

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇLARIN ABSORPSİYONU VE PERMEABİLİTESİ ÜZERİNE
MALNÜTRİSYONUN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ecz. Fatma KIR

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇLARIN ABSORPSİYONU VE PERMEABİLİTESİ ÜZERİNE
MALNÜTRİSYONUN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ecz. Fatma KIR

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Selma ŞAHİN

ANKARA

2024

ONAY SAYFASI**İLAÇLARIN ABSORPSİYONU VE PERMEABİLİTESİ ÜZERİNE MALNÜTRİSYONUN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ****Fatma KIR****Danışman: Prof. Dr. Selma ŞAHİN**

Bu tez çalışması 29.11.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof. Dr. İmran Vural</i>	<i>(imza)</i>
	<i>Hacettepe Üniversitesi</i>	
Üye:	<i>Prof. Dr. Zeynep Şafak Teksin</i>	<i>(imza)</i>
	<i>Gazi Üniversitesi</i>	
Üye:	<i>Prof. Dr. Sibel Pehlivan</i>	<i>(imza)</i>
	<i>Hacettepe Üniversitesi</i>	
Üye:	<i>Prof. Dr. Tuba İnceçayır</i>	<i>(imza)</i>
	<i>Gazi Üniversitesi</i>	
Üye:	<i>Doç. Dr. Tuğba Gülsün İnal</i>	<i>(imza)</i>
	<i>Hacettepe Üniversitesi</i>	

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

12 Aralık 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

7.

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

29/11/2024

Fatma KIR

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tez erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tez erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Selma ŞAHİN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Fatma KIR

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince bilgisi ve deneyimi ile bana yol gösteren, özveri ve sabırla beni destekleyen değerli danışmanım Prof. Dr. Selma Şahin'e en içten dileklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Farmakokinetik modelleme konusunda engin bilgi ve tecrübelerini paylaşan Prof. Dr. William J. Jusko'ya, lisansüstü derslerinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Donald E. Mager'a, ADAPT 5 yazılımı konusunda bana yardımcı olan Prof. Dr. David Z. D'Argenio'ya en içten dileklerimle teşekkür ederim. Modelleme konusunda bana destek veren Dr. Xiaonan Li'ye, eşsiz arkadaşlıkları ve çalışmalarına verdikleri bilimsel ve manevi destekleri için Dr. Ruihong Yu ve Dr. Javiera Cortés-Ríos'a, yardımları için Ecz. Wensi Wu'ya ve Dr. Jusko'nun tüm laboratuvar ekibine sonsuz teşekkür ederim. Enerjik ve pozitif yaklaşımları ile beni her zaman motive eden ve öğrenme sürecimi daha keyifli ve verimli bir hale getiren Prof. Dr. Jean-Baptiste Woillard'a ve bölüm başkanı Prof. Dr. Pierre Marquet'e sonsuz teşekkür ederim. Tüm doktora sürecimde beni manevi olarak destekleyen Prof. Dr. İmran Vural'a teşekkür ederim. Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erem Bilensoy'a sağladıkları olanaklar ve destekleri için teşekkürlerimi sunarım. Tez izleme komitesinde yer alan hocalarım Doç. Dr. Tuğba Gülsün İnal'a ve Prof. Dr. Tuba İnceçayır'a teşekkürlerimi sunarım. Doktora sürecim boyunca desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Levent Öner'e, Prof. Dr. Filiz Öner'e, Prof. Dr. Hakan Eroğlu'na ve Doç. Dr. Ayşegül Doğan'a teşekkür ederim. Doktora sürecimde beni motive eden ve yol gösteren Dr. Ecz. Nihan İzat'a çok teşekkür ederim. Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma bilimsel ve manevi katkılarından dolayı çok teşekkür ederim. Doktora sürecimde hep yanımda olan Ecz. Meryem Ermiş'e, Uzm. Ecz. Merve Kurt'a, Uzm. Ecz. Fatima Al-Sulaiti'ya, Uzm. Biyomühendis Ayşe Demiral'a, Ecz. Betül Gür'e, Dr. Ecz. Ece Türkmen'e, Dr. Ecz. Melih Zeki Kaya'ya, Ecz. Şemsi Muratoğlu'na, Uzm. Ecz. Ayşenur Çağ'a, Ecz. Yaşar Furkan Kılınboz'a ve Ecz. Alperen Ağca'ya teşekkürlerimi sunarım. Doktora sürecimde bana manevi olarak destek olan Prof. Dr. Yılmaz Çapan ve Doç. Dr. Semih Çalamak başta olmak üzere Lokman Hekim Üniversitesi'ne teşekkür ederim. Başta annem Dilek Kır, babam Hacı Veli Kır ve kardeşim Osman Eren Kır olmak üzere sevgiyle ve sabırla tüm doktora sürecimde yanımda olan, destek ve cesaret veren aileme çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarımı yürütmem için proje desteği sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne (Proje Kodu: TSA-2022-19747) teşekkürlerimi sunarım. Doktora sürecimi YÖK 100/2000 doktora bursu ile destekleyen Yükseköğretim Kurulu (YÖK)'na teşekkür ederim. ERASMUS+ staj hareketliliği kapsamında beni destekleyen Hacettepe Üniversitesi'ne teşekkür ederim. 2211-C programı ile yurt içi doktora tez çalışmalarımı, 2214-A programı ile yurt dışı doktora tez çalışmalarımı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kır F., İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Malnütrisyonun Etkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2024. Malnütrisyonunda görülen patofizyolojik değişiklikler gastrointestinal kanaldan ilaç emilimini etkilemektedir. Bu tezin amacı, malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda bağırsaklardan farklı mekanizmalara (transselüler ve paraselüler) absorplanan model maddelerin (metoprolol ve atenolol) *in vitro* hücre kültürü ve *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmaları ile absorpsiyonu/permeabilitesinin incelenmesi, *in vivo* ve farmakokinetik modelleme çalışmaları yapılarak değerlendirilmesidir. Ayrıca, metoprololün absorpsiyon ve permeabilitesindeki değişim P-gp, CYP3A4 ve PMAT inhibitörleri (elakridar, ketokonazol ve verapamil) kullanılarak araştırılmıştır. Deneyler sonunda elde edilen numunelerdeki madde miktarları valide edilmiş HPLC metodları ile analiz edilmiştir. *In vivo* veriler modelden bağımsız yöntem, minimal fizyolojik esaslı farmakokinetik modelleme çalışmaları ve popülasyon farmakokinetiği analizleri ile değerlendirilmiş ve farmakokinetik parametrelerin kestirimleri yapılmıştır. Transport çalışmalarının sonuçlarına göre malnütrisyon geliştirilen HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinden atenololün permeabilitesi artarken ($p<0,05$) metoprololün permeabilitesinde malnütrisyonla ilgili olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. *In situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen sonuçlar malnütrisyonlu grupta atenololün jejunum ve ileumdan permeabilitesi artarken ($p<0,05$), kolondan permeabilitesinin değişmediğini göstermiştir. Ancak metoprololün jejunum ve ileumdan permeabilitesi malnütrisyonunda değişmezken, kolondan permeabilitesi anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). *In vivo* plazma konsantrasyon-zaman profilleri 2-3 aşamalı sıfıncı derece absorpsiyon kinetiğe göre tanımlanmış ve malnütrisyonlu sıçanların ilaç maruziyetlerindeki artış açıklanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar malnütrisyonunda model ilaçların permeabilite/absorpsiyonlarının değişebileceğini kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: ADME, bağırsak perfüzyonu, beta-blokör, farmakokinetik modelleme, hücre kültürü, malnütrisyon.

Destekleyen Kurumlar: Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: TSA-2022-19747). Fatma KIR, Yükseköğretim Kurulu (YÖK) 100/2000 Doktora bursu ile ve 2211-C ve 2214-A bursları ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Kir F., Investigation the Effect of Malnutrition on the Absorption and Permeability of Drugs. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD. Thesis in Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Ankara, 2024. Pathophysiological changes seen in malnutrition affect drug absorption from the gastrointestinal tract. The aim of thesis is to investigate the absorption/permeability of model compounds (metoprolol and atenolol) absorbed from the intestines by different mechanisms (transcellular and paracellular) in malnourished rats using *in vitro* cell culture and *in situ* intestinal perfusion studies and their evaluation by *in vivo* and pharmacokinetic modeling studies. In addition, the change in absorption and permeability of metoprolol were investigated using P-gp, CYP3A4, and PMAT inhibitors (elacridar, ketoconazole, and verapamil). The amount of compounds in samples obtained from the experiments was analyzed by validated HPLC methods. *In vivo* data were evaluated by model-independent method, minimal physiologically based pharmacokinetic modeling and population pharmacokinetic analyses and pharmacokinetic parameters were estimated. According to the results of transport studies, while the permeability of atenolol increased in malnourished HCT-8 and Caco-2 cells ($p < 0.05$), no significant difference was observed in the permeability of metoprolol in malnourished cells. Results from *in situ* intestinal perfusion studies showed that permeability of atenolol across jejunum and ileum increased in malnourished groups ($p < 0.05$), while its colonic permeability did not change. On the other hand, while the permeability of metoprolol across jejunum and ileum did not change in malnutrition, its colonic permeability decreased significantly ($p < 0.05$). *In vivo* plasma concentration-time profiles were characterized by 2-3 stage zero-order absorption kinetics, and increase in drug exposure in malnourished rats was explained. The results obtained from this study proved that the permeability/absorption of model compounds may change in malnutrition.

Keywords: ADME, intestinal perfusion, beta-blocker, pharmacokinetic modelling, cell culture, malnutrition.

Supporting Organizations: This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: TSA-2022-19747). Fatma KIR was supported by Council of Higher Education (YÖK) 100/2000 PhD grant and The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) 2211-C and 2214-A grants.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gastrointestinal Sistemin Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri	4
2.2. Gastrointestinal Kanaldan İlaç Absorpsiyonu	6
2.3. Bağırsak Permeabilitesi Tayin Yöntemleri	9
2.3.1. İnsanlarda Farmakokinetik Çalışmalar	10
2.3.2. İntestinal Permeabilite Yöntemleri	10
2.4. Malnütrisyon Tanımı, Sınıflandırması ve Görülme Sıklığı	12
2.5. Malnütrisyonun Vücutta Meydana Getirdiği Değişiklikler	15
2.6. Malnütrisyonun İlaçların Farmakokinetiği Üzerine Etkisi	17
2.7. Malnütrisyonunda Yapılan Farmakokinetik Çalışmalar	24
2.8. Farmakokinetik Modelleme	33
2.8.1. mPBPK Model	39
2.8.2. Popülasyon Farmakokinetiği (popPK)	41
2.9. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Özellikleri	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	50
3.1. Gereçler	50
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Biyolojik Maddeler	50
3.1.2. HPLC Gereçleri	51
3.1.3. Perfüzyon Gereçleri	51
3.1.4. Aletler	52

3.1.5. Deney Hayvanı	53
3.2. Yöntem	53
3.2.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	53
3.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	65
3.2.3. Hayvan Deneyleri	73
3.2.4. Modelden Bağımsız Yöntem İle Analiz	85
3.2.5. Minimal Fizyolojik Esaslı Farmakokinetik Modelleme	86
3.2.6. Veri Analizi	95
3.2.7. İstatistiksel Analiz	99
4. BULGULAR	100
4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu	100
4.2. Biyoanalitik Yöntem Validasyonu	100
4.2.1. Seçicilik (<i>Selectivity</i>)	100
4.2.2. Özgüllük (<i>Specificity</i>)	101
4.2.3. Matriks Etkisi (<i>Matrix Effect</i>)	103
4.2.4. Kalibrasyon Doğrusu ve Aralığı (<i>Calibration Curve and Range</i>)	105
4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik (<i>Accuracy and Precision</i>)	110
4.2.6. Analit Taşınması (<i>Carry-over</i>)	112
4.2.7. Kararlılık (<i>Stability</i>)	113
4.2.8. Enjeksiyonlar Arası Tekrar Edilebilirlik (<i>Reinjection Reproducibility</i>)	116
4.2.9. Geri Kazanım (<i>Recovery</i>)	118
4.2.10. Sistem Uygunluk Testleri (<i>System Suitability Tests</i>)	119
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	120
4.3.1. Hücre Canlılığı Testleri	122
4.3.2. Çift Yönlü Transport Çalışmaları	132
4.4. Hayvan Deneyleri	138
4.4.1. Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları	140
4.4.2. <i>In vivo</i> Çalışmalar	152
4.5. Modelden Bağımsız Yöntem	154
4.6. Minimal Fizyolojik Esaslı Farmakokinetik Modelleme	155
5. TARTIŞMA	174
5.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	174
5.2. Malnütrisyon Geliştirilmesi	176

5.2.1. <i>İn vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	176
5.2.2. Hayvan Deneyleri	177
5.3. Bağırsak Permeabilitesini Tayin Etmek Amacıyla Yapılan Çalışmalar	183
5.3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	183
5.3.2. <i>İn situ</i> Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları	189
5.3.3. İnsan Absorpsiyon Derecesinin Kestirimi Çalışmaları	197
5.4. <i>İn vivo</i> Çalışmalar	198
5.5. Modelden Bağımsız Yöntem	199
5.6. Minimal Fizyolojik Esaslı Farmakokinetik Modelleme Çalışmaları	200
5.6.1. Ön Modelleme Çalışmaları	203
5.6.2. Model İyileştirme ve Parametre Kestirimi	205
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	207
7. KAYNAKLAR	212
8. EKLER	238
EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi	
EK-2: Etik Kurul Revizyonları	
EK-3: Monolix ve ADAPT 5 Programları ile Uygulanan Kodlar	
EK-4: Turnitin Dijital Makbuz	
EK-5: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

A-B	Apikalden bazolaterale geçiş
ADME	Absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon
AIC	Akaike Bilgi Kriteri, <i>The Akaike information criterion</i>
AMAL	Akut malnütrisyon
ATN	Atenolol
AU	Arbitrar birim, <i>arbitrary unit</i>
AUC	Eğri altında kalan alan, <i>Area under the curve</i>
b	Orantısal hata terimi
B-A	Bazolateralden apikale geçiş
BDDCS	Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi
BIC	Bayes Bilgi Kriterleri, <i>Bayesian information criterion</i>
BK	Bulunan konsantrasyon
BKİ	Beden kitle indeksi
BSH	Bağıl standart hata
BSS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
BSV	Bireyler arası değişkenliği, <i>between-subjects variability</i>
C_b	Bazolateral bölgedeki konsantrasyon
C_{in}	Segmente giren perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu
CL	Toplam klerens, sistemik (böbrek) klerensi
CL_{int}	Karaciğerdeki (C _{hep}) intirinsik klerens
C_{maks}	İlacın kanda ulaştığı maksimum konsantrasyonu
CONUT	Beslenme durumunun kontrolü, <i>Controlling Nutritional status</i>
C_{out}	Segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu
C_p	Plazma ilaç konsantrasyonu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELA	Elakridar
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
F	Biyoyararlanım

$f_{a, \text{man}}$	İnsanlarda absorplanan fraksiyon
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü, <i>Food and Agriculture Organization</i>
FBS	Fetal bovin serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FK	Fenol kırmızısı
fr	CL_{int} 'in fraksiyonu
f_u	Bağlanmamış ilaç fraksiyonu
GFR	Glomerüler filtrasyon hızı
GİS	Gastrointestinal sistem/kanal
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi, <i>International Council for Harmonisation</i>
IV	İntravenöz
IVIVC	İn vitro in vivo korelasyon
k_a	Absorpsiyon hız sabiti
KET	Ketokonazol
KMAL	Kronik malnütrisyon
LLOQ	En düşük kalibrasyon sınırı, <i>Lower limit of quantification</i>
LOD	Saptayabilme sınırı, <i>Limit of detection</i>
LOQ	Kantitasyon sınırı, <i>Limit of quantification</i>
LY	Lucifer sarısı, <i>Lucifer Yellow</i>
MES	2-Morfolinoetansülfonik asit
MET	Metoprolol tartarat
mPBPK	Minimal fiyolojik esaslı farmakokinetik
OCT	Organik katyon taşıyıcı
OGS	Ortalama geçiş süresi
P_{app}	Görünür permeabilite
PBPK	Fizyolojik esaslı farmakokinetik
$P_{\text{eff, man}}$	İnsanlarda efektif permeabilite değerleri
PEM	Protein-enerji malnütrisyonu, protein-kalori malnütrisyonu
P-gp	P-glikoprotein

PK/PD	Farmakokinetik/farmakodinamik
PMAT	Plazma membran monoamin taşıyıcı
Q	Perfüzyon çözeltisinin akış hızı
RSH	Relatif standart hata
SH	Standart hata
TEER	Transepitel elektrik rezistans, <i>Transepithelial/transendothelial electrical resistance</i>
VER	Verapamil
VK	Varyasyon katsayısı



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Gastrointestinal kanalın yapısı ve bağırsaklardan absorpsiyon mekanizmaları.	7
2.2. Malnütrisyonun sınıflandırması.	12
2.3. PEM çalışmalarında kullanılan ilaçların BSS'ye göre sınıflandırılması.	28
2.4. PEM çalışmalarında kullanılan ilaçların BDDCS'ye göre sınıflandırılması.	28
2.5. Obezite çalışmalarında kullanılan ilaçların BSS'ye göre sınıflandırılması.	32
2.6. Obezite çalışmalarında kullanılan ilaçların BDDCS'ye göre sınıflandırılması.	33
2.7. Atenololün kimyasal yapısı.	42
2.8. Metoprolol tartaratın kimyasal yapısı.	44
2.9. Elakridarin kimyasal yapısı.	46
2.10. Fenol kırmızısının kimyasal yapısı.	47
2.11. Ketokonazolün kimyasal yapısı.	48
2.12. Verapamil hidroklorürün kimyasal yapısı.	49
3.1. Pik kuyruklanma faktörü (T) hesabı.	65
3.2. Hücre canlılığı testi için AMAL ve KMAL geliştirme yöntemleri.	67
3.3. Model etkin maddeler için çift yönlü transport çalışmalarının şematik gösterimi.	72
3.4. İnhibitör kullanılan çift yönlü transport çalışmalarının şematik gösterimi.	72
3.5. Sıçanlar için hazırlanan %5 ve %20 protein içeren yemler.	74
3.6. Perfüzyon sistemi ve cerrahi yöntemin şematik olarak gösterilmesi.	79
3.7. Perfüzyon deneyi akış şeması.	79
3.8. Sıçan plazmasından ATN ve MET'in ekstraksiyonu için kullanılan yöntem.	85
3.9. Farmakokinetik model geliştirme süreci.	87
3.10. ATN için üç doku kompartmanlı mPBPK model yapısı.	88
3.11. MET için üç doku kompartmanlı mPBPK model yapısı.	90
4.1. Optimum koşullarda ATN, MET ve FK'nin eş zamanlı analizi ile elde edilen HPLC kromatogramı.	100
4.2. Matrikslerin ve ATN-MET-FK'nin kolona enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramları.	101
4.3. Hareketli faz içinde ATN ve LY'nin enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı.	102

4.4.	Hareketli faz içinde MET ve ELA enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı.	102
4.5.	Hareketli faz içinde MET ve KET enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı.	102
4.6.	Hareketli faz içinde MET ve VER enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı.	103
4.7.	ATN'nin hareketli fazdaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (ortalama $\pm$ standart sapma (SS); n=6).	105
4.8.	MET'in hareketli fazdaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).	106
4.9.	FK'nin hareketli fazdaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).	107
4.10.	ATN'nin plazmadaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).	109
4.11.	MET'in plazmadaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).	109
4.12.	HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinin <i>inverted</i> mikroskoptaki görüntüleri.	121
4.13.	HCT-8 hücrelerinde ATN ile yapılan hücre canlılığı testi sonuçları (ortalama $\pm$ standart hata (SH); n=3).	123
4.14.	HCT-8 hücrelerinde ATN ile yapılan hücre canlılığı testi sonuçlarının karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SH; n=3).	124
4.15.	HCT-8 hücrelerinde MET ile yapılan hücre canlılığı testi sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=3).	126
4.16.	HCT-8 hücrelerinde MET ile yapılan hücre canlılığı testi sonuçlarının karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SH; n=3).	127
4.17.	Sağlıklı Caco-2 hücrelerinde yapılan 24, 48 ve 72 saatlik hücre canlılığı testi sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=3).	129
4.18.	Caco-2 hücrelerinde kontrol, sağlıklı ve KMAL geliştirilen hücrelerde ATN ve MET uygulanarak yapılan 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarının karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SH; n=3).	131
4.19.	LY'nin kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).	133
4.20.	Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen HCT-8 hücrelerine ATN ve MET'in uygulanması sonucu elde edilen görünür permeabilite değerleri (ortalama $\pm$ SH, n=4).	135
4.21.	Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen HCT-8 hücrelerine MET ve inhibitörlerin uygulanması sonucu elde edilen görünür permeabilite değerleri (ortalama $\pm$ SH, n=4).	135

4.22.	Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen Caco-2 hücrelerine ATN ve MET'in uygulanması sonucu elde edilen görünür permeabilite değerleri (ortalama $\pm$ SH, n=4).	136
4.23.	Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen Caco-2 hücrelerine MET ve inhibitörlerin uygulanması sonucu elde edilen görünür permeabilite değerleri (ortalama $\pm$ SH, n=4).	137
4.24.	Malnütrisyon geliştirilen sıçanların karaciğer yapısı.	140
4.25.	<i>In situ</i> bağırsak perfüzyonu çalışmalarında ATN uygulanan segmentlerden (jejunum, ileum, kolon) elde edilen ilaç konsantrasyonunun FK'ye göre normalize edilmiş değerleri. Mavi çizgiler sağlıklı yeşil çizgiler ise malnütrisyon geliştirilen sıçanların sonuçlarını göstermektedir (ortalama $\pm$ SS; n=4).	142
4.26.	<i>In situ</i> bağırsak perfüzyonu çalışmalarında MET uygulanan segmentlerden (jejunum, ileum, kolon) elde edilen ilaç konsantrasyonunun FK'ye göre normalize edilmiş değerleri. Mavi çizgiler sağlıklı yeşil çizgiler ise malnütrisyon geliştirilen sıçanların sonuçlarını göstermektedir (ortalama $\pm$ SS; n=4).	143
4.27.	<i>In situ</i> bağırsak perfüzyonu çalışmalarında MET ve ELA uygulanan segmentlerden (jejunum, ileum, kolon) elde edilen ilaç konsantrasyonunun FK'ye göre normalize edilmiş değerleri. Mavi çizgiler sağlıklı yeşil çizgiler ise malnütrisyon geliştirilen sıçanların sonuçlarını göstermektedir (ortalama $\pm$ SS; n=4).	144
4.28.	ATN için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).	146
4.29.	MET için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).	146
4.30.	ELA ile uygulanan MET için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).	147
4.31.	Sıçanlara oral yolla ATN, MET ve MET+ELA uygulanmasıyla elde edilen plazma konsantrasyon-zaman profilleri (ortalama $\pm$ SS, n=4).	153
4.32.	ATN'nin plazma konsantrasyon- zaman profilinin popülasyon uyumları. Semboller gözlemleri, çizgiler ise popülasyon uyumlarını göstermektedir. Kesikli çizgi k_{03} olmadan popülasyon uyumu göstermektedir.	156
4.33.	mPBPK modeli kullanılarak IV ve oral dozlar için ATN'nin plazma konsantrasyonunun ortak uyumunu göstermektedir. Semboller gözlemleri, çizgiler ise mPBPK modeliyle uyumunu göstermektedir. Kesikli çizgi k_{03} olmadan uyumu göstermektedir.	157
4.34.	MET'in plazma konsantrasyonunun zamana göre profilinin popülasyon uyumları. Semboller gözlemleri, çizgiler ise popülasyon uyumunu göstermektedir.	161

4.35.	mPBPK modeli kullanılarak IV ve oral dozlar için MET'in plazma konsantrasyonunun ortak uyumu. Semboller gözlemleri çizgiler ise mPBPK modeliyle uyumu göstermektedir.	162
4.36.	ATN için gözlemlere karşı kestirimlerin grafiği.	166
4.37.	MET için gözlemlere karşı kestirimlerin grafiği.	167
4.38.	ATN için rezidüellerin dağılım grafiği.	168
4.39.	MET için rezidüellerin dağılım grafiği.	169
4.40.	ATN için görsel kestirim kontrol grafiği.	170
4.41.	MET için görsel tahmini kontrol grafiği.	171
4.42.	ATN ve MET için simülasyonlar ve harici veri setleri ile karşılaştırma. Semboller gözlemleri ($\pm 2SD$), düz çizgi ve kesikli çizgi sırasıyla ADAPT ve Monolix tarafından kestirimi yapılan profilleri göstermektedir.	172

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. Yetişkinlerin vücut kitle indeksine göre sınıflandırılması.	14
2.2. Marasmus ve kwashiorkorda vücuttaki değişiklikler.	16
2.3. Malnütrisyonunda vücuttaki fizyolojik değişiklikler.	17
2.4. PEM'in ADME parametreleri üzerindeki etkisi.	18
2.5. Obezitenin ADME parametreleri üzerindeki etkisi.	22
2.6. PEM'de kullanılan ilaçların ADME parametrelerindeki değişimler.	25
2.7. Etkin maddelerin BSS ve BDDCS'ye göre sınıflandırılması.	27
2.8. Obezitede kullanılan ilaçların dağılımı ve eliminasyonundaki değişiklikler.	30
2.9. Klasik ve PBPK modellerin karşılaştırılması.	35
2.10. Obezitede farmakokinetik modelleme yaklaşımları.	37
3.1. ATN ve MET'in tayininde kullanılan HPLC yöntemleri.	54
3.2. Metot optimizasyonu ve geliştirilen HPLC metot taslağı.	56
3.3. <i>In vivo</i> çalışmalarda kullanılan HPLC yöntemi.	59
3.4. <i>In vitro</i> ve <i>in situ</i> çalışmalar için validasyon çalışmalarında kullanılan kalite kontrol standartları ve konsantrasyonları.	62
3.5. <i>In vivo</i> çalışmalar için validasyon çalışmalarında kullanılan kalite kontrol standartları ve konsantrasyonları.	62
3.6. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan ortamlar ve içerikleri.	68
3.7. Transport çalışmalarında uygulanan maddeler ve konsantrasyonları.	70
3.8. Transport çalışmaları deney tasarımı.	71
3.9. %5 ve %20 kcal protein içeren yemlerin formülleri.	74
3.10. Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi.	76
3.11. ATN ve MET için ekstraksiyon yöntemleri.	82
4.1. Perfüzyon çözeltileri kullanılarak hazırlanan çözeltilere ait analiz sonuçları (ortalama $\pm$ standart hata, SH; n=3).	104
4.2. Plazma örnekleri kullanılarak elde edilen ilaç çözeltilerine ait analiz sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=3).	104
4.3. ATN, MET ve FK'ye ait doğrusallık bulguları.	108
4.4. Plazmadan analiz edilen ATN ve MET'e ait doğrusallık bulguları.	110

4.5.	ATN, MET ve FK'nin günler arası ve gün içi kesinlik ve doğruluk sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=6).	111
4.6.	ATN ve MET'in günler arası ve gün içi kesinlik ve doğruluk sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=6).	112
4.7.	Hareketli faz içindeki ATN, MET ve FK'nin buzdolabında (+4°C'de) 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca kararlılık çalışması (ortalama $\pm$ SS; n=3).	113
4.8.	Hareketli faz içindeki ATN, MET ve FK'nin buzlukta (-20°C'de) 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca kararlılık çalışması (ortalama $\pm$ SS; n=3).	114
4.9.	Hareketli faz içindeki ATN, MET ve FK'nin buzdolabında (+4°C'de) 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca dayanıklılığına ait konsantrasyon sonuçları (ortalama $\pm$ SS; n=3).	114
4.10.	Hareketli faz içindeki ATN, MET ve FK'nin buzlukta (-20°C'de) 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca dayanıklılığına ait konsantrasyon sonuçları (ortalama $\pm$ SS; n=3).	115
4.11.	Plazma içindeki ATN ve MET'in buzlukta (-20°C'de) 1 hafta boyunca kararlılık çalışmasına ait bulgular (ortalama $\pm$ SS; n=3).	115
4.12.	Plazmadaki ATN ve MET'in buzlukta (-20°C'de) 1 hafta boyunca dayanıklılığına ait konsantrasyon sonuçları (ortalama $\pm$ SS; n=3).	116
4.13.	ATN, MET ve FK'nin HPLC ile analizinde yönteminin enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirliğinin değerlendirmesine ait bulgular (ortalama $\pm$ SH; n=6).	117
4.14.	ATN ve MET'in HPLC ile analizinde yönteminin enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirliğinin değerlendirmesine ait bulgular (ortalama $\pm$ SS; n=6).	117
4.15.	ATN, MET ve FK için geliştirilen HPLC metodu için geri kazanım çalışmasına ait bulgular (ortalama $\pm$ SH; n=6).	118
4.16.	ATN ve MET için geliştirilen HPLC metodu için geri kazanım çalışmasına ait bulgular (ortalama $\pm$ SS; n=6).	119
4.17.	ATN, MET ve FK için sistem uygunluk test kriterleri ve elde edilen analiz sonuçları.	119
4.18.	Plazmadan analiz edilen ATN ve MET için sistem uygunluk test kriterleri ve elde edilen analiz sonuçları.	120
4.19.	Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen HCT-8 hücrelerinden elde edilen görünür permeabilite katsayıları (ortalama $\pm$ SH, n=4).	134
4.20.	Sağlıklı ve KMAL geliştirilen Caco-2 hücrelerinden elde edilen görünür permeabilite katsayıları (ortalama $\pm$ SH, n=4).	136
4.21.	<i>İn situ</i> çalışmalarda kullanılan sıçanların ağırlık, serum albümin ve total kolesterol değerleri (ortalama $\pm$ SS; n=4).	138

4.22.	<i>İn vivo</i> çalışmalarda kullanılan sıçanların ağırlık, serum albümin ve total kolesterol değerleri (ortalama $\pm$ SS; n=4).	139
4.23.	Sağlıklı ve malnütrisyonlu gruplarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler (ortalama $\pm$ SS; n=4).	141
4.24.	ATN ve MET için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).	145
4.25.	ATN ve MET için tayin edilen k_a değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).	149
4.26.	Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda hesaplanan net su akış değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).	150
4.27.	ATN ve MET için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% f_a) (ortalama $\pm$ SH; n=4).	151
4.28.	ATN ve MET için tahmin edilen insan P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).	151
4.29.	ATN ve MET için modelden bağımsız yöntem ile tayin edilen farmakokinetik parametreler (ortalama $\pm$ SS; n=4).	154
4.30.	Atenolol için kestirilen popülasyon farmakokinetik parametreleri.	158
4.31.	Naif havuzlama ile elde edilen ATN ortak uyumlu model için kestirimi yapılan farmakokinetik parametreler.	159
4.32.	Metoprolol için kestirilen popülasyon farmakokinetik parametreleri.	163
4.33.	Naif havuzlama ile elde edilen MET ortak uyumlu model için kestirimi yapılan farmakokinetik parametreler.	164
5.1.	CONUT ile malnütrisyon derecesinin değerlendirilmesi.	179
5.2.	Serum albümin düzeyi ve vücut ağırlığı analizine göre malnütrisyon derecesinin değerlendirilmesi.	180

1. GİRİŞ

İlaçlar enteral (oral) ve parenteral (topikal, sublingual ve transdermal gibi) olmak üzere birçok yoldan uygulanabilmektedir. Bu yollardan en çok tercih edileni oral yoldan ilaç uygulamasıdır. Oral yoldan ilaç uygulaması güvenli, kolay ve ekonomik olmakla birlikte ilaçların absorpsiyon ve biyoyararlanımları etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri, dozaj şeklinin özellikleri ve fizyolojik etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

Protein-enerji malnütrisiyonu (PEM, protein-kalori malnütrisiyonu), sıklıkla bebeklerde ve çocuklarda görülen, genellikle enfeksiyonla ilişkili, hafiften şiddetliye kadar değişen bir dizi protein ve kalori eksikliğinden kaynaklanan patolojik bir durum olarak tanımlanmaktadır (1). Son 30 yılda hastanede yatan hastalarda malnütrisiyonun görülme sıklığı %19 ile %80 arasında değişmektedir (2). Malnütrisiyon 5 yaşından küçük çocuklarda yılda 10,8 milyon ölümün yaklaşık yarısından doğrudan veya dolaylı olarak sorumludur. Az gelişmiş ülkelerde olduğu kadar gelişmiş ülkelerde de görülmektedir (3). Bu durum yetersiz gıda alımından kaynaklanmakla beraber bir hastalık nedeniyle de ortaya çıkabilmektedir. Anoreksiya nervoza, kanser ve AIDS gibi hastalıklar genellikle düşük gıda alımına, yetersiz besin tüketimine/absorpsiyonuna ve buna bağlı olarak gelişen besin maddelerine artan gereksinime ya da aşırı kaybına yol açabilmektedir. Kanser hastalarının yaklaşık %50'si hastalığın seyri sırasında yetersiz beslendiği için (4) bu durum kemoterapiye toleransın ve bağışıklığın bozulmasına yol açabilmektedir (5). Ayrıca, HIV/AIDS ve tüberküloz gibi hastalıklar genellikle malnütrisiyonla beraber bulunup bağışıklık azaldığında ortaya çıkmaktadır (6).

Oral yoldan verilen ilaçlar, sistemik dolaşıma girmeden önce çeşitli süreçlerden (tablet formunda ilacın çözünmesi ve etkin maddenin gastrointestinal sistem/kanal (GİS)'dan absorpsiyonu) geçerek GİS'ten absorbe edilmektedir (7). İlaçların absorpsiyonu; ilacın çözünürlüğüne, çeşitli pH değerlerinde iyonlaşmasına, GİS'in yüzey alanına ve bağırsaklardan geçiş süresine bağlıdır.

Malnütrisiyon bağırsak dokularının fizyolojik fonksiyonlarını/durumlarını etkileyebilir. Örneğin mukozal kütle, bağırsak protein içeriği ve toplam bağırsak yüzey

alanı malnütrisyonunda önemli ölçüde azalmaktadır. Ayrıca, fırça kenar membranlarının kolesterol ve fosfolipit bileşimi (lipit:protein ve kolesterol:fosfolipit oranları) artmaktadır (8). Toplam bağırsak yüzey alanının malnütrisyonunda azalması (9) temel besin maddelerinin malabsorbsiyonuna yol açabilmektedir (10).

Malnütrisyonunda ilaçların absorpsiyonlarında meydana gelen değişikliği araştıran çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle, bu çalışmada bağırsaklardan farklı mekanizmalarla (transselüler ve paraselüler) absorplanan model etkin maddelerin (metoprolol tartarat; MET ve atenolol; ATN) absorpsiyon ve permeabilitesi üzerine malnütrisyonun etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda;

- Biyoanalitik Yöntem Geliştirilmesi
 - Yapılacak hücre kültürü ve *in situ* perfüzyon çalışmalarında kullanılmak üzere biyoanalitik yöntemin geliştirilmesi ve validasyonu,
 - Yapılacak *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilen biyoanalitik yöntemin modifiye edilmesi ve validasyonu yapılacaktır.
- Hücre Kültürü Çalışmaları
 - Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak en uygun ATN ve MET konsantrasyonunun tespiti amacıyla hücre canlılığı testleri,
 - Normal ve malnütrisyon geliştirilmiş HCT-8 (insan ileoçekal kolorektal kanser hücre hattı) ve Caco-2 (insan kolon kanser hücre hattı) hücrelerinde çift yönlü transport çalışmaları (apikalden bazolaterale ve bazolateralden apikale doğru) ile ATN ve MET'in permeabiliteleri tayin edilecektir.
- *In Situ* Perfüzyon Çalışmaları
 - Kontrol (sağlıklı) ve malnütrisyon geliştirilmiş sıçanlarda üçlü bağırsak perfüzyonu (jejunum, ileum, kolon) çalışmaları ile ATN ve MET'in absorpsiyonu ve permeabilitesi incelenecektir.

- *In Vivo* Çalışmalar
 - Kontrol (sağlıklı) ve malnütrisyon geliştirilmiş sıçanlarda ATN ve MET'in oral yolla uygulanmasından sonra plazma konsantrasyon-zaman eğrilerinden farmakokinetik parametreleri tayin edilecektir.
- Farmakokinetik Modelleme Çalışmaları
 - Literatürden fizyolojik (kan akış hızı ve doku hacimleri gibi) ve plazma profillerine dair (intravenöz, IV ATN ve IV MET uygulaması) verilerin toplanması,
 - Minimal fizyolojik esaslı farmakokinetik (mPBPK) modellerin geliştirilmesi,
 - Oral ve IV profillerin ayrı ayrı ve birlikte model uyumlarının sağlanması,
 - Popülasyon analizlerinin yapılması ve model optimizasyonu çalışmaları yapılacaktır.

Yapılacak tüm çalışmalar sonucu elde edilen bulgular literatürde yer alan bilgiler ile kıyaslanarak malnütrisyonun ilaç absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerindeki etkisi değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

İlaçlar hastalıkların teşhisi, tedavisi ve önlenmesi için sistemik ya da lokal etki elde etmek amacı ile enteral (oral) ve parenteral (topikal, sublingual, transdermal, rektal, intravenöz, nazal, bukkal, vajinal gibi) yollardan uygulanmaktadır. Bu uygulama yolları arasında en yaygın olanı oral yoldan ilaç uygulamasıdır. Oral ilaç uygulaması hasta uyuncu yüksek, genellikle güvenli, uygulama kolaylığı sağlayan ve ekonomik olan bir yoldur. Ayrıca, oral yoldan yüksek miktarda ilaç verilebilmekte ve çeşitli formülasyonlar sayesinde ilaçların salımları uzatılabilmektedir (11, 12).

Oral yoldan ilaç uygulamasında ilacın sistemik dolaşıma geçerek farmakolojik etki gösterebilmesi için GİS'ten geçerek absorbe olması gerekmektedir. İlaçların absorpsiyonu temel olarak ilaçların fizikokimyasal özelliklerine (partikül büyüklüğü, polimorfizm ve tuz-ester yapıları gibi), dozaj şekline ait faktörlere (dozaj şekli tipi ve formülasyondaki yardımcı maddeler gibi) ve fizyolojik faktörlere (pH, mide-bağırsak kanalından geçiş süresi ve bireysel farklılıklar gibi) bağlı olarak değişmektedir (11, 13-16). Oral yoldan uygulanan bir ilaç GİS'ten geçerken enterositlerdeki enzimler ile yıkıma uğrayabilir ve karaciğerde metabolize edilebilir. Bu nedenle ilacın biyoyararlanımı bu işlemlerden kurtulan değişmemiş ilaç fraksiyonuna bağlı olarak değişebilmektedir (17).

Bir ilacın gastrointestinal kanaldan absorpsiyonunda hız kısıtlayan iki temel parametre çözünürlük ve permeabilitedir. Çözünürlüğü düşük olan etkin maddeler için çözünme hızı, permeabilitesi (GİS membranından geçme hızı) düşük olan etkin maddeler için ise GİS membranlarından geçme hızı, hız kısıtlayıcı basamak olarak kabul edilmektedir (18).

2.1. Gastrointestinal Sistemin Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri

GİS, ağızdan başlayarak anüste sonlanmakta ve sindirimi sağlayan segmentlerden (mide, ince bağırsak ve kalın bağırsak gibi) oluşmaktadır. Ayrıca sindirim sürecinde karaciğer, safra kesesi ve pankreas gibi yardımcı organlar da görev almaktadır. Ağız, ilaçların ilk işleme uğradığı yer olup sindirimin başladığı yerdir. Yüzey

alanı küçük (yaklaşık 100 cm²) olmakla beraber kan ve lenf damarları açısından zengin olduğu için kısa sürede yüksek kan ilaç seviyeleri elde edilebilmektedir. Oral mukozadan absorpsiyon genellikle pasif difüzyon ile olup, ilaçların tükrükle uzaklaştırılmasına bağlı olarak absorpsiyonda değişiklikler ve düzensizlikler olabilmektedir. İlaçlar oral mukozadan absorplandıklarında jugular ven ile sistemik dolaşıma geçtikleri için ilk geçiş etkisi görülmemektedir. Yutak ve mide özefagus ile birleşmektedir. Özefagus yaklaşık 20-22 cm uzunluğunda ve 2,5 cm çapında olan üçte ikisi çizgili, üçte biri ise düz kastan oluşan bir borudur (pH 5-6). İlaçların sağlıklı bireylerde özefagustan geçiş süreleri kısa ($9,4 \pm 2$ saniye) olduğu için ilaç absorpsiyonu yoktur (19). Mide (uzunluk: 20 cm, genişlik: 15 cm, pH 1,2-3,5) üç bölgeden oluşmaktadır (fundus, gövde ve pilor). Fundus, sindirim gazlarını toplar; gövde, hidroklorik asit ve pepsinojen; pilor, mukus, gastrin ve hidroklorik asit salgılamaktadır. Mukus salgısı ile mide yüksek asit içeriklerine karşı korunmaktadır, gastrin ise hidroklorik asit salgılanmasını uyarmaktadır. Hidroklorik asit salgılanması sonucunda azalan pH, pepsinojeni pepsine dönüştürerek aktifleştirmektedir. Midenin yüzey alanı küçük (yaklaşık 1 m²) olsa da aspirin, fenitoin ve varfarin gibi ilaçlar mideden absorplanmaktadır (20-22). İnce bağırsak yaklaşık 6 metre uzunluğunda olup duodenum (uzunluk: 20-30 cm; pH: 6,5-7,6), jejunum (uzunluk: 2,5 m; pH: 6,3-7,3) ve ileum (uzunluk: 3,5 m; pH: 7,6) olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. İnce bağırsağın yüzey alanı kıvrımlı yapısından dolayı (Kerckring kıvrımları, villus ve mikrovillus (*brush border*, fırça kenar)) oldukça fazladır (200 m²) ve kan akış hızı yüksektir (25 mL/dk x 100 g) (23).

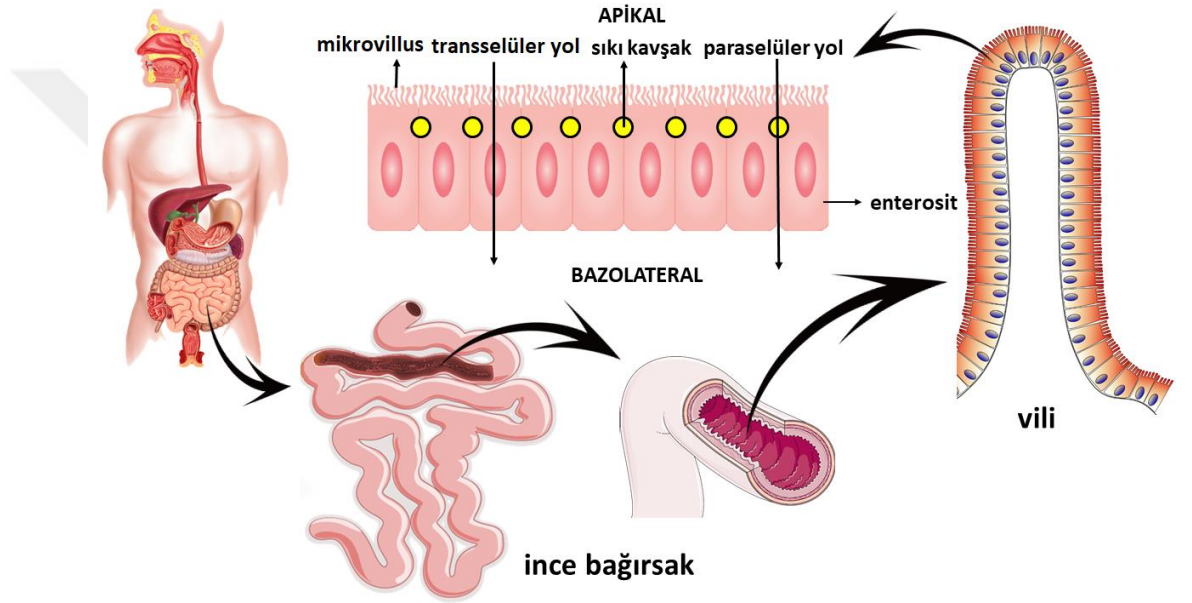
Duodenum ve jejunumda bulunan Kerckring kıvrımları yüzey alanında yaklaşık üç katlık bir artış sağlar. Bağırsak lümeni içine doğru çıkıntıları olan villuslar duodenum ve ileumda genişken, jejunumda uzun ve incedir ve yüzey alanında 30 katlık bir artış sağlamaktadır. Mikrovilluslar ise ince bağırsağın yüzey alanında yaklaşık 600 katlık artış sağlamaktadır (16). Bu nedenle, ince bağırsak, ilaçların absorpsiyonu için GIS'in en önemli bölgelerindendir ve birçok ilacın absorbe olduğu yerdir. İlaçların absorpsiyonu bağırsak segmentlerine göre farklılık gösterebilmektedir. Örneğin duodenum ve jejunumdaki absorpsiyon ileuma kıyasla daha fazladır. Bunun nedeni

duodenum ve jejunumdaki villus ve mikrovillus yoğunluğunun daha fazla olmasıdır. Ayrıca enterositlerin apikal (lümen) ve bazolateral (kan) yüzeylerinde absorptif (*influx*, *uptake*) ve eksorptif (*efflux*) taşıyıcı proteinler yer almaktadır. Mikrovillusların uç kısımlarında, birçok ilacın metabolizasyonundan sorumlu olan CYP3A4 gibi enzimler de bulunmaktadır. *Influx* taşıyıcılar (OATP'ler, OAT'ler ve OCT'ler gibi) substratı olan ilaçların absorpsiyonunu arttırırken, *efflux* taşıyıcılar (P-gp, BCRP ve MRP2 gibi) substrat ilaçların absorpsiyonu genellikle azaltmaktadır. Kalın bağırsak (uzunluk: 1,5 m; pH: 7,5-8) çekum (uzunluk: 10-30 cm, genişlik: 7 cm), kolon (uzunluk: 150 cm, genişlik: 5 cm) ve rektumdan (uzunluk: 15-19 cm, genişlik: 2,5 cm) oluşmaktadır. Kalın bağırsağın başlıca işlevleri arasında sindirilemeyen besinlerin feçes ile atılması, feçesten suyun absorpsiyonu ve bağırsak bakterileri tarafından üretilen esansiyel vitaminlerin absorpsiyonu yer almaktadır. Kalın bağırsağın yüzey alanı villuslar bulunmadığı için ince bağırsağa kıyasla daha küçük olsa da kolon duvarında yer alan haustra adı verilen kese şeklindeki katmanlar sayesinde kolon genişleyip uzayabilmektedir (24). Kolon, su ve elektrolitlerin absorpsiyonundan sorumludur ve bu bölge çözünürlüğü az olan ve geciktirilmiş salım sağlayan ilaçların absorpsiyonu için önemli bir öneme sahiptir (16). Ayrıca, ilaçların kısmi olarak da olsa ilk geçiş etkisinden kaçışı ve kontrollü salım sağlayan ilaçların absorpsiyonunun sağlanması nedenleri ile rektal yolla da ilaç uygulaması yapılmaktadır. Diğer yandan, rektal mukozanın yapısı nedeni ile ilaçların düzensiz absorbe olması ve yüzey alanının küçük olmasından dolayı sınırlı ilaç absorpsiyonu rektal yolun sakıncaları arasında yer almaktadır (25).

2.2. Gastrointestinal Kanaldan İlaç Absorpsiyonu

Oral yoldan uygulanan ilaçların absorbe olarak etki edeceği bölgeye ulaşmaları için GİS membranı da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik membranlardan geçmek zorundadır. İlaçların bağırsak epitelinde absorpsiyonu temel olarak transselüler ve paraselüler (interselüler) yol olarak iki mekanizmaya göre gerçekleşmektedir (Şekil 2.1.). Transselüler yol ile membranlardan geçen ilaçların absorpsiyonu pasif difüzyon, taşıyıcılar aracılığıyla (*carrier-mediated*) transport (kolaylaştırılmış pasif difüzyon ve aktif transport), veziküler transport, konvektif (por) transport ve iyon çifti oluşumu

gibi mekanizmalarla gerçekleşmektedir (21). Transselüler yol ile absorplanan ilaçlara metoprolol, propranolol, fenitoin ve naproksen örnek olarak verilebilmektedir (26). Paraselüler yol ile absorbe olan ilaçlar epitel hücreler arasındaki boşluklardan geçmekte ve fırça kenarın altında yer alan sıkı kavşaklar (*tight junction*) tarafından kontrol edilmektedir (27). Jejunumun por çapı 0,8 nm, ileum ve kolonun ise 0,3 nm olduğu için büyük moleküllü ilaçlar paraselüler yol ile absorbe olamamaktadır (22). Paraselüler yol ile absorplanan ilaçlara atenolol, mannitol, ranitidin ve simetidin örnek olarak verilebilmektedir (28-33).



Şekil 2.1. Gastrointestinal kanalın yapısı ve bağırsaklardan absorpsiyon mekanizmaları.

İlaçların GİS'ten absorpsiyonunda etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri, farmasötik dozaj şeklinin özellikleri ve fizyolojik faktörler etkili olmaktadır. Çözünmüş ve non-iyonize halde olan maddeler gastrointestinal membrandan geçebilmektedir. Bu nedenle, partikül büyüklüğü, kristal form, polimorfizm ve tuz şekli gibi çözünürlüğe etki eden faktörler, ilacın iyonizasyonunu etkileyen ortam pH'sı ve ilacın pKa'sı ilaç absorpsiyonunu etkilemektedir (34-37). Yağda yüksek çözünürlük gösteren ilaçların lipid yapıdaki hücre membranından permeabilitesi yüksektir. Farmasötik dozaj şeklinin formülasyonunda yer alan yardımcı maddeler ilacın çözünürlük özelliklerini,

GİS'te kalma süresini ya da hücre membranlarından geçişini değiştirerek ilacın absorpsiyonunda değişikliğe neden olabilmektedir (38). İlaçların absorpsiyonu, absorpsiyon bölgesinde kalış süresi ile de ilişkilidir. Mide boşalma süresinde gecikmeye (yağlı ve sıcak besin tüketimi; antikolinerjik ve trisiklik antidepresanlar gibi ilaçların kullanımı ve mide ülseri gibi nedenler) bağlı olarak ilaçların absorpsiyon hızları yavaşlayarak absorpsiyon dereceleri değişebilmektedir (11, 16, 39, 40). Peristaltik hareketler sayesinde duodenumdaki ilacın mukozal hücreler ile teması artmaktadır. Fiziksel aktiviteler, yaş ve hastalık gibi faktörler peristaltik hareketi etkileyerek intestinal motiliteyi ve buna bağlı olarak da ilaçların absorpsiyonunun etkilemektedir (16, 39, 40). Ayrıca, konjestif kalp yetmezliği gibi hastalık durumlarında kan akış hızının azalmasına bağlı olarak ilaçların ince bağırsaktan uzaklaşma hızı ve biyoyararlanımı da azalabilmektedir (16).

Bireyler arasında yaş, cinsiyet ve çeşitli patolojik durumlar gibi farklılıklar ilaçların absorpsiyonlarını değiştirebilmektedir. Bireylerin yaşlarına bağlı olarak organ kan akış hızlarında azalma, GİS motilitesinde değişiklik, gastrik pH'da artma ve enzimatik aktivitelerde değişiklik olabilmektedir (16). Ayrıca, bireylerin cinsiyetlerine bağlı olarak vücut ağırlığı, vücuttaki kas ve yağ oranları, hormon seviyeleri, plazma protein seviyesi, enzim (sitokrom P450 gibi) aktiviteleri, ilaç taşıyıcılarının fonksiyonlarındaki farklılıklarından dolayı ilaçların absorpsiyonu değişebilmektedir (21). Enzimler (sitokrom P450 gibi) ve taşıyıcı proteinlerin (P-gp ve BCRP gibi) ekspresyon derecelerinde birey içi ve bireyler arasında olan genetik polimorfizme bağlı olarak ilaçların absorpsiyonunda farklılıklar görülebilmektedir (41). Karaciğer (siroz gibi), böbrek (böbrek yetmezliği gibi) ve kardiyovasküler sistem fonksiyonlarının hastalıklara bağlı olarak bozulması sonucu ilaçların absorpsiyonu değişebilmektedir (42). Ayrıca, malnütrisyon ve Crohn hastalığı gibi GİS'ten absorpsiyonu etkileyen hastalıklara bağlı olarak da ilaçların absorpsiyonlarında değişiklikler meydana gelebilmektedir (11).

2.3. Bağırsak Permeabilitesi Tayin Yöntemleri

Etkin maddelerin permeabilitesi, fiziokokimyasal özellikleri (molekül büyüklüğü ve lipofilisite gibi), bağırsağın membran yapısı ve transport mekanizmaları gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Permeabilitede meydana gelen değişiklik, ilaçların absorpsiyonlarını dolayısıyla da biyoyararlanımlarını değiştirmektedir.

Etkin maddeler çözünürlük ve permeabilite özellikleri doğrultusunda Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BSS) göre dört sınıfa ayrılmaktadır (Sınıf I, yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite; Sınıf II, düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite; Sınıf III, yüksek çözünürlük ve düşük permeabilite; Sınıf IV düşük çözünürlük ve düşük permeabilite). Avrupa İlaç Ajansı (EMA), BSS'ye göre bioeşdeğerlik başvuruları için insanlarda tam absorpsiyonun (absorpsiyon derecesi $\geq$ %85) kanıtlanmasını talep etmektedir. Tam absorpsiyon yüksek permeabilite ile ilişkilidir. Tam absorpsiyonun tayininin mutlak biyoyararlanım ya da kütle denge çalışmaları ile yapılması önerilmektedir (43). Kütle denge çalışmalarında, absorbe edilen ilaç fraksiyonun tayini için kullanılan metabolitler absorpsiyondan sonra oluşmalıdır. Bu nedenle, etkin maddenin mide/bağırsakta parçalanmadığından/metabolize olmadığından emin olunmalıdır. Metabolizasyon (Faz I oksidasyon ve Faz II konjugasyon) sadece absorpsiyondan sonra meydana gelmektedir. Böylece oluşan metabolitlerin idrar ve feçesten geri kazanımıyla ilacın idrardan geri kazanılan miktarının toplamı uygulanan dozun $\geq$ %85 ise elde edilen veriler tam absorpsiyonu desteklemektedir (43).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) etkin madde GiS'te stabilse kütle denge ya da mutlak biyoyararlanım çalışmaları ile uygulanan ilaç dozun absorpsiyon derecesi $\geq$ %85 ise etkin maddenin yüksek permeabilite gösterdiğini kabul etmiştir (44). Etkin maddelerin permeabilite özellikleri (i) kütle denge çalışmaları (insanda), (ii) mutlak biyoyararlanım çalışmaları ve (iii) intestinal perfüzyon çalışmaları yöntemleri ile tayin edilebilmektedir. İnsanların kullanılmadığı yöntemlerde, uygun bir hayvan modelinde

(örn. sıçan) *in vivo* ve *in situ* intestinal perfüzyon çalışması ve/veya *in vitro* permeabilite çalışmaları (intestinal doku kesitleri/epitel hücre tek tabakasıyla) ile permeabilite tayinlerinin yapılması tasviye edilmektedir. Permeabilite tayin yöntemleri aşağıda özetlenmektedir.

2.3.1. İnsanlarda Farmakokinetik Çalışmalar

- **Kütle Denge Çalışmaları**

Kütle denge çalışmaları ile işaretli olmayan, dayanıklı izotop/radyoaktif işaretli ilaç etkin maddeleri kullanılarak ilacın absorpsiyon derecesi tayin edilmektedir. Bu kapsamda yer alacak yeterli sayıda gönüllü olmalı ve böylece absorpsiyon dereceleri güvenilir olarak tayin edilebilmektedir. Ayrıca, kütle denge çalışmalarında ilacın $\geq 85\%$ 'i idrarla değişmeden atılmıyorsa ilacın GIS'de dayanıklı olduğunun da kanıtlanması gerekmektedir.

- **Mutlak Biyoyararlanım Çalışmaları**

Oral yoldan uygulanan bir ilacın mutlak biyoyararlanımı IV yoldan uygulanan ilacın sistemik dolaşıma geçen ilaç miktarına oranlanması ile hesaplanmaktadır. Bu çalışmalarda da yeterli sayıda gönüllüye yer verilerek tayin edilen absorpsiyon derecesinin güvenilir olması sağlanmalıdır. FDA'ya göre ilacın mutlak biyoyararlanımının $\geq 85\%$ olduğu kanıtlanırsa GIS'teki stabilitesinin kanıtlanması için ek veri sunulması gerekmemektedir.

2.3.2. İntestinal Permeabilite Yöntemleri

Bu yöntem, ince bağırsak hücrelerinden pasif difüzyonla geçen etkin maddeler için uygundur. İnsanlarda bazı ilaçların permeabilitelerinin düşük olmasının nedeni etkin maddenin *efflux* taşıyıcıların (P-gp gibi) substratları olmalarından kaynaklanabilmektedir. Permeabilite tayini için kullanılan sistemlerde *efflux* taşıyıcı proteinleri bulunmuyorsa/*efflux* taşıyıcı proteinlerin ekspresyonları düşükse, etkin

maddelerin permeabilitesi yanlış tayin edilerek sınıflandırmada hatalar yapılabilmektedir. Bu nedenle etkin maddenin permeabilite sınıfını tayin etmek için kullanılan sistemlerde *efflux* taşıyıcı proteinlerin varlığı siklosporin A, vinblastin ve rodamine 123 gibi model ilaçlar ile çift yönlü transport çalışmaları yapılarak kanıtlanmalıdır.

FDA tarafından permeabilite tayini için önerilen yöntemler aşağıda sıralanmıştır:

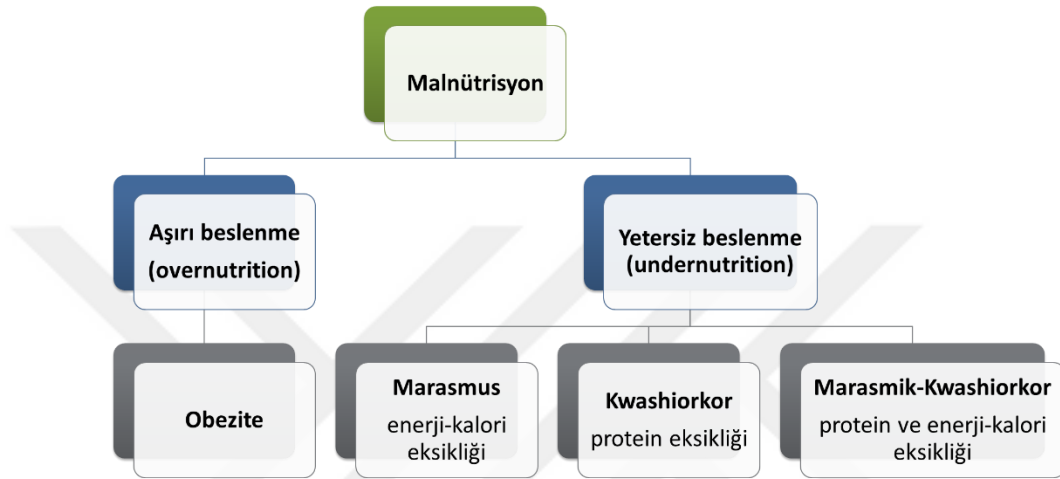
- ✓ *In vivo* bağırsak perfüzyonu (insanda)
- ✓ Hayvan modelleri (sıçan gibi) ile *in vivo/in situ* bağırsak perfüzyonu
- ✓ Bağırsak dokuları (insan/hayvan) kullanılarak *in vitro* permeasyon
- ✓ *In vitro* permeasyon (tek tabakalı epitel hücreden)

Mutlak biyoyararlanım $\geq$ %85 ise, uygulanan ilacın $\geq$ %85'i idrarla değişmeden atılıyorsa, uygulanan ilacın $\geq$ %85'i GİS'de stabil olup idrardan değişmeden veya metabolitine dönüşerek geri elde edilebiliyorsa permeabilite tayini için tek bir yöntem yeterli olmaktadır. Aksi taktirde, FDA iki farklı yöntemin kullanılmasını tavsiye etmektedir. Farklı permeabilite tayin yöntemleri arasındaki veriler çelişkili ise insanlardan elde edilen verilerin, *in vitro* ya da hayvanlardan elde edilen veriler yerini alacağı belirtilmiştir. Etkin maddenin permeabilitesinin sınırı etkin maddenin insandaki absorpsiyon derecesine (dolaylı) ve intestinal membranından (insan) kütle transfer hızının ölçümüne (doğrudan) bağlıdır (45). Ayrıca, FDA'nın ilk kılavuzunda etkin maddenin yüksek permeabilite sınırı olan $\geq$ %90 absorpsiyon derecesi, daha sonra yayımlanan kılavuzda EMA ile uyumlu hale getirilmiştir ($\geq$ %85) (44, 46).

Tez kapsamında seçilen model ilaçların (ATN ve MET) permeabilitelerinin tayini için *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ve lümen kayıp esasına dayanan *in situ* üçlü intestinal bağırsak perfüzyonu yöntemi kullanılmıştır.

2.4. Malnütrisyon Tanımı, Sınıflandırması ve Görülme Sıklığı

Malnütrisyon, yetersiz beslenme ve aşırı beslenmeyi kapsayan ve farklı alt gruplara ayrılan “kötü beslenme” anlamına gelmektedir (47). Malnütrisyon, yetersiz beslenme anlamında kullanılsa da aşırı beslenme de malnütrisyonla dahil edilmektedir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Malnütrisyonun sınıflandırması (47).

• Protein-Enerji Malnütrisyonu (PEM)

PEM, genellikle enfeksiyonla ilişkili, hafiften şiddetliye kadar değişen bir dizi protein ve kalori eksikliğinden kaynaklanan ve sıklıkla bebeklerde ve çocuklarda görülen patolojik bir durumdur (1). Kwashiorkor, marasmus ve marasmik-kwashiorkor, 1962 yılında Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, *Food and Agriculture Organization*) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ; *The World Health Organization*, WHO) tarafından PEM olarak tanımlanmıştır (48). Kwashiorkor, enerjiye kıyasla proteinin ciddi eksikliği; marasmus ise protein ve kalori eksikliği olan bir diyetle beslenme ile ortaya çıkmaktadır (49, 50).

Sudan, Etiyopya, Bangladeş, Burkina Faso ve Kamerun'da yaygın olan marasmusun görülme sıklığı, Uganda, Zambiya, Nijerya ve Kolombiya gibi ülkelerde yaygın olan kwashiorkordan daha yüksektir (48). 1970 yılında yapılan bir çalışmaya göre gelişmekte olan ülkelere kwashiorkorun görülme sıklığı %0,2-1,6 iken,

marasmusun görülme sıklığı %1,2-6,8'dir (48). Kwashiorkor genellikle 1-4 yaş arası çocuklarda görülürken, marasmus genellikle 1 yaş altı çocuklarda görülür (51). Bu nedenle PEM üzerine yapılan çalışmalar esas olarak çocuklara odaklanmıştır. Kwashiorkor ödemli çocuklarda, marasmus yaşına göre düşük kilolu çocuklarda ve marasmik-kwashiorkor her ikisine de sahip çocuklarda görülmektedir (52). Bunlar DSÖ tarafından belirlenen güncel antropometrik standartlara göre kabul edilmiştir (48). PEM'i belirlemek için çocuğun antropometrik, biyokimyasal ve klinik olarak taraması yapılmaktadır (53). Çocuklarda PEM için antropometrik göstergeler aşağıda listelenmiştir:

- ✓ *bodurluk (stunting)*: yaşa göre boy z-skoru küresel medyan değerinin -2 standart sapmanın (SS) altında olması,
- ✓ *zayıflık (wasting)*: boya göre ağırlık z-skoru küresel medyan değerinin -2 SS'nin altında olması,
- ✓ *düşük kiloluluk (underweight)*: yaşa göre ağırlık z-skoru küresel medyan değerinin -2 SS'nin altında olmasıdır (54).

Yaşa göre düşük ağırlık terimi hem bodur hem de zayıf çocukları kapsadığından (55), yaşa göre ağırlık kullanımı 1972'de Waterlow tarafından boya göre ağırlık olarak değiştirilmiştir (55). Beslenme durumu, boy ve kilo ölçülüp, ölçümlerin DSÖ tarafından tanımlanan standart ölçümlerle karşılaştırılmasıyla değerlendirilmektedir (54). DSÖ'nün, özellikle hekimlere ve sağlık çalışanlarına şiddetli yetersiz beslenmenin yönetimi konusunda tavsiyelerde bulunmak için yetersiz beslenme konusunda kılavuzları vardır. Ayrıca DSÖ tarafından şiddetli akut yetersiz beslenmesi olan bebekler ve çocuklar için yayınlanan bir kılavuz da vardır (56, 57).

Malnütrisyon, az gelişmiş ülkelerde olduğu kadar gelişmiş ülkelerde de görülmektedir (14). Bu durum yetersiz gıda alımından kaynaklanmakla beraber bir hastalık nedeniyle de ortaya çıkabilmektedir. Anoreksiya nervoza, kanser ve AIDS gibi hastalıklar genellikle düşük gıda alımına, yetersiz besin tüketimine/absorpsiyonuna ve buna bağlı olarak gelişen besin maddelerine artan gereksinimine ya da aşırı kaybına yol açabilmektedir.

- **Obezite**

Vücutta anormal ve aşırı yağ birikimi obezite olarak tanımlanmaktadır (58). Obezitenin sınıflandırılmasına yönelik farklı yaklaşımlar mevcuttur, yetişkinlerde aşırı kilonun derecesini belirlemek için kullanılan en yaygın yöntem beden kitle indeksine (BKİ) göre değerlendirmedir (59). BKİ, boy-kilo endeksi ve hesaplanan kilogramın yetişkin boyunun metre cinsinden karesine bölünmesiyle elde edilen bir indekstir (Tablo 2.1.).

Malnütrisyonun sınıflarından birisi olan normalde daha az ağırlıkta olan bireylerin BKİ değeri $18,5 \text{ kg/m}^2$ 'den azdır. BKİ değeri 30 kg/m^2 'nin üzerinde olduğunda ise obezite görülmektedir. Obezite temel olarak üç düzeyde (Sınıf I, II ve III) incelenir ve Sınıf III obez morbid obez olarak bilinmektedir.

Tablo 2.1. Yetişkinlerin vücut kitle indeksine göre sınıflandırılması (59).

Durum	BKİ (kg/m^2)
zayıf (<i>underweight</i>)	$< 18,50$
normal	$18,50 - 24,99$
fazla kilolu (<i>overweight</i>)	$\geq 25,00$
obez öncesi (<i>pre-obese</i>)	$25,00 - 29,99$
sınıf I obez - orta derecede obez	$30,00 - 34,99$
sınıf II obez - aşırı obez	$35,00 - 39,99$
sınıf III obez - çok aşırı obez	$\geq 40,00$

Çocuklarda obezite sınırları, çocukların BKİ'lerinin olgunlaşma süreçleri nedeniyle değişken olmasından dolayı yetişkinlerden farklı şekilde değerlendirilmiştir. Bu sınıflandırma, 5-19 yaş arası çocuklar için zayıflık ($< -2 \text{ SS}$), aşırı kiloluluk ($+1 \text{ SS}$ ile $> +2 \text{ SS}$ arasında) ve obezlik ($> +2 \text{ SS}$) olarak belirlenmiştir. 5 yaşından küçük çocuklarda obezite, boy-kilo oranının DSÖ Çocuk Büyüme Standartları medyanından $+3 \text{ SS}$ olması şeklinde tanımlanmaktadır (59).

2.5. Malnütrisyonun Vücutta Meydana Getirdiği Değişiklikler

Malnütrisyonunda görülen patofizyolojik değişiklikler ilaçların absorpsiyonunu, proteine bağlanmasını, hepatik metabolizasyonunu ve renal eliminasyonunu etkilediğinden malnütrisyonlu hastalarda ilacın atılımı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Bu nedenle malnütrisyonlu hastalarda uygulanan ilaç dozunun ayarlanması gerekebilmektedir (7, 60).

• Protein-Enerji Malnütrisyonu (PEM)

Açlık ve PEM’de vücut ağırlığında, mukozal kütlede, bağırsak protein içeriğinde ve toplam bağırsak yüzey alanında önemli azalmalar meydana gelmektedir (8). Lunn ve ark. bebeklerdeki malabsorpsiyonun PEM’e neden olabileceğini belirtmiştir (10). Tüm vücut oksijen tüketiminin %17- 25’inden sorumlu olan ince bağırsaklarda (61), besin alımının azalması veya tamamen kesilmesi durumunda metabolik olaylar belirgin şekilde etkilenmektedir (8). Toplam bağırsak yüzey alanının açlık durumunda azalmasının villusların seviyelerindeki azalmaya bağlı olabileceği düşünülmektedir (9).

PEM görülen yavru tavşanlarda, yüksek lipid:protein oranı dahil olmak üzere, fırça kenar membranlarının kolesterol ve fosfolipit bileşiminde değişiklikler gözlenmiştir. Ayrıca hem kolesterol hem de fosfolipit membran bileşenleri ve kolesterol:fosfolipit oranı artmıştır (8).

Açlık ve malnütrisyon:

- ✓ İnce bağırsağın mukozal yapısı ve taşıma işlevi üzerinde önemli etkilere sahiptir (8),
- ✓ Oluşan mukozal atrofi, besinlerin bağırsaklardan total absorpsiyonunu azaltmaktadır (8),
- ✓ Makromoleküllerin bağırsak boyunca hareketini arttırmaktadır (8),
- ✓ Fırça kenar membranı boyunca endositotik alımın artmasına bağlı olarak makromoleküllerin absorpsiyonunu arttırmaktadır (62, 63).

PEM'de vücut ağırlığında, mukoza kütlesinde ve villus düzeyinde azalma olurken, bağırsaklardaki makromoleküllerin ve kolesterol fosfolipit membran bileşenlerinin hareketinde artış görülmektedir (8). Marasmus ve kwashiorkorda vücutta meydana gelen değişiklikler Tablo 2.2.'de özetlendiği gibi birbirinden farklıdır.

Tablo 2.2. Marasmus ve kwashiorkorda vücuttaki değişiklikler (48).

Marasmus	Kwashiorkor
Yetersiz enerji alımı	Yetersiz protein alımı
Ödem yok	Ödem var
Deri altı yağ dokusu kaybı	Yağlı karaciğer
'Yaşlı adam' görünümü	'Ay dede yüzü' görünümü
Vücut ağırlığı çok düşük	Vücut ağırlığı düşük
Ciltte kuruluk ve kırısklık	Bağırsaklarda patojen bakteriler
Leptin miktarında azalma	Plazma proteinlerinde azalma
İştah artışı	İştah azalması

- **Obezite**

Obezitede toplam akciğer kapasitesi azalırken kan viskozitesi, hepatik klerens ve arteriyel kan basıncı artmaktadır (8-10, 59, 61, 64). Obezitede mutlak yağ dokusu kütlesi ve yağsız vücut kütlesi daha fazladır (65). Ayrıca, obezitede yağ kütlesinin toplam vücut ağırlığına oranı artmaktadır (59).

PEM ve obezitede vücutta olan fiziksel değişiklikler Tablo 2.3.'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Malnütrisyonunda vücuttaki fizyolojik değişiklikler (8-10, 59, 61, 64).

Yetersiz beslenme	Aşırı beslenme
Artış	
- fırça kenar membranı - kolesterol fosfolipit membran bileşenleri - kolesterol:fosfolipit - bağırsak boyunca makromoleküllerin hareketi - fırça kenar membranı boyunca endositotik alım	- kan viskozitesi - sistemik basınç - mide boşalması - hepatik klerens - karaciğerde yağlanma - glomerüler filtrasyon hızı - kan hacmi - arteriyel basınç - C reaktif protein - tümör nekroz faktörü - akciğer kan hacmi - O₂ tüketimi
Azalma	
- vücut ağırlığı - mukozal kütle - bağırsak protein içeriği - toplam bağırsak yüzey alanı - villus seviyesi	toplam akciğer kapasitesi

2.6. Malnütrisyonun İlaçların Farmakokinetiği Üzerine Etkisi

Malnütrisyonunda vücutta oluşan patofizyolojik değişikliklere bağlı olarak ADME parametrelerinde değişiklikler olabilmektedir (66). Bu nedenle öncelikle malnütrisyonunda vücutta oluşan değişimlerin detaylı olarak tanımlanması ve ADME parametreleri ile ilişkilendirilmesi gerekmektedir. Böylece ilaçların farmakokinetik özelliklerinde olası değişimler ortaya koyulabilecektir (67).

• Protein-Enerji Malnütrisyonu (PEM)

PEM'in ilaçların absorpsiyonu üzerine etkisi değişkendir. PEM'in ilaçların absorpsiyonu üzerine etkisini inceleyen çalışmalarda aspirin, gentamisin, metronidazol, fenitoin gibi ilaçların absorpsiyonunun önemli ölçüde etkilenmediği (68-70) kloramfenikol, parasetamol, sülfadiazin gibi ilaçların absorpsiyonunun önemli

ölçüde arttığı (71-73) tespit edilmiştir. Diğer yandan, karbamazepin (74) ve klorokin (75) gibi ilaçların absorpsiyonu malnütrisyonunda önemli ölçüde azalmıştır.

PEM, ilaçların proteinlere bağlanmasını da etkilemektedir. PEM’de bazı ilaçların (kloramfenikol, digoksin, para-amino salisilik asit, salisilat, streptomisin, sülfametoksazol gibi) proteine bağlanması önemli ölçüde azalırken (76-80), klorokin (80) proteinlere bağlanması artmıştır. Ancak kinin (81), gentamisin (78), izoniazid (78, 79), rifampisin (78, 79), fenitoin (78) gibi ilaçların proteinlere bağlanma oranı çocuklarda değişmemiştir (81).

PEM’de, erlotinib gibi P-gp substratı olan ilaçların absorpsiyonu ve klerensi (5-florourasil, metotreksat, antrasiklinler, vinka alkaloitler, etoposide gibi) etkilenecek farmakokinetik özelliklerinde değişiklikler meydana geldiği gösterilmiştir, ancak diğer taşıyıcı proteinler için bu durumun geçerli olmadığı belirtilmiştir (82). İlaçların ADME parametrelerinin PEM’de gözlenen patofizyolojik değişikliklere bağlı olarak değişimi Tablo 2.4.’te özetlenmektedir.

Tablo 2.4. PEM'in ADME parametreleri üzerindeki etkisi (8).

Parametre	Etki
Absorpsiyon	- malabsorpsiyon - toplam bağırsak absorpsiyonunda azalma - makromoleküllerin absorpsiyonunda artma - P-gp substratlarının absorpsiyonunda değişiklik
Dağılım	ilaçların proteinlere bağlanmasında değişiklik
Metabolizma	hepatik metabolizmada değişiklik
Eliminasyon	- P-gp substratlarının klerensinde değişiklikler - renal eliminasyonda değişiklik - esas olarak karaciğerde metabolize olan ilaçların toplam klerensinde azalma ve eliminasyon yarılanma ömürlerinde artma - monoklonal antikorların ve FcRn aracılı ilaçların farmakokinetiğinde değişiklik

FcRn, neonatal Fc reseptörü; P-gp, P-glikoprotein.

Absorpsiyon

Oral yoldan verilen ilaçlar, sistemik dolaşıma girmeden önce çeşitli süreçlerden (tablet formunda ilacın çözünmesi gibi) geçerek absorbe edilmektedir (7). İlaçların absorpsiyonu, ilacın çözünürlüğüne, ortam pH'sında iyonlaşmasına, GİS'in yüzey alanına ve bağırsak geçiş süresine bağlıdır (83, 84). PEM sonucu GİS yapısında meydana gelen değişikliğe bağlı olarak ilaçların absorpsiyonunda da değişiklikler olabilmektedir (7).

PEM, bağırsak dokularının fizyolojik fonksiyonlarını/durumlarını etkileyebilmektedir. PEM'de mukozal kütle, bağırsak protein içeriği ve toplam bağırsak yüzey alanı önemli ölçüde azalmaktadır. Ayrıca, fırça kenar zarlarının kolesterol ve fosfolipit bileşimi (örneğin, lipit:protein ve kolesterol:fosfolipit oranları) artmaktadır (8). Toplam bağırsak yüzey alanı genellikle PEM'de azalmakta (9) ve bu muhtemelen villus seviyesindeki azalmadan kaynaklanmaktadır (8). Bu durum temel besin maddelerinin malabsorbsiyonuna yol açabilmektedir (10). Ayrıca hem kwashiorkor hem de marasmusun bağırsak mikrobiyotasında genel tür çeşitliliğinin (özellikle anaerobik türlerde) azaldığı bulunmuştur. Ancak, bu durumun kwashiorkorda marasmustan daha belirgin olduğu tespit edilmiştir (48). PEM'de sık görülen ishal ve kusma sonucu oral yolla kullanılan ilaçların bağırsaktan geçiş süresi kısalabilmekte ve bu durum ilaçların çeşitli derecelerde malabsorbsiyonuna yol açabilmektedir (60, 85).

Literatürde PEM'de ilaçların absorpsiyonundaki değişikliklere ilişkin çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Altı sağlıklı ve beş kwashiorkorlu çocuğa tek doz oral klorokin (10 mg/kg) uygulanmıştır. Plazma klorokin konsantrasyonlarına göre, ortalama AUC değerleri kwashiorkorlu ve sağlıklı çocuklar için sırasıyla 40 ± 34 ng.sa/mL ve 134 ± 99 ng.sa/mL olarak bulunmuştur. Ortalama AUC değerinin kwashiorkorlu çocuklarda sağlıklı çocuklara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p < 0,001$) daha düşük olduğu bulunmuştur (75).

Beş sağlıklı ve yedi kwashiorkorlu çocuğa nazogastrik tüp aracılığıyla 50 mL su içinde tek doz (40 mg) kafein verilmiştir. CYP1A2 enzimi tarafından metabolize edilen

kafeinin AUC değerleri kwashiorkorlu çocuklarda artmıştır. Bu artış CYP1A2 enzim aktivitesinin kwashiorkorlu çocuklarda sağlıklı çocuklara kıyasla önemli ölçüde azalmasına bağlıdır. Sağlıklı çocuklarda AUC değeri $22,7 \pm 15,6$ (ortalama $\pm$ SS) $\mu\text{g.sa/mL}$ iken kwashiorkorlu çocuklarda AUC değeri ($67,2 \pm 37,5 \mu\text{g.sa/mL}$) anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$) (86).

Dağılım

Plazma; albümin, alfa-1 asit glikoprotein, lipoprotein ve globulin gibi proteinleri içermektedir (7). Albümin ve globulin seviyeleri PEM'de değişmektedir. Hem çocuklarda hem de yetişkinlerde PEM'de protein sentezinde önemli bir azalma tespit edilmiştir (55). Tüm vücuttaki protein sentezi ve yıkım oranları kwashiorkorlu çocuklarda marasmuslu çocuklara göre daha yavaştır. Ayrıca, kwashiorkorlu çocuklarda hipoalbüminemi görülmektedir (49).

İlaçların özelliklerine (asidik, bazik gibi) bağlı olarak plazma proteinlerine bağlanma oranları farklılık gösterebilmektedir. İlaçlar ve plazma proteinleri arasındaki bu etkileşimin bir sonucu olarak ilaçların vücutta dağılım özellikleri ve etkileri değişebilmektedir (87). PEM'de albümin ve globulin seviyeleri değiştiğinden, albümin ve globuline yüksek oranda bağlanan ilaçların farmakokinetik özelliklerinde değişiklikler meydana gelmektedir (78, 88).

İlaç-protein bağlanma özelliklerindeki değişim, ilacın dağılımını, yarılanma ömrünü ve eliminasyonunu da değiştirebilmektedir (7). Dağılım hacmi küçük olan ilaçların serbest ilaç fraksiyonlarının dağılım hacmi büyük ölçüde değişirken, dağılım hacmi büyük olan ilaçlarda görülen serbest ilaç fraksiyonlarındaki değişim ilaçların doku bağlanma özelliklerine bağlıdır (7). Ayrıca, serbest ilacın klerensi organ kan akışından azsa, klerens her zaman bağlanma özelliklerine bağlı olmaktadır. Diğer yandan, ekstraksiyon oranı düşükse, eliminasyon perfüzyon oranı ile sınırlı olacaktır (89).

Altı ay ile altı yaş arasındaki on iki sağlıklı, sekiz marasmuslu ve beş kwashiorkorlu Etiyopyalı çocuğa 5 mg/kg dozunda intravenöz (IV) teofilin

uygulanmıştır. Teofilinin V_d değerleri sağlıklı, marasmuslu ve kwashiorkorlu çocuklar için sırasıyla $504,2 \pm 44,3$; $677,5 \pm 50,1$ ve $724,6 \pm 60,3$ mL/kg olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre, V_d 'nin marasmuslu ($p < 0,02$) ve kwashiorkorlu ($p < 0,01$) çocuklarda sağlıklı çocuklara göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (90).

Kinin, on sağlıklı ve on PEM'li çocuğa 4 saat boyunca 8 mg/kg IV infüzyon şeklinde uygulandığında V_d değerleri sağlıklı ve PEM geliştirilmiş çocuklarda sırasıyla $1,63 \pm 1,05$ ve $0,56 \pm 0,28$ L/kg olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar PEM'li çocuklarda kininin dağılıma hacminin sağlıklı çocuklara kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermektedir ($p < 0,05$) (91).

Metabolizma ve Eliminasyon

PEM'de karaciğerde çeşitli morfolojik değişiklikler meydana gelebilmektedir. Şiddetli PEM'de, karaciğerde Faz I (bireysel sitokrom P450 izoformları gibi) ve Faz II (konjugasyon enzimleri gibi) enzimlerinin sentezinin ve aktivasyonunun azalması ve karaciğer fonksiyonlarının bozulması nedeniyle ilaçların metabolizmasında ve eliminasyonunda değişiklikler meydana gelebilmektedir (7, 92, 93). Özellikle kwashiorkorlu çocuklarda bilirubin-uridindifosfat (UDP) ve CYP1A2 enzim aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, karaciğerde UDP ve CYP1A2 enzimleri tarafından metabolize edilen ilaçların (sırasıyla kloramfenikol ve kafein) metabolizmasında değişikliklere neden olabilmektedir (71, 86).

Diğer yandan, PEM'in böbrek fonksiyonları üzerine etkisine ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalara göre PEM'de glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ve böbrek kan akış hızı azalsa bile beslenme rehabilitasyonu sonrası böbrek fonksiyonları normale dönmektedir (94). PEM'in GFR üzerine etkisi genellikle penisilin ve aminoglikozidler gibi böbrekler tarafından elimine edilen ilaçlar için geçerlidir (93). Marasmus-kwashiorkor ve kwashiorkor'da ödem gözlenmiş olup böbrekler fazla sıvı ve sodyumu yeterli şekilde atamamıştır (94). Bu nedenle PEM'de ilaçların doz ayarlamaları yapıldığında ilacın eliminasyon yolu ve organlardaki dağılımları atılımında rol oynamaktadır.

- **Obezite**

ADME parametreleri obezitede değişebilmektedir. Obezite, ilaçların biyoyararlanımında ve CYP enzim aktivitesinde değişiklik yapabilir, lipofilik ilaçların dağılım hacmini, α -1-asit-glikoprotein (AAG) miktarını ve lipofilik ilaçların yarılanma ömrünü artırabilmektedir (Tablo 2.5.).

Tablo 2.5. Obezitenin ADME parametreleri üzerindeki etkisi (59).

Parametre	Etki
Absorpsiyon	- oral yoldan verilen ilaçların bağırsak perfüzyonunda absorpsiyonunda artış - ilaçların biyoyararlanımlarında artış
Dağılım	- lipofilik ilaçların dağılım hacminde artış - AAG miktarında artış - AAG'ye yüksek oranda bağlanan ilaçların dağılımındaki değişiklikler
Metabolizma	CYP enzimlerinin (örn. CYP3A) aktivitesinde azalma
Eliminasyon	lipofilik ilaçların yarılanma ömründe artış

AAG, alfa-1-asit-glikoprotein.

Absorpsiyon

İlaçların absorpsiyonu ve buna bağlı olarak biyoyararlanımı, ilacın uygulama yoluna bağlıdır. Obez hastalarda, subkütan doku bileşimindeki değişiklikler, deri kalınlığındaki değişiklikler ve iğne uzunluğunun obez hastalar için uygun olmaması gibi durumlar söz konusudur (95). Bu nedenle obez hastalarda özellikle deri altı, transdermal ve intramüsküler (IM) ilaç uygulamalarında ilaçların absorpsiyonunun azaldığı belirlenmiştir. Bağırsak perfüzyonunun artması ve mide boşalmasının hızlanması nedeniyle (96), oral uygulamada ilaçların biyoyararlanımı artmaktadır (97).

Dağılım

İlaçların vücuttaki dağılımı, bölgesel kan akışına ve ilacın dokuya ve plazma proteinlerine bağlanma oranına bağlıdır (59). Normal vücut ağırlığında yağ

dokusundaki kan akışı zayıftır. Buna göre, BSS sınıf III obezitede 1 g yağ başına kan akışı, sınıf I obeziteye göre önemli ölçüde düşüktür (65). Bu durum obezite sınıflandırmalarına bağlı olarak obez bireyler arasında önemli farklılıklar olabileceğini göstermektedir. Bunun sonucunda, deri altına uygulanan ilaçların yağ dokusunda dağılımı farklı olabilmektedir. Ayrıca, obez bireylerde kronik inflamatuvar durumları nedeniyle AAG miktarında bir artış tespit edilmiştir (59). Bu nedenle, AAG'ye yüksek oranda bağlanan ilaçların farmakokinetik parametreleri bundan etkilenebilmektedir.

İlacın fizikokimyasal özellikleri (lipofiliklik gibi) obez bireylerde ilacın dağılımında önemli bir role sahiptir. Hidrofilik ilaçlar genellikle daha yüksek bir plazma konsantrasyonuna sahipken, lipofilik ilaçlar daha düşük bir plazma konsantrasyonuna sahiptir. Ayrıca, hidrofilik ilaçların yağ dokusunda dağılımı küçükken, lipofilik ilaçlar yağ dokusunda daha kolay dağılmaktadır. Bu nedenle, hidrofilik ilaçlar (aminoglikozitler, lityum, glikopeptitler, beta-laktamlar gibi) hücre dışı sıvıda kalır ve dağılım hacimleri yağsız kütle ile ilişkilidir. Ancak, hidrofilik ilaçların dağılımı aşırı yağ dokusundan önemli ölçüde etkilenmez. Lipofilik ilaçların dağılım hacmi toplam vücut ağırlığıyla ilişkili olabilir. Bu nedenle, yüksek lipofilisiteye sahip ilaçlar (fenitoin, midazolam, propofol gibi) yağ dokusunda daha fazla dağılacak ve dağılım hacimleri de büyük olacaktır (98).

Metabolizma ve Eliminasyon

Obezitede meydana gelen fizyopatolojik değişikliklere (artan kardiyak debi ve hepatik kan akışı gibi) ek olarak, inflamasyon karaciğer fonksiyonlarını etkileyebilir ve glomerüler filtrasyon hızı obez olmayan bireylere göre yaklaşık %60 daha yüksektir. Bu nedenle, sınıf III obezite glomerüler hiperfiltrasyonla ilişkilidir (99).

Obezite, ilaç metabolizmasını esas olarak iki şekilde etkilemektedir (59):

(i) ilaç atılımında rol oynayan enzimler,

- Kilo-normalize edilmiş ve mutlak CYP3A aracılı klerensin obezitede normal hastalara göre daha düşük olduğu bulunmuştur (100, 101).

- Obezitenin diğer CYP enzimleri ve CYP dışındaki enzimler üzerindeki etkilerine ilişkin veriler çok sınırlıdır.

(ii) hepatik ekstraksiyon oranı (düşük veya yüksek),

- Hepatik kan akışının artması (a) hepatik klerensin artmasına neden olur, ayrıca yüksek ve orta karaciğer ekstraksiyonu olan ilaçlar için hepatik ilk geçiş ekstraksiyonu; (b) düşük karaciğer ekstraksiyonu olan ilaçlar için herhangi bir değişikliğe neden olmaz.
- *Influx* taşıyıcılarının obezitede ekspresyonlarının azaldığı, *efflux* taşıyıcılarının ise ekspresyon seviyelerinin arttığına dair bulgular mevcuttur. Ancak, taşıyıcıların ekspresyonlarındaki farkın daha ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir (102).

2.7. Malnütrisyonunda Yapılan Farmakokinetik Çalışmalar

• Protein-Enerji Malnütrisyonu

PEM'de uygulanan çeşitli ilaçların ADME parametrelerinde meydana getirdiği değişiklikler Tablo 2.6.'da özetlenmiştir. Bazı ilaçlarla ilgili çalışmaların sonuçları farklılık gösterdiğinden, birden fazla gruba dahil edilmişlerdir. Örneğin, kinin ve penisilin ile yapılan bazı çalışmalarda, bu ilaçların PEM'de absorpsiyonunda artış gözlemlenirken, diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlarda anlamlı bir fark bulunmamış ve dolayısıyla absorpsiyonlarında bir değişim gözlemlenmemiştir (66).

Tablo 2.6. PEM'de kullanılan ilaçların ADME parametrelerindeki değişimler (66, 103).

Parametre	Değişiklik	İlaç
Absorpsiyon	↑	fenobarbiton, kafein, kinin, kloramfenikol, parasetamol, penisilin, sülfadiazin, sülfametaksazol
	↓	efavirenz, karbamazepin, klorokin, lopinavir, lumefantrin, pirimetamin, sülfadoksin
	→	aspirin, etambutol, fenitoin, gentamisin, kinin, metronidazol, penisilin, pirazinamit, teofilin, tobramisin
Dağılım	↑	digoksin, etionamid, fenobarbiton, flukloksasilin, kloksasilin, kloramfenikol, para-amino salisilik asit, penisilin, salisilat, streptomisin, sülfametoksazol, tiyofenton
	↓	klorokin
	→	dikumarol, etambutol, fenitoin, gentamisin, izoniazit, kinin, rifampisin,
	↑	efavirenz, gentamisin, lopinavir, rifampisin, streptomisin, teofilin
	↓	gentamisin, izoniazid, kinin, klorokin, nevirapin, rifabutin, sakonavir
	→	amikasin, antipirin, asetanilit, aspirin, etambutol, izoniazit, kinin, kloramfenikol, metronidazol, penisilin, streptomisin, teofilin
Metabolizma		Primer olarak karaciğer ve böbreklerden metabolize olan ilaçların CL ve $t_{1/2}$ değişebilir.

Tablo 2.6. (Devam) PEM'de kullanılan ilaçların ADME parametrelerindeki değişimler (66, 103).

Eliminasyon	CL	↑	kinin*
			antipirin*, asetanilit*, izoniazit*, kafein*, kinin*, kloramfenikol*, metronidazol*, penisilin**, sefoksitin**
t _{1/2}		→	amikasin**, etambutol**, gentamisin**, kloramfenikol*, streptomisin**, teofilin*
		↑	antipirin, asetanilit, fenobarbiton, izoniazit, kafein, kinin, kloramfenikol, metronidazol, parasetamol, sülfadiazin, sülfametoksazol
		↓	kinin*
		→	aspirin, fenitoin, gentamisin**, izoniazit, kloramfenikol*, klorokin, teofilin*, tobramisin

↑, artma; ↓, azalma; →, değişiklik yok; AUC, eğri altında kalan alan; CL, toplam klerens; f_u, serbest ilaç fraksiyonu; k_a, absorpsiyon hız sabiti; t_{1/2}, yarılanma ömrü; V_d, dağılım hacmi; * esas olarak karaciğerden eliminasyon; ** esas olarak böbreklerden eliminasyon.

İlaçların yiyeceklerle birlikte alınmasına bağlı olarak absorpsiyonda değişiklikler olabilmektedir. Örneğin, bazı antibiyotiklerin (penisilin, ampisilin, oksasilin gibi), antitüberküloz ilaçların (izoniazid, rifampisin gibi) absorpsiyonu yiyeceklerle birlikte alındığında azalmaktadır. Diğer yandan, hidralazin, klorokin ve antifungal ilaçların absorpsiyonu besinlerle alındığında artmaktadır. Ayrıca, absorpsiyondaki değişiklikler, özellikle dar terapötik indekse sahip ilaçlar (örneğin teofilin, digoksin ve fenitoin gibi) için kritik olabilmektedir. Ancak, fenitoin ve teofilin gibi dar terapötik indekse sahip ilaçların PEM'de absorpsiyonunda önemli bir değişiklik bulunmamıştır (7).

Kloksasilin gibi plazma proteinlerine (özellikle albümin) yüksek oranda ve karbamazepin gibi plazma proteinlerine orta derecede bağlanan ilaçların PEM'de serbest ilaç fraksiyonları artmaktadır (74).

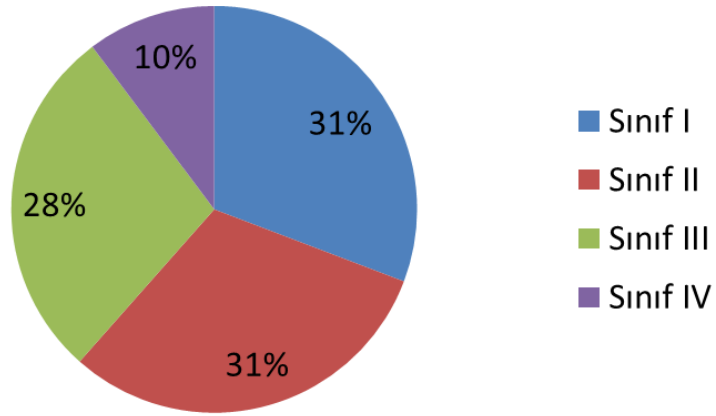
Kontrol grubundaki ve rehabilite edilen (kontrol grubu) şiddetli PEM'li on çocuğa tek doz 30 mg/kg metronidazol oral yoldan uygulandığında kontrol grubu ve PEM'li çocukların klerens değerleri (sırasıyla 0,166 ve 0,077 L/kg/sa) arasında anlamlı ($p < 0,01$) bir azalma olduğu tespit edilmiştir (70).

BSS ve Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi (BDDCS)'ye göre, etkin maddeler Tablo 2.7.'de özetlendiği gibi dört sınıfa ayrılmıştır (44, 104).

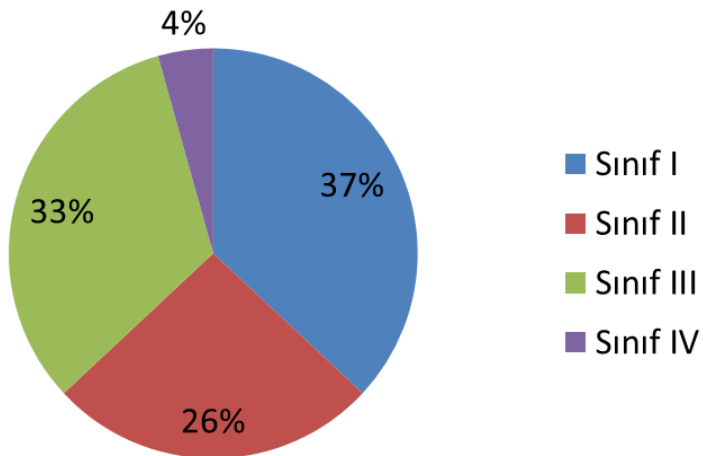
Tablo 2.7. Etkin maddelerin BSS ve BDDCS'ye göre sınıflandırılması.

Sınıf	BSS	BDDCS
I	yüksek çözünürlük yüksek permeabilite	yüksek çözünürlük yüksek metabolizma
II	düşük çözünürlük yüksek permeabilite	düşük çözünürlük yüksek metabolizma
III	yüksek çözünürlük düşük permeabilite	yüksek çözünürlük zayıf metabolizma
IV	düşük çözünürlük düşük permeabilite	düşük çözünürlük zayıf metabolizma

Tez kapsamında yapılan literatür taraması sonucunda PEM'de kullanılan ilaçların BSS ve BDDCS sınıflandırılması amacıyla sırasıyla 39 ve 46 etkin madde değerlendirilmiştir. Bazı etkin maddeler çalışmalara göre farklı BSS'de (örneğin Sınıf I ve III) sınıflandırıldığı için değerlendirmeye dahil edilmemiştir. (Şekil 2.3. ve 2.4.).



Şekil 2.3. PEM çalışmalarında kullanılan ilaçların BSS'ye göre sınıflandırılması.



Şekil 2.4. PEM çalışmalarında kullanılan ilaçların BDDCS'ye göre sınıflandırılması.

Şekil 2.3. ve 2.4.'teki sonuçlara göre BSS ve BDDCS'ye göre PEM çalışmalarında kullanılan etkin maddeler Sınıf I-III'te yer alırken Sınıf IV'teki ilaçlar PEM'de en az çalışılan ilaç sınıfı olarak tespit edilmiştir.

- **Obezite**

Obezitede uygulanan çeşitli ilaçların ADME parametrelerindeki değişiklikler Tablo 2.8.'de verilmiştir. PEM ve obezitede GIS'teki değişiklikler nedeniyle, oral olarak kullanılan ilaçların absorpsiyonu doğrudan etkilenebilmektedir. Örneğin, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında, ilaçların metabolik süreçlerinde ve vücuttan atılımında değişiklikler söz konusudur. Plazma proteinlerinin seviyesindeki değişiklikler, proteinlere bağlı ilaçların dağılım hacminde ve doku alımında farklılıklara neden olabilmektedir. Kalpteki değişiklikler sonucu kan akımında meydana gelen değişiklikler, doku perfüzyonunda ve ilaçların reseptör etkileşimlerinde farklılıklara neden olabilmektedir.

Tablo 2.8. Obezitede kullanılan ilaçların dağılımı ve eliminasyonundaki değişiklikler (105-107).

Parametre	Değişiklik	İlaç
Dağılım V_d	↑	aminoglikozitler, β-laktamlar (ertapenem, meropenem, piperasilin sefepim), florokinolonlar, flukonazol, glikopeptitler, glisilglisinler, lipopeptitler, makrolitler, oksazolidinonlar, polimiksinler V_d (L): deksfenfluramin, fenitoin, gentamisin, glipizid, kafein, karbamazepin, propofol, siprofloksasin, süfentanil, vankomisin V_d (L/kg): fenitoin, süfentanil
	↓	V_d (L): gliburit (glibenklamid), veküronyum V_d (L/kg): deksfenfluramin, gentamisin, gliburid (glibenklamid), glipizid, kafein, karbamazepin, lityum, propofol, remifentanil, rokuronyum, siprofloksasin, vankomisin, vekuronyum

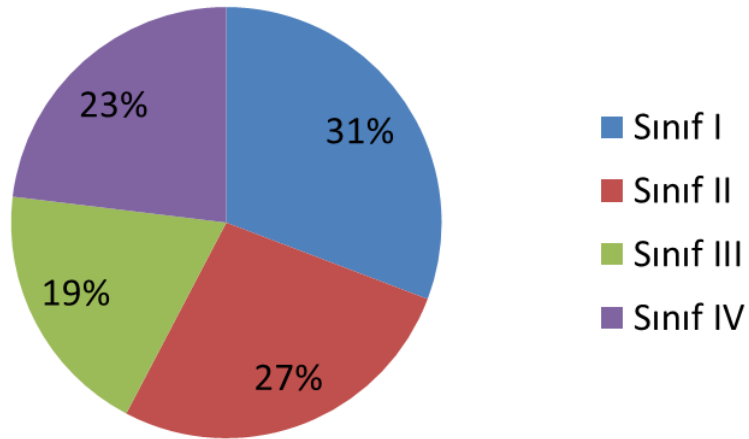
Tablo 2.8. (Devam) Obezitede kullanılan ilaçların dağılımı ve eliminasyonundaki değişiklikler (105-107).

Parametre	Değişiklik	İlaç
Eliminasyon	Karaciğer fonksiyonuna bağlı olarak artabilir veya azalabilir	florokinolonlar, glisilglisinler, makrolidler, oksazolidinonlar
	Böbrek fonksiyonuna bağlı olarak artabilir veya azalabilir	aminoglikozitler, β-laktamlar, flukonazol, glikopeptitler, lipopeptitler, polimiksiner
	↑	antifungal (flukonazol ve mikafungin), antikanser (busulfan), bisoprolol, β-laktamlar (ertapenem, meropenem, piperasilin, sefepim), deksfenfluramin, fenitoin, fluorokinolonlar (siprofloksasin), gentamisin, gliburid (glibenklamid), glipizid, ifosfamid, labetalol, lipopeptitler (daptomisin), lityum, siprofloksasin, sotalol, vankomisin
	↓	doksorubisin, dosetaksel, irinotekan, karbamazepin, karboplatin, oksazolidinonlar (linezolid), paklitaksel, propofol, remifentanil, rokoronyum, siklofosfamid, sisplatin, süfentanil, topotekan, vekuronyum
	↑	bisoprolol, doksorubisin, fenitoin, ifosfamid, irinotekan, kafein, karbamazepin, karboplatin, labetalol, propofol, propranolol, siklofosfamid, siprofloksasin, süfentanil, topotekan
	↓	deksfenfluramin, dosetaksel, enoksaparin sodyum, gentamisin, gliburid (glibenklamid), glipizid, lityum, neбивolol, paklitaksel, sotalol, vankomisin, vekuronyum
	→	sisplatin

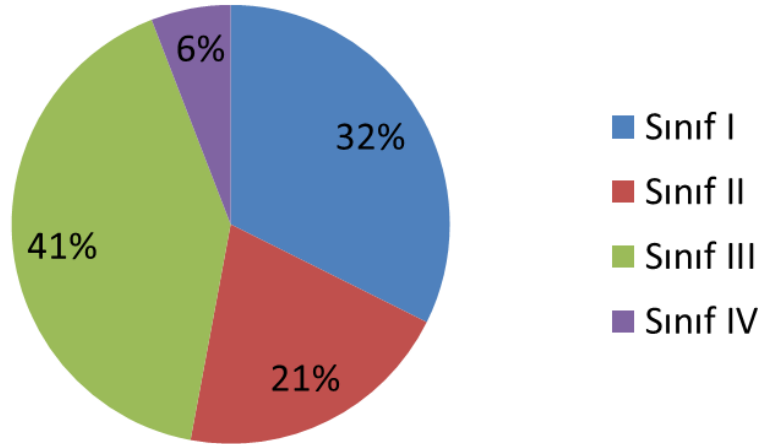
Lityum sitrat ($31,4 \text{ mEq}$) 10 obez ($110,2 \pm 28,6 \text{ kg}$) ve 8 normal kilolu gönüllüye ($63,1 \pm 6,6 \text{ kg}$) oral yoldan uygulanmış ve kan ile idrar örnekleri sırasıyla 48 ve 12 saat boyunca toplanmıştır. Lityumun obez hastalardaki klerens değerinin ($33,9 \pm 7,0 \text{ mL/dk}$) normal kilolu gönüllülere ($23,0 \pm 6,2 \text{ mL/dk}$) kıyasla önemli ölçüde arttığı ($p = 0,005$) tespit edilmiştir (108).

Sekiz obez (ortalama 91 kg ağırlığında) ve 8 obez olmayan kadına (ortalama 51 kg ağırlığında) tek doz dl-bisoprolol ($0,16 \text{ mg/kg}$, IV) uygulandığında obez kadınlardaki klerensin obez olmayan kadınlara kıyasla ($14,8 \pm 1,4$ ve $12,8 \pm 2,2 \text{ L/saat}$) anlamlı ($p < 0,05$) derecede arttığı bulunmuştur (109).

Obezitede kullanılan ilaçların BSS ve BDDCS'ye göre sınıflandırılması için sırasıyla 25 ve 34 etkin madde değerlendirilmiştir. Bazı etkin maddeler çalışmalara göre farklı BSS sınıflarında (örneğin sınıf III ve IV) yer aldığından bu etkin maddeler değerlendirilmemiştir (Şekil 2.5. ve 2.6.).



Şekil 2.5. Obezite çalışmalarında kullanılan ilaçların BSS'ye göre sınıflandırılması.



Şekil 2.6. Obezite çalışmalarında kullanılan ilaçların BDDCS'ye göre sınıflandırması.

Obezitede çalışmalarında kullanılan ilaçlar BSS Sınıf I ve II'de yer alırken BDDCS'ye göre çoğunlukla Sınıf I ve III'te yer almaktadır. BDDCS'ye göre Sınıf IV'teki ilaçlarla ilgili çalışmalar çok azdır.

2.8. Farmakokinetik Modelleme

Farmakokinetik verilerin değerlendirilmesi için kompartmansız (modelden bağımsız) ve kompartman modelleri olmak üzere çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Kompartmansız analizler sonucunda elde edilen bilgilerin sınırlı olması nedeni ile vücudu anatomik ve fizyolojik olarak daha iyi temsil eden kompartmanlı analizler tercih edilmektedir.

Farmakokinetik ve farmakodinamik modelleme ve simülasyon çalışmaları, ilaç geliştirme sürecinde yol gösterici araçlardır. Modelleme ve simülasyon çalışmaları ile:

- ✓ Preklinik ve klinik veri setlerinin uygun bir model ile tanımlanması ile farmakokinetik parametrelerin kestirimi,
- ✓ Preklinik çalışmalarda *in vitro* ve *in siliko* verilere ek olarak hayvanlardan (fare, sıçan, köpek ve maymun gibi) elde edilen literatür verileri kullanılarak insandaki ilaç absorpsiyonunun tahmin edilmesi,

- ✓ Anatomi ve fizyolojik parametreleri içeren bir modelleme aracı olarak absorpsiyon, klerens, dağılım hacmi, doku dağılımı ve ilaçlar arası etkileşimin tahmin edilmesi,
- ✓ Malnütrisyonla beraber ortaya çıkabilecek farklı hasta popülasyonlarında (örneğin, AIDS, kanser, tüberküloz) in siliko farmakodinamik cevabın simülasyonu,
- ✓ Dar terapötik aralığa sahip ilaçlar için uygun dozun belirlenmesi ve test edilmesi, doğru dozaj rejiminin saptanması ile klinik çalışmaların başarısının artırılması,
- ✓ Doz modifikasyonunun gerekli görüldüğü durumlarda modelleme yaklaşımı ile klinik yanıtın kestirimi,
- ✓ İlacın bilinen farmakokinetik/farmakodinamik özellikleri bilgisinden hareketle araştırma ilacı için doz optimizasyonunun yapılması,
- ✓ Geliştirilecek yeni bileşikler için daha kısa süreli ve daha etkili klinik çalışma tasarımının sağlanması,
- ✓ Yiyecek, taşıyıcı protein ve enzimlerin etkisi, metabolizma gibi parametreler modelleme çalışmaları ile incelenerek verilerin elde edilmesi ve bu doğrultuda çalışmaların yönlendirilmesi,
- ✓ İlaç geliştirilmesinde Faz II evresinde farklı formülasyonlar geliştirilmesi,
- ✓ İn vitro in vivo korelasyon (IVIVC) yapılmaktadır (110).

Etkin maddenin ADME özelliklerinin matematiksel denklemlerle tanımlanması ile farmakokinetik modeller oluşturulmaktadır (111). Farmakokinetik modelleme yaklaşımlarını temel olarak klasik ve fizyolojik esaslı farmakokinetik (PBPK, *physiologically based pharmacokinetic*) modellemeler olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.9.).

Tablo 2.9. Klasik ve PBPK modellerin karşılaştırılması (110-112).

Klasik	PBPK
Vücut kompartmanlar olarak tanımlanır	Vücut anatomik ve fizyolojik olarak kompartmanlara ayrılır
Plazmayı temsil eden merkezi kompartman, periferik kompartman(lar)a bağlanır	Kompartmanlardaki kan akışı, organ büyüklüğü gibi sistem parametreleri dikkate alınır
Kompartmanlar arasındaki ilişki hız sabitleriyle matematiksel olarak kurulur	Kompartmanların özellikleri (örn. doku hacmi ve kan akışı) diferansiyel denklemler ile tanımlanır
Fizyolojik parametreler dikkate alınmaz	Fizyolojik parametrelerden yararlanılır
Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri dikkate alınmaz	Etkin maddenin çözünürlüğü, permeabilitesi gibi parametreler dikkate alınır
Sınırlı bilgi sağlar	Kapsamlı bilgi sağlar
İlacın farmakokinetik özellikleri ile ilgili sınırlı bilgi sağlar. Klerens ve dağılım hacmi gibi veriler elde edilerek ilacın yarılanma ömrü hesaplanır	İlacın farmakokinetik özellikleri ve plazma doku dağılım profilleri tahmin edilir

PBPK, fizyolojik esaslı farmakokinetik.

PBPK modeller, etkin maddelerin kandaki ve dokulardaki konsantrasyonunu, ilaç etkin maddelerinin fizikokimyasal özelliklerini, vücudun fizyolojik özelliklerini, ilaç uygulama yolu ve etki bölgesini dikkate alarak tanımlamayı sağlar (113). PBPK modelleme 1937 yılında Teorell tarafından yapılmışsa da (114) ilaç dağılımında PBPK'nin uygulanmasının araştırılmasına dair ilk çalışmalar Bischoff ve ark. tarafından 60'ların sonlarında- 1970'lerin başında yayınlanmıştır (115, 116). PBPK uygulamaları ilk zamanlarda matematiksel modellerin karmaşıklığı ve girdi verilerinin elde etmek için çok fazla hayvan deneyine gereksinim olması nedeniyle yaygın olarak kullanılamamıştır (117). Ayrıca, plazma-doku dağılım katsayılarının kestirimleri ile PBPK uygulamaları da gelişmiştir (118).

PBPK modellerin avantajları:

- ✓ Dokulardaki etkin madde dağılımı kullanılarak serbest-bağılı etkin madde konsantrasyonlarının kestirilmesi,
- ✓ Karaciğer ve böbreklerdeki eliminasyon mekanizmaları konusunda fikir edinilmesi,
- ✓ Farklı fizyolojik koşullardaki etkin madde konsantrasyonlarının (C_p) kestirimi,
- ✓ Hayvan modelleri kullanılarak geliştirilen modellerin insana uyarlanabilmesine imkan sağlaması (119, 120).

PBPK modeller aşağıdaki özellikler dikkate alınarak oluşturulmaktadır:

- ✓ Organ ve doku hacimleri gibi anatomik özellikler,
- ✓ Kan akış hızları gibi fizyolojik özellikler,
- ✓ Membranlardan permeabilite gibi transport özellikleri,
- ✓ İlaç-protein etkileşimleri gibi termodinamik özellikler,
- ✓ Mide bağırsak kanalının içeriği,
- ✓ İlacın kompartmanlar arası geçiş özellikleri,
- ✓ Etkin maddenin permeabilite özellikleri ve buna bağlı olarak taşıyıcı etkisi,
- ✓ Bağırsakta meydana gelen metabolik faaliyetler.

PEM düzeylerinin ve fizyolojik farklılıkların doğru bir şekilde belirlenmesi PBPK modelinin zorlukları arasındadır. Bu nedenle model geliştirme sürecindeki karmaşıklık nedeniyle PEM’li popülasyonlar için PBPK geliştirme çalışmaları oldukça sınırlıdır.

Sjögren ve ark. tarafından PEM’li çocuklarda model ilaçların (kafein, sefoksitin, siprofloksasin, lumefantrin, pirimetamin ve sülfadoksin) farmakokinetik özelliklerini tanımlayan PBPK modeli geliştirme çalışması yapılmıştır (67). Literatürde yetersiz beslenen çocukların doku veya organ değişimleri ile ilgili yeterli bilgi bulunmadığından, PBPK modeli geliştirmek için gerekli veri sağlanamamaktadır. Bu nedenle hedef popülasyon (pediatrik popülasyon) için alternatif bir yaklaşım kullanılmıştır. PEM’li çocuklarda ve yetişkinlerde benzer fizyolojik değişikliklerin meydana geldiği varsayımı ile PEM’li pediatrik popülasyon ile fizyolojik esaslı bir ilişki kurulmuştur. Bu kapsamda

öncelikle sağlıklı yetişkin vücudunun fizyolojik özelliklerini kullanarak model ilaçların farmakokinetiğini tanımlayan PBPK model geliştirilmiştir. Fizyolojik pediatrik ölçeklendirme yöntemi ile yetişkinler için geliştirilmiş olan PBPK modelin pediatrik kullanımını değerlendirilmiştir. PEM'li pediatrik hastaların fizyolojik özelliklerindeki değişiklikler tanımlanarak farklı seviyelerde (hafif, orta ve şiddetli) PEM görülen pediatrik hastalar için sanal popülasyon (*virtual population*) oluşturulmuştur. Bu popülasyon için uygulanması planlanan PBPK modelinin performansı model ilaçların literatürde yer alan plazma konsantrasyon-zaman profilleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen sanal pediatrik popülasyonun model ilaçların farmakokinetik profillerinin PBPK modeller kullanılarak tanımlanabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Böylece bu yaklaşım kullanılarak PEM'li pediatrik hastalarda ilaçlar için doz önerileri yapılabilecektir.

Diğer yandan, obezite ile ilgili yapılan farmakokinetik çalışmalarda modelleme yaklaşımları önemli bir yer tutmaktadır (Tablo 2.10.)

Tablo 2.10. Obezitede farmakokinetik modelleme yaklaşımları (59).

Popülasyon Farmakokinetiği (popPK)
- Tüm obezite sınıfları, yaş, cinsiyet, vücut ağırlığı ve eklenebilecek diğer değişkenlere ilişkin veriler - Toplam vücut ağırlığı, beden kitle indeksi, vücut yüzey alanı, yağsız vücut kütlesi veya ideal vücut ağırlığı gibi değişkenler model geliştirmede yaygın olarak kullanılmaktadır
Kompartmansız Analiz (NCA)
- Faz III klinik çalışmalarda obez bireyler için belirlenen dozu desteklemek amacı ile kullanılabilir AUC_t, AUC_{∞}, C_{maks}, CL; CL/F, V_d veya V_d/F ve $t_{1/2}$ belirlenmelidir
Fizyolojik Esaslı Farmakokinetik (PBPK) Modelleme
- Obezitedeki fizyopatolojik değişiklikler hakkında ayrıntılı bilgi gereklidir - Çalışmaya ilişkin klinik veri kümeleri kullanılarak simülasyon yapılabilir

Obez bireyler için ilaç maruziyetini güvenilir şekilde simüle etmek amacıyla PBPK modellerinin geliştirilmesi için fizyopatolojik değişiklikler hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır. Ayrıca, PBPK modellemesi için obezitenin etkilerini gösteren klinik veri kümelerine ihtiyaç duyulabilmektedir (59).

Emond ve ark. tarafından vücut yağ kütlesinin 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) eliminasyonu üzerindeki etkilerini obezite geliştirilen farelerde incelemek amacı ile PBPK model geliştirilmiştir. Deneysel sonuçlara göre obezitenin TCDD'nin yarılanma ömrünü arttırdığı kanıtlanmıştır. Ancak, modele vücuttaki yağ miktarı ve CYP1A2 ekspresyon faktörleri dahil edilmiş olsa da model yarılanma ömründeki artışı açıklamak için yeterli bulunmamıştır. Bu durum obezite ve metabolik sendromdaki değişikliklere bağlanmıştır (121).

Wu ve ark. obezite ve böbrek yetmezliği olan hastalarda telavansin kullanımını değerlendirmek için önceki bir popPK çalışmasının sonuçlarına dayalı bir PBPK modeli geliştirmiştir. PBPK simülasyonu sonucunda, toplam vücut ağırlığına göre belirlenen dozaj rejiminin obezitede böbrek yetmezliği olan hastalarda kullanılmaması gerektiği ortaya çıkmıştır. Dozaj önerileri obez hastalarda böbrek yetmezliğinin derecesine göre yapılmıştır (122).

Gerhart ve ark. tarafından obez çocuklardan oluşan sanal bir popülasyon geliştirmiş ve bu popülasyona klindamisin ve trimetoprim/sülfametoksazol için daha önce geliştirilen modeller uygulanarak obeziteli çocuklarda bu ilaçların dozlaması araştırılmıştır. Obez çocuklar için sanal popülasyon literatür verileri kullanılarak geliştirilmiştir. Sanal popülasyon, farmakokinetikle ilgili fizyolojideki obeziteyle ilişkili temel değişiklikler (artan vücut boyutu, organ boyutu ve kan akışı, plazma protein konsantrasyonları ve glomerüler filtrasyon gibi) değerlendirilerek oluşturulmuştur. Bu sanal popülasyon, daha önce geliştirilen PBPK modeller kullanılarak obeziteli çocuklarda klindamisin ve trimetoprim/sülfametoksazolün farmakokinetiğini açıklamak için kullanılmıştır. Obez olmayan çocuklara kıyasla, obez çocuklarda klindamisin ve trimetoprim/sülfametoksazolün kiloya göre normalize edilmiş klerensi ve dağılım hacminin azaldığı sonucuna ulaşılmıştır. Model simülasyonları, klindamisin

ve trimetoprim/sülfametoksazol için obez çocuklarda önerilen kiloya dayalı dozlamayı desteklemektedir, çünkü bu ilaçlar klerenste ve dağılım hacmindeki azalmaya rağmen hedeflenen maruziyeti karşılamıştır (123).

Çalışma örnekleri doğrultusunda PBPK modelleme çalışmalarının yapılabilmesi için obezitede ve eşlik eden hastalıklarda vücuttaki patofizyolojik değişikliklerin iyi tanımlanarak modele yansıtılması gerekmektedir.

2.8.1. mPBPK Model

PBPK, anatomik ve fizyolojik bilgiyi farmakokinetik değerlendirmeye dahil ettiği için 'klasik' bölmeli modellerden daha mekanik bir modeldir (112). Ancak bu modelleri oluşturmak, çok sayıda organ ve dokudaki ilaç konsantrasyonlarının ölçülmesini gerektirmektedir. Yalnızca kan veya plazma verileri mevcut olduğunda genellikle kompartmansız (*Non-Compartmental Analysis*, NCA) ve/veya kompartmanlı analiz kullanılmaktadır (124). Ancak, memeli (*mammillary*) modeller vücutu genellikle sınırlı fizyolojik veya anatomik özelliklere sahip kompartmanlar olarak temsil ettiği için organizmanın fizyolojik özelliklerinden yararlanamamaktadır (125, 126). Bu nedenle, tüm vücut PBPK (*whole body* PBPK, WB-PBPK) modellerinde yer alan önemli fizyolojik özellikleri içeren alternatif bir modelleme yaklaşımı olarak mPBPK modelleme yaklaşımı geliştirilmiştir (127). mPBPK modellerinde kan ve doku hacimleri, kardiyak kan akım hızının organlara giden fraksiyonları ve doku:kan partiyon katsayısı (K_p) gibi fizyolojik faktörler de yer almaktadır (127). mPBPK modelleri çeşitli uygulama yollarıyla verilen (IV bolus, IV infüzyon ve oral gibi) beta-laktam antibiyotikleri (amoksisilin, ampisilin, sefazolin ve piperasilin gibi), midazolam gibi ilaçların yanı sıra monoklonal antikorların (mAb; leksatumumab, pateklizumab, mepolizumab, gevokizumab ve tefibazumab gibi) modellenmesinde başarıyla uygulanmıştır (127-129).

Birleştirme (*lumping*), benzer özellik (ilaç afinitesi, kan akım hızı gibi) gösteren dokuları daha az kompartman oluşturmak için bir araya getirerek WB-PBPK modellerinin karmaşıklığını azaltmak için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır (130,

131). WB-PBPK modelleri genellikle sınırlı sayıda kompartmanla başarılı bir şekilde temsil edilebilmektedir (127). Örneğin, varfarin için sadece dört organdan oluşan bir PBPK modeli geliştirilmiştir (132). Alternatif olarak bu modelde benzer özellik gösteren bazı organlar (kas, yağ, böbrek gibi) toplanıp, varfarinin konsantrasyon-zaman profili esas olarak doğrusal olmayan (nonlinear, karaciğer) ve doğrusal (linear) doku dağılım bileşenleri tarafından desteklenebilmektedir (127).

Ayrıca, 'hibrit-PBPK' modelleri, belirli organlara (çoğunlukla karaciğer, böbrek, beyin veya tümör gibi) perfüzyon girdisi ve plazma-konsantrasyon profillerini kullanarak modelleme imkanı sunmaktadır (133-135). Böylece belirli dokularda ilaç maruziyetleri ve dağılımları için daha ayrıntılı veri eldesine olanak tanınmış olacaktır (127).

Fizyolojik ve anatomik özelliklerin mPBPK modellerine dahil edilmesi, sistem ve ilaca özgü parametrelerin ayrılmasına olanak tanır ve ilaçların farmakokinetik özelliklerinin belirlenmesinde bilinen fizikokimyasal ve metabolik özelliklerin dikkate alınmasını sağlar. Böylece, mPBPK modelleri çeşitli ilaçların karakterize edilmesiyle gösterilecek ve geleneksel memeli modellerinden daha iyi farmakokinetik kestirimler sağlayabilecektir (127). Ayrıca, mPBPK modellerinde parametre kestirimleri, diğer kompartmanlı modellerden daha gerçekçi bir şekilde değerlendirilerek yorumlanabilmektedir (127).

mPBPK modelleri kan kompartmanına bir ve/veya iki doku kompartmanının eklenmesi ile oluşmaktadır. Ayrıca, karaciğer gibi eliminasyon organlarının modele kompartman olarak eklenmesi ile beraber ilk geçiş etkisi değerlendirilebilmektedir. Kompartman sayısının artmasına bağlı olarak daha çok parametre kestirimi sağlanabilmektedir (127). mPBPK modelleri, aynı/farklı yollarla ilaç uygulaması sonucu elde edilen profillerin birlikte uyumuna olanak sağlamaktadır. Örneğin; dihidrokodein, verapamil, repaglinid ve midazolamın oral ve IV verilerinin mPBPK modelleri kullanılarak birlikte uyumu ile hepatik intrinsik klerens, hepatik olmayan klerens ve pre-hepatik biyoyararlanımın kestirimleri sağlanabilmektedir (127).

Ayrıca hayvanlardan elde edilen (örneğin moksifloksasin) verilerden hareketle insanlardaki parametrelerin kestirimi için kullanılan allometrik yöntem mPBPK modellerine kolayca uygulanabilmektedir (127).

2.8.2. Popülasyon Farmakokinetiği (popPK)

PopPK modelleme yaklaşımları birey içi ve bireyler arası faktörleri de hesaba katarak değerlendirme sağlamaktadır. PopPK modelleri özellikle klinik çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (59).

PopPK çalışmalarındaki yaygın yaklaşım, bireylerin vücut ağırlıklarını bir değişken olarak değerlendirmektir. Ayrıca, obezitenin farmakokinetik parametreler üzerindeki etkisini araştırmak için farklı yaklaşımlar kullanılabilmektedir. Toplam vücut ağırlığı, vücut yüzey alanı, yağsız vücut kütlesi veya ideal vücut ağırlığı gibi değişkenler de model geliştirmede değişken olarak kullanılarak test edilebilmektedir. Kestirimi yapılacak parametreler ile en ilişkili olarak bulunan değişkenler dozaj senaryosuna ve pozoloji modellerine dahil edilmektedir. Ayrıca, hastalarda zamanla oluşabilecek değişiklikler de popPK modelleme çalışmalarında dikkate alınmalıdır (59).

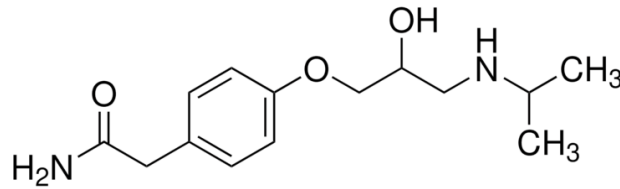
Bireyler arası ve birey içi değişkenleri değerlendirme olanağı sağladığı için malnütrisyonunda popPK çalışmaları önemli bir yere sahiptir. Otuz iki obez çocuğa IV fentanil uygulamasından sonra plazma fentanil konsantrasyonları popPK analizi ile değerlendirilmiştir. IV uygulanan fentanilin farmakokinetiğini tanımlamak için ağırlık ve klerens arasındaki allometrik ilişkinin kullanılmasının uygun olduğunu sonucuna ulaşılmıştır (136).

Tez kapsamında yapılacak *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* çalışmalarda PEM geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle bundan sonraki bölümlerde malnütrisyon terimi, PEM yerine kullanılmıştır.

2.9. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Özellikleri

- **Atenolol**

Kimyasal adı (±)-4-[2-Hidroksi-3-[(1-metiletil)amino]propoksi]benzenasetamid, 4-[2' Hidroksi-3'-(izopropilamino)propoksi]fenilasetamid olan atenolol ($C_{14}H_{22}N_2O_3$, molekül ağırlığı: 266,34 g/mol, Şekil 2.7.) renksiz, kokusuz kristal bir tozdur. Metanolde serbestçe çözünür; asetik asitte ve dimetil sülfoksit (DMSO)'te çözünür; izopropanolde az çözünür; asetonitril, etil asetat ve kloroformda çözünmez (137). Atenolol BSS ve BDDCS'ye göre Sınıf III (yüksek çözünürlük, düşük permeabilite; yüksek çözünürlük, zayıf metabolizma)'te yer alır (138).



Şekil 2.7. Atenololün kimyasal yapısı.

Atenolol; hipertansiyon, angina pectoris, kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsünün tedavisinde kullanılan hidrofilik yapıda kardiyoselektif beta-1 adrenerjik reseptör antagonistidir (139). Diğer beta blokörlerde olduğu gibi atenolol uygulamasına bağlı olarak kan basıncında, kalp atış hızında (yaklaşık %15-25) ve kalp debisinde (genellikle yaklaşık %20) azalma olmaktadır (140). Piyasada atenololün oral olarak kullanılan hemen salım sağlayan formülasyonları mevcuttur. Atenolol'ün kantitatif analizlerinde spektrofotometre, gaz sıvı kromatografisi ve HPLC yöntemleri kullanılmaktadır (141-143).

Hidrofilik ilaçların hücre membranlarından geçişi zor olduğu için atenololün bağırsaktan absorpsiyonu zayıftır. Bu nedenle, oral yolla uygulamasından sonra yaklaşık %50'si sistemik dolaşıma geçmektedir (139). Atenololün absorpsiyonunun iki aşamada gerçekleşen görünür birinci dereceye uygun olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur. İki hızlı absorpsiyon aşamasının, iki fazlı mide boşalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (139, 144).

Atenololün farklı dozlarda uygulanması ile plazma atenolol konsantrasyonu arasında doğrusal bir korelasyon vardır. Örneğin, 100 mg'lık atenolol dozundan sonra elde edilen C_{maks} , 25 mg dozun uygulanmasıyla elde edilen C_{maks} 'a göre 4 kat artmıştır. Plazma proteinlerine bağlanması çok azdır ve genellikle albümine bağlanmaktadır (~ %3).

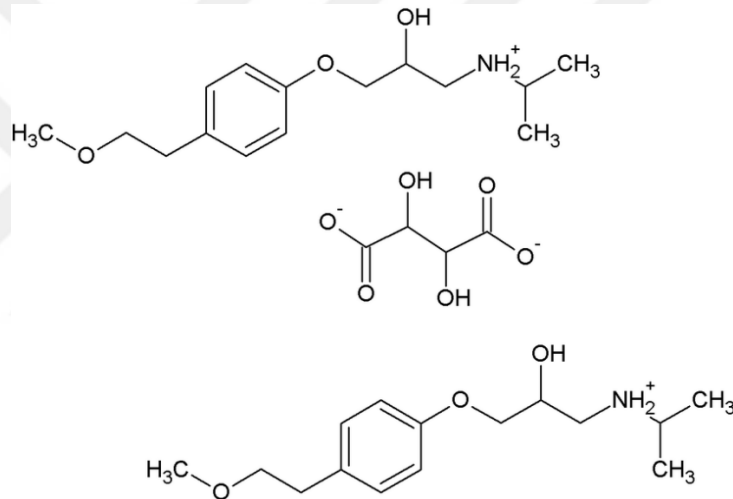
Tek doz oral uygulamada açlık durumunda hastalarda plazma pik konsantrasyonu 3 saat içinde (2-4 saat arasında) görülmektedir. 100 mg oral uygulamadan sonra sonra plazma konsantrasyonları yaklaşık 0,6 ya da 0,9 µg/mL olarak bulunmuştur. Atenololün biyoyararlanımı besin varlığına bağlı olarak değişmektedir. Besinlerle beraber atenolol uygulaması sonucu elde edilen AUC değerlerinde %20'lik azalma tespit edilmiştir (139).

Hidrofilik yapısı nedeni ile neredeyse tamamı böbreklerden elimine edilmektedir (~%90). Plazma verilerinden elde edilen eliminasyon hız sabitleri idrardan elde edilen değerlere benzerdir ve her ikisi de yaklaşık 1 sa^{-1} 'e ulaşmaktadır (144). Böbrek fonksiyonları normal olan hastalara tek doz IV atenolol uygulamasını takiben atenololün eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 6 ve 9 saat olarak hesaplanmıştır. Toplam klerensi 97,3 mL/dk ile 176,3 mL/dk arasında değişmektedir. Bu nedenle sadece glomerüler filtrasyon değil, tübüler sekresyonun da görüldüğü söylenebilmektedir. IV uygulamayı takiben idrardan geri kazanım yaklaşık %90 iken oral uygulamadan sonra yaklaşık %50 geri kazanım olduğu tespit edilmiştir (139).

Atenolol neredeyse tamamen değişmeden böbrekler tarafından atıldığı için böbrek yetmezliğinde eliminasyonunun değişmesi beklenir. Oral yoldan tek doz atenolol (100 mg) uygulamasından sonra ortalama glomerüler filtrasyon hızı (GFR) 54 mL/dk ve 16 mL/dk olan hastalarda yarılanma ömrünün sırasıyla 14,1 ve 22,0 saat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, oral yolla 50 mg atenolol uygulamasından sonra plazma atenolol seviyesi böbrek yetmezliği olanlarda yaklaşık iki kat artmıştır. Bu nedenle GFR'ye göre atenolol dozu ayarlanmalıdır. Diğer yandan, karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalarda ya da yaşlanmaya bağlı olarak değişen karaciğer fonksiyonları atenololün eliminasyon kinetiğini etkilememektedir (139).

• Metoprolol Tartarat

Kimyasal adı 1-(izopropilamino)-3-(p-(2-metoksietil)fenoksi)-2-propanol (2:1) dekstro tartarat tuzu olan metoprolol tartarat $((C_{15}H_{25}NO_3)_2 \cdot C_4H_6O_6)$, molekül ağırlığı: 684,82 g/mol; Şekil 2.8.) renksiz, kokusuz kristal bir tozdur (137). 1 mol metoprolol tartarat, yapısında 2 mol metoprolol içerdiği için 684,82 g/mol metoprolol tartarat, 534,728 g/mol metoprolole (molekül ağırlığı: 267,364 g/mol) eşdeğerdir. Suda çözünürlüğü yüksektir. Ayrıca, kloroform, diklorometan ve alkolde çözünmektedir. Fakat, benzen, dietil eter ve asetonda çözünmemektedir (46). Metoprolol BSS ve BDDCS'ye göre Sınıf I (yüksek çözünürlük, yüksek permeabilite; yüksek çözünürlük, yüksek metabolizma)'de yer alır (138).



Şekil 2.8. Metoprolol tartaratın kimyasal yapısı.

Metoprolol, 1969 yılında ABD tarafından geliştirilen ve 1978 yılında FDA tarafından onaylanan, kardiyoselektif bir beta-1 adrenerjik reseptör antagonisti olan bir ilaçtır. R- ve S- enantiyomerlerin rasemik karışımı olan MET'in klinikteki kullanımı genellikle hipertansiyon, angina pectoris, kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsünün tedavisi içindir (145). Piyasada metoprololün IV, oral, hemen salım, uzatılmış salım ve kontrollü salımlı formülasyonları mevcuttur.

MET permeabilite yönteminin uygunluğunun değerlendirilmesinde ve çalışılacak maddelerin permeabilitelerini özelliklerini kıyaslamak amacı ile referans madde olarak kullanılmaktadır (146). Metoprolol tartaratın analizi için HPLC yaygın

olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (147), gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (148) gibi yöntemler de kullanılmaktadır.

Oral uygulamayı takiben GİS'ten absorpsiyonu hızlı ve neredeyse tamdır (%95) (149). Mideden absorpsiyonu ihmal edilebilir düzeydedir ve büyük bir kısmı bağırsaklardan absorplanır. Oral yolla uygulanan ilaçlar sistemik dolaşıma ulaşmadan karaciğerden geçtiği için ilk geçiş etkisi görülebilmektedir (150). Gastrointestinal absorpsiyonu tam olmasına rağmen, ilk geçiş etkisine uğradığı için metoprololün yaklaşık %50'si sistemik dolaşıma ulaşır (151, 152). 1,5-2 saatte plazmada maksimum ilaç konsantrasyonuna ulaşmaktadır. Plazma yarılanma ömrü 4 saat olduğu için ilacın kandaki seviyesini korumak için sık dozlama yapılmalıdır. Plazma ve serum proteinlerine bağlanması düşüktür (%12) ve genellikle albümine bağlanır (153). Metoprololün organik katyon taşıyıcılarının (OCT2) substratı olduğu bilinmektedir (154).

Metoprolol sistemik dolaşıma ulaştıktan sonra dokulara hızlı bir şekilde dağılır. Sıçanlarda akciğer, karaciğer ve böbrek gibi dokulardaki metoprolol düzeyinin plazmaya kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle dağılım hacmi gerçek vücut hacminden birkaç kat daha fazla olup kararlı durum dağılım hacmi yaklaşık 3,2 L/kg'dır (155, 156).

Metoprolol, esas olarak CYP2D6 enzimi tarafından ve daha az oranda CYP3A4, CYP2B6 ve CYP2C9 tarafından metabolize edilir (157, 158). Metoprololün yarılanma ömrü, terapötik doz aralığındaki uygulamalarda dozdan etkilenmediği için sağlıklı bireylerde eliminasyon yarılanma ömrü 2,5-5 saat arasında değişmektedir. Metoprolol, büyük oranda (~%95) karaciğerden metabolize olduğu için böbrek fonksiyonlarındaki azalma metoprololün dispozisyonu üzerinde daha az etkilidir. Oral olarak uygulanan dozun idrar ile değişmeden atılan kısmı %5'ten daha azdır (153).

Metoprolol tartaratin yarılanma ömrü ve sistemik yararlanımı açısından böbrek hastaları ve sağlıklı gönüllüler arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Bu nedenle kronik böbrek hastaları için metoprolol dozunda kısıtlama yapılmasına gerek

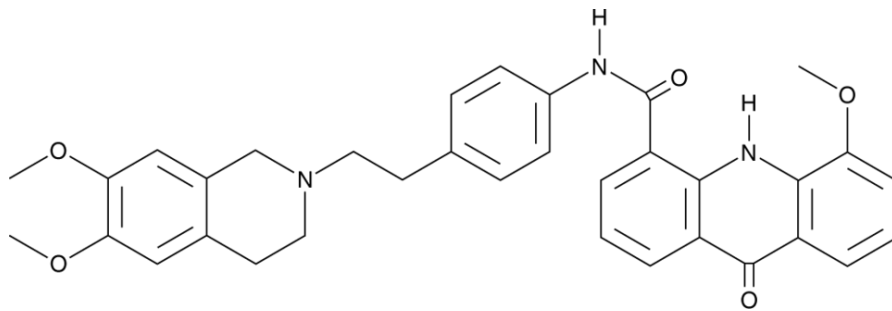
yoktur. Ayrıca, metoprolol uygulanmasından 10-12 saat sonra ikinci bir yavaş eliminasyon fazının meydana gelebileceği öne sürülmüştür. Ancak bunun kanıtlanması için metoprolol uygulamasından sonra 10-24 saat aralığında daha fazla örnek toplanmalıdır (155).

Metoprolol sağlıklı gönüllülere IV yolla uygulandığında toplam vücut klerensi 0,72-1,54 L/dk olarak tespit edilmiştir. Metoprolol hepatik klerensi yüksek bir ilaç olduğu için, hepatik kan akışındaki değişiklikler metoprololün plazma seviyeleri ve eliminasyon hızı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (151, 155, 159, 160).

Metoprololün farmakokinetiği 20-65 yaş arası kişilerde değerlendirilmiş ve bu aralıkta ilacın farmakokinetiğinin yaştan neredeyse hiç etkilenmediği gösterilmiştir. Bu nedenle genç bireylerden elde edilen verilere dayalı doz tahminlerinin 65 yaş altı hipertansif hastalara uygulanabileceği belirtilmiştir (161, 162).

- **Elakridar**

Kimyasal adı N-[4-[2-(3,4-dihidro-6,7-dimetoksi-2(1H)-izokinolinil)etil]fenil]-9,10-dihidro-5-metoksi-9-okso-4-akridinkarboksamid olan elakridar akridon karboksamid türevi sarı bir tozdur (GF120918, GG918, GW0918; $C_{34}H_{33}N_3O_5$, molekül ağırlığı: 563,6 g/mol; Şekil 2.9.) (163). Elakridar (ELA) kloroform, diklorometan, DMSO ve metanolde çözünür (163).



Şekil 2.9. Elakridarin kimyasal yapısı.

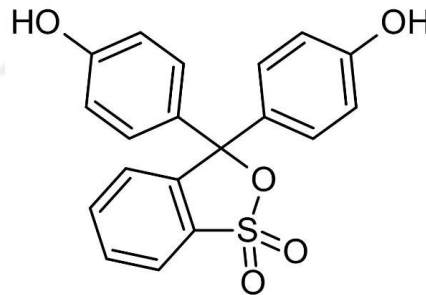
P-gp'e bağlanarak ilacın hücre içine girmesini inhibe ederek hücreleri sitotoksik ilaçlara karşı duyarlı hale getirdiği için P-gp inhibitörü olarak kullanılmaktadır. İntestinal lümende bulunan P-gp'lerin ELA ile inhibe edilmesi

antikanser amaçla kullanılan ilaçların biyoyararlanımlarını arttırabilmektedir. Kanserli hastalara elakridar uygulamasına bağlı olarak minimum düzeyde yan etki gözleendiği tespit edilmiştir (164). Ayrıca, diğ er taşıyıcı proteinler (BCRP gibi) üzerinde de seçici olarak etki gösterebilmektedir (165-167). Ancak MRP ve CYP3A için inhibitör etkisi açıklanmamıştır (168).

ELA'nın miktar tayini amacıyla HPLC ve sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (*Liquid chromatography-mass spectrometry/LC-MS*) ve flow sitometri gibi yöntemler kullanılmaktadır (169, 170).

- **Fenol Kırmızısı**

Kimyasal adı fenolsülfonftalin olan fenol kırmızısı ($C_{19}H_{14}O_5S$, molekül ağırlığı: 354,37 g/mol; Şekil 2.10) kırmızı renkte, kokusuz kristal bir tozdur (137). Suda, etanolde ve metanolde çözünür, kloroformda çözünmez (171).



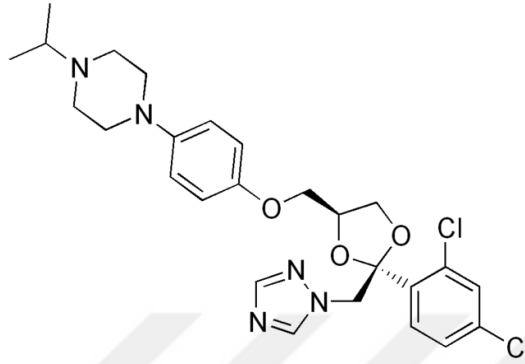
Şekil 2.10. Fenol kırmızısının kimyasal yapısı.

Hücre kültürü çalışmalarında pH indikatörü, bağırsaklarda su dengesini incelemek amacıyla referans madde ve böbrek fonksiyonlarının takibi için fenol kırmızısı (FK) kullanılmaktadır.

- **Ketokonazol**

Kimyasal adı ($\pm$)-cis-1-Asetil-4-{4-[2(2,4-diklorofenil)-2-imidazol-1-ilmetil 1,3-dioksolan-4-ilmetoksi]fenilpiperazin olan ketokonazol ($C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$, molekül ağırlığı: 531,4 g/mol; Şekil 2.11) imidazol yapısında olup, beyaz veya beyaza yakın bir tozdur.

Suda pratik olarak çözünmemekle beraber, metil alkolde çözünür, diklorometanda kolayca çözünür (137). Ketokonazol (KET) BSS ve BDDCS'ye göre Sınıf II (düşük çözünürlük, yüksek permeabilite; düşük çözünürlük, zayıf metabolizma)'de yer alır (172).



Şekil 2.11. Ketokonazolün kimyasal yapısı.

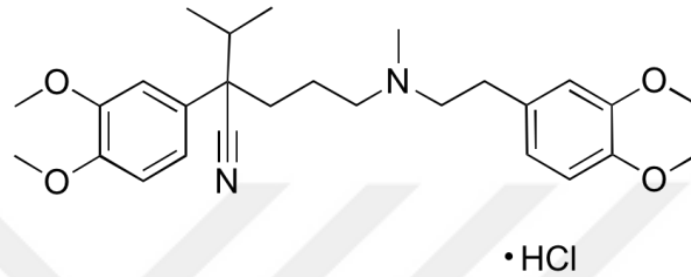
KET, antifungal olarak mantar enfeksiyonlarında sistemik ve topikal olarak uygulanabilmektedir (173). Ayrıca literatürde ve çeşitli kılavuzlarda CYP3A4 inhibitörü olarak önerilen referans ilaçtır (174).

Mide pH'sındaki düşme sonucu GİS'ten ketakonazolün absorpsiyonu artmaktadır. Oral yolla uygulanan ketakonazolün (200 mg) uygulamadan 2 saat sonra ortalama pik plazma konsantrasyonu 3,5 µg/mL olarak tayin edilmiştir. Ayrıca, sağlıklı gönüllülere topikal ve vajinal ketakonazol uygulamasına bağlı absorpsiyon düşüktür. Plazma proteinlerine bağlanması > %90'dır ve albümine yüksek oranda bağlanır. Anne sütüne geçer, fakat serebrospinal sıvıya geçişi azdır. Bifazik eliminasyon gösterir, yarılanma ömrü ve terminal yarılanma ömrü sırasıyla 2 ve 8 saat'tir. Karaciğerde aktif olmayan metabolitlerine dönüştürülür. Metabolitler ve değişmemiş ilaç büyük oranda feçesle atılırken idrar ile atılması azdır (137).

- **Verapamil Hidroklorür**

Kimyasal adı 2-(3,4-dimetoksifenil)-5-[2-(3,4-dimetoksifenil)etil-metilamino]-2-propan-2-ilpentannitril;hidroklorür olan verapamil ($C_{27}H_{39}ClN_2O_4$, molekül ağırlığı: 491,1 g/mol; Şekil 2.12) beyaz, kokusuz kristal bir tozdur. Suda çözünürken alkolde az

çözünmektedir. Kloroformda kolayca çözünürken, eterde çözünmemektedir (137). BSS ve BDDCS'ye göre Sınıf II (düşük çözünürlük, yüksek permeabilite; düşük çözünürlük, yüksek metabolizma)'de yer alır. Ancak, pH 7,3 - 8 arasında çözünürlük problemi olsa da pH 1 – 6,8 arasında çözünürlük özellikleri ile ilgili bir sorunu olmadığı için DSÖ tarafından Sınıf I olarak sınıflandırılabilceği de belirtilmektedir (175).



Şekil 2.12. Verapamil hidroklorürün kimyasal yapısı.

Verapamil (VER) antianjinal, antihipertansif ve antiaritmik etkileri olan selektif olmayan bir kalsiyum kanal blokörüdür. Piyasa preparatlarında farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri farklı olan optik izomerlerini ((+)-(R)-Verapamil ve (-)-(S)-Verapamil) eşit oranda içeren rasemik bir karışım halindedir. Enantiyomerlerinin insan jejunumundan permeabilitesi yüksektir ve esas olarak pasif transsellüler difüzyon ile taşınmaktadır. Metabolizması stereoselektiftir ve S-Verapamil hızlı, R-Verapamil orta oranda hepatik ekstraksiyona uğrar. Oral yolla tek dozda uygulandıktan (160 mg) sonra insanlardaki biyoyararlanım S- ve R- izomerleri için sırasıyla %20 ve %45'tir. Metabolizasyonunda majör olarak etkili enzim CYP3A4'tür (176). FDA kılavuzuna göre orta derecede CYP3A4 inhibisyonu sağlayan VER'in (174), yapılan son çalışmalarda PMAT inhibitörü de olduğu gösterilmiştir (175).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Biyolojik Maddeler

Madde Adı	Marka / Kaynak
Asetonitril	Merck / Almanya
Atenolol	Sigma-Aldrich / ABD
Caco-2 hücre hattı	ATCC / ABD
D-(+)-Glikoz monohidrat	Isolab Chemicals / Almanya
Dimetil sülfoksit	Isolab Chemicals / Almanya
Dimetil sülfoksit steril	Origen Biomedical, CryoPur / ABD
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
Elakridar	Cayman Chemical / ABD
FBS (Fetal Bovin Serumu)	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
Fenol kırmızısı	Sigma-Aldrich / Almanya
HBSS (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
HCT-8 hücre hattı	ATCC / ABD
HEPES	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
Ketokonazol	Sandoz / Türkiye
Lusifer sarısı	Sigma-Aldrich / ABD
MES hidrat	Sigma-Aldrich / ABD
Metanol	Isolab Chemicals / Almanya
Metoprolol tartarat	Novartis Pharma AG / İsviçre
Tiazolil mavi tetrazolyum bromür (MTT)	AppliChem GmbH / Almanya
Penisilin-Streptomisin	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya

Potasyum dihidrojen fosfat	Isolab Chemicals, Almanya
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich / ABD
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
Sodyum klorür	Isolab Chemicals / Almanya
Trietilamin	J.T. Baker / ABD
Tripsin-EDTA çözeltisi	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
Verapamil	Sigma-Aldrich / Almanya

3.1.2. HPLC Gereçleri

Cihaz/Alet Adı	Marka / Kaynak
HPLC (LC-20 A/Prominence Alliance, Diot Array Dedektör (DAD)	Shimadzu / Japonya
HPLC kolonu (Intersustain C18, 5 µm, 250 × 4.6 mm)	GL Sciences / Japonya
Vakumlu Pompa (Shimadzu, LC-20AT)	Shimadzu / Japonya

3.1.3. Perfüzyon Gereçleri

Cihaz/Alet Adı	Marka / Kaynak
Cerrahi iplik	SMI / Belçika
Isı kontrollü kabin	Comat / Türkiye
Maskito düz klemp	Steriway / Türkiye
Perfüzyon tüpleri	Gilson / Fransa
Peristaltik pompa	Gilson / Fransa
Standart cerrahi makas	Steriway / Türkiye
Standart cerrahi penset	Steriway / Türkiye
Vannas makas	Steriway / Türkiye

3.1.4. Aletler

Cihaz/Alet Adı	Marka / Kaynak
Derin dondurucu (-20 °C)	Beko, Türkiye
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Eppendorf, ABD
Manyetik balık	Isolab, Almanya
Manyetik balık tutucusu	Isolab, Almanya
Membran filtre (Karışık selüloz, 0,45 µm)	Lubitech, Çin
Membran filtre (Politetrafloroetilen (PTFE), 0,45 µm)	Lubitech / Çin
Mikropipet (0,5-10, 10-100, 100-1000 µL)	Eppendorf / Almanya
Mikrosantrifüj tüpü (renkli)	LP Italiana Spa, İtalya
Mikrosantrifüj tüpü çalkalayıcı (Eppendorf Thermomixer, USA)	Eppendorf, ABD
Nitril eldiven	Isolab, Almanya
Parafilm	Isolab, Almanya
pH Metre	Hanna Instruments / ABD
Pipet ucu (10, 200, 1000 µL)	Greiner Bio-One / Almanya
Plate (96 Kuyucuklu)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germany)
Santifüj tüpü (renkli) (15 ve 50 mL)	Isolab, Almanya
Şırınga ucu filtre (Karışık selüloz, 0,45µm)	Lubitech / Çin
Şırınga ucu filtre (PTFE, 0,45µm)	Lubitech / Çin
Thincert	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germany)
Ultra saf su cihazı (Mili-Q İntegral 5)	Millipore / ABD
Ultrasonik Banyo	AdvantageLab / Almanya
Vial (amber renkli cam), insert ve kapak	Allpro / Çin
Vorteks	Biosan / Litvanya

3.1.5. Deney Hayvanı

Tür	Kaynak	Barınma
Sprague Dawley, Erkek Sıçan	Kobay Deney Hayvanları A.Ş., Türkiye	Kobay Deney Hayvanları A.Ş., Türkiye

3.2. Yöntem

Malnütrisyonunda ilaçların bağırsaklardan absorpsiyonu/permeabilitesi ve farmakokinetik parametrelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalar:

- Çalışmada kullanılan etkin maddeler için uygun analiz yönteminin belirlenmesi ve valide edilmesi,
- Hücre kültürü çalışmaları,
 - Hücre canlılığı testleri,
 - Çift yönlü transport çalışmaları,
- Hayvan deneyleri,
 - *In situ* üçlü bağırsak perfüzyonu çalışmaları,
 - *In vivo* farmakokinetik çalışmalar,
- Modelden bağımsız yöntem ile *in vivo* sonuçların değerlendirilmesi
 - Minimal fizyolojik esaslı farmakokinetik modelleme çalışmaları,
 - Oral profillerin birlikte uyumu (*joint fitting*),
 - PopPK analizleri

3.2.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Hücre kültürü, *in situ* bağırsak perfüzyonu ve *in vivo* çalışmalarından elde edilen numunelerdeki etkin madde miktarları HPLC cihazı kullanılarak valide edilmiş analitik yöntemlerle tayin edilmiştir. ATN ve MET'in eş zamanlı miktar tayini için yapılan literatür taraması sonucunda denenmek üzere Tablo 3.1.'de yer alan yöntemler seçilmiştir.

Tablo 3.1. ATN ve MET'in tayininde kullanılan HPLC yöntemleri.

Etkin Madde	Metot	Kolon	Mobil Faz	Dalga Boyu (nm)	Akış Hızı (mL/dk)	Kolon Sıcaklığı (°C)	Enjeksiyon Hacmi (µL)	Alıkoma Zamanı (dk)	Kaynak
ATN, MET	HPLC-UV	C18	fosfat tamponu (pH 3,8), ACN (90:10)*	220	1	35	Belirtilmemiş	ATN: 5,1 MET: 15,4	(177)
ATN, MET	HPLC	C18	0,03 M potasyum tamponu (pH 3,5), ACN, metanol (58:21:21)	227	1	25	5	ATN: 2,58 MET: 3,58	(178)
ATN	HPLC-UV	C8	ACN, metanol, 0.02 M fosfat tamponu, (pH 5) (20:20:60)	226	1	25	20	1,76	(179)
ATN, MET	HPLC-UV	C18	0,1 M fosfat tamponu (pH 3,14), ACN (60:40)	ATN: 228 MET: 224	1.2	25	20	ATN: ~ 3,6 MET: ~ 4,2	(180)
ATN, MET	HPLC-UV	C18	10 mM fosfat tamponu (pH 3,0), ACN (50:50)	ATN: 237 MET: 243	1	25	20	ATN: 2,303 MET: 2,827	(181)

ACN, asetonitril; *ACN oranı ilk 25 dakika sonunda %10'dan %35'e çıkacak şekilde gradient uygulanmıştır.

Tablo 3.1’de yer alan yöntemlerin denenmesi sonucu belirlenen optimum yöntemle çalışmalar başlatılmıştır.

***In vitro ve in situ* Çalışmalar İçin Analitik Yöntem Optimizasyonu**

ATN, MET ve FK’nin aynı anda tayin edilmesini sağlayan biyoanalitik yöntem geliştirme amacıyla yapılan ön denemeler sonucunda Delamoye ve ark. tarafından kullanılan gradient yöntemi (177) modifiye edilerek ATN, MET ve FK’nin eş zamanlı olarak tayin edebilen bir metot taslağı oluşturulmuştur (Tablo 3.2.). Çeşitli denemeler yapılarak en uygun kolon, sıcaklık, hareketli faz, enjeksiyon hacmi, dalga boyu ve akış hızı tayin edilmiştir.



Tablo 3.2. Metot optimizasyonu ve geliştirilen HPLC metot taslağı.

Kolon	Optimum: InertSustain C18 (5 µm; 4,6 mm x 250 mm) Denenen kolonlar: InertSustain C18; ODS-2 C18; Waters Spherisorb® ODS 2 ve C8
Kolon Sıcaklığı	Optimum: 35°C Denenen sıcaklık değerleri: 20, 25, 35 ve 40°C
Hareketli Faz I – A Hattı	Optimum: ACN Denenen organik çözücüler: ACN ve MeOH
Hareketli Faz II – B Hattı	Optimum: pH 7,0 Fosfat Tamponu (12,5 mM) Denenen pH'lar: 2,51; 3,0; 3,5; 3,8; 5,3; 6,61; 7,0 ve 7,10 Denenen konsantrasyonlar: 12,5; 25,5 ve 50 mM
D Hattı	Tip I Su
Akış Hızı	Optimum: 1 mL/dk Denenen hızlar: 0,8; 1; 1,2 ve 1,5 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL Denenen enjeksiyon hacimleri: 10 ve 50 µL
Dalga Boyu	Optimum: 224 nm Denenen dalga boyları: 224, 225, 227, 228, 232, 237, 243, 273, 274 ve 450 nm
Analiz Süresi	Optimum: 23 dk Denenen analiz süreleri: 10, 15, 23 ve 26 dk
Yöntem	90:10 (tampon:ACN) – Başlangıç %10 – 35'e ACN gradient 0,01- %10 15,00 - %35 23,00 - %35 * Ardışık numuneler arası dengelenme süresi 3 dk olarak başlangıç oranlarında hareketli faz ile (tampon:ACN, 90:10) yapılacaktır.

ACN: asetonitril, MeOH: metanol.

Metot geliştirme sürecinde Tablo 3.2.'de verilen çeşitli C18 kolonları ve C8 kolon kullanılarak denemeler yapılmıştır. C18 kolonları kullanılarak yapılan denemelerde ATN, MET ve FK'nin alıkonma zamanları farklılık göstermiştir. C8 kolonda ayırıcılık yetersiz olduğu için C18 kolonda analizlerin yapılmasına karar verilmiştir. Farklı C18 kolon markaları arasında sistem uygunluk parametreleri değerlendirilerek InertSustain C18 kolonda çalışmaların devam ettirilmesine karar verilmiştir.

Metot geliştirme için öncelikle izokratik akış denenmiş fakat analiz edilecek maddelerin birbirinden ayrılması için yeterli olmadığından gradient yöntemleri denenerek metot belirlenmiştir. Metot optimizasyonu için çeşitli analiz sürelerinde ve çeşitli hız ve hareketli faz oranlarında denemeler yapılmış ve optimum analiz süresi ve hareketli faz oranları tespit edilmiştir.

Taslak metot kullanılarak yapılan analizler oda sıcaklığında gerçekleştirildiğinde elde edilen piklerin asimetri oranları daha yüksek bulunduğu için çeşitli sıcaklıklar denenerek metot optimize edilmiştir. Optimum düzey 35°C’de elde edilmiştir.

Hareketli faz için organik çözücü olarak çeşitli oranlarda ACN ve MeOH denenmiştir. Metoda MeOH dahil edildiğinde MET ve FK’nin alıkonma zamanlarının arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle hareketli faz olarak ACN seçilmiştir.

Ayrıca çeşitli pH ve konsantrasyonlarda fosfat tamponlarının denenmesi sonucu asidik pH’lerde ATN’nin alıkonma zamanının kısaldığı, MET ve FK piklerinin birbirlerine yakın çıktığı tespit edilmiştir. Bu nedenle asidik pH’lerde ATN’nin, asidik ortamda urasil enjekte edilerek tespit edilen ölü hacme çok yakın pik vermesi ve 2-(*N*-morfolino) etansülfonik asit (MES) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan çalışmalarda tampondan gelen piklerle girişim yapma olasılığı mevcuttur. Ayrıca, asidik pH’lerde yapılacak validasyon çalışmalarında yüksek konsantrasyonlarda hazırlanacak standart numuneler için MET ve FK piklerinin arasında 1 dk’dan az sürenin olması girişimlere sebep olma riskini arttırmaktadır. Bu nedenlerle asidik karakterli bir tampon seçilmemiştir. Bazik pH’da ise analiz edilecek maddelerin sistem uygunluk parametrelerinin istenen aralıklar içinde olmadığı tespit edilmiştir. Optimum sonuçlar pH 7,0 tamponu kullanılarak elde edilmiştir. pH 7,0 fosfat tamponu farklı konsantrasyonlarda (12,5; 25,5 ve 50 mM) kullanılarak denemeler yapılmıştır. Bunun sonucunda pik asimetri oranı en uygun çıkan konsantrasyon değeri 12,5 mM olarak tespit edilmiştir.

Metot optimizasyonunda çeşitli hareketli faz hızlarında çalışılmıştır. Akış hızı değeri 1 mL/dk'nin altına indiğinde maddelerin alıkonma zamanları uzamış, pik şekilleri bozulmuş ve pik asimetri oranları artmıştır. Akış hızı değeri 1 mL/dk'nin üstüne çıktığında ise maddelerin alıkonma zamanları kısalmış ve pik asimetri oranlarında artış gözlenmiştir. Bu nedenle optimum akış hızı değeri 1 mL/dk olarak belirlenmiştir.

Optimum koşullarda yapılan analizler sonucunda elde edilen kromatogramlar değerlendirilirken üç maddenin de aynı kromatografik pencerede analizini sağlayan dalga boyunu bulmak için çeşitli dalga boylarında incelemeler yapılmıştır. Bunun sonucunda 224 nm üç maddenin de gözlenebildiği optimum dalga boyu olarak seçilmiştir.

Optimum koşullarda yapılan analizlerde 15 dk'lık analiz süresinin ATN, MET ve FK'nın eş zamanlı tayinlerinde yeterli olduğu bulunmuştur. Hücre kültürü çalışmalarında ise MET ile birlikte nitel olarak analiz edilecek ELA, KET ve VER alıkonma zamanları sırası ile 19,620; 19,668 ve 19,660 dakika olduğu için nitel analiz yapılabilmesi için analiz süresi 23 dk olacak şekilde uzatılmıştır.

***In vivo* Çalışmalar İçin Metot Optimizasyonu**

Hücre kültürü ve *in situ* perfüzyon çalışmalarından elde edilen numunelerin analizi için geliştirilen HPLC metodu modifiye edilerek *in vivo* çalışmalardan elde edilen numunelerin analizleri yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL'den 50 µL'ye, analizler arası dengelenme süresi 3 dk'dan 5 dk'ya çıkarılmış ve analiz süresi 23 dk'dan 15 dk'ya indirilmiştir (Tablo 3.2.). Enjeksiyon hacminin artması ile kolona verilen madde miktarının artması ve daha düşük konsantrasyonların tayininin sağlanabilmesi amaçlanmıştır. Plazma numuneleri ile çalışıldığı için dengelenme süresi uzatılarak, bir önceki analizden sonra sistemin dengelenmesi sağlanmıştır. Analiz edilecek ATN ve MET'in alıkonma zamanları doğrultusunda analiz süresi 23 dk'dan 15 dk'ya kısaltılarak, daha az solvan harcanarak analizler yapılmıştır.

Biyolojik numunelerden ekstraksiyondan sonra yapılacak analizlerde genellikle iç standart kullanımı tercih edilmektedir. *İn situ* bağırsak perfüzyonu çalışması için geliştirilmiş olan HPLC yöntemi ile ATN ve MET'in aynı anda analizi yapılabilmektedir. *İn vivo* çalışmalarda ATN ve MET uygulaması ayrı yapıldığı için ATN olan numunelerde iç standart olarak MET (20 µg/mL); MET olan numunelerde ise iç standart olarak ATN (20 µg/mL) kullanılmıştır. *İn vivo* çalışmalar için kullanılan HPLC yöntemi Tablo 3.3.'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3. *İn vivo* çalışmalarda kullanılan HPLC yöntemi.

Kolon	InertSustain C18 (5 µm; 4,6 mm x 250 mm)
Kolon Sıcaklığı	35°C
Hareketli Faz I	ACN
Hareketli Faz II	pH 7,0 Fosfat Tamponu (12,5 mM)
Akış Hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	50 µL
Dalga Boyu	224 nm
Analiz Süresi	15 dk
Yöntem	90:10 (tampon:ACN) – Başlangıç %10 – 35'e ACN gradient 0,01 - %10 15,00 - %35 *Ardışık numuneler arası dengelenme süresi 5 dk olarak başlangıç oranlarında hareketli faz ile (tampon:ACN, 90:10) yapılmıştır.

ACN: asetonitril, MeOH: metanol.

Biyoanalitik Yöntem Validasyonu

Bir analitik yöntem sonucunda elde edilen verilerin doğru, kesin ve güvenilir olarak tayin edildiğinin kanıtlanması için metodun valide edilmesi gerekmektedir. Bir yöntemin validasyonu, bir veya bir seri analitin belirli bir matriks içindeki konsantrasyonunun tayini için kullanılan belirli bir yöntemin, amaçlanan uygulama bakımından güvenilirliğini göstermek için yapılması gereken bütün işlemleri kapsamaktadır. Yapılması planlanan analizler için hücrelerden, sıçan bağırsağından ve

kandan elde edilen numuneler kullanılacağı için metod validasyonu biyoanalitik metod validasyonu ICH M10 kılavuzunda yer alan kabul kriterlerine göre yapılmıştır (182). Bu amaçla seçicilik, özgüllük, matriks etkisi, kalibrasyon doğrusu ve aralığı, doğruluk ve kesinlik, analit taşınması, kararlılık, enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik, geri kazanım ve sistem uygunluk testleri yapılmıştır.

- **Seçicilik (*Selectivity*)**

Tayin edilecek analitlerin matrikste yer alan diğer maddelerin varlığında analiz edilmesi ile seçicilik çalışmaları yapılmıştır. Seçicilik çalışmaları kapsamında tayin edilecek maddeleri (ATN ve MET) içermeyen, *in vitro* hücre kültürü (çift yönlü transport) ve *in situ* üçlü bağırsak perfüzyon çalışmalarında matriks olarak kullanılan sırasıyla *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) ve MES tamponu çözeltilerinin ve *in vivo* çalışmalar için boş plazmanın kolona enjeksiyonu yapılarak değerlendirilmiştir.

- **Özgüllük (*Specificity*)**

Tayin edilecek analitlerin, analite yapısal olarak benzeyen maddeler, metabolitler, izomerler, safsızlıklar, bozunma ürünleri dahil olmak üzere diğer maddelerin varlığında saptanması ve ayırt edilebilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla özgüllük çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda birlikte uygulanacak ATN, MET ve FK'nin, ATN ve Lucifer sarısı (*Lucifer Yellow*, LY)'nin, MET ve ELA, KET ve VER'in kolona enjeksiyonları sonucu girişim olup olmadığı değerlendirilmiştir.

- **Matriks Etkisi (*Matrix effect*)**

Numunenin bulunduğu matrikste girişime neden olan ve çoğunlukla tanımlanamayan bileşen(ler) nedeniyle analitin analiz edilmesinde meydana gelebilecek değişiklikler tespit edilmelidir. Bu nedenle yöntemin validasyonu sırasında matriks etkisi değerlendirilmiştir. Matriks etkisi, her biri en az 6 farklı kaynaktan alınan matriksler kullanılarak hazırlanan düşük ve yüksek kalite kontrol numunelerinin en az 3 tekrarlı olarak analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.

- **Kalibrasyon Doğrusu ve Aralığı (*Calibration Curve and Range*)**

Analitlerin çeşitli konsantrasyonları ile cihazın analit cevapları arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla kalibrasyon doğrusu ve aralığı tespit edilmelidir. Kalibrasyon doğrusu ve aralığını tespit etmek ile ATN, MET ve FK'nin stok çözeltileri hazırlanmıştır. ATN, MET ve FK'nin hareketli faz içinde hazırlanan stok çözeltilerinden (100 µg/mL) uygun seyreltmeler yapılarak standart çözeltiler (ATN: 0,76; 1; 2; 5; 10; 20; 30; 37,5; 40 ve 50 µg/mL, MET: 1,14; 3; 5; 10; 20; 30; 37,5; 40 ve 50 µg/mL, FK: 0,47; 1; 2,5; 7,5; 8; 10; 12,5; 15; 17,5 ve 20 µg/mL) hazırlanmıştır. ATN, MET ve FK'nin teorik konsantrasyonlarına karşı HPLC analizinde gözlenen pik alanlarının doğrusal regresyon analizleri yapılmıştır. *In vivo* çalışmalar için ATN analizlerinde MET, MET analizlerinde ise ATN iç standart olarak kullanılarak her bir etkin madde için kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur.

Konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak standart doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (R^2) hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğruları her bir konsantrasyon noktasında 6 tekrarlı olarak hazırlanmıştır. R^2 değerinin 1'e yakın olmasına göre değerlendirme yapılmıştır.

Kalite kontrol standartları (KKS) kalibrasyon eğrisi aralığında en düşük kalibrasyon sınırı, düşük (en düşük kalibrasyon sınırının 3 katı içerisinde), orta (kalibrasyon aralığının %30-50'sinde) ve yüksek (en yüksek kalibrasyon sınırının en az %75'i) konsantrasyonu içerecek şekilde minimum 4 farklı nokta belirlenmiştir (182). Doğrusallık çalışmalarından sonra ATN, MET ve FK için kalite kontrol standartları belirlenerek doğruluk ve kesinlik çalışmaları bu standartlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.).

Tablo 3.4. *In vitro* ve *in situ* çalışmalar için validasyon çalışmalarında kullanılan kalite kontrol standartları ve konsantrasyonları.

KKS	ATN (µg/mL)	MET (µg/mL)	FK (µg/mL)
En düşük kalibrasyon sınırı (LLOQ)	0,76	1,14	0,47
Düşük	2	3	1
Orta	20	20	8
Yüksek	37,5	37,5	15

Tablo 3.5. *In vivo* çalışmalar için validasyon çalışmalarında kullanılan kalite kontrol standartları ve konsantrasyonları.

KSS	ATN (µg/mL)	MET (µg/mL)
En düşük kalibrasyon sınırı (LLOQ)	5,13	4,97
Düşük	10	10
Orta	20	30
Yüksek	37,5	56,25

- **Doğruluk ve Kesinlik (*Accuracy and Precision*)**

Analitlerin gerçek konsantrasyon değeri ile ölçülen değer arasındaki farkı göstermek için doğruluk, aynı şartlarda ve aynı yöntemle elde edilen sonuçların birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini tespit etmek için ise kesinlik analizleri yapılmıştır.

Metot validasyonunda doğruluk ve kesinlik çalışmaları için çalışma numunelerini temsil eden KKS'ler hazırlanmıştır. Bu numuneler, çalışma numuneleri için öngörülen koşullarda saklanarak analiz edilmiştir. Her bir etkin madde için aynı düzeydeki kalite kontrol örnekleri eş zamanlı olarak tayin edilmiştir. Diğer bir deyişle ATN, MET ve FK'nin LLOQ konsantrasyonundaki numuneleri aynı vial içinde hazırlanmıştır. Her bir kalite kontrol standardı için ATN, MET ve FK'nin belirtilen konsantrasyonunu içeren 4 farklı vial hazırlanmıştır. Analizler her bir vial için altı tekrarlı (4 x 6 = 24 vial) olacak şekilde hazırlanarak gün içi doğruluk ve kesinlik çalışması yapılmıştır.

Ayrıca, yapılan gün içi çalışmanın 3 ayrı günde tekrarlanmasıyla günler arası doğruluk ve kesinlik çalışması yapılmıştır. Doğruluk % ortalama bağıl hata (OBH, Eşitlik 3.1.), kesinlik ise % bağıl standart sapma (BSS) hesaplanması ile değerlendirilmiştir.

$$\% \text{ OBH} = \left| \frac{(\text{Bulunan konsantrasyon} - \text{Eklenen konsantrasyon})}{(\text{Eklenen konsantrasyon})} \times 100 \right| \quad (3.1.)$$

- **Analit Taşınması (*Carry-over*)**

Analitlerin tayininde cihazda önceki numuneden kalan analitin ölçülen konsantrasyon üstündeki etkisini değerlendirmek için analit taşınması analizi yapılmıştır. Bu kapsamda hareketli faz içinde ATN, MET ve FK'nin enjekte edilen en yüksek kalibrasyon standartlarının analizi sonrası boş matris analiz edilerek elde edilen pikler değerlendirilmiştir.

- **Kararlılık (*Stability*)**

Analitleri içeren numunelerin analiz edileceği zamana kadar saklanacağı koşullarda kararlılığının değerlendirilmesi için kararlılık analizleri yapılmıştır. Analitlerin kararlılığı, düşük ve yüksek konsantrasyonda kalite kontrol örnekleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Örnekler enjekte edildikten sonra buzdolabında +4°C'de ve buzlukta -20°C'de muhafaza edilmiştir. 24 saat, 1 hafta ve 1 ay sonra numuneler analiz edilerek geri kazanım değerleri (%) hesaplanmıştır.

- **Enjeksiyonlar Arası Tekrar Edilebilirlik (*Reinjection Reproducibility*)**

Aynı yöntem, aynı analizci, aynı cihaz ve aynı laboratuvar koşullarında ölçümlerin tekrarlanabilirliğini göstermek amacı ile enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik, depolamadan sonra kalite kontrol örneklerinden düşük, orta ve yüksek olanların minimum 5 tekrarından oluşan bir çalışmayı yeniden enjekte ederek değerlendirilmiştir (182). Enjeksiyonlar arasındaki tekrar edilebilirlik analizleri için 6 tekrarlı olacak şekilde düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarındaki kalite kontrol standartları kullanılarak analizler yapılmıştır.

- **Geri Kazanım (*Recovery*)**

Analitlerin gerçek konsantrasyonu ile analiz edilen analit miktarlarının ölçüm sonucunun karşılaştırılması amacı ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. ATN, MET ve FK'nin düşük, orta ve yüksek konsantrasyondaki kalite kontrol standartları için yapılan geri kazanım çalışma sonuçları değerlendirilmiştir.

- **Sistem Uygunluk Testleri (*System Suitability Tests*)**

Cihazın, elektronik parçaların, analitik işlemlerin ve analitlerin bir arada değerlendirilebilmesi amacı ile sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Geliştirilen metodun sistem uygunluk testleri USP'de belirtilen ayırıcılık, teorik tabaka sayısı (kolon etkinliği) ve pik asimetri oranı (kuyruklanma faktörü) gibi parametreler dikkate alınarak kantitatif analizi yapılacak olan ATN, MET ve FK için değerlendirilmiştir (183, 184).

Kapasite faktörlerinin (k') hesaplanmasında kullanılan ölü hacmi tayin etmek için geliştirilen metot kullanılarak urasil (0,1 mg/mL) enjekte edilmiştir. Ölü hacim 3,014 dakika olarak tespit edilmiş ve maddelerin kapasite faktörleri Eşitlik 3.2. kullanılarak manuel olarak hesaplanmıştır.

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (3.2.)$$

t_R : Maddenin alıkonma zamanı, t_0 : ölü zaman (kolonda tutunamayan maddenin alıkonma zamanı)

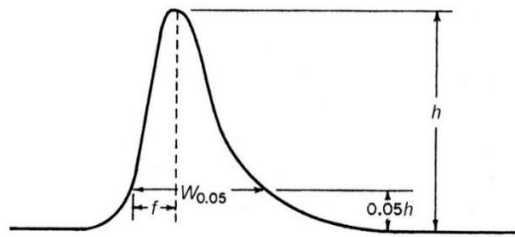
Kolon etkinliği teorik tabaka sayısı (N) ile ifade edilmekte olup bu değerin 2000'in üzerinde olması gerekmektedir (Eşitlik 3.3). ATN, MET ve FK için bu değer HPLC cihazı tarafından hesaplanmıştır.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{t_w} \right)^2 \quad (3.3.)$$

t_R : maddenin alıkonma zamanı, w : pikin taban genişliği

Elde edilen piklerin asimetrisi kuyruklanma faktörü (*tailing factor*, T) ile gösterilmiştir. Bu değerin 1 olması pikin simetrik olduğunu gösterirken bu değerdeki artış analizin doğruluğunun azaldığını göstermektedir. Simetri faktörü (Şekil 3.1) Eşitlik 3.4.'e hesaplanmaktadır (183). ATN, MET ve FK için kuyruklanma faktörü HPLC cihazı tarafından hesaplanmıştır.

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f} \quad (3.4.)$$



Şekil 3.1. Pik kuyruklanma faktörü (T) hesabı (183).

h: pik yüksekliği, $W_{0.05}$: %5 yükseklikte pikin genişliği, f: taban çizgisinden tepe yüksekliğinin %5'lik noktasında ölçülen mesafe.

Ayırıcılık (rezolüsyon), analiz edilecek madde pikleri arasındaki ayırımı ölçüsüdür ve kullanılan kolonun pikleri ayırma kapasitesini ifade etmektedir. Rezolüsyonun yüksek olması pikler arasındaki taban çizgisinin ayırımının iyi olduğunu gösterir. ATN, MET ve FK için rezolüsyon değerleri HPLC cihazı tarafından hesaplanmıştır.

3.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

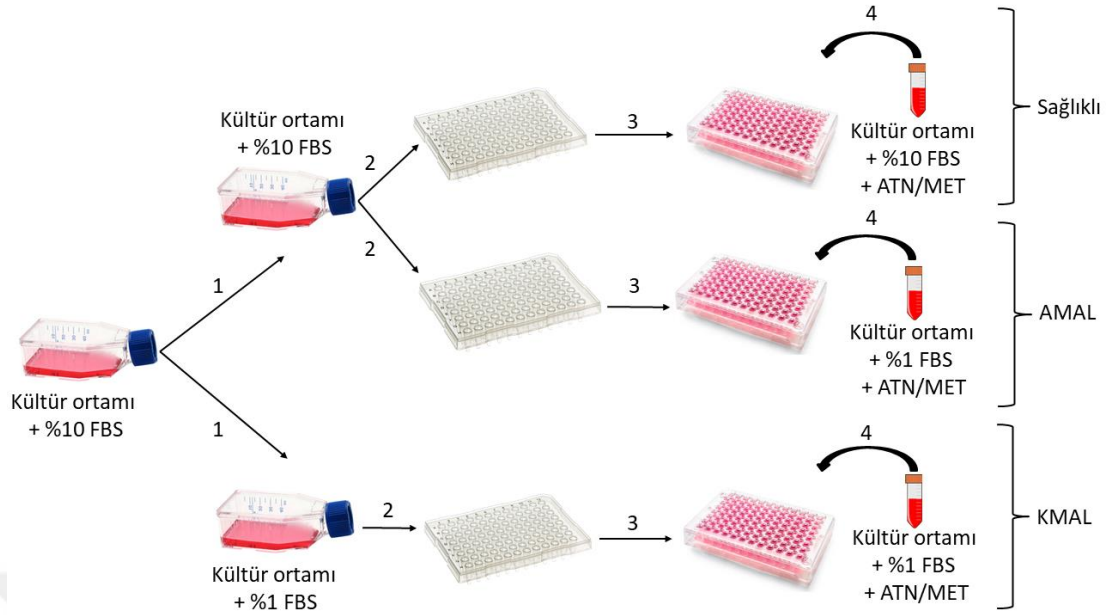
- **Hücre Canlılığı Testleri**

Canlı hücrelerin renksiz ya da az renkli 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT)'ün, renkli formazan türevlerine dönüştürmesi esasına dayanan yöntem 1983 yılında Mosmann tarafından immünolojik çalışmalar için hızlı bir kolorimetrik yöntem olarak tanımlanmıştır (185). Sarı renkli olan MTT, çoğalan hücrelerde bulunan mitokondriyal süksinik dehidrogenaz enzimi tarafından

suda çözünmeyen ve spektrofotometrik olarak ölçülebilen mor renkli formazana dönüşmektedir. Hücre canlılığı çalışmaları hücrelerin mitokondriyal enzimlerinin MTT tetrazolyum tuzunu MTT formazana dönüştürmesi ile hücre canlılığının ve eklenen konsantrasyondaki etkin maddelerin toksik olup olmadığının test edilmesi esasına dayanan hücre canlılığı testi ile yapılmıştır.

Hücre canlılığı testi için sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilecek hücreler ayrı flaskalarda büyütülmüştür. Sağlıklı hücreler %10 fetal bovin serum (FBS) içeren kültür ortamı ile beslenmeye devam ederken, kronik malnütrisyon (KMAL) geliştirilecek hücreler 21 gün boyunca %1 FBS ile beslenmiştir. Hücre süspansiyonları 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hemasitometre ve tripan mavisi kullanılarak sayılıp 96 kuyucuklu steril plakalara ekilmiştir. Her plakanın dış tarafında bulunan kuyucuklara inkübatörde kurumayı engellemek amacıyla hücre ekilmeyip fosfat tamponlu salin (*phosphate buffered saline*-PBS; pH 7,4) eklenmiştir. Hücrelerin kuyucuklara tutunabilmesi için 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda kültür ortamı içinde çözündürülerek hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki ATN ve MET çözeltileri (ATN: 5, 10, 50, 100 ve 150 µg/mL; MET: 5, 10, 50, 100 ve 300 µg/mL) kuyucuklara (n=5) eklenmiştir. Ayrıca etkin madde içermeyen kontrol grupları için (n=5) kuyucuklara PBS ve kültür ortamı eklenmiştir.

KMAL geliştirilen ve akut malnütrisyon (AMAL) geliştirilecek olan hücrelere etkin maddeler %1 FBS içeren kültür ortamında çözündürülerek uygulanmıştır (186, 187). KMAL geliştirilen hücreler hiçbir aşamada yüksek oranda FBS içeren kültür ortamı ile muamele edilmemiş, AMAL geliştirilmesi hedeflenen hücrelerin ilk kez %1 FBS ile karşılaşması etkin madde uygulaması ile beraber olmuştur. Hücre canlılığı testleri için malnütrisyon geliştirme yöntemleri Şekil 3.2.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.2. Hücre canlılığı testi için AMAL ve KMAL geliştirme yöntemleri.

1: sağlıklı hücrelerin iki ayrı flaska bölünmesi, 2: hücrelerin 96 kuyucuklu plakalara ekilmesi, 3: 24 saatlik inkübasyon, 4: inkübasyon sonunda kuyucuklara ATN/MET içeren çözeltilerin eklenmesi.

Etkin madde eklenen steril plakalar 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda MTT (5 mg/mL) çözeltisi hücre içeren kuyucuklara ilave edilerek 4 saat inkübatörde (37°C, %5 CO²) bekletilmiştir. 4 saatlik süre sonunda plakaların içindeki çözeltiler boşaltılarak kuyucuklara DMSO (50 µL/kuyucuk) eklenmiştir. Kuyucuklarda oluşan kristal yapılar *inverted* mikroskopta incelenmiştir. 570 ve 650 nm’de mikroparka okuyucu (*Elisa Plate Reader*) kullanılarak absorbanslar okunmuştur. Elde edilen değerler ile etkin maddelerin sitotoksosite yüzdesi hesaplanarak transport çalışmalarında kullanılacak en uygun konsantrasyon belirlenmiştir.

- **Çift Yönlü Transport Çalışmaları**

Hücre kültürü çalışmalarına başlamak için -200°C’de dondurulmuş olarak temin edilen Caco-2 ve HCT-8 hücreleri 37°C’lik su banyosunda sıvı hale getirildikten sonra santrifüj tüpüne alınan 5-6 mL kültür ortamına (Caco-2 için Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium, DMEM; HCT-8 için Roswell Park Memorial Institute, RPMI 1640) laminar akış kabini altında eklenmiştir. Hücreler 1000 rpm’de 3 dakika

santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmıştır. Hücreler taze kültür ortamında (Tablo 3.6.) süspande edilerek 25 cm² hücre kültür kaplarına (flask) aktararak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 3 gün süreyle inkübe edilmiştir.

Tablo 3.6. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan ortamlar ve içerikleri.

Hücre Hattı	Ortam	Eklenen Maddeler
Caco-2	DMEM	%10 FBS, 50 U/mL penisilin ve 50 µg/mL streptomisin
HCT-8	RPMI	

Hücre yoğunluğu %70-80 oranına ulaştığında inkübe edilen flask içindeki kültür ortamı laminar akış kabini altında uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkanmıştır. Flasklara yapışmış halde bulunan hücreler üzerine %0,025 tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5-10 dakika süreyle inkübatörde bekletilmiştir. İnkübatörden alınan hücre süspansiyonu besleme ortamı içeren uygun sayıda steril flasklara eklenerek pasaj işlemi tamamlanmıştır. Pasaj işlemi Caco-2 hücreleri için ilk 7-10 gün boyunca her 3 günde bir daha sonra her 2 günde bir; HCT-8 hücreleri için ise ilk 7-10 gün boyunca her 2 günde bir daha sonra her gün yapılmıştır.

Kontrol grubu: Hücreler %2 glutamin, %10 FBS ve 100 U/mL penisilin-streptomisin içeren kültür ortamı ile beslenmiştir.

Malnütrisyon grubu: Hücreler %2 glutamin, %1 FBS ve 100 U/mL penisilin-streptomisin içeren kültür ortamı ile beslenmiştir.

Transport çalışmalarında 0,4 µm por büyüklüğüne sahip olan insert'ler ve 12 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Flasklara ekilip büyütülen hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek flasklara yapışmış olan hücrelerin kolay kalkması sağlanmıştır.

Literatürde malnütrisyon geliştirilmiş hücrelerde yapılmış transport çalışmaları bulunmamaktadır. Bu nedenle transport deneyleri için hücrelerin uygun şekilde büyüebilmesi amacıyla insertlere sağlıklı hücre ekimi yapılmıştır. Hücre süspansiyonları 12 kuyucuklu plakalardaki her insertin (por yoğunluğu: 2 x 10⁶, transparent; yüzey alanı: 1,131 cm²; por büyüklüğü: 0,4 µm) apikeline 1 x 10⁵ hücre olacak şekilde (500 µL hücre süspansiyonu) hemasitometre ve tripan mavisi

kullanılarak sayılarak ekilmiştir. Bazolateral'e 1 mL büyüme ortamı eklendikten sonra plakalar 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre koyulmuştur. Hücrelerin insertlere yapışabilmesi için hücreler ekildikten sonra ilk 3 gün ortam değişimi yapılmayıp, sonraki günlerde büyüme ortamı gün aşırı değiştirilmiştir. Hücrelerin ortam değişimleri sırasında sağlıklı hücreler için %10 FBS, KMAL geliştirilecek hücreler için %1 FBS içeren kültür ortamı kullanılmıştır. HCT-8 hücreleri için hücre ekimi yapıldıktan 8 gün (188), Caco-2 hücreleri için ise 21 gün (189) sonra transepitel elektrik rezistans (TEER) değerleri (Millicell-ERS epitel voltometre) ölçülmüştür. TEER değeri belli bir değerin üstünde olan hücreler permeabilite çalışmalarına dahil edilmiştir.

Transport çalışmalarında kullanılmadan önce hücrelerin TEER değerleri Eşitlik 3.5. yardımı ile hesaplanmıştır.

$$TEER = R_{numune} - R_{boş} \quad (3.5.)$$

R_{numune} = ölçülen TEER değeri, $R_{boş}$ = hücre içermeyen kontrol insertlerin TEER değeri

Transport deneylerinde kullanılacak;

- **HCT-8 hücreleri (pasaj sayısı: 6):** Sağlıklı hücrelerin TEER değerleri 1300-1700 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ arasında bulunurken, KMAL geliştirilen hücrelerin TEER değerleri 450-750 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ arasında bulunmuş ve tüm insertler transport deneylerinde kullanılmıştır.
- **Caco-2 hücreleri (pasaj sayısı: 33):** Sağlıklı hücrelerin TEER değerleri 1100-1700 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ arasında bulunurken, KMAL geliştirilen hücrelerin TEER değerleri 700-1300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ arasında bulunmuş ve tüm insertler transport deneylerinde kullanılmıştır.

Transport deneylerinde D-glikoz (25 mM, sağlıklı; 5,6 mM KMAL) ve HEPES (10 mM) içeren HBSS (kalsiyum, magnezyum ve FK içermeyen; pH 7,4 – 7,6) transport ortamı olarak kullanılmıştır. Hücreler deneyden önce transport ortamında 30 dakika süreyle ön inkübasyona (37°C) tabi tutulmuştur. Transport deneylerinde kullanılacak etkin maddelerin, inhibitörlerin ve sıfır permeabilite belirteci LY'nin transport ortamı içindeki stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler transport ortamı ile

1:1 oranında seyreltildikten sonra hücrelere uygulanmıştır. Transport çalışmalarında hücrelere uygulanan maddeler ve konsantrasyonları Tablo 3.7.'de verilmiştir.

Tablo 3.7. Transport çalışmalarında uygulanan maddeler ve konsantrasyonları.

Madde	Görev	Uygulanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)
ATN	etkin madde*	150
MET	etkin madde**	300
ELA	P-gp inhibitörü	0,003 (5 μM)
KET	CYP3A4 inhibitörü	50
VER	PMAT inhibitörü	2,5
LY	sıfır permeabilite belirteci	100

* paraselüler geçiş, orta permeabilite belirteci; ** transselüler geçiş, yüksek permeabilite belirteci (44).

Çift yönlü transport çalışması için apikalden bazolaterale geçişin (A-B, *absorptive*) araştırılacağı insertlerde etkin madde apikal bölmeye eklenerek bazolateral bölmeden örnekleme yapılmıştır. Bazolateralinden apikale geçişin (B-A, *secretory*) araştırılacağı insertlerde ise etkin maddeler bazolateral bölmeye eklenerek apikal bölmeden örnekleme yapılmıştır. Sadece etkin maddenin geçişinin araştırılacağı insertlerde etkin maddenin olmadığı kompartmana sadece transport ortamı eklenmiştir. İnhibitör etkisinin araştırılacağı insertlerde ise ilgili inhibitör hem apikal hem de bazolateral kompartmana eklenmiştir.

LY hücrelerden hem pasif difüzyon hem de paraselüler yollarla geçtiği için hücre tek tabaka bütünlüğü LY'nin geçişi izlenerek incelenabilmektedir. LY lipofilik bariyerlerden serbestçe geçemediği için yüksek LY geçişi hücre tek tabaka bütünlüğünün bozulduğunun bir göstergesidir. Bu nedenle ATN içeren kuyucuklara LY de eklenmiştir. Transport deneylerindeki gruplar ve deney tasarımı Tablo 3.8.'de verilmiştir.

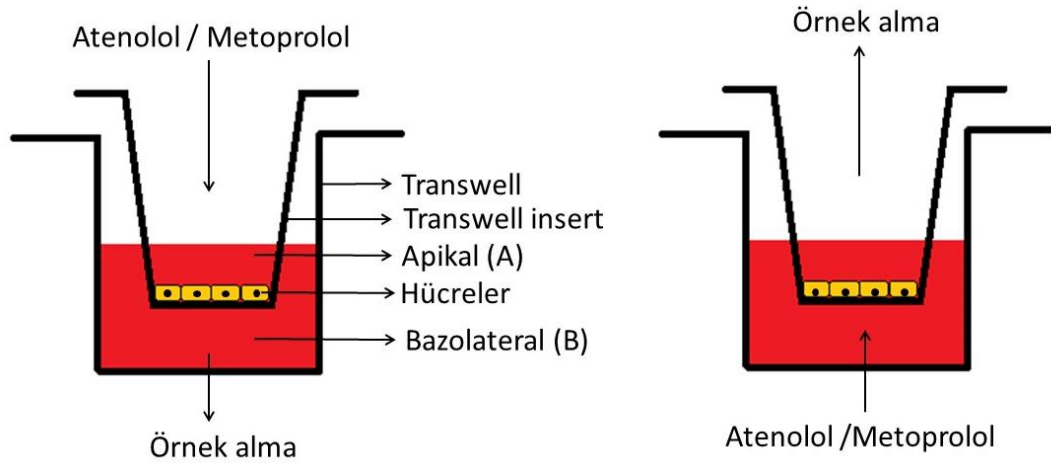
Tablo 3.8. Transport çalışmaları deney tasarımı.

Madde	A-B		B-A	
	Apikal	Bazolateral	Apikal	Bazolateral
ATN	ATN + LY	Transport Ortamı	Transport Ortamı	ATN + LY
MET	MET	Transport Ortamı	Transport Ortamı	MET
	MET + ELA	ELA	ELA	MET + ELA
	MET + KET	KET	KET	MET + KET
	MET + VER	VER	VER	MET + VER

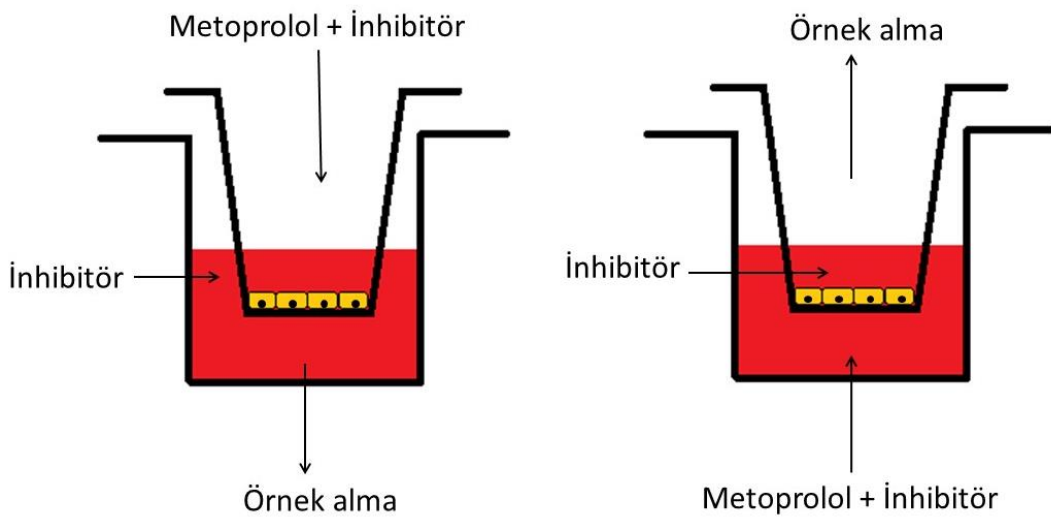
Çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 50-60 rpm’de 2 saat inkübasyondan sonra apikal ve bazolateral kompartmanlardan örnekler alınmıştır. A-B çalışmaları için bazolateral, B-A çalışmaları için ise apikal örnekleri HPLC ile analiz edilerek etkin maddelerin konsantrasyon değerleri kalibrasyon doğrusu ile hesaplanmıştır.

Ayrıca, ATN içeren kuyucuklardan 2 saat inkübasyon sonunda hem bazolateral hem de apikal kompartmanlardan 100 µL örnekler alınarak 96 kuyucuklu plakaya koyulmuş ve bir mikropilaka okuyucuda 430, 485, 530, 538 ve 540 nm’de LY’nin absorbans değerleri ölçülmüş ve en yüksek absorbans verdiği dalga boyu 485 nm olarak tespit edilmiştir (190).

Çift yönlü transport çalışmaları ile her bir bölme (A-B ve B-A) için etkin maddelerin permeabilite değerleri tespit edilmiştir. Transport çalışmaları kapsamında yapılacak hücre kültürü çalışmaları Şekil 3.3. ve 3.4.’te özetlenmiştir.



Şekil 3.3. Model etkin maddeler için çift yönlü transport çalışmalarının şematik gösterimi.



Şekil 3.4. İnhibitör kullanılan çift yönlü transport çalışmalarının şematik gösterimi.

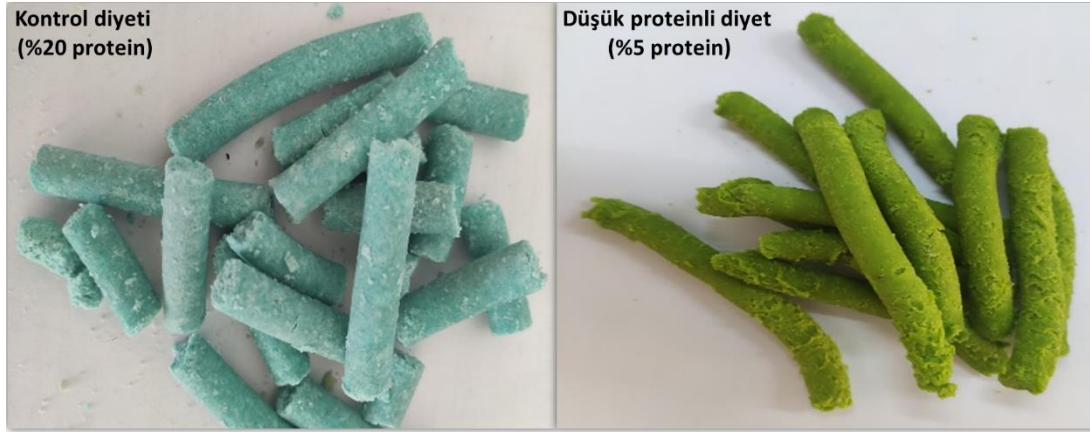
MET'in Caco-2 ve HCT-8 hücrelerinden permeabilitesi üzerine inhibitörlerin etkilerini incelemek amacıyla apikale MET ve inhibitör içeren transport ortamı (250 μ L), bazolaterale ise sadece inhibitör içeren transport ortamı (750 μ L) eklenmiştir. 37°C'de 50-60 rpm'de 2 saat inkübasyondan sonra bazolateralden örnekler alınarak HPLC ile analiz edilmiş ve konsantrasyon değerleri kalibrasyon doğrusu yardımıyla hesaplanmıştır.

MET'in inhibitor varlığında bazolateralinden apikale permeabilitesinin incelenmesi amacıyla bazolaterale MET ve inhibitör içeren transport ortamı (750 μ L), apikale ise sadece inhibitör içeren transport ortamı (250 μ L) eklenmiştir (191, 192). 37°C'de 50-60 rpm'de 2 saat inkübasyondan sonra apikalden örnekler alınarak HPLC ile analiz edilmiş ve konsantrasyon değerleri kalibrasyon doğrusu yardımıyla hesaplanmıştır.

3.2.3. Hayvan Deneyleri

Hayvan deneyleri için Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş.'den etik kurul izni alınmış ve tüm hayvanlar Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş.'den temin edilmiştir. Etik kurul olan belgesi ve revizyonlar EK-1'de yer almaktadır.

In situ ve *in vivo* çalışmalarda 200-225 g ağırlığında erkek Sprague Dawley (SD) sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar iki gruba ayrılarak, ilk grup izokalorik kontrol diyetiyle (protein içeriği %20), malnütrisyon geliştirilmesi planlanan diğer grup ise düşük protein içerikli diyetle (protein içeriği %5) 17-20 gün boyunca beslenmiştir (Şekil 3.5.). Sıçanların yem içerikleri ARDEN Araştırma & Deney tarafından formüle edilerek üretilmiştir. Sıçanlar için hazırlanan yemlerin içerikleri Tablo 3.9.'da yer almaktadır. Sıçanların besine ve suya erişimleri sınırsızdır. Malnütrisyon geliştirilecek sıçanlara, sağlıklı sıçanların beslenme sıklığına göre yem sağlanmıştır. Hayvan deneylerinden önce sıçanlardan kan alınarak, serum albümin ve total kolesterol miktarları belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Sıçanlar için hazırlanan %5 ve %20 protein içeren yemler.

Tablo 3.9. %5 ve %20 kcal protein içeren yemlerin formülleri.

Besin Yapı Taşları	g (%)		g (%)	
Protein	4,78	5	19,2	20
Karbonhidrat	80,80	85	67,3	70
Yağ	4,26	10	4,3	10
Yem İçeriği	g	kcal/kg	g	kcal/kg
Kazein, 90 mesh	47,5	190	200	800
L-Sistin DL metiyonin	3	12	3	12
Mısır nişastası	315	1260	315	1260
Maltodekstrin	187,5	750	35	140
Sakkaroz	350	1400	350	1400
Selüloz, BW200	50	0	50	
Mısır yağı	25	225	25	225
Palmiye yağı	20	180	20	180
Mineral karışımı S10026	10	0	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0	13	0
Kalsiyum karbonat	5,5	0	5,5	0
Potasyum sitrat, 1 H ₂ O	16,5	0	16,5	0
Vitamin karışımı V10001	10	40	10	40
Kolin bitartrat	2	0	2	0
FDC	0		0	
	1055	4057	1055	4057

Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları

In situ çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarında ısı kontrollü kabin içinde gerçekleştirilmiştir.

• Cerrahi Tekniğin Geliştirilmesi

Cerrahi işlemler anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Anestezi ketamin (90 mg/kg)-ksilazin (5 mg/kg) kombinasyonunun intraperitoneal (i.p.) olarak verilmesiyle sağlanmış ve anestezi derinliği sıçanların ayak parmaklarının sıkıştırılmasına verilen reaksiyona göre değerlendirilmiştir. Deney boyunca anestezi derinliği takip edilerek gerektiğinde ek doz ketamin-ksilazin kombinasyonu uygulanmıştır. Tüm perfüzyon çalışmaları ısı kontrollü kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Karın duvarı orta hat boyunca kesildikten sonra jejunum, ileum ve kolon açığa çıkarılmıştır. Perfüze edilecek bağırsak segmenti uzunlukları jejunum için 4,0-10,0 cm, ileum için 3,0-4,8 cm ve kolon için 2,0-3,0 cm olarak ayarlanmıştır ve bölgedeki kan akımı korunarak izolasyonları sağlanmıştır. İzole edilen bağırsak segmentlerinin proksimal ve distal uçlarına silikon tüpler yerleştirilerek cerrahi iplikle sabitlenmiştir. İzole bağırsak segmenti serum fizyolojik (37°C) ile yıkanarak temizlenmiş ve temizlenme göstergesi olarak çözeltinin berrak gelmesi esas alınmıştır. Peristaltik pompa aracılığıyla akış hızı 0,2 mL/dk olacak şekilde ayarlanmış ve deney sırasında perfüzyon çözeltisi sirküle edilmeyerek tek geçişli (*single pass*) olarak düzenlenmiştir. İzole edilen bağırsak segmentleri (jejunum, ileum ve kolon) serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra perfüzyon çözeltisiyle 0,2 mL/dk hızda dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 30 dk) perfüze edilmiştir. Perfüze edilen bağırsak segmentleri dengeye ulaştıktan sonra model etkin maddelerin bağırsaklardan absorpsiyon ve permeabilitesini incelemek amacıyla çalışmalar 2 grup altında gerçekleştirilmiştir.

• Perfüzyon Ortamı

Perfüzyon çözeltisi olarak kimyasal ve enzimatik olarak dayanıklı olan, biyoanalitik uygulamalarda sıklıkla kullanılan, suda çözünen, pKa'sı sıcaklıktan

etkilenmeyen MES tamponu (pH 6,5) kullanılmıştır (192). Perfüzyon çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi Tablo 3.10.'da özetlenmiştir.

Tablo 3.10. Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi.

Madde	Konsantrasyon
MES tamponu	10 mM
NaCl	135 mM
KCl	5 mM

Perfüzyon deneylerinde su dengesine ulaşıp ulaşılmadığını tayin etmek amacıyla FK referans madde olarak perfüzyon çözeltisine eklenmiştir. Perfüzyon çalışmalarında ATN paraselüler yolla absorplanan model ilaç, MET ise transselüler yolla absorplanan model ilaç olarak kullanılmıştır. Ayrıca MET bağırsak perfüzyonu çalışmalarında yüksek permeabilite referansı olarak da kullanılmıştır.

• Perfüzyon Sisteminden Kaynaklanan Gecikme Süresinin Tayini ve Perfüzyon Sistemi ile Etkileşiminin İncelenmesi

Perfüzyon çözeltisi rezervuardan plastik tüpler aracılığıyla önce peristaltik pompaya sonra da bağırsak segmentlerine ulaşmaktadır. Perfüzyon çözeltisinin akış hızı (0,2 mL/dk) göz önüne alındığında bağırsak segmentlerine ulaşana kadar bir gecikme süresi olmaktadır. Gecikme süresini tayin etmek amacıyla Evans mavisi çözeltisi (0,1 mg/mL) hazırlanarak rezervuara konmuş ve plastik/silikon tüpler boş iken peristaltik pompa çalıştırılmıştır. Evans mavisi içeren çözeltinin rezervuardan bağırsak segmentlerine ulaşmasına kadar geçen süre bir kronometre yardımıyla ölçülmüştür. Ayrıca, perfüzyon çözeltisinin bağırsak segmentlerini doldurarak izole segmentin diğer ucundan toplanabilmesi için de bir süre gerekecektir. Bu süre perfüzyon çözeltisinin akış hızı (Q) ve bağırsak segmentlerinin hacmine bağlıdır. Her bir bağırsak segmentinin hacmi (V) silindirin hacmini hesaplamak amacıyla kullanılan Eşitlik 3.6. ile hesaplanmıştır.

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot l \quad (3.6.)$$

l = Perfüze edilen segment uzunluğu (cm), r = Bağırsak segmentlerinin yarıçapı (jejunum ve ileum: 0,18 cm; kolon: 0,2 cm)

Perfüzyon çözeltisinin bağırsak segmentlerinden ortalama geçiş süresi (OGS, dk) Eşitlik 3.7. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$OGS = \frac{V}{Q} \quad (3.7.)$$

Q = perfüzyon çözeltisinin akış hızı (mL/dk), V = bağırsak segmentinin hacmi (mL)

Model etkin maddeler ile perfüzyon çalışmalarında kullanılan plastik ve silikon tüpler arasında olası bir etkileşim olması rezervuardan bağırsak segmentlerine ulaşan madde dozunda azalmaya neden olacaktır. Böyle bir etkileşim olup olmadığını incelemek amacıyla, deney hayvanı kullanılmadan model etkin maddelerin çözeltileri hazırlanarak rezervuara eklenmiştir. Peristaltik pompa aracılığıyla rezervuardaki çözeltiler 0,2 mL/dk akış hızında olacak şekilde plastik ve silikon tüplerden geçirilmiş ve 140 dk süreyle belirli zaman aralıklarında örnekler toplanmıştır. Numunelerdeki model etkin madde konsantrasyonları HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir.

- **Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları**

In situ bağırsak perfüzyonu çalışmaları iki grup olarak yapılmıştır. Gruplar ile ilgili bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

Grup 1 - Kontrol Grubu: ATN (0,4 mg/mL) + MET (0,8 mg/mL) ve MET (0,8 mg/mL) + ELA (1 µM)

İzole segmentler (jejunum, ileum ve kolon) perfüzyon çözeltisiyle dengeye ulaşana kadar (30 dk) perfüze edildikten sonra FK (0,1 mg/mL), ATN ve MET içeren perfüzyon çözeltisiyle eş zamanlı olarak 60 dk süreyle perfüze edilmiş ve her 5 dakikada bir manuel olarak ependorf tüplere örnek toplanmıştır.

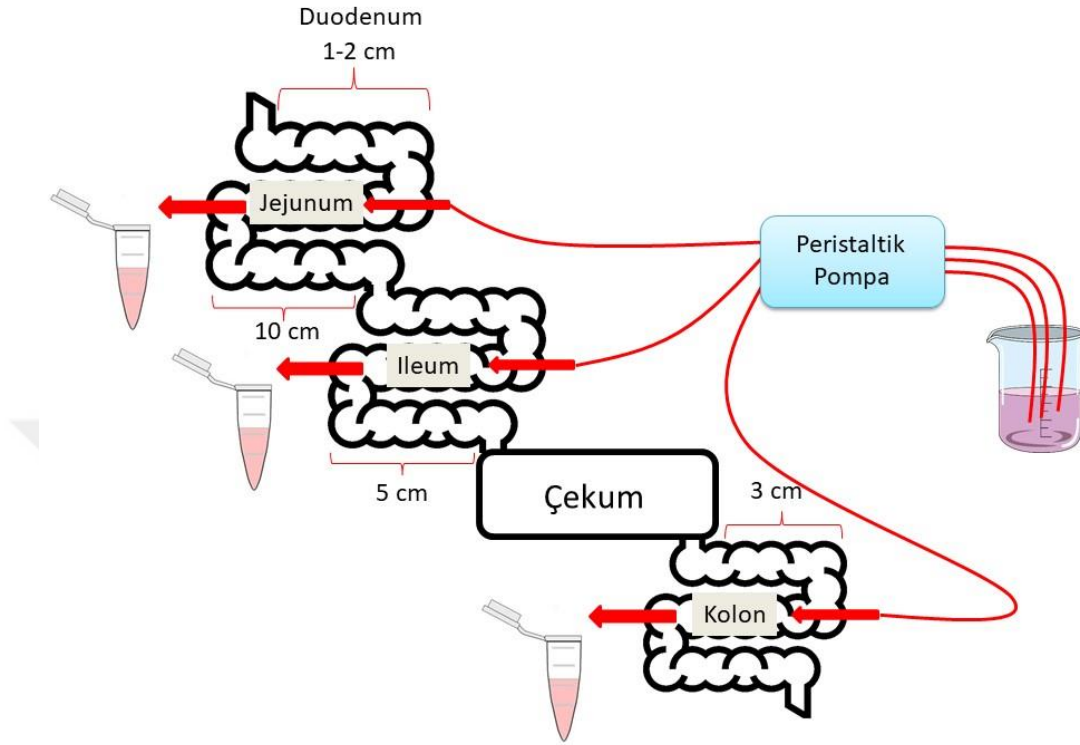
Spesifik P-gp inhibitörü olan ELA perfüzyon çözeltisine eklenerek jejunum, ileum ve kolon 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda izole edilen segmentler FK (0,1 mg/mL), MET ve ELA içeren perfüzyon çözeltisiyle 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir manuel olarak ependorf tüplere örnek toplanmıştır.

Grup 2 - Malnütrisyon Grubu: ATN (0,4 mg/mL) + MET (0,8 mg/mL) ve MET (0,8 mg/mL) + ELA (1 µM)

İzole segmentler (jejunum, ileum ve kolon) perfüzyon çözeltisiyle dengeye ulaşana kadar (30 dk) perfüze edildikten sonra FK (0,1 mg/mL), ATN ve MET içeren perfüzyon çözeltisiyle eş zamanlı olarak 60 dk süreyle perfüze edilmiş ve her 5 dakikada bir manuel olarak ependorf tüplere örnek toplanmıştır.

Spesifik P-gp inhibitörü olan ELA perfüzyon çözeltisine eklenerek jejunum, ileum ve kolon 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda izole edilen segmentler FK (0,1 mg/mL), MET ve ELA içeren perfüzyon çözeltisiyle 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir manuel olarak ependorf tüplere örnek toplanmıştır.

Üçlü bağırsak perfüzyonu çalışmaları ve perfüzyon deneyi akış şeması Şekil 3.6. ve 3.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Perfüzyon sistemi ve cerrahi yöntemin şematik olarak gösterilmesi.

30 dk	MES tamponu + FK
60 dk (5 dk'da bir örnek toplama)	MES tamponu + FK + ATN + MET
30 dk	MES tamponu + FK + MET + ELA
60 dk (5 dk'da bir örnek toplama)	MES tamponu + FK + MET + ELA

Şekil 3.7. Perfüzyon deneyi akış şeması.

Perfüzyon deneyleri tamamlandıktan sonra hayvanlar eksanguinasyon yöntemi ile öldürülerek her bir bağırsak segmenti çıkarılıp uzunlukları yeniden

ölçülmüştür. Deney süresince toplanan tüm perfüzyon örnekleri analiz edilinceye kadar -20°C'de dondurularak saklanmıştır. Toplanan örneklerdeki etkin madde miktarları valide edilmiş HPLC yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

***In vivo* Çalışmalar**

In vivo çalışmalar Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş.'de yapılmıştır. *In vivo* çalışmalar için gece boyunca aç bırakılan sıçanlardan ilaç uygulamasından önce kuyruk venlerinden kan alınarak albümin ve total kolesterol miktarları belirlenmiştir. Daha sonra paslanmaz çelik bilye uçlu gavaj kanülü kullanılarak oral gavaj yoluyla etkin maddeler uygulanarak kan örnekleri toplanmıştır (~100 µL). Toplanan kan örnekleri santrifüjlendikten sonra plazma ayrılarak, uygun yöntemlerle analiz edilinceye kadar -20 derecede saklanmıştır.

- **Pilot Çalışmalar**

In vivo çalışmalarda uygulanacak etkin madde dozunu ve örnek alma sıklığını belirlemek amacıyla ATN (n=3) ve MET (n=3) deney hayvanlarına ayrı ayrı oral yolla uygulandıktan sonra farklı zaman noktalarında kan örnekleri alınarak pilot çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Literatür verileri doğrultusunda MET'in 3 saat süreyle, ATN'nin ise 9 saat süreyle takip edilmesi planlanmıştır. Pilot çalışmalardan elde edilen bulgular doğrultusunda nihai örnekleme zamanları ve süresi belirlenmiştir.

- **Sağlıklı ve Malnütrisyon Geliştirilen Sıçanlarda *in vivo* Çalışmalar**

Kontrol Grupları:

Grup 1-K: ATN (250 mg/kg)

Kontrol grubundaki sıçanlara (n=4) paslanmaz çelik bilye uçlu gavaj kanülü kullanılarak oral gavaj yoluyla su içinde süspanse edilmiş ATN (250 mg/kg) verildikten

sonra belirli aralıklarla (0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 450 ve 480 dk) sıçanların kuyruk venlerinden kan toplanmıştır.

Grup 2-K: MET (400 mg/kg)

Kontrol grubundaki sıçanlara (n=4) paslanmaz çelik bilye uçlu gavaj kanülü kullanılarak oral gavaj yoluyla su içinde MET (400 mg/kg) çözeltisi verildikten sonra belirli aralıklarla (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 105, 120, 150, 180, 240, 300, 360 ve 420 dk) sıçanların kuyruk venlerinden kan toplanmıştır.

Grup 3-K: MET (400 mg/kg) + ELA (5 mg/kg)

Kontrol grubundaki sıçanlara (n=3) paslanmaz çelik bilye uçlu gavaj kanülü kullanılarak oral gavaj yoluyla su içinde süspanse edilmiş ELA (5 mg/kg) çözeltisi uygulandıktan 30 dk sonra su içinde MET (400 mg/kg) çözeltisi uygulanarak belirli aralıklarla (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 105, 120, 150, 180, 240, 300, 360 ve 420 dk) sıçanların kuyruk venlerinden kan toplanmıştır.

Malnütrisyon Grupları:

Grup 1-M: ATN (250 mg/kg)

Malnütrisyon grubundaki sıçanlara (n=4) paslanmaz çelik bilye uçlu gavaj kanülü kullanılarak oral gavaj yoluyla su içinde süspanse edilmiş ATN (250 mg/kg) verildikten sonra belirli aralıklarla (0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 450 ve 480 dk) sıçanların kuyruk venlerinden kan toplanmıştır.

Grup 2-M: MET (400 mg/kg)

Malnütrisyon grubundaki sıçanlara (n=4) paslanmaz çelik bilye uçlu gavaj kanülü kullanılarak oral gavaj yoluyla su içinde MET (400 mg/kg) çözeltisi verildikten sonra belirli aralıklarla (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 105, 120, 150, 180, 240, 300, 360 ve 420 dk) sıçanların kuyruk venlerinden kan toplanmıştır.

Grup 3-M: MET (400 mg/kg) + ELA (5 mg/kg)

Malnütrisyon grubundaki sıçanlara (n=3) paslanmaz çelik bilye uçlu gavaj kanülü kullanılarak oral gavaj yoluyla su içinde süspanse edilmiş ELA (5 mg/kg) çözeltisi uygulandıktan 30 dk sonra su içinde MET (400 mg/kg) çözeltisi uygulanarak belirli aralıklarla (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 105, 120, 150, 180, 240, 300, 360 ve 420 dk) sıçanların kuyruk venlerinden kan toplanmıştır.

In vivo çalışmalar tamamlandıktan sonra hayvanlar servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülmüştür. *In vivo* çalışmalar sonucunda elde edilen kan numuneleri santrifüjlenerek plazmalar elde edilmiş ve analiz edilinceye kadar -20°C'de saklanmıştır.

• ***In vivo* Çalışmalar İçin Plazmadan Ekstraksiyon Yöntemleri**

Plazmadan ATN ve MET konsantrasyonlarının tayin edilebilmesi amacıyla yapılacak ekstraksiyon yöntemi için literatür taraması yapılmış ve yöntemler Tablo 3.11.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.11. ATN ve MET için ekstraksiyon yöntemleri.

Etkin Madde	İç Standart	Plazma Miktarı (µL)	Organik Faz	Yöntem	Kaynak
ATN	MET	500	kloroform:bütanol (4:1, h/h)	HPLC	(193)
	6,7-dimethyl- 2,3-di(2-pyridyl)quinoxaline	200	asetonitril	UHPLC–MS/MS	(194)
	prokainamid hidroklorür	500	n-bütanol–n-heksan(1:1)	HPLC	(195)
MET	ATN	500	etil asetat: dietil eter (2:1, h/h)	GC–MS	(196)
	kolik asit-d4	50	metanol	UHPLC	(197)
	nevirapin	100	etil asetat	LC-MS-MS	(198)
	-	50	tersiyer bütıl metil eter	HPLC	(199)
	fenasetin	50	tersiyer bütıl metil eter	LC-ESI-MS/M	(200)
	kateşin	50	asetonitril	HPLC	(201)

GC/MS: Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi; HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi; LC-ESI-MS/M: Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi; LC MS/MS: Sıvı kromatografi tandem kütle/kütle spektrometre; UHPLC: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi.

Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin denenmesi ve optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesinden sonra kalibrasyon eğrisinin plazma için tekrar oluşturulması için Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş.'den birden fazla sağlıklı sıçandan toplanmış plazma örnekleri temin edilerek kullanılmıştır.

Ekstraksiyon için çeşitli yöntemler denenmiştir (193, 194, 197, 199, 200). Ayrıca tersiyer bütıl metil eterin kullanıldığı yöntemde farklı miktarlarda organik solvan kullanılarak ve organik solvanın azot ile uçurulma aşamasından sonra yapılan hareketli faz ile seyreltmede farklı seyreltme oranları kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Denenen ekstraksiyon işlemleri aşağıda özetlenmiştir.

50 µL sıçan plazmasına, hazırlanan 100 µg/mL stoktan 20 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde etkin madde (ATN/MET) eklenmesi ile oluşan karışıma aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

1. Plazmaya 50 µL 1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir. Numune 5 saniye vortekslendikten sonra kloroform:1-bütanol (4:1, h/h, 400:100 µL) eklenmiştir. Numune 30 saniye vortekslendikten sonra 3000 g'de 7 dk santrifüjlenmiştir. Organik faz farklı bir tüpe alınarak oda sıcaklığında azot gazı ile uçurulmuştur. Tüpe 100 µL metanol eklenerek çözelti analiz edilmiştir. Azot ile uçurma aşamasında uçurma işlemi manuel olarak yapıldığı için potansiyel ilaç kaybı nedeni ile bu yöntem tercih edilmemiştir.
2. Karışıma su:asetonitril (98:2, h/h) eklenmiştir. Elde edilen karışım 5 dk boyunca 12000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant ayrılarak 0,22 µm polivinil diflorür (PVDF) şırınga filtresinden geçirildikten sonra analiz edilmiştir. Ekstraksiyon için eklenen asetonitrilin suya göre düşük oranda olması ve numunenin bir kısmının şırınga içinde kalması nedeni ile bu yöntem tercih edilmemiştir.

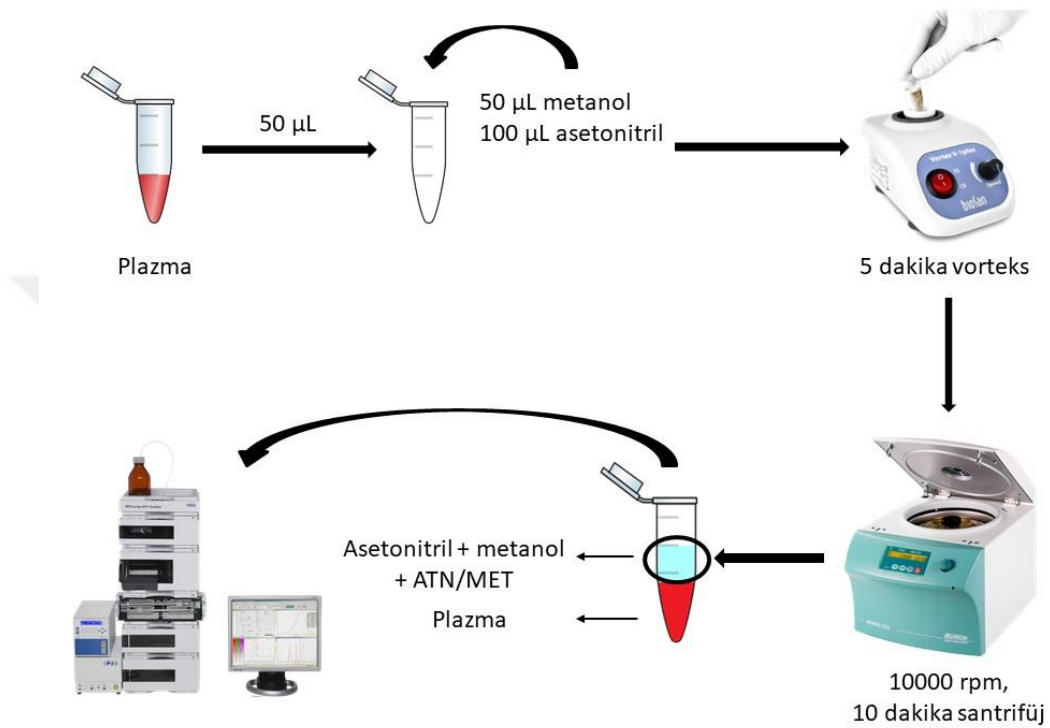
3. Karışıma 150 µL etanol eklendikten sonra elde edilen karışım 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatant analiz edilmiştir.
4. Karışıma 150 µL etanol eklendikten sonra elde edilen karışım 1 dakika 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant analiz edilmiştir.
5. Karışıma 1,2 mL tersiyer bütül metil eter eklenerek 5 dk vortekslenmiştir. 5 dk 6000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant oda sıcaklığında azotla uçurulmuş ve 200 µL hareketli faz eklenerek analiz edilmiştir. Ayrıca bu yöntemde farklı tersiyer bütül metil eter miktarları (0,5; 1 ve 1,5 mL) kullanılarak ve analiz öncesi seyretme işlemi 200 µL yerine 100 µL hareketli faz ile de denenerek analiz edilmiştir. Azot ile uçurma aşamasında uçurma işlemi manuel olarak yapıldığı için potansiyel ilaç kaybı nedeni ile bu yöntem tercih edilmemiştir.
6. Karışıma 100 µL asetonitril ve 50 µL metanol eklenmiş ve 5 dk vortekslenmiştir. 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant ayrılarak analiz edilmiştir. Bu yöntem sadece 50 µL etanol değil, 100 µL etanol kullanılarak da değerlendirilmiştir.

Denenen ekstraksiyon yöntemleri için geri kazanım değerleri Eşitlik 3.8.'e göre hesaplanarak değerlendirilmiştir. Tersiyer bütül metil eter, kloroform-1-bütanol, etanol, asetonitril ve asetonitril-metanol kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarda verim değerleri sırasıyla yaklaşık %40, 50, 70, 75 ve 85 olarak bulunmuştur. Bu nedenle plazma numunelerinden ATN ve MET ekstraksiyonu için 6. yöntem tercih edilerek asetonitril:metanol kullanılmıştır.

$$\% \text{Geri kazanım} = \frac{\text{Analiz sonucu elde edilen konsantrasyon}}{\text{Eklenen konsantrasyon}} \times 100 \quad (3.8.)$$

Ekstraksiyon işlemi Yoon ve ark. kullandığı yönteme uygun olacak şekilde hazırlanmıştır. Yoon ve ark. ekstraksiyonda organik solvan olarak sadece asetonitril

kullanmış, metanolü iç standart ile plazmaya eklemiştir. Bu nedenle uygulanan ekstraksiyon yönteminde organik faz olarak 100 μ L asetonitril ve 50 μ L metanol kullanılmıştır (201). Plazma numunelerinin analizleri için kullanılan ekstraksiyon yöntemi Şekil 3.8.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.8. Sıçan plazmasından ATN ve MET'in ekstraksiyonu için kullanılan yöntem.

Yapılan *in vivo* çalışmalardan elde edilen numunelerdeki ilaç konsantrasyonları belirlendikten sonra konsantrasyon değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek plazma konsantrasyon-zaman profilleri çizilmiştir. Farmakokinetik parametreler modelden bağımsız yöntem ve farmakokinetik modelleme çalışmaları ile tayin edilmiştir.

3.2.4. Modelden Bağımsız Yöntem İle Analiz

Maksimum plazma konsantrasyonu (C_{maks}) ve maksimum konsantrasyona ulaşma zamanı (t_{maks}) plazma konsantrasyon-zaman profillerinden tayin edilmiştir. Eliminasyon hız sabiti (k_{el}) plazma konsantrasyon-zaman profillerinin doğrusallık gösteren terminal fazının regresyon analiziyle tayin edilmiştir. Son ölçülen

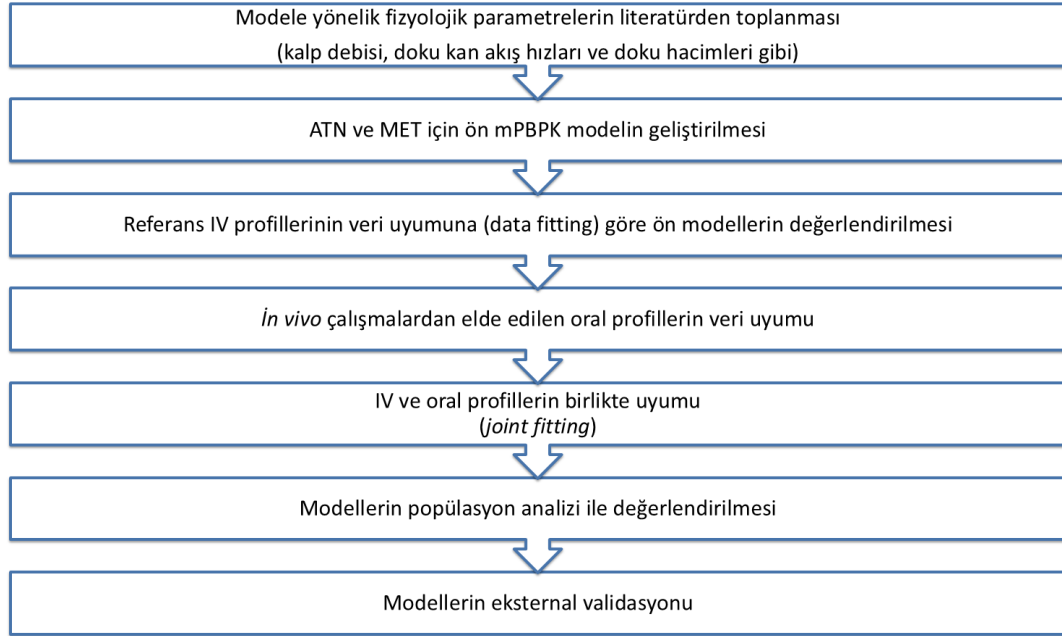
konsantrasyona kadar olan eğri altında kalan alan (AUC_t) log-lineer trapezoidal yöntemle tayin edilmiş, son ölçülen konsantrasyonun k_{el} 'e bölünmesiyle sonsuza kadar ekstrapole edilmiştir (AUC_{∞}). Ayrıca klerens (CL/F) ve dağılım hacmi (V_d/F) de plazma konsantrasyon zaman profilinden tayin edilmiştir. Modelden bağımsız analizler PKanalix (2024R1, Lixoft SAS, Simülasyon Plus Şirketi) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5. Minimal Fizyolojik Esaslı Farmakokinetik Modelleme

Modelleme çalışmaları Prof. Dr. William J. Jusko'nun danışmanlığında Eczacılık ve Eczacılık Bilimleri Okulu, Buffalo, New York Eyalet Üniversitesi (*The State University of New York at Buffalo (SUNY) School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*)'nde gerçekleştirilmiştir. Yapılan modelleme çalışmaları ve analizleri kapsamında lisanslı yazılımlar da dahil olmak üzere gerekli olabilecek tüm yazılım (ADAPT 5, Monolix, GastroPlus, R, Matlab, Simcyp, PK-Sim, SPSS, GraphPad gibi) erişimleri ve eğitimleri Buffalo Üniversitesi tarafından ücretsiz olarak sağlanmıştır.

Tez kapsamında model geliştirme çalışmaları için ADAPT 5 (202) kullanılmıştır. ADAPT, ilaçların temel farmakokinetik ve farmakodinamik (PK/PD) özelliklerinin keşfedilmesi, araştırılması ve uygulanması için Güney Kaliforniya Üniversitesi tarafından geliştirilmiş bir modelleme platformdur. Bu yazılım kullanılarak sistem parametreleri belirlenmiş, model kompartmanları için diferansiyel denklemleri tanımlanarak ATN ve MET için minimal fizyolojik esaslı farmakokinetik modeller geliştirilmiştir ve parametre kestirimleri yapılmıştır. Geliştirilen modelin popülasyon analizleri Monolix (versiyon 2023 R1, Lixoft SAS, Antony, France) kullanılarak yapılmıştır. Monolix, farmakometri alanında popülasyon farmakokinetik/farmakodinamik (PK/PD) modellemesi ve Sistem Farmakolojisi alanlarında yaygın olarak kullanılan Simülasyon Plus firması tarafından geliştirilmiş bir yazılımdır.

Tez kapsamında yapılan farmakokinetik modelleme çalışmaları Şekil 3.9.'da özetlenmektedir.

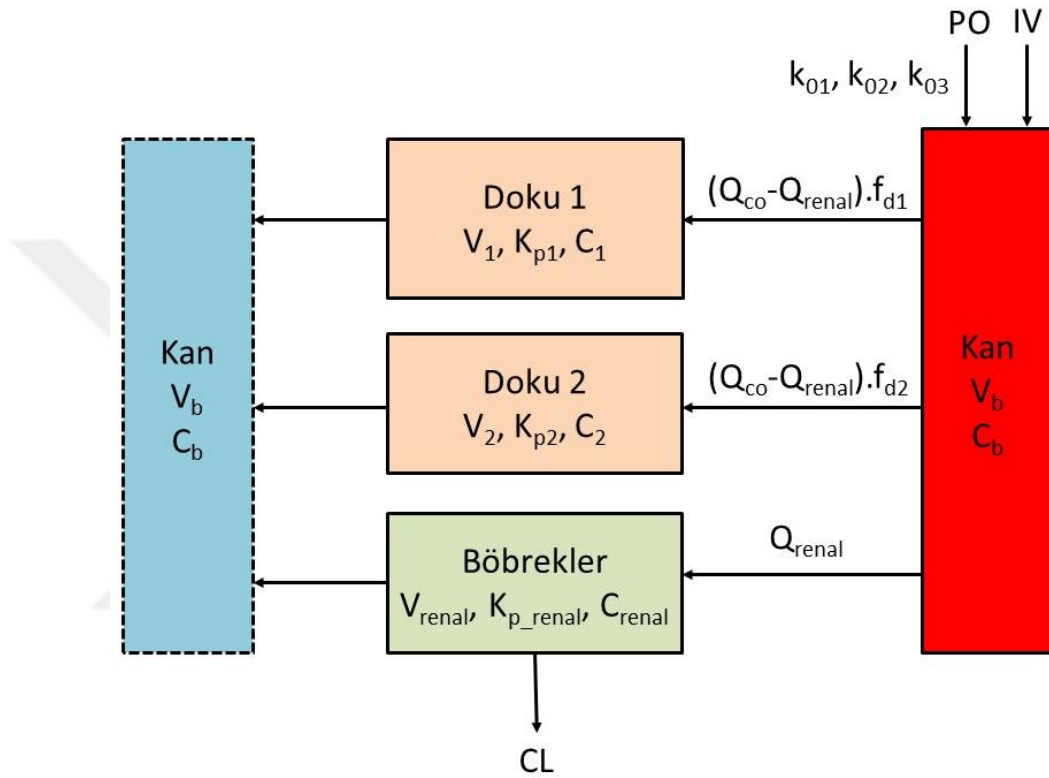


Şekil 3.9. Farmakokinetik model geliştirme süreci.

- Model Tasarımı

Atenolol

ATN için üç doku kompartmanlı mPBPK modeli kullanılmıştır (Şekil 3.10.), Doku 1'in hızlı perfüze olan, Doku 2'nin ise yavaş perfüze olan dokular olduğu varsayılmıştır.



Şekil 3.10. ATN için üç doku kompartmanlı mPBPK model yapısı.

ATN için doku:plazma partisyon katsayısı (K_p) değerleri için GastroPlus PBPK simülatörü (versiyon 9.9; Simülasyonlar Plus, Inc., Lancaster, CA, ABD)'nden elde edilen değer kullanılmıştır (203, 204). Buna göre karaciğer, böbrek ve akciğer, yüksek K_p değerlerine sahip Doku 1 (karaciğer: 2,87, böbrek: 3 ve akciğer: 2,63), geri kalan dokular ise Doku 2 olarak tanımlanmıştır. ATN hidrofildir ve esas olarak böbrekler tarafından elimine edilmektedir. Bu nedenle böbrek, modelde ayrı bir kompartman olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 3.10.'da verilen ATN modeli aşağıdaki diferansiyel denklemler (Eşitlik 3.9.-3.12.) ile tanımlanmıştır:

$$\begin{aligned}
 V_b \cdot R_b \cdot \frac{dC_p}{dt} = & \text{Girdi (PO/IV)} \\
 & + (Q_{CO} - Q_{renal}) \cdot f_{d1} \cdot R_b \cdot \left(\frac{C_1}{K_{p1}} - C_p \right) \\
 & + (Q_{CO} - Q_{renal}) \cdot f_{d2} \cdot R_b \cdot \left(\frac{C_2}{K_{p2}} - C_p \right) \\
 & + Q_{renal} \cdot R_b \cdot \left(\frac{C_{renal}}{K_{p_renal}} - C_p \right) \\
 C_p(0) = 0 \text{ (PO)}, C_p(0) = \text{Doz}/V_b \text{ (IV)} & \quad (3.9.)
 \end{aligned}$$

$$V_1 \cdot \frac{dC_1}{dt} = (Q_{CO} - Q_{renal}) \cdot f_{d1} \cdot R_b \cdot \left(C_p - \frac{C_1}{K_{p1}} \right) \quad C_1(0) = 0 \quad (3.10.)$$

$$V_2 \cdot \frac{dC_2}{dt} = (Q_{CO} - Q_{renal}) \cdot f_{d2} \cdot R_b \cdot \left(C_p - \frac{C_2}{K_{p2}} \right) \quad C_2(0) = 0 \quad (3.11.)$$

$$V_{renal} \cdot \frac{dC_{renal}}{dt} = Q_{renal} \cdot R_b \cdot \left(C_p - \frac{C_{renal}}{K_{p_renal}} \right) - CL \cdot C_p \quad C_{renal}(0) = 0 \quad (3.12.)$$

C_p plazma ilaç konsantrasyonu, C_1 , C_2 ve C_{renal} Doku 1, 2 ve böbrekteki ilaç konsantrasyonları, V_b kan hacmi, V_1 ve V_2 Doku 1 ve 2'nin hacimleri, V_{renal} böbrek hacmi, Q_{CO} kardiyak output, f_{d1} ve f_{d2} Doku 1 ve 2 için Q_{CO} 'nun fraksiyonları, Q_{renal} renal kan akışı, K_{p1} ve K_{p2} Doku 1 ve 2 için doku:plazma partisyon katsayısı, K_{p_renal} böbrek için doku:plazma partisyon katsayısı, CL sistemik (böbrek) klerensi, k_{01} , k_{02} ve k_{03} belirlenmiş zaman aralıkları boyunca görünür sıfır dereceli absorpsiyon hız sabitleri ve R_b kan/plazma oranıdır.

Şekil 3.11.'deki MET modeli aşağıdaki diferansiyel denklemler (Eşitlik 3.13.-3.16.) ile tanımlanmıştır:

$$\begin{aligned}
 V_b \cdot R_b \cdot \frac{dC_p}{dt} = & \text{Girdi (IV)} + (Q_{CO} - Q_{hep}) \cdot f_{d1} \cdot R_b \cdot \left(\frac{C_1}{K_{p1}} - C_p \right) \\
 & + (Q_{CO} - Q_{hep}) \cdot f_{d2} \cdot R_b \cdot \left(\frac{C_2}{K_{p2}} - C_p \right) \\
 & + Q_{hep} \cdot R_b \cdot \left(\frac{C_{hep}}{K_{p_hep}} - C_p \right) \\
 C_p(0) = & 0 \text{ (PO)}, C_p(0) = \text{Doz}/V_b \text{ (IV)}
 \end{aligned} \tag{3.13.}$$

$$V_1 \cdot \frac{dC_1}{dt} = (Q_{CO} - Q_{hep}) \cdot f_{d1} \cdot R_b \cdot \left(C_p - \frac{C_1}{K_{p1}} \right) \quad C_1(0) = 0 \tag{3.14.}$$

$$V_2 \cdot \frac{dC_2}{dt} = (Q_{CO} - Q_{hep}) \cdot f_{d2} \cdot R_b \cdot \left(C_p - \frac{C_2}{K_{p2}} \right) \quad C_2(0) = 0 \tag{3.15.}$$

$$\begin{aligned}
 V_{hep} \cdot \frac{dC_{hep}}{dt} = & \text{Girdi (PO)} + Q_{hep} \cdot R_b \cdot \left(C_p - \frac{C_{hep}}{K_{p_hep}} \right) \\
 & - CL_{int} \cdot R_b \cdot \frac{C_{hep}}{K_{p_hep}} \\
 C_{hep}(0) = & 0
 \end{aligned} \tag{3.16.}$$

V_{hep} karaciğer hacmi, Q_{hep} hepatik kan akışı, K_{p1} ve K_{p2} Doku 1 ve 2 için doku:plazma plazma partiyon katsayıları, K_{p_hep} karaciğer için doku:plazma plazma partiyon katsayısı (62,25), CL_{int} karaciğerdeki (C_{hep}) intirinsik klerens. Diğer semboller Şekil 10'daki parametreler ile aynıdır.

- **Fizyolojik Parametreler / Sistem Parametreleri**

mPBPK modelleri, doku hacmi, kalp debisi (kardiyak output) ve doku kan akış hızları gibi sistem parametrelerini tanımlayarak fizyolojik ve anatomik özelliklere dayanmaktadır (127). Malnütrisyonunda kan akışındaki değişimin anlamlı olmadığı bilinmekle birlikte, beta blokerlerin etkisiyle kalp debisinde ve dokulara kan akışında azalma modelleme çalışmaları kapsamında değerlendirilmiştir (Tablo 3.12.) (207).

Doku hacimleri Eşitlik 3.17. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Vücut Ağırlığı} = V_b + V_1 + V_2 + V_3 \quad (3.17.)$$

V_3 , ATN veya MET için böbrek/karaciğer hacmidir (127, 208). Tüm doku hacimleri modelde fizyolojik değerlere göre sabitlenmiştir (209, 210).

Tablo 3.12. Modelleme çalışmalarında kullanılan dokuların fizyolojik parametreleri (207, 209, 210).

Parametre	Hacim (V, mL/kg)	Kan akışı (Q, mL/dk/kg)	Düzeltilmiş kan akışı* (Q, mL/dk/kg)
Akciğer	3,27 ^a	314,55	179,91 ^c
Karaciğer	33,81 ^a	80,75	75,348 ^c
Böbrek	6,16 ^a	38,95	29 ^c
Kan	58,82 ^b	314,55	179,91 ^c

^a (210), ^b (209), ^c (207), *Beta blokör kullanımına bağlı olarak hesaplanarak modelde kullanılmıştır (207).

ATN için düşük f_{d1} ve f_{d2} ile karakterize edilen permeabilite ile sınırlandırılmış dağılım Eşitlik 3.18.'e göre varsayılmıştır (129):

$$f_{d,\text{toplaml}} = f_{d1} + f_{d2} \leq 1 \quad (3.18.)$$

MET için perfüzyon ile sınırlı dağılım ise Eşitlik 3.19.'a göre varsayılmıştır (129):

$$f_{d,\text{toplaml}} = f_{d1} + f_{d2} = 1 \quad (3.19.)$$

R_b değeri, plazma konsantrasyonlarına dayalı verileri kullanarak kan konsantrasyonuna bağlı farmakokinetik parametreleri hesaplamak için Eşitlik 3.20 kullanılarak hesaplanmıştır (211):

$$\rho = \frac{\text{HCT} - 1 + R_b}{\text{HCT} \cdot f_u} \quad (3.20.)$$

ρ kan hücreleri için afinite, HCT hematokrit ve f_u plazmada bağlanmamış (serbest) ilaç fraksiyonudur.

ρ değeri ATN için hesaplanırken MET için 2,57 olarak sabitlenmiştir (212). HCT'nin diyetlerdeki protein içeriğine bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir. Buna göre, malnütrisyon geliştirilen ve sağlıklı SD sıçanlarının HCT'leri sırasıyla %45,5

ve %47,5'tir (213). ATN ve MET'in plazma proteinlerine bağlanması düşüktür ve esas olarak albümine bağlanmaktadır. Bu nedenle, malnütrisyon geliştirilen grubun f_u değerleri, kontrol grubunun albümin konsantrasyonuyla (f_u ATN: 0,970; f_u MET: 0,805) karşılaştırılarak hesaplanmıştır (f_u ATN: 1,00, f_u MET: 0,908) (205, 211). Kontrol ve malnütrisyon geliştirilen gruplar için ATN'nin R_b değerleri 1,00 ve 1,014, MET'in R_b değerleri ise 1,508 ve 1,607 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca referans IV MET uygulaması için R_b değeri 1,7'dir (R- ve S-MET ortalaması).

• IV ve Oral Profil Uyumları

ATN ve MET'in IV uygulamasını takiben plazma profilleri, oral profiller için referans olarak literatürden alınmıştır (201, 214). ATN'nin farmakokinetiği, erkek SD sıçanlarda 1 mg/kg IV dozdan sonra elde edilen profil kullanılarak değerlendirilmiştir (214). MET için referans olarak erkek SD sıçanlara 0,5; 1 ve 2 mg/kg olmak üzere üç farklı dozda IV uygulama sonucu elde edilen profiller kullanılmıştır (201).

ATN ve MET absorpsiyon profilleri ilk olarak nokta-alan dekonvölüsyon (*point-area deconvolution*) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (215). Böylece, ilaçların her zaman noktasındaki absorpsiyon oranı, IV ve PO profillerinin karşılaştırılması yoluyla Eşitlik 3.21. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Girdi hızı} = \frac{D_0 \cdot C_{pt}}{F \cdot AUC_{IV}^{(0-t)}} \quad (3.21.)$$

D_0 doz, C_{pt} t zamanında oral uygulama sonrası plazma ilaç konsantrasyonu, F biyoyararlanım, $AUC_{IV}^{(0-t)}$ IV uygulama için t zamanına kadar olan eğri altında kalan alandır.

Sonuçlar, ATN ve MET'in absorpsiyon oranlarının, sıfır dereceli girdinin bir göstergesi olarak sabit kaldığını göstermiştir (215). Her ilaç için iki veya üç faz görüldüğü için absorpsiyon iki veya üç aşamalı sıfır dereceli süreç olarak tanımlanmıştır. Öncelikle IV ve oral profillerin popülasyon uyumu test edilmiş, daha

sonra tüm veriler, her ilaç için çoğu parametrelerin ortak değerlendirilmesi ile veri uyumu sağlanmıştır.

Her ilacın biyoyararlanımı, model uyumu ile elde edilen oral ve IV plazma konsantrasyon profillerinin doza göre normalize edilmiş toplam AUC değerlerinden hesaplanmıştır.

- **Modellerin Eksternal Validasyonu**

Modellerin eksternal validasyonunun değerlendirmesi için literatürde yer alan farklı IV veri setleri kullanılmıştır. ATN için Ni ve ark. erkek SD sıçanlarda 1,67 mg/kg IV doz uygulamasından sonra elde edilen farmakokinetik profil kullanılmıştır (216). MET için ise erkek SD sıçanlarında R-MET'in 1,5 mg/kg IV doz uygulamasından sonra elde edilen farmakokinetik profil kullanılmıştır (212). Plazma profili verileri Web Plot Digitizer versiyon 5.0 (Automeris LLC, California, ABD, <https://automeris.io>) kullanılarak elde edilmiştir.

- **Naif Havuzlama (*Naïve pooling*)**

Naif havuzlama, farmakokinetik ve farmakodinamik modellerde kullanılmaktadır. Naif havuzlamada tüm sıçanların IV ve oral profillerini içeren veriler birleştirilmekte ve bireysel farklılıklar dikkate alınmamaktadır. Referans IV profillerinde her noktanın standart sapmaları da değerlendirilerek farklı sıçanlar olarak varsayılmıştır. Böylece her bir IV referans dozu için üç sıçan değerlendirilmiştir. Naif havuzlama, tüm IV ve PO verilerinin birlikte uyumunun sağlanmasını içermektedir. Ön veri analizi yapmak ve genel bilgi elde etmek için kullanılmaktadır. Fakat bireyler arası değişkenliği dikkate almadığı için kestirimlerin doğruluğu daha düşük olabilmekte ve detaylı modellemeler için uygun olmayabilmektedir. Böylece naif havuzlama ile yapılan analizlere ek olarak bireysel farklılıkları da değerlendirebilen popülasyon analizleri yapılmıştır.

- **Popülasyon Analizi (PopPK)**

mPBPK modelleri kullanılarak IV referanslarının farmakokinetik parametre kestirimleri yapılmış (f_{d1} , K_{p1} ve CL) ve bu parametreler oral profillerin absorpsiyonlarını değerlendirmek için sağlıklı ve malnütrisyonlu gruplarda sabitlenmiştir. Parametrelerin bireyler arası değişkenliği (*between-subjects variability*, BSV, ω^2) ve rastgele etkilerinin log-normal dağıldığı varsayılmıştır. Rezidüel hataları tanımlamak için çeşitli hata modelleri (örneğin sabit, orantısal ve birleşik) uygulanmıştır. Tüm gruplar için orantısal hata modeli, MET oral profillerini tanımlamak için ise sabit hata modeli kullanılmıştır. Fisher Bilgi Matrisini (*Fisher Information Matrix*, FIM) hesaplamak için doğrusallaştırma yöntemi kullanılmış ve kestirimi yapılan parametrelerin standart hataları değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre her iki ilaç için de sadece CL'nin rastgele etkisi modele dahil edilmiştir.

3.2.6. Veri Analizi

- **Hücre Kültürü**

Hücre Canlılığı Testleri

Hücre canlılığı testleri sonucunda hücre canlılığı Eşitlik 3.22. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Sitotoksosite} = 100 - \text{Hücre canlılığı} \quad (3.22.)$$

Çift Yönlü Transport Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen görünür permeabilite katsayısı (P_{app}) Eşitlik 3.23. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$P_{app} = \frac{V_b \cdot C_b}{C_0 \cdot A \cdot T} \quad (3.23.)$$

A, Uygulama yüzey alanı ($1,13 \text{ cm}^2$); C_0 , Apikal bölgedeki başlangıç ilaç konsantrasyonu (M); C_b , Bazolateral bölgedeki konsantrasyon (M); P_{app} , görünür permeabilite (cm/sn); T, deney süresi (sn); V_b , Bazolateral kompartman hacmi (mL).

Netflux oranı bazolateralinden apikale geçişte elde edilen görünür permeabilite katsayısının ($P_{app} (B-A)$), apikalden bazolaterale geçişte elde edilen görünür permeabilite katsayısına ($P_{app} (A-B)$) oranı ($P_{app} (B-A) / P_{app} (A-B)$) olarak hesaplanmıştır.

• Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları

İyonize olmayan ilaçların gastrointestinal absorpsiyonunu simüle etmek için *mixing-tank* model kullanılırken (217) ince bağırsağın fiziksel özellikleri de dikkate alınarak paralel tüp modeli yaklaşımının kullanımı da yaygınlaşmaktadır (218, 219). Elde edilen sonuçlardan, efektif permeabilite değerlerinin (P_{eff}) ve absorpsiyon hız sabitlerinin (k_a) hesaplanabilmesi için paralel tüp modeli yaklaşımı için aşağıda verilen eşitlikler (Eşitlik 3.24. ve 3.25.) kullanılmıştır (220-222).

$$P_{eff} = \frac{-Q \cdot \ln\left(\frac{C'_{out}}{C'_{in}}\right)}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot l} \quad (3.24.)$$

$$k_a = \frac{\left[1 - \left(\frac{C'_{out}}{C'_{in}}\right)\right] \cdot Q}{\pi \cdot r^2 \cdot l} \quad (3.25.)$$

C_{in} , segmente giren perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$); C_{out} , segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$); l , perfüze edilen bağırsak segmentinin uzunluğu (cm), Q, Akış hızı (mL/sn); R, perfüze edilen bağırsak segmentinin yarıçapıdır (cm).

Segmentlerin ortalama yarıçapları jejunum ve ileum için 0,18 cm, kolon için 0,2 cm olarak kabul edilmiştir. Eşitlikte verilen $(C_{out}/C_{in})'$ oranı (C_{out}/C_{in} düzeltilmiş) aşağıda verilen eşitlik (Eşitlik 3.26.) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\frac{C'_{out}}{C'_{in}} = \frac{C_{out}}{C_{in}} \times \frac{C_{in \text{ fenol kırmızısı}}}{C_{out \text{ fenol kırmızısı}}} \quad (3.26.)$$

Segmente giren ve segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki FK konsantrasyon değerleri kullanılarak net su akışı değeri (*net water flux* (mL/sn/cm); NWF) Eşitlik 3.27. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$NWF = \frac{Q \cdot \left[1 - \frac{C_{out}}{C_{in}}\right] \text{ fenol kırmızısı}}{L} \quad (3.27.)$$

Yapılan hesaplamalar sonucunda net su akışı değerin negatif çıkması mukozal bölgeden (lümen) serozal bölgeye (kan) sıvı kaybı (absorpsiyon) olduğunu ifade etmektedir. Bu değerin pozitif çıkması ise mukozal bölgeye sıvı girişi (sekresyon) olduğunu ifade etmektedir.

Ayrıca, sıçanlardan tayin edilen permeabilite değerleri kullanılarak Eşitlik 3.28. ve 3.29. aracılığı ile insanlardaki tahmini absorpsiyon dereceleri ($\%f_a$) hesaplanmıştır (223).

$$P_{eff,man} = 3,6 \cdot P_{eff,rat} + 0,03 \cdot 10^{-4} \quad (3.28.)$$

$$f_{a,man} = 1 - e^{-\left[2 \cdot P_{eff,man} \cdot \frac{t_{res}}{r} \cdot 2,8\right]} \quad (3.29.)$$

$f_{a,man}$, insanlarda absorplanan fraksiyon; $P_{eff,man}$, insanlarda efektif permeabilite değerleri; r , insan ince bağırsağının yarıçapı (1,75 cm); t_{res} , insandaki ortalama ince bağırsak geçiş zamanı (3 saat).

- ***In vivo* ve Farmakokinetik Modelleme Çalışmaları**

Naif Havuzlama (*Naïve pooling*)

Plazma konsantrasyonu-zaman profilinin model uyumu ADAPT 5'teki maksimum olabilirlik kestirim yöntemi (*maximum likelihood estimation method*) kullanılarak yapılmıştır (202).

Varyans modeli Eşitlik 3.30. ile tanımlanmıştır:

$$V_i = (\sigma_{\text{kesişim}} + \sigma_{\text{eğim}} Y_i)^2 \quad (3.30.)$$

V_i i 'inci veri noktasının varyansı, Y_i modele göre tahmin edilen i 'nci konsantrasyon, varyans parametreleri $\sigma_{\text{kesişim}}$ ve $\sigma_{\text{eğim}}$ varyans modeli parametreleridir. Modelin uyum iyiliği (*goodness of fit*, GoF), kestirimlerin görsel incelemesi, Akaike Bilgi Kriteri (*The Akaike information criterion*, AIC), Schwarz Kriteri (SC) ve varyasyon katsayısı (% VK) ile değerlendirilmiştir.

Naif havuzlama analizi ADAPT 5 kullanılarak yapılmış ve sonuçlar GraphPad Prism (versiyon 6) kullanılarak görselleştirilmiştir.

PopPK

PopPK modellerinin veri analizleri, Y_{ij} gözlemine ilişkin ilişki, i 'inci bireyin gözlemlenen j 'inci konsantrasyonu için Eşitlik 3.31.'deki gibi tanımlanmıştır:

$$\log(Y_{ij}) = \log(c_{\text{pred},ij}) + b \cdot \log(c_{\text{pred},ij}) \cdot \varepsilon_{ij} \quad (3.31.)$$

$c_{\text{pred},ij}$, i 'inci bireyin j 'inci konsantrasyonu için tahmin edilen ilaç konsantrasyonu, b orantısal hata terimi ve ε_{ij} 'nin, ortalama olarak sıfır ve σ_2 varyansı ile i 'inci bireyin j 'inci konsantrasyonu için rezidüel hatayı temsil eden standartlaştırılmış Gauss rastgele değişkenleri olduğu varsayılmaktadır (224).

Modeller GoF, -2 kat log-olabilirlik (*-2 times log-likelihood*, -2LL), AIC, Bayes Bilgi Kriterleri (BIC), Düzeltilmiş Bayes Bilgi Kriterleri (BICc) ve parametre kestirimlerinin relatif standart hatalarına (RSH) göre değerlendirilmiştir.

PopPK analizi Monolix kullanılarak yapılmıştır. Modelleme çalışmaları için kullanılan ADAPT 5 ve Monolix kodları EK-2’de verilmektedir.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Transport çalışmalarından elde edilen P_{app} değerlerinin sağlıklı ve KMAL geliştirilen hücreler için karşılaştırmalı analizleri IBM SPSS (versiyon 29.0)’de iki grup için bağımsız örneklem t-testi (*unpaired* t-test) ve birden fazla grup için ise tek yönlü ANOVA (*one-way* ANOVA) kullanılarak yapılmıştır (α , anlamlılık düzeyi = 0,05; %95 güven düzeyi). MET ve inhibitörlerinin karşılaştırılması amacıyla ANOVA kullanılmış, farklı olan grupların MET'ye göre ikili karşılaştırması için post hoc analizlerinden Dunnett's testi kullanılarak p değerleri elde edilmiştir.

In situ çalışmalarda sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanlar için elde edilen değerler IBM SPSS’de Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılarak karşılaştırılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

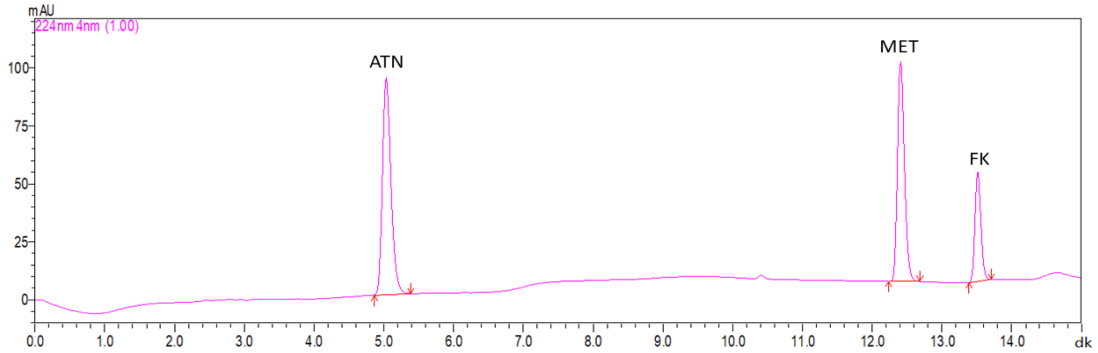
Modelleme çalışmaları sonucu kestirimi yapılan parametrelerin istatistiksel karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testi ve ardından IBM SPSS ile post hoc analiz olarak Mann-Whitney U ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

Tez kapsamında yapılan analitik yöntem validasyon çalışmaları, *in vitro* hücre canlılık testleri ve çift yönlü transport çalışmaları, *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmaları, *in vivo* çalışmalar, modelden bağımsız yöntem ile analiz sonuçları ve farmakokinetik modelleme çalışmalarının sonuçları aşağıda değerlendirilmiştir.

4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu

Geliştirilen ve optimize edilen analitik metot kullanılarak analiz edilen ATN, MET ve FK'ye ait HPLC kromotogramı Şekil 4.1.'de yer almaktadır.



Şekil 4.1. Optimum koşullarda ATN, MET ve FK'nin eş zamanlı analizi ile elde edilen HPLC kromotogramı.

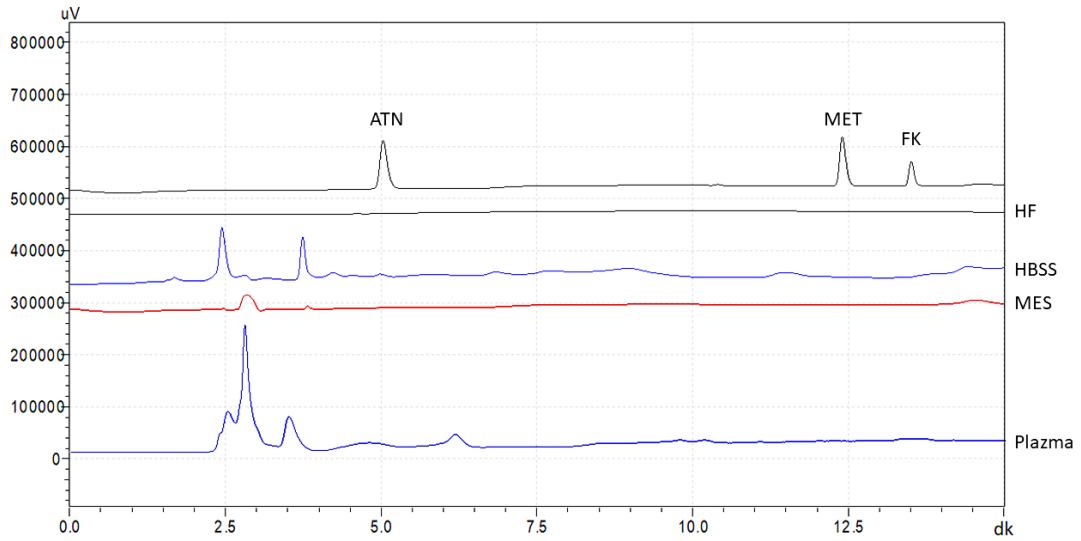
Geliştirilen yöntemlerin validasyonunda ICH'in 2022 yılında yayınlanan M10 kılavuzunda (*International Conference on Harmonisation-2022*) belirtilen aşağıdaki validasyon parametreleri incelenmiştir.

4.2. Biyoanalitik Yöntem Validasyonu

4.2.1. Seçicilik (*Selectivity*)

Yapılan çalışmalar sonucu tayin edilecek maddeleri (ATN, MET ve FK) içermeyen, *in vitro* hücre kültürü (çift yönlü transport), *in situ* üçlü bağırsak perfüzyon çalışmaları ve *in vivo* çalışmalarda matriks olarak kullanılan HBSS, MES tamponu ve sıçan plazmasının kolona enjeksiyonu yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar

değerlendirilmiş ve tayin edilecek maddelerin alıkonma zamanlarında girişim yapan hiçbir pik olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan validasyon çalışmalarında ATN, MET ve FK'nin hareketli faz içindeki stok ve standart çözeltileri kullanılacağı için kolona hareketli faz enjeksiyonu da yapılarak tayin edilecek maddeler ile girişim yapan herhangi bir pikin olmadığı kanıtlanmıştır (Şekil 4.2.). Bu nedenle uygulanan yöntem tayin edilecek maddeler için seçicidir.

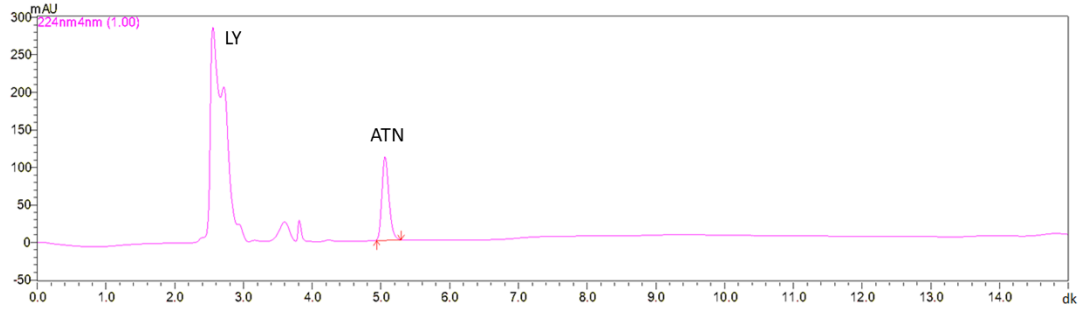


Şekil 4.2. Matrislerin ve ATN-MET-FK'nin kolona enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramları.

4.2.2. Özgüllük (*Specificity*)

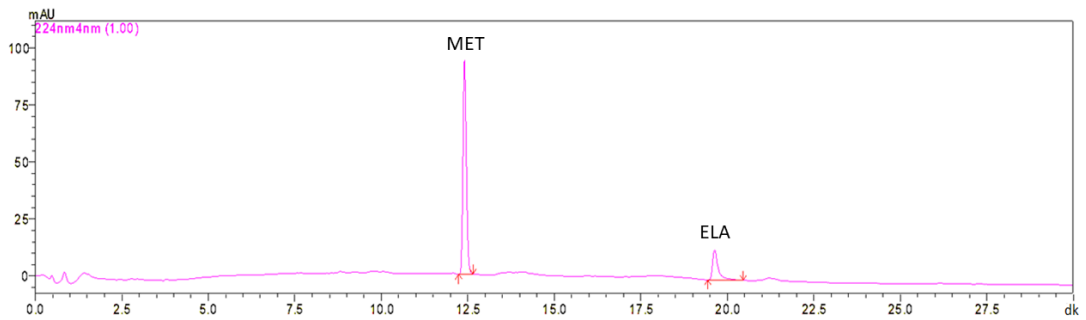
In vitro ve *In situ* Çalışmalar İçin Özgüllük

Hücre kültürü çalışmalarında ATN ile uygulanacak olan LY'nin hareketli faz içinde ATN ile beraber uygulanması sonucu, ATN piki ile girişim yapmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3.).

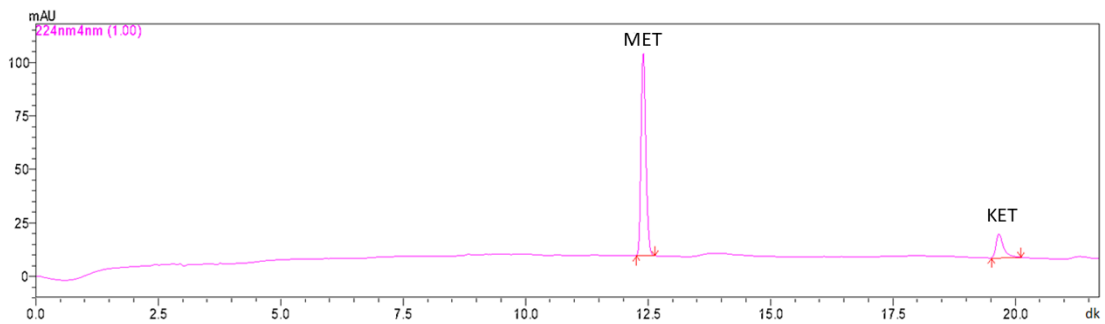


Şekil 4.3. Hareketli faz içinde ATN ve LY'nin enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı.

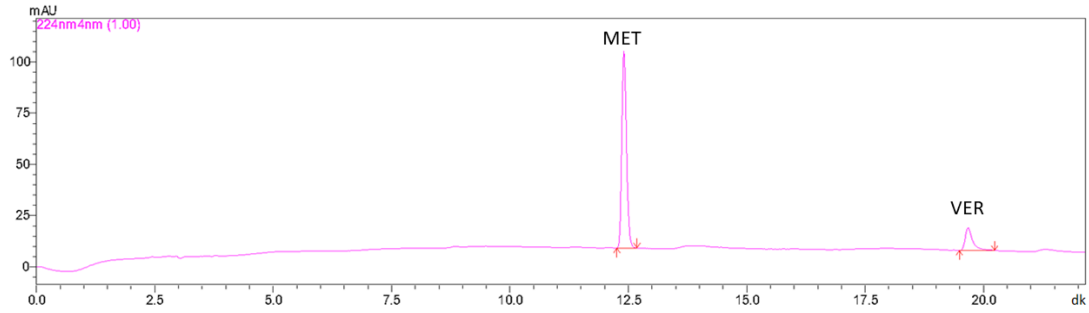
Hücre kültürü çalışmalarında MET ile uygulanacak ELA (Şekil 4.4.), KET (Şekil 4.5.) ve VER'in (Şekil 4.6.) hareketli faz içinde MET beraber enjeksiyonu yapılmış ve MET ile girişim yapan herhangi bir pik tespit edilmemiştir. Ayrıca, MES tampon çözeltisinin kromatogramı incelendiğinde MET ile beraber uygulanacak hiçbir inhibitör madde ile MES tampon çözeltisinden gelen piklerin girişim yapmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Hareketli faz içinde MET ve ELA enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı.



Şekil 4.5. Hareketli faz içinde MET ve KET enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı.



Şekil 4.6. Hareketli faz içinde MET ve VER enjeksiyonu ile elde edilen HPLC kromatogramı.

FK, hücre kültürü çalışmalarında yer almayıp, sadece *in situ* üçlü bağırsak perfüzyonu çalışmalarında ATN ve MET ile beraber kullanılacaktır. Kromatograma göre hareketli faz içindeki ATN, MET ve FK'nin girişim yapmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, perfüzyon çalışmalarında kullanılacak olan MES tampon çözeltisinden gelen pikler ile FK enjeksiyonu sonucunda elde edilen pikin girişim yapmadığı gösterilmiştir.

Elde edilen kromatogramların değerlendirilmesi sonucu ATN, MET ve FK'nin eş zamanlı tayinleri için geliştirilen metodun özgüllüğü kanıtlanmıştır (Şekil 4.2.).

***In vivo* Çalışmalar İçin Özgüllük**

ATN ve MET çözeltileri sıçan plazmasına eklenerek, ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktın analiz edilmesi sonucu ATN ve MET'in piklerinin girişim yapmaması üzerine, ATN ve MET'nin eş zamanlı tayinleri için geliştirilen metodun özgüllüğü kanıtlanmıştır.

4.2.3. Matriks Etkisi (*Matrix Effect*)

Matriks etkisi kapsamında değerlendirilen her bir matriks kaynağı için doğruluk, gerçek konsantrasyonun $\pm$ %15'i içinde olmalı ve kesinlik (%VK) %15'ten büyük olmamalıdır (182).

in vitro ve *in situ* Çalışmalar İçin Matris Etkisi

Farklı kaynaklardan hazırlanmış olan perfüzyon çözeltileri kullanılarak hazırlanan çözeltilere ait analiz sonuçları Tablo 4.1.'de verilmektedir.

Tablo 4.1. Perfüzyon çözeltileri kullanılarak hazırlanan çözeltilere ait analiz sonuçları (ortalama $\pm$ standart hata, SH; n=3).

Maddeler	KKS	EK ($\mu\text{g/mL}$)	BK ($\mu\text{g/mL}$)	Kesinlik (%BSS)	Doğruluk (%OHB)
ATN	Düşük	2	1,76 $\pm$ 0,05	5,11	12,00
	Yüksek	37,5	41,3 $\pm$ 0,09	0,36	10,13
MET	Düşük	3	2,68 $\pm$ 0,03	2,24	10,67
	Yüksek	37,5	38,50 $\pm$ 0,06	0,26	2,67
FK	Düşük	1	1,14 $\pm$ 0,01	1,75	14,00
	Yüksek	15	16,20 $\pm$ 0,05	0,56	8,00

BK, bulunan konsantrasyon; BSS, bağıl standart sapma; EK, eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları; OHB, ortalama bağıl hata.

in vivo Çalışmalar İçin Matris Etkisi

Farklı kaynaklardan hazırlanmış olan plazmalar kullanılarak elde edilen ilaç çözeltilerine ait analiz sonuçları Tablo 4.2.'de verilmektedir.

Tablo 4.2. Plazma örnekleri kullanılarak elde edilen ilaç çözeltilerine ait analiz sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=3).

Maddeler	KKS	EK ($\mu\text{g/mL}$)	BK ($\mu\text{g/mL}$)	Kesinlik (%BSS)	Doğruluk (%OHB)
ATN	Düşük	10	8,70 $\pm$ 0,06	1,15	13,00
	Yüksek	37,5	32,40 $\pm$ 0,68	3,64	13,60
MET	Düşük	10	8,60 $\pm$ 0,05	1,05	14,00
	Yüksek	56,25	63,20 $\pm$ 0,08	0,21	12,36

BK, bulunan konsantrasyon; BSS, bağıl standart sapma; EK, eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları; OHB, ortalama bağıl hata.

Farklı sıçanların (n=6) ilaç içermeyen plazmaları kullanılarak ATN ve MET içeren düşük ve yüksek kalite kontrol örnekleri 3 tekrarlı olarak analiz edildiğinde

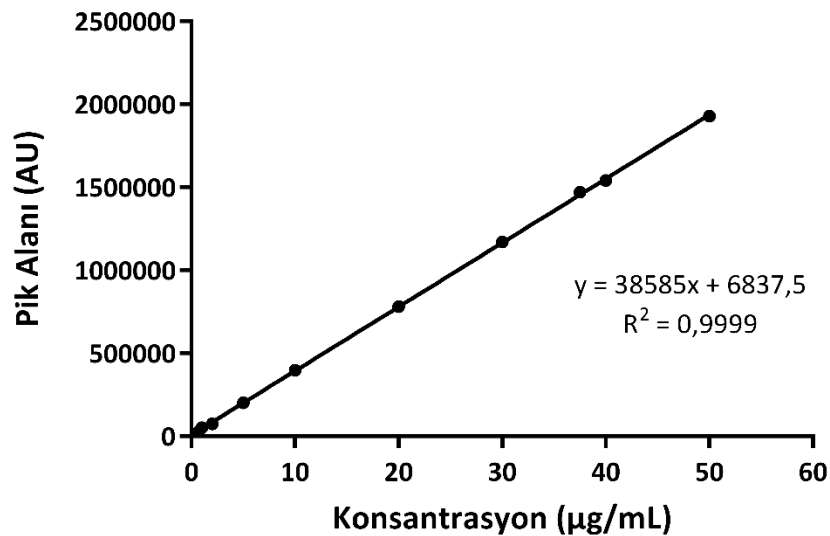
OBH'nin ve %VK'nin %15'in altında bulunmasıyla doğruluk ve kesinlik koşulları sağlanarak (Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.) matris etkisi dışlanmıştır.

4.2.4. Kalibrasyon Doğrusu ve Aralığı (*Calibration Curve and Range*)

İn vitro ve İn situ Çalışmalar İçin Kalibrasyon Doğrusu ve Aralığı

ICH M10 kılavuzuna göre her bir kalibrasyon standardı için hesaplanan konsantrasyonların, teorik değerlerin $\pm$ %15'i içinde olmalıdır. Bu koşul en düşük kalibrasyon sınırı için $\pm$ %20 olarak belirlenmiştir. En az 6 kalibrasyon noktasında kalibrasyon standartlarının en az % 75'inin belirtilen koşulu sağlaması gerekmektedir (182).

ATN'nin standart çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.7.).

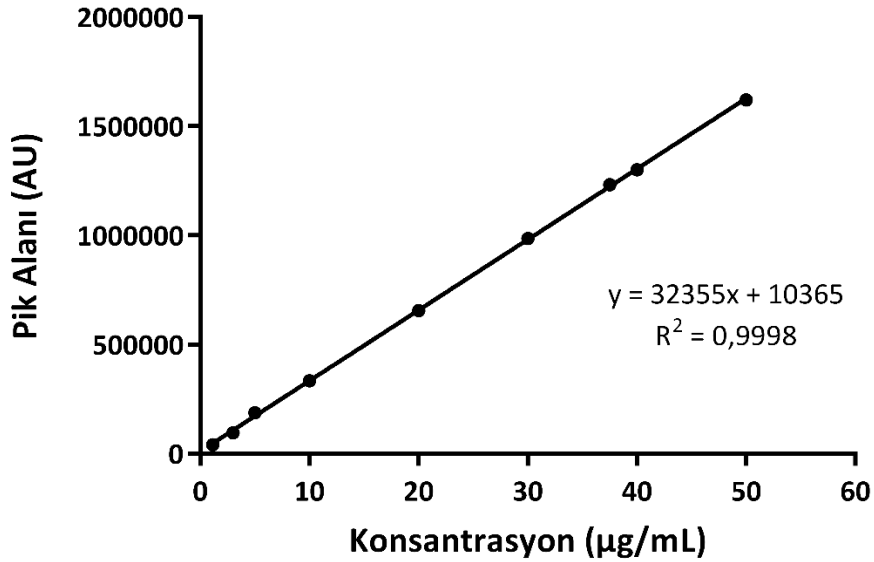


Şekil 4.7. ATN'nin hareketli fazdaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemini (ortalama $\pm$ standart sapma (SS); n=6).

ATN için elde edilen kalibrasyon doğrusunda yer alan her bir kalibrasyon standardı için geri kazanım hesaplanarak en düşük kalibrasyon noktasında teorik değerlerin $\pm$ %20'si içerisinde (%18,94) ve diğer noktalarda ise $\pm$ %15 içinde (%0,26-

13,65) olduğu bulunmuştur. Böylece belirlenen kalibrasyon standartlarının ICH M10 kılavuzunda belirtilen kriterleri sağladığı gösterilmiştir (182).

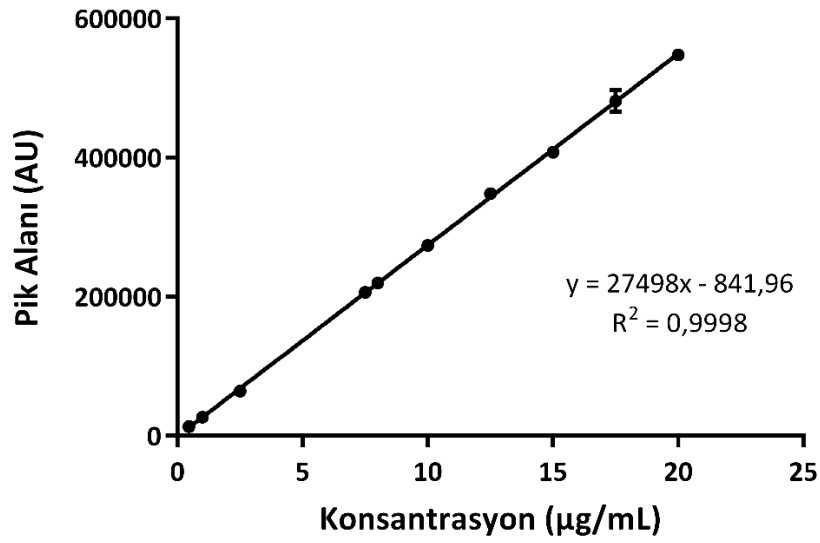
MET'in standart çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. MET'in hareketli fazdaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).

MET için elde edilen kalibrasyon doğrusunda yer alan her bir kalibrasyon standardı için geri kazanım hesaplanarak en düşük kalibrasyon noktasında teorik değerlerin $\pm$ %20'si içerisinde (%18,89) ve diğer noktalarda ise $\pm$ %15 içinde (%0,16 - 12,32) olduğu bulunmuştur. Böylece belirlenen kalibrasyon standartlarının ICH M10 kılavuzunda belirtilen kriterleri sağladığı gösterilmiştir (182).

FK'nin standart çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. FK'nin hareketli fazdaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).

FK için elde edilen kalibrasyon doğrusunda yer alan her bir kalibrasyon standardı için geri kazanım hesaplanarak en düşük kalibrasyon noktasında teorik değerlerin $\pm$ %20'si içerisinde (%9,20) ve diğer noktalarda $\pm$ %15 içinde (%0,14 - 5,06) bulunmuştur. Böylece belirlenen kalibrasyon standartlarının ICH M10 kılavuzunda belirtilen kriterleri sağladığı gösterilmiştir (182).

ATN, MET ve FK için elde edilen kalibrasyon doğrularına ait bilgiler Tablo 4.3.'te özetlenmiştir.

Tablo 4.3. ATN, MET ve FK'ye ait doğrusallık bulguları.

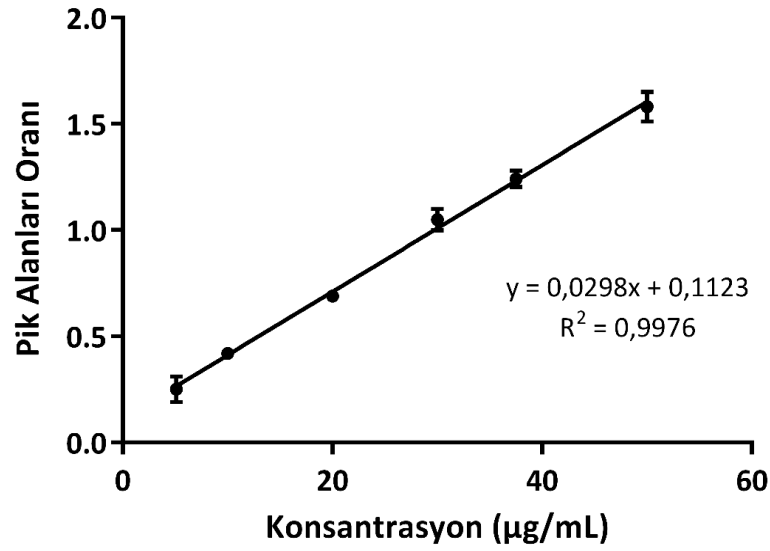
Parametreler	ATN	MET	FK
Doğru Denklemi	$y = 38585x + 6837,5$	$y = 32355x + 10365$	$y = 27498x - 841,96$
Eğimin Standart Hatası	52,68	66,60	134,65
Kesişimin Standart Hatası	1188,75	1401,53	654,25
Determinasyon Katsayısı (R^2)	0,9999	0,9998	0,9998
Doğrusallık Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	0,76 - 50	1,14 - 50	0,47 - 20
Nokta Sayısı	10	9	10
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,23	0,34	0,14
LLOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,76	1,14	0,47

Analiz yönteminin duyarlılığının kanıtlanması amacıyla geliştirilen yöntemlerin gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LLOQ) saptanmıştır. HPLC yönteminin gözlenebilirlik sınırı, analiz edilecek maddenin sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük konsantrasyon değerleridir. Alt tayin sınırı ise, analiz edilecek maddenin S/G oranı 10 olduğunda saptanabilen en küçük konsantrasyon değeridir (184).

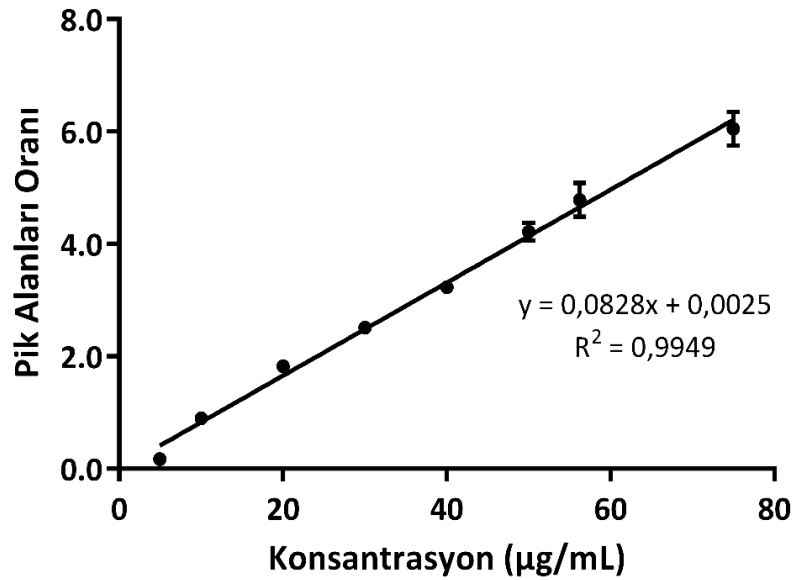
Optimize metot kullanılarak ATN, MET ve FK için sırasıyla 0,5; 0,5 ve 1 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında elde tayin edilen S/G oranlarının sırasıyla 6,57; 4,39 ve 21,34 olarak bulunmuştur. Tayin edilen her bir madde için S/G oranının 3 ve 10 olacak şekilde hesaplamalar yapılarak LOD ve LOQ değerleri tespit edilmiştir ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.3.'te verilmiştir. Ayrıca optimize metot kullanılarak her bir etkin madde için tespit edilen LOD ve LLOQ konsantrasyonlarında numune enjekte edilerek ATN, MET ve FK için S/G oranları kontrol edilmiştir.

in vivo Çalışmalar İçin Kalibrasyon Doğrusu ve Aralığı

ATN ve MET'in teorik konsantrasyonlarına karşı HPLC analizinde gözlenen pik alanlarının iç standardın pik alanlarına oranlanması ile doğrusal regresyon analizleri yapılarak elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 4.10. ve 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.10. ATN'nin plazmadaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).



Şekil 4.11. MET'in plazmadaki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).

ATN ve MET için plazmadan tayin edilen kalibrasyon doğrularına ait bilgiler Tablo 4.4.'te özetlenmiştir.

Tablo 4.4. Plazmadan analiz edilen ATN ve MET'e ait doğrusallık bulguları.

Parametreler	ATN	MET
Doğru Denklemi	$y = 0,0298x + 0,1123$	$y = 0,0828x - 0,0025$
Determinasyon Katsayısı (R^2)	0,9976	0,9949
Doğrusallık Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	5,13 - 50	4,97 - 75
Nokta Sayısı	6	8
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	1,69	1,64
LLOQ ($\mu\text{g/mL}$)	5,13	4,97

4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik (*Accuracy and Precision*)

in vitro ve *in situ* Çalışmalar İçin Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk ve kesinlik çalışmaları için ATN, MET ve FK'nin kalite kontrol standartlarının gün içi, günler arası ve enjeksiyonlar arası analizlerinin sonuçları Tablo 4.5.'te verilmiştir. Her bir madde için OBH ve %VK'nin en düşük kalite kontrol standartları için $\pm$ %20'nin altında, diğer noktalar için $\pm$ %15'in altında bulunmasıyla analitik yöntemin doğruluk ve kesinliği gösterilmiştir.

Tablo 4.5. ATN, MET ve FK'nin günler arası ve gün içi kesinlik ve doğruluk sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=6).

Maddeler	EK ($\mu\text{g/mL}$)	Günler Arası ¹			Gün İçi ²		
		BK ($\mu\text{g/mL}$)	Kesinlik BSS (%)	Doğruluk (%OHB)	BK ($\mu\text{g/mL}$)	Kesinlik BSS (%)	Doğruluk (%OHB)
ATN	0,76	0,62 $\pm$ 0,01	4,79	18,34	0,62 $\pm$ 0,02	4,86	17,84
	2	1,73 $\pm$ 0,02	4,78	13,63	1,74 $\pm$ 0,02	2,15	13,24
	20	19,46 $\pm$ 0,11	2,29	2,68	19,20 $\pm$ 0,06	0,70	4,02
	37,5	38,36 $\pm$ 0,26	2,91	2,29	37,93 $\pm$ 0,11	0,68	1,13
MET	1,14	0,92 $\pm$ 0,01	2,42	19,05	0,92 $\pm$ 0,01	1,73	19,34
	3	2,62 $\pm$ 0,06	9,39	12,66	2,63 $\pm$ 0,10	8,54	12,32
	20	19,90 $\pm$ 0,05	0,97	0,49	19,91 $\pm$ 0,05	0,75	0,44
	37,5	37,34 $\pm$ 0,29	3,35	0,44	37,78 $\pm$ 0,69	1,03	0,75
FK	0,47	0,50 $\pm$ 0,01	6,08	6,57	0,51 $\pm$ 0,02	8,48	9,20
	1	1,01 $\pm$ 0,01	4,65	1,43	1,03 $\pm$ 0,01	3,50	2,65
	8	8,26 $\pm$ 0,10	4,88	3,26	8,02 $\pm$ 0,03	0,86	0,26
	15	14,50 $\pm$ 0,23	6,60	3,36	14,89 $\pm$ 0,12	2,04	0,75

BK, bulunan konsantrasyon; BSS, bağıl standart sapma; EK, eklenen konsantrasyon; OHB, ortalama bağıl hata. ¹ Günler arası çalışmalar her bir etkin madde için 4 tane kalite kontrol örneklerinin 6 tekrarlı analizi üç farklı günde yapılarak gerçekleştirilmiştir. ² Gün içi çalışmalar her bir etkin madde için 4 adet kalite kontrol örneklerinin 6 tekrarlı analizi aynı gün içinde yapılarak gerçekleştirilmiştir.

in vivo Çalışmalar İçin Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk ve kesinlik çalışmaları için ATN ve MET'in kalite kontrol standartlarının gün içi, günler arası ve enjeksiyonlar arası analizlerinin sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. ATN ve MET'in günler arası ve gün içi kesinlik ve doğruluk sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=6).

Maddeler	EK ($\mu\text{g/mL}$)	Günler Arası ¹			Gün İçi ²		
		BK ($\mu\text{g/mL}$)	Kesinlik BSS (%)	Doğruluk (%OBH)	BK ($\mu\text{g/mL}$)	Kesinlik BSS (%)	Doğruluk (%OBH)
ATN	5,13	4,20 $\pm$ 0,32	18,67	14,42	4,36 $\pm$ 0,35	18,52	14,04
	10	8,60 $\pm$ 0,40	11,40	14,00	8,82 $\pm$ 0,25	6,94	11,80
	20	17,49 $\pm$ 0,61	8,54	12,55	17,25 $\pm$ 0,44	6,25	13,75
	37,5	39,47 $\pm$ 0,76	4,74	4,72	39,26 $\pm$ 0,50	3,12	4,91
MET	4,97	4,75 $\pm$ 0,35	18,05	11,07	4,39 $\pm$ 0,32	19,08	17,30
	10	8,72 $\pm$ 0,51	14,33	12,80	8,79 $\pm$ 0,46	12,82	12,10
	30	26,52 $\pm$ 0,65	6,00	11,60	26,61 $\pm$ 0,48	4,42	11,30
	56,25	49,32 $\pm$ 0,67	3,33	12,32	50,50 $\pm$ 0,78	3,78	10,22

BK, bulunan konsantrasyon; BSS, bağıl standart sapma; EK, eklenen konsantrasyon; OBH, ortalama bağıl hata. ¹Günler arası çalışmalar her bir etkin madde için 4 tane kalite kontrol örneklerinin 6 tekrarlı analizi üç farklı günde yapılarak gerçekleştirilmiştir. ²Gün içi çalışmalar her bir etkin madde için 4 adet kalite kontrol örneklerinin 6 tekrarlı analizi aynı gün içinde yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Her bir madde için OBH ve %VK'nin en düşük kalite kontrol standartları için $\pm$ %20'nin altında, diğer noktalar için $\pm$ %15'in altında bulunmasıyla analitik yöntemin doğruluk ve kesinliği gösterilmiştir.

4.2.6. Analit Taşınması (*Carry-over*)

In vitro ve *In situ* Çalışmalar İçin Analit Taşınması

Boş matriksten elde edilen pikin en düşük kalibrasyon standartlarının pik alanlarının $\pm$ %20'sinin altında olması gerekmektedir.

Boş matriksin ATN, MET ve FK'nin en yüksek kalibrasyon standartlarının (sırasıyla 50, 50 ve 20 µg/mL) analizi sonrası enjekte edilmesiyle elde edilen pik en düşük kalibrasyon standartlarının (sırasıyla 0,76; 1,14 ve 0,47 µg/mL) pik alanının $\pm$ %20'sinin altında olduğu için analit taşınması etkisi dışlanmıştır.

***In vivo* Çalışmalar İçin Analit Taşınması**

Boş plazmanın ATN ve MET'in en yüksek kalibrasyon standartlarının (sırasıyla 37,5 ve 56,25 µg/mL) analizi sonrası enjekte edilmesiyle elde edilen pik en düşük kalibrasyon standartlarının (sırasıyla 5,13 ve 4,97 µg/mL) pik alanının $\pm$ %20'sinin altında olduğu için analit taşınması etkisi dışlanmıştır.

4.2.7. Kararlılık (Stability)

Analitlerin kararlılığı, düşük ve yüksek konsantrasyonlu kalite kontrol örnekleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

***In vitro* ve *In situ* Çalışmalar İçin Kararlılık**

Örnekler toplandıktan sonra buzdolabında +4°C'de ve buzlukta -20°C'de muhafaza edilmiştir. 24 saat, 1 hafta ve 1 ay sonra numuneler analiz edilerek geri kazanım değerleri (%) hesaplanmıştır (Tablo 4.7. ve 4.8.).

Tablo 4.7. Hareketli faz içindeki ATN, MET ve FK'nin buzdolabında (+4°C'de) 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca kararlılık çalışması (ortalama $\pm$ SS; n=3).

Madde	KKS	EK (µg/mL)	Hemen ölçüm (% Kalan)	24 saat (% Kalan)	1 hafta (% Kalan)	1 ay (% Kalan)
ATN	Düşük	2	84,11 $\pm$ 0,01	85,36 $\pm$ 0,02	86,19 $\pm$ 0,02	88,75 $\pm$ 0,07
	Yüksek	37,5	99,90 $\pm$ 1,27	99,56 $\pm$ 1,34	99,49 $\pm$ 1,38	101,50 $\pm$ 1,95
MET	Düşük	3	110,34 $\pm$ 0,00	108,85 $\pm$ 0,14	113,58 $\pm$ 0,04	113,52 $\pm$ 0,05
	Yüksek	37,5	95,78 $\pm$ 1,21	96,09 $\pm$ 1,23	96,06 $\pm$ 1,27	98,27 $\pm$ 1,59
FK	Düşük	1	93,86 $\pm$ 0,12	115,14 $\pm$ 0,04	83,76 $\pm$ 0,13	99,22 $\pm$ 0,09
	Yüksek	15	110,13 $\pm$ 0,72	107,77 $\pm$ 0,71	110,29 $\pm$ 0,72	113,62 $\pm$ 0,76

EK: eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları.

Tablo 4.8. Hareketli faz içindeki ATN, MET ve FK'nin buzlukta (-20°C'de) 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca kararlılık çalışması (ortalama $\pm$ SS; n=3).

Madde	KKS	EK ($\mu\text{g/mL}$)	Hemen ölçüm (% Kalan)	24 saat (% Kalan)	1 hafta (% Kalan)	1 ay (% Kalan)
ATN	Düşük	2	88,06 $\pm$ 0,11	86,32 $\pm$ 0,02	85,43 $\pm$ 0,02	85,43 $\pm$ 0,02
	Yüksek	37,5	100,44 $\pm$ 0,68	99,99 $\pm$ 0,67	99,70 $\pm$ 0,62	99,70 $\pm$ 0,62
MET	Düşük	3	111,82 $\pm$ 0,00	112,14 $\pm$ 0,02	114,26 $\pm$ 0,10	112,71 $\pm$ 0,07
	Yüksek	37,5	97,92 $\pm$ 0,69	97,96 $\pm$ 0,62	97,24 $\pm$ 0,56	97,49 $\pm$ 0,54
FK	Düşük	1	97,98 $\pm$ 0,09	113,41 $\pm$ 0,02	93,24 $\pm$ 0,09	90,31 $\pm$ 0,07
	Yüksek	15	111,50 $\pm$ 0,52	109,01 $\pm$ 0,40	110,20 $\pm$ 0,39	110,55 $\pm$ 0,38

EK, eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları.

Kalite kontrol örnekleri, donma-çözme döngüleri arasında en az 12 saat donmuş halde tutulmalıdır ve analiz sonucu elde edilen ortalama konsantrasyon, gerçek konsantrasyonun $\pm$ %20'sinin içinde olmalıdır (182). Yapılan kararlılık çalışmaları sonucunda ölçülen konsantrasyon değerleri, gerçek konsantrasyon değerlerinin $\pm$ %20'si içinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.9. ve 4.10.).

Tablo 4.9. Hareketli faz içindeki ATN, MET ve FK'nin buzdolabında (+4°C'de) 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca dayanıklılığına ait konsantrasyon sonuçları (ortalama $\pm$ SS; n=3).

Madde	KKS	EK ($\mu\text{g/mL}$)	Kabul Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	Hemen ölçüm ($\mu\text{g/mL}$)	24 saat ($\mu\text{g/mL}$)	1 hafta ($\mu\text{g/mL}$)	1 ay ($\mu\text{g/mL}$)
ATN	Düşük	2	1,6 - 2,4	1,68	1,71	1,72	1,77
	Yüksek	37,5	30 - 45	37,46	37,33	37,31	38,06
MET	Düşük	3	2,40 - 3,60	3,31	3,27	3,41	3,41
	Yüksek	37,5	30 - 45	35,92	36,04	36,02	36,85
FK	Düşük	1	0,80 - 1,20	0,94	1,15	0,84	0,99
	Yüksek	15	12 - 18	16,52	16,32	16,54	17,04

EK, eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları.

Tablo 4.10. Hareketli faz içindeki ATN, MET ve FK'nin buzlukta (-20°C'de) 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca dayanıklılığına ait konsantrasyon sonuçları (ortalama $\pm$ SS; n=3).

Madde	KKS	EK ($\mu\text{g/mL}$)	Kabul Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	Hemen ölçüm ($\mu\text{g/mL}$)	24 saat ($\mu\text{g/mL}$)	1 hafta ($\mu\text{g/mL}$)	1 ay ($\mu\text{g/mL}$)
ATN	Düşük	2	1,6 - 2,4	1,76	1,73	1,71	1,71
	Yüksek	37,5	30 - 45	37,66	37,50	37,39	37,32
MET	Düşük	3	2,40 - 3,60	3,35	3,36	3,43	3,38
	Yüksek	37,5	30 - 45	36,72	36,73	36,46	36,56
FK	Düşük	1	0,80 - 1,20	0,98	1,13	0,93	0,90
	Yüksek	15	12 - 18	16,72	16,35	16,53	16,58

EK, eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları.

Kalite kontrol standartlarının geri kazanım değerlerinin -20°C'de saklandığında, +4°C'de saklanmasına kıyasla daha yüksek çıktığı için numuneler -20°C'de saklanmıştır.

***In vivo* Çalışmalar İçin Kararlılık**

Plazma örnekleri analiz edilinceye kadar buzlukta -20°C'de muhafaza edilmiştir. Stabilité çalışmaları -20°C'de 1 hafta olacak şekilde yapılmıştır. 1 haftanın sonunda numuneler analiz edilerek gerçek konsantrasyon değerlerinin $\pm$ %20'si içinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.11.).

Tablo 4.11. Plazma içindeki ATN ve MET'in buzlukta (-20°C'de) 1 hafta boyunca kararlılık çalışmasına ait bulgular (ortalama $\pm$ SS; n=3).

Madde	KKS	EK ($\mu\text{g/mL}$)	Hemen ölçüm (% Kalan)	1 hafta (% Kalan)
ATN	Düşük	5,13	85,58 $\pm$ 0,14	85,96 $\pm$ 0,17
	Yüksek	37,5	104,67 $\pm$ 0,26	104,88 $\pm$ 0,32
MET	Düşük	4,97	88,93 $\pm$ 0,21	88,73 $\pm$ 0,24
	Yüksek	56,25	118,79 $\pm$ 0,31	118,84 $\pm$ 0,39

EK, eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları.

Tablo 4.12. Plazmadaki ATN ve MET'in buzlukta (-20°C'de) 1 hafta boyunca dayanıklılığına ait konsantrasyon sonuçları (ortalama $\pm$ SS; n=3).

Madde	KKS	EK ($\mu\text{g/mL}$)	Kabul Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	Hemen ölçüm ($\mu\text{g/mL}$)	1 hafta ($\mu\text{g/mL}$)
ATN	Düşük	5,13	4,10 – 6,16	4,39	4,41
	Yüksek	37,5	30,0 – 45,0	39,25	39,33
MET	Düşük	4,97	3,98 – 5,96	4,42	4,11
	Yüksek	56,25	45,0 – 67,5	66,82	66,85

EK, eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları.

Kalite kontrol örnekleri, donma-çözme döngüleri arasında en az 12 saat donmuş halde tutulmalıdır ve analiz sonucu elde edilen ortalama konsantrasyon, gerçek konsantrasyonun $\pm$ %20'si içinde olmalıdır (182). Yapılan kararlılık çalışmaları sonucunda ölçülen konsantrasyon değerleri, gerçek konsantrasyon değerlerinin $\pm$ %20'si içinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.12.).

4.2.8. Enjeksiyonlar Arası Tekrar Edilebilirlik (*Reinjection Reproducibility*)

Enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik, depolamadan sonra kalite kontrol örneklerinden düşük, orta ve yüksek olanların minimum 5 tekrarından oluşan bir çalışmayı yeniden enjekte ederek değerlendirmektedir (182).

In vitro ve *In situ* Çalışmalar İçin Enjeksiyonlar Arası Tekrar Edilebilirlik

Enjeksiyonlar arasındaki tekrar edilebilirlik analizleri için 6 tekrarlı olacak şekilde düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarındaki kalite kontrol standartları kullanılarak analizler yapılmıştır (Tablo 4.13.).

Tablo 4.13. ATN, MET ve FK'nin HPLC ile analizinde yönteminin enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirliğinin değerlendirmesine ait bulgular (ortalama $\pm$ SH; n=6).

Madde	KKS	EK ($\mu\text{g/mL}$)	BK ($\mu\text{g/mL}$)	OBH (%)	BSS (%)
ATN	Düşük	2	1,70 $\pm$ 0,05	15,13	6,52
	Orta	20	19,16 $\pm$ 0,03	4,19	0,43
	Yüksek	37,5	37,84 $\pm$ 0,13	0,91	0,83
MET	Düşük	3	2,61 $\pm$ 0,01	13,16	8,79
	Orta	20	19,79 $\pm$ 0,10	1,05	0,60
	Yüksek	37,5	37,10 $\pm$ 0,05	1,07	4,51
FK	Düşük	1	1,02 $\pm$ 0,02	1,62	4,12
	Orta	8	8,72 $\pm$ 0,16	9,06	4,48
	Yüksek	15	14,22 $\pm$ 0,48	5,23	8,27

BK, bulunan konsantrasyon; BSS, bağıl standart sapma; EK, eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları; OBH, ortalama bağıl hata.

Her bir madde için OBH ve BSS en düşük kalite kontrol standartları için $\pm$ %20'nin altında, diğer noktalar için $\pm$ %15'in altında bulunmasıyla analitik yöntemin doğruluk ve kesinliği gösterilmiştir.

***In vivo* Çalışmalar İçin Enjeksiyonlar Arası Tekrar Edilebilirlik**

Enjeksiyonlar arasındaki tekrar edilebilirlik analizleri için 6 tekrarlı olacak şekilde düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarındaki kalite kontrol standartları kullanılarak analizler yapılmıştır (Tablo 4.14.).

Tablo 4.14. ATN ve MET'in HPLC ile analizinde yönteminin enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirliğinin değerlendirmesine ait bulgular (ortalama $\pm$ SS; n=6).

Madde	KKS	EK ($\mu\text{g/mL}$)	BK ($\mu\text{g/mL}$)	OBH (%)	BSS (%)
ATN	Düşük	10	8,59 $\pm$ 2,09	14,05	13,57
	Orta	20	17,25 $\pm$ 1,42	13,74	11,17
	Yüksek	37,5	32,45 $\pm$ 0,08	13,47	10,19
MET	Düşük	10	8,72 $\pm$ 1,24	12,76	13,89
	Orta	30	26,52 $\pm$ 3,65	11,59	13,68
	Yüksek	56,25	49,32 $\pm$ 6,07	12,32	12,25

BK, bulunan konsantrasyon; BSS, bağıl standart sapma; EK, eklenen konsantrasyon; KKS, kalite kontrol standartları; OBH, ortalama bağıl hata.

Her bir madde için OBH ve BSS en düşük kalite kontrol standartları için $\pm \%20$ 'nin altında, diğer noktalar için $\pm \%15$ 'in altında bulunmasıyla analitik yöntemin doğruluk ve kesinliği gösterilmiştir.

4.2.9. Geri Kazanım (*Recovery*)

In vitro ve *In situ* Çalışmalar İçin Geri Kazanım

ATN, MET ve FK'nin düşük, orta ve yüksek konsantrasyondaki kalite kontrol standartları için yapılan geri kazanım çalışma sonuçları Tablo 4.15.'te özetlenmiştir.

Tablo 4.15. ATN, MET ve FK için geliştirilen HPLC metodu için geri kazanım çalışmasına ait bulgular (ortalama $\pm$ SH; n=6).

Tayin edilecek madde	EK ($\mu\text{g/mL}$)	BK ($\mu\text{g/mL}$)	Geri kazanım (%)	BSS (%)
ATN	2	1,74	86,76 $\pm$ 0,71	2,00
	20	19,20	95,98 $\pm$ 0,26	0,67
	37,5	37,93	101,13 $\pm$ 0,26	0,64
MET	3	2,63	87,68 $\pm$ 8,13	9,27
	20	19,91	99,56 $\pm$ 0,28	0,68
	37,5	37,78	100,75 $\pm$ 0,40	0,96
FK	1	1,03	102,65 $\pm$ 1,32	3,16
	8	8,02	100,26 $\pm$ 0,24	0,60
	15	14,89	99,25 $\pm$ 0,76	1,89

BK, bulunan konsantrasyon; BSS, bağıl standart sapma; EK, eklenen konsantrasyon.

Geri kazanımın $\%100$ olması gerekmemektedir, ancak değerler tekrarlanabilir olmalıdır. Geri kazanım çalışmalarının genellikle düşük, orta ve yüksek olmak üzere kalibrasyon aralığındaki üç noktayı kapsaması önerilmektedir (182). Elde edilen sonuçlara göre ATN, MET ve FK için geri kazanım değerleri uygun bulunmuştur.

in vivo Çalışmalar İçin Geri Kazanım

ATN ve MET'in düşük, orta ve yüksek konsantrasyondaki kalite kontrol standartları için yapılan geri kazanım çalışma sonuçları Tablo 4.16.'da özetlenmiştir.

Tablo 4.16. ATN ve MET için geliştirilen HPLC metodu için geri kazanım çalışmasına ait bulgular (ortalama $\pm$ SS; n=6).

Tayin edilecek madde	EK ($\mu\text{g/mL}$)	BK ($\mu\text{g/mL}$)	Geri kazanım (%)	BSS (%)
ATN	10	8,81 $\pm$ 2,10	89,26	13,34
	20	17,49 $\pm$ 1,08	91,82	12,62
	37,5	32,70 $\pm$ 0,26	87,65	11,04
MET	10	8,79 $\pm$ 1,12	80,57	12,41
	30	26,61 $\pm$ 3,41	87,67	12,72
	56,25	50,50 $\pm$ 3,65	87,43	7,18

BK, bulunan konsantrasyon; BSS, bağıl standart sapma; EK, eklenen konsantrasyon.

Geri kazanımın %100 olması gerekmemektedir, ancak değerler tekrarlanabilir olmalıdır. Geri kazanım çalışmalarının genellikle düşük, orta ve yüksek olmak üzere kalibrasyon aralığındaki üç noktayı kapsaması önerilmektedir (182). Elde edilen sonuçlara göre ATN ve MET için geri kazanım değerleri uygun bulunmuştur.

4.2.10. Sistem Uygunluk Testleri (*System Suitability Tests*)

in vitro ve *in situ* Çalışmalar İçin Sistem Uygunluk Testleri

Elde edilen sonuçlara göre ATN, MET ve FK için sistem uygunluk parametreleri Tablo 4.17.'de verilmiştir.

Tablo 4.17. ATN, MET ve FK için sistem uygunluk test kriterleri (183) ve elde edilen analiz sonuçları.

Parametre	Sınır Değer	ATN	MET	FK
Alıkonma zamanı (dk)		5,028	12,401	13,507
Kapasite faktörü (k')		0,668	3,115	3,481
Ayırıcılık (R_s)	$R_s > 1,5$	6,316	33,687	5,863
Pik asimetri oranı	$\leq 1,5$	1,347	1,287	1,226
Teorik tabaka sayısı (N)	$N > 2000$	7208	60987	94032

ATN, MET ve FK için elde edilen ayırıcılık, pik asimetri oranı ve teorik tabaka sayısı sonuçları USP'de belirtilen sistem uygunluk test sınırlarının içinde yer almaktadır. Böylece geliştirilen metodun, kantitatif olarak analizi yapılacak maddeler için sistem uygunluk test kriterlerini karşıladığı kanıtlanmıştır.

***In vivo* Çalışmalar İçin Sistem Uygunluk Testleri**

Geliştirilen metodun sistem uygunluk testleri USP'de belirtilen ayırıcılık, teorik tabaka sayısı (kolon etkinliği) ve pik asimetri oranı (kuyruklanma faktörü) gibi parametreler dikkate alınarak kantitatif analizi yapılacak olan ATN ve MET için değerlendirilmiştir (183, 184). Elde edilen sonuçlara göre ATN ve MET için sistem uygunluk parametreleri Tablo 4.18.'de yer almaktadır.

Tablo 4.18. Plazmadan analiz edilen ATN ve MET için sistem uygunluk test kriterleri (183) ve elde edilen analiz sonuçları.

Parametre	Sınır Değer	ATN	MET
Alıkonma zamanı (dk)		5,568	13,432
Kapasite faktörü (k')		1.202	4,312
Ayırıcılık (R_s)	$R_s > 1,5$	5,309	2,370
Pik asimetri oranı	$\leq 1,5$	0,921	1,118
Teorik tabaka sayısı (N)	$N > 2000$	2158	9271

Piklerin saflıklarını ve herhangi bir madde ile girişim yapıp yapmadığının ölçütü olan pik saflık indeksleri sırasıyla ATN ve MET için sırasıyla 0,9999 ve 0,9879 olarak bulunmuştur. Elde edilen pik saflık indeksleri 1'e yakın olduğu için kromatogramda iki pikin başarılı bir şekilde ayrıldığı sonucuna ulaşılmıştır.

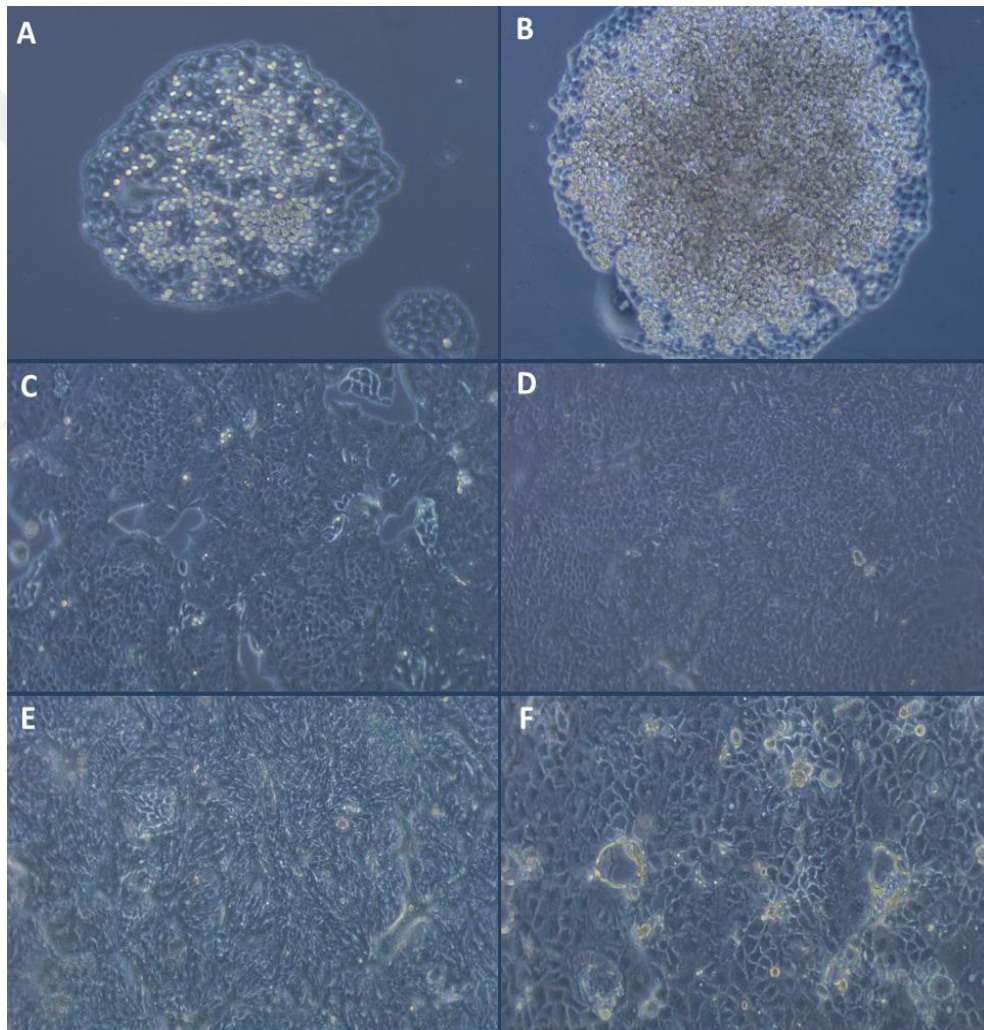
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı Caco-2 ve HCT-8 hücrelerinin *inverted* mikroskoptaki görüntüleri Şekil 4.12'de verilmiştir.

Caco-2 hücrelerinin büyümelerinde KMAL geliştirme çalışmaları sırasında *inverted* mikroskopta gözle görünür ölçüde yavaşlama olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı

Caco-2 hücreleri gün aşırı olarak pasajlanırken, KMAL geliştirilen Caco-2 hücrelerinde 2 günde bir sadece ortam değişimi yapılmış, 4 günde bir pasajlanmıştır.

HCT-8 hücrelerinin flasklara yapışması ve büyümesinin Caco-2 hücrelerine göre daha hızlı olduğu gözlenmiştir. HCT-8 hücrelerinin büyümesinde KMAL geliştirildiğinde dahi *inverted* mikroskopta gözle görünür bir yavaşlama olmamıştır. Sağlıklı hücrelerin pasaj zamanında KMAL geliştirilen hücreler de pasajlanmıştır. KMAL gelişimi için 3 gün süreyle (2 pasaj) sağlıklı hücreler %1 FBS içeren kültür ortamı ile (RPMI 1640) beslenmişlerdir.



Şekil 4.12. HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinin *inverted* mikroskoptaki görüntüleri (x20).

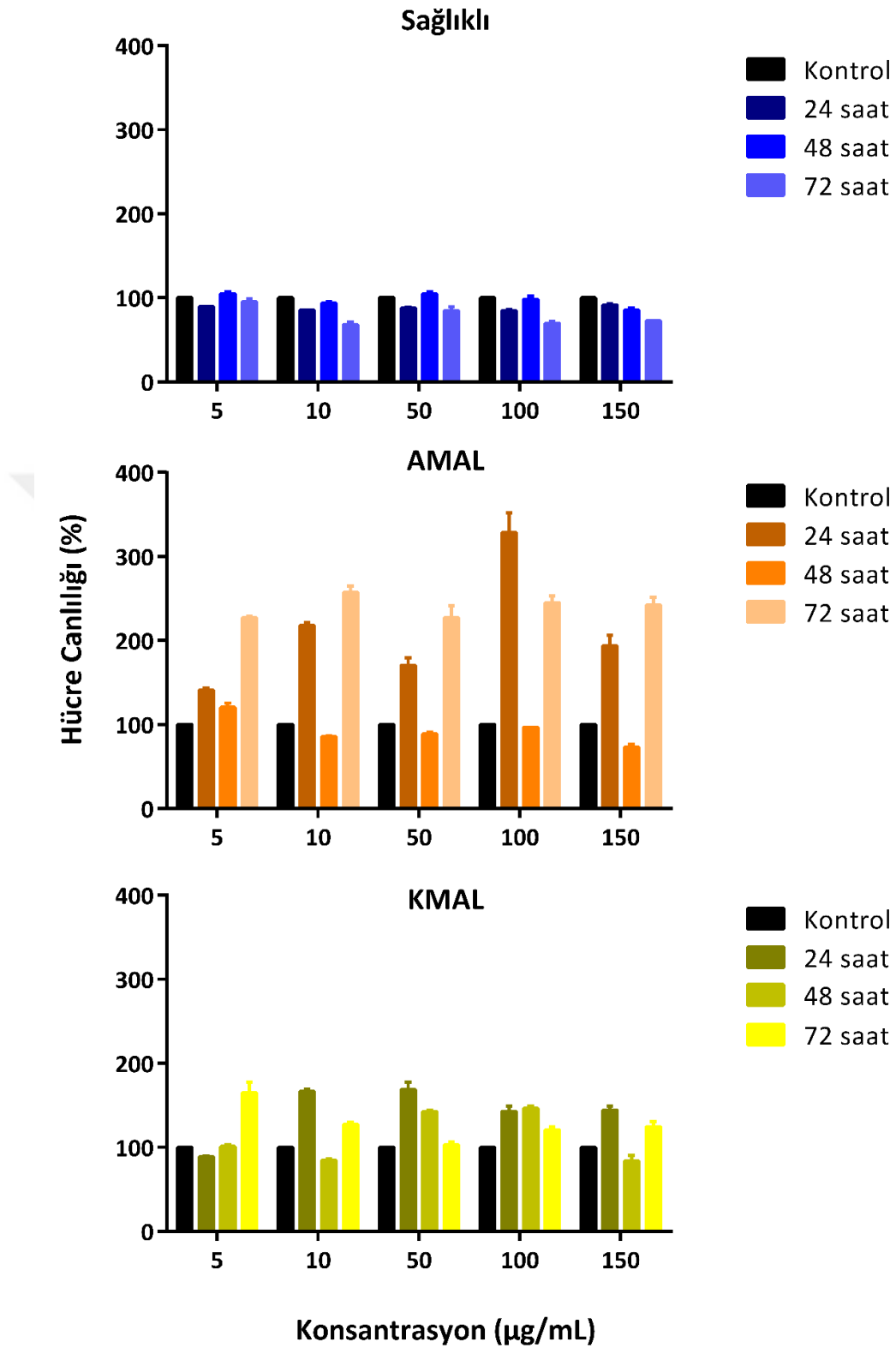
a ve b: yeni açılan HCT-8 hücrelerinin koloni şeklinde büyümeleri; **c:** HCT-8 hücrelerinin flaska ekildikten 1 gün sonundaki görüntüsü; **d:** HCT-8 hücrelerinin flaska ekildikten 2 gün sonundaki görüntüsü; **e:** HCT-8 hücrelerinin flaska ekildikten 3 gün sonundaki görüntüsü; **f:** Caco-2 hücrelerinin flastaki görüntüsü.

4.3.1. Hücre Canlılığı Testleri

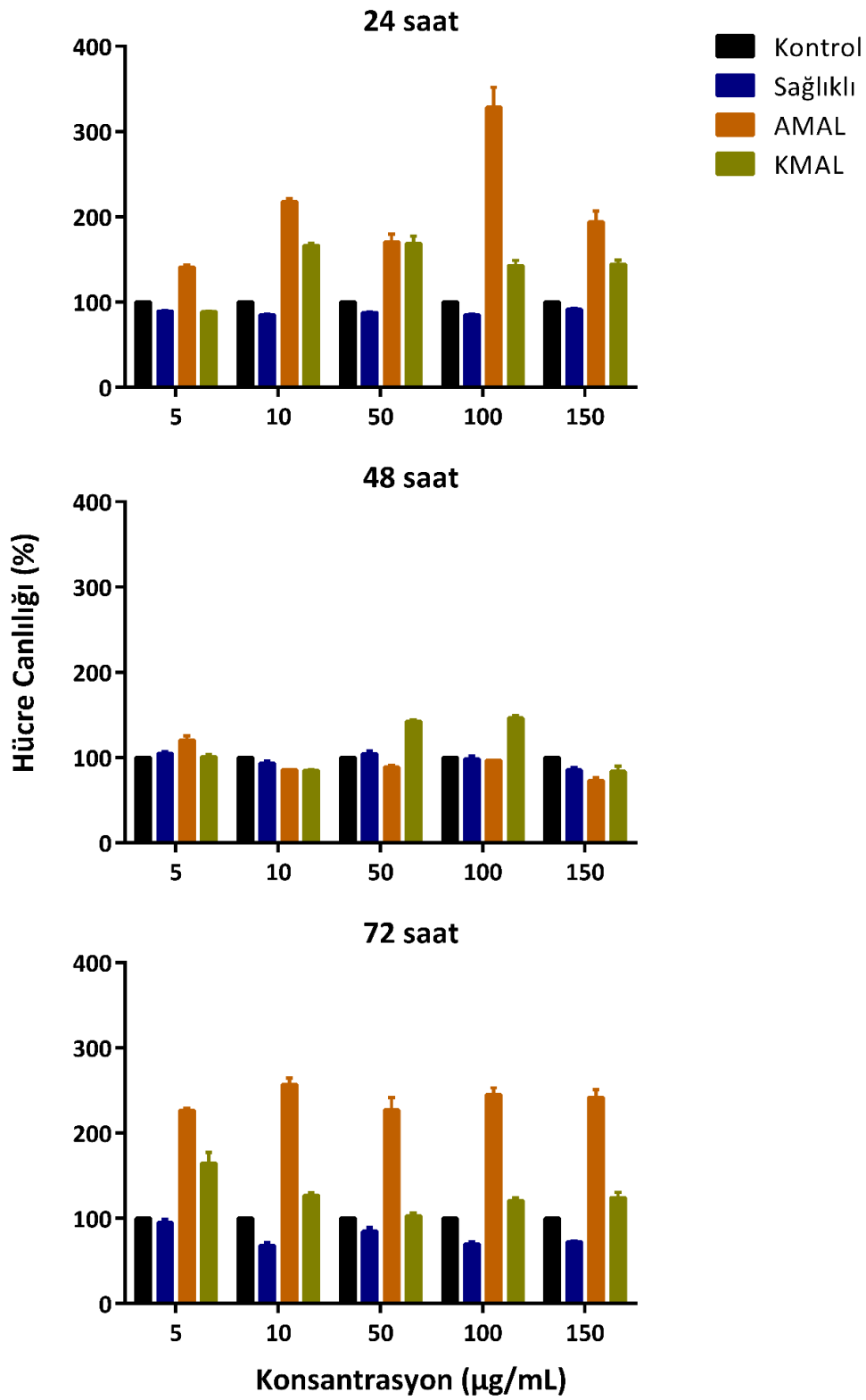
HCT-8 Hücreleri İçin Hücre Canlılığı Testleri

HCT-8 hücrelerinde yapılan hücre canlılığı testi pasaj sayısı 2 olan sağlıklı hücreler, pasaj sayısı 5 olan AMAL ve KMAL geliştirilen hücreler için üç farklı zaman noktasında (24, 48 ve 72 saat) ve 5 farklı konsantrasyonda (ATN: 5, 10, 50, 100 ve 150 $\mu\text{g/mL}$; MET: 5, 10, 50, 100 ve 300 $\mu\text{g/mL}$) gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.).





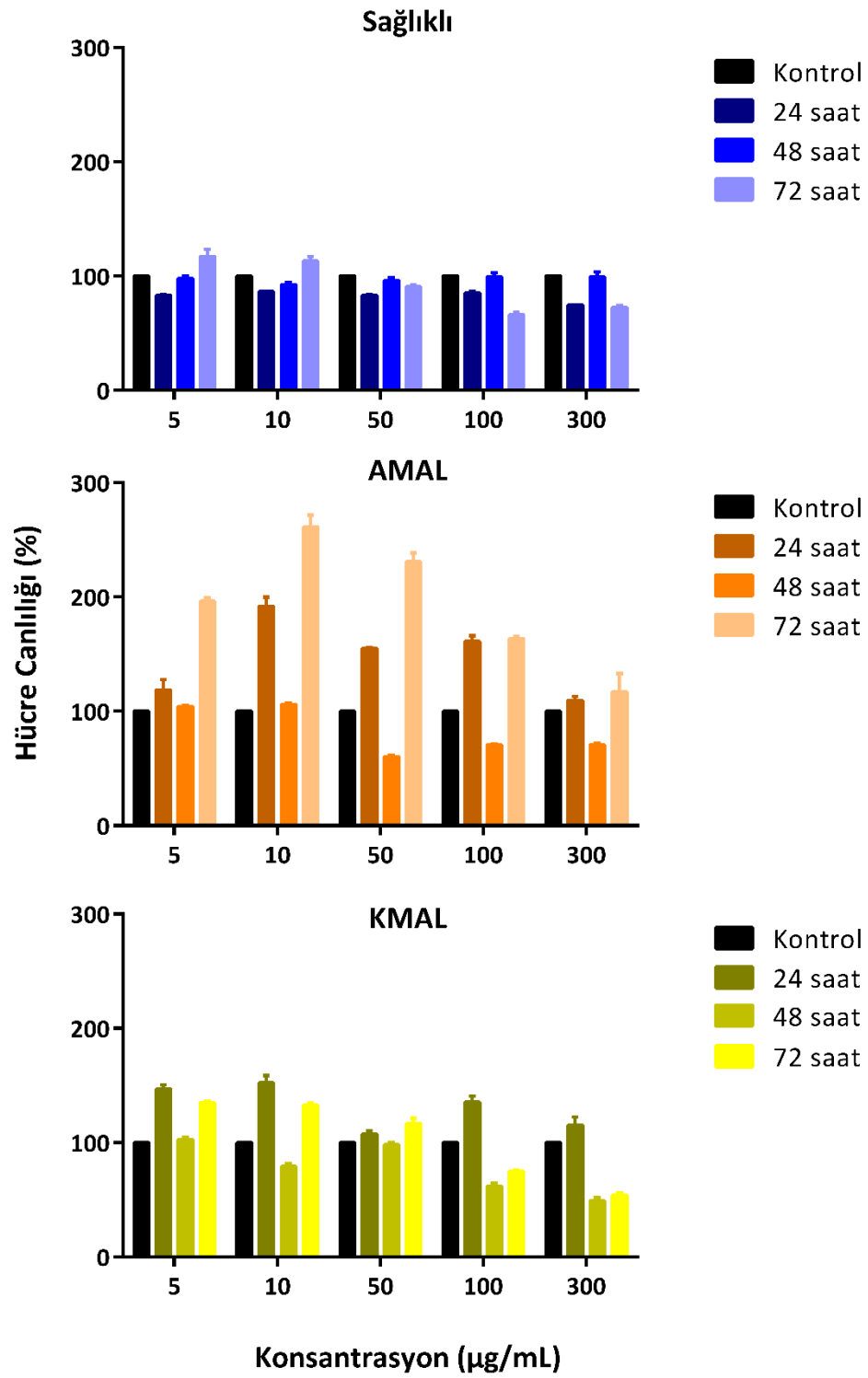
Şekil 4.13. HCT-8 hücrelerinde ATN ile yapılan hücre canlılığı testi sonuçları (ortalama $\pm$ standart hata (SH); n=3).



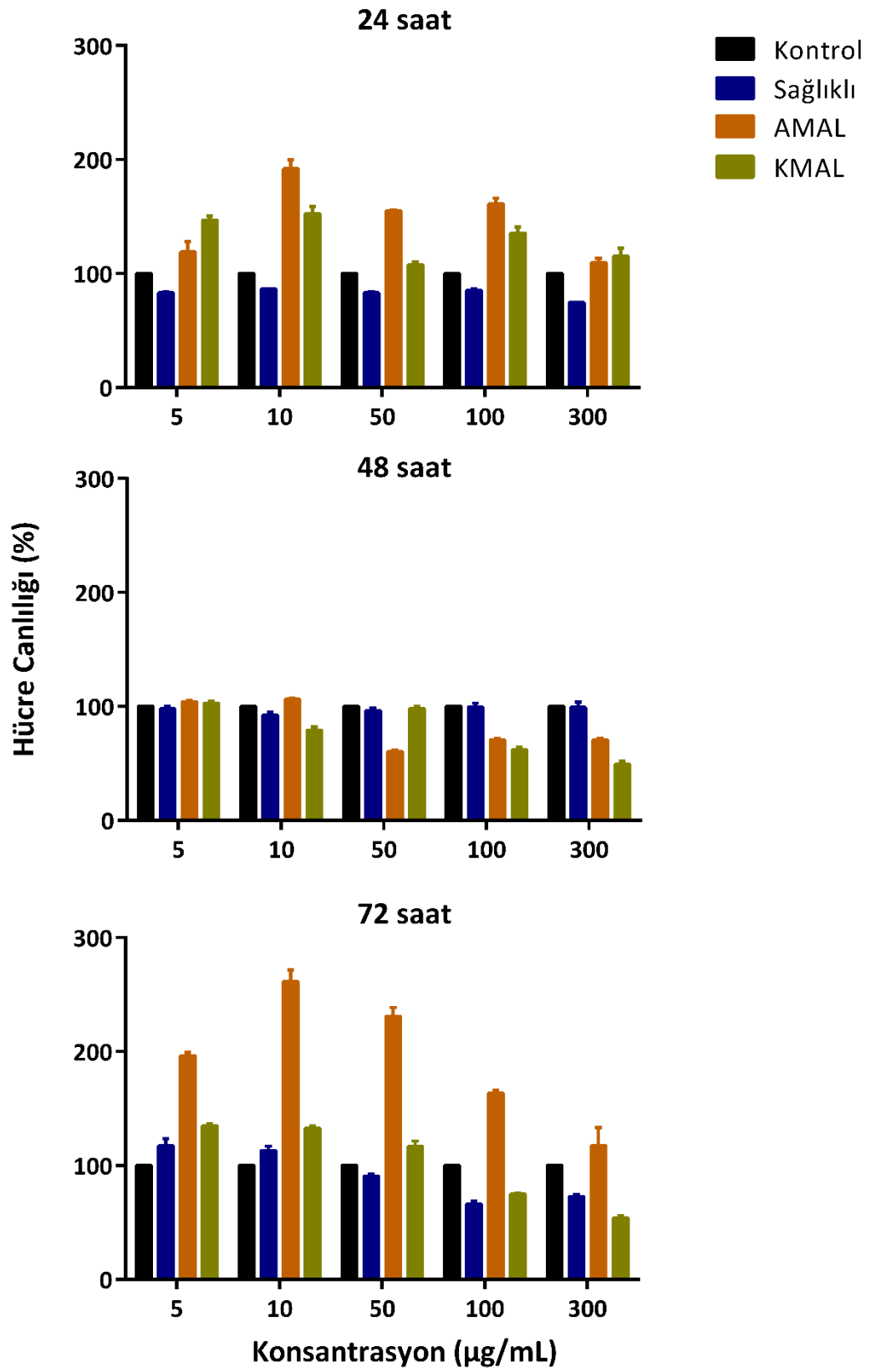
Şekil 4.14. HCT-8 hücrelerinde ATN ile yapılan hücre canlılığı testi sonuçlarının karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SH; n=3).

ATN ile sağlıklı HCT-8 hücrelerinde yapılan 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre hücrelere uygulanan konsantrasyonlarda hücre canlılıklarının %84,73-91,45 arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. 48 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre ise 150 µg/mL konsantrasyonda ATN uygulamasına bağlı olarak hücre canlılığı %85,65'e kadar düşmüştür. 72 saatlik hücre canlılığı testi sonucunda en yüksek hücre canlılığı 5 µg/mL'de (%95,04) tespit edilirken, hücre canlılığı %68,12'ye kadar düşmüştür.

AMAL geliştirilen HCT-8 hücrelerinde 24 ve 72 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre hücre canlılıkları tüm konsantrasyonlar için %100'ün üstünde bulunurken, 48 saat sonunda 150 µg/mL ATN uygulanmasına bağlı olarak hücre canlılığı %73,23'e kadar düşmüştür. KMAL geliştirilen HCT-8 hücrelerinde 24 ve 72 saatlik hücre canlılığı 24 saatlik 5 µg/mL ATN uygulaması (%88,84) hariç hücre canlılıkları tüm konsantrasyonlar için %100 ve üstünde bulunmuştur. Elde edilen bulgular doğrultusunda AMAL ve KMAL geliştirilmiş hücrelere ATN uygulamasının hücre proliferasyonunu arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.15. HCT-8 hücrelerinde MET ile yapılan hücre canlılığı testi sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=3).



Şekil 4.16. HCT-8 hücrelerinde MET ile yapılan hücre canlılığı testi sonuçlarının karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SH; n=3).

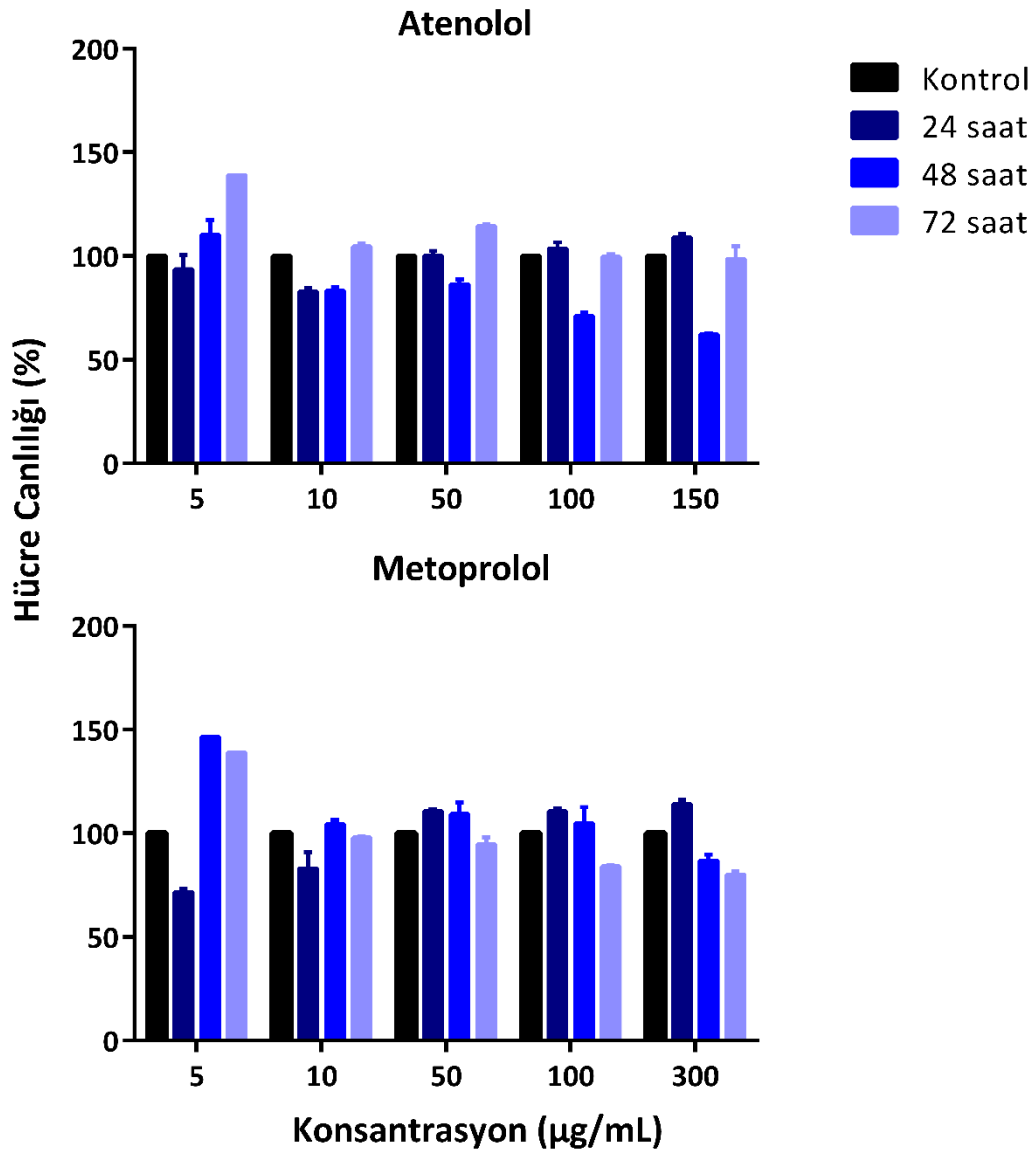
MET ile sağlıklı HCT-8 hücrelerinde yapılan 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre hücrelere uygulanan konsantrasyonlarda hücre canlılıklarının %70,55-85,36 arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. 48 saatlik deney sonucuna göre ise tüm konsantrasyonlar için hücre canlılığı değerleri %92,3-99,33 arasında bulunmuştur. 72 saatlik deney sonucunda ise yüksek MET konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığı %66,17'ye kadar düşmüştür.

AMAL geliştirilen HCT-8 hücrelerinde yapılan 24 ve 72 saatlik hücre canlılığı testi sonucunda hücre canlılığı uygulanan tüm MET konsantrasyonlarında %100 ve üzerinde bulunmuştur. 48 saatlik deney sonucuna göre ise uygulanan konsantrasyonun artması ile beraber %60,37'ye kadar düşmüştür.

KMAL geliştirilen HCT-8 hücrelerinde yapılan 24 saatlik hücre canlılığı testi sonucu hücre canlılıkları tüm konsantrasyonlar için %100'e yakın bulunurken, 48 ve 72 saat için MET konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak sırası ile %49,07 ve %54,24'e kadar düşmüştür.

Caco-2 Hücreleri İçin Hücre Canlılığı Testleri

Hücre canlılığı testleri pasaj sayısı 25 olan sağlıklı Caco-2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat; pasaj sayısı 32 olan KMAL geliştirilen Caco-2 hücrelerinde ise 24 saat olmak üzere ATN ve MET'in 5 farklı konsantrasyonlarında (ATN: 5, 10, 50, 100 ve 150 µg/mL; MET: 5, 10, 50, 100 ve 300 µg/mL) gerçekleştirilmiştir. ATN ve MET için sağlıklı ve KMAL geliştirilen Caco-2 hücrelerinde elde edilen bulgular Şekil 4.17. ve 4.18.'de sunulmuştur.

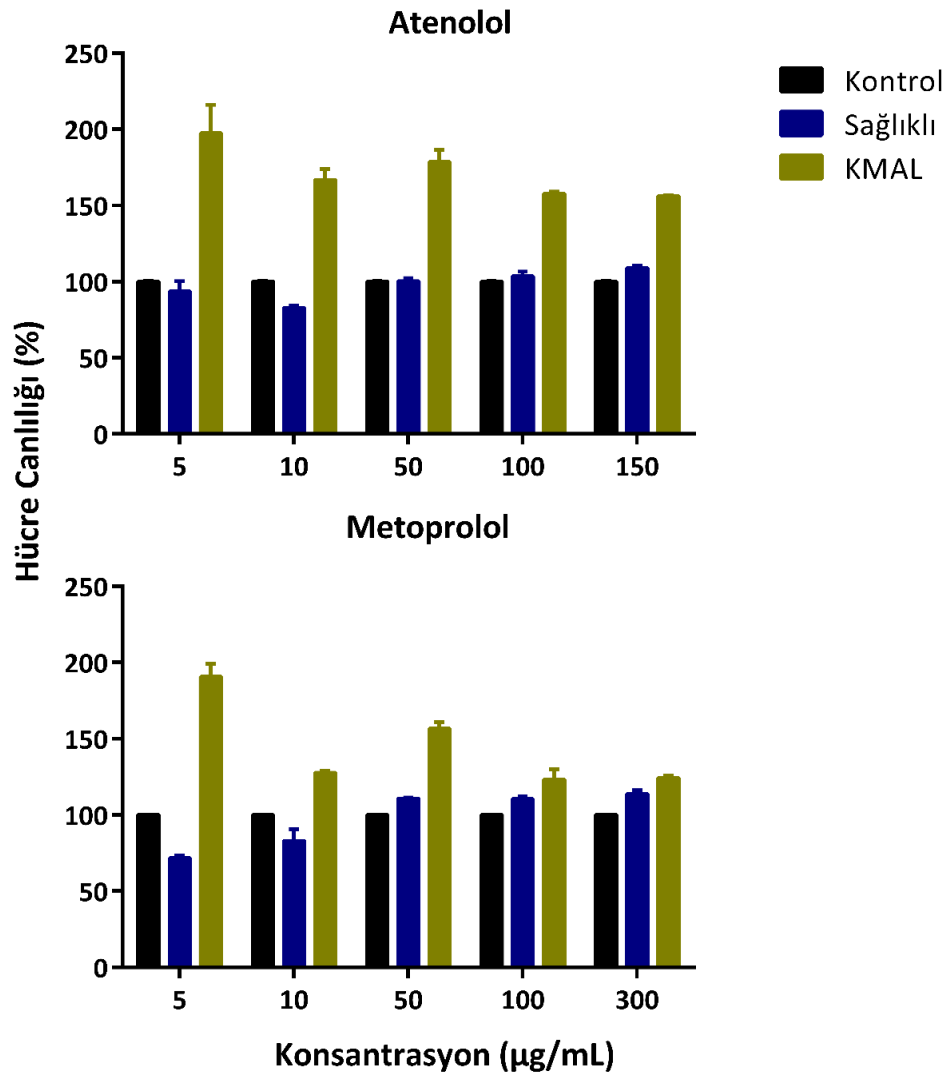


Şekil 4.17. Sağlıklı Caco-2 hücrelerinde yapılan 24, 48 ve 72 saatlik hücre canlılığı testi sonuçları (ortalama $\pm$ SH; n=3).

Sağlıklı Caco-2 hücrelerinde yapılan 24 ve 72 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre çeşitli konsantrasyonlarda ATN uygulanmasıyla hücre canlılığının ATN konsantrasyonu artsa da %100'e olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre ise ATN konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının %110,19'dan %62,07'lere kadar düştüğü gözlenmiştir.

Sağlıklı Caco-2 hücrelerinde yapılan 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre çeşitli konsantrasyonlarda MET uygulanmasıyla hücre canlılığının MET konsantrasyonu arttıkça arttığı tespit edilirken, 48 ve 72 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre MET konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının sırası ile %86,69 ve %80,08'e kadar düştüğü gözlenmiştir.

Transport deneylerinde hücreler etkin maddeye 2 saat boyunca maruz kalacağı için Caco-2 hücrelerinde yapılan hücre canlılığı testi sonuçlarına göre uygulanan tüm ATN ve MET konsantrasyonlarının transport deneyleri için uygun olacağı ve seçilen konsantrasyonlarda sağlıklı ve KMAL geliştirilen hücrelerde herhangi bir toksik etki gözlenmeyeceği sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.18. Caco-2 hücrelerinde kontrol, sağlıklı ve KMAL geliştirilen hücrelerde ATN ve MET uygulanarak yapılan 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarının karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SH; n=3).

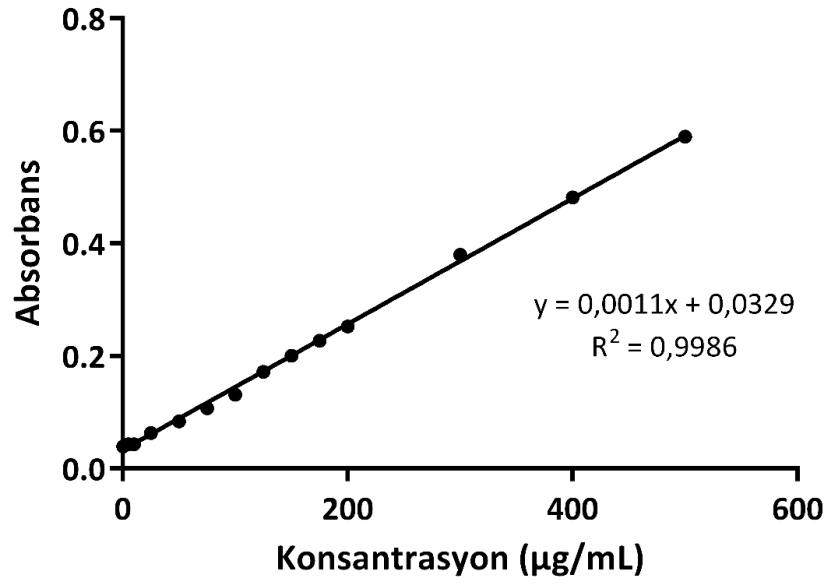
ATN ile Caco-2 hücrelerinde yapılan 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre sağlıklı hücrelere uygulanan 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda hücre canlılıkları sırasıyla %93,62 ve 82,85 olarak bulunmuştur. Diğer konsantrasyonlarda ise canlılık %100 ve üzeri olarak bulunmuştur. KMAL geliştirilen hücrelere uygulanan tüm ATN konsantrasyonlarında hücre canlılığı kontrol grubuna ve sağlıklı hücrelere göre daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen bulgular doğrultusunda ATN'nin KMAL geliştirilen hücrelerde proliferasyona neden olduğu ve ATN konsantrasyonunun artması ile proliferasyon oranının azaldığı sonucuna ulaşılmıştır.

MET ile Caco-2 hücrelerinde yapılan 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarına göre sağlıklı hücrelere uygulanan 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda hücre canlılıkları sırasıyla %71,57 ve 83,06 olarak bulunmuştur. Diğer konsantrasyonlarda ise canlılık %100 ve üzeri olarak bulunmuştur. KMAL geliştirilen hücrelere uygulanan tüm MET konsantrasyonlarında hücre canlılığı kontrol grubuna ve sağlıklı hücrelere göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgular doğrultusunda MET'nin KMAL geliştirilen hücrelerde proliferasyona neden olduğu ve MET konsantrasyonunun artması ile proliferasyon oranının azaldığı sonucuna ulaşılmıştır.

Hücre canlılığı testi, hücrelere çift yönlü transport çalışmalarında uygulanabilecek konsantrasyonu belirlemek amacı ile yapılmıştır. Çift yönlü transport deneyleri 2 saat süreceği için hem sağlıklı hem de malnütrisyon geliştirilen HCT-8 ve Caco-2 hücreleri için seçilen ATN ve MET konsantrasyonlarının (5-150; 5-300 µg/mL) çift yönlü transport deneyleri için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Etkin madde tayini için kullanılacak HPLC yöntemi ile tayin edilebilirliği sağlamak amacı ile çift yönlü transport çalışmalarında kullanılmak üzere ATN için 150 µg/mL, MET için ise 300 µg/mL konsantrasyonları seçilmiştir.

4.3.2. Çift Yönlü Transport Çalışmaları

ATN ile beraber kuyucuklara eklenen LY'nin konsantrasyonunu ölçmek için 0,5 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığında (0,5; 1; 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 300; 400; 500) LY'nin sudaki çözeltisi hazırlanmıştır. 485 nm'de elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Şekil 4.19.) kullanılarak transport deneyleri sonucunda elde edilen LY'nin absorbans değerlerinden konsantrasyonları hesaplanmıştır.



Şekil 4.19. LY'nin kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama $\pm$ SS; n=6).

HCT-8 Hücrelerinde Yapılan Çift Yönlü Transport Çalışması

Sağlıklı ve KMAL geliştirilmiş HCT-8 hücrelerinden elde edilen sonuçlar Tablo 4.19., Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.'de özetlenmiştir. LY'nin permeabilitesi tüm gruplarda $< 1 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunduğu için ATN uygulanan insertlerin tamamı deneye dahil edilmiştir (180).

Tablo 4.19. Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen HCT-8 hücrelerinden elde edilen görünür permeabilite katsayıları (ortalama $\pm$ SH, n=4).

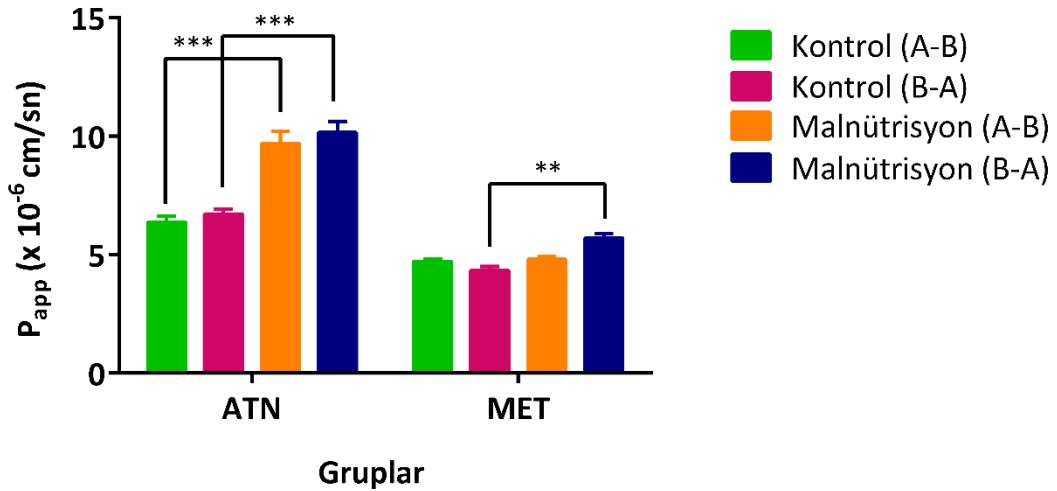
Madde	Sağlıklı			Malnütrisyon		
	A-B ($\times 10^{-6}$ cm/sn)	B-A ($\times 10^{-6}$ cm/sn)	NFO	A-B ($\times 10^{-6}$ cm/sn)	B-A ($\times 10^{-6}$ cm/sn)	NFO
ATN	6,38 $\pm$ 0,25***	6,72 $\pm$ 0,21***	1,05	9,69 $\pm$ 0,53	10,16 $\pm$ 0,47	1,05
MET	4,72 $\pm$ 0,09	4,34 $\pm$ 0,17**	0,92	4,81 $\pm$ 0,14	5,71 $\pm$ 0,18	1,19
MET + ELA	4,81 $\pm$ 0,02	4,36 $\pm$ 0,09	0,91	4,28 $\pm$ 0,07	4,53 $\pm$ 0,08	1,06
MET + KET	4,62 $\pm$ 0,16	5,03 $\pm$ 0,36	1,09	4,80 $\pm$ 0,25	4,66 $\pm$ 0,13	0,97
MET + VER	4,87 $\pm$ 0,09*	4,60 $\pm$ 0,05*	0,94	5,68 $\pm$ 0,05	4,88 $\pm$ 0,07	0,86

NFO: Netflux oranı, malnütrisyon geliştirilen gruba göre anlamlı olarak farklıdır *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$).

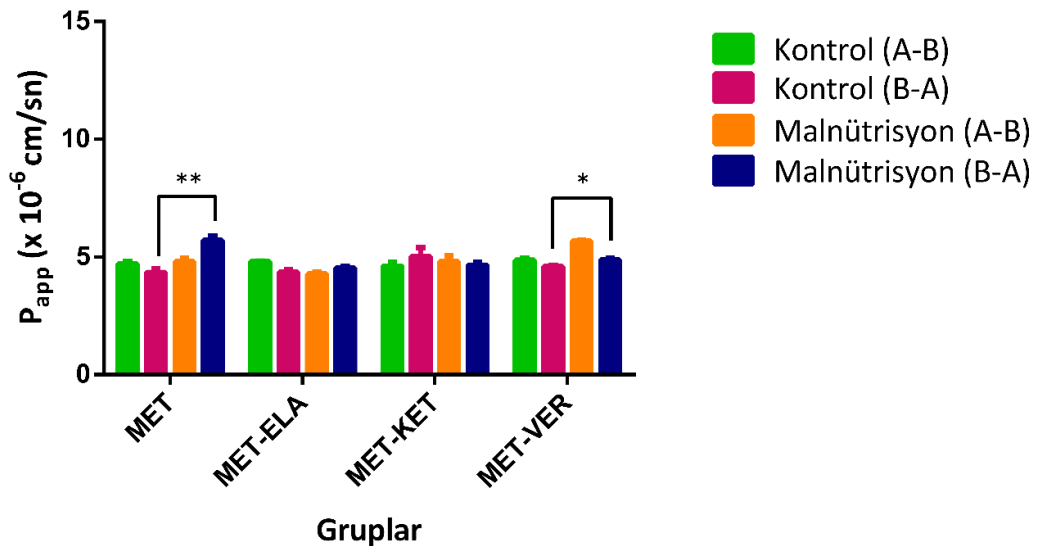
Hem sağlıklı hem de KMAL geliştirilen HCT-8 hücrelerinde yapılan transport çalışmalarından elde edilen sonuçlar ATN'nin bazolateral yöndeki permeabilitesinin (P_{app} B-A) apikal yöndeki permeabilitesinden (P_{app} A-B) biraz daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Malnütrisyon grubunda ATN'nin her iki yöndeki permeabilitesinin sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Ayrıca ATN'nin hem sağlıklı hem de KMAL geliştirilmiş gruplardaki A-B ve B-A yönündeki permeabilite değerleri MET ve inhibitör grupları için tayin edilen permeabilite değerlerine göre daha yüksektir. Ancak MET B-A ve MET+VER A-B ve B-A grupları için bu fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,05$)

MET'in sağlıklı hücrelerdeki ve KMAL geliştirilen hücrelerdeki apikal yöndeki permeabilite değerleri benzer ($4,72 \times 10^{-6}$ cm/sn vs $4,81 \times 10^{-6}$ cm/sn) bulunurken, bazolateral yöndeki permeabilite değerinin KMAL geliştirilen hücrelerde daha yüksek olduğu ($4,34 \times 10^{-6}$ cm/sn vs $5,71 \times 10^{-6}$ cm/sn) bulunmuştur ($p < 0,05$). MET ve inhibitörlerin (ELA, KET ve VER) birlikte uygulanması ile elde edilen apikal ve

bazolateral permeabilite değerleri hem sağlıklı hücrelerde hem de KMAL geliştirilen hücrelerde benzer bulunmuştur. Ayrıca inhibitörler varlığında (ELA, KET ve VER) MET için hesaplanan *netflux* oranları ($P_{app} (B-A) / P_{app} (A-B)$)'nın 2'den küçük olması MET'nin hem sağlıklı hücrelerde hem de KMAL geliştirilmiş hücrelerde P-gp, PMAT ve CYP3A4 substratı olmayabileceğinin bir göstergesi olarak alınmıştır.



Şekil 4.20. Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen HCT-8 hücrelerine ATN ve MET'in uygulanması sonucu elde edilen görünür permeabilite değerleri (ortalama $\pm$ SH, n=4).



Şekil 4.21. Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen HCT-8 hücrelerine MET ve inhibitörlerin uygulanması sonucu elde edilen görünür permeabilite değerleri (ortalama $\pm$ SH, n=4).

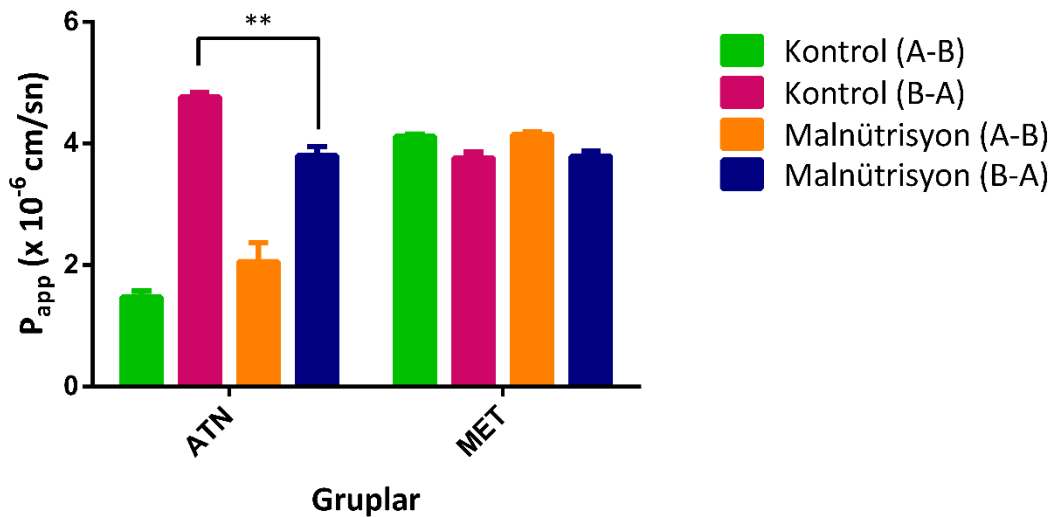
Caco-2 Hücrelerinde Yapılan Çift Yönlü Transport Çalışma Sonuçları

Sağlıklı ve KMAL geliştirilmiş Caco-2 hücrelerinde yapılan çift yönlü transport çalışmalarından elde edilen sonuçlar Tablo 4.20., Şekil 4.22. ve Şekil 4.23.'te özetlenmiştir. LY'nin permeabilitesi tüm gruplarda $< 1 \times 10^{-6}$ olarak bulunduğu için ATN uygulanan insertlerin tamamı deneye dahil edilmiştir (180).

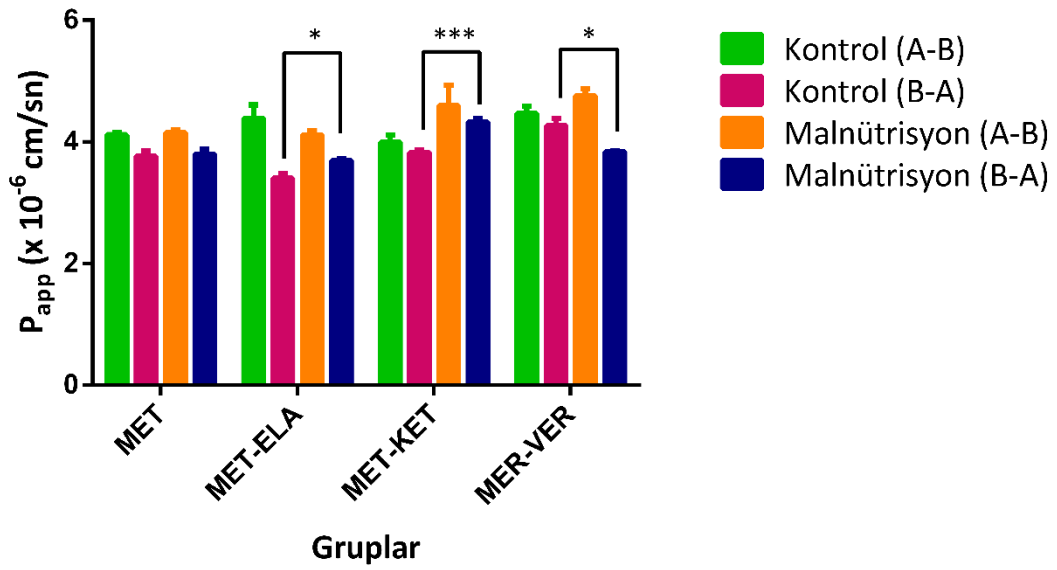
Tablo 4.20. Sağlıklı ve KMAL geliştirilen Caco-2 hücrelerinden elde edilen görünür permeabilite katsayıları (ortalama $\pm$ SH, n=4).

Madde	Sağlıklı			Malnütrisyon		
	A-B ($\times 10^{-6}$ cm/sn)	B-A ($\times 10^{-6}$ cm/sn)	NFO	A-B ($\times 10^{-6}$ cm/sn)	B-A ($\times 10^{-6}$ cm/sn)	NFO
ATN	1,47 $\pm$ 0,10	4,77 $\pm$ 0,08**	3,24	2,06 $\pm$ 0,31	3,81 $\pm$ 0,14	1,86
MET	4,12 $\pm$ 0,04	3,77 $\pm$ 0,09	0,92	4,15 $\pm$ 0,04	3,80 $\pm$ 0,08	0,92
MET + ELA	4,39 $\pm$ 0,22	3,40 $\pm$ 0,08*	0,77	4,11 $\pm$ 0,07	3,69 $\pm$ 0,03	0,90
MET + KET	3,99 $\pm$ 0,12	3,83 $\pm$ 0,04***	0,96	4,60 $\pm$ 0,33	4,33 $\pm$ 0,06	0,94
MET + VER	4,47 $\pm$ 0,12	4,27 $\pm$ 0,12*	0,96	4,76 $\pm$ 0,11	3,84 $\pm$ 0,02	0,81

NFO: Netflux oranı, malnütrisyon geliştirilen gruba göre anlamlı olarak daha düşüktür *(p < 0,05), ** (p < 0,01), *** (p < 0,001).



Şekil 4.22. Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen Caco-2 hücrelerine ATN ve MET'in uygulanması sonucu elde edilen görünür permeabilite değerleri (ortalama $\pm$ SH, n=4).



Şekil 4.23. Sağlıklı ve malnütisyon geliştirilen Caco-2 hücrelerine MET ve inhibitörlerin uygulanması sonucu elde edilen görünür permeabilite değerleri (ortalama $\pm$ SH, n=4).

Sağlıklı Caco-2 hücrelerinde ATN'nin A-B yönündeki permeabilitesi B-A yönündeki permeabilitesinden anlamlı derecede daha düşük olup ($p < 0,05$) netflux oranı 3,24 olarak tayin edilmiştir. Sağlıklı Caco-2 hücrelerinde ATN'nin B-A yönündeki permeabilite değeri, MET'in inhibitörlerle (ELA, KET VER) birlikte uygulandığında tayin edilen B-A permeabilite değerlerinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). KMAL geliştirilen hücrelerde ATN'nin A-B yönündeki permeabilitesi B-A yönündeki permeabilitesinden düşük olmakla birlikte aradaki fark anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.20.).

MET ve inhibitörlerin (ELA, KET ve VER) birlikte uygulanması ile elde edilen apikal ve bazolateral permeabilite değerleri hem sağlıklı hücrelerde hem de KMAL geliştirilen hücrelerde oldukça benzer bulunmuştur. Ayrıca inhibitörler varlığında (ELA, KET ve VER) MET için hesaplanan *netflux* oranlarının 2'den küçük olması MET'in hem sağlıklı hücrelerde hem de KMAL geliştirilmiş hücrelerde P-gp, PMAT ve CYP3A4 substratı olmayabileceğinin bir göstergesi olarak alınmıştır.

Sonuç olarak her iki hücre hattında da hem sağlıklı hem de KMAL geliştirilen hücrelerden elde edilen sonuçlar paraselüler yolla taşınan ATN'nin permeabilite değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir. Hücrelerden transselüler yolla geçen MET için ise elde edilen sonuçlar ise kullanılan hücre hattına bağlı olarak farklılıklar göstermiştir.

4.4. Hayvan Deneyleri

Hayvan deneylerinden önce sıçanlardan kan alınarak, serum albümin ve total kolesterol miktarları belirlenerek sıçanlarda malnütrisyon gelişimi değerlendirilmiştir.

In situ Çalışmalar

In situ çalışmalarda kullanılan sıçanların deney öncesi ölçülen ağırlık, serum albümin ve total kolesterol değerleri Tablo 4.21'de özetlenmiştir.

Tablo 4.21. *In situ* çalışmalarda kullanılan sıçanların ağırlık, serum albümin ve total kolesterol değerleri (ortalama $\pm$ SS; n=4).

Parametre	Sağlıklı	Malnütrisyon
Vücut Ağırlığı (g)	301 $\pm$ 20,49*	253,43 $\pm$ 10,83
Serum Albümin (g/dL)	4,2 $\pm$ 0,2*	3,4 $\pm$ 0,2
Total Kolesterol (mg/dL)	60,29 $\pm$ 13,45	50,86 $\pm$ 4,88

* Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$).

Sağlıklı sıçanların ağırlık ve serum albümin değerleri malnütrisyon geliştirilen gruba göre anlamlı olarak azalırken, total kolesterol değerleri malnütrisyon geliştirilen gruba göre azalmış olsa da bu fark anlamlı bulunmamıştır.

İn vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmalarda kullanılan sıçanların deney öncesi ölçülen ağırlık, serum albümin ve total kolesterol değerleri Tablo 4.22’de özetlenmiştir.

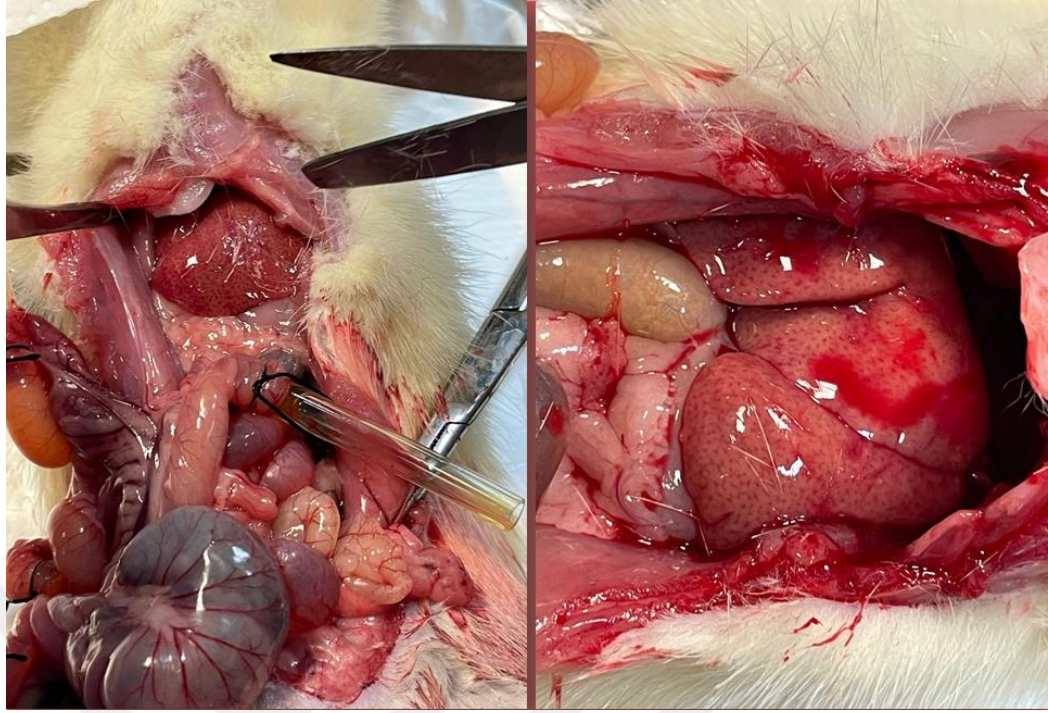
Tablo 4.22. *İn vivo* çalışmalarda kullanılan sıçanların ağırlık, serum albümin ve total kolesterol değerleri (ortalama $\pm$ SS; n=4).

Grup		Vücut Ağırlığı (g)	Serum Albümin (g/dL)	Total Kolesterol (mg/dL)
ATN	Sağlıklı	300 $\pm$ 18,27	4,40 $\pm$ 0,07	78,4 $\pm$ 15,01
	Malnütrisyon	216 $\pm$ 14,99*	3,75 $\pm$ 0,17**	50,3 $\pm$ 8,34**
MET	Sağlıklı	302 $\pm$ 16,47	4,68 $\pm$ 0,13	66,5 $\pm$ 10,01
	Malnütrisyon	233 $\pm$ 14,25**	4,15 $\pm$ 0,15**	49,5 $\pm$ 2,69**
MET-ELA	Sağlıklı	316,00 $\pm$ 13,49	5,00 $\pm$ 0,71	69,67 $\pm$ 12,76
	Malnütrisyon	241,67 $\pm$ 12,50*	4,37 $\pm$ 0,48*	46,67 $\pm$ 0,47*

Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır *(p < 0,05) ve ** (p < 0,001).

Sağlıklı sıçanların ağırlık, serum albümin ve total kolesterol değerleri malnütrisyon geliştirilen gruba göre anlamlı olarak azalmıştır (p < 0,05). Böylece malnütrisyon gelişimi kanıtlanmıştır (225).

Ayrıca, malnütrisyon geliştirilen sıçanların karaciğerlerinin görsel olarak farklılaştığı gözlenmiş olmakla birlikte (Şekil 4.24.) yeterince kesit alınamadığı için histopatolojik inceleme yapılamamıştır.



Şekil 4.24. Malnütrisyon geliştirilen sıçanların karaciğer yapısı.

4.4.1. Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları

- **Perfüzyon Sisteminden Kaynaklanan Gecikme Süresinin Tayini ve Perfüzyon Sistemi ile Etkileşmenin İncelenmesi**

Perfüzyon çözeltisinin bağırsak segmentlerine ulaşma ve bağırsak segmentlerinden numune toplanacak eppendorf tüpüne ulaşma süreleri hesaplanarak dengelenme süresi 30 dk olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle örnek toplamaya 30 dk dengelenme süresinden sonra başlanmıştır.

Bağırsak perfüzyonu çalışmaları sonunda zamanın fonksiyonu olarak toplanan numunelerdeki madde konsantrasyonları hazırlanan standart doğru denklemleri kullanılarak tayin edilmiştir. Tayin edilen konsantrasyon değerleri rezervuardaki madde konsantrasyonuna oranlanarak normalize edilmiş ve bu konsantrasyon değerleri zamana karşı grafiklenerek her bir bağırsak segmentinin (jejunum, ileum ve kolon) lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonu gösteren konsantrasyon zaman profilleri elde edilmiştir. Rezervuardaki model etkin madde

konsantrasyonlarıyla toplanan numunelerdeki konsantrasyonlar karşılaştırılarak perfüzyon sisteminde bulunan plastik ve silikon tüplerle etkileşme olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

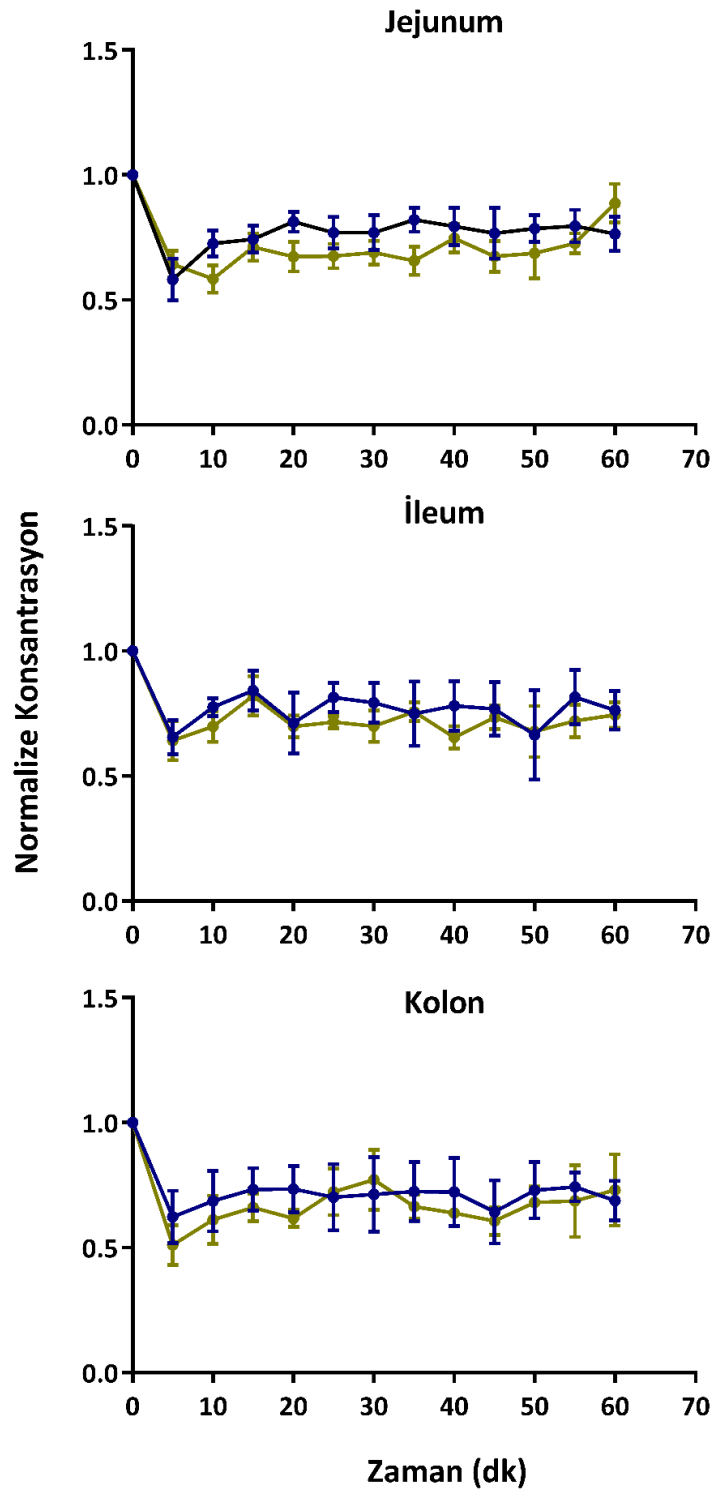
- **Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları**

Perfüzyon çalışmalarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler Tablo 4.23.'te özetlenmiştir.

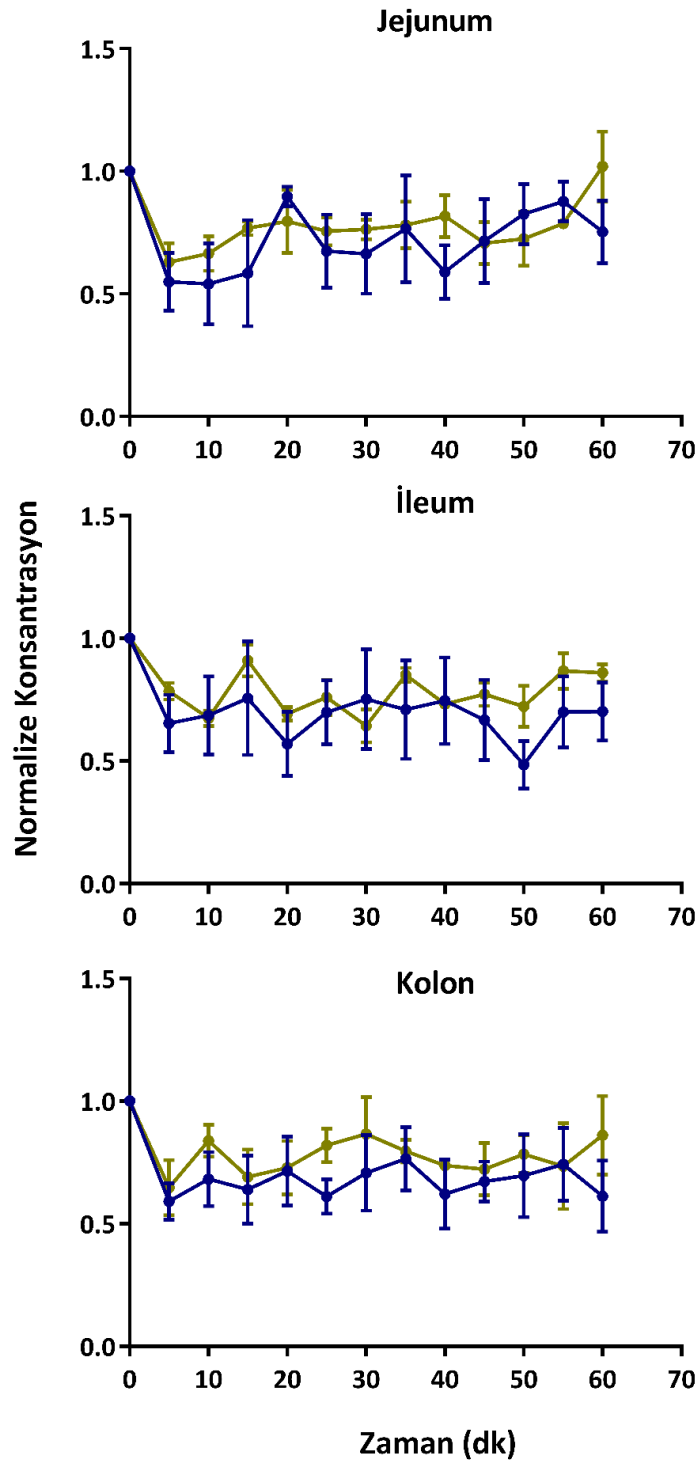
Tablo 4.23. Sağlıklı ve malnütrisyonlu gruplarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler (ortalama $\pm$ SS, n=4).

Gruplar	Sağlıklı	Malnütrisyon
Sıçan Ağırlığı (g)	301 $\pm$ 17,37	224,5 $\pm$ 14,62
Akış Hızı (mL/dak)	0,2	0,2
Segment Uzunlukları (cm)		
Jejunum	8,57 $\pm$ 2,09	8,21 $\pm$ 1,28
İleum	3,88 $\pm$ 0,89	3,63 $\pm$ 0,65
Kolon	1,63 $\pm$ 0,22	2,63 $\pm$ 0,41

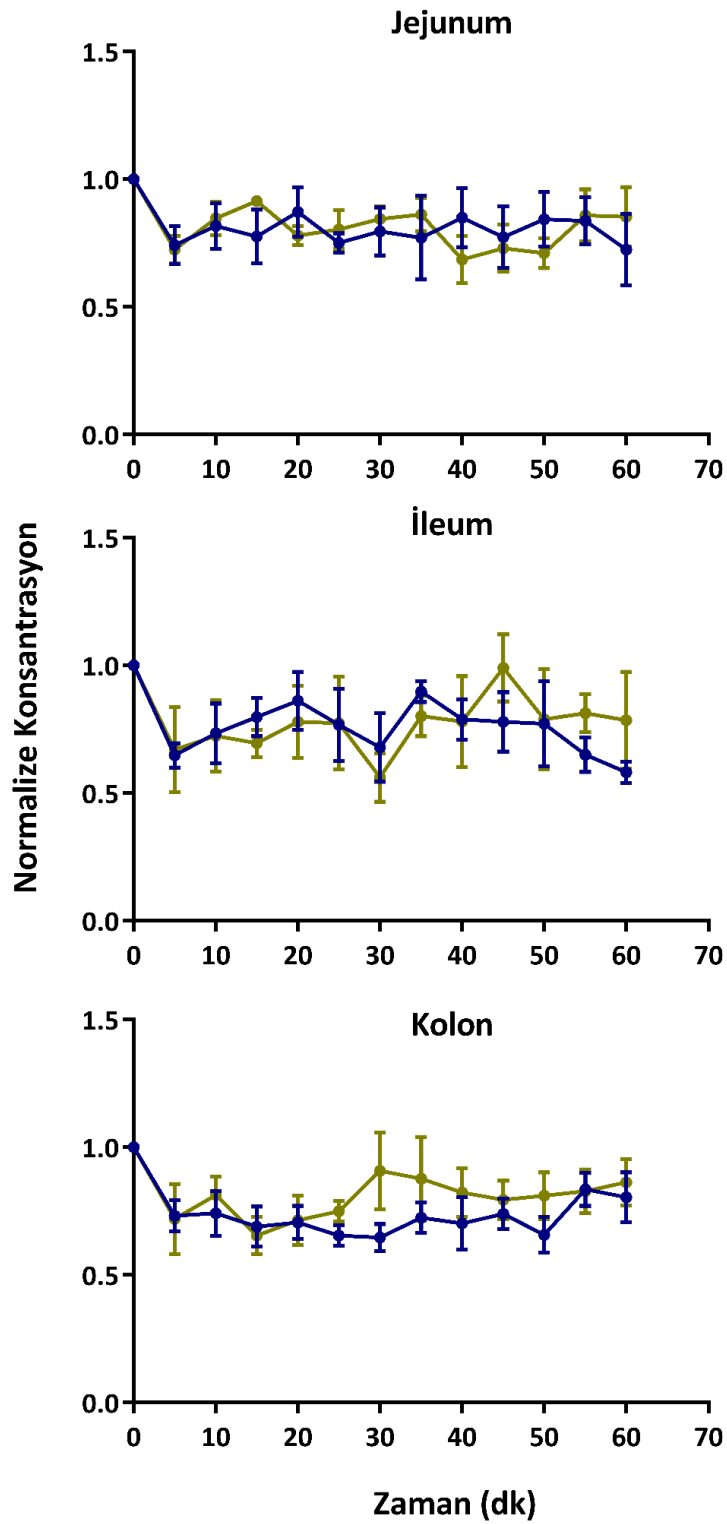
In situ bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen numunelerin analizi sonucu elde edilen konsantrasyon değerlerinin FK'ye göre normalize edilmesiyle elde edilen profiller Şekil 4.25- 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.25. *In situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarında ATN uygulanan segmentlerden (jejunum, ileum, kolon) elde edilen ilaç konsantrasyonunun FK'ye göre normalize edilmiş değerleri. Mavi çizgiler sağlıklı yeşil çizgiler ise malnütrisyon geliştirilen sıçanların sonuçlarını göstermektedir (ortalama $\pm$ SS; n=4).



Şekil 4.26. *In situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarında MET uygulanan segmentlerden (jejunum, ileum, kolon) elde edilen ilaç konsantrasyonunun FK'ye göre normalize edilmiş değerleri. Mavi çizgiler sağlıklı yeşil çizgiler ise malnütrisyon geliştirilen sıçanların sonuçlarını göstermektedir (ortalama $\pm$ SS; n=4).



Şekil 4.27. *İn situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarında MET ve ELA uygulanan segmentlerden (jejunum, ileum, kolon) elde edilen ilaç konsantrasyonunun FK'ye göre normalize edilmiş değerleri. Mavi çizgiler sağlıklı yeşil çizgiler ise malnütrisyon geliştirilen sıçanların sonuçlarını göstermektedir (ortalama $\pm$ SS; n=4).

- **Sağlıklı ve Malnütrisyon Geliştirilen Grupların Permeabilite Değerleri**

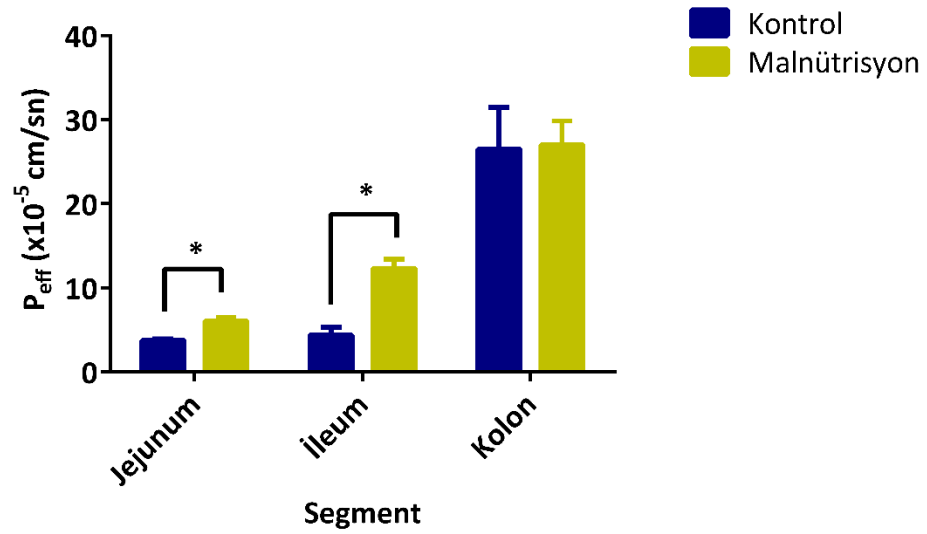
ATN ve MET için sağlıklı ve malnütrisyonlu gruplarda hesaplanan permeabilite değerleri Tablo 4.24., Şekil 4.28.- 4.30.'da özetlenmektedir.

Tablo 4.24. ATN ve MET için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).

Bağırsak Segmenti	P_{eff} ($\times 10^{-5}$ cm/sn)					
	Sağlıklı			Malnütrisyon		
	ATN	MET	MET-ELA	ATN	MET	MET-ELA
Jejunum	3,74 $\pm$ 0,19*	4,35 $\pm$ 0,69	3,95 $\pm$ 0,65	6,07 $\pm$ 0,39	3,95 $\pm$ 0,63	4,68 $\pm$ 0,89
İleum	4,39 $\pm$ 0,90*	12,08 $\pm$ 0,79	12,10 $\pm$ 1,88	12,30 $\pm$ 1,12	12,60 $\pm$ 1,37	18,03 $\pm$ 2,63
Kolon	26,53 $\pm$ 4,92	28,74 $\pm$ 3,53*	28,02 $\pm$ 4,08*	26,98 $\pm$ 2,88	13,15 $\pm$ 1,62	13,23 $\pm$ 1,62

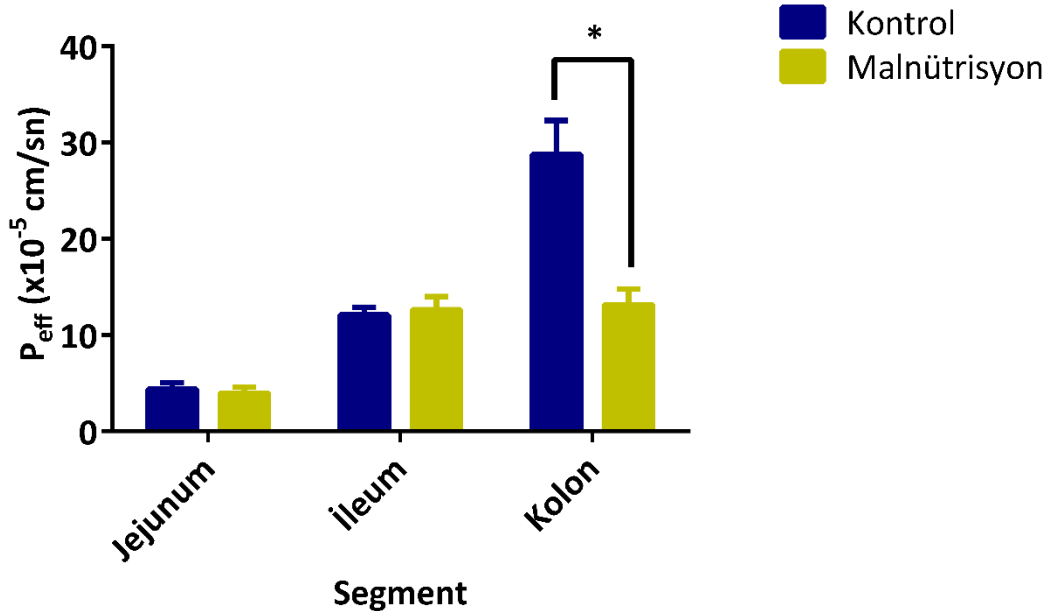
*Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilmiş sıçan grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Hem sağlıklı hem de malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda ATN'nin permeabilitesinin jejunumdan kolona doğru arttığı (jejunum < ileum < kolon) tespit edilmiştir. Malnütrisyon geliştirilen sıçanların jejunum ve ileumlarından ATN permeabilitesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sağlıklı sıçanlardan daha fazladır ($p < 0,05$). Ancak ATN'nin kolondan permeabilitesi her iki grup için de diğer segmentlere göre daha yüksek bulunmakla beraber sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.



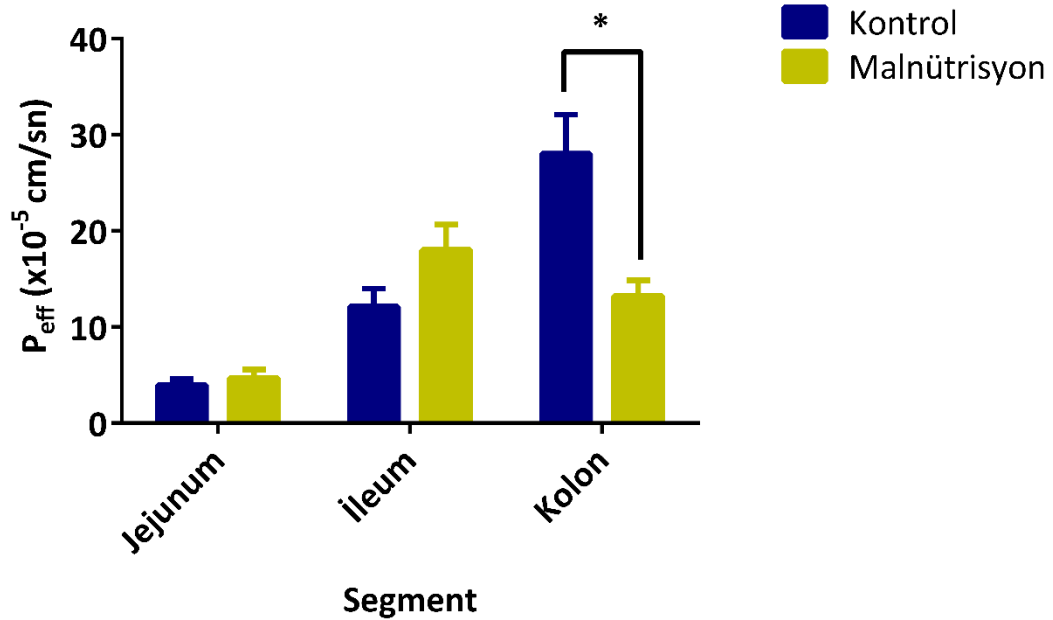
Şekil 4.28. ATN için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).

Hem sağlıklı hem de malnütisyon geliştirilen sıçanlarda MET'in permeabilitesinin jejunumdan kolona doğru arttığı (jejunum < ileum < kolon) tespit edilmiştir. MET'in sağlıklı sıçanların perfüze edilen segmentlerinden (jejunum, ileum ve kolon) permeabilitesinin malnütisyon grubuna göre daha yüksek olduğu ancak bu farkın sadece kolonda istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.29. MET için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).

Perfüzyon ortamına P-gp inhibitörü ELA ilave edildiğinde MET'in permeabilitesinin sağlıklı sıçanlarda jejunumdan kolona doğru arttığı (jejunum < ileum < kolon) ve bu permeabilite değerlerinin ELA içermeyen gruplarla oldukça benzer olduğu tespit edilmiştir. Malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda MET permeabilitesinin ELA varlığında en düşük jejunumda en yüksek ileumda olduğu bulunmuştur (jejunum < kolon < ileum). ELA'nın uygulanıldığı gruplardan tayin edilen MET'in permeabilite değerleri karşılaştırıldığında sadece kolondan permeabilitesinin sağlıklı sıçanlarda malnütrisyon geliştirilenlere göre anlamlı derecede daha yüksek ($p < 0,05$) olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.30. ELA ile uygulanan MET için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; $n=4$).

Sonuç olarak bağırsaktan paraselüler yolla absorbe olan model etkin madde ATN'nin malnütrisyonu bağlı olarak permeabilitesi artmıştır. Elde edilen sonuçlar malnütrisyonunda hücreler arası sıkı kavşakların (*tight junctions*) gevşemesine bağlı olarak paraselüler yolla geçiş yapan ilaçların permeabilitelerinin artabileceği düşüncesini desteklemektedir (8, 226).

Bağırsaktan transselüler yolla absorbe olan model etkin madde MET'in malnütrisyonu bağı olarak permeabilitesi jejunum ve ileumda değişmezken, kolonda anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). ATN ve MET'in absorpsiyon hız sabitleri (k_a) Tablo 4.25'te yer almaktadır.



Tablo 4.25. ATN ve MET için tayin edilen k_a değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).

Bağırsak Segmenti	k_a (dk ⁻¹)					
	Sağlıklı			Malnütrisyon		
	ATN	MET	MET-ELA	ATN	MET	MET-ELA
Jejunum	0,0243 $\pm$ 0,0013*	0,0253 $\pm$ 0,0038	0,0459 $\pm$ 0,0048	0,0365 $\pm$ 0,0023	0,0240 $\pm$ 0,0037	0,0372 $\pm$ 0,0066
İleum	0,0255 $\pm$ 0,0060*	0,0702 $\pm$ 0,0039	0,0756 $\pm$ 0,0088	0,0738 $\pm$ 0,0062	0,0813 $\pm$ 0,0114	0,1095 $\pm$ 0,0129
Kolon	0,1407 $\pm$ 0,0267	0,1531 $\pm$ 0,0188*	0,1608 $\pm$ 0,0174*	0,1406 $\pm$ 0,0140	0,0674 $\pm$ 0,0104	0,0840 $\pm$ 0,0174

*Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilmiş sıçan grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p < 0,05).

Hem ATN hem de MET için tayin edilen k_a değerleri permeabilite değerleriyle paralellik göstermektedir. Sağlıklı sıçanlarda ATN, MET ve MET-ELA gruplarında k_a değerleri jejunumdan kolona doğru artmıştır (jejunum < ileum < kolon). Malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda ATN grubunda k_a değerleri jejunumdan kolona doğru artarken, MET ve MET-ELA gruplarında ise en düşük k_a değerleri jejunumda en yüksek k_a değeri ileumdan (jejunum < kolon < ileum) tayin edilmiştir.

Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda hesaplanan net su akış değerleri Tablo 4.26'da verilmiştir.

Tablo 4.26. Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda hesaplanan net su akış değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).

Bağırsak Segmenti	Net Su Akışı ($\times 10^{-4}$ mL/sn/cm)			
	Sağlıklı		Malnütrisyon	
	ATN/MET	MET-ELA	ATN/MET	MET-ELA
Jejunum	0,68 $\pm$ 0,15	0,34 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,16	0,53 $\pm$ 0,10
İleum	0,94 $\pm$ 0,14	0,51 $\pm$ 0,18	1,00 $\pm$ 0,19	1,66 $\pm$ 0,39
Kolon	4,37 $\pm$ 0,58	2,96 $\pm$ 0,43	2,75 $\pm$ 0,35	1,25 $\pm$ 0,37

Elde edilen değerler tüm gruplar için pozitif bulunmuş ve mukozal bölgeye sıvı girişi (sekresyon) olduğunu sonucuna ulaşılmıştır.

- **İnsan İçin Tahmin Edilen Absorpsiyon ve Permeabilite Değerleri**

ATN ve MET için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri ve P_{eff} değerleri sırası ile Tablo 4.27. ve 4.28.'de verilmiştir.

Tablo 4.27. ATN ve MET için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% f_a) (ortalama $\pm$ SH; n=4).

Bağırsak Segmenti	f_a (%)					
	Sağlıklı			Malnütrisyon		
	ATN	MET	MET-ELA	ATN	MET	MET-ELA
Jejunum	0,13 $\pm$ 0,01**	0,15 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,03
İleum	0,15 $\pm$ 0,03**	0,42 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,09
Kolon	0,91 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,12*	1,04 $\pm$ 0,12*	0,96 $\pm$ 0,10	0,46 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,05

Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilmiş sıçan grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır * (p < 0,05), ** (p < 0,01).

Tablo 4.28. ATN ve MET için tahmin edilen insan P_{eff} değerleri (ortalama $\pm$ SH; n=4).

Bağırsak Segmenti	P_{eff} ($\times 10^{-5}$ cm/sn)					
	Sağlıklı			Malnütrisyon		
	ATN	MET	MET-ELA	ATN	MET	MET-ELA
Jejunum	13,75 $\pm$ 0,69*	15,97 $\pm$ 2,49	15,69 $\pm$ 2,10	22,14 $\pm$ 1,41	14,51 $\pm$ 2,26	18,56 $\pm$ 3,01
İleum	16,12 $\pm$ 3,25*	43,78 $\pm$ 2,85	47,49 $\pm$ 5,95	44,58 $\pm$ 4,05	45,67 $\pm$ 4,94	70,63 $\pm$ 9,47
Kolon	95,83 $\pm$ 17,70	103,76 $\pm$ 12,72*	109,59 $\pm$ 12,56*	100,38 $\pm$ 10,85	47,65 $\pm$ 5,82	47,16 $\pm$ 5,29

* Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilmiş sıçan grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p < 0,05).

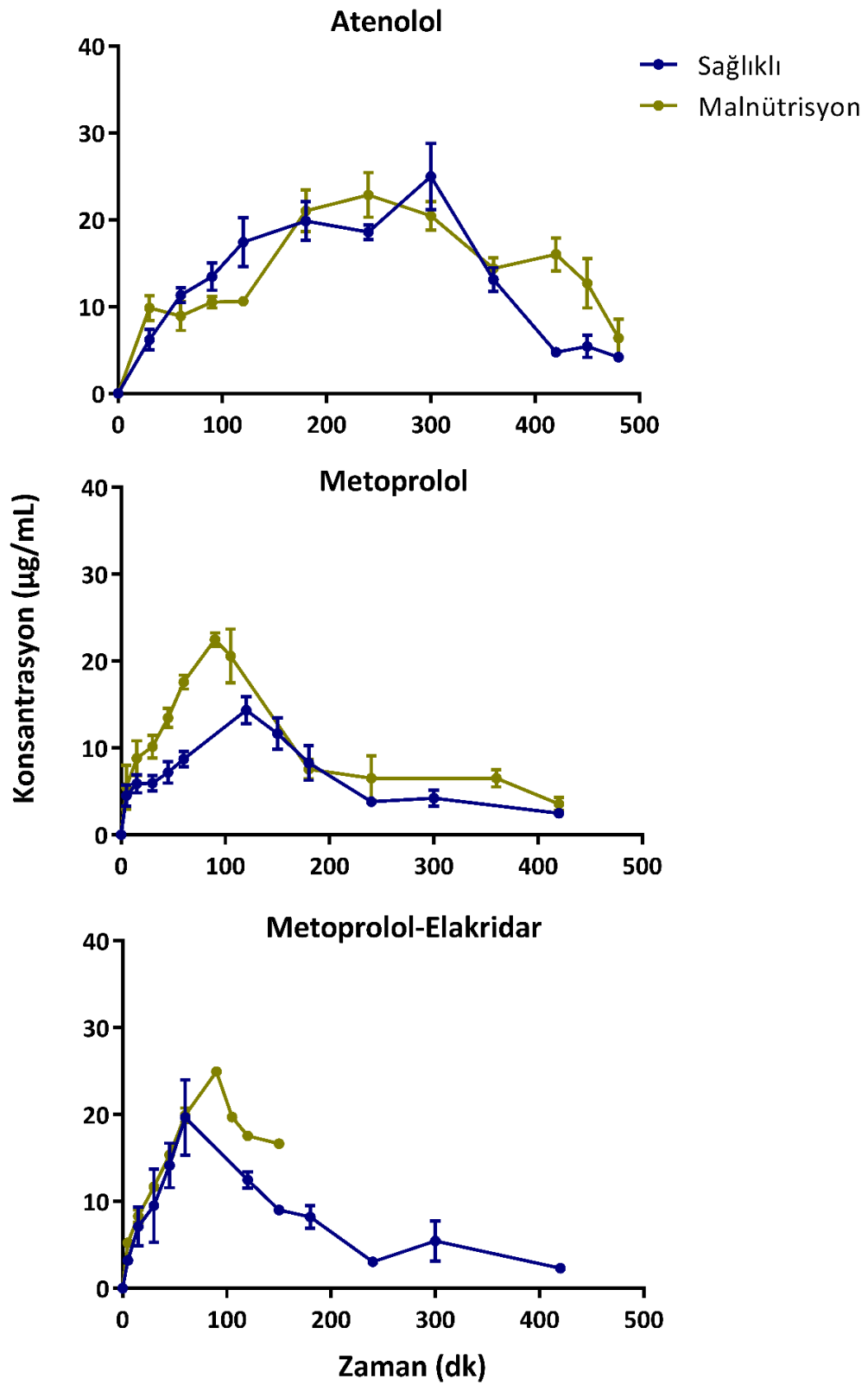
4.4.2. *İn vivo* Çalışmalar

- **Pilot Çalışmalar**

İn vivo çalışmalarda ne kadar sıklıkta örnek alınacağını ve analizler için uygun dozu belirlemek için yapılan pilot çalışmalar sonucunda ATN 250 mg/kg, MET 400 mg/kg ve ELA 5 mg/kg dozda uygulanmıştır (199, 227-229). Kan örneklerinin toplanma sıklığı arttırılarak, toplanan kan hacmi azaltılmıştır. Böylece elde edilen kan örneklerindeki ilaç konsantrasyonları için farmakokinetik profil doğru şekilde değerlendirilebilecektir. Pilot çalışmalarda kullanılan sıçanların sayısının artmasından dolayı, *in vivo* çalışma gruplarında kullanılacak sıçan sayısı azaltılmıştır.

- **Sağlıklı ve Malnütrisyon Geliştirilen Sıçanlarda *İn vivo* Çalışmalar**

Yapılan *in vivo* çalışmalar için elde edilen plazma numunelerinin HPLC ile analiz edilmesi sonucu ilaç plazma konsantrasyonu-zaman (Şekil 4.31.) profili elde edilmiştir. ATN ve MET'nin vazodilatasyon etkisine bağlı olarak bazı zaman noktalarından kan örneği alınamamıştır.



Şekil 4.31. Sıçanlara oral yolla ATN, MET ve MET+ELA uygulanmasıyla elde edilen plazma konsantrasyon-zaman profilleri (ortalama $\pm$ SS, n=4).

in vivo çalışmalar sonucunda elde edilen plazma konsantrasyon-zaman profilleri modelden bağımsız yöntem ve farmakokinetik modeller geliştirilerek değerlendirilmiştir.

4.5. Modelden Bağımsız Yöntem

Modelden bağımsız yöntem kullanılarak yapılan analizlerin sonuçları Tablo 4.29.'da verilmiştir.

Tablo 4.29. ATN ve MET için modelden bağımsız yöntem ile tayin edilen farmakokinetik parametreler (ortalama $\pm$ SS; n=4).

Parametre	ATN		MET	
	Sağlıklı	Malnütrisyon	Sağlıklı	Malnütrisyon
$AUC_{(0-\infty)}$ ($\mu\text{g.dk/mL}$)	7318 $\pm$ 40	7951 $\pm$ 950	3094 $\pm$ 446*	5584 $\pm$ 1503
$AUC_{(0-t)}$ ($\mu\text{g.dk/mL}$)	5684 $\pm$ 2465	7241 $\pm$ 498	2364 $\pm$ 570*	3969 $\pm$ 498
CL/F (mL/dk/kg)	34,16 $\pm$ 0,19	31,74 $\pm$ 3,73	102,4 $\pm$ 15,6*	58,7 $\pm$ 13,9
C_{maks} ($\mu\text{g/mL}$)	24,02 $\pm$ 4,91	23,46 $\pm$ 2,41	14,34 $\pm$ 1,78*	23,04 $\pm$ 1,55
k_{el} (dk^{-1})	0,0096 $\pm$ 0,0022	0,017 $\pm$ 0,013	0,0067 $\pm$ 0,0011	0,0038 $\pm$ 0,0019
t_{last} (dk)	390 $\pm$ 140	480 $\pm$ 0	300 $\pm$ 98*	420 $\pm$ 0
t_{maks} (dk)	240 $\pm$ 69	240 $\pm$ 49	120 $\pm$ 0*	93,8 $\pm$ 7,5
V_d/F (mL/kg)	3662 $\pm$ 870	2945 $\pm$ 2242	15345 $\pm$ 993	20408 $\pm$ 12826

*Malnütrisyonlu grup ile istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p \leq 0,05$).

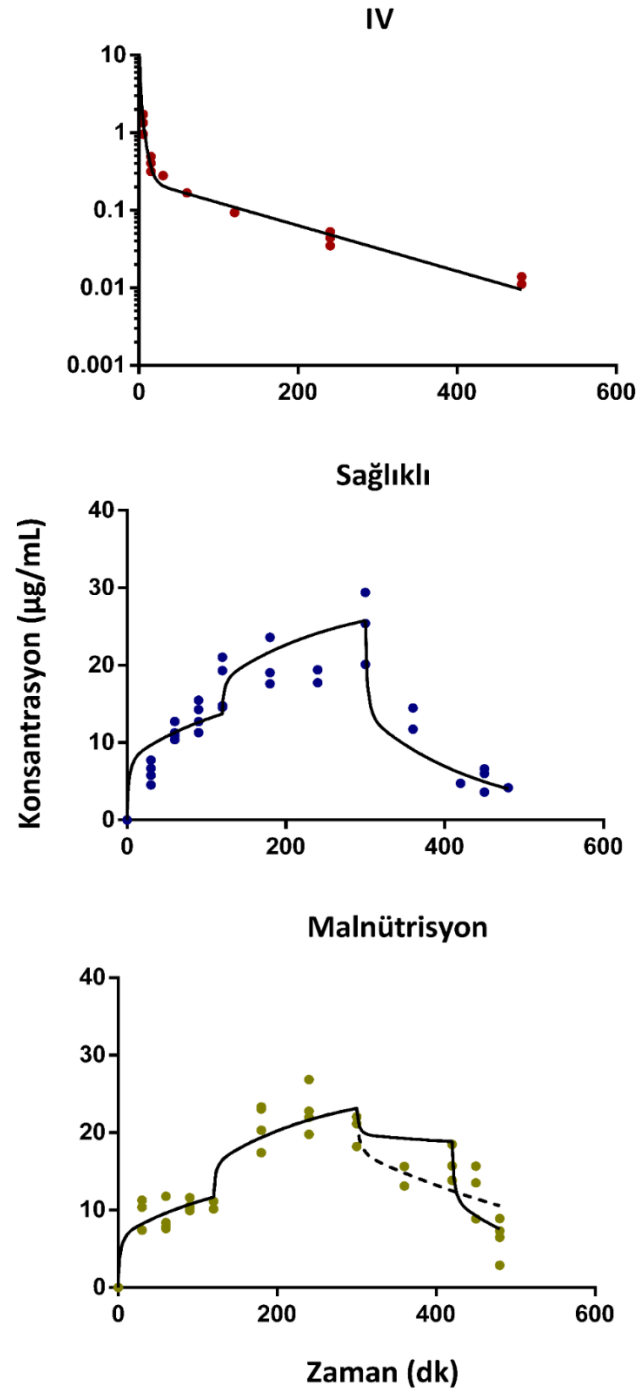
ATN için elde edilen farmakokinetik parametrelerin sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). MET için elde edilen $AUC_{(0-\infty)}$, $AUC_{(0-t)}$, C_{maks} , ve t_{last} değerleri malnütrisyon geliştirilen grupta sağlıklı gruba göre anlamlı olarak artarken, CL/F ve t_{maks} değerleri anlamlı olarak azalmıştır ($p \leq 0,05$).

MET ve ELA uygulanan malnütrisyon geliştirilmiş sıçanlarda MET'in eliminasyon fazındaki noktalarda sıçanlardan yeterince kan toplanamadığı için profilin eliminasyon kısmı tamamlanamamıştır. $AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$ oranı %20.90 ($< \%75-80$) olduğu için plazma MET konsantrasyonu-zaman eğrisinin profili doğru şekilde tanımlayamayacağı sonucuna ulaşılmıştır (230). Bu nedenle MET-ELA grubundan elde edilen sonuçlar modelden bağımsız yöntem ve modelleme çalışmalarında kullanılmamıştır.

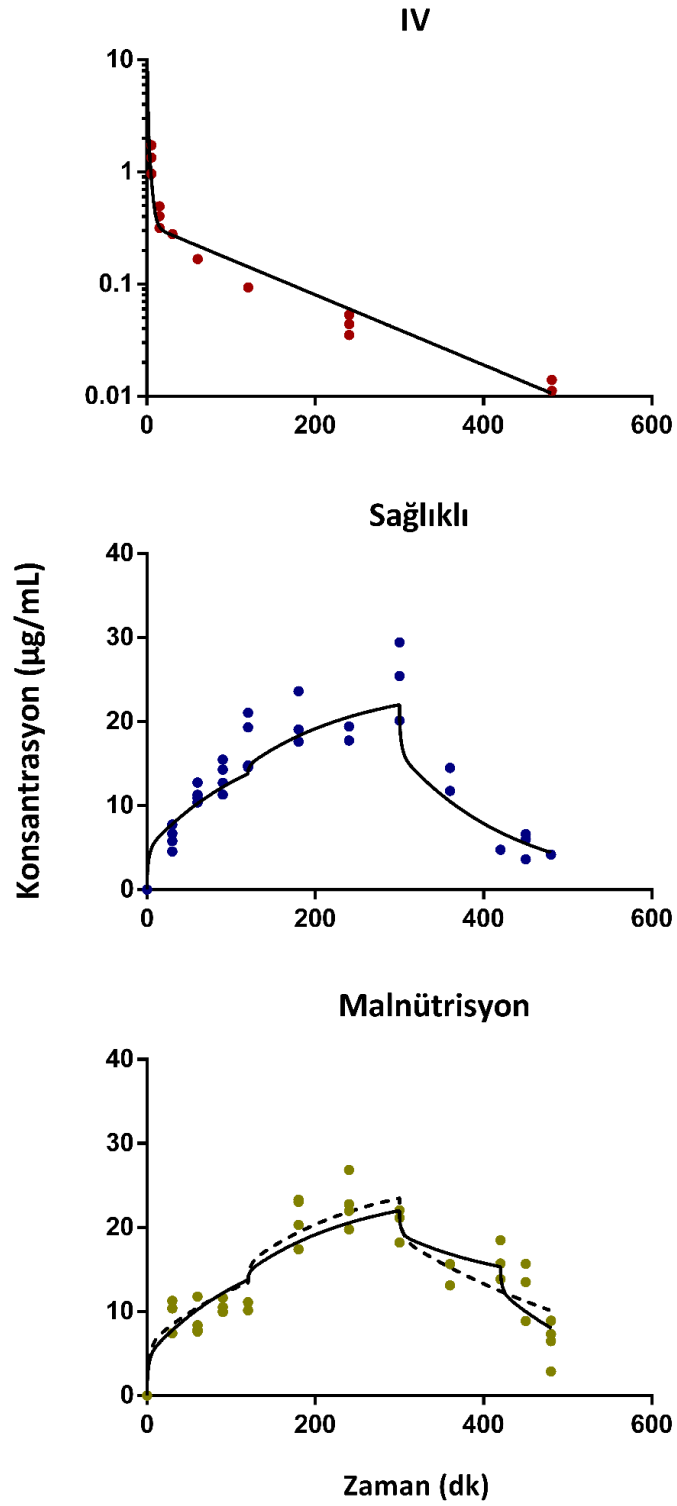
4.6. Minimal Fizyolojik Esaslı Farmakokinetik Modelleme

Literatürden elde edilen ATN IV uygulamasından sonra hızlı bir başlangıç düşüş fazı ve bunu izleyen uzun bir doğrusal terminal faz sergilemiştir. Sağlıklı ve malnütrisyonlu gruplarda oral dozun ardından, ilk zaman noktasında ilaç konsantrasyonunda hızlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, 120 dk sonra absorpsiyon oranı artmıştır. Plazma konsantrasyonları iki belirgin fazda yükselerek sağlıklı için $25,0 \pm 3,82 \mu\text{g/mL}$ ve malnütrisyonlu gruplar için $22,8 \pm 2,56 \mu\text{g/mL}$ 'lik benzer bir C_{maks} değerine 240-300 dk'da ulaşmıştır. Plazma ilaç konsantrasyonları sağlıklı grupta t_{maks} 'tan sonra IV profiline benzer hızlı bir düşüş gösterirken, malnütrisyonlu grupta farklı bir yavaş düşüş göstermiştir. Profillerdeki bu değişiklikler ve ön dekonvolüsyon analizi sonucu ATN'nin 2 veya 3 absorpsiyon fazına sahip olduğu varsayılmıştır.

ATN'nin popülasyonu ve IV ve oral (sağlıklı ve malnütrisyon) verilerin ADAPT 5 kullanılarak birlikte uyumları Şekil 4.32. ve 4.33.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.32. ATN'nin plazma konsantrasyon- zaman profilinin popülasyon uyumları. Semboller gözlemleri, çizgiler ise popülasyon uyumlarını göstermektedir. Kesikli çizgi k_{03} olmadan popülasyon uyumu göstermektedir.



Şekil 4.33. mPBPK modeli kullanılarak IV ve oral dozlar için ATN'nin plazma konsantrasyonunun ortak uyumunu göstermektedir. Semboller gözlemleri, çizgiler ise mPBPK modeliyle uyumunu göstermektedir. Kesikli çizgi k_{03} olmadan uyumu göstermektedir.

ATN'nin PopPK parametre kestirimleri Tablo 4.30. ve 4.31'de özetlenmiştir.

Tablo 4.30. Atenolol için kestirilen popülasyon farmakokinetik parametreleri.

Parametre	Tanım	Kestirim	Linearizasyon	
			SH	BSH (%)
Sabit Etki				
f_{d1}^a	Doku 1 için fraksiyonel dağılım parametresi	0,134	0,016	11,9
K_{p1}^b	Doku 1 için doku:plazma partiyon katsayısı	1,43	0,0973	6,81
CL (mL/dk/kg)	Toplam klerens	16,04	1,28	8,00
$k_{01} S$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırıncı derece absorpsiyon sabiti 1 (t = 0-120 dk)	1,19	0,0758	6,38
$k_{01} M$ (mg/dk/kg)		1,012*	0,0633	6,26
$k_{02} S$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırıncı derece absorpsiyon sabiti 2 (t = 120-300 dk)	1,86**	0,138	7,41
$k_{02} M$ (mg/dk/kg)		1,68	0,134	7,99
$k_{03} S^c$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırıncı derece absorpsiyon sabiti 3 (t = 300-360 dk)	0		
$k_{03} M$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırıncı derece absorpsiyon sabiti 3 (t = 300-420 dk)	1,16	0,147	12,6
V_{ss} (L/kg) ^d	Kararlı durumdaki dağılım hacmi	1,41		
F S ^e	Görünür mutlak biyoyararlanım	0,426		
F M ^e		0,673		
Rastgele Etkilerin Standart Sapması				
		Kestirim (VK%)		
ω CL	CL'nin rastgele etkisi	0,124 (12,5)	0.0589	47.4
Hata Modeli Parametreleri				
b IV	Orantılı hata terimi	0,154	0,0328	21,3
b S		0,256	0,03204	12,5
b M		0,234	0,0272	11,6

^a $f_{d1} = f_{d2}$, ^b $K_{p1} = K_{p2}$, ^c GoF'a göre 0 olarak varsayılmıştır, ^d $V_{ss} = (V_b + V_1 \cdot K_{p1} + V_2 \cdot K_{p2} + V_3 \cdot K_{p3}) / \text{vücut ağırlığı}$;

^e $F = (AUC_{PO} \cdot Doz_{IV}) / (AUC_{IV} \cdot Doz_{PO})$, BSH, bağıl standart hata, M: malnütrisyonlu grup, S: sağlıklı grup, SH: kestirilen standart hata, * $k_{02} S$ ve $k_{02} M$ 'ye göre anlamlı olarak düşük ($p < 0,05$), ** $k_{03} M$ 'den anlamlı olarak yüksek ($p < 0,05$).

ATN uygulanan sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanların popülasyon analizleri sonucu elde edilen plazma konsantrasyon-zaman profillerinin AUC'leri sırası ile 6750,443 $\mu\text{g}\cdot\text{dk}/\text{mL}$ ve 7655,095 $\mu\text{g}\cdot\text{dk}/\text{mL}$ 'dir.

Tablo 4.31. Naif havuzlama ile elde edilen ATN ortak uyumlu model için kestirimi yapılan farmakokinetik parametreler.

Parametre	Tanım	Kestirim (%VK)
k_{01} (mg/dk/kg)	Görünür sıfırinci derece absorpsiyon sabiti 1 ($t = 0-120$ dk)	1,32 (8,83)
k_{02} (mg/dk/kg)	Görünür sıfırinci derece absorpsiyon sabiti 2 ($t = 120-300$ dk)	1,61* (9,51)
$k_{03} S^a$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırinci derece absorpsiyon sabiti 3 ($t = 300-360$ dk)	0
$k_{03} M$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırinci derece absorpsiyon sabiti 3 ($t = 300-420$ dk)	0,817 (19,3)
f_{d1}^b	Doku 1 için fraksiyonel dağılım parametresi	0,312 (18,2)
K_{p1}^c	Doku 1 için doku:plazma partisyon katsayısı	1,79 (9,68)
CL (mL/dk/kg)	Toplam klerens	16,3 (6,68)
V_{ss}^d (L/kg)	Kararlı durumdaki dağılım hacmi	1,75 (9,25)
σ_{slope}	Varyans parametresi	0,284 (8,37)
F S ^e	Görünür mutlak biyoyararlanım	0,390
F M ^e		0,631

^a 0 olduğu varsayılmıştır, ^b $f_{d1} = f_{d2}$, ^c $K_{p1} = K_{p2}$, ^d $V_{ss} = (V_b + V_1 \cdot K_{p1} + V_2 \cdot K_{p2} + V_3 \cdot K_{p3}) / \text{vücut ağırlığı}$ ikincil parametre olarak hesaplanmıştır, ^e $F = (AUC_{PO} \cdot Doz_{IV}) / (AUC_{IV} \cdot Doz_{PO})$, M: malnütrisyonlu grup, S: sağlıklı grup, * $k_{03} M'$ den anlamlı olarak yüksek ($p < 0,05$).

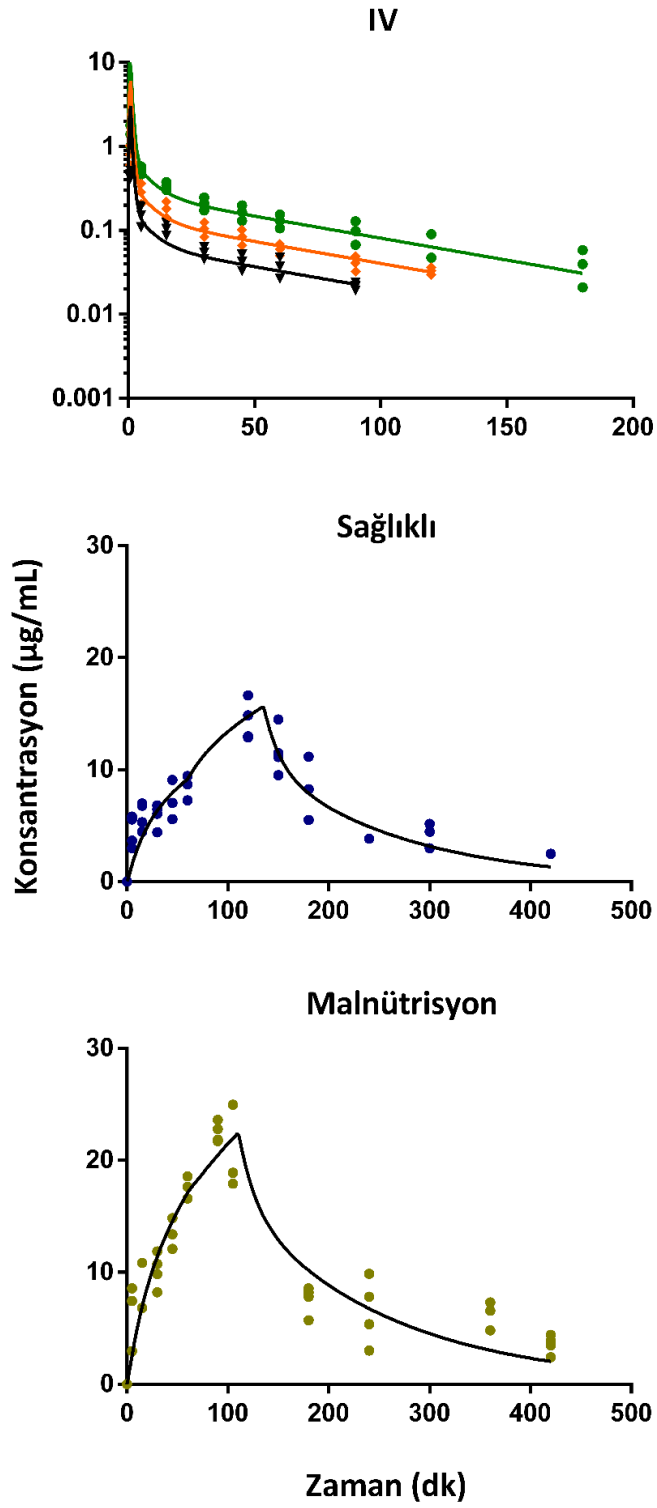
ATN uygulanan sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanların naif havuzlama ile profillerin ortak uyumları sonucu elde edilen plazma konsantrasyon-zaman profillerinin AUC'leri sırası ile 6279,52 $\mu\text{g}\cdot\text{dk}/\text{mL}$ ve 7289,91 $\mu\text{g}\cdot\text{dk}/\text{mL}$ 'dir.

Uyum ile ilgili parametreler (f_{d1} , K_{p1} ve CL) tüm gruplarda paylaşılmıştır. f_{d1} ve f_{d2} 'nin eşit olduğu varsayılmış ve çok küçük (0,134) bulunmuştur; bu sonuç ATN'nin permeabilite sınırlı dağılım ile tutarlıdır. PopPK'de k_{01} ve k_{02} ayrı ayrı değerlendirilmiş, sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen gruplar arasında önemli bir fark olmadığı bulunmuştur. Bu nedenle k_{01} ve k_{02} parametreleri paylaşılmıştır. Görsel incelemeye göre t_{maks} hem kontrol hem de malnütrisyonlu gruplar için 300 dk'ya sabitlenmiştir. İlk absorpsiyon fazının süresi (t_1) dekonvolüsyon ve deneme-yanılma ile belirlenmiş

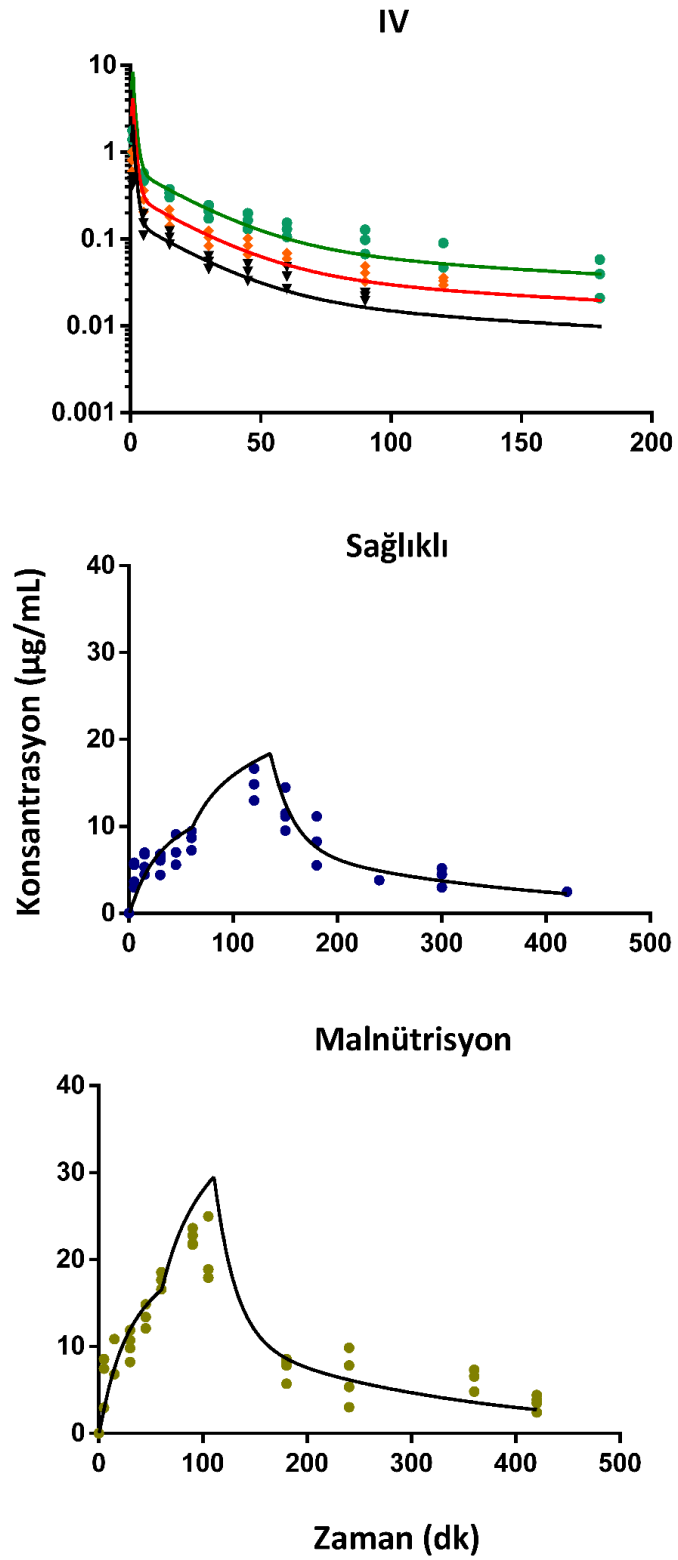
ve ardından her iki grup için 120 dk'ya sabitlenmiştir. Sağlıklı ve malnütrisyonlu gruplar arasındaki farkın üçüncü absorpsiyon fazından (k_{03}) kaynaklandığı düşünülmüştür.

MET ayrıca IV uygulamada iki fazlı (*biexponential*) kinetik sergilemiştir. Üç IV doz seviyesi için farmakokinetik veriler doğrusallık göstermiştir. Oral uygulamadan sonra MET, her iki grup için başlangıç zaman noktalarında ilaç konsantrasyonunda hızlı bir artış göstermiştir. Absorpsiyon oranı sağlıklı grup için 60 dk'dan sonra artarken, malnütrisyon geliştirilen grup için tüm absorpsiyon fazı boyunca benzer olduğu görülmüştür. T_{maks} 'tan sonra ilaç konsantrasyonu her iki grup için de benzer şekilde azalmıştır. 100-120 dk'daki C_{maks} , sağlıklı grupta $14,3 \pm 1,54 \mu\text{g/mL}$ ve malnütrisyonlu grupta $20,6 \pm 3,12 \mu\text{g/mL}$ 'dir. Oral profillerde IV eğrilere öre daha yavaş bir düşüş fazı gözlenmiştir.

MET'in Monolix ile analiz edilen popülasyon uyumları ve ADAPT ile analiz edilen IV ve oral (sağlıklı ve malnütrisyon) verilerin birlikte uyumları Şekil 4.34. ve 4.35.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.34. MET'in plazma konsantrasyonunun zamana göre profilinin popülasyon uyumları. Semboller gözlemleri, çizgiler ise popülasyon uyumunu göstermektedir.



Şekil 4.35. mPBPK modeli kullanılarak IV ve oral dozlar için MET'in plazma konsantrasyonunun ortak uyumu. Semboller gözlemleri çizgiler ise mPBPK modeliyle uyumu göstermektedir.

Popülasyon ve ortak uyum ile elde edilen MET'in son parametre tahminleri Tablo 4.32. ve 4.33.'te özetlenmiştir.

Tablo 4.32. Metoprolol için kestirilen popülasyon farmakokinetik parametreleri.

Parametre	Tanım	Kestirim	Linearizasyon		
			SH	BSH (%)	
Sabit Etki					
f_{d1}^a	Doku 1 için fraksiyonel dağılım parametresi	0,464	0,104	22,4	
K_{p1}^b	Doku 1 için doku:plazma partiyon katsayısı	4,033	0,54	13,4	
CL_{int} (mL/dk/kg)	İntrinsik klerens	148	26,7	18,0	
$k_{01} S$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırncı derece absorpsiyon sabiti 1 (t = 0-60 dk)	4,5	0,463	10,3	
$k_{01} M$ (mg/dk/kg)		7,56	0,611	8,076	
$k_{02} S$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırncı derece absorpsiyon sabiti 2 (t = 60-135 dk)	5,57	1,02	18,4	
$k_{02} M$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırncı derece absorpsiyon sabiti 2 (t = 60-110 dk)	7,12*	1,12	15,8	
fr S	CL_{int} 'in fraksiyonu	0,336	0,0611	18,2	
fr M		0,256	0,0387	15,1	
V_{ss} (L/kg) ^c	Kararlı durumdaki dağılım hacmi	5,82			
F S ^e	Görünür mutlak biyoyararlanım	0,422			
F M ^e		0,839			
Rastgele Etkilerin Standart Sapması					
		Kestirim	%VK		
ω CL	CL'nin rastgele etkisi	0,258	26,2	0,137	53,2
Hata Modeli Parametreleri					
b IV	Orantılı hata terimi	0,365	0,033	9,11	
a S	Sabit hata terimi	1,76	0,194	11,04	
a M		2,54	0,274	10,78	

^a $f_{d2} = 1 - f_{d1}$, ^b $K_{p1} = K_{p2}$, ^c $V_{ss} = (V_b + V_1 \cdot K_{p1} + V_2 \cdot K_{p2} + V_3 \cdot K_{p3}) / \text{vücut ağırlığı}$, ^e $F = (AUC_{PO} \cdot Doz_{IV}) / (AUC_{IV} \cdot Doz_{PO})$, M: malnütrisyonlu grup, S: sağlıklı grup, * $k_{01} S$ 'den anlamlı olarak büyüktür (p<0,05).

MET uygulanan sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanların popülasyon analizleri sonucu elde edilen plazma konsantrasyon-zaman profillerinin AUC'leri sırası ile 2497,467 $\mu\text{g} \cdot \text{dk} / \text{mL}$ ve 3835,368 $\mu\text{g} \cdot \text{dk} / \text{mL}$ 'dir.

Tablo 4.33. Naif havuzlama ile elde edilen MET ortak uyumlu model için kestirimi yapılan farmakokinetik parametreler.

Parametre	Tanım	Kestirim (%VK)
$k_{01} S^a$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırinci derece absorpsiyon sabiti 1 (t = 0-60 dk)	4 (10,7)
$k_{01} M^b$ (mg/dk/kg)		7 (11,8)
$k_{02} S^c$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırinci derece absorpsiyon sabiti 2 (t = 60-135 dk)	6 (16,05)
$k_{02} M^d$ (mg/dk/kg)	Görünür sıfırinci derece absorpsiyon sabiti 3 (t = 60-110 dk)	11,1* (17,9)
f_{d1}	Doku 1 için fraksiyonel dağılım parametresi	0,82 (2,98)
f_{d2}^e	Doku 2 için fraksiyonel dağılım parametresi	0,18 (13,5)
K_{p1}^f	Doku 1 için doku:plazma partision katsayısı	5,40 (19,1)
CL_{int} (mL/dk/kg)	İntrinsik klerens	40,4 (8,56)
V_{ss}^g (L/kg)	Kararlı durumdaki dağılım hacmi	7,062 (13,3)
σ_{slope}	Varyans parametresi	0,55 (7,17)
$F S^h$	Görünür mutlak biyoyararlanım	0,492
$F M^h$		0,815

^a 2,5-4 arası ile sınırlandırılmıştır, ^b 5,5-7 arası ile sınırlandırılmıştır, ^c 4-6 arası ile sınırlandırılmıştır, ^d 10-11,5 arası ile sınırlandırılmıştır, ^e ikincil parametre olarak $f_{d2}=1 - f_{d1}$ 'e göre hesaplanmıştır, ^f $K_{p1} = K_{p2}$, ^g $V_{ss} = (V_b + V_1 \cdot K_{p1} + V_2 \cdot K_{p2} + V_3 \cdot K_{p3}) / \text{vücut ağırlığı}$ ikincil parametre olarak hesaplanmıştır, ^h $F = (AUC_{PO} \cdot Doz_{IV}) / (AUC_{IV} \cdot Doz_{PO})$ formülüne göre hesaplanmış ve her referans IV dozuyla (0,5, 1 ve 2 mg/kg) oral profillerin karşılaştırılması sonucu elde edilen F değerlerinin ortalaması alınmıştır, M: malnütrisyonlu grup, S: sağlıklı grup, * $k_{01} S$ 'den anlamlı olarak büyüktür (p < 0,05).

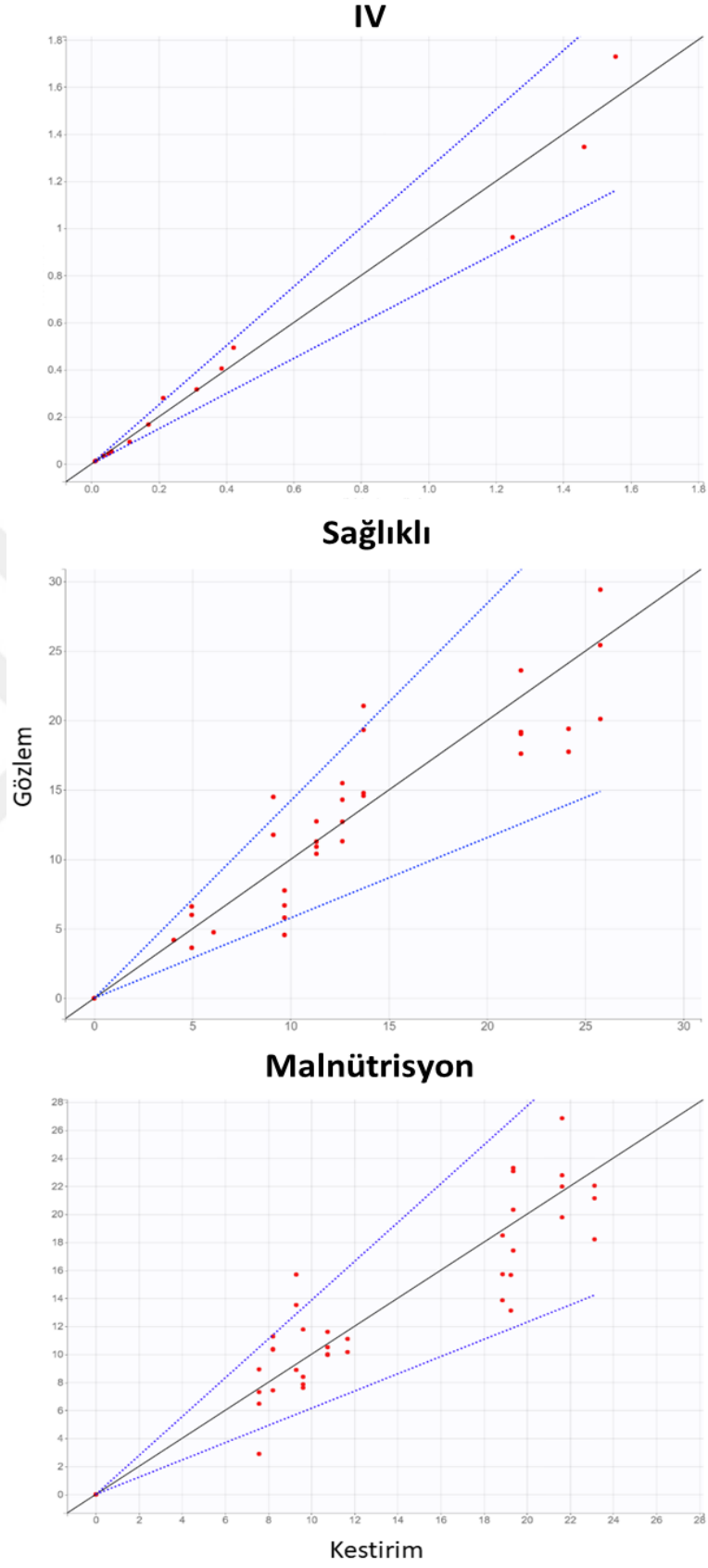
MET uygulanan sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanların naif havuzlama ile profillerin ortak uyumları sonucu elde edilen plazma konsantrasyon-zaman profillerinin AUC'leri sırası ile 1987,31 µg.dk/mL ve 2542,33 µg.dk/mL'dir.

Dağılımla ilgili parametreler (f_{d1} , K_{p2} ve CL) tüm gruplarda paylaşılmıştır. MET için kestirilen f_{d1} (0,464) ve f_{d2} (0,536) değerleri, ATN'den daha yüksektir. Böylece elde edilen sonuç, MET için perfüzyon ile sınırlı dağılım varsayımına uygundur. Absorpsiyon fazları, sağlıklı ve malnütrisyonlu gruplar için ayrı ayrı tanımlanmıştır. Absorpsiyon oranı sabitleri, birlikte uyum için paylaşılmamıştır ve iki grubu karşılaştırmak için ayrı parametreler olarak değerlendirilmiştir. T_{maks} , sağlıklı ve malnütrisyon grupları için 135 ve 110 dk'lara sabitlenmiştir ve t_1 , optimizasyonla her iki grup için 60 dk'ya sabitlenmiştir.

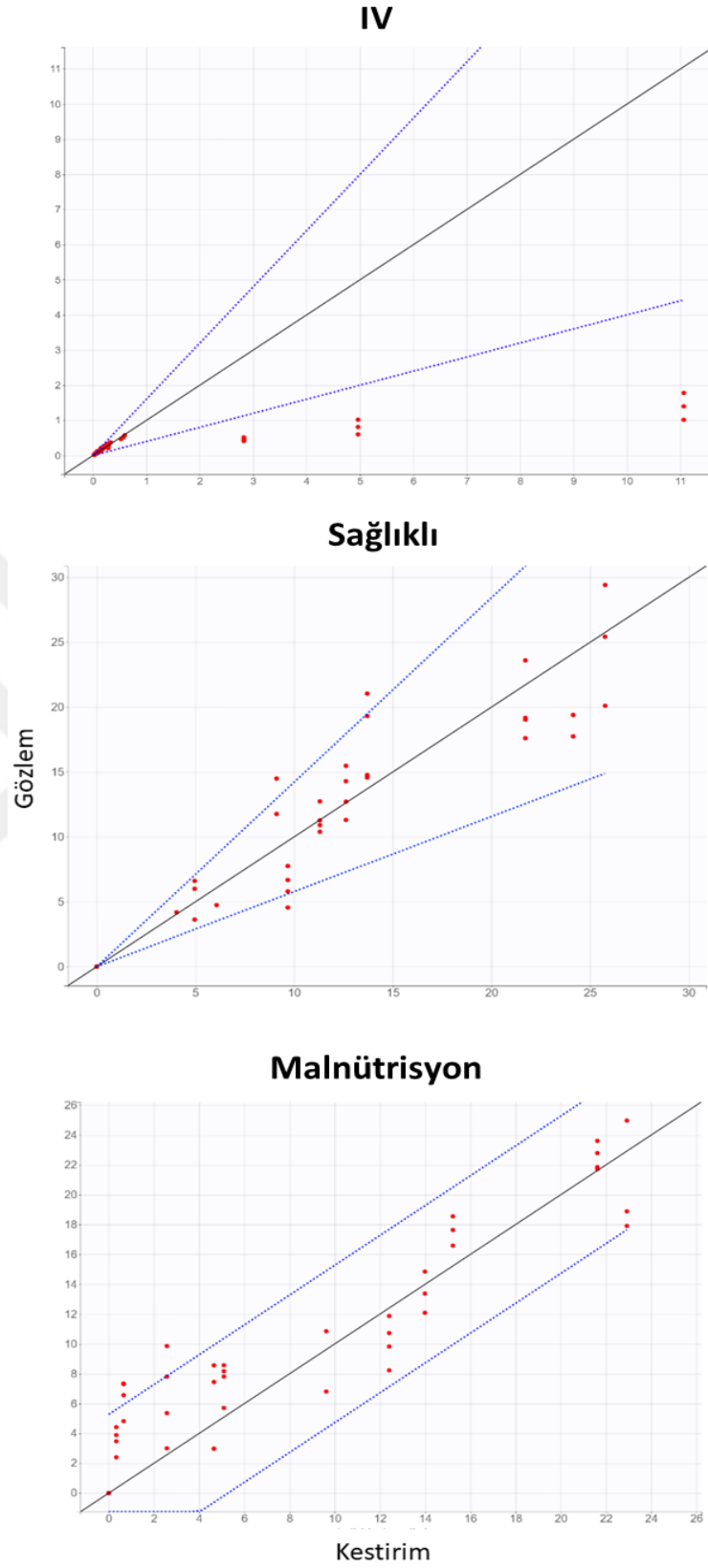
k_{0i} değerleri miktar/zaman (mg/dk/kg) birimlerine sahip olduğundan, genel biyoyararlanım (F), kestirilen konsantrasyon-zaman profilleri kullanılarak hesaplanmıştır. Parametrelerle ve malnütrisyonlu gruplarda gözlenen daha yüksek konsantrasyonlarla tutarlı olarak, F, ATN için 0,43'ten 0,67'ye ve MET için 0,42'den 0,84'e yükselmiştir. Popülasyon modelleri, GoF'ye göre sağlıklı ve malnütrisyonlu gruplar için IV uyumundan elde edilen CL'nin 0,34 ve 0,27 fraksiyonları kullanılarak optimize edilmiştir. Bu nedenle, popülasyon analizinde oral profiller için CL değeri ($43,8 \pm 5,92$ mL/dk/kg), birlikte uyumda tahmin edilen CL'ye ($40,4$ mL/dk/kg) benzer bulunmuştur.

Popülasyon Analizleri

Popülasyon uyumları için profiller Şekil 4.32. ve 4.34.'te gösterilmiştir. Referans IV ve oral (sağlıklı ve malnütrisyonlu gruplar) profillerin mPBPK modeli tarafından başarılı bir şekilde kestirimi yapılmıştır. Ayrıca, malnütrisyonlu grup için absorpsiyon fazlarını iki veya üç aşamalı sıfırıncı dereceli süreç olarak tanımlayan model kestirimleri Tablo 4.34. ve 4.35.'te gösterilmiştir. ATN ve MET için gözlemler ve kestirimler için aykırı değerler oranları $\%7,59 \pm 0,524$ ve $\%10,32 \pm 2,26$ 'dır (Şekil 4.36. ve 4.37.). Rezidüelin dağılım grafiklerinde herhangi bir yöne doğru eğilim yoktur (Şekil 4.38. ve 4.39.). Görsel kestirim kontrol grafikleri Şekil 4.40. ve 4.41'de verilmiştir.

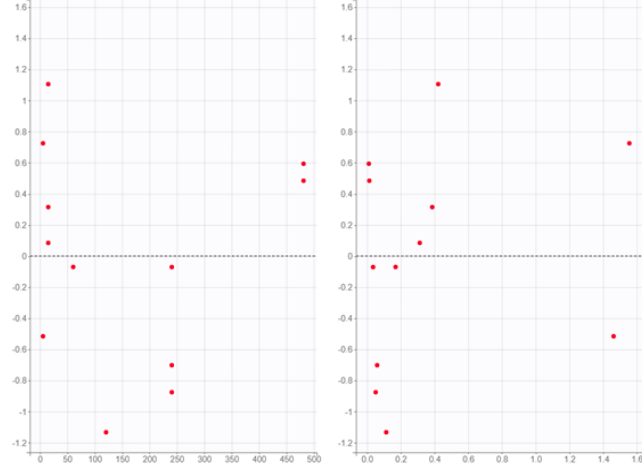


Şekil 4.36. ATN için gözlemlere karşı kestirimlerin grafiği.

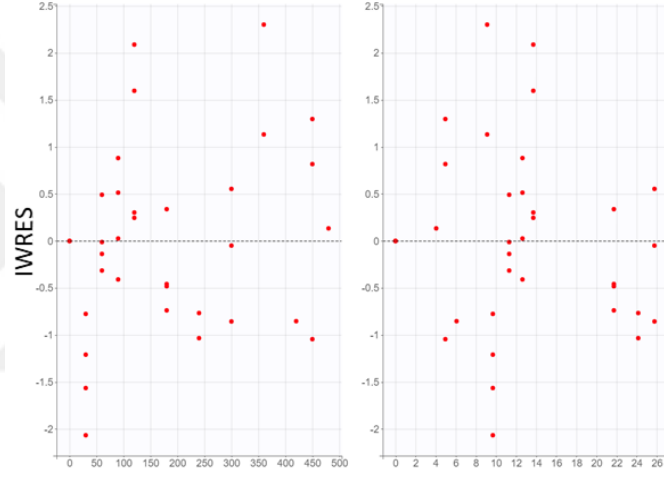


Şekil 4.37. MET için gözlemlere karşı kestirimlerin grafiği.

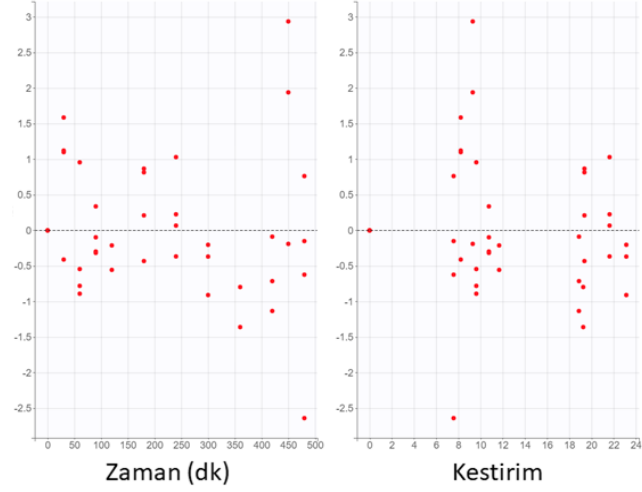
IV



Sağlıklı

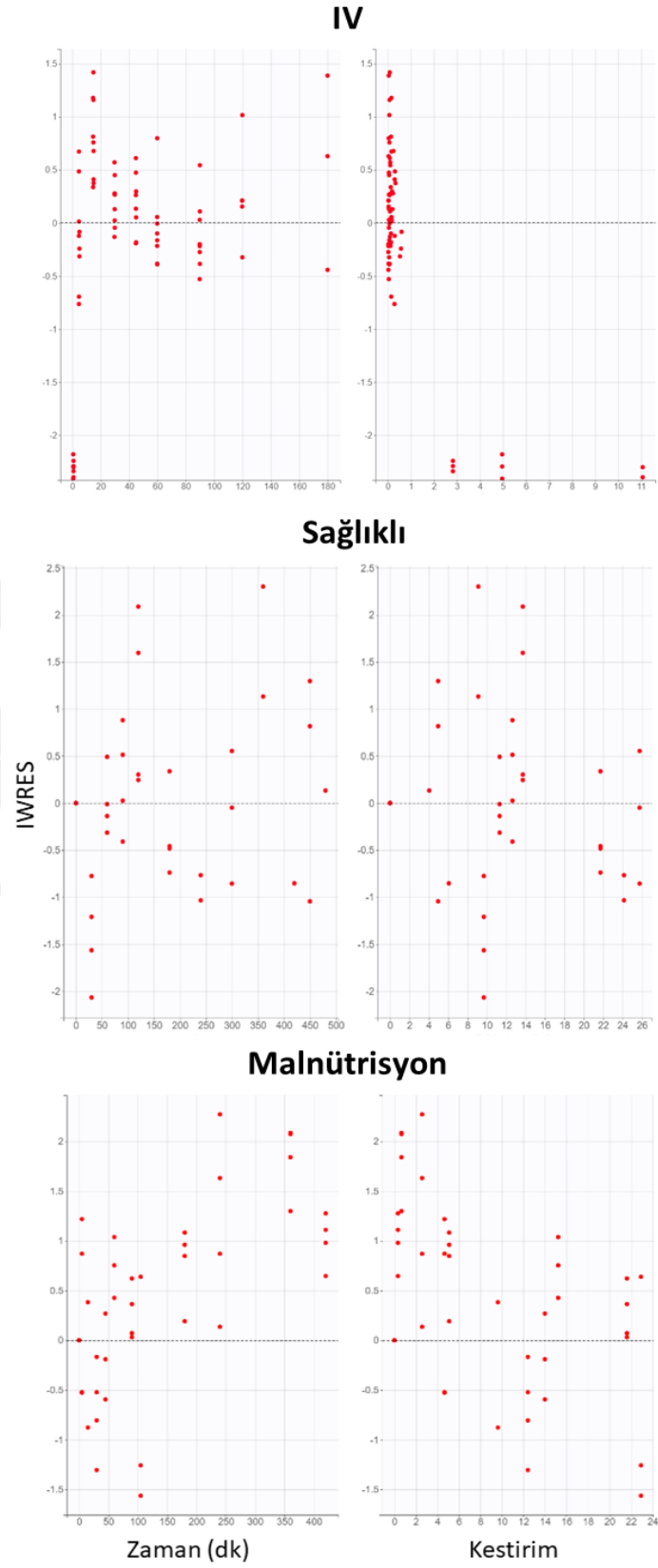


Malnütrisyon



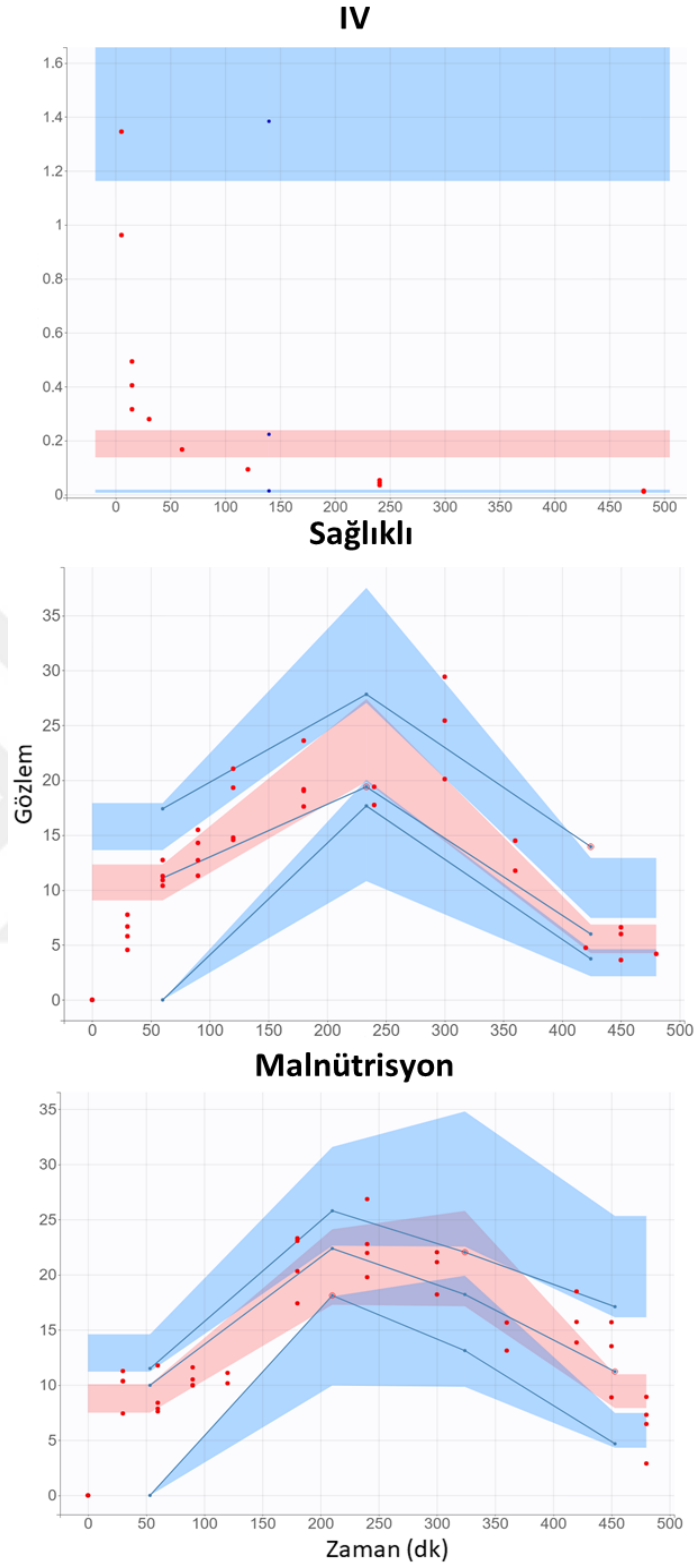
Şekil 4.38. ATN için rezidüellerin dağılım grafiği.

IWRES: bireysel rezidüeller.



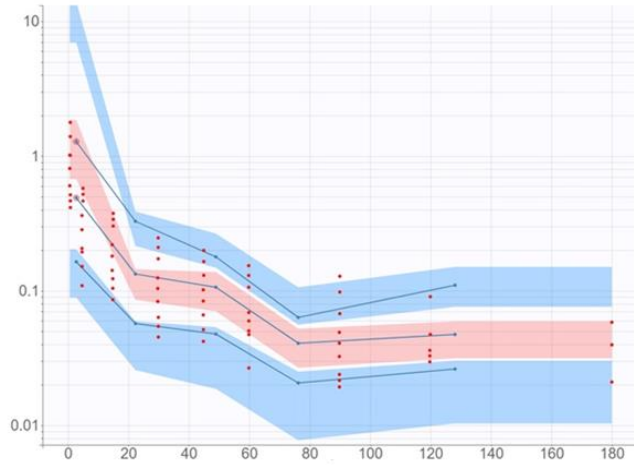
Şekil 4.39. MET için rezidüellerin dağılım grafiği.

IWRES: bireysel rezidüeller.

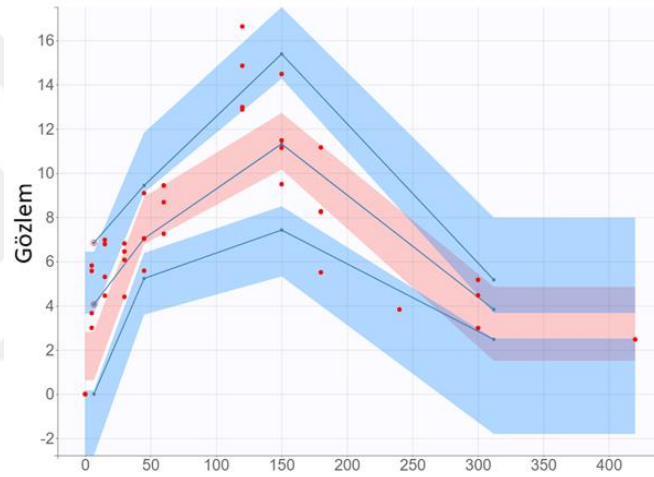


Şekil 4.40. ATN için görsel kestirim kontrol grafiği (Noktalar gözlemleri, çizgiler model uyumunu, pembe ve mavi bölgeler ise model tahmin aralığını göstermektedir).

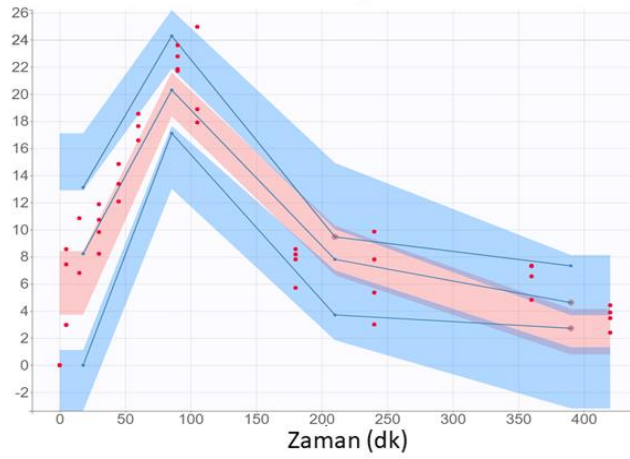
IV



Sağlıklı



Malnütrisyon

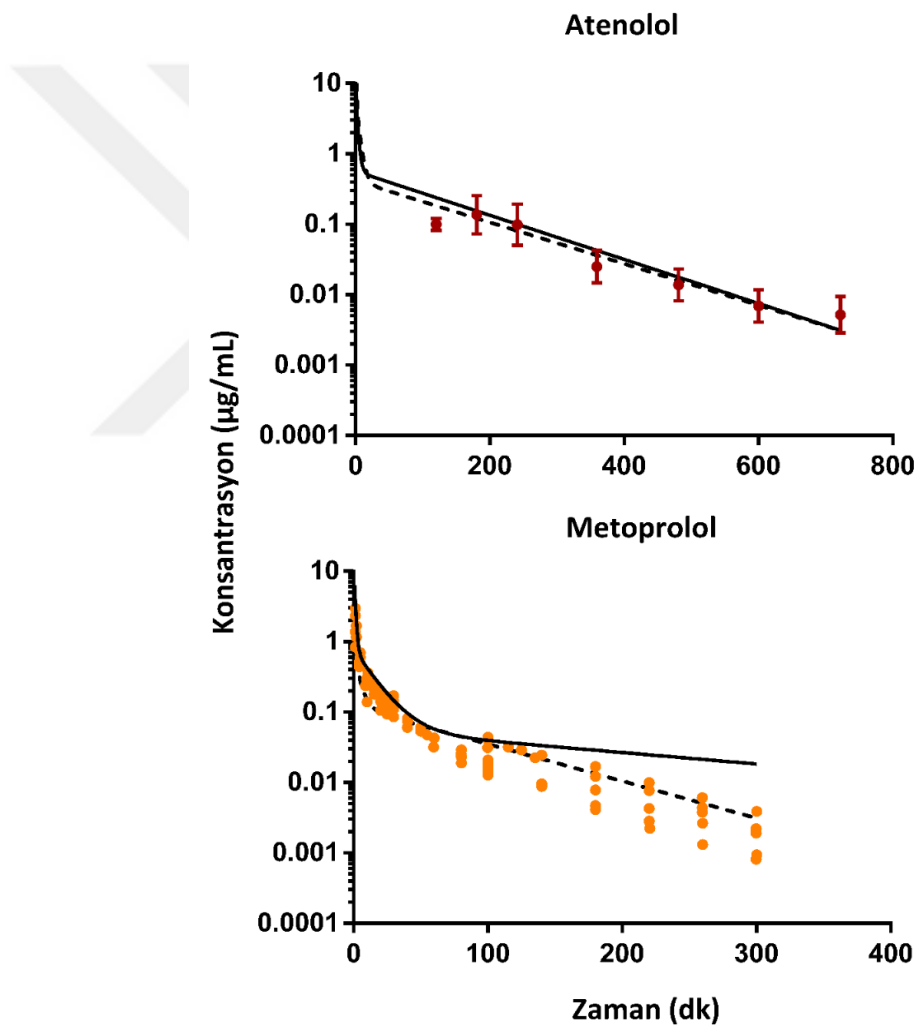


Şekil 4.41. MET için görsel tahmini kontrol grafiği (Noktalar gözlemleri, çizgiler model uyumunu, pembe ve mavi bölgeler ise model tahmin aralığını göstermektedir).

ATN ve MET için kestirilen popülasyon parametreleri Tablo 4.32 ve 4.34'te listelenmiştir. Düşük SH ve %BSH değerlerine sahip oldukları için tüm parametrelerin kestirimleri başarılıdır.

Modellerin Eksternal Validasyonu

Simülasyon çalışmaları, referans olarak kullanılan IV profillerden farklı IV veriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.42.).



Şekil 4.42. ATN ve MET için simülasyonlar ve harici veri setleri ile karşılaştırma. Semboller gözlemleri ($\pm 2SD$), düz çizgi ve kesikli çizgi sırasıyla ADAPT ve Monolix tarafından kestirimi yapılan profilleri göstermektedir.

ATN uygulamasına bağılı olarak ADAPT ve Monolix tarafından başarılı kestirimler sağlanmıştır. MET uygulamasına bağılı elde edilen profilin Monolix tarafından iyi bir şekilde kestirimi yapılırken, ADAPT tarafından yapılan kestirim yalnızca erken veriler ile uyumludur. K_{p_hep} , MET IV referansının karışık R- ve S-izomerleri varsayılarak hesaplanmıştır; ancak, MET için kullanılan harici veri seti R-MET uygulamasından sonra elde edildiğı için K_{p_hep} , R-MET'in closed-loop K_p kestirimi ile elde edilen 39,1'e sabitlenmiştir (212). Bu nedenle modelin R-MET'in geç zaman noktalarındaki aşırı tahmini, MET'in stereoselektif metabolizmasıyla ilgili olabilmektedir. Çünkü R-MET, insanlarda CYP2D6 enzimi tarafından metabolize edilmektedir ve S-MET'ten %40 daha yüksek bir klerense sahiptir (231). Yapılan validasyon çalışmaları ile uygulanan modelin ATN ve MET profillerinin güvenli bir şekilde değerlendirdiğı sonucuna ulaşılmıştır.

5. TARTIŞMA

5.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Analizi yapılacak maddelerin tayinleri uygun bir analitik yöntem kullanılarak yapılmaktadır. Geliştirilen analitik yöntemlerin özelliklerinin istenilen amaçlara uygun olduğunu göstermek için validasyon çalışmaları yapılmalıdır. Analizi yapılacak maddenin tayin edileceği matrikse göre analitik ya da biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmaktadır. Tayini yapılacak maddeler kan, serum, idrar, feçes, tükürük ve doku gibi biyolojik bir matriks içinde ise validasyon parametreleri ve değerlendirmeleri biyolojik yöntem validasyonuna göre yapılır (232). Tez çalışmaları kapsamında *in situ* bağırsak perfüzyonu sonucu toplanan perfüzet ve *in vivo* çalışmalardan toplanan kan örneklerinden madde analizi yapıldığı için biyoanalitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları yapılmıştır.

In situ çalışmalarda, perfüzyon ortamında yer alan ATN, MET ve FK'nin analizleri için literatür taraması yapılmış ve geliştirilen yöntemler (177, 178, 180, 181, 193) incelenmiştir. Literatürde ATN ve MET'in ayrı ayrı ve aynı anda tayinleri olsa da ATN, MET ve FK'nin aynı anda tayini için kullanılan bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle, on üç beta blokörün (ATN, MET, sotalol, nadolol, pindolol ve labetalol gibi) tayini için geliştirilen yöntem (177) modifiye edilerek ATN, MET ve FK'nin aynı anda tayin edilmesine olanak sağlayan HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir (233). Ayrıca, *in vivo* çalışmalardan elde edilen plazmadaki ATN ve MET'in miktar tayinleri için Kir ve ark. tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilmiş ve yönteme iç standart (internal standard) eklenmiştir. İç standart, kan gibi biyolojik numunelerden madde miktarı tayinlerinde duyarlılığı arttırmak amacı ile kullanılmaktadır. *In vivo* çalışmalarda sıçanlara ATN ve MET ayrı ayrı uygulanacakları için ATN olan plazma örneklerinde MET; MET olanlarda ise ATN bulunmamaktadır. Bu nedenle ATN içeren numuneler için MET; MET içerenler için ise ATN iç standart olarak kullanılarak *in situ* için geliştirilen HPLC yöntemi modifiye edilmiş ve validasyonu yapılarak *in vivo* çalışmalardan elde edilen numunelerin analizleri için kullanılmıştır. İç standart içeren numunelerin analizlerinde, miktarı tayin edilecek maddenin ve numuneye bilinen

konsantrasyonda eklenen iç standardın pik alanları oranlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve tüm değerlendirmeler bu doğrultuda yapılmıştır.

Biyoanalitik yöntem validasyonu için EMA ve FDA'nın 2011 ve 2018 yıllarında yayımlanan kılavuzları mevcuttur (234, 235). Bu kılavuzlar arasında terminoloji ve değerlendirilmesi gereken validasyon parametreleri açısından bazı farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, kalibrasyon için kullanılan standartların tekrar sayısı ve kabul kriterleri EMA kılavuzunda belirtilirken, FDA kılavuzunda yer almamaktadır. Diğer yandan, FDA elde edilen kalibrasyon standartlarının dışlanması mevcut modelin değişmemesini önerirken, EMA veri dışlanmasında yeni kalibrasyon doğrusu oluşturulmasını önermektedir. Matriks etkisinin incelenmesi FDA ve EMA tarafından önerilmek ile beraber EMA'da detaylı olarak açıklanırken, FDA'nın kılavuzunda detaylı bir açıklama yer almamaktadır.

Biyoanalitik analizlerde verilerin kalite ve tutarlılığının iyileştirilmesi amacı ile 2016 yılında ICH tarafından harmonize bir kılavuz hazırlanmaya başlanmış, kılavuzun güncel taslağı 2019 yılında yayınlanmış ve kılavuz son haline 2022'de gelmiştir (182, 236). Tez çalışmaları kapsamında yukarıda örneklerle belirtilen yasal otoriteler arasındaki farklılıklardan kaçınmak amacı ile ICH M10 kılavuzu esas alınarak biyoanalitik yöntem için validasyon parametreleri belirlenmiş ve değerlendirilmiştir (182). Validasyon çalışmaları kapsamında seçicilik, özgüllük, matriks etkisi, kalibrasyon doğrusu ve aralığı, doğruluk ve kesinlik, analit taşınması, kararlılık, enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik, geri kazanım ve sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Validasyon parametreleri geliştirilen iki yöntem (*in vitro* - *in situ* ve *in vivo*) için de değerlendirildiğinde ICH M10 kılavuzunda belirtilen sınırlar içinde olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular geliştirilen metotların tez kapsamında yapılan deneylerden elde edilen numunelerdeki model etkin maddelerin tayinlerinde güvenle kullanılabileceğini göstermiştir.

5.2. Malnütrisyon Geliştirilmesi

5.2.1. *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre hattına bağlı olarak çeşitli ortamlar (DMEM, RPMI 1640 ve MEM (*Minimum Essential Medium*) gibi) kullanılmaktadır. Bu ortamların farklı glikoz, glutamin, magnezyum ve kalsiyum iyonlarını içerip içermeme, içeriyorsa da farklı oranlarda içermeleri söz konusudur. Hücreleri beslemek için kullanılan ortamlara FBS eklenmektedir (186, 187).

Literatürde hücrelerde malnütrisyon geliştirilmesi ile ilgili sınırlı sayıda yayın mevcuttur (186, 187, 237). Lynam ve ark. hipertrofik yara izi kaynaklı fibroblastların yetersiz beslenme sonucu hücre apoptozuna sebep olup olmadığını araştırmıştır. Bu amaçla kontrol grubu %10 FBS içeren DMEM ile beslenirken, malnütrisyon geliştirilen hücreler %5 ve %0,5 FBS içeren DMEM ile beslenmiştir (237). Ayrıca HCT-8 hücrelerinde malnütrisyon geliştirmek amacıyla hücreler %0,1 - 1 oranında FBS içeren ortam ile beslenerek hücrelerin besin alımı kısıtlanmıştır (186, 187).

Literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda HCT-8 (ileoçekal kolorektal adenokarsinoma), Caco-2 (kolorektal adenokarsinoma) ve HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) hücre hatlarında çalışmalar yapılarak bu hücre hatlarının birbirlerinin yerine kullanılabilirliği değerlendirilmiştir (238-240). Bu tez çalışması kapsamında malnütrisyon geliştirmek amacıyla HCT-8 ve Caco-2 hücre hatları kullanılmıştır.

Malnütrisyon geliştirme çalışmaları kapsamında literatürden farklı olarak akut (AMAL) ve kronik malnütrisyon (KMAL) olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. AMAL'de hücreler deney gününe kadar kontrol grubundaki hücreler gibi %10 FBS içeren ortam ile beslenirken, KMAL geliştirilen hücreler deney gününe kadar %1 FBS içeren ortam ile beslenmiştir. Deney günü kontrol grubu için hazırlanan ilaç çözeltilerinde %10 FBS içeren DMEM kullanılırken, AMAL ve KMAL geliştirilen hücreler için %1 FBS içeren DMEM kullanılmıştır. AMAL ve KMAL geliştirilen hücrelerde hücre canlılığı testleri yapılmış ve farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) ATN ve MET'e maruz

kalan hücrelerin canlılıkları değerlendirilmiştir. HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinde KMAL ve AMAL geliştirilmesi sonucu yapılan hücre canlılığı testi ATN ve MET uygulamasının hücre canlılığına genellikle olumlu yönde etkisinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu nedenle çift yönlü transport çalışmalarında kullanılacak dozun belirlenmesinde malnütrisyonlu hücrelerden kaynaklı doz azaltılması yapılmamıştır.

Çift yönlü transport çalışmalarında kullanılan hücrelerde KMAL geliştirilmiştir. Çift yönlü transport deneylerinde model etkin maddeler glikoz ve HEPES içeren HBSS'de çözündürülerek hücrelere uygulanmaktadır. Etkin madde çözeltileri hazırlanırken kontrol grubu için 25 mM glikoz içeren HBSS, malnütrisyon grubu için 5,6 mM glikoz içeren HBSS kullanılmıştır. Malnütrisyonlu gruptaki glikoz konsantrasyonu hesaplanırken yüksek (4,5 g/L) ve düşük (1 g/L) konsantrasyonlarda glikoz içeren DMEM'deki glikoz konsantrasyonları dikkate alınmıştır. Böylece malnütrisyon geliştirilecek hücrelerde kullanılacak HBSS'ye düşük glikoza göre yapılan hesaplama sonucunda elde edilen konsantrasyonda (5,6 mM) glikoz eklenmiştir. Böylece yetersiz beslenme durumu deney süresince de sağlanmıştır.

5.2.2. Hayvan Deneyleri

Sıçanlar genelde kazein (protein kaynağı), jelatin, sükroz, dekstroz, vitamin ve mineral karışımı içeren yemlerle beslenmektedir (225, 241-243). Sıçan yemleri protein içeriğine göre protein kısıtlı (%5), protein kısıtlı olmayan (%18), besin olarak dengeli (%18,7) ve protein açısından zengin (%35) pelletler olarak adlandırılmaktadır (241, 244, 245).

Sıçanlarda malnütrisyon geliştirmek amacıyla literatürde farklı protein içeriklerine sahip yemler kullanılmıştır (241, 242, 244, 246-248). Varma'nın 1979 yılında yaptığı bir çalışmada erkek SD sıçanları (yaklaşık 35 günlük, 100-125 g) iki gruba ayrılarak kontrol grubu %21, malnütrisyon grubu %5 protein içeren izokalorik pellet ile beslenmiştir. Protein eksikliğinin en belirgin etkisi vücut ağırlığında azalma olduğu için tüm sıçanların vücut ağırlıkları düzenli olarak kaydedilmiştir. Kontrol grubundaki

sıçanların vücut ağırlığı artarken ($117 \pm 1,8$ g'dan 249 ± 3 g'a), malnütrisyon geliştirilen sıçanların vücut ağırlığı azalmıştır ($118 \pm 1,6$ 'dan $112 \pm 1,7$ 'ye). Malnütrisyon grubunda diyetteki protein eksikliği toplam plazma proteinlerinde, albümin ve globulinlerde, hepatik toplam ve mikrozomal proteinlerde ve sitokrom P-450'de küçük ama önemli bir azalmaya ($p < 0,05$) neden olmuştur (241).

Benzer şekilde, Williams ve ark. 'nın erkek SD sıçanlarda (9-42 günlük, 150-175 g) yaptığı bir çalışmada kontrol grubu %22,5 ve malnütrisyon grubu %5,5 protein içeren izokalorik diyetle 17-20 gün süre ile beslenmiştir. 15. günde plazma protein seviyeleri kontrol grubunda 5,69 g/100 mL (5,32-6,01 g/100 mL) ve malnütrisyon grubunda 4,34 g/100 mL (4,01-4,94 g/100 mL) olarak bulunmuştur. İlaç uygulamasından hemen önce vücut ağırlıkları kontrol ve malnütrisyon grubunda sırasıyla 345 g (327–363 g) ve 199 g (186–208 g) olarak ölçülmüştür (244).

Bobyn ve ark. 'nın yaptığı bir çalışmada yetişkin erkek Moğol çöl fareleri %12,5 protein içeren (kontrol diyeti) ve %2 protein içeren düşük proteinli diyetle 28 gün boyunca beslenmiştir. Besin ve suya sınırsız erişimi olan farelerin iki haftada bir vücut ağırlıkları ve günlük yiyecek alımları kaydedilmiştir. Ayrıca karaciğer glutatyon (GSH) konsantrasyonu (249) ölçülmüş ve karaciğer lipid düzeyleri tespit edilmiştir. 28. günde malnütrisyonlu farelerin vücut ağırlığı kontrol grubundan %17 daha düşük bulunmuştur ($p < 0,001$). Ayrıca, malnütrisyonlu gruptaki farelerin ortalama besin alımının 28 gün boyunca kontrol grubunun %85'i olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Malnütrisyonlu farelerde karaciğerdeki lipid düzeyi artarken ($p < 0,001$), karaciğer glutatyon (GSH) konsantrasyonu önemli ölçüde azalmıştır ($p < 0,001$) (247).

Erkek Swiss Webster fareler (2-3 aylık, 25 g) kontrol (%20 protein) ve az protein (%4 protein, hipoprotein) içeren diyetle beslenmişlerdir. Diyetler sadece protein (kazein) miktarı açısından farklı olup diğer tüm maddeler aynıdır. Besine ve suya erişimleri sınırsız olan farelerin vücut ağırlıkları her 72 saatte bir, besin tüketimi ise her 48 saatte bir ölçülmüştür. Fareler beslenmeye başladıktan 14 gün sonra malnütrisyon geliştirilen grubun vücut ağırlığında %20 azalma meydana gelmiştir (248, 250). Hipoprotein içeren diyetle beslenen farelerin vücut ağırlıklarında, protein

tüketimlerinde, albümin ve pre-albümin konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre azalma olmuştur ($p < 0,05$) (248).

Erkek ve dişi SD sıçanlar (5-10 haftalık) yüksek (fare küpü, *mouse cube*) ve düşük protein (*Average Grade bake's flour*) içeren yemlerle beslenmişlerdir. 2 hafta sonra kontrol grubuna kıyasla düşük protein içeren diyetle beslenen sıçanların vücut ağırlıkları yaklaşık %40 oranında azalmıştır. Maymunlar kontrol grubuna verilen diyetin onda biri oranında bir diyetle beslendiklerinde 2 hafta sonunda vücut ağırlıklarının yaklaşık %20'sini kaybetmişlerdir. Malnütrisyon seviyesinin belirlenmesi amacıyla vücut ağırlığı, serum albümin konsantrasyonu ve plazma 11-hidroksikortikosteroid düzeyi ölçülmüştür. Ayrıca, bazı sıçanlarda beyin ağırlığı ve beyin asetilkolinesteraz aktivitesi de belirlenmiştir. Malnütrisyon geliştirilen sıçanların %25'i, özellikle üç aydan sonra yetersiz beslenme ve enfeksiyon (burun, göz gibi) sonucu ölmüştür (246).

Ayrıca, kolesterol ve serum albümin seviyelerine göre malnütrisyon sınıfının belirlenmesi ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (243, 251). Ignacio de Ulíbarri ve ark. yatan hastalar için malnütrisyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan CONUT (CONTrolling NUTritional status, beslenmenin kontrolü) sınıflama sisteminde serum albümin, kolesterol ve toplam lenfositlere göre skorlama yapmıştır (Tablo 5.1.) (251).

Tablo 5.1. CONUT ile malnütrisyon derecesinin değerlendirilmesi (251).

Parametre	Malnütrisyon Derecesi			
	Normal	Hafif	Orta	Şiddetli
Serum albümin (g/dL) Skor	3,5 – 4,5 0	3,0 – 3,49 2	2,5 – 2,9 4	< 2,5 6
Toplam lenfosit/mL Skor	> 1600 0	1200-1599 1	800-1199 2	< 800 3
Kolesterol (mg/dL) Skor	0	1	2	3
Toplam Skor	0-1	2-4	5-8	9-12

Merino-Sanjuán ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kontrol grubunda yer alan sıçanlar (erkek Wistar: 8-9 haftalık, 220-250 g) %14 protein içeren standart

pelletlerle günlük besin alımı 20 g/60,2 kcal olacak şekilde, malnütrisyon grubunda yer alan sıçanlar ise %5 protein içeren günlük besin alımı 10 g/38 kcal olacak şekilde 26 gün süreyle beslenmiştir. Besin alımları kısıtlı ancak suya erişimleri sınırsız olan sıçanların ağırlıkları, serum albümin ve toplam kolesterol konsantrasyonları ölçülmüştür. Serum albümin seviyesindeki değişiklikler protein miktarındaki değişiklik; kolesterol seviyesindeki değişiklik ise kalori tüketimi ile ilgili parametreler olarak değerlendirilmiştir. Ölçümler sonucunda serum albümin düzeyleri < 2,3 g/dL ve ağırlıkları < 240 g ise malnütrisyon geliştiği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, bu parametrelere göre sıçanlar hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üç farklı malnütrisyon derecesine CONUT'a göre sınıflandırılmışlardır (243). Parametre değerleri ve yetersiz beslenme derecesine göre atanan puanlar Tablo 5.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 5.2. Serum albümin düzeyi ve vücut ağırlığı analizine göre malnütrisyon derecesinin değerlendirilmesi (243).

Parametre	Beslenme Durumu			
	Normal	Hafif	Orta	Şiddetli
Serum albümin (g/dL) Skor	4,3-2,3 0	2,3-1,9 2	1,89-1,5 4	< 1,5 6
Vücut ağırlığı (g) Skor	310-24 0	240-220 1	219-190 2	< 190 3
Toplam skor	0	1-3	4-6	8-9
Malnütrisyon derecesi	Nomal	Hafif	Orta	Şiddetli

Rossi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada erkek Wistar sıçanları (81 g) beş gruba ayrılarak 6 ve 12 hafta boyunca yüksek (%16 protein, sırasıyla grup A ve C) ve düşük protein içeren (~%4 protein, sırasıyla grup B ve D) bir diyetle beslenmiştir. Diyetler izokalorik (4,15 kcal/g) olup sıçanların suya erişimi sınırsızdır. Sıçanlar haftada iki kere tartılmıştır. Ayrıca, 6 hafta boyunca düşük proteinli diyet ile beslendikten sonra 6 hafta boyunca yüksek proteinli diyet ile beslenen bir grup (grup E, rehabilite edilen) oluşturularak karşılaştırmalar yapılmıştır (225). Ağırlık ölçümleri sonucu düşük proteinle beslenen sıçanların ağırlık artışlarının, yüksek proteinle beslenenlere kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Altı hafta boyunca düşük proteinli diyetle beslenen sıçanlarda toplam plazma proteinleri ve albümin düzeyleri kontrol grubuna (yüksek protein içeren diyetle beslenen grup) göre daha düşüktür ($p < 0,05$). Ancak

kolesterol düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. 12 hafta boyunca düşük proteinli diyetle beslenen sıçanlarda toplam plazma proteinleri ve albümin düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Diğer taraftan, rehabilite edilen sıçanların plazma protein konsantrasyonu kontrol grubundan (grup C) daha düşükken ($p < 0,05$), iki grubun plazma albümin düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca, grup C, D ve E'nin kolesterol konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (225).

González-Hernández ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada marasmus ve kwashiorkora benzer malnütrisyon tiplerini oluşturmak amacıyla iki farklı diyet kullanılmıştır. Erkek SD sıçanları (35-40 g) kontrol, marasmus ve kwashiorkor olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Kontrol grubundaki sıçanlar %84,3 kazein (%89,19 ham protein) içeren diyetle beslenirken kwashiorkor grubundaki sıçanlar kazein içermeyen bir diyetle beslenmiştir. Kontrol ve kwashiorkor grubundaki sıçanların besine erişimleri sınırsızdır. Marasmus grubundaki sıçanlar ise kontrol grubu tarafından yenen yem miktarının %70'i verilmiş (vücut ağırlıklarına göre) ve %84,3 kazein içeren diyetle beslenerek besine erişimi sınırlandırılmıştır. Sıçanlar üç hafta boyunca beslenmiş ve vücut ağırlıkları düzenli olarak ölçülmüştür. Hayvanların vücut ağırlıkları malnütrisyonun bir göstergesi olarak kullanılmıştır. Üç hafta sonra sıçanların (i) protein miktarı (plazma, karaciğer ve ince bağırsağın proksimal segmenti), (ii) toplam plazma protein miktarı, (iii) karaciğer yağ içeriği, (iv) esteraz aktivitesi (bağırsağın proksimal segment mukozasından) gibi biyokimyasal parametreleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda kontrol grubu ile malnütrisyonlu gruplar arasında vücut ağırlığındaki farklar anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$): kontrol grubu en yüksek ortalama vücut ağırlığına sahipken, kwashiorkor grubundaki sıçanların ağırlığı en düşük olarak bulunmuştur. Ayrıca, üç grup tarafından tüketilen toplam yem miktarı arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Kwashiorkor grubunda hayvanlar sınırsız beslenmelerine rağmen, diğer iki gruptan anlamlı derecede daha az miktarda yiyecek tüketmiştir. Kwashiorkor grubunun ortalama plazma protein içeriği diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Kontrol ve marasmus grupları arasında karaciğerdeki lipid

içeriği açısından bir fark bulunmazken, kwashiorkor grubundaki karaciğer lipit içerikleri diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede daha yüksektir ($p < 0,05$) (242). Üç grup arasında ince bağırsak esteraz aktivitesinde anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen, her iki malnütrisyonlu grup için de bağırsağın proksimal segmentinde daha düşük protein seviyeleri tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (242). Ayrıca, kontrol grubunda duodenum mukozasının absorptif hücreleri düzgün bir şekilde sıralanmış ve mikrovilluslar normal görünümündedir. Kwashiorkor grubunda mikrovilluslar daha kısa ve bazıları parçalanmış görünümündedir. Marasmus grubunda kontrol grubuna kıyasla, villus sayısında belirgin farklılıklar olmasına rağmen bu farklılıkların kwashiorkor grubunda gözlenen farklılıklardan daha az belirgin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Malnütrisyon için geliştirilen hayvan modelleri marasmus (iyi kalitede bir diyetin düşük miktarlarda tüketimi ile) ve kwashiorkor (düşük protein içerikli diyet tüketimi ile) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kwashiorkor geliştirilmesinde kullanılan diyetin protein içeriğinin çok düşük olması ve malnütrisyon geliştirme süresinin uzun olması hayvanlarda strese neden olabilmektedir. Bu nedenle, malnütrisyon geliştirmek için yöntem belirlerken diyetin protein içeriği ve malnütrisyon geliştirme süresinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (242).

Sonuç olarak, malnütrisyon modeli çeşitli türlerde geliştirilmiştir. Bunlar arasında çeşitli fare türleri (Swiss, C57BL/6, BALB/c ve C57BL/6J), sıçan türleri (SD ve Wistar), tavşanlar ve maymunlar bulunmaktadır. Malnütrisyon gelişimi için kullanılan diyetlerin içeriklerinde farklılıklar olsa da genellikle ortak noktaları düşük protein içermeleridir. Sıçan ve fare yemlerinde protein kaynağı olarak kullanılan kazein oranının azaltılması ile malnütrisyon geliştirilmektedir. Malnütrisyon gelişimi sonunda kanda IL-4, IL-10 ve serum eritropoetin düzeyi artmış, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 α ve IL-6'nın azalmış, karaciğerdeki toplam ekstraselüler matriks azalmış, akciğerde elastin ve α -düz kas aktini artmıştır. Ayrıca lenfosit, plasenta, periton makrofajları ve fibroblastlarda apoptoz azalırken timus ve dalakta apoptozda artış tespit edilmiştir (252).

Malnütrisyon gelişiminin kanıtlanması için serum albümin, kolesterol konsantrasyonu ve ağırlık ölçümü gibi çeşitli parametreler değerlendirilmektedir.

Ölçülen parametreler değerlendirilerek malnütrisyonun seviyesi (hafif, orta ve şiddetli) belirlenmektedir (Tablo 5.1. ve 5.2.). Bu kapsamda literatürde CONUT'u kullanan çalışmalar vardır. Fakat, CONUT insanlar için oluşturulmuştur (251) ve hayvanlar için oluşturulan sistemde (243) değerlendirme kriterleri ve sınırları farklılık göstermektedir (243, 251). Böylece malnütrisyon gelişiminin kanıtlanmasında takip edilen parametreler albümin, kolesterol ve ağırlık değişimi iken, ölçülen parametrelere bağlı malnütrisyonun sınıflandırılması ve parametrelerin sınır değerleri farklılık göstermektedir. Bu nedenle tez kapsamında yapılan çalışmalarda malnütrisyon gelişimi kontrol ve malnütrisyon geliştirilen grubun serum albümin, total kolesterol ve ağırlık olmak üzere üç parametre ölçümü ve gruplar arasındaki farkın anlamlılığının değerlendirilmesi ile yapılmıştır. Ölçümü yapılan parametreler, *in situ* grubundaki total kolesterol konsantrasyonları hariç malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$). Böylece *in situ* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere %5 protein içeren diyetle beslenmiş sıçanlarda malnütrisyon gelişimi kanıtlanmıştır.

5.3. Bağırsak Permeabilitesini Tayin Etmek Amacıyla Yapılan Çalışmalar

5.3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Literatürde malnütrisyon geliştirilen hücrelerde hücre canlılığı testi yer almamaktadır ve ilk defa bu tez kapsamında yapılmıştır. Çift yönlü transport çalışmalarında HCT-8 ve Caco-2 hücrelerine uygulanacak optimum ATN ve MET konsantrasyonunu belirlemek amacı ile kontrol ve malnütrisyon geliştirilen hücrelerde hücre canlılığı testi yapılmıştır. Ayrıca, hücrelerde akut ve kronik olmak üzere iki farklı malnütrisyon geliştirilerek hücre canlılığı testi yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı testi sonucunda, çift yönlü transport çalışmalarında ATN için 150 µg/mL, MET için ise 300 µg/mL konsantrasyonları seçilmiştir.

Ayrıca, literatürde malnütrisyon geliştirilen çift yönlü transport çalışmaları bulunmamaktadır. Böylece malnütrisyon geliştirilen hücrelerde yapılan çift yönlü transport çalışmaları ile literatüre katkı sağlanmıştır.

- **Atenolol**

Tez kapsamında HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinde yapılan çift yönlü transport çalışmaları sonucunda ATN'nin kontrol grubunun A-B permeabilite değerleri sırasıyla $6,38 \pm 0,25 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $1,47 \pm 0,10 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunurken, B-A permeabilite değerleri sırasıyla $6,72 \pm 0,21 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $4,77 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Malnütrison geliştirilen HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinde yapılan çift yönlü transport çalışmaları sonucunda ise kontrol grubunun A-B permeabilite değerleri sırasıyla $9,69 \pm 0,53 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $2,06 \pm 0,31 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunurken, B-A permeabilite değerleri sırasıyla $10,16 \pm 0,47 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $3,81 \pm 0,14 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur.

Literatürde ATN'nin permeabilitesi farklı yöntemler kullanılarak incelenmiştir. ATN'nin Caco-2 hücre hatları kullanılarak tayin edilen permeabilite değerleri $0,147 \times 10^{-6}$ ile $1,17 \times 10^{-6}$ cm/sn arasında değişmektedir (253-255). Tez kapsamında bulunan değerler literatürdeki çalışmalar sonucunda bulunan değerlerden farklılık göstermektedir. Bulgulardaki farklılığın nedeni hücre hatlarının pasaj sayılarının farklılığı, hücrelere uygulanan etkin madde konsantrasyonunun farklı olması ve deneysel koşullardaki farklılıklara bağlı olduğu düşünülmektedir.

- **Metoprolol**

Tez kapsamında HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinde yapılan çift yönlü transport çalışmaları sonucunda MET'in kontrol grubunun A-B permeabilite değerleri sırasıyla $4,72 \pm 0,09 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $4,12 \pm 0,04 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunurken, B-A permeabilite değerleri sırasıyla $4,34 \pm 0,17 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $3,77 \pm 0,09 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Malnütrsiyon geliştirilen HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinde yapılan çift yönlü transport çalışmaları sonucunda ise kontrol grubunun A-B permeabilite değerleri sırasıyla $4,81 \pm 0,14 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $4,15 \pm 0,04 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunurken, B-A permeabilite değerleri sırasıyla $5,71 \pm 0,18 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $3,80 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur.

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında HCT-8 ve Caco-2 hücre hatlarında MET'in permeabilitesi hem tek başına hem de P-gp inhibitörü olan ELA varlığında incelenmiştir. HCT-8 hücrelerinde MET'in A-B ve B-A permeabilite değeri tek başına ve ELA ile uygulandığında sırası ile $4,72 \pm 0,09 \times 10^{-6}$; $4,34 \pm 0,17 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $4,81 \pm 0,02 \times 10^{-6}$; $4,36 \pm 0,09 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, Caco-2 hücrelerinde MET'in A-B ve B-A permeabilite değeri tek başına ve ELA ile uygulandığında sırası ile $4,12 \pm 0,04 \times 10^{-6}$; $3,77 \pm 0,09 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $4,39 \pm 0,22 \times 10^{-6}$; $3,40 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre ELA uygulaması ile MET'in permeabilite değerleri anlamlı olarak değişmemiştir ($p > 0,05$). MET'in *Net flux* oranı HCT-8 ve Caco-2 hücreleri için sırasıyla 1,19 ve 0,92 olarak bulunmuştur olarak bulunmuş ve MET'in absorpsiyonunda P-gp'nin bir rolünün olmayabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Malnütrisyon geliştirilen HCT-8 hücrelerinde MET'in A-B ve B-A permeabilitesi tek başına uygulandığında $4,81 \pm 0,14 \times 10^{-6}$; $5,71 \pm 0,18 \times 10^{-6}$ cm/sn, ELA ile uygulandığında ise $4,28 \pm 0,07 \times 10^{-6}$; $5,53 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Malnütrisyon geliştirilen Caco-2 hücrelerinde MET'in permeabilitesi tek başına uygulandığında $4,15 \pm 0,04 \times 10^{-6}$; $3,80 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/sn, ELA ile uygulandığında ise $4,11 \pm 0,07 \times 10^{-6}$; $3,69 \pm 0,03 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Böylece elde edilen bulgulara göre ELA uygulaması ile MET'in permeabilite değerleri anlamlı olarak değişmemiştir ($p > 0,05$).

Kontrol ve malnütrisyonlu hücre grupları karşılaştırıldığında MET'in B-A permeabilitesi Caco-2 hücrelerinde ELA ile uygulandığında malnütrisyonlu grupta artmıştır ($p < 0,05$).

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında HCT-8 ve Caco-2 hücre hatlarında MET'in permeabilitesi hem tek başına hem de CYP3A4 inhibitörü olan KET varlığında incelenmiştir. HCT-8 hücrelerinde MET'in A-B ve B-A permeabilite değeri tek başına ve KET ile uygulandığında sırası ile $4,72 \pm 0,09 \times 10^{-6}$; $4,34 \pm 0,17 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $4,62 \pm 0,16 \times 10^{-6}$; $5,03 \pm 0,36 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, Caco-2 hücrelerinde MET'in A-B ve B-A permeabilite değeri tek başına ve KET ile

uygulandığında sırası ile $4,12 \pm 0,04 \times 10^{-6}$; $3,77 \pm 0,09 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $3,99 \pm 0,12 \times 10^{-6}$; $3,38 \pm 0,04 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre KET uygulaması ile MET'in permeabilite değerleri anlamlı olarak değişmemiştir ($p > 0,05$). MET'in *Net flux* oranı HCT-8 ve Caco-2 hücreleri için sırasıyla 1,19 ve 0,92 olarak bulunmuştur olarak bulunmuş ve MET'in metabolizasyonunda CYP3A4'ün bir rolünün olmayabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Malnütrisyon geliştirilen HCT-8 hücrelerinde MET'in A-B ve B-A permeabilitesi tek başına uygulandığında $4,81 \pm 0,14 \times 10^{-6}$; $5,71 \pm 0,18 \times 10^{-6}$ cm/sn, KET ile uygulandığında ise $4,28 \pm 0,07 \times 10^{-6}$; $5,53 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Malnütrisyon geliştirilen Caco-2 hücrelerinde MET'in permeabilitesi tek başına uygulandığında $4,15 \pm 0,04 \times 10^{-6}$; $3,80 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/sn, KET ile uygulandığında ise $4,60 \pm 0,33 \times 10^{-6}$; $4,33 \pm 0,06 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Böylece elde edilen bulgulara göre KET uygulaması ile MET'in permeabilite değerleri anlamlı olarak değişmemiştir ($p > 0,05$).

Kontrol ve malnütrisyonlu hücre grupları karşılaştırıldığında MET'in B-A permeabilitesi Caco-2 hücrelerinde KET ile uygulandığında malnütrisyonlu grupta artmıştır ($p < 0,001$).

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında HCT-8 ve Caco-2 hücre hatlarında MET'in permeabilitesi hem tek başına hem de PMAT inhibitörü olan VER varlığında incelenmiştir. HCT-8 hücrelerinde MET'in A-B ve B-A permeabilite değeri tek başına ve VER ile uygulandığında sırası ile $4,72 \pm 0,09 \times 10^{-6}$; $4,34 \pm 0,17 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $4,87 \pm 0,09 \times 10^{-6}$; $4,60 \pm 0,05 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, Caco-2 hücrelerinde MET'in A-B ve B-A permeabilite değeri tek başına ve VER ile uygulandığında sırası ile $4,12 \pm 0,04 \times 10^{-6}$; $3,77 \pm 0,09 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $4,47 \pm 0,12 \times 10^{-6}$; $4,27 \pm 0,12 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre KET uygulaması ile MET'in permeabilite değerleri anlamlı olarak değişmemiştir ($p > 0,05$). MET'in *Net flux* oranı HCT-8 ve Caco-2 hücreleri için sırasıyla 1,19 ve 0,92 olarak bulunmuştur.

Malnütrisyon geliştirilen HCT-8 hücrelerinde MET'in A-B ve B-A permeabilitesi tek başına uygulandığında $4,81 \pm 0,14 \times 10^{-6}$; $5,71 \pm 0,18 \times 10^{-6}$ cm/sn, KET ile uygulandığında ise $5,68 \pm 0,05 \times 10^{-6}$; $4,88 \pm 0,07 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Malnütrisyon geliştirilen Caco-2 hücrelerinde MET'in permeabilitesi tek başına uygulandığında $4,15 \pm 0,04 \times 10^{-6}$; $3,80 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ cm/sn, KET ile uygulandığında ise $4,76 \pm 0,11 \times 10^{-6}$; $3,84 \pm 0,02 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Böylece elde edilen bulgulara göre VER uygulaması ile MET'in permeabilite değerleri anlamlı olarak değişmemiştir ($p > 0,05$).

Kontrol ve malnütrisyonlu hücre grupları karşılaştırıldığında malnütrisyonlu grupta MET'in A-B ve B-A'ya permeabilitesi HCT-8 hücre hattında VER uygulaması ile artarken ($p < 0,05$), B-A permeabilitesi Caco-2 hücrelerinde azalmıştır ($p < 0,05$). Bunun sonucunda PMAT'ın MET absorpsiyonunda etkisinin olabileceği düşünülmüştür.

Malnütrisyonlu grupta MET'in permeabilitesindeki artışın malnütrisyonlu hücreler arası sıkı kavşakların gevşemesinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmüştür (8).

Literatürde MET'in permeabilitesi farklı yöntemler kullanılarak incelenmiştir. MET'in Caco-2 hücre hatları kullanılarak tayin edilen permeabilite değerleri $0,37 \times 10^{-6}$ cm/sn ile $54,8 \times 10^{-6}$ arasında değişmektedir (255-259). Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen permeabilite sonuçları literatür ile benzerlik göstermektedir.

Ayrıca, yüksek hız ve düşük maliyetli olan Paralel Yapay Membran Geçirgenlik Testi (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA) ile da MET'in permeabilitesi araştırılmıştır. MET'in PAMPA'dan tayin edilen permeabilite değeri $1,53 \pm 0,05 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur (260). Caco-2 hücrelerinden ve bağırsak perfüzyonu çalışmalarından tayin edilen permeabilite değerleri sırası ile $4,0 \times 10^{-5}$ cm/sn ve $2,0 \times 10^{-5}$ – $3,3 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak birbirlerine yakın bulunmuştur (221, 260-262). PAMPA ile tayin edilen MET permeabilitesi tez kapsamında yapılan Caco-2 ve

HCT-8 hücrelerinden elde edilen MET permeabilite değerlerine kıyasla daha yüksek olarak bulunmuştur.

PAMPA daha düşük maliyetli bir yöntem olsa da permeabilite çalışmalarında hücrelerin kullanımı bağırsak epitel hücrelerinin yapısını ve taşıma mekanizmalarını daha doğru temsil etmektedir. Ayrıca, hücre kullanılarak yapılan çalışmalarda aktif taşıma ve metabolizma gibi mekanizmaları da modellenebilmektedir. Teksin ve ark. PAMPA ile elde edilen permeabilite değerleri ile Caco-2 hücrelerinden elde edilen permeabilite değerlerini karşılaştırmışlardır. Metoprolol dahil olmak üzere etkin maddelerin (örn. asiklovir, atenolol, karbamazepin, ketoprofen, verapamil gibi) PAMPA ile bulunan permeabilite değerleri Caco-2 hücrelerine kıyasla genellikle daha düşüktür (260). Bu sonuçlar tez kapsamında hücreler kullanılarak yapılan transport çalışmalarından elde edilen permeabilite değerlerine kıyasla literatürde yer alan PAMPA sonucunun daha düşük olmasını açıklamaktadır.

Wu ve Benet'in ilaçların absorpsiyonları üzerinde taşıyıcı proteinlerin etkisini incelediği çalışmada metoprolol gibi Sınıf I'de yer alan ilaçların absorpsiyonları üzerinde taşıyıcı proteinlerin etkisinin minimum düzeyde olduğunu öne sürülmüştür. Bu durum Sınıf I'de yer alan ilaçların yüksek çözünürlük özelliklerinden dolayı GİS'te eksorptif taşıyıcıları doygunluğa ulaştıracak kadar yüksek oranda bulunmasına bağlamıştır. Sınıf III'te yer alan ilaçların absorpsiyonu üzerinde absorptif taşıyıcıların etkisinin daha baskın olduğu öngörülmektedir (104). Sınıf I'de yer alan MET'in inhibitör varlığında HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinden permeabilitesindeki değişiklikler anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar Wu ve Benet'in varsayımı ile tutarlıdır. Diğer yandan, tez kapsamında ATN'nin permeabilitesi/absorpsiyonu üzerine inhibitör etkisi incelenmediği için absorptif taşıyıcıların ATN'nin absorpsiyonu üzerine etkisi ek çalışmalar yapılarak araştırılabilir.

HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinden MET'in inhibitör varlığı ve yokluğundaki permeabilite değerleri birbirlerine yakın olarak bulunmuştur. ATN'nin permeabilite değerleri ise HCT-8 hücrelerinde Caco-2'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, Caco-2 hücrelerindeki permeabilite değerlerine göre ATN için *net flux* oranı 1,86

bulunmuş olup, ATN'nin P-gp substartı olup olmadığı araştırılabilir. Sonuç olarak HCT-8 hücreleri MET için Caco-2 hücrelerinin yerine kullanılması düşünülebilirken ATN için elde edilen sonuçların farklılığına dayanarak bu değişim için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Ayrıca hücrelerin birbirlerinin yerlerine kullanımının ilacın ince bağırsaktan absorpsiyon özelliklerine (transselüler ve paraselüler) dayandırılarak bir genelleme yapılabilmesi için daha fazla ilaç kullanılarak ek çalışmalar yapılmalıdır.

Hücre kültürü çalışmaları hayvan deneylerine kıyasla daha hızlı ve daha düşük maliyetli olsa da hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlar etkin maddelerin permeabilite değerleri için sınırlı bilgi sağlamaktadır. *In situ* bağırsak perfüzyonu ile permeabilite tayininde hayvanların kullanılması, canlı organizmanın temsiline olanak sağlamaktadır. Böylece elde edilen sonuçlar daha güvenilir olabilmektedir. Ayrıca, *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarında perfüze edilen segment(ler)e bağlı olarak etkin maddenin permeabilitesindeki değişiklikler değerlendirilebilmektedir. Böylece hücre kültürüne kıyasla daha fazla veri elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle hücre kültürü çalışmalarından sonra *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmaları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

5.3.2. *In situ* Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları

In situ Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Tekniği

Etkin maddelerin çözünürlük ve permeabilite değerlerine göre BSS sınıflandırması yapılmaktadır. Çözünürlük tayinlerinin yapılmasında genellikle shake-flask yöntemi önerilirken, permeabilite tayini için insanlarda farmakokinetik çalışmalar (kütle-denge ve mutlak biyoyararlanım çalışmaları), *in vivo* bağırsak perfüzyon çalışmaları, insan ya da hayvan bağırsak dokuları kullanılarak *in vitro* permeasyon çalışmaları ve tek tabakalı epitel hücre kültürlerinden *in vitro* permeasyon çalışmaları gibi birden fazla yöntem önerilmektedir (45). Hayvanlarda yapılan *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmaları nöral endokrin, lenfatik ve mezenterik kan dolaşımının korunması ve insanlarda yapılan *in vivo* deneylere benzer sonuçlar vermesinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (263). Bu nedenle tez kapsamında

yapılan çalışmalarda *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmaları yapılarak permeabilite değerlendirilmiştir.

İntestinal perfüzyon, 1958 yılında Schanker ve ark. tarafından önerilmiş olup ekonomik olması ve cerrahi tekniğin kolaylığından dolayı yaygın olarak kullanılmıştır (264). Bağırsaklardan absorpsiyon ve permeabiliteyi incelemek amacıyla perfüzyon çözeltisinin tek geçişli (*single pass*) (265, 266) veya sirkülasyonlu (*recirculation*) (267) olarak gerçekleştirildiği iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Doluisio ve ark. tarafından tanımlanan, perfüzyon çözeltisinin sirküle edildiği yöntemlerin (268) en büyük dezavantajı, zamanın fonksiyonu olarak perfüzyon çözeltisinden eksilen kısım ölçüldüğü için, absorpsiyonu düşük olan etkin maddelerle çalışıldığında hatalı sonuçlar verebilmesidir (269).

Tez kapsamında yapılacak *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarında permeabilitesi yüksek olan MET ve düşük olan ATN kullanılmıştır. Ayrıca, malnütrisyon gelişimine bağlı olarak ATN ve MET'in permeabilitelerinde değişiklik (artma/azalma) olacağı öngörülmektedir. Bu nedenle ATN ve MET'in bağırsaklardan permeabilite ve absorpsiyon özellikleri üzerinde malnütrisyonun etkisini incelemek amacıyla lümeninden kayıp esasına dayanan, Higuchi ve ark. tarafından önerilen, bağırsak segmentinin perfüzyon çözeltisinin tek geçişli (*single pass*) olarak perfüze edildiği yöntem kullanılarak üç farklı bağırsak segmenti (jejunum, ileum ve kolon) aynı anda perfüze edilmiştir (218). Böylece ATN ve MET için kontrol ve malnütrisyonlu gruplardan elde edilen permeabilite değerleri daha güvenilir olacak ve farklı bağırsak segmentlerinin eş zamanlı perfüzyonu gerçekleştirilebilecektir. Tek geçişli bağırsak perfüzyonunun dezavantajları arasında (i) perfüzyon çözeltisi sirküle edilmediği için fazla miktarlarda perfüzyon çözeltisine ihtiyaç duyulması, (ii) cerrahi işlem esnasında barsakların iyi temizlenememesi ve (iii) perfüze edilen segmentlerden kan sızıntısının olmasına bağlı olarak numunelerin lümen içeriği ile kontamine olabilmesidir. Bu nedenle, perfüzyon çözeltisi fazlası üstünden hazırlanmış, perfüze edilecek bağırsak segmentleri izole edildikten sonra serum fizyolojik ile yıkanmış ve gerekli önlemler alınarak kan sızıntısı oluşumu önlenmiştir.

Perfüzyon deneylerinde deney hayvanı olarak uygun boyutlu olması, kolay üretilmesi ve literatürde yaygın olarak kullanılmasından dolayı SD cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır (270). Perfüzyon çalışmalarında, perfüzyon çözeltisi olarak Golytely çözeltisi, MES tamponu ve HBSS gibi çeşitli çözeltiler kullanılmaktadır (271-273). Bunlardan MES tamponu kolay hazırlanır, kimyasal ve enzimatik olarak dayanıklıdır, biyoanalitik uygulamalarda sıklıkla kullanılır, suda çözünür ve pKa'sı sıcaklıktan etkilenmez (192, 274). Bu nedenle tez kapsamında yapılan perfüzyon çalışmalarında perfüzyon çözeltisi olarak MES tampon kullanılmıştır.

Perfüzyon Deneyleri

- **Su Dengesine Ulaşma Zamanının Tayini**

İntestinal epitelden su akışı paraselüler ve transselüler yollarla gerçekleşmektedir. GIS epitelinden suyun hareketi aktif iyonik transport veya ozmotik gradyanla gerçekleşmektedir. Yapılacak çalışmalarda, bağırsaklardan permeabilitesi olmayan (hemoglobin, radyoaktif olarak işaretlenmiş polietilen glikol ve fenol kırmızısı gibi) bir referans madde kullanılarak bağırsaklardaki su dengesinin incelenmesi gerekmektedir (275, 276). Referans maddeler arasında en yaygın olarak çeşitli konsantrasyonlarda (0,005-0,1 mg/mL) fenol kırmızısı kullanılmaktadır (24). Perfüzyon çözeltisine yüksek konsantrasyonda fenol kırmızısının kullanımı sonucu oluşan çözeltinin analizinde yüksek oranda seyreltmeye gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle perfüzyon çözeltisine sıfır permeabilite referans maddesi olarak eklenen fenol kırmızısı 0,1 mg/mL konsantrasyonunda kullanılmıştır.

Fenol kırmızısının bağırsağa giriş ve çıkış konsantrasyonlarının oranının bire eşit olması kararlı duruma ulaşma zamanıdır ve bağırsak segmentlerinde su dengesinin sağlandığının göstergesidir. Literatürde yer alan çalışmalarda bağırsak segmentleri için su dengesine ulaşma zamanı araştırılmıştır. Dahan ve Amidon'un çalışmasında proksimal jejunum, orta ince barsak ve distal ileum ortak olarak değerlendirilmiş ve su dengesine ulaşma süresi 1 saat olarak belirtilmiştir (Dahan and

Amidon, 2009). Diğer taraftan, Wagner ve ark. ise jejunum, ileum ve kolon için su dengesine ulaşma süresinin 30 dk olduğunu bildirmişlerdir (277). Zakeri Milani ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada jejunum için su dengesine ulaşma süresi 40 dk olarak belirlenmiştir (262). Bölümümüzde daha önce yapılan bağırsak perfüzyonu çalışmalarında fenol kırmızısının dengeye ulaşma zamanı jejunum, ileum ve kolon için sırasıyla 20, 15 ve 30 dk olarak belirlendiği için tez kapsamında yapılan çalışmalarda fenol kırmızısının kararlı duruma ulaşma süreleri tüm bağırsak segmentleri için 30 dk olarak kabul edilmiştir (278, 279).

- **Atenolol ve Metoprolol Tartaratın Permeabilitesini İncelemek Amacıyla Yapılan Çalışmalar**

ATN yüksek çözünürlük, düşük permabilite özelliği gösterdiği için BSS Sınıf III'te yer almaktadır. Düşük permabilite özelliği göstermesi nedeni ile elde edilen permabilite değerlerinde $\ln$ fonksiyonuna bağlı olarak negatif sonuçlar bulunmuştur. Ayrıca, MET için de numunelerin çoğu için pozitif permabilite değerleri bulunmuş olsa da bir kısmı negatiftir. Elde edilen bulgular üzerine literatür taraması yapılmıştır. Salphati ve ark. ATN ve MET'in de yer aldığı etkin maddeler kullanılarak yapmış olduğu *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışması sonuçları P_{eff} için kullanılan denkleme eksi işareti koyularak değerlendirilmiştir (220). Ayrıca Gökçe ve ark. tarafından yapılan çalışmada da P_{eff} değeri hesaplamak için kullanılan formüle eksi koyularak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir (222).

Wagner ve ark. tarafından yapılmış olan bir çalışmada farklı talinolol konsantrasyonları (0,025; 0,05; 0,1; 0,25 and 0,5 mmol/L) ve perfüzyon çözeltisinin sistemden farklı geçiş hızları (1,8; 3,6; 9,1; 18,2 and 36,4 mg/min) kullanılarak *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre özellikle düşük dozda (0,025 mmol/L) ve düşük hızda (1,8 mg/dk) uygulanan talinolol çözeltileri sonucunda elde edilen permabilite değerleri negatif olarak bulunmuştur (277). Talinolol BSS Sınıf II (düşük çözünürlük, yüksek permabilite)'de (138) yer almasına rağmen negatif P_{eff} değerleri elde edilmiştir.

Dahlgren ve ark. ATN, enalaprilat, ketoprofen ve MET etkin maddeleri ile yapmış olduğu *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışması sonuçları lümeniden kayıp esasına göre ve plazma etkin madde konsantrasyonlarının ölçülmesi ile değerlendirilmiştir. Lümeniden kayıp esasına dayalı olarak yapılan hesaplamalarda negatif permeabilite değerleri tespit edilmiştir. Permeabilite değerleri üç yaklaşım (negatif değerler işleme dahil edilerek, negatif değerler ihmal edilerek ve negatif değerler sıfır kabul edilerek) kullanılarak değerlendirilmiştir. Lümeniden kayıp esasına göre elde edilen sonuçlar plazma konsantrasyonları ölçülerek hesaplanan sonuçlarla kıyaslandığında lümeniden kayıp sonucu bulunan negatif değerlerin ihmal edilmemesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır (280).

Literatür araştırmaları sonucuna permeabilite için kullanılan denklemin Eşitlik 3.24.'te verilmiş ve permeabilite değerleri hesaplanarak $n=4$ üstünden değerlendirmeler yapılmıştır (Bkz. Tablo 4.24.).

- **Atenolol**

Kontrol grubunda (sağlıklı) yapılan çalışmalarda farklı bağırsak segmentlerinden tayin edilen permeabilite değerleri (jejunum: $3,74 \pm 0,19 \times 10^{-5}$ cm/sn; ileum: $4,39 \pm 0,90 \times 10^{-5}$ cm/sn, kolon: $26,53 \pm 4,92 \times 10^{-5}$ cm/sn (ortalama $\pm$ SH) ATN'nin absorpsiyonunun en yüksek olduğu segmentin kolon ve en düşük olduğu segmentin ise jejunum olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.24.).

Malnütrisyonlu grupta yapılan çalışmalarda ise farklı bağırsak segmentlerinden tayin edilen permeabilite değerleri (jejunum: $6,07 \pm 0,39 \times 10^{-5}$ cm/sn; ileum: $12,30 \pm 1,12 \times 10^{-5}$ cm/sn, kolon: $26,98 \pm 2,88 \times 10^{-5}$ cm/sn) ATN'nin absorpsiyonunun en yüksek olduğu segmentin kolon ve en düşük olduğu segmentin ise jejunum olduğunu göstermiştir. Kontrol ve malnütrisyonlu gruplar karşılaştırıldığında ATN'nin kolondan permeabilitesi malnütrisyonlu gruptan etkilenmezken ($p > 0,05$), jejunum ve ileumdan permeabilitesi malnütrisyonlu grupta azalmıştır ($p < 0,05$).

Literatürde ATN'nin bağırsaklardan permeabilitesini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (281-283). Lozoya-Agullo ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada erkek Wistar sıçanların (250-300 g) kolonu “closed loop” perfüzyon tekniği (268) ile perfüze edilmiştir. ATN'nin (500 µM) kolon permeabilitesi $2,32 \pm 0,21 \times 10^{-5}$ (ortalama $\pm$ SS, n=6-7) cm/sn ve absorpsiyon hız sabiti $0,429 \pm 0,038 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur (283). Venkatesh ve ark. (erkek SD sıçanlar: 250–350 g) tek geçişli *insitu* tek geçişli perfüzyon çalışması ile ATN'nin (400 µM) sıçan jejunumundan permeabilitesini $2,2 \pm 0,40 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak tayin etmiştir (281). Brouwers ve ark. tarafından sıçanlarda (erkek Wistar: ~350 g) gerçekleştirilen perfüzyon çalışmasında ATN'nin (50 mM) ileumdan permeabilitesi $0,2 \pm 0,0040 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur (282).

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda 400 µg/mL konsantrasyonunda uygulanan ATN'nin kontrol grubundaki permeabilitesi jejunum, ileum ve kolon için sırasıyla $3,74 \pm 0,19 \times 10^{-5}$; $4,39 \pm 0,90 \times 10^{-5}$ ve $26,53 \pm 4,92 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Bulunan değerler literatürdeki permeabilite değerlerinden farklıdır. Ayrıca, malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda *in situ* intestinal perfüzyon tekniği kullanılarak ATN'nin permeabilitesini inceleyen herhangi bir çalışma literatürde mevcut olmadığı için malnütrisyon geliştirilen sıçanlardan elde edilen permeabilite değerleri literatür ile kıyaslanamamıştır.

- **Metoprolol Tartarat**

Kontrol grubunda (sağlıklı) yapılan çalışmalarda farklı bağırsak segmentlerinden tayin edilen permeabilite değerleri (jejunum: $4,35 \pm 0,69 \times 10^{-5}$ cm/sn; ileum: $12,08 \pm 0,79 \times 10^{-5}$ cm/sn, kolon: $28,74 \pm 3,53 \times 10^{-5}$ cm/sn) MET'in absorpsiyonunun en yüksek olduğu segmentin kolon ve en düşük olduğu segmentin ise jejunum olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.27.).

Malnütrisyonlu grupta yapılan çalışmalarda ise farklı bağırsak segmentlerinden tayin edilen permeabilite değerleri (jejunum: $3,95 \pm 0,63 \times 10^{-5}$ cm/sn; ileum: $12,60 \pm 1,37 \times 10^{-5}$ cm/sn, kolon: $13,15 \pm 1,62 \times 10^{-5}$ cm/sn) MET'in

absorpsiyonunun en yüksek olduğu segmentin kolon ve en düşük olduğu segmentin ise jejunum olduğunu göstermiştir. Kontrol ve malnütrisyonlu gruplar karşılaştırıldığında MET'in jejunum ve ileumdan permeabilitesi malnütrisyonla etkilenmezken ($p > 0,05$), malnütrisyonla kolondan MET permeabilitesi azalmıştır.

Kontrol grubunda MET'in tek başına ve P-gp inhibitörü olarak kullanılan ELA'nın perfüzyon ortamına eklenmesiyle bağırsak segmentlerinden elde edilen permeabiliteleri jejunum, ileum ve kolon için sırasıyla $4,35 \pm 0,69 \times 10^{-5}$; $12,08 \pm 0,79 \times 10^{-5}$; $28,74 \pm 3,53 \times 10^{-5}$ cm/sn ve $3,95 \pm 0,65 \times 10^{-5}$; $12,10 \pm 1,88 \times 10^{-5}$; $28,02 \pm 4,08 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur.

Malnütrisyonlu grupta MET'in tek başına ve ELA'nın perfüzyon ortamına eklenmesiyle bağırsak segmentlerinden elde edilen permeabiliteleri jejunum, ileum ve kolon için sırasıyla $3,95 \pm 0,63 \times 10^{-5}$; $12,60 \pm 1,37 \times 10^{-5}$; $13,15 \pm 1,67 \times 10^{-5}$ cm/sn ve $4,68 \pm 0,89 \times 10^{-5}$; $18,03 \pm 2,63 \times 10^{-5}$; $13,23 \pm 1,62 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur.

Kontrol ve malnütrisyonlu hücre grupları karşılaştırıldığında MET'in permeabilitesinin ELA uygulaması ile anlamlı olarak değişmemiştir ($p > 0,05$). Elde edilen bulgulara göre MET'in absorpsiyonunda P-gp'nin bir rolünün olmayabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Literatürde MET'in bağırsaklardan permeabilitesini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (189, 273). Incecayir ve ark. tarafından erkek Wistar sıçanlar (250-310 g) ve BALB/c fareler (20-25 g) kullanılarak tek geçişli perfüzyon çalışması yapılmıştır. Metoprololün (400 µg/mL) sıçan jejunum ve ileumundan permeabilitesi sırasıyla $3,3 \pm 1,1 \times 10^{-5}$ ve $5,7 \pm 1,7 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunurken, farelerin jejunumundaki permeabilite değeri $5,5 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak tayin edilmiştir (189). Gulsun ve ark. erkek SD sıçanlarında (250-350 g) tek geçişli perfüzyon çalışması yapmış ve MET için tayin edilen permeabilite değerleri jejunum, ileum ve kolon için sırasıyla $5,77 \pm 3,37 \times 10^{-5}$; $4,33 \pm 0,48 \times 10^{-5}$ ve $10,50 \pm 3,15 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Segmentlerdenki permeabilite değerleri karşılaştırıldığında jejunum ile kolon ve ileum ile kolon arasındaki fark anlamlı bulunurken ($p < 0,05$) jejunum ile ileum arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (273).

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda 800 µg/mL konsantrasyonunda uygulanan MET'in permeabilitesi jejunum, ileum ve kolon için sırasıyla $4,35 \pm 0,69 \times 10^{-5}$, $12,08 \pm 0,79 \times 10^{-5}$ ve $28,74 \pm 3,53 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Bulunan değerler literatürdeki mevcut permeabilite değerleri ile karşılaştırıldığında jejunum için benzer permabilite değerleri elde edilirken, ileum ve kolon için elde edilen permeabilite değerleri literatüre göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda *in situ* intestinal perfüzyon tekniği kullanılarak MET'in permeabilitesini inceleyen herhangi bir çalışma literatürde mevcut olmadığı için malnütrisyon geliştirilen sıçanlardan elde edilen permeabilite değerleri literatür ile kıyaslanamamıştır.

MET'in referans olarak kullanıldığı HBSS, Golytely çözeltisi ve MES tamponu gibi çeşitli perfüzyon ortamları kullanılarak yapılan *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarında MET'in permeabiliteleri farklı bulunmuştur. HBSS kullanıldığında MET'in permeabilitesi jejunum, ileum ve kolon için sırasıyla 1,37; 4,83; $3,27 \times 10^{-5}$ cm/sn; Golytely çözeltisi kullanıldığında ise MET'in permeabilite değerleri sırasıyla 2,90; 2,71; $2,91 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur (278). HBSS kullanılarak yapılan perfüzyon deneylerinde MET'in permeabilite değerleri her bir bağırsak segmentinde birbirinden farklı bulunurken, Golytely çözeltisi kullanıldığında permeabilite değerleri tüm segmentler için birbirine yakın olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, Kaynak ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Golytely çözeltisi kullanılmış ve MET'in permeabilite değerleri jejunumdan $3,19 \pm 0,18 \times 10^{-5}$ cm/sn, ileumdan $6,39 \pm 0,24 \times 10^{-5}$ cm/sn, ve kolondan $8,43 \pm 0,52 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur (284). Perfüzyon ortamı olarak MES tamponu kullanıldığında ise MET'in permeabilitesi jejunum, ileum ve kolon için sırası ile $5,77 \pm 3,37 \times 10^{-5}$; $4,33 \pm 0,48 \times 10^{-5}$ ve $10,50 \pm 3,15 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur (273, 284). Böylece, kullanılan perfüzyon çözeltisinin permeabilite değerleri üstünde etkisinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Literatürde malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda MET'in permeabilitesini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmadığı için sonuçlar literatür ile kıyaslanamamıştır.

MET, BSS Sınıf I (yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite)'de yer almakta (285) ve etkin maddelerin permeabilite sınıflarını tayin etmek için referans olarak kullanılmaktadır (45, 286). Permeabilite değerleri MET'ten düşük olan etkin maddelerin düşük permeabiliteye sahip olduğu kabul edilmektedir (221). Ayrıca, logP değeri MET'in logP değerinden ($\log P=1,72$) daha düşük olan maddelerin permeabilitesinin düşük olduğu kabul edilmektedir (287). Tez kapsamında yapılan çalışmalarda tüm segmentlerinde ATN'nin permeabilitesi MET'ten daha düşük bulunmuştur. Böylece ATN'nin permeabilitesinin düşük olduğu yapılan deneysel çalışmalarla da kanıtlanmıştır.

5.3.3. İnsan Absorpsiyon Derecesinin Kestirimi Çalışmaları

Farmakokinetik parametrelerin türler arasında ekstrapole edilebilmesi için alometri gibi yöntemler kullanılmaktadır. Sıçanlarda yapılan *in situ* perfüzyon deneylerinden elde edilen permeabilite değerleri kullanılarak Fagerholm ve ark. tarafından 1996 yılında insan absorpsiyon derece kestirimlerinin yapılabileceği gösterilmiştir (288). Tez kapsamında sıçanlarda yapılan *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarından her bir bağırsak segmenti için elde edilen permeabilite değerleri kullanılarak insan P_{eff} ve absorpsiyon dereceleri kestirimleri yapılmıştır.

Kontrol ve malnütrisyonlu grupta hem ATN hem de MET için en yüksek absorpsiyon dereceleri kolonda bulunmuştur ($\sim \%1$). ATN'nin jejunum ve ileumdan absorpsiyon dereceleri malnütrisyonlu grupta artmıştır ($p < 0,01$). MET'in ise tek ve ELA ile uygulamasında kolondaki absorpsiyon derecesi malnütrisyonlu grupta azalmıştır ($p < 0,05$). Elde edilen sonuçlar permeabilite değerlerinin değişimi ile uyumlu bulunmuştur.

Lennernas ve ark. *single-pass* perfüzyon çalışmaları ile ATN ve MET'in insan jejunumundaki P_{eff} değerlerini araştırmıştır. Ortalama net sıvı akışı yaklaşık olarak 1,5-2,0 mL/sa/cm olarak tespit edilmiş ve segmente net bir sekresyon olduğu sonucuna ulaşılmıştır. P_{eff} değerleri *well-stirred* modele göre hesaplanmıştır. ATN ve MET'in P_{eff} değerleri sırası ile 0,2 ve $1,4 \times 10^{-4}$ cm/sn olarak bulunmuştur (289). Tez kapsamında

yapılan çalışmalarda benzer şekilde segmete sekresyon olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, sağlıklı insanlar için yapılan jejunumdan ATN ve MET'in kestirim sonuçları sırası ile $1,375 \pm 0,069$ ve $1,597 \pm 0,249 \times 10^{-4}$ cm/sn olarak bulunmuştur. ATN için bulunan permeabilite değerleri Lennernas ve ark.'na kıyasla daha yüksek bulunurken, MET için bulunan permeabilite değerleri birbirlerine yakındır.

In vitro çalışmalardan elde edilen ATN ve MET'in permeabilite değerleri *in situ* çalışmalardan elde edilen her bir bağırsak segmentindeki değerlere kıyasla daha küçük olarak bulunmuştur. *In vitro* ve *in situ* sistemler izole edilmiş sistemler olduğu için sağlamış oldukları bilgiler izole edilen bölgeye bağlı olarak sınırlıdır. Bu nedenle tez kapsamında *in vitro* ve *in situ* çalışmaların devamı niteliğinde karşılaştırma sağlanması için *in vivo* çalışmalar yapılmıştır.

5.4. *In vivo* Çalışmalar

Plazma ilaç konsantrasyonu-zaman eğrisinin doğru şekilde tanımlanabilmesi için kan örneği alma zamanlarının uygun şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, pilot çalışmalar için örnekleme zamanları literatürde yer alan örnekleme zamanları denenerek belirlenmiştir. Pilot çalışmalar sonucu elde edilen numuneler HPLC'de önceden valide edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. HPLC yönteminde ATN ve MET için LLOQ değerleri sırası ile 5,13 ve 4,97 µg/mL Bulunduğu için, plazma ilaç konsantrasyonlarının güvenilir tayinleri için, konsantrasyonlar LLOQ değerlerinden büyük olmalıdır. LLOQ değerlerinden küçük olan konsantrasyonlar profillerin oluşturulmasına dahil edilmemiştir. ATN ve MET'in uygulaması sonucu elde edilen plazma numunelerinden miktar tayinlerinin yapılabilmesi ve farmakokinetik profillerinin oluşturulabilmesi için sırasıyla 250 µg/mL ve 400 µg/mL dozları seçilmiştir.

ATN ve MET için yapılacak *in vivo* çalışmalarda doz ve kan örneği alma sıklığını belirlemek amacıyla pilot çalışmalar yapılmıştır. ATN (250 µg/mL) ve MET (400 µg/mL) tek doz olarak sıçanlara uygulanmıştır. ATN uygulanan kontrol ve malnütrisyonlu

gruptan elde edilen farmakokinetik profiller birbirlerine yakın bulunurken, MET uygulanan malnütrisyonlu grupların absorpsiyon fazları kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunurken eğri benzer şekilde inmiştir. Ayrıca, ELA uygulanan (5 mg/kg) kontrol grubu, sadece MET uygulanan malnütrisyonlu grubun profiline benzerlik göstermiştir. Diğer taraftan, ELA uygulanan malnütrisyonlu sıçanların plazma MET konsantrasyon-zaman eğrisinin inen kısmı yeterince kan örneği toplanamadığı için tanımlanamamıştır. Ayrıca, seçilen doz literatüre göre daha yüksek olduğu için enzimlerin/taşıyıcı proteinlerin doygunluğu ihtimali ortaya çıkmıştır.

5.5. Modelden Bağımsız Yöntem

Sıçanlarda yapılan *in vivo* farmakokinetik çalışmaların sonuçları modelden bağımsız yöntemle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ATN'nin sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanların farmakokinetik parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Diğer yandan, MET uygulaması sonucu elde edilen $AUC_{(0-\infty)}$, $AUC_{(0-t)}$, C_{maks} , ve t_{last} değerleri malnütrisyon geliştirilen grupta sağlıklı gruba göre anlamlı olarak artmıştır ($p \leq 0,05$). CL/F ve t_{maks} değerleri ise malnütrisyonlu grupta anlamlı olarak azalmıştır. Böylece malnütrisyonunda MET'e olan ilaç maruziyeti sağlıklı sıçanlara göre daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($p \leq 0,05$).

Modelden bağımsız yöntem, vücudu kompartmanlara ayırarak incelemeyi. Bu nedenle organların fizyolojik özelliklerinin ayrı değerlendirilmesi mümkün değildir. Malnütrisyonunda vücutta meydana gelen değişikliklere bağlı olarak model etkin maddelerin absorpsiyon özelliklerinin araştırılması amaçlandığı için modelleme çalışmaları yapılmıştır.

Literatürdeki birçok çalışmada sıçanlara oral yoldan ATN ve MET uygulanmıştır. Yoon ve ark. sağlıklı erkek SD sıçanlara (200-250 g, $n=5$) 1, 2 ve 5 mg/kg dozlarında oral yoldan MET uygulamış ve farmakokinetik parametreleri değerlendirmiştir. Elde edilen AUC , C_{maks} , t_{maks} , terminal $t_{1/2}$ ve renal klerens (CL_R) değerleri artan dozlar için sırası ile $3,04 \pm 0,390$; $6,61 \pm 1,23$; $61,5 \pm 18,7$ $\mu\text{g.dk/mL}$, $0,0610 \pm 0,0208$; $0,126 \pm 0,0508$; $0,828 \pm 0,177$ $\mu\text{g/mL}$, 20; 20; 30 dk, $31,0 \pm 9,50$; $36,6 \pm 5,55$; $45,4 \pm 8,27$ dk ve

5,14 $\pm$ 3,62; 4,34 $\pm$ 2,37; 3,31 $\pm$ 2,48 mL/dk/kg'dir. Ayrıca MET'in 0,5, 1 ve 2 mg/kg dozlarında IV infüzyon (1 dk) olarak uygulanması ile elde edilen sonuçlardan elde edilen CLR değerleri sırası ile 9,13 $\pm$ 2,83; 11,6 $\pm$ 3,09 ve 10,0 $\pm$ 4,14 mL/dk/kg olarak bulunmuştur. Diğer yandan CL_{toplam} değerleri artan dozlara göre sırası ile 71,9 $\pm$ 9,79; 76,8 $\pm$ 17,1 ve 71,3 $\pm$ 13,3 mL/dk/kg bulunmuştur. Böylece MET'in eliminasyonunda böbreklerin etkisinin ihmal edilebilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır (201).

Funai ve ark. sağlıklı erkek Wistar sıçanlara (7-8 haftalık, n=6) 1 mg/kg dozlarında oral yoldan ATN uygulamış ve farmakokinetik profilleri değerlendirmiştir. Elde edilen AUC_(0-∞), C_{maks}, ve t_{maks} değerleri sırası ile 307 $\pm$ 40 ng.sa/mL, 72,3 $\pm$ 7,2 ng/mL ve 2,83 $\pm$ 0,75 saattir (290).

Literatüde yapılan çalışmalarda ATN ve MET için daha düşük dozlarla çalışılmıştır ve bu nedenle elde edilen farmakokinetik parametre sonuçları tez kapsamında yapılan çalışmalara kıyasla daha küçük olarak bulunmuştur. Diğer yandan, ATN ve MET için literatürde yer alan birçok çalışmada farmakokinetik parametreler modelden bağımsız yöntem ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, farmakokinetik çalışmalarda yetersiz beslenen sıçanlarda ATN ve MET'in farmakokinetik profilleri değerlendirilmemiştir. Bu nedenle tez kapsamında yapılan çalışmalar literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır.

5.6. Minimal Fizyolojik Esaslı Farmakokinetik Modelleme Çalışmaları

Verrest ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda malnütrisyonla ilaçların absorpsiyonlarının, protein bağlanmasının, dağılım hacimlerinin ve klerenslerin hem arttığı hem de azaldığı tespit edilmiştir (103). Bu değişiklikler malnütrisyonla vücutta meydana gelen değişikliklerin yanında ilaca bağlı da olabilmektedir. Malnütrisyonla ilaçların farmakokinetiğindeki değişiklikleri incelemek için yapılan modelleme çalışmaları sınırlı sayıdadır.

Williams ve ark. malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda ketaminin farmakokinetik değerlendirmesi için lineer memeli plazma klerens (*linear mammillary plasma clearance*) modelleri kullanmışlardır (244). Modelleme çalışmaları ile malnütrisyon

sırasında absorpsiyon oranının arttığı ve klerensin azaldığı sonucuna ulaşılmıştır. Ketamin esas olarak CYP450 enzimleri (CYP2B6, 2C9 ve 3A4) tarafından metabolize edilmektedir ve yüksek oranda ilk geçiş metabolizmasına uğramaktadır. Diğer taraftan, Sjögren ve ark. sağlıklı ve malnütrisyonlu yetişkinler ile çocuklar arasındaki vücuttaki farklılıkları değerlendirmiştir (67). Doku bileşenlerindeki azalma, malnütrisyon seviyelerine göre tanımlanmış ve farklı malnütrisyon seviyelerinde fizyolojik değişikliklerin çocuklara korele edilmesine yönelik fizyolojik ölçeklendirme parametreleri belirlenmiştir. Böylece, malnütrisyonlu sanal pediatrik popülasyonlar oluşturulmuş ve bir PBPK modeli geliştirilmiştir. İlaça maruziyetteki değişiklikler (kafein, sefoksitin ve siprofloksasin için artış; lumefantrin, pirimetamin ve sülfadoksin için azalma) malnütrisyonla meydana gelen eliminasyon kapasitesindeki değişikliklere bağlanmıştır.

Tez kapsamında yapılan mPBPK modelleme çalışmaları ile oral uygulamayı takiben kontrol (sağlıklı) ve malnütrisyonlu sıçanlar için ATN ve MET'in farmakokinetiği değerlendirilmiştir. mPBPK modelleri anatomik ve fizyolojik özellikleri içerip yalnızca kan/plazma verileri mevcut olduğunda ilaçların plazma farmakokinetik profillerini başarıyla tanımlayabilmektedir. Ayrıca mPBPK modelleri, benzer kinetik özelliklere sahip dokuları birleştirerek '*lumping*' yaklaşımını içerdiğinden esnek özelliktedir (127). MET için mPBPK modeli karaciğer ve ilk geçiş etkisi de dahil edilerek, ATN modeli ise böbrek eklenerek genişletilmiştir. Tez çalışmalarından elde edilen oral profiller ve literatür IV verileriyle beraber mPBPK modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, K_p değerleri literatürden alınarak kullanılmış ve beta blokörlerin beklenen etkilerine uygun olarak kan akışları azaltılarak modelde tanımlanmıştır.

Malnütrisyonlu grupta ATN ve MET için artan biyoyararlanım (0,43'ten 0,67'ye ve 0,42'den 0,84'e) her iki absorpsiyon aşamasında daha yüksek absorpsiyon oranlarıyla ilişkilendirilmiştir. ATN için hesaplanan F değerinin MET'e göre daha az olması ATN'nin düşük permeabilite özelliğine bağlanabilmektedir. MET için elde edilen F, Q_h ve CL_{int} ile hesaplanan biyoyararlanımının 0,79 olması beklendiğinden ilk geçiş etkisiyle ilişkili olabilmektedir ($F^* = 1 - CL_h/Q_h$ 'den, $CL_h = IV \text{ Doz}/AUC$).

İlaçların absorpsiyonunu GIS'in farklı segmentlerinde farklılık göstermektedir (291). Tez kapsamında yapılan *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmaları sonucunda ATN ve MET'in absorpsiyonlarının farklı bağırsak segmentlerine göre değişiklik gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca, ATN ve MET'in sıçan bağırsağının farklı bölümlerindeki geçirgenliğini araştırmak için yapılan *in situ* çalışmaların sonuçları, ATN ve MET'in geçirgenliğinin GIS pH'sına bağlı olarak değişmesi nedeniyle her iki ilacın absorpsiyonunun da bölgeye bağlı olarak değiştiğini göstermiştir (292, 293). Bu nedenle, mPBPKs modellerinde ATN ve MET için iki veya üç absorpsiyon fazı tanımlanmıştır. Bu yaklaşıma benzer şekilde, oral uygulamadan sonra plazma ilaç konsantrasyonu-zaman profili aşamalarındaki farklılıklar, ilaçların GIS'te aşağı doğru hareket etmesiyle bölgeye bağlı absorpsiyon oranlarının değiştiği hatta bu değişikliğin biyoyararlanımı da sınırlayabildiği "sonlu absorpsiyon süresi (*finite absorption time*)" modelleri kullanılarak yorumlanmıştır (217, 294).

Malnütrisyonunda hücreler arasındaki sıkı kavşakların gevşemesine bağlı olarak ilaçların absorpsiyonu artabilmektedir (8). Ayrıca açlık ve malnütrisyon sırasında taşıyıcıların ekspresyon seviyeleri artmaktadır. Örneğin, OATP (sıçanlarda ve farelerde) ve OCT'nin (farelerde) gen ekspresyonu, açlık ve malnütrisyonunda artmıştır (295-297). ATN ve MET, OCT taşıyıcılarının substratlarıdır (154, 298, 299). Fakat, OCT'nin bağırsaklardaki ekspresyonunun ihmal edilecek kadar az olması nedeni ile OCT gen ekspresyonunun malnütrisyonadaki artışı, ATN ve MET'in absorpsiyonlarındaki değişikliği ile ilişkilendirilememiştir.

Optimizasyon (t_i değerleri) ve bulgularla birlikte popPK değerlendirmeleri de uygun uyumlar sağlamıştır. ADAPT'deki naif havuzlama ve birlikte uyum ile benzer sonuçlar bulunmuştur (Tablo 4.32.-4.35.).

5.6.1. Ön Modelleme Çalışmaları

mPBPK modelleri genellikle kan kompartmanı ile beraber bir ya da iki doku kompartmanı ile tanımlanmaktadır. Ayrıca, mPBPK modelleri karaciğer gibi organlar ile de genişletilerek ilk geçiş etkisinin de incelenmesine olanak sağlamaktadır (127). Cao ve Jusko tarafından yapılan bir çalışmada iki doku kompartmanlı mPBPK modeli karaciğerin ayrı bir kompartman olarak tanımlanması ile genişletilmiş ve karaciğerde ilk geçiş etkisine maruz kalan dihidrokodein, verapamil, repaglinid ve midazolamın farmakokinetik parametrelerinin kestirimleri başarıyla yapılmış ve ilk geçiş etkisi değerlendirilmiştir (127). Nan ve Jusko ise üç kompartmanlı mPBPK modelinde ayırmış oldukları karaciğer kompartmanını üç alt kompartmana bölerek her bir alt kompartmanın intrinsik klerensleri de modele dahil edilmiştir (208). Böylece karaciğerin mPBPK modellerinde ayrı bir kompartman olarak değerlendirilmesi yaygınlaşmıştır. Bu kapsamda ATN ve MET için geliştirilen ön modelde iki doku kompartmanlı mPBPK modeli kullanılmış olsa da ATN ve MET'in farmakokinetik özellikleri dikkate alınmış ve ana eliminasyon organları olan sırasıyla böbrek ve karaciğer, ayrı kompartmanlar olarak değerlendirilmiştir. Böylece hem ATN için hem de MET için 3 doku kompartmanlı mPBPK modelleri geliştirilmiştir.

Geliştirilen ön modeller, ATN ve MET için literatürden elde edilen referans IV profilleri kullanılarak test edilmiştir. Referans IV profillere ait veriler Web Plot Digitizer aracılığı ile elde edilmiştir. Verilerin bu şekilde elde edilmesi, asıl verilerden sapmaları da beraberinde getirebilmektedir. Bu nedenle orijinal verilerden elde edilecek sonuç ile tamamen aynı olamayabilmektedir. IV profillerin model uyumlarındaki az da olsa sapmalar bu nedene bağlanmıştır.

Literatürde yer alan IV ATN uygulamasını takiben elde edilen plazma ATN konsantrasyonu-zaman verileri kullanılarak çeşitli ön denemeler yapılmış ve model uyumu değerlendirilmiştir. Model uyumu en iyi olan Kumar ve ark. çalışmasından elde edilen ATN profili, referans olarak seçilmiştir (214). Ni ve ark. çalışması ise modelin eksternal validasyonunda kullanılmak üzere seçilmiştir (216). Referans olarak kullanılan IV profilindeki zaman noktaları ve her zaman noktasındaki örnek sayısı azdır.

Referans IV ATN'nin popülasyon analizlerinde mPBPK model uyumları GoF'a göre iyi bulunurken, oral profillerle birlikte uyumunda referans IV profilinde model kestirimlerinde saplamalar görülmektedir (Şekil 4.26.). Bu sapmaların nedeni, ortak uyuma bağlı olarak oral profillerle paylaşılan parametrelerle (f_d , K_p ve CL gibi) ilişkilendirilmiştir.

MET'in popülasyon analizlerinde bulunan sonuçlara göre malnütrisyonlu grubun iki absorpsiyon faz sabitleri birbirlerine çok yakın bulunmuştur (k_{01} M: 7,56 mg/dk/kg; k_{02} M: 7,12 mg/dk/kg). Bu nedenle malnütrisyonlu grup için tek absorpsiyon fazlı sıfıncı derece farmakokinetiğe göre kodlanarak değerlendirilmiştir. GoF ve oral profillerindeki farklılıkların değerlendirilebilmesi için kontrol ve malnütrisyonlu grup için iki absorpsiyon fazlı sıfıncı derece kinetiği tanımlanmıştır.

Literatürde yer alan IV MET uygulamasını takiben elde edilen plazma MET konsantrasyonu-zaman verileri kullanılarak çeşitli ön denemeler yapılmış ve model uyumu değerlendirilmiştir. Model uyumu en iyi olan, üç farklı dozda (0,5; 1 ve 2 mg/kg) MET uygulaması yapılan ve çeşitli zaman noktalarında birçok veri sağlayan Yoon ve ark. çalışmasından elde edilen MET profilleri, referans olarak seçilmiştir (201). Modelde yer alan K_p gibi parametreler için kaynak olarak kullanılan Cheung ve ark. çalışması sonucu elde edilen IV MET profili ise eksternal validasyon olarak kullanılmıştır (212). Ön modellerin değerlendirilmesinde kullanılan IV MET profillerinin karaciğer kompartmanı ile genişletilmiş toplam üç doku kompartmanlı mPBPK modeli kullanılarak önce ayrı ayrı sonra birlikte uyumları sağlanmıştır.

Lineer farmakokinetik özellik gösteren maddelerin farklı dozlarda uygulanması sonucu elde edilen AUC değerleri doz ile orantılı olarak artmakta/azalmaktadır. Yoon ve ark. 2 mg/kg dozda IV uygulanan MET'in AUC değerinin ($29 \pm 6,51 \mu\text{g.dk/mL}$) diğer dozlara kıyasla (0,5 mg/kg: $7,07 \pm 1,08 \mu\text{g.dk/mL}$ ve 13,5 mg/kg: $29 \pm 6,51 \mu\text{g.dk/mL}$) süperpozisyon kuralına uymadığı sonucuna ulaşılmıştır. Oral profiller ve üç MET dozu için birlikte uyumda IV 2 mg/kg MET dozu uygulamasına bağlı elde edilen profilde mPBPK model kestirimleri daha az olmuştur.

Birlikte profil uyumlarında çeşitli parametreler (f_d , K_p ve CL gibi) tüm profiller arasında paylaşılmaktadır. Literatürden alınan IV profiller ile *in vivo* deneyler sonucu elde edilen profillerin ortak uyumunda çeşitli kaynaklar kullanıldığı için profillerin farklılık göstermesi beklenmektedir. Bu farklılık nedeni ile profillerin ortak uyumunda IV referans profillerde de oral profillerde de sapmalar görülmektedir (Bkz. Şekil 4.34.).

5.6.2. Model İyileştirme ve Parametre Kestirimi

Oral uygulama sonucu her zaman noktasında absorbe olan ilaç miktarının belirlenmesi için dekonvülasyon yöntemi kullanılmaktadır. Rescigno ve Segre tarafından 1966 yılında önerilen dekonvülasyon yöntemi ile iki kompartman arasındaki transfer fonksiyonunun belirlenmesi sağlanmıştır (300). Benet ve Chiang tarafından 1974 yılında dekonvülasyonun ilaç absorpsiyonunun belirlenmesindeki uygulamaları ortaya koyulmuştur (301). Absorpsiyon sürecini tanımlayan transfer fonksiyonunun antitransformunu tahmin etmek için nokta-alan dekonvülasyon metodu önerilmiştir (301). Dekonvülasyon tekniği ile sıfırıncı ve birinci derece absorpsiyon hız sabitlerinin tahminleri de sağlanabilmektedir (215, 302). Bu nedenle tez kapsamında yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda elde edilen profillerin absorpsiyon fazlarının tanımlanması için referans IV profiller kullanılarak nokta-alan dekonvülasyon yöntemi ile yapılmıştır.

ATN için iki ve üç fazlı absorpsiyon denenmiş ve kontrol grubu için iki ve üç fazlı absorpsiyon profilleri arasında GoF açısından farklılık bulunmaması ile kontrol grubunun absorpsiyon fazı iki aşamalı olarak tanımlanmıştır. Diğer taraftan, ATN uygulanan malnütrisyonlu grupta absorpsiyon üç fazlı aşama olarak tanımlanmıştır.

Geliştirilen modellerin güvenilirliklerinin değerlendirilebilmesi için referans veri setinden farklı bir veri seti kullanılarak eksternal validasyon yapılmıştır. Bu kapsamda, referans IV verileri için mPBPK model kestirimleri kaydedilerek, eksternal veri seti için yapılacak simülasyonlarda sabitlenmiş ve doz eksternal veri setlerinde kullanılan dozlar modele tanımlanarak simülasyonlar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar

GoF'e göre değerlendirilmiştir. Eksternal validasyon için kullanılan ATN verilerin uyumları hem oral profiller ve referans IV profillerin toplu uyumunda kestirilerek (ADAPT 5) sabitlenen parametrelere hem de popülasyon uyumuna göre kestirilen parametrelerin (Monolix) sabitlenmesi ile elde edilen sonuçlara göre uygun bulunmuştur. Diğer taraftan, MET için geliştirilen mPBPK modelin eksternal validasyon çalışmasında popülasyon analizi sonucu elde edilen kestirilen parametrelerin (Monolix) sabitlenmesi ile olan uyum, ortak uyum sonucu kestirilen parametrelerin (ADAPT 5) sabitlenmesi ile olan uyumdan daha iyidir. ADAPT 5 sonuçları kullanılarak yapılan simülasyonlarda eliminasyon fazının son kısmında uyum sağlanamamıştır. Bu durumun, ortak uyum sonucu parametrelerde saplamaların görülebilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

ATN ve MET için modelden bağımsız yöntem ile hesaplanan AUC değerleri modeller ile hesaplanandan farklılık göstermektedir. Sağlıklı sıçanlarda ATN için modelden bağımsız yöntem, ADAPT 5 ve Monolix kullanılarak hesaplanan AUC değerleri sırasıyla $7317,98 \pm 39,77$; $6279,52$ ve $6750,443 \mu\text{g.dk/mL}$ iken malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda ise sırası ile $7951,27 \pm 950,06 \mu\text{g.dk/mL}$; $7289,91 \mu\text{g.dk/mL}$ ve $7655,095 \mu\text{g.dk/mL}$ 'dir. Diğer yandan, sağlıklı sıçanlarda MET için modelden bağımsız yöntem, ADAPT 5 ve Monolix kullanılarak hesaplanan AUC değerleri sırasıyla $3094,16 \pm 445,67 \mu\text{g.dk/mL}$; $1987,31 \mu\text{g.dk/mL}$ ve $2497,467 \mu\text{g.dk/mL}$ iken malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda ise sırası ile $5584,05 \pm 1503,22$; $2542,33$ ve $3835,368 \mu\text{g.dk/mL}$ 'dir. ATN ve MET için sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilmiş sıçanlarda modelden bağımsız ve modellemeler ile hesaplanan AUC değerleri birbirlerinden farklıdır ($p < 0,05$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- ***Analitik yöntem ve validasyonu***

- Literatürde ilk olarak ATN, MET ve FK'nin *in situ* perfüzyon çalışmalarından elde edilen numunelerden eş zamanlı tayin edilmesi için HPLC yöntemi geliştirilerek ICH M10 Biyoanalitik Yöntem Validasyonu kılavuzuna göre valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem ATN ve MET'in analizi için *in vitro* hücre kültürü çalışmaları için de başarıyla kullanılmıştır.
- ATN ve MET'in *in vivo* çalışmalarından elde edilen kan numunelerinden tayin edilebilmesi için *in situ* perfüzyon çalışmaları için geliştirilmiş olan HPLC yöntemi modifiye edilerek ICH M10 Biyoanalitik Yöntem Validasyonu kılavuzuna göre valide edilmiştir.

- ***Hücre kültürü çalışmaları***

- Hücre canlılığı testleri malnütrisyonlu hücrelerde ilk defa bu tez kapsamında yapılmıştır. Bu kapsamda hücrelerde akut ve kronik olmak üzere iki farklı malnütrisyon geliştirilerek hücre canlılığı testi yapılmış ve sonuçlar değerlendirilerek çift yönlü transport çalışmaları için optimum ilaç konsantrasyonları belirlenmiştir.
- Malnütrisyon geliştirilen hücrelerde çift yönlü transport çalışmaları ilk kez bu tez kapsamında yapılmıştır. HCT-8 ve Caco-2 hücrelerinde ATN ve MET uygulanarak çift yönlü transport çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca, MET'in absorpsiyonunda P-gp ve PMAT'ın, metabolizasyonda ise CYP3A4 enzimlerinin etkisinin incelenebilmesi amacı ile ELA, VER ve KET uygulamaları yapılarak MET'in permeabilite değişimi ve *net flux* oranları değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda PMAT'ın MET absorpsiyonunda etkisinin olabileceği görülmüştür.

- **Hayvan deneyleri**

- *In situ* bağırsak perfüzyonu ve *in vivo* çalışmalarda kullanılmak amacıyla sıçanlarda malnütrisyon geliştirilmiş ve malnütrisyon gelişimi sıçanlardaki ağırlık değişimi, serum albümin düzeyleri ve toplam kolesterol konsantrasyonları kontrol grubu ile kıyaslanarak kanıtlanmıştır. Malnütrisyon geliştirilen sıçanların ağırlıkları ve serum albümin düzeyleri kontrol grubuna kıyasla daha düşük ($p < 0,05$) bulunurken toplam kolesterol konsantrasyonu *in situ* perfüzyon çalışmalarındaki sağlıklı sıçanlara benzer, *in vivo* çalışmalarda kullanılacak kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).
- Malnütrisyon geliştirilen sıçanlarda *in situ* perfüzyon çalışmaları ilk kez bu tez kapsamında yapılmıştır. Sağlıklı (kontrol) ve malnütrisyonlu sıçanlarda *in situ* perfüzyon çalışmaları yapılarak ATN ve MET'in bağırsaktan permeabiliteleri tayin edilmiştir ve malnütrisyon grubunda ATN ve MET permeabiliteleri jejunum, ileum ve kolon için sırası ile $6,07 \pm 0,39$; $12,30 \pm 1,12$; $26,98 \pm 2,88 \times 10^{-5}$ cm/sn ve $3,95 \pm 0,63$; $12,60 \pm 1,37$; $13,15 \pm 1,62 \times 10^{-5}$ cm/sn olarak bulunmuştur. *In vitro* ve *in situ* çalışmalarda MET permeabilitesi ELA uygulanması ile değişmediği için MET absorpsiyonunda P-gp'nin etkisinin olmayabileceği tespit edilmiştir.
- *In situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarında elde edilen permeabilite değerleri insanlardaki absorpsiyon derecelerinin kestiriminde kullanılmış ve hem ATN hem de MET için hem kontrol (ATN: %0,91; MET: %0,99) hem de malnütrisyonlu gruplarda (ATN: %0,96; MET: %0,46) en yüksek kolonda bulunmuştur. ELA uygulanan kontrol grubunda en yüksek absorpsiyon derecesi kolonda bulunurken (%1,04), malnütrisyonlu grupta ileumdaki absorpsiyon derecesi diğer segmentlere kıyasla daha büyük olarak bulunmuştur (%0,67).
- Sağlıklı ve malnütrisyonlu sıçanlara oral olarak tek doz uygulanan ATN (250 mg/kg) ve MET (400 mg/kg) uygulanarak *in vivo* çalışmalar yapılmış ve plazma konsantrasyon profilleri elde edilmiştir. Modelden bağımsız yöntemle tayin edilen farmakokinetik veriler değerlendirilmiş ve malnütrisyonunda hem ATN hem de MET'in AUC değerlerinin arttığı tespit edilmiştir.
- ELA varlığında MET'in kandaki konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir.

- Plazma konsantrasyon zaman profillerinin modellenmesinde mPBPK modeller geliştirilmiştir. *In vivo* çalışmalarda kullanılan sıçanlardan elde edilen profillerden popülasyonlar oluşturulmuştur. Farmakokinetik profillerin dağılım ve eliminasyonları literatürden alınan ve referans olarak kullanılan IV profillerin popülasyon analizleri kullanılarak mPBPK modelleri ile parametre kestirimleri yapılmış ve kestirilen parametreler oral profiller için sabitleştirilmiştir.
- Modelleme çalışmaları ATN (kontrol) ve MET (kontrol ve malnütrisyonlu) için iki, malnütrisyonlu sıçanlara uygulanan ATN için ise üç aşamalı sıfırıncı derece absorpsiyon gösterdiğine işaret etmiştir. ATN'nin malnütrisyon grubunda k_{oi} değerleri kontrol grubuna benzer bulunmuştur. MET uygulanan malnütrisyon grubunda ise absorpsiyon hız sabitleri artmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular model ilaç olarak kullanılan ve bağırsaklardan sırasıyla parasetamol ve transselüler olarak geçen ATN (kontrol grubu jejunum: $3,74 \pm 0,19 \times 10^{-5}$ cm/sn; ileum: $4,39 \pm 0,90 \times 10^{-5}$ cm/sn, malnütrisyonlu grup: jejunum: $6,07 \pm 0,39 \times 10^{-5}$ cm/sn; ileum: $12,30 \pm 1,12 \times 10^{-5}$ cm/sn) ve MET'in (kontrol grubu kolon: $28,74 \pm 3,53 \times 10^{-5}$ cm/sn; malnütrisyonlu grup kolon: $13,15 \pm 1,62 \times 10^{-5}$ cm/sn) malnütrisyonunda permeabilite ve absorpsiyonunun değiştiğini desteklemektedir. Bu değişikliklerin nedenlerini incelemek amacıyla farklı bağırsak segmentlerindeki taşıyıcı protein ve enzim ekspresyon düzeyleri incelenebilir.

BSS Sınıf I'de yer alan ilaçların çözünürlüklerinin yüksek olması nedeni ile GİS'te eksorptif taşıyıcıları doygunluğa ulaştıracak kadar yüksek oranda bulunabileceğinden dolayı Wu ve Benet, taşıyıcı proteinlerin etkisinin Sınıf I'de yer alan ilaçların absorpsiyonu üzerine minimal düzeyde olacağını varsaymışlardır. Diğer yandan, Sınıf III'te yer alan ilaçların absorpsiyonu üzerinde absorptif taşıyıcıların etkisinin daha baskın olduğu öngörülmektedir (104). MET, Sınıf I'de yer almaktadır ve inhibitör varlığında MET'in permeabilitesindeki değişiklik anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar Wu ve Benet'in varsayımı ile tutarlıdır. Tez kapsamında ATN'nin

permeabilitesi/absorpsiyonu üzerine inhibitör etkisi incelenmediği için absorptif taşıyıcıların ATN'nin absorpsiyonu üzerine etkisi ek çalışmalar yapılarak araştırılabilir.

Oral ve IV uygulama ile malnütrisyonunda model ilaçların hem mutlak biyoyararlanımları değerlendirilebilir hem de elde edilen veriler modelleme çalışmalarında referans olarak kullanılabilir. Malnütrisyonu bağlı olarak vücutta meydana gelen değişiklikler, dokularda biriken ilaç miktarını da etkileyebileceği için *in vivo* çalışmalarda plazma verilerine ilave olarak doku konsantrasyonları belirlenip mPBPK model PBPK model olarak genişletilerek plazma ve doku konsantrasyonları kullanılıp, daha çok parametrenin daha güvenilir olarak kestirimleri yapılabilir.

Türkiye’de malnütrisyon riski ile ilgili yapılan bir araştırmalarda hastanelerde yatan hastalarda malnütrisyon riskinin yaygın olduğu (%15) sonucuna ulaşılmıştır (303). Tez çalışmalarından elde edilen sonuca göre malnütrisyonunda ilaçların farmakokinetiğindeki değişiklikler meydana gelebileceği kanıtlanmıştır. Bu durum, hastanede yatan malnütrisyonlu hastalar için ilaç dozlarının düzenlenmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Diyet değişikliğine bağlı olan vejetaryenlik ve veganlık dünya genelinde gittikçe artmaktadır. Vejetaryen bireyler et ve balık gibi hayvan kaynaklı gıdaları tüketmezken hayvansal yan ürünleri (süt ürünleri, yumurta ve bal gibi) tüketmektedir. Vegan bireyler ise hem et ve balık dahil hiçbir hayvansal ürünleri hem de hayvansal yan ürünleri tüketmemektedir. Böylece besin öğelerinin alımı vejetaryen/vegan olmayan bireylere kıyasla farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle vejetaryen/vegan bireyler için farklı diyetler mevcuttur. Vejetaryen ve vegan diyetlerindeki besinler ilaçların emilimini ve absorpsiyonunu etkileyebilir. Örneğin, bitkisel proteinlerin ve B12 vitamininin eksikliği, bazı ilaçların emilimini ve metabolizmasını etkileyebilir. Diğer yandan, bu diyetlerdeki besinler, vücuttaki mikrobiyotayı etkileyebilir ve böylece ilaçların metabolizması değişebilir. Böylece vejetaryen/vegan bireylerde ilaçların farmakokinetik profili etkilenebilmektedir. Bu nedenle, vejetaryen/vegan birey popülasyonları üzerinde de diyetisyenler ile iş birliği içerisinde çeşitli çalışmalar

yapılması gerekmektedir. Vejetaryen ve vegan bireylerin ilaç tedavisinde dikkatli olunması ve gerekirse ilaçların dozlarının ayarlanması gerekmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Nnakwe N. The effect and causes of protein-energy malnutrition in Nigerian children. *Nutr Res.* 1995;15(6):785-94.
2. Waitzberg DL, Ravacci G, Raslan M. Desnutrición hospitalaria. *Nutr hosp.* 2011;26(2):254-64.
3. Hoffer LJ. Clinical nutrition: 1. Protein–energy malnutrition in the inpatient. *CMAJ.* 2001;165(10):1345-9.
4. Greene JB. Clinical approach to weight loss in the patient with HIV infection. *Gastroenterol Clin North Am.* 1988;17(3):573-86.
5. Reilly JJ, Weir J, McColl JH, Gibson BE. Prevalence of protein-energy malnutrition at diagnosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;29(2):194-7.
6. Schaible UE, Kaufmann SHE. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med.* 2007;4(5):e115.
7. Krishnaswamy K. Drug metabolism and pharmacokinetics in malnourished children. *Clin Pharmacokinet.* 1989;17:68-88.
8. Ferraris RP, Carey HV. Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annu Rev Nutr.* 2000;20(1):195-219.
9. Mayhew TM. Striated brush border of intestinal absorptive epithelial cells: stereological studies on microvillous morphology in different adaptive states. *J Electron Microsc Tech.* 1990;16(1):45-55.
10. Lunn P, Northrop-Clewes C, Downes R. Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants. *The Lancet.* 1991;338(8772):907-10.
11. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1981.
12. Laurence Brunton BK, Randa Hilal-Dandan. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 14th Edition. 2022.
13. Chillistone S, Hardman J. Factors affecting drug absorption and distribution. *Anaesth Intensive Care Med.* 2008;9(4):167-71.
14. Hörter D, Dressman J. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):75-87.

15. Kwon Y. Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists: Springer Science & Business Media; 2001.
16. Venkatesvarlu V. Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. Hyderabad: Global Media; 2008.
17. Rowland M, Tozer, T. N. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications. Netherlands: Wolters Kluwer; 2011.
18. Aulton ME, Taylor K. Aulton's pharmaceutics. The design and manufacture of medicines. 2007;3:176-8.
19. Channer KS, Virjee JP. The effect of size and shape of tablets on their esophageal transit. J Clin Pharmacol. 1986;26(2):141-6.
20. Selen A. Factors influencing bioavailability and bioequivalence, bioequivalence and therapeutic equivalence. In: Swarbrick J, editor. Pharmaceutical Bioequivalence. New York: Marcel Dekker; 1991.
21. Shargel L, Yu, A. B. C. . Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics: London: Prentice-Hall International Inc.; 1993.
22. Washington N, Washington, C., Wilson, C. G. . Physiological Pharmaceutics: Barriers to Drug Absorption. 2001:1-18.
23. Biber B, Lundgren O, Svanvik J. The influence of blood flow on the rate of absorption of ⁸⁵Kr from the small intestine of the cat. Acta Physiol Scand. 1973;89(2):227-38.
24. Şener E. Barsaklardan İlaç Absorpsiyonu Üzerine Kapsaisin Etkisinin Araştırılması: Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara; 2010.
25. Prasanna JL, Deepthi B, Rao NR. Rectal drug delivery: A promising route for enhancing drug absorption. Asian J Pharm Res. 2012;2(4):143-9.
26. Pade V, Stavchansky S. Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model. Pharm Res. 1997;14:1210-5.
27. Collett A, Walker D, Sims E, He Y-L, Speers P, Ayrton J, et al. Influence of morphometric factors on quantitation of paracellular permeability of intestinal epithelia in vitro. Pharm Res. 1997;14:767-73.

28. Chiou WL, Chen TM, Choo YS, Abdel-Hameed MH. Alternative derivation for the gastrointestinal absorption residence time. *J Pharm Sci.* 1992;81(5):486-7.
29. Lennernas H, Ahrenstedt O, Ungell A. Intestinal drug absorption during induced net water absorption in man; a mechanistic study using antipyrine, atenolol and enalaprilat. *Br J Clin Pharmacol.* 1994;37(6):589-96.
30. Suttle AB, Brouwer K. Bile flow but not enterohepatic recirculation influences the pharmacokinetics of ranitidine in the rat. *DMD.* 1994;22(2):224-32.
31. Bijlsma PB, Peeters RA, Groot JA, Dekker PR, Taminiau JA, Van Der Meer R. Differential in vivo and in vitro intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: a hypothesis. *Gastroenterology.* 1995;108(3):687-96.
32. Collett A, Sims E, Walker D, He Y-L, Ayrton J, Rowland M, et al. Comparison of HT29-18-C 1 and Caco-2 cell lines as models for studying intestinal paracellular drug absorption. *Pharm Res.* 1996;13:216-21.
33. Lane ME, O'Driscoll CM, Corrigan OI. The relationship between rat intestinal permeability and hydrophilic probe size. *Pharm Res.* 1996;13:1554-8.
34. Schanker LS. On the mechanism of absorption of drugs from the gastrointestinal tract. *J Med Pharm Chem.* 1960;2(4):343-59.
35. Grass GM. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;23(1-3):199-219.
36. Egan WJ, Lauri G. Prediction of intestinal permeability. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(3):273-89.
37. Pang KS. Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series). *DMD.* 2003;31(12):1507-19.
38. Blume HH, Schug BS. The biopharmaceutics classification system (BCS): class III drugs—better candidates for BA/BE waiver? *Eur J Pharm Sci.* 1999;9(2):117-21.
39. Hirtz J. The gastrointestinal absorption of drugs in man: a review of current concepts and methods of investigation. *Br J Clin Pharmacol.* 1985;19(S2):77S-83S.

40. Jamei M, Turner D, Yang J, Neuhoﬀ S, Polak S, Rostami-Hodjegan A, et al. Population-based mechanistic prediction of oral drug absorption. *The AAPS Journal*. 2009;11:225-37.
41. Del Amo EM, Heikkinen AT, Mönkkönen J. In vitro–in vivo correlation in p-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption. *Eur J Pharm Sci*. 2009;36(2-3):200-11.
42. Ritschel WA, Denson DD. Influence of disease on bioavailability. *Pharm Sci*. 1991;48:67-115.
43. EMA. Guideline on the Investigation of Bioequivalence. 2010.
44. FDA. Guidance for industry, M9 biopharmaceutics classification system based biowaivers. 2021.
45. FDA. Guidance for industry, waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. 2000.
46. FDA. Guidance for industry, waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Draft guidance. 2015.
47. Bain LE, Awah PK, Geraldine N, Kindong NP, Siga Y, Bernard N, et al. Malnutrition in sub-saharan Africa: burden, causes and prospects. *Pan Afr Med J*. 2013;15(1).
48. Alou MT, Golden MH, Million M, Raoult D. Difference between kwashiorkor and marasmus: Comparative meta-analysis of pathogenic characteristics and implications for treatment. *Microb Pathog*. 2021;150:104702.
49. Manary MJ, Broadhead RL, Yarasheski KE. Whole-body protein kinetics in marasmus and kwashiorkor during acute infection. *Am J Clin*. 1998;67(6):1205-9.
50. Scrimshaw NS, Viteri FE. INCAP studies of kwashiorkor and marasmus. *Food Nutr Bull*. 2010;31(1):34-41.
51. McLaren DS. A fresh look at protein-calorie malnutrition. *The Lancet*. 1966;288(7461):485-488.
52. Walker A. Classification of infantile malnutrition. *The Lancet*. 1970;296(7681):1028.

53. Akombi BJ, Agho KE, Merom D, Renzaho AM, Hall JJ. Child malnutrition in sub-Saharan Africa: A meta-analysis of demographic and health surveys (2006-2016). *PLoS One*. 2017;12(5):e0177338.
54. Onis Md, Garza C, Onyango A, Martorell R. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. 2006.
55. Waterlow J. Classification of nutritional status. *The Lancet*. 1975;306(7932):463-4.
56. WHO. Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. 1999.
57. WHO. Pocket book of hospital care for children: guidelines for the management of common childhood illnesses. 2013.
58. Cederholm T, Barazzoni R, Austin P, Ballmer P, Biolo G, Bischoff SC, et al. ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. *Clin Nutr*. 2017;36(1):49-64.
59. EMA. Reflection paper on investigation of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the obese population. Draft guidance. 2018.
60. Gomez F, Ramos Galvan R, Frenk S, Cravioto Munoz J, Chávez R, Vázquez J. Mortality in second and third degree malnutrition. 1956.
61. Cant JP, McBride BW, Croom Jr WJ. The regulation of intestinal metabolism and its impact on whole animal energetics. *J Anim Sci*. 1996;74(10):2541-53.
62. Worthington BS, Boatman ES, Kenny GE. Intestinal absorption of intact proteins in normal and protein-deficient rats. *Am J Clin*. 1974;27(3):276-86.
63. Heyman M, Boudraa G, Sarrut S, Giraud M, Evans L, Touhami M, et al. Macromolecular transport in jejunal mucosa of children with severe malnutrition: a quantitative study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1984;3(3):357-63.
64. Lavie CJ, Alpert MA, Arena R, Mehra MR, Milani RV, Ventura HO. Impact of obesity and the obesity paradox on prevalence and prognosis in heart failure. *JACC: Heart Failure*. 2013;1(2):93-102.
65. Forbes GB, Welle SL. Lean body mass in obesity. *Int J Obes*. 1983;7(2):99-107.
66. Oshikoya KA, Sammons HM, Choonara I. A systematic review of pharmacokinetics studies in children with protein-energy malnutrition. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66:1025-35.

67. Sjögren E, Tarning J, Barnes KI, Jonsson EN. A physiologically-based pharmacokinetic framework for prediction of drug exposure in malnourished children. *Pharmaceutics*. 2021;13(2).
68. Samotra K, Gupte S, Raina R. Pharmacokinetics of gentamicin in protein-energy malnutrition. *Eur J Clin Pharmacol*. 1985;29:255-6.
69. Treluyer J, Sultan E, Alexandre J, Roux A, Flouvat B, Lagardere B. P Pharmacokinetics of aspirin in African children-influence of nutritional status. *Archives Francaises De Pediatrie*. 1991;48(5):337-41.
70. Lares-Asseff I, Cravioto J, Santiago P, Pérez-Ortíz B. Pharmacokinetics of metronidazole in severely malnourished and nutritionally rehabilitated children. *Clin Pharmacol Ther*. 1992;51(1):42-50.
71. Mehta S, Kalsi H, Jayaraman S, Mathur V. Chloramphenicol metabolism in children with protein-calorie malnutrition. *Am J Clin*. 1975;28(9):977-81.
72. Mehta S, Nain C, Sharma B, Mathur V. Metabolism of sulfadiazine in children with protein calorie malnutrition. *Pharmacology*. 1980;21(6):369-74.
73. Mehta S, Nain C, Yadav D, Sharma B, Mathur V. Disposition of acetaminophen in children with protein calorie malnutrition. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1985;23(6):311-5.
74. Bano G, Raina R, Sharma D. Pharmacokinetics of carbamazepine in protein energy malnutrition. *Pharmacology*. 1986;32(4):232-6.
75. Walker O, Dawodu A, Salako L, Alván G, Johnson A. Single dose disposition of chloroquine in kwashiorkor and normal children-evidence for decreased absorption in kwashiorkor. *Br J Clin Pharmacol*. 1987;23(4):467-72.
76. Eyberg C, Moodley, GP, Buchanan N. The pharmacology of malnutrition-Part I. Salicylate binding studies using normal serum/plasma and kwashiorkor serum. *S Afr Med J*. 1974;48(61):2565-7.
77. Buchanan N, Van der Walt L, Strickwold B. Pharmacology of malnutrition III: Binding of digoxin to normal and kwashiorkor serum. *J Pharm Sci*. 1976;65(6):914-6.
78. Buchanan N. Drug-protein binding and protein energy malnutrition. *S Afr Med J*. 1977;52(18):733-7.
79. Buchanan N, van der Walt L. The binding of antituberculous drugs to normal and kwashiorkor serum. *S Afr Med J*. 1977;52(13):522-5.

80. Buchanan N, Van der Walt L. The binding of chloroquine to normal and Kwashiorkor serum. *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26(5 Pt 1):1025-7.
81. Treluyer J, Roux A, Mugnier C, Flouvat B, Lagardere B. Metabolism of quinine in children with global malnutrition. *Pediatr Res.* 1996;40(4):558-63.
82. Pérez-Pitarch A, Guglieri-López B, Nacher A, Merino V, Merino-Sanjuán M. Impact of undernutrition on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of anticancer drugs: a literature review. *Nutr Cancer.* 2017;69(4):555-63.
83. Melander A. Influence of food on the bioavailability of drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1978;3:337-51.
84. Toothaker RD, Welling PG. The effect of food on drug bioavailability. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1980;20:173-99.
85. Viteri FE, Flores JM, Alvarado J, Béhar M. Intestinal malabsorption in malnourished children before and during recovery: Relation between severity of protein deficiency and the malabsorption process. *AJDD.* 1973;18(3):201-11.
86. Akinyinka O, Sowunmi A, Honeywell R, Renwick A. The pharmacokinetics of caffeine in Nigerian children suffering from malaria and kwashiorkor. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;56:153-8.
87. Bridges J, Age W. Drug-serum protein interactions and their biological significance. *Progr. Drug Metabol.* 1976;1:193-247.
88. Krishnaswamy K. Drug xenobiotic metabolism in undernutrition. *Proc. Nutr. Soc. of India.* 1986;32:35-42.
89. Wilkinson G. Plasma Binding, Distribution, and Elimination. *Drugs and Nutrients*: CRC Press; 2020. p. 21-49.
90. Eriksson M, Paalzow L, Bolme P, Mariam T. Pharmacokinetics of theophylline in Ethiopian children of differing nutritional status. *Eur J Clin Pharmacol.* 1983;24:89-92.
91. Pussard E, Barennes H, Daouda H, Clavier F, Sani AM, Osse M, et al. Quinine disposition in globally malnourished children with cerebral malaria. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65(5):500-10.
92. Mehta S. Malnutrition and drugs: clinical implications. *Dev Pharmacol Therap* 1990;15(3-4):159-65.

93. Oshikoya KA, Senbanjo IO. Pathophysiological changes that affect drug disposition in protein-energy malnourished children. *Nutr Metab.* 2009;6:1-7.
94. Alleyne GA. The effect of severe protein calorie malnutrition on the renal function of Jamaican children. *Pediatrics.* 1967;39:400-411.
95. Erstad BL, Barletta JF. Implications of obesity for drug administration and absorption from subcutaneous and intramuscular injections: a primer. *AJHP.* 2022;79(15):1236-44.
96. Cardoso-Júnior A, Gonzaga Vaz Coelho L, Savassi-Rocha PR, Vignolo MC, Abrantes MM, Miranda de Almeida A, et al. Gastric emptying of solids and semi-solids in morbidly obese and non-obese subjects: an assessment using the 13 C-octanoic acid and 13 C-acetic acid breath tests. *Obes Surg.* 2007;17:236-41.
97. Cho S-J, Yoon I-S, Kim D-D. Obesity-related physiological changes and their pharmacokinetic consequences. *J Pharm Investig.* 2013;43:161-9.
98. Barras M, Legg A. Drug dosing in obese adults. *Aust Prescr.* 2017;40(5):189.
99. Chagnac A, Herman M, Zingerman B, Erman A, Rozen-Zvi B, Hirsh J, et al. Obesity-induced glomerular hyperfiltration: its involvement in the pathogenesis of tubular sodium reabsorption. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(12):3946-52.
100. Morgan ET. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(4):434-8.
101. Brill MJ, Diepstraten J, van Rongen A, Van Kralingen S, van den Anker JN, Knibbe CA. Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children. *Clin Pharmacokinet.* 2012;51:277-304.
102. Pierre V, Johnston C, Ferslew B, Brouwer K, Gonzalez D. Population pharmacokinetics of morphine in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and healthy adults. *CPT:PSP.* 2017;6(5):331-9.
103. Verrest L, Wilthagen EA, Beijnen JH, Huitema AD, Dorlo TP. Influence of malnutrition on the pharmacokinetics of drugs used in the treatment of poverty-related diseases: a systematic review. *Clin Pharmacokinet.* 2021;60:1149-69.
104. Wu C-Y, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a

biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res.* 2005;22:11-23.

105. Cheymol G. Effects of obesity on pharmacokinetics: implications for drug therapy. *Clin Pharmacokinet.* 2000;39:215-31.
106. Hanley MJ, Abernethy DR, Greenblatt DJ. Effect of obesity on the pharmacokinetics of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49:71-87.
107. Alobaid AS, Hites M, Lipman J, Taccone FS, Roberts JA. Effect of obesity on the pharmacokinetics of antimicrobials in critically ill patients: a structured review. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47(4):259-68.
108. Reiss RA, Haas CE, Karki SD, Gumbiner B, Welle SL, Carson SW. Lithium pharmacokinetics in the obese. *Clin Pharmacol Ther.* 1994;55(4):392-8.
109. Le Jeune C, Poirier J, Cheymol G, Ertzbischoff O, Engel F, Hugues F. Pharmacokinetics of intravenous bisoprolol in obese and non-obese volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;41:171-4.
110. Lavé T, Parrott N, Grimm H, Fleury A, Reddy M. Challenges and opportunities with modelling and simulation in drug discovery and drug development. *Xenobiotica.* 2007;37(10-11):1295-310.
111. Jones H, Rowland-Yeo K. Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. *CPT:PSP.* 2013;2(8):1-12.
112. Rowland M, Peck C, Tucker G. Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011;51(1):45-73.
113. Wagner C, Jantratid E, Kesisoglou F, Vertzoni M, Reppas C, Dressman JB. Predicting the oral absorption of a poorly soluble, poorly permeable weak base using biorelevant dissolution and transfer model tests coupled with a physiologically based pharmacokinetic model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;82(1):127-38.
114. Teorell T. Kinetics of distribution of substances administered to the body, I: The extravascular modes of administration. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1937;57:205-25.
115. Bischoff K, Dedrick R. Thiopental pharmacokinetics. *J Pharm Sci.* 1968;57(8):1346-51.

116. Bischoff K, Dedrick R, Zaharko D. Preliminary model for methotrexate pharmacokinetics. *J Pharm Sci.* 1970;59(2):149-54.
117. Tanaka C, Kawai R, Rowland M. Dose-dependent pharmacokinetics of cyclosporin A in rats: events in tissues. *DMD.* 2000;28(5):582-9.
118. Poulin P, Theil FP. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. 1. Mechanism-based prediction of volume of distribution. *J Pharm Sci.* 2002;91(1):129-56.
119. De Buck SS, Mackie CE. Physiologically based approaches towards the prediction of pharmacokinetics: in vitro–in vivo extrapolation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007;3(6):865-78.
120. Pang KS, Durk MR. Physiologically-based pharmacokinetic modeling for absorption, transport, metabolism and excretion. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2010;37:591-615.
121. Emond C, DeVito MJ, Diliberto JJ, Birnbaum LS. The influence of obesity on the pharmacokinetics of dioxin in mice: an assessment using classical and PBPK modeling. *Toxicol Sci.* 2018;164(1):218-28.
122. Wu W, Ke M, Ye L, Lin C. Application of physiologically based pharmacokinetic modeling to predict the pharmacokinetics of telavancin in obesity with renal impairment. *Eur J Clin Pharmacol.* 2021;77:989-98.
123. Gerhart JG, Carreño FO, Edginton AN, Sinha J, Perrin EM, Kumar KR, et al. Development and evaluation of a virtual population of children with obesity for physiologically based pharmacokinetic modeling. *Clin Pharmacokinet.* 2022:1-14.
124. Jusko WJ. Guidelines for collection and pharmacokinetic analysis of drug disposition data. *Applied pharmacokinetics: Applied Therapeutics*, San Francisco; 1980. p. 639-80.
125. Riegelman S, Loo J, Rowland M. Shortcomings in pharmacokinetic analysis by conceiving the body to exhibit properties of a single compartment. *J Pharm Sci.* 1968;57(1):117-23.
126. Chiou WL. Potential pitfalls in the conventional pharmacokinetic studies: effects of the initial mixing of drug in blood and the pulmonary first-pass elimination. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1979;7:527-36.
127. Cao Y, Jusko WJ. Applications of minimal physiologically-based pharmacokinetic models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2012;39(6):711-23.

128. Cao Y, Balthasar JP, Jusko WJ. Second-generation minimal physiologically-based pharmacokinetic model for monoclonal antibodies. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2013;40:597-607.
129. Jeong Y-S, Jusko WJ. Meta-assessment of metformin absorption and disposition pharmacokinetics in nine species. *Pharmaceuticals*. 2021;14(6):545.
130. Nestorov IA, Aarons LJ, Arundel PA, Rowland M. Lumping of whole-body physiologically based pharmacokinetic models. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1998;26:21-46.
131. Pilari S, Huisinga W. Lumping of physiologically-based pharmacokinetic models and a mechanistic derivation of classical compartmental models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2010;37:365-405.
132. Levy G, Mager DE, Cheung WK, Jusko WJ. Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants I: physiologic modeling of S-warfarin in rats and pharmacologic target-mediated warfarin disposition in man. *J Pharm Sci*. 2003;92(5):985-94.
133. Rocci M, Szefer S, Acara M, Jusko W. Prednisolone metabolism and excretion in the isolated perfused rat kidney. *DMD*. 1981;9(3):177-82.
134. Kawahara M, Sakata A, Miyashita T, Tamai I, Tsuji A. Physiologically based pharmacokinetics of digoxin in *mdr1a* knockout mice. *J Pharm Sci*. 1999;88(12):1281-7.
135. Gallo JM, Vicini P, Orlansky A, Li S, Zhou F, Ma J, et al. Pharmacokinetic model-predicted anticancer drug concentrations in human tumors. *Clin Cancer Res*. 2004;10(23):8048-58.
136. Maharaj AR, Wu H, Zimmerman KO, Speicher DG, Sullivan JE, Watt K, et al. Dosing of continuous fentanyl infusions in obese children: a population pharmacokinetic analysis. *J Clin Pharmacol*. 2020;60(5):636-47.
137. Martindale: the complete drug reference. London: Pharmaceutical Press; 2009.
138. Bocci G, Oprea TI, Benet LZ. State of the Art and Uses for the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): New Additions, Revisions, and Citation References. *The AAPS Journal*. 2022;24(2):37.
139. Kirch W, Görg KG. Clinical pharmacokinetics of atenolol--a review. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1982;7(2):81-91.

140. Heel RC, Brogden RN, Speight TM, Avery GS. Atenolol: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in angina pectoris and hypertension. *Drugs*. 1979;17(6):425-60.
141. Malbica JO, Monson KR. New and expedient determination of atenolol in biological samples. *J Pharm Sci*. 1975;64(12):1992-4.
142. Wan SH, Maronde RF, Matin SB. GLC determination of atenolol and beta-blocking agents in biological fluids. *J Pharm Sci*. 1978;67(9):1340-2.
143. Weddle OH, Amick EN, Mason WD. Rapid determination of atenolol in human plasma and urine by high-pressure liquid chromatography. *J Pharm Sci*. 1978;67(7):1033-5.
144. Mason WD, Winer N, Kochak G, Cohen I, Bell R. Kinetics and absolute bioavailability of atenolol. *Clin Pharmacol Ther*. 1979;25(4):408-15.
145. Cleland JG, Bristow MR, Erdmann E, Remme WJ, Swedberg K, Waagstein F. Beta-blocking agents in heart failure. Should they be used and how? *Eur Heart J*. 1996;17(11):1629-39.
146. Dahan A, West BT, Amidon GL. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPIP) approach in the rat. *Eur J Pharm Sci*. 2009;36(2-3):320-9.
147. Gao F, Zhang M, Cui X, Wang Z, Sun Y, Gu J. Simultaneous quantitation of hydrochlorothiazide and metoprolol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;52(1):149-54.
148. Bisceglia KJ, Yu JT, Coelhan M, Bouwer EJ, Roberts AL. Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2010;1217(4):558-64.
149. FDA. Lopressor. Erişim: 18 Kasım 2024. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/017963s062,018704s021lbl.pdf].
150. Benet LZ. Gastrointestinal absorption of drugs in patients with congestive heart failure. *AJHP*. 1976:33-50.
151. Regårdh CG, Johnsson G, Jordö L, Lungborg P, Persson BA, Rönn O. Plasma concentrations and beta-blocking effects in normal volunteers after

- intravenous doses of metoprolol and propranolol. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1980;2(6):715-23.
152. Yang Y, Faustino PJ, Volpe DA, Ellison CD, Lyon RC, Yu LX. Biopharmaceutics classification of selected beta-blockers: solubility and permeability class membership. *Mol Pharm*. 2007;4(4):608-14.
 153. Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*. 2000;101(5):558-69.
 154. Dudley AJ, Bleasby K, Brown CD. The organic cation transporter OCT2 mediates the uptake of β -adrenoceptor antagonists across the apical membrane of renal LLC-PK1 cell monolayers. *Br J Pharmacol*. 2000;131(1):71-9.
 155. Regårdh C-G, Johnsson G. Clinical pharmacokinetics of metoprolol. *Clin Pharmacokinet*. 1980;5(6):557-69.
 156. Zamir A, Hussain I, Ur Rehman A, Ashraf W, Imran I, Saeed H, et al. Clinical Pharmacokinetics of Metoprolol: A Systematic Review. *Clin Pharmacokinet*. 2022;61(8):1095-114.
 157. Berger B, Bachmann F, Duthaler U, Krähenbühl S, Haschke M. Cytochrome P450 Enzymes Involved in Metoprolol Metabolism and Use of Metoprolol as a CYP2D6 Phenotyping Probe Drug. *Front Pharmacol*. 2018;9:774.
 158. Brocker CN, Velenosi T, Flaten HK, McWilliams G, McDaniel K, Shelton SK, et al. Metabolomic profiling of metoprolol hypertension treatment reveals altered gut microbiota-derived urinary metabolites. *Hum Genomics*. 2020;14(1):10.
 159. Regårdh CG, Borg KO, Johansson R, Johnsson G, Palmer L. Pharmacokinetic studies on the selective beta₁-receptor antagonist metoprolol in man. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1974;2(4):347-64.
 160. Jordö L, Attman PO, Aurell M, Johansson L, Johnsson G, Regårdh CG. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of metoprolol in patients with impaired renal function. *Clin Pharmacokinet*. 1980;5(2):169-80.
 161. Bengtsson C, Johnsson G, Regårdh CG. Plasma levels and effects of metoprolol on blood pressure and heart rate in hypertensive patients after an acute dose and between two doses during long-term treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 1975;17(4):400-8.
 162. Kendall MJ, Brown D, Yates RA. Plasma metoprolol concentrations in young, old and hypertensive subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 1977;4(4):497-9.

163. Elacridar. Erişim: 18 Kasım 2024. [https://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=elacridar].
164. Kruijtzter CM, Beijnen JH, Rosing H, ten Bokkel Huinink WW, Schot M, Jewell RC, et al. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol*. 2002;20(13):2943-50.
165. Wallstab A, Koester M, Böhme M, Keppler D. Selective inhibition of MDR1 P-glycoprotein-mediated transport by the acridone carboxamide derivative GG918. *Br J Cancer*. 1999;79(7-8):1053-60.
166. Evers R, Kool M, Smith AJ, van Deemter L, de Haas M, Borst P. Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport. *Br J Cancer*. 2000;83(3):366-74.
167. Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, et al. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(20):1651-6.
168. Ward KW, Azzarano LM. Preclinical pharmacokinetic properties of the P-glycoprotein inhibitor GF120918A (HCl salt of GF120918, 9,10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-isoquinoliny)ethyl]phenyl]-4-acridine-carboxamide) in the mouse, rat, dog, and monkey. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310(2):703-9.
169. Kemper EM, Jansen B, Brouwer KR, Schellens JH, Beijnen JH, van Tellingen O. Bioanalysis and preliminary pharmacokinetics of the acridonecarboxamide derivative GF120918 in plasma of mice and humans by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;759(1):135-43.
170. Stokvis E, Rosing H, Causon RC, Schellens JH, Beijnen JH. Quantitative analysis of the P-glycoprotein inhibitor Elacridar (GF120918) in human and dog plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Mass Spectrom*. 2004;39(10):1122-30.
171. Biotechnology SC. Phenol Red (CAS 143-74-8). Erişim: 18 Kasım 2024. [http://www.scbt.com/datasheet-203752-phenol-red.html].
172. Tsume Y, Amidon G, Takeuchi S. Dissolution effect of gastric and intestinal pH for a BCS class II drug, pioglitazone: new in vitro dissolution system to predict in vivo dissolution. *J Bioequiv Availab*. 2013;5(6):224-7.

173. Novotná A, Krasulová K, Bartoňková I, Korhoňová M, Bachleda P, Anzenbacher P, et al. Dual effects of ketoconazole cis-enantiomers on CYP3A4 in human hepatocytes and HepG2 Cells. *PLoS One*. 2014;9(10):e111286.
174. Perdaems N, Blasco H, Vinson C, Chenel M, Whalley S, Cazade F, et al. Predictions of metabolic drug-drug interactions using physiologically based modelling: Two cytochrome P450 3A4 substrates coadministered with ketoconazole or verapamil. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(4):239-58.
175. Vogelpoel H, Welink J, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Möller H, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. *J Pharm Sci*. 2004;93(8):1945-56.
176. Thörn HA, Hedeland M, Bondesson U, Knutson L, Yasin M, Dickinson P, et al. Different effects of ketoconazole on the stereoselective first-pass metabolism of R/S-verapamil in the intestine and the liver: important for the mechanistic understanding of first-pass drug-drug interactions. *DMD*. 2009;37(11):2186-96.
177. Delamoye M, Duverneuil C, Paraire F, de Mazancourt P, Alvarez J-C. Simultaneous determination of thirteen β -blockers and one metabolite by gradient high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection. *Forensic Sci Int*. 2004;141(1):23-31.
178. Hussain S, Munjewar RR, Farooqui M. Development and validation of a simultaneous HPLC method for quantification of Atenolol, Metoprolol Tartarate and Propranolol Hydrochloride in drug substance. *Int J Curr Pharm Res*. 2011;2(1):443.
179. Belal F, Sharaf El-Din M, Aly F, Hefnawy M, El-Awady M. Stability-indicating HPLC method for the determination of Atenolol in pharmaceutical preparations. *J Chromat Separation Techniq*. 2013;4(164):2.
180. Raoufi A, Ebrahimi M, Bozorgmehr MR. Application of response surface modeling and chemometrics methods for the determination of Atenolol, Metoprolol and Propranolol in blood sample using dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC-DAD. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 2019;1132:121823.
181. Ravisankar P, Devala Rao G, Krishna Chaitanya M, Devadasu C, Srinivasa Babu P. Rapid separation of five anti-hypertensive agents-atenolol, metoprolol, hydrochlorothiazide, amlodipine and nebivolol: Application to estimation of metoprolol succinate in tablet dosage form. *J Chem Pharm Res*. 2013;5:215-28.

182. ICH. M10 bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022.
183. USP. The United States Pharmacopoeia - The National Formulary (USP 30 - NF 25). 2007.
184. CH. Q2 (R1) validation of analytical procedures: Text and methodology. 2005.
185. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
186. Costa LB, Noronha FJ, Roche JK, Sevilleja JE, Warren CA, Oriá R, et al. Novel in vitro and in vivo models and potential new therapeutics to break the vicious cycle of *Cryptosporidium* infection and malnutrition. *J Infect Dis*. 2012;205(9):1464-71.
187. Bolick DT, Chen T, O. Alves LA, Tong Y, Wu D, Joyner LT, et al. Intestinal cell kinase is a novel participant in intestinal cell signaling responses to protein malnutrition. *PLoS One*. 2014;9(9):e106902.
188. Almousa AA, Meurens F, Krol ES, Alcorn J. Linoorbitides and enterolactone mitigate inflammation-induced oxidative stress and loss of intestinal epithelial barrier integrity. *Int Immunopharmacol*. 2018;64:42-51.
189. Incecayir T, Tsume Y, Amidon GL. Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and Caco-2 cells: use as a reference standard for BCS classification. *Mol Pharmaceutics*. 2013;10(3):958-66.
190. Chan E, Tan W, Ho P, Fang L. Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors. *J Chromatogr A*. 2005;1072(2):159-68.
191. Orr JM, Benet LZ. The effect of fasting on the rate of intestinal drug absorption in rats: Preliminary studies. *AJDD*. 1975;20(9):858-65.
192. Dahan A, West BT, Amidon GL. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *Eur J Pharm Sci*. 2009;36(2-3):320-9.
193. Yilmaz B, Arslan S, Asci A. HPLC method for determination of atenolol in human plasma and application to a pharmacokinetic study in Turkey. *J Chromatogr Sci*. 2012;50(10):914-9.
194. De Nicolò A, Avataneo V, Rabbia F, Bonifacio G, Cusato J, Tomasello C, et al. UHPLC–MS/MS method with protein precipitation extraction for the

simultaneous quantification of ten antihypertensive drugs in human plasma from resistant hypertensive patients. *JPBA*. 2016;129:535-41.

195. Spanakis M, Niopas I. Determination of atenolol in human plasma by HPLC with fluorescence detection: validation and application in a pharmacokinetic study. *J Chromatogr Sci*. 2013;51(2):128-32.
196. Yilmaz B, Arslan S, Akba V. Gas chromatography–mass spectrometry method for determination of metoprolol in the patients with hypertension. *Talanta*. 2009;80(1):346-51.
197. Duthaler U, Bachmann F, Suenderhauf C, Grandinetti T, Pfefferkorn F, Haschke M, et al. Liver cirrhosis affects the pharmacokinetics of the six substrates of the basal phenotyping cocktail differently. *Clin Pharmacokinet*. 2022;61(7):1039-55.
198. Venkateswarlu P, Kumar B, Sessaiah K, Prasad V. Selective and sensitive method for the determination of metoprolol in human plasma using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Acta Pharm*. 2010;60(2):177-84.
199. Pingili RB, Vemulapalli S, Dirisala VR, Mullapudi SS, Gullapalli Y, Kilaru NB. Effect of naringenin on the pharmacokinetics of metoprolol succinate in rats. *Xenobiotica*. 2021;51(8):926-32.
200. Kallem RR, Ramesh M, Seshagirirao J. Validated LC-ESI-MS/MS method for simultaneous quantitation of felodipine and metoprolol in rat plasma: application to a pharmacokinetic study in rats. *Biomed Chromatogr*. 2013;27(6):784-91.
201. Yoon I-S, Choi M-K, Kim JS, Shim C-K, Chung S-J, Kim D-D. Pharmacokinetics and first-pass elimination of metoprolol in rats: contribution of intestinal first-pass extraction to low bioavailability of metoprolol. *Xenobiotica*. 2011;41(3):243-51.
202. D'Argenio DZ, Schumitzky A, Wang X. ADAPT 5 user's guide: pharmacokinetic/pharmacodynamic systems analysis software. Los Angeles: Biomedical Simulations Resource. 2009:1-316.
203. Rodgers T, Leahy D, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases. *J Pharm Sci*. 2005;94(6):1259-76.
204. Rodgers T, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions. *J Pharm Sci*. 2006;95(6):1238-57.

205. Jeong Y-S, Yim C-S, Ryu H-M, Noh C-K, Song Y-K, Chung S-J. Estimation of the minimum permeability coefficient in rats for perfusion-limited tissue distribution in whole-body physiologically-based pharmacokinetics. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;115:1-17.
206. Yang Y, Faustino PJ, Volpe DA, Ellison CD, Lyon RC, Yu LX. Biopharmaceutics classification of selected β -blockers: solubility and permeability class membership. *Mol Pharmaceutics.* 2007;4(4):608-14.
207. Risberg J, Hordnes C, Tyssebotn I. The effect of β 1-adrenoceptor blockade on cardiac output and organ blood flow in conscious rats. *Scand J Clin Lab Invest.* 1987;47(6):521-7.
208. Li X, Jusko WJ. Utility of minimal physiologically based pharmacokinetic models for assessing fractional distribution, Oral absorption, and series-compartment models of hepatic clearance. *DMD.* 2023;51(10):1403-18.
209. Shah DK, Betts AM. Towards a platform PBPK model to characterize the plasma and tissue disposition of monoclonal antibodies in preclinical species and human. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2012;39:67-86.
210. Li X, DuBois DC, Almon RR, Jusko WJ. Physiologically based pharmacokinetic modeling involving nonlinear plasma and tissue binding: Application to prednisolone and prednisone in rats. *JPET.* 2020;375(2):385-96.
211. Rodgers T, Leahy D, Rowland M. Tissue distribution of basic drugs: accounting for enantiomeric, compound and regional differences amongst β -blocking drugs in rat. *J Pharm Sci.* 2005;94(6):1237-48.
212. Cheung S, Rodgers T, Aarons L, Gueorguieva I, Dickinson G, Murby S, et al. Whole body physiologically based modelling of β -blockers in the rat: events in tissues and plasma following an iv bolus dose. *Br J Pharmacol.* 2018;175(1):67-83.
213. Edozien JC, Switzer BR. Effects of dietary protein, fat and energy on blood hemoglobin and hematocrit in the rat. *J Nutr.* 1977;107(6):1016-21.
214. Kumar S, Ravulapalli SY, Tiwari SK, Gupta S, Nair AB, Jacob S. Effect of sex and food on the pharmacokinetics of different classes of BCS drugs in rats after cassette administration. *Int J Pharm.* 2021;610:121221.
215. Cheng H, Jusko WJ. The area function method for assessing the drug absorption rate in linear systems with zero-order input. *Pharm Res.* 1989;6:133-9.

216. Ni J, Ouyang H, Aiello M, Seto C, Borbridge L, Sakuma T, et al. Microdosing assessment to evaluate pharmacokinetics and drug metabolism in rats using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Pharm Res.* 2008;25:1572-82.
217. Dressman J, Fleisher D. Mixing-tank model for predicting dissolution rate control of oral absorption. *J Pharm Sci.* 1986;75(2):109-16.
218. Komiya I, Park J, Kamani A, Ho NF, Higuchi WI. Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes. *Int J Pharm.* 1980;4(3):249-62.
219. Levitt MD, Kneip JM, Levitt DG. Use of laminar flow and unstirred layer models to predict intestinal absorption in the rat. *J Clin Invest.* 1988;81(5):1365-9.
220. Salphati L, Childers K, Pan L, Tsutsui K, Takahashi L. Evaluation of a single-pass intestinal-perfusion method in rat for the prediction of absorption in man. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53(7):1007-13.
221. Kim J-S, Mitchell S, Kijek P, Tsume Y, Hilfinger J, Amidon GL. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I biowaiver requests. *Mol Pharmaceutics.* 2006;3(6):686-94.
222. Gökçe E, Kaynak M, Yurdasiper Erdem A, Ustundag-Okur N, Şahin S. Comparison of intestinal permeability of nebivolol hydrochloride loaded solid lipid nanoparticles with commercial nebivolol tablet. *J Res Pharm.* 2018;22(4).
223. Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharmaceutical research.* 1996;13:1336-42.
224. Sandra L, Smits A, Allegaert K, Nicolai J, Annaert P, Bouillon T. Population pharmacokinetics of propofol in neonates and infants: Gestational and postnatal age to determine clearance maturation. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(4):2089-97.
225. Rossi M, Oliveira J, Zucoloto S, Pissaia O, Costa R. Effect of protein-calorie malnutrition on catecholamine levels and weight of heart in rats. *J Neural Transm.* 1980;48:85-99.
226. Welsh F, Farmery S, MacLennan K, Sheridan M, Barclay G, Guillou P, et al. Gut barrier function in malnourished patients. *Gut.* 1998;42(3):396-401.
227. Shi J, Cao B, Zha W-b, Wu X-l, Liu L-s, Xiao W-j, et al. Pharmacokinetic interactions between 20 (S)-ginsenoside Rh2 and the HIV protease inhibitor ritonavir in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(10):1349-58.

228. Thermo Fisher Scientific, "Metoprolol tartrate", Safety data sheet, revision date: 30/03/2024.
229. Sigma-Aldrich, "Atenolol", Safety Data Sheet, revision date: 30/04/2022.
230. Edelman AB, Cherala G, Munar MY, DuBois B, McInnis M, Stanczyk FZ, et al. Prolonged monitoring of ethinyl estradiol and levonorgestrel levels confirms an altered pharmacokinetic profile in obese oral contraceptives users. *Contraception*. 2013;87(2):220-6.
231. Blake CM, Kharasch E, Schwab M, Nagele P. A meta-analysis of CYP2D6 metabolizer phenotype and metoprolol pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(3):394-9.
232. Moein MM, El Beqqali A, Abdel-Rehim M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017;1043:3-11.
233. Kir F, Dogan A, Sahin S. Development of a RP-HPLC method for simultaneous determination of atenolol, metoprolol tartrate and phenol red for in-situ rat intestinal perfusion studies. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 2024;1241:124160.
234. EMA. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.
235. FDA. Guidance for industry, bioanalytical method validation. 2018.
236. EMA. ICH harmonised guideline bioanalytical method validation M10. Draft version. 2019.
237. Lynam EC, Xie Y, Dawson R, McGovern J, Upton Z, Wang X. Severe hypoxia and malnutrition collectively contribute to scar fibroblast inhibition and cell apoptosis. *Wound Repair Regen*. 2015;23(5):664-71.
238. Gabor F, Stangl M, Wirth M. Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines Caco-2, HT-29 and HCT-8. *JCR*. 1998;55(2-3):131-42.
239. Kouzel IU, Pohlentz G, Schmitz JS, Steil D, Humpf HU, Karch H, et al. Shiga toxin glycosphingolipid receptors in human Caco-2 and HCT-8 colon epithelial cell lines. *Toxins (Basel)*. 2017;9(11).
240. Wang N, Gao E, Cui C, Wang F, Ren H, Xu C, et al. The combined anticancer of peanut skin procyanidins and resveratrol to CACO-2 colorectal cancer cells. *Food Sci Nutr*. 2023;11(10):6483-97.

241. Varma DR. Influence of dietary protein on the anti-inflammatory and ulcerogenic effects and on the pharmacokinetics of phenylbutazone in rats. *JPET*. 1979;211(2):338-44.
242. González I, Sotelo A, Jung H. Effect of malnutrition on the pharmacokinetics of cefuroxime axetil in young rats. *JPPS*. 2008;11(1):9-21.
243. Merino-Sanjuan M, Catalán-Latorre A, Nacher A, Miralles-Arnau S, Jimenez-Torres N. Animal model of undernutrition for the evaluation of drug pharmacokinetics. *Nutr Hosp*. 2011;26(6):1296-304.
244. Williams ML, Mager DE, Parenteau H, Gudi G, Tracy TS, Mulheran M, et al. Effects of protein calorie malnutrition on the pharmacokinetics of ketamine in rats. *DMD*. 2004;32(8):786-93.
245. Chiacchierini G, Naneix F, Apergis-Schoute J, McCutcheon JE. Restriction of dietary protein in rats increases progressive-ratio motivation for protein. *Physiol Behav*. 2022;254:113877.
246. McFarlane H, Hamid J. Cell-mediated immune response in malnutrition. *Clin Exp Immunol*. 1973;13(1):153.
247. Bobyn PJ, Corbett D, Saucier DM, Noyan-Ashraf MH, Juurlink BH, Paterson PG. Protein-energy malnutrition impairs functional outcome in global ischemia. *Exp Neurol*. 2005;196(2):308-15.
248. Fock RA, Vinolo MAR, Crisma AR, Nakajima K, Rogero MM, Borelli P. Protein-energy malnutrition modifies the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2008;54(5):371-7.
249. Taylor CG, Bauman PF, Sikorski B, Bray TM. Elevation of lung glutathione by oral supplementation of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate protects against oxygen toxicity in protein-energy malnourished rats. *The FASEB Journal*, 1992;6:3101-3107.
250. Borelli P, Mariano M, Borojevic R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutr Res*. 1995;15(10):1477-85.
251. De Ulíbarri JI, González-Madroño A, de Villar NG, González P, González B, Mancha A, et al. CONUT: a tool for controlling nutritional status. First validation in a hospital population. *Nutr hosp* 2005;20(1):38-45.

252. Santos EW, Oliveira DC, Silva GB, Tsujita M, Beltran JO, Hastreiter A, et al. Hematological alterations in protein malnutrition. *Nutr Rev.* 2017;75(11):909-19.
253. Neuhoﬀ S, Ungell A-L, Zamora I, Artursson P. pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug–drug interactions. *Pharm Res.* 2003;20:1141-8.
254. Wu Q, Yang X-W. The constituents of *Cibotium barometz* and their permeability in the human Caco-2 monolayer cell model. *J Ethnopharmacol.* 2009;125(3):417-22.
255. Hakkarainen JJ, Jalkanen AJ, Kääriäinen TM, Keski-Rahkonen P, Venäläinen T, Hokkanen J, et al. Comparison of in vitro cell models in predicting in vivo brain entry of drugs. *Int J Pharm.* 2010;402(1-2):27-36.
256. Nicklin P, Keates AC, Page T, Bailey CJ. Transfer of metformin across monolayers of human intestinal Caco-2 cells and across rat intestine. *Int J Pharm.* 1996;128(1-2):155-62.
257. Proctor WR, Bourdet DL, Thakker DR. Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *DMD.* 2008;36(8):1650-8.
258. Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, Fischer T, Kamiyama E, Takahashi M, et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2012;46(5):367-73.
259. Alvi MM, Chatterjee P. A prospective analysis of co-processed non-ionic surfactants in enhancing permeability of a model hydrophilic drug. *AAPS PharmSciTech.* 2014;15(2):339-53.
260. Teksin ZS, Seo PR, Polli JE. Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers. *The AAPS journal.* 2010;12(2):238-41.
261. Zakeri MP, Valizadeh H, Azarmi Y, Barzegar JM, Tajerzadeh H. Simultaneous determination of metoprolol, propranolol and phenol red in samples from rat in situ intestinal perfusion studies. *DARU J. Pharm. Sci.* 2006;14(2):102-108.
262. Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, Azarmi Y, Islambolchilar Z, Barzegar S, et al. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. *J Pharm Sci.* 2007;10(3):368-79.
263. Griffin B, O'Driscoll C. Models of the small intestine. *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models.* 2008:34-76.

264. Schanker LS, Tocco DJ, Brodie BB, Hogben CA. Absorption of drugs from the rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1958;123(1):81-8.
265. Lindahl A, Frid S, Ungell AL, Lennernas H. No evidence for the involvement of the multidrug resistance-associated protein and/or the monocarboxylic acid transporter in the intestinal transport of fluvastatin in the rat. *AAPS PharmSci.* 2000;2(3):E26.
266. Berggren S, Hoogstraate J, Fagerholm U, Lennernäs H. Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using in situ and in vitro absorption models. *Eur J Pharm Sci.* 2004;21(4):553-60.
267. Grassi M, Cadelli G. Theoretical considerations on the in vivo intestinal permeability determination by means of the single pass and recirculating techniques. *Int J Pharm.* 2001;229(1-2):95-105.
268. Doluisio JT, Billups NF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky JV. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci.* 1969;58(10):1196-200.
269. Barr WH. The role of intestinal metabolism in bioavailability. *Pharm Sci.* 1991;48:149-67.
270. Güneli EG, Ateş, M., Gümüştekin, M. Deneysel hayvan araştırmalarının planlamasında dikkat edilecek hususlar. In: Yücel O, editor. *Küçük Deney Hayvanlarından Rat.* Ankara: Q-Matris Yayınları; 2012.
271. Edgecombe SC, Stretch GL, Hayball PJ. Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. *J Nutr.* 2000;130(12):2996-3002.
272. Hu M, Chen J, Lin H. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307(1):314-21.
273. Gulsun T, Sahin S. Development and validation of a RP-HPLC method for simultaneous determination of metformin hydrochloride, phenol red and metoprolol tartrate for intestinal perfusion studies. *Lat Am J Pharm.* 2016;35(1):50-7.
274. MES hydrate. Erişim: 18 Kasım 2024. [\[https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigma/m8250?srltid=AfmBOoq5zJ75KWum4vZ-0vdKFkaIP0QBdhkuUy9UI-aOoLuicRn9Pusn\]](https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigma/m8250?srltid=AfmBOoq5zJ75KWum4vZ-0vdKFkaIP0QBdhkuUy9UI-aOoLuicRn9Pusn).

275. Curran PF, Solomon AK. Ion and water fluxes in the ileum of rats. *J Gen Physiol.* 1957;41(1):143-68.
276. Issa C, Gupta P, Bansal AK. Implications of density correction in gravimetric method for water flux determination using rat single-pass intestinal perfusion technique: a technical note. *AAPS PharmSciTech.* 2003;4(2):E16.
277. Wagner D, Spahn-Langguth H, Hanafy A, Koggel A, Langguth P. Intestinal drug efflux: formulation and food effects. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;50 Suppl 1:S13-31.
278. Güder F. Kurkuminin barsaklardan ilaç absorpsiyonu üzerine etkisinin incelenmesi [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2011.
279. İnal TG. İlaçların absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerine diyabetin etkisinin incelenmesi [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2016.
280. Dahlgren D, Roos C, Peters K, Lundqvist A, Tannergren C, Sjögren E, et al. Evaluation of drug permeability calculation based on luminal disappearance and plasma appearance in the rat single-pass intestinal perfusion model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;142:31-7.
281. Venkatesh G, Ramanathan S, Nair N, Mansor S, Sattar MA, Khan MAH, et al. Permeability of atenolol and propranolol in the presence of dimethyl sulfoxide in rat single-pass intestinal perfusion assay with liquid chromatography/UV detection. *Biomed Chromatogr.* 2007;21(5):484-90.
282. Brouwers J, Mols R, Annaert P, Augustijns P. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling. *DMD.* 2010;31(5-6):278-85.
283. Lozoya-Agullo I, Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Merino-Sanjuan M, Bermejo M. Development of an ion-pair to improve the colon permeability of a low permeability drug: Atenolol. *Eur J Pharm Sci.* 2016;93:334-40.
284. Kaynak MS, Buyutuncel E, Caglar H, Sahin S. Determination of regional intestinal permeability of diclofenac and metoprolol using a newly-developed and validated high performance liquid chromatographic method. *Trop J Med Res.* 2015;14(1):163-70.
285. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413-20.
286. Bansal T, Singh M, Mishra G, Talegaonkar S, Khar RK, Jaggi M, et al. Concurrent determination of topotecan and model permeability markers (atenolol,

antipyrine, propranolol and furosemide) by reversed phase liquid chromatography: utility in Caco-2 intestinal absorption studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;859(2):261-6.

287. Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernäs H, Hussain AS, et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* 2004;1(1):85-96.
288. Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm Res.* 1996;13(9):1336-42.
289. Lennernäs H, Knutson L, Knutson T, Lesko L, Salmonson T, Amidon G. Human effective permeability data for atenolol, metoprolol, propranolol, desipramine and carbamazepine to be used in the proposed biopharmaceutical classification for IR-products. *Eur J Pharm Sci.* 1996(4):S69.
290. Funai Y, Shirasaka Y, Ishihara M, Takemura M, Ichijo K, Kishimoto H, et al. Effect of osmolality on the pharmacokinetic interaction between apple juice and atenolol in rats. *DMD.* 2019;47(4):386-91.
291. Vinarov Z, Abdallah M, Agundez JA, Allegaert K, Basit AW, Braeckmans M, et al. Impact of gastrointestinal tract variability on oral drug absorption and pharmacokinetics: An UNGAP review. *Eur J Pharm Sci.* 2021;162:105812.
292. Doménech J, Alba M, Morera J, Obach R, Plá Delfina J. Gastric, intestinal and colonic absorption of metoprolol in the rat. *Br J Clin Pharmacol.* 1985;19(S2):85S-9S.
293. Roos C, Dahlgren D, Sjögren E, Tannergren C, Abrahamsson B, Lennernäs H. Regional intestinal permeability in rats: a comparison of methods. *Mol Pharmaceutics.* 2017;14(12):4252-61.
294. Macheras P, Chrysafidis P. Revising pharmacokinetics of oral drug absorption: I models based on biopharmaceutical/physiological and finite absorption time concepts. *Pharm Res.* 2020;37:1-13.
295. Chen C, Cheng X, Dieter MZ, Tanaka Y, Klaassen CD. Activation of cAMP-dependent signaling pathway induces mouse organic anion transporting polypeptide 2 expression. *Mol Pharmacol.* 2007;71(4):1159-64.
296. Dietrich CG, Martin IV, Porn AC, Voigt S, Gartung C, Trautwein C, et al. Fasting induces basolateral uptake transporters of the SLC family in the liver via HNF4 α and PGC1 α . *AJP-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2007;293(3):G585-G90.

297. Hastreiter AA, Dos Santos GG, Makiyama EN, Santos EWC, Borelli P, Fock RA. Effects of protein malnutrition on hematopoietic regulatory activity of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Nutr Biochem*. 2021;93:108626.
298. Mimura Y, Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Yuasa H. Functional identification of organic cation transporter 1 as an atenolol transporter sensitive to flavonoids. *BB Reports*. 2015;2:166-71.
299. Yin J, Duan H, Shirasaka Y, Prasad B, Wang J. Atenolol renal secretion is mediated by human organic cation transporter 2 and multidrug and toxin extrusion proteins. *Drug Metabolism and Disposition*. 2015;43(12):1872-81.
300. Rescigno A, Segre G. Drug and tracer kinetics. Waltham, Mass: Blaisdell Pub. Co; 1966:102.
301. Benet LZ, Chiang CWN. In Abstracts of Papers Presented at the 13th National Meeting of the APhA Academy of Pharmaceutical Sciences, Chicago. 1972;2:169-71.
302. Cheng H, Staubus AE, Shum L. An area function method for estimating the apparent absorption rate constant. *Pharm Res*. 1988;5:57-60.
303. Korfalı G, Gündoğdu H, Aydınтуğ S, Bahar M, Besler T, Moral AR, Oğuz M, Sakarya M, Uyar M, Kılıçturgay S. Nutritional risk of hospitalized patients in Turkey. *Clin. Nutr*. 2009;28(5):533-7.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi



KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	583
	Protokol Adı	İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Malnütrisyonun Etkisinin İncelenmesi
	Başvuru Tarihi	14.10.2021
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Prof. Dr. Selma ŞAHİN
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
	Yardımcı Araştırmacılar	Ecz. Fatma KIR
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	583
	Onay Tarihi	15.10.2021
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	60 adet, Erkek Sprague-Dawley Rat
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş, çalışmanın gerçekleşmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL. A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı A.Begüm BUGDAYCI AÇIKKOL	e- imzalı
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ	e- imzalı
	Sorumlu Veteriner Hekim Orkun TARKUN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Enes Arda ARSLAN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Fatma Nur İNÇEH	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Murat Okan HATİPOĞLU	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Canan ÇAKIR ÇOBAN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Zeynep AYDIN TARAKÇI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Adil KIŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Uzman Dığdem YÖYEN ERMİŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	e- imzalı

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Merkez Ofis :

Şube Ofis :

Telefon :

Faks :

Etikimza Süreç No : 1pr6p5qhr5a2a615782 Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır

EK-2: Etik Kurul Revizyonları

03.11.2021

Sn. Prof. Dr. Selma ŞAHİN

Yürütücüsü olduğunuz "İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Malnütrisyonun Etkisinin İncelenmesi" başlıklı çalışmanız 15.10.2021 tarihinde 583 protokol numarası ile onaylanmıştır. 03.11.2021 tarihli dilekçeniz ile proje başlığının "İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Malnütrisyonun Etkisinin İncelenmesi" olarak değiştirilmesi, projeye yardımcı araştırmacı olarak Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül DOĞAN'ın eklenmesi talebiniz kurulumuzca incelenmiş olup değişikliklerin yapılması uygun bulunmuştur.

A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL
Yönetim Kurulu Başkanı
Veteriner Hekim

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Merkez Ofis : Uzay Çağı Caddesi, 1308. Sokak No:6 (Odtü Teknokent) Yenimahalle - Ankara

Şube Ofis : İ.O.S.B 21.Cadde 520.Sokak No:2/2 Yenimahalle – Ankara

KOBAY D.H.L. A.Ş. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU'NA

Protokol numarası 583, onay tarihi 15.10.2021 olan, yürütücülüğümde başvurusu yapılan "İlaçların Absorbsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Malnütrisyonun Etkisinin İncelenmesi" başlıklı projede;

1. İn situ çalışmalarda kullanılacak elakridar dozunun 1 µM olarak değiştirilmesi,
2. İn vivo çalışmalar için kullanılacak atenolol dozunun 1 – 400 mg/kg, metoprolol dozunun 2 – 800 mg/kg aralıkları denenerek uygun dozun belirlenmesi,
3. İn vivo çalışmalarda kullanılacak elakridar dozunun 5 mg/kg olarak değiştirilmesi,
4. İn vivo çalışmalarda her alınan kan örneğinden sonra subkütan olarak salın uygulanması,
5. Sağlıklı ve malnütrisyon geliştirilen sıçanların karaciğerlerinin histopatolojik incelemesinin yapılması

hususunda gereğini arz ederim.

01.08.2023

Prof. Dr. Selma ŞAHİN



02.08.2023

SN. PROF. DR. SELMA ŞAHİN

Kurumumuz etik kurulunca 15.10.2021 tarihli 583 protokol numarası ile onaylanan “İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Malnütrisyonun Etkisinin İncelenmesi” başlıklı projenize ilişkin 01.08.2023 tarihli dilekçeniz kurulumuzca değerlendirilmiş olup, çalışmanızda talep ettiğiniz değişikliklerin gerçekleştirilmesi onaylanmıştır.

Gereğini arz ederim.

A.Begüm BUĞDAYCI
Yönetim Kurulu Başkanı
Veteriner Hekim

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Merkez Ofis : Uzun Çarşı Caddesi, 1308. Sokak No:6 (Odtü Teknokent) Yenimahalle - Ankara

Şube Ofis : İ.O.S.B 21.Cadde 520.Sokak No:2/2 Yenimahalle – Ankara

EK-3: Monolix ve ADAPT 5 Programları ile Uygulanan Kodlar**1. ATN IV Profilinin Popülasyon Analizi İçin Monolix Kodu**

DESCRIPTION: Model for ATN IV

[LONGITUDINAL]

input={fd1,Kp1,CL,Group}

Group = {use=regressor}

PK:

depot(target=B, p=1/58.82)

EQUATION:

Vb = 58.82

V1 = 37.08

V2 = 897.94

Vkid = 6.16

Qco = 179.91

Qkid = 29.00

Rb_H = 1.000

Kpkid = 3.0

Kp2 = Kp1

fd2 = fd1

fdt = fd1+fd2

;Initial Conditions

t_0 = 0

B_0 = 0

T1_0 = 0

T2_0 = 0

K_0 = 0

AUC_0 = 0

;ODEs

odeType=stiff

;Blood Compartment

```

ddt_B = ((Qco-Qkid)*fd1*T1*Rb_H/Kp1+(Qco-
Qkid)*fd2*T2*Rb_H/Kp2+Qkid*K*Rb_H/Kpkid-((Qco-Qkid)*fd1*Rb_H+(Qco-
Qkid)*fd2*Rb_H+Qkid*Rb_H)*B)/(Vb*Rb_H)
ddt_T1 = ((Qco-Qkid)*fd1*Rb_H*B-(Qco-Qkid)*fd1*T1*Rb_H/Kp1)/V1
ddt_T2 = ((Qco-Qkid)*fd2*Rb_H*B-(Qco-Qkid)*fd2*T2*Rb_H/Kp2)/V2
ddt_K = (Qkid*Rb_H*B-Qkid*K*Rb_H/Kpkid-CL*B)/Vkid
ddt_AUC = B

```

OUTPUT:

output = {B}

table = (247)

2. ATN Kontrol Grubunun Popülasyon Analizi İçin Monolix Kodu

DESCRIPTION: Model for ATN H

[LONGITUDINAL]

input={k01,k02,Group}

Group = {use=regressor}

PK:

EQUATION:

Vb = 58.82

V1 = 37.08

V2 = 897.94

Vkid = 6.16

Qco = 179.91

Qkid = 29.00

Rb_H = 1.000

Kpkid = 3.0

tfirst= 120

tmax = 300

fd1 = 0.134

fd2 = 0.134

Kp1 = 1.43

Kp2 = 1.43

CL = 16.04

;Initial Conditions

t_0 = 0

B_0 = 0

T1_0 = 0

T2_0 = 0

K_0 = 0

AUC_0 = 0

;ODEs

odeType=stiff

if (t <= tfirst)

input_H = k01*250000

elseif (t>tfirst&t<=tmax)

input_H = k02*250000

else

input_H = 0

end

;Blood Compartment

ddt_B = (input_H+(Qco-Qkid)*fd1*T1*Rb_H/Kp1+(Qco-Qkid)*fd2*T2*Rb_H/Kp2+Qkid*K*Rb_H/Kpkid-((Qco-Qkid)*fd1*Rb_H+(Qco-Qkid)*fd2*Rb_H+Qkid*Rb_H)*B)/(Vb*Rb_H)

ddt_T1 = ((Qco-Qkid)*fd1*Rb_H*B-(Qco-Qkid)*fd1*T1*Rb_H/Kp1)/V1

ddt_T2 = ((Qco-Qkid)*fd2*Rb_H*B-(Qco-Qkid)*fd2*T2*Rb_H/Kp2)/V2

ddt_K = (Qkid*Rb_H*B-Qkid*K*Rb_H/Kpkid-CL*B)/Vkid

ddt_AUC = B

OUTPUT:

output = {B}

table = (247)

3. ATN Yetersiz Beslenen Grubun Popülasyon Analizi İçin Monolix Kodu

DESCRIPTION: Model for ATN M

[LONGITUDINAL]

input={k01,k02,k03,Group}

Group = {use=regressor}

PK:

EQUATION:

Vb = 58.82

V1 = 37.08

V2 = 897.94

Vkid = 6.16

Qco = 179.91

Qkid = 29.00

Rb_M = 1.014

Kpkid = 3.0

tfirst= 120

tmax = 300

tmal = 420

fd1 = 0.134

fd2 = 0.134

Kp1 = 1.43

Kp2 = 1.43

CL = 16.04

;Initial Conditions

t_0 = 0

B_0 = 0

T1_0 = 0

T2_0 = 0

K_0 = 0

AUC_0 = 0

;ODEs

```
odeType=stiff
```

```
if (t <= tfirst)
```

```
input_M = k01*250000
```

```
elseif (t>tfirst&t<=tmax)
```

```
input_M = k02*250000
```

```
elseif (t>tmax&t<=tmal)
```

```
input_M = k03*250000
```

```
else
```

```
input_M = 0
```

```
end
```

```
;Blood Compartment
```

```
ddt_B = (input_M+(Qco-Qkid)*fd1*T1*Rb_M/Kp1+(Qco-  
Qkid)*fd2*T2*Rb_M/Kp2+Qkid*K*Rb_M/Kpkid-((Qco-Qkid)*fd1*Rb_M+(Qco-  
Qkid)*fd2*Rb_M+Qkid*Rb_M)*B)/(Vb*Rb_M)
```

```
ddt_T1 = ((Qco-Qkid)*fd1*Rb_M*B-(Qco-Qkid)*fd1*T1*Rb_M/Kp1)/V1
```

```
ddt_T2 = ((Qco-Qkid)*fd2*Rb_M*B-(Qco-Qkid)*fd2*T2*Rb_M/Kp2)/V2
```

```
ddt_K = (Qkid*Rb_M*B-Qkid*K*Rb_M/Kpkid-CL*B)/Vkid
```

```
ddt_AUC = B
```

```
OUTPUT:
```

```
output = {B}
```

```
table = (247)
```

4. MET IV Profilinin Popülasyon Analizi İçin Monolix Kodu

DESCRIPTION: Model for MET IV

[LONGITUDINAL]

input={fd1,Kp1,CL}

PK:

depot(target=B, p=1/58.82)

EQUATION:

Vb = 58.82

V1 = 9.43

V2 = 897.94

Vliver = 33.81

Qco = 179.91

Qliver = 75.34

Kp2 = Kp1

Kpliver = 62.25

Rb_H = 1.70

;Initial Conditions

t_0 = 0

B_0 = 0

T1_0 = 0

T2_0 = 0

L_0 = 0

AUC_0 = 0

;ODEs

odeType=stiff

;Blood Compartment

ddt_B = (((Qco-Qliver)*fd1*T1*Rb_H/Kp1+(Qco-Qliver)*(1-fd1)*T2*Rb_H/Kp2+Qliver*L*Rb_H/Kpliver)-((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H+(Qco-Qliver)*(1-fd1)*Rb_H+Qliver*Rb_H)*B)/(Vb*Rb_H)

ddt_T1 = ((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H*B-(Qco-Qliver)*fd1*T1*Rb_H/Kp1)/V1

ddt_T2 = ((Qco-Qliver)*(1-fd1)*Rb_H*B-(Qco-Qliver)*(1-fd1)*T2*Rb_H/Kp2)/V2

ddt_L = (Qliver*Rb_H*B-Qliver*L*Rb_H/Kpliver-CL*L*Rb_H/Kpliver)/Vliver

ddt_AUC = B

OUTPUT:

```
output = {B}
table = (247)
```

5. MET Kontrol Grubunun Popülasyon Analizi İçin Monolix Kodu

DESCRIPTION: Model for MET H

```
[LONGITUDINAL]
input={k01_H,k02_H,b,Group}
Group = {use=regressor}
```

PK:

EQUATION:

Vb = 58.82

V1 = 9.43

V2 = 897.94

Vliver = 33.81

Qco = 179.91

Qliver = 75.34

Kpliver = 62.25

Rb_H = 1.508

tfirst = 60

tmax_H = 135

fd1 = 0.464

Kp1 = 4.033

Kp2 = 4.033

CL = 148.63

;Initial Conditions

t_0 = 0

B_0 = 0

T1_0 = 0

T2_0 = 0

L_0 = 0

AUC_0 = 0

;ODEs

```
odeType=stiff
```

```
if (t <= tfirst)
```

```
input_PO= k01_H*312327.4
```

```
elseif (t>tfirst&t<=tmax_H)
```

```
input_PO= k02_H*312327.4
```

```
else
```

```
input_PO = 0
```

```
end
```

```
;Blood Compartment
```

```
ddt_B = (((Qco-Qliver)*fd1*T1*Rb_H/Kp1+(Qco-Qliver)*(1-  
fd1)*T2*Rb_H/Kp2+Qliver*L*Rb_H/Kpliver)-((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H+(Qco-Qliver)*(1-  
fd1)*Rb_H+Qliver*Rb_H)*B)/(Vb*Rb_H)
```

```
ddt_T1 = ((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H*B-(Qco-Qliver)*fd1*T1*Rb_H/Kp1)/V1
```

```
ddt_T2 = ((Qco-Qliver)*(1-fd1)*Rb_H*B-(Qco-Qliver)*(1-fd1)*T2*Rb_H/Kp2)/V2
```

```
ddt_L = (input_PO+Qliver*Rb_H*B-Qliver*L*Rb_H/Kpliver-CL*b*L*Rb_H/Kpliver)/Vliver
```

```
ddt_AUC = B
```

```
OUTPUT:
```

```
output = {B}
```

```
table = (247)
```

6. MET Yetersiz Beslenen Grubun Popülasyon Analizi İçin Monolix Kodu

DESCRIPTION: Model for MET M

[LONGITUDINAL]

input={k01_M,k02_M,b,Group}

Group = {use=regressor}

PK:

EQUATION:

Vb = 58.82

V1 = 9.43

V2 = 897.94

Vliver = 33.81

Qco = 179.91

Qliver = 75.34

Kpliver = 62.25

Rb_H = 1.607

tfirst = 60

tmax_M = 110

fd1 = 0.464

Kp1 = 4.033

Kp2 = 4.033

CL = 148.63

;Initial Conditions

t_0 = 0

B_0 = 0

T1_0 = 0

T2_0 = 0

L_0 = 0

AUC_0 = 0

;ODEs

odeType=stiff

if (t <= tfirst)

input_PO= k01_M*312327.4

elseif (t>tfirst&t<=tmax_M)

```
input_PO= k02_M*312327.4
```

```
else
```

```
input_PO = 0
```

```
end
```

```
;Blood Compartment
```

```
ddt_B = (((Qco-Qliver)*fd1*T1*Rb_H/Kp1+(Qco-Qliver)*(1-  
fd1)*T2*Rb_H/Kp2+Qliver*L*Rb_H/Kpliver)-((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H+(Qco-Qliver)*(1-  
fd1)*Rb_H+Qliver*Rb_H)*B)/(Vb*Rb_H)
```

```
ddt_T1 = ((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H*B-(Qco-Qliver)*fd1*T1*Rb_H/Kp1)/V1
```

```
ddt_T2 = ((Qco-Qliver)*(1-fd1)*Rb_H*B-(Qco-Qliver)*(1-fd1)*T2*Rb_H/Kp2)/V2
```

```
ddt_L = (input_PO+Qliver*Rb_H*B-Qliver*L*Rb_H/Kpliver-CL*b*L*Rb_H/Kpliver)/Vliver
```

```
ddt_AUC = B
```

```
OUTPUT:
```

```
output = {B}
```

```
table = (247)
```

7. ATN için ADAPT-5 Kodları

```

*****
*****
C                                ADAPT
C
C                                Version 5
C
C*****
*****
C
C
C                                MODEL
C
C
C
C    This file contains Fortran subroutines into which the user
C    must enter the relevant model equations and constants.
C
C    Consult the User's Guide for details concerning the format
for *
C    entered equations and definition of symbols.
C
C
C
C    1. Symbol-   Parameter symbols and model constants
C
C    2. DiffEq-   System differential equations
C
C    3. Output-   System output equations
C
C    4. Varmod-   Error variance model equations
C
C    5. Covmod-   Covariate model equations (ITS,MLEM)
C
C    6. Popinit-  Population parameter initial values
(ITS,MLEM) *
C    7. Prior -   Parameter mean and covariance values
(ID,NPD,STS) *
C    8. Sparam-   Secondary parameters
C
C    9. Amat -    System state matrix
C
C
C*****
*****

C#####
#####C

Subroutine SYMBOL
Implicit None

```

```

                Include 'globals.inc'
                Include 'model.inc'

CC
C-----
-----C
C   Enter as Indicated
C
C---C-----
-----C

        NDEqs   = 15  ! Enter # of Diff. Eqs.
        NSParam  = 6   ! Enter # of System Parameters.
        NVparam  = 1   ! Enter # of Variance Parameters.
        NSecPar  = 1   ! Enter # of Secondary Parameters.
        NSecOut  = 0   ! Enter # of Secondary Outputs (not used).
        Ieqsol   = 1   ! Model type: 1 - DIFFEQ, 2 - AMAT, 3 -
OUTPUT only.
        Descr    = 'mPBPK model with two tissue compartments for ATN
joint fitting'

CC
C-----
-----C
C   Enter Symbol for Each System Parameter (eg. Psym(1)='Kel')
C
C---C-----
-----C

        Psym(1)='fd1'
        Psym(2)='Kp1'
        Psym(3)='CL'

        Psym(4)='k01'
        Psym(5)='k02'

        Psym(6)='k03'

CC
C-----
-----C
C   Enter Symbol for Each Variance Parameter {eg:
PVsym(1)='Sigma'}      C
C---C-----
-----C

        PVsym(1)='Sigma'

CC
C-----
-----C
C   Enter Symbol for Each Secondary Parameter {eg:
PSsym(1)='CLt'}      C
C---C-----
-----C

```

```

      PSsym(1)='Vss'

C-----C
C-----C
C
      Return
      End

C#####C

      Subroutine DIFFEQ(T,X,XP)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Real*8 T,X(MaxNDE),XP(MaxNDE)

      Real*8 fd1,fd2,fdt,Vss
      Real*8 Kp1,Kp2,Kpkid
      Real*8 Qco,Qkid
      Real*8 CL,CL_M
      Real*8 k01,k02,k03
      Real*8 Vb,V1,V2,Vkid
      Real*8 Rb_H,Rb_M
      Real*8 input_H,input_M
      Real*8 tfirst,tmax,tmal

CC
C-----C
C-----C
C   Enter Differential Equations Below {e.g.  XP(1) = -P(1)*X(1)}
C   C
C-----C
C-----C

      fd1      = P(1)
      Kp1      = P(2)
      CL       = P(3)

      k01      = P(4)
      k02      = P(5)

      k03      = P(6)

      Vb       = 58.82      !mL/kg
      V1       = 37.08      !mL/kg
      V2       = 897.94     !mL/kg
      Vkid     = 6.16       !mL/kg

      Qco      = 179.91     !mL/min/kg
      Qkid     = 29.00      !mL/min/kg

```

```

Rb_H      = 1.000
Rb_M      = 1.014

Kpkid     = 3.0
Kp2       = Kp1

fdt       = fd1+fd2
fd2       = fd1

tfirst    = 120      !min
tmax      = 300      !min

tmal      = 420      !min

C  ATN iv

C  1. Blood Compartment
  IF (fdt>1) THEN
    XP(1)=0
  ELSE

    XP(1) = (R(1)+(Qco-Qkid)*fd1*X(2)*Rb_H/Kp1
c  +(Qco-Qkid)*fd2*X(3)*Rb_H/Kp2+Qkid*X(4)*Rb_H/Kpkid
c  -((Qco-Qkid)*fd1*Rb_H+
c  (Qco-Qkid)*fd2*Rb_H+Qkid*Rb_H)*X(1))/(Vb*Rb_H)

    ENDIF

C  2. Tissue Compartment 1
  XP(2) = ((Qco-Qkid)*fd1*Rb_H*X(1)-
c  (Qco-Qkid)*fd1*X(2)*Rb_H/Kp1)/V1

C  3. Tissue Compartment 2
  XP(3) = ((Qco-Qkid)*fd2*Rb_H*X(1)
c  -(Qco-Qkid)*fd2*X(3)*Rb_H/Kp2)/V2

C  4. Kidney
  XP(4) = (Qkid*Rb_H*X(1)
c  -Qkid*X(4)*Rb_H/Kpkid-CL*X(1))/Vkid

C  Healthy Rats

    IF (T<=tfirst) THEN
      input_H = k01*Bolus(1,1)

    ELSE IF (T>tfirst.and.T<=tmax) THEN
      input_H = k02*Bolus(1,2)

    ELSE
      input_H = 0

    END IF

C  2. Blood Compartment
  IF(fdt>1) THEN

```

```

XP(5)=0
ELSE

    XP(5) = (input_H+(Qco-Qkid)*fd1*X(6)*Rb_H/Kp1
c +(Qco-Qkid)*fd2*X(7)*Rb_H/Kp2+Qkid*X(8)*Rb_H/Kpkid
c -((Qco-Qkid)*fd1*Rb_H
c +(Qco-Qkid)*fd2*Rb_H+Qkid*Rb_H)*X(5))/(Vb*Rb_H)

ENDIF

C    3. Tissue Compartment 1
    XP(6) = ((Qco-Qkid)*fd1*Rb_H*X(5) -
c (Qco-Qkid)*fd1*X(6)*Rb_H/Kp1)/V1

C    4. Tissue Compartment 2
    XP(7) = ((Qco-Qkid)*fd2*Rb_H*X(5)
c -(Qco-Qkid)*fd2*X(7)*Rb_H/Kp2)/V2

C    5. Kidney
    XP(8) = (Qkid*Rb_H*X(5)
c -Qkid*X(8)*Rb_H/Kpkid-CL*X(5))/Vkid

C    Malnourished Rats

    IF (T<=tfirst) THEN
        input_M = k01*Bolus(1,2)

    ELSE IF (T>tfirst.and.T<=tmax) THEN
        input_M = k02*Bolus(1,2)

    ELSE IF (T>tmax.and.T<=tma1) THEN
        input_M = k03*Bolus(1,2)

    ELSE

        input_M = 0

    END IF

C    2. Blood Compartment
    XP(9) = (input_M+(Qco-Qkid)*fd1*X(10)*Rb_M/Kp1
c +(Qco-Qkid)*fd2*X(11)*Rb_M/Kp2+Qkid*X(12)*Rb_M/Kpkid
c -((Qco-Qkid)*fd1*Rb_M
c +(Qco-Qkid)*fd2*Rb_M+Qkid*Rb_M)*X(9))/(Vb*Rb_M)

C    3. Tissue Compartment 1
    XP(10) = ((Qco-Qkid)*fd1*Rb_M*X(9) -
c (Qco-Qkid)*fd1*X(10)*Rb_M/Kp1)/V1

C    4. Tissue Compartment 2
    XP(11) = ((Qco-Qkid)*fd2*Rb_M*X(9)
c -(Qco-Qkid)*fd2*X(11)*Rb_M/Kp2)/V2

C    5. Kidney

```

```

      XP(12) = (Qkid*Rb_M*X(9)
c -Qkid*X(12)*Rb_M/Kpkid-CL*X(9))/Vkid

```

```

C      AUC Calculation

```

```

      XP(13) = X(1)
      XP(14) = X(5)
      XP(15) = X(9)

```

```

C-----
-----C
C-----
-----C
C

```

```

      Return
      End

```

```

C#####
#####C

```

```

      Subroutine OUTPUT(Y,T,X)
      Implicit None

```

```

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

```

```

      Real*8 Y(MaxNOE),T,X(MaxNDE)

```

```

CC
C-----
-----C
C      Enter Output Equations Below      {e.g.  Y(1) = X(1)/P(2)  }
C
C-----c-----
-----C

```

```

      Y(1) = X(1)
      Y(2) = X(5)
      Y(3) = X(9)

```

```

      Y(4) = X(13)
      Y(5) = X(14)
      Y(6) = X(15)

```

```

C-----
-----C
C-----
-----C
C

```

```

      Return
      End

```

```

C#####
#####C

```

```

      Subroutine VARMOD(V,T,X,Y)
      Implicit None

```

```

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

```

```

      Real*8 V(MaxNOE),T,X(MaxNDE),Y(MaxNOE)

```

```

CC

```

```

C-----

```

```

-----C

```

```

C      Enter Variance Model Equations Below

```

```

C

```

```

C          {e.g. V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2 }

```

```

C

```

```

C-----C-----

```

```

-----C

```

```

          V(1:6) = (0.0001+PV(1)*Y(1:6))**2

```

```

C-----

```

```

-----C

```

```

C-----

```

```

-----C

```

```

C

```

```

      Return

```

```

      End

```

```

C#####
#####C

```

```

      Subroutine COVMOD(Pmean, ICmean, PC)
      Implicit None

```

```

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

```

```

      Real*8 PC(MaxNCP)

```

```

      Real*8 Pmean(MaxNSP+MaxNDE), ICmean(MaxNDE)

```

```

CC

```

```

C-----

```

```

-----C

```

```

C      Enter # of Covariate Parameters

```

```

C

```

```

C-----C-----

```

```

-----C

```

```

          NCparam = 0      ! Enter # of Covariate Parameters.

```

```

CC

```

```

C-----

```

```

-----C

```

```

C   Enter Symbol for Covariate Params {eg: PCsym(1)='CLRenal'}
C
C-----C-----
-----C

CC
C-----
-----C
C   For the Model Params. that Depend on Covariates Enter the
Equation C
C       {e.g. Pmean(1) = PC(1)*R(2) }
C
C-----C-----
-----C

C-----
-----C
C-----
-----C
C
C       Return
C       End

C#####
#####C

C       Subroutine POPINIT(PmeanI,ICmeanI,PcovI,ICcovI, PCI)
C   Initial parameter values for population program parameters
(ITS, MLEM)

C       Implicit None

C       Include 'globals.inc'
C       Include 'model.inc'

C       Integer I,J
C       Real*8 PmeanI(MaxNSP+MaxNDE), ICmeanI(MaxNDE)
C       Real*8 PcovI(MaxNSP+MaxNDE,MaxNSP+MaxNDE),
ICcovI(MaxNDE,MaxNDE)
C       Real*8 PCI(MaxNCP)

CC
C-----
-----C
C   Enter Initial Values for Population Means
C
C       { e.g. PmeanI(1) = 10.0      }
C
C-----C-----
-----C

CC

```

```

C-----
-----C
C   Enter Initial Values for Pop. Covariance Matrix (Lower
Triang.)      C
C           { e.g. PcovI(2,1) = 0.25      }
C
C-----C-----
-----C

CC
C-----
-----C
C   Enter Values for Covariate Model Parameters
C
C           { e.g. PCI(1) = 2.0      }
C
C-----C-----
-----C

C-----
-----C
C-----C-----
-----C
C
      Return
      End

C#####
#####C

      Subroutine PRIOR(Pmean,Pcov,ICmean,ICcov)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Integer I,J
      Real*8 Pmean(MaxNSP+MaxNDE), ICmean(MaxNDE)
      Real*8 Pcov(MaxNSP+MaxNDE,MaxNSP+MaxNDE),
ICcov(MaxNDE,MaxNDE)

CC
C-----
-----C
C   Enter Nonzero Elements of Prior Mean Vector
C
C           { e.g. Pmean(1) = 10.0      }
C
C-----C-----
-----C

CC

```

```

C-----
-----C
C   Enter Nonzero Elements of Covariance Matrix (Lower Triang.)
C
C       { e.g. Pcov(2,1) = 0.25      }
C
C-----C-----
-----C

C-----
-----C
C-----
-----C
C
C       Return
C       End

C#####
#####C

C       Subroutine SPARAM(PS,P,IC)
C       Implicit None

C       Include 'globals.inc'

C       Real*8 PS(MaxNSECP), P(MaxNSP+MaxNDE), IC(MaxNDE)

CC
C-----
-----C
C   Enter Equations Defining Secondary Paramters
C
C       { e.g. PS(1) = P(1)*P(2)      }
C
C-----C-----
-----C

C       PS(1) = (58.82+P(2)*37.08+P(2)*897.4+3.0*6.16)/1000
C       !L/kg

C-----
-----C
C-----
-----C
C
C       Return
C       End

C#####
#####C

C       Subroutine AMAT(A)
C       Implicit None

```

```

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Integer I,J
      Real*8 A(MaxNDE,MaxNDE)

      DO I=1,Ndeqs
        Do J=1,Ndeqs
          A(I,J)=0.0D0
        End Do
      End Do

      CC
      C-----
      -----C
      C   Enter non zero elements of state matrix   {e.g.  A(1,1) = -
      P(1) }      C
      C-----C-----
      -----C

      C-----
      -----C
      C-----
      -----C
      C
      Return
      End

      C#####
      #####C

```

8. MET İçin ADAPT-5 Kodları

```

*****
*****
C                                ADAPT
C
C                                Version 5
C
C*****
*****
C
C
C                                MODEL
C
C
C      This file contains Fortran subroutines into which the user
C      must enter the relevant model equations and constants.
C
C      Consult the User's Guide for details concerning the format
for *
C      entered equations and definition of symbols.
C
C
C
C      1. Symbol-   Parameter symbols and model constants
C
C      2. DiffEq-   System differential equations
C
C      3. Output-   System output equations
C
C      4. Varmod-   Error variance model equations
C
C      5. Covmod-   Covariate model equations (ITS,MLEM)
C
C      6. Popinit-  Population parameter initial values
(ITS,MLEM) *
C      7. Prior -   Parameter mean and covariance values
(ID,NPD,STS) *
C      8. Sparam-   Secondary parameters
C
C      9. Amat -    System state matrix
C
C
C*****
*****

C#####
#####C

      Subroutine SYMBOL
      Implicit None

```

```

                Include 'globals.inc'
                Include 'model.inc'

CC
C-----C
-----C
C   Enter as Indicated
C
C---C-----C
-----C

        NDEqs   = 25   ! Enter # of Diff. Eqs.
        NSParam  = 7    ! Enter # of System Parameters.
        NVparam  = 1    ! Enter # of Variance Parameters.
        NSecPar  = 6    ! Enter # of Secondary Parameters.
        NSecOut  = 0    ! Enter # of Secondary Outputs (not used).
        Ieqsol   = 1    ! Model type: 1 - DIFFEQ, 2 - AMAT, 3 -
OUTPUT only.
        Descr    = 'mPBPK model with two tissue compartments for MET
joint fitting'

CC
C-----C
-----C
C   Enter Symbol for Each System Parameter (eg. Psym(1)='Kel')
C
C---C-----C
-----C

        Psym(1)='fd1'
        Psym(2)='Kp1'
        Psym(3)='CL'

        Psym(4)='k01dummy_H'
        Psym(5)='k02dummy_H'

        Psym(6)='k01dummy_M'
        Psym(7)='k02dummy_M'

CC
C-----C
-----C
C   Enter Symbol for Each Variance Parameter {eg:
PVsym(1)='Sigma'}      C
C---C-----C
-----C

        PVsym(1)='Sigma'

CC
C-----C
-----C
C   Enter Symbol for Each Secondary Parameter {eg:
PSsym(1)='CLt'}      C

```

```

C-----C-----
-----C

      PSSym(1)='k01_H'
      PSSym(2)='k02_H'

      PSSym(3)='k01_M'
      PSSym(4)='k02_M'

      PSSym(5)='fd2'
      PSSym(6)='Vss'

C-----C-----
-----C
C-----C
C
      Return
      End

C#####
#####C

      Subroutine DIFFEQ(T,X,XP)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Real*8 T,X(MaxNDE),XP(MaxNDE)

      Real*8 fd1,fd2,fdt
      Real*8 Kp1,Kp2,Kpliver
      Real*8 Vb,V1,V2,Vliver,Vss
      Real*8 Qco,Qliver,CL
      Real*8 Rb_H_iv,Rb_H,Rb_M
      Real*8 k01_H,k02_H,tfirst_H,tmax_H,input_H
      Real*8 k01_M,k02_M,tfirst_M,tmax_M,input_M

CC
C-----C-----
-----C
C   Enter Differential Equations Below {e.g.  XP(1) = -P(1)*X(1)}
C   C
C-----C-----
-----C

      fd1          = P(1)
      Kp1          = P(2)
      CL           = P(3)

      k01_H        = 0.0025+(0.0015*P(4))/(0.0015+P(4))
      k02_H        = 0.0040+(0.0020*P(5))/(0.0020+P(5))

      k01_M        = 0.0055+(0.0015*P(6))/(0.0015+P(6))

```

```

k02_M      = 0.0100+(0.0015*P(7))/(0.0015+P(7))

Vb          = 58.82      !mL/kg
V1          = 9.43       !mL/kg
V2          = 897.94     !mL/kg
Vliver      = 33.81      !mL/kg

Qco         = 179.91     !mL/min/kg
Qliver      = 75.348     !mL/min/kg

Kpliver     = 62.25

Rb_H_iv     = 1.70
Rb_H        = 1.508
Rb_M        = 1.607

tfirst_H    = 60         !min
tfirst_M    = 60         !min

tmax_H      = 135        !min
tmax_M      = 110        !min

Kp2 = Kp1

fd2 = 1-fd1
fdt = fd1+fd2

C   IV 0.5

C   1. Blood Compartment
    IF (fdt>1) THEN
      XP(1) = 0
    ELSE

      XP(1) = (R(1)+(Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv*X(2)/Kp1
c + (Qco-Qliver)*fd2*Rb_H_iv*X(3)/Kp2
c + Qliver*X(4)*Rb_H_iv/Kpliver
c - ((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv+(Qco-Qliver)
c *fd2*Rb_H_iv+Qliver*Rb_H_iv)*X(1))/(Vb*Rb_H_iv)

      ENDIF

C   2. Tissue Compartment 1
      XP(2) = ((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv*X(1)
c - (Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv*X(2)/Kp1)/V1

C   3. Tissue Compartment 2
      XP(3) = ((Qco-Qliver)*fd2*Rb_H_iv*X(1)
c - (Qco-Qliver)*fd2*Rb_H_iv*X(3)/Kp2)/V2

C   4. Liver Compartment
      XP(4) = (Qliver*Rb_H_iv*X(1)
c - Qliver*X(4)*Rb_H_iv/Kpliver-
CL*X(4)*Rb_H_iv/Kpliver)/Vliver

```

```

C      IV 1.0

C      1. Blood Compartment
      IF (fdt>1) THEN
        XP(5) = 0
      ELSE

        XP(5) = (R(2)+(Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv*X(6)/Kp1
c +(Qco-Qliver)*fd2*Rb_H_iv*X(7)/Kp2
c +Qliver*X(8)*Rb_H_iv/Kpliver
c -((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv+(Qco-Qliver)
c *fd2*Rb_H_iv+Qliver*Rb_H_iv)*X(5))/(Vb*Rb_H_iv)

      ENDIF

C      2. Tissue Compartment 1
      XP(6) = ((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv*X(5)
c -(Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv*X(6)/Kp1)/V1

C      3. Tissue Compartment 2
      XP(7) = ((Qco-Qliver)*fd2*Rb_H_iv*X(5)
c -(Qco-Qliver)*fd2*Rb_H_iv*X(7)/Kp2)/V2

C      4. Liver Compartment
      XP(8) = (Qliver*Rb_H_iv*X(5)
c - Qliver*X(8)*Rb_H_iv/Kpliver-
CL*X(8)*Rb_H_iv/Kpliver)/Vliver

C      IV 2.0

C      1. Blood Compartment
      IF (fdt>1) THEN
        XP(9) = 0
      ELSE

        XP(9) = (R(3)+(Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv*X(10)/Kp1
c +(Qco-Qliver)*fd2*Rb_H_iv*X(11)/Kp2
c +Qliver*X(12)*Rb_H_iv/Kpliver
c -((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv+(Qco-Qliver)
c *fd2*Rb_H_iv+Qliver*Rb_H_iv)*X(9))/(Vb*Rb_H_iv)

      ENDIF

C      2. Tissue Compartment 1
      XP(10) = ((Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv*X(9)
c -(Qco-Qliver)*fd1*Rb_H_iv*X(10)/Kp1)/V1

C      3. Tissue Compartment 2
      XP(11) = ((Qco-Qliver)*fd2*Rb_H_iv*X(9)
c -(Qco-Qliver)*fd2*Rb_H_iv*X(11)/Kp2)/V2

C      4. Liver Compartment
      XP(12) = (Qliver*Rb_H_iv*X(9)

```

```

c - Qliver*X(12)*Rb_H_iv/Kpliver-
CL*X(12)*Rb_H_iv/Kpliver)/Vliver

```

C Healthy Rats

```

      IF (T<=tfirst_H) THEN
input_H= k01_H*Bolus(1,1)

      ELSE IF (T>tfirst_H.and.T<=tmax_H) THEN
input_H= k02_H*Bolus(1,1)

      ELSE
input_H= 0

      END IF

```

C 1. Blood Compartment

```

      IF (fdt>1) THEN
XP(13) = 0
      ELSE

XP(13) = ((Qco*fd1*X(14)*Rb_H/Kp1+Qco*fd2*X(15)*Rb_H/Kp2
c +Qliver*X(16)*Rb_H/Kpliver)
c - (Qco*fd1*Rb_H+Qco*fd2*Rb_H+Qliver*Rb_H)
c *X(13))/(Vb*Rb_H)

      ENDIF

```

C 2. Tissue Compartment 1

```

XP(14) = (Qco*fd1*Rb_H*X(13)-Qco*fd1*X(14)*Rb_H/Kp1)/V1

```

C 3. Tissue Compartment 2

```

XP(15) = (Qco*fd2*Rb_H*X(13)
c -Qco*fd2*X(15)*Rb_H/Kp2)/V2

```

C 4. Liver Compartment

```

XP(16) = (input_H+Qliver*Rb_H*X(13)
c - Qliver*X(16)*Rb_H/Kpliver-CL*X(16)*Rb_H/Kpliver)/Vliver

```

C Malnoursihed Rats

```

      IF (T<=tfirst_M) THEN
input_M= k01_M*Bolus(1,2)

      ELSE IF (T>tfirst_M.and.T<=tmax_M) THEN
input_M= k02_M*Bolus(1,2)

      ELSE
input_M= 0

      END IF

```

C 1. Blood Compartment

```

      IF (fdt>1) THEN
      XP(17) = 0
      ELSE

      XP(17) = ((Qco*fd1*X(18)*Rb_M/Kp1+Qco*fd2*X(19)*Rb_M/Kp2
c +Qliver*X(20)*Rb_M/Kpliver)
c -(Qco*fd1*Rb_M+Qco*fd2*Rb_M+Qliver*Rb_M)
c *X(17))/(Vb*Rb_M)

      ENDIF

C      2. Tissue Compartment 1
      XP(18) = (Qco*fd1*Rb_M*X(17)-Qco*fd1*X(18)*Rb_M/Kp1)/V1

C      3. Tissue Compartment 2
      XP(19) = (Qco*fd2*Rb_M*X(17)
c -Qco*fd2*X(19)*Rb_M/Kp2)/V2

C      4. Liver Compartment
      XP(20) = (input_M+Qliver*Rb_M*X(17)
c - Qliver*X(20)*Rb_M/Kpliver-CL*X(20)*Rb_M/Kpliver)/Vliver

C      Calculation of AUC

      XP(21) = X(1)/Rb_H_iv
      XP(22) = X(5)/Rb_H_iv
      XP(23) = X(9)/Rb_H_iv

      XP(24) = X(13)/Rb_H

      XP(25) = X(17)/Rb_M

C-----
-----C
C-----
-----C
C
      Return
      End

C#####
#####C

      Subroutine OUTPUT(Y,T,X)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Real*8 Y(MaxNOE),T,X(MaxNDE)

CC
C-----
-----C
C      Enter Output Equations Below      {e.g.  Y(1) = X(1)/P(2) }
C

```

```

C-----C-----
-----C

```

```

      Y(1) = X(1)

```

```

      Y(2) = X(5)

```

```

      Y(3) = X(9)

```

```

      Y(4) = X(13)

```

```

      Y(5) = X(17)

```

```

C      Calculation of AUC

```

```

      Y(6) = X(21)

```

```

      Y(7) = X(22)

```

```

      Y(8) = X(23)

```

```

      Y(9) = X(24)

```

```

      Y(10) = X(25)

```

```

C-----C-----
-----C

```

```

C-----C-----
-----C

```

```

C
      Return
      End

```

```

C#####
#####C

```

```

      Subroutine VARMOD(V,T,X,Y)

```

```

      Implicit None

```

```

      Include 'globals.inc'

```

```

      Include 'model.inc'

```

```

      Real*8 V(MaxNOE),T,X(MaxNDE),Y(MaxNOE)

```

```

CC
C-----C-----
-----C

```

```

C      Enter Variance Model Equations Below

```

```

C
C      {e.g. V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2 }
C

```

```

C-----C-----
-----C

```

```

      V(1:10) = (0.0001+PV(1)*Y(1:10))**2

```

```

C-----C-----
-----C

```

```

C-----
-----C
C
      Return
      End

C#####
#####C

      Subroutine COVMOD(Pmean, ICmean, PC)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Real*8 PC(MaxNCP)
      Real*8 Pmean(MaxNSP+MaxNDE), ICmean(MaxNDE)

CC
C-----
-----C
C      Enter # of Covariate Parameters
C
C-----C-----
-----C

      NCparam = 0      ! Enter # of Covariate Parameters.

CC
C-----
-----C
C      Enter Symbol for Covariate Params {eg: PCsym(1)='CLRenal'}
C
C-----C-----
-----C

CC
C-----
-----C
C      For the Model Params. that Depend on Covariates Enter the
Equation C
C      {e.g. Pmean(1) = PC(1)*R(2) }
C
C-----C-----
-----C

C-----
-----C
C-----
-----C
C
      Return
      End

```

```

C#####
#####C

```

```

      Subroutine POPINIT(PmeanI,ICmeanI,PcovI,ICcovI, PCI)
C   Initial parameter values for population program parameters
      (ITS, MLEM)

```

```

      Implicit None

```

```

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

```

```

      Integer I,J
      Real*8 PmeanI(MaxNSP+MaxNDE), ICmeanI(MaxNDE)
      Real*8 PcovI(MaxNSP+MaxNDE,MaxNSP+MaxNDE),
ICcovI(MaxNDE,MaxNDE)
      Real*8 PCI(MaxNCP)

```

```

CC
C-----
-----C
C   Enter Initial Values for Population Means
C
C       { e.g. PmeanI(1) = 10.0      }
C
C-----C-----
-----C

```

```

CC
C-----
-----C
C   Enter Initial Values for Pop. Covariance Matrix (Lower
Triang.)      C
C       { e.g. PcovI(2,1) = 0.25      }
C
C-----C-----
-----C

```

```

CC
C-----
-----C
C   Enter Values for Covariate Model Parameters
C
C       { e.g. PCI(1) = 2.0          }
C
C-----C-----
-----C

```

```

C-----
-----C
C-----
-----C
C

```

```

      Return
      End

C#####
#####C

      Subroutine PRIOR(Pmean,Pcov,ICmean,ICcov)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Integer I,J
      Real*8 Pmean(MaxNSP+MaxNDE), ICmean(MaxNDE)
      Real*8 Pcov(MaxNSP+MaxNDE,MaxNSP+MaxNDE),
      ICcov(MaxNDE,MaxNDE)

CC
C-----
C-----C
C   Enter Nonzero Elements of Prior Mean Vector
C
C       { e.g. Pmean(1) = 10.0      }
C
C-----C-----
C-----C

CC
C-----
C-----C
C   Enter Nonzero Elements of Covariance Matrix (Lower Triang.)
C
C       { e.g. Pcov(2,1) = 0.25      }
C
C-----C-----
C-----C

C-----
C-----C
C-----C
C
      Return
      End

C#####
#####C

      Subroutine SPARAM(PS,P,IC)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'

      Real*8 PS(MaxNSECP), P(MaxNSP+MaxNDE), IC(MaxNDE)

```

```

CC
C-----
-----C
C   Enter Equations Defining Secondary Paramters
C
C           { e.g.  PS(1) = P(1)*P(2)    }
C
C-----C-----
-----C

      PS(1)  = 0.0025+(0.0015*P(4))/(0.0015+P(4))
!µg/min/kg
      PS(2)  = 0.0040+(0.0020*P(5))/(0.0020+P(5))
!µg/min/kg
      PS(3)  = 0.0055+(0.0015*P(6))/(0.0015+P(6))
!µg/min/kg
      PS(4)  = 0.0100+(0.0015*P(7))/(0.0015+P(7))
!µg/min/kg

      PS(5)  = 1-P(1)
      PS(6)  = (58.82+9.43*P(2)+897.94*P(2)+33.81*62.25)/1000
!L/kg

C-----
-----C
C-----
-----C
C
      Return
      End

C#####
#####C

      Subroutine AMAT(A)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Integer I,J
      Real*8 A(MaxNDE,MaxNDE)

      DO I=1,Ndeqs
        Do J=1,Ndeqs
          A(I,J)=0.0D0
        End Do
      End Do

CC
C-----
-----C
C   Enter non zero elements of state matrix {e.g.  A(1,1) = -
P(1) }    C

```

C---c-----
-----C

C-----
-----C
C-----
-----C
C

Return
End

C#####
#####C



EK-4: Turnitin Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Fatma Kır
Ödev başlığı: İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Malnütrisy...
Gönderi Başlığı: İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Malnütrisy...
Dosya adı: Fatma_Kır_Doktora_Tezi.pdf
Dosya boyutu: 5.52M
Sayfa sayısı: 213
Kelime sayısı: 40,766
Karakter sayısı: 258,798
Gönderim Tarihi: 06-Ara-2024 01:18ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2542824698



EK-5: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Malnütrisyonun Etkisinin İncelenmesi

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Fatma Kır

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 213

İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine
Malnütrisyonun Etkisinin İncelenmesi

ORJİNALLİK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**8**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**5**

2

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**2**

3

turkiyeklinikleri.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

Esra DEMİRTÜRK, Tilbe ÇEVİKELLİ, Deniz ONAN. "Pharmaceutical Factors Affecting Bioavailability and Bioequivalency: Physical and Chemical Properties of the Active Substance, Traditional Review", Journal of Literature Pharmacy Sciences, 2024

Yayın

<%**1**

5

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

doczz.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

repositorij.pmf.unizg.hr

İnternet Kaynağı

<%**1**

9. ÖZGEÇMİŞ

