

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

**İLAÇLARIN ABSORPSİYONU VE PERMEABİLİTESİ ÜZERİNE  
DİYABETİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Uzm. Ecz. Tuğba GÜLSÜN İNAL**

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2016**

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

**İLAÇLARIN ABSORPSİYONU VE PERMEABİLİTESİ ÜZERİNE  
DİYABETİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Uzm. Ecz. Tuğba GÜLSÜN İNAL**

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Selma Şahin**

**ANKARA  
2016**

## ONAY SAYFASI

iii

Anabilim Dalı :Farmasötik Teknoloji  
Program :Biyofarmasötik ve Farmakokinetik  
Tez Başlığı :İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Diyabetin Etkisinin İncelenmesi

Öğrenci Adı-Soyadı :Tuğba Gülsün İnal  
Savunma Sınavı Tarihi :31.03.2016

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Levent Öner  
Hacettepe Üniversitesi

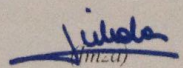
Tez danışmanı: Prof. Dr. Selma Şahin  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Alper B. İskit  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç.Dr. Zeynep Şafak Teksin  
Gazi Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. M. Sinan Kaynak  
İnönü Üniversitesi

ONAY  
Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

  
Prof.Dr. Diclehan ORHAN  
Müdür

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren ve her aşamasında bilimsel bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ilgisi ve desteğiyle her zaman her konuda yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Selma ŞAHİN'e en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez izleme komitemdeki hocalarım Prof. Dr. Levent ÖNER ve Prof. Dr. Alper B. İSKİT'e bilimsel katkılarından dolayı içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında histopatolojik analizlerin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Kemal Kösemehmetoğlu'na ve hayvanların anestezisi sırasında her zaman yardımlarını esirgemeyen Muhammed Karim Haidar'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürütmem için proje desteği sağlayan TÜBİTAK'a (SBAG 112S638) teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan, sabrı ve sonsuz anlayışı ile bana güç ve destek veren Ecz. Yağmur AKDAĞ ÇAYLI, Ecz. Naile ÖZTÜRK, Ecz. Nihan İZAT, Ecz. (B.U.) Fatma GÜDER, Ecz. (B.U.) Müge ATEŞ, Ecz. Ertan ÖZDEMİR, Ecz. (B.U.) Mine SİLİNDİR GÜNAY, Dr. Ecz. Burçin YAVUZ, Ecz. Selin Seda DOĞAN başta olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı hocalarıma, elamanlarına ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak tüm yaşamım boyunca olduğu gibi doktora tez çalışmam sırasında da daima yanımda olan, sevgi ve desteğini esirgemeyen, bana inanan ve güvenen eşime, anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi bana hayatın anlamını öğreten oğlum Hüseyin Kaan'a ithaf ederim.

## ÖZET

**Gülsün İnal T., İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Diyabetin Etkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2016.** Bu tezin amacı, Tip 2 diyabetli sıçanlarda metformin hidroklorürün farklı bağırsak segmentlerinden (jejunum, ileum, kolon) absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerine diğer diyabet ilaçlarının (repaglinid, gliburid), CYP3A4 (ketokonazol) ve PMAT (verapamil) inhibitörlerinin, etkisinin *in situ* bağırsak perfüzyonu yöntemi kullanılarak incelenmesidir. Streptozotosin ve nikotinamid kullanılarak sıçanlarda Tip 2 diyabet geliştirilmiştir. Tüm perfüzyon çözeltilerine referans madde olarak metoprolol tartarat ve fenol kırmızısı eklenmiştir. Metformin hidroklorür, metoprolol tartarat, fenol kırmızısının perfüzyon örneklerindeki konsantrasyonları valide edilmiş bir HPLC yöntemi kullanılarak eş zamanlı olarak tayin edilmiştir. Metformin hidroklorürün Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi verapamil varlığında ve yokluğunda incelendiğinde verapamilin metformin hidroklorürün permeabilitesini önemli derecede azalttığı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Benzer şekilde, diyabette gerçekleştirilen perfüzyon deneylerinde de verapamilin tüm bağırsak segmentlerden metformin hidroklorürün permeabilitesini önemli derecede azalttığı bulunmuştur. Metformin hidroklorürün intestinal permeabilitesinin (jejunum hariç) Tip 2 diyabette kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı ve diyabette intestinal permeabilitenin kolon>ileum>jejunum sırasına göre azaldığı bulunmuştur. Diğer diyabet ilaçları ile birlikte perfüze edildiğinde, metformin hidroklorürün ileal (gliburid ve repaglinid varlığında) ve kolonik (repaglinid varlığında) permeabilitesinin önemli derecede değiştiği bulunmuştur. Ayrıca, CYP3A4 inhibitörü ketokonazol perfüzyon çözeltilisine ilave edildiğinde diyabette metformin hidroklorürün permeabilitesinde anlamlı farklar bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar diyabette intestinal permeabilitenin değiştiğini açıkça göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabet, bağırsak perfüzyonu, permeabilite, metformin hidroklorür

**Destekleyen Kurumlar:** Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 112S638).

## ABSTRACT

**Gülsün İnal T., Investigation of Influence of Diabetes on Drug Absorption and Permeability. Hacettepe University Health Science Institute, PhD. Thesis in Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Ankara, 2016.** The purpose of this thesis is to investigate the effect of other diabetic agents (repaglinide, glyburide), CYP3A4 (ketoconazole) and PMAT (verapamil) inhibitors on the absorption and permeability of metformin hydrochloride across different intestinal segments (jejunum, ileum, colon) in rats with Type 2 diabetes by using *in situ* intestinal perfusion method. Type 2 diabetes was developed in the rats by using streptozotocin and nicotinamide. Metoprolol tartrate and phenol red were added as the reference compounds to all perfusion mediums. Concentrations of metformin hydrochloride, metoprolol tartrate and phenol red in perfusion samples were determined simultaneously by means of a validated HPLC method. When the Caco-2 permeability of metformin hydrochloride was investigated in the absence and presence of verapamil, verapamil has been found to decrease metformin hydrochloride permeability significantly ( $p < 0,05$ ). Similarly, in perfusion experiments performed in diabetic rats, verapamil has been found to reduce the permeability of metformin hydrochloride in all segments, significantly. The intestinal permeability of metformin hydrochloride (except jejunum) was increased significantly in Type 2 diabetes compared to the control group, and intestinal permeability in diabetes was found to decrease in the order of colon>ileum>jejunum. When co-perfused with the other diabetic agents, ileal (in the presence of glyburide and repaglinide) and colonic (in the presence of repaglinide) permeabilities of metformin hydrochloride have been found to change significantly. Also, with the addition of CYP3A4 inhibitor ketoconazole to the perfusion medium, significant differences have been found in the intestinal permeability of metformin hydrochloride in diabetes. The results obtained from this study indicated clearly that intestinal permeability changes in diabetes.

**Keywords:** Diabetes, intestinal perfusion, permeability, metformin hydrochloride

**Supporting organizations:** This study was supported by TUBITAK (Project number: 112S638).

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xx
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gastrointestinal Kanal ve İlaç Absorpsiyonu	3
2.2. Bağırsak Permeabilitesini Tayin Yöntemleri	10
2.3. Diyabet	13
2.3.1. Pankreas	13
2.3.2. İnsülin	15
2.3.3. Diyabetin Tanımı ve Tarihçesi	17
2.3.4. Diyabet Prevelansı (Görülme Sıklığı)	17
2.3.5. Diyabetin Tanısı ve Komplikasyonları	18
2.3.6. Diyabet Sınıflandırılması	19
2.3.7. Diyabette Değişen Enzim ve Taşıyıcı Proteinler	21

2.3.8. Diyabet Tedavisi	23
2.3.9. Deneysel Diyabet Geliştirme Yöntemleri	24
2.4. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri	26
2.4.1. Metformin Hidroklorür	26
2.4.2. Gliburid	32
2.4.3. Repaglinid	36
2.4.4. Ketokonazol	39
2.4.5. Verapamil	40
2.4.6. Metoprolol Tartarat	42
2.4.7. Fenol Kırmızısı	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Gereçler	44
3.1.1. Kimyasal Maddeler	44
3.1.2. HPLC Gereçleri	44
3.1.3. Perfüzyon Gereçleri	44
3.1.4. Aletler	44
3.1.5. Deney Hayvanı	44
3.2. Yöntem	45
3.2.1. Sıçanlarda Streptozotosin ve Nikotinamid Uygulaması ile Diyabet Geliştirilmesi	45
3.2.2. İn situ Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Tekniği	48
3.2.3. Perfüzyon Sisteminde Yapılan Çalışmalar	51
3.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	57



3.2.5. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	59
3.2.6. Veri Analizi	67
3.2.7. İstatistiksel Analiz	70
4. BULGULAR	71
4.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	71
4.1.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu	71
4.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu	73
4.2. Sıçanlarda Streptozotosin ve Nikotinamid Uygulaması ile Diyabet Geliştirilmesi	83
4.3. Perfüzyon Sisteminde Yapılan Çalışmalar	88
4.3.1. Gecikme Süresinin Tayini	88
4.3.2. Perfüzyon Sistemi ile Etkileşmenin İncelenmesi	88
4.4. Perfüzyon Deneylei	89
4.4.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular	92
4.4.2. Diyabet Grubuna Ait Bulgular	109
4.4.3. Metformin Hidroklorürün Jejunumdan Permeabilitesine Ait Bulgular	127
4.4.4. Metformin Hidroklorürün İleumdan Permeabilitesine Ait Bulgular	131
4.4.5. Metformin Hidroklorürün Kolondan Permeabilitesine Ait Bulgular	136
4.4.6. Net Su Akışı Değerlerine Ait Bulgular	141
4.4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları	145
4.4.8. Metformin Hidroklorürün İnsandaki Absorpsiyon Derecesinin Kestirimi	146

5. TARTIŞMA	154
5.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	154
5.2. Sıçanlarda Streptozotosin ve Nikotinamid Uygulaması ile Diyabet Geliştirilmesi	155
5.3. İn situ Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Tekniği	157
5.4. Perfüzyon Deneylei	159
5.4.1. Metformin Hidroklorür ve Metoprolol Tartaratın Permeabilitesini İncelemek Amacıyla Yapılan Çalışmalar	162
5.4.2. Metformin Hidroklorür ve Metoprolol Tartaratın Permeabilitesi Üzerine Diyabet İlaçlarının ve İnhibitörlerin Etkisini İncelemek Amacıyla Yapılan Çalışmalar	165
5.5. İnsan Absorpsiyon Derecesinin Kestirimi Çalışmaları	175
6. SONUÇLAR	177
KAYNAKLAR	180
EKLER	
EK I-Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneylei Yerel Etik Kurul İzni	
EK II- Tez Kapsamında Yapılan Çalışmalar	
EK III-Özgeçmiş	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ABC	ATP binding cassette
ADA	American Diabetes Association®
BSS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
Caco-2	Kolon adenokarsinom hücre hattı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
fa	Absorpsiyon derecesi
FBS	Fetal bovine serum
GI	Gastrointestinal
HbA1C	Hemoglobin A1C
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IFG	Bozulmuş açlık glikozu
LOD	Saptayabilme sınırı
LLOQ	Kantitasyon sınırı
MATE	Human multidrug and toxin extrusion
NWF	Net su akışı
OCT	Organik katyon transporter
OGTT	Oral Glikoz Tolerans Testi

$P_{app}$	Görünür permeabilite katsayısı
$P_{eff}$	Efektif permeabilite katsayısı
P-gp	P-glikoprotein
PMAT	Plazma membran monoamin taşıyıcı
SLC	Solute carrier
TEER	Transepitel elektrik rezistans
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
RSS	Relatif Standart Sapma

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İnce bağırsağın yüzey alanını artıran oluşumlar: dairesel plikalar (a), vili (b), ve mikrovili (c)	5
2.2. Hücre içi metabolizasyon ve apikal-bazolateral membranlardaki absorptif ve eksorptif taşıyıcıları gösteren enterositlerin şematik gösterimi	6
2.3. Gastrointestinal kanalda bulunan eksorptif ve absorptif taşıyıcıların lokalizasyonu	10
2.4. a) Pankreasın anatomisi, b) Ekzokrin pankreas, c) Tek bir asini, d) Ekzokrin dokusuna gömülü bir pankreas adacığı	14
2.5. İnsan insülininin primer yapısı	15
2.6. Pankreasın beta hücreleri tarafından insülin salgılanması ve glikoz stimülasyonunun temel mekanizmaları	16
2.7. Metformin hidroklorürün kimyasal yapısı	26
2.8. Gliburidin kimyasal yapısı	32
2.9. Repaglinidin kimyasal yapısı	36
2.10. Ketokonazolün kimyasal yapısı	40
2.11. Verapamilin kimyasal yapısı	41
2.12. Metoprolol tartaratın kimyasal yapısı	42
2.13. Fenol kırmızısının kimyasal yapısı	43
3.1. Perfüzyon sistemi ve cerrahi yöntemin şematik olarak gösterilmesi	49
3.2. Perfüzyon deneyi akış şeması	57
3.3. Pik kuyruklanma faktörünün tayini	67
4.1. Fenol kırmızısı, metformin hidroklorür, metoprolol tartaratın birlikte enjeksiyonuyla elde edilen HPLC kromatogramı	73
4.2. Jejunum, ileum, kolondan toplanan ve fenol kırmızısı içermeyen perfüzyat çözeltisi karışımının 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı	74

- 4.3. Jejunum, ileum, kolondan toplanan ve fenol kırmızısı içeren perfüzet çözeltisi karışımının 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı 74
- 4.4. Ketokonazol içeren perfüzyon çözeltisinin 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı 75
- 4.5. Verapamil içeren perfüzyon çözeltisinin 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı 75
- 4.6. Repaglinid içeren perfüzyon çözeltisinin 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı 75
- 4.7. Gliburid içeren perfüzyon çözeltisinin 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı 76
- 4.8. Perfüzyon çözeltisi ile uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan metformin hidroklorür çözeltilerine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi 76
- 4.9. Perfüzyon çözeltisi ile uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan metoprolol tartarat çözeltilerine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi 77
- 4.10. Perfüzyon çözeltisi ile uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan fenol kırmızısı çözeltilerine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi 78
- 4.11. 40x büyütmede normal (a), streptozotosin (b) ve nikotinamid (c) gruplarında Langerhans adacıklarının (ok) pankreas lobülündeki sayısı ve dağılımı görülmektedir. 400x büyütmede Langerhans adacıklarının normal gruba kıyasla (d) streptozotosin grubunda hücre sitoplazmalarında küçülme, nükleer hiperkromazi ve piknosis (elips), nükleol belirginliği görülmektedir (e); dolayısıyla adacık hacmi küçülmüştür (f). Nikotinamid grubunda da benzer değişiklikler görülmekle birlikte bunlar streptozotosin grubundan daha hafif şiddetlidir (g) 86

- 4.12. Perfüzyon deneylerinde kullanılan tüm sıçanlarda pankreas adacıklarında çeşitli değişiklikler dikkati çekmiştir: 1) adacık sayısında azalma (A, C, E, G, I, K), 2) lobül çapında azalma (F, H, L), 3) vakuolizasyon ve dejeneratif değişiklikler (D), 4) piknozis (D, F, H), 5) nükleol belirginliği (D, F, L) ve 6) sitoplazma hacminde azalma (D, F, H, J). Bazı adacıklarda bu değişiklikler minimaldir (J). 87
- 4.13. Kontrol grubunda jejunum, ileum ve kolonun metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri 92
- 4.14. Sağlıklı sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 93
- 4.15. Kontrol grubunda PMAT inhibitörü olarak verapamil kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): verapamil yok; (+):verapamil var] 94
- 4.16. Verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 96
- 4.17. Kontrol grubunda repaglinid kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): repaglinid yok; (+):repaglinid var] 97
- 4.18. Repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 99
- 4.19. Kontrol grubunda gliburid kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): gliburid yok; (+):gliburid var] 100

4.20. Gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	102
4.21. Kontrol grubunda gliburid ve ketokonazol kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): ketokonazol yok; (+):ketokonazol var]	103
4.22. Gliburid ve ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	105
4.23. Kontrol grubunda repaglinid ve ketokonazol kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): ketokonazol yok; (+):ketokonazol var]	106
4.24. Repaglinid ve ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	108
4.25. Diyabetli sıçanlarda jejunum, ileum ve kolonun metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri	110
4.26. Diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	111
4.27. Diyabet grubunda PMAT inhibitörü olarak verapamil kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): verapamil yok; (+):verapamil var]	112
4.28. Verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	114



- 4.29. Diyabet grubunda repaglinid kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): repaglinid yok; (+):repaglinid var] 115
- 4.30. Repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 117
- 4.31. Diyabet grubunda gliburid kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): gliburid yok; (+):gliburid var] 118
- 4.32. Gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 120
- 4.33. Diyabet grubunda gliburid ve ketokonazol kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): ketokonazol yok; (+):ketokonazol var] 121
- 4.34. Gliburid ve ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 123
- 4.35. Diyabet grubunda repaglinid ve ketokonazol kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): ketokonazol yok; (+):ketokonazol var] 124
- 4.36. Repaglinid ve ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 126
- 4.37. Kontrol ve diyabet gruplarında verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için jejunumdan tayin edilen 127

$P_{eff}$ değerleri	
4.38. Kontrol ve diyabet gruplarında repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için jejunumda tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	128
4.39. Kontrol ve diyabet gruplarında gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için jejunumda tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	129
4.40. Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) gliburidle birlikte verilen metformin hidroklorür için jejunumdan tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	130
4.41. Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) repaglinidle birlikte verilen metformin hidroklorür için jejunumdan tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	131
4.42. Kontrol ve diyabet gruplarında verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	132
4.43. Kontrol ve diyabet gruplarında repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	133
4.44. Kontrol ve diyabet gruplarında gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	134
4.45. Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) gliburidle birlikte verilen metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	135
4.46. Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) repaglinidle birlikte verilen metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	136
4.47. Kontrol ve diyabet gruplarında verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için kolondan tayin edilen	137

$P_{eff}$  değerleri

- 4.48. Kontrol ve diyabet gruplarında repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için kolondan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 138
- 4.49. Kontrol ve diyabet gruplarında gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için kolondan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 139
- 4.50. Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) gliburidle birlikte verilen metformin hidroklorüre ait kolondan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 140
- 4.51. Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) repaglinidle birlikte verilen metformin hidroklorüre ait kolondan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri 141
- 4.52. Verapamil varlığında ve yokluğunda metformin hidroklorüre ait Caco-2’den geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen permeabilite katsayıları 145

## TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Diyabet tanısı için kan düzeyleri	19
2.2. Diyabette değişen enzim ve taşıyıcılar	23
2.3. Metformin hidroklorürün farmakokinetik özellikleri	28
2.4. Metforminle diğer bazı ilaçların etkileşmeleri	30
2.5. Gliburidin farmakokinetik özellikleri	34
2.6. Repaglinidin farmakokinetik özellikleri	39
3.1. Diyabet geliştirmek için oluşturulan gruplar, diyabet ajanları, uygulama dozları ve yolları	46
3.2. Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi	50
3.3. Perfüzyon deneylerinde kullanılacak model ve referans ilaçlar ve perfüzyon çözeltisine eklenecek konsantrasyonları	51
3.4. Analitik yöntem ve validasyonunda kullanılan HPLC koşulları	60
3.5. Gün içi ve günler arası kesinlik deneylerinde kullanılan konsantrasyonlar	64
4.1. Metformin hidroklorüre ait doğrusallık bulguları	77
4.2. Metoprolol tartarata ait doğrusallık bulguları	78
4.3. Fenol kırmızısına ait doğrusallık bulguları	79
4.4. Metformin hidroklorür, fenol kırmızısı ve metoprolol tartaratin günler arası ve gün içi kesinlik ve doğruluk sonuçları	81

4.5. -20 °C’de saklanan metformin hidroklorür, fenol kırmızısı ve metoprolol tartaratın perfüzyon çözetisindeki 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca dayanıklılığı	82
4.6. Kontrol grubunda yer alan sıçanların kodları, vücut ağırlıkları ve enjeksiyon hacimleri	83
4.7. Streptozotosin grubunda yer alan sıçanların kodları, vücut ağırlıkları ve enjeksiyon hacimleri	84
4.8. Nikotinamid + Streptozotosin grubunda yer alan sıçanların kodları, vücut ağırlıkları ve enjeksiyon hacimleri	84
4.9. Streptozotosin ve nikotinamid + streptozotosin uygulanmasından 3 gün ve 1 hafta sonra tüm gruplarda tayin edilen kan glikoz düzeyleri	85
4.10. Farklı bağırsak segmentleri için tayin edilen hacim ve ortalama geçiş süreleri	88
4.11. Kontrol ve diyabet gruplarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler	90
4.12. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	93
4.13. Verapamil yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	96
4.14. Repaglinid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	99
4.15. Gliburid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	102
4.16. Gliburid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	105

4.17. Repaglinid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	108
4.18. Diyabet grubunda metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	110
4.19. Diyabet grubunda verapamil yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	114
4.20. Diyabet grubunda repaglinid yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	117
4.21. Diyabet grubunda gliburid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	120
4.22. Diyabet grubunda gliburid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	123
4.23. Diyabet grubunda repaglinid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	126
4.24. Kontrol gruplarında hesaplanan net su akış değerleri ( $\mu\text{L}/\text{dk}/\text{cm}$ )	143
4.25. Diyabet gruplarında hesaplanan net su akış değerleri ( $\mu\text{L}/\text{dk}/\text{cm}$ )	144
4.26. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	146
4.27. Verapamil yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	147
4.28. Repaglinid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	147

4.29. Gliburid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	148
4.30. Gliburid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	149
4.31. Repaglinid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	149
4.32. Diyabet grubunda metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	150
4.33. Diyabet grubunda verapamil yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	151
4.34. Diyabet grubunda repaglinid yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	151
4.35. Diyabet grubunda gliburid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	152
4.36. Diyabet grubunda gliburid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	153
4.37. Diyabet grubunda repaglinid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa)	153
5.1. Permeabilitede gözlenen değişimler	178

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İlacın özelliklerine ve tedavi amacına göre ilaç uygulama yolları enteral, parenteral ve diğer uygulama yolları olarak üç temel gruba ayrılmaktadır. Oral (enteral) uygulama, en güvenli ve en kolay uygulama olduğu için sistemik etki etmek amacıyla en çok tercih edilen uygulama yoludur. Oral yolla verilen ilaçların absorpsiyonu ve biyoyararlanımı üzerine ilacın fizikokimyasal özellikleri, dozaj şekline ait etkenler ve fizyolojik etkenler önemli derecede etki etmektedir.

Dünya nüfusunun önemli bir kısmını etkileyen diyabet (Diabetes Mellitus), karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozuklukla karakterize edilen, yüksek kan glikoz düzeyleri ile seyreden, karmaşık metabolik bir hastalıktır. Tüm dünyada 2014 yılında 387 milyon diyabet hastası bulunurken bu sayının 2035 yılında 592 milyona çıkacağı öngörülmektedir. Bunun yanı sıra, 2014 yılında Tip 2 diyabet nedeniyle 4,9 milyon kişi ölürken bu rakam her geçen yıl artmaktadır. Diyabette albümin ve metabolitlerinin enzimatik olmayan glikolizlenmesi ile ilaç emiliminin etkilenmesi ve trigliserid ve serbest yağ asitlerinin plazma konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak plazma proteinlerine bağlanmada değişiklikler gözlenebilir. Sistemik etki elde etmek amacıyla oral yolla uygulanan ilaçların absorpsiyonu üzerine absorptif/eksorptif taşıyıcılar ve/veya enzimler etki etmektedir. Yapılan araştırmalarda bu taşıyıcıların ve enzimlerin düzeylerinde diyabete bağlı değişiklikler bulunmuştur. Bu değişiklikler diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların absorpsiyon, dağılıma ve metabolizasyon gibi farmakokinetik özelliklerini önemli derecede etkileyebilir, terapötik yanıtın farklı olmasına yol açabilir. Bu nedenle güvenli ve etkili bir ilaç tedavisi için diyabetin ilaç absorpsiyonu üzerine etkisinin incelenmesi önemlidir.

Bu çalışmada diyabetin seçilen model ilacın (metformin hidroklorür) bağırsaklardan absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerine etkisi incelenecektir. Bu amaçla;



- Model (metformin hidroklorür) ve referans ilaçların (metoprolol tartarat, fenol kırmızısı) perfüzyon örneklerindeki miktarlarının simultane olarak tayini için analitik yöntem geliştirilerek validasyonu yapılacaktır.
- Sıçanlarda streptozotosin ve streptozotosin/nikotinamid uygulaması ile Tip 2 diyabet geliştirilecektir.
- Model ilacın (metformin hidroklorür) absorpsiyon ve permeabilitesini incelemek amacıyla, jejunum, ileum ve kolonun simultane olarak perfüze edileceği üçlü bağırsak perfüzyonu tekniği geliştirilecektir.
- Metformin hidroklorürün farklı bağırsak segmentlerinden absorpsiyon ve permeabilitesi diyabet ve kontrol gruplarında incelenecektir. Metformin hidroklorürün absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerine PMAT inhibitörünün (verapamil) etkisi diyabet ve kontrol gruplarında incelenecektir.
- Metformin hidroklorürün absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerine gliburidin etkisi diyabet ve kontrol gruplarında incelenecektir.
- Metformin hidroklorürün absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerine repaglinidin etkisi diyabet ve kontrol gruplarında incelenecektir.
- Metformin hidroklorürün absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerine gliburid ve CYP3A4 inhibitörünün (ketokonazol) kombine etkisi diyabet ve kontrol gruplarında incelenecektir.
- Metformin hidroklorürün absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerine repaglinid ve CYP3A4 inhibitörünün (ketokonazol) kombine etkisi diyabet ve kontrol gruplarında incelenecektir.
- Metformin hidroklorürün permeabilitesi üzerine PMAT inhibitörünün (verapamil) etkisi Caco-2 hücrelerinden incelenecektir.
- Sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden tayin edilen permeabilite verileri kullanılarak insanlardaki absorpsiyon dereceleri kestirimi yapılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Gastrointestinal Kanal ve İlaç Absorpsiyonu

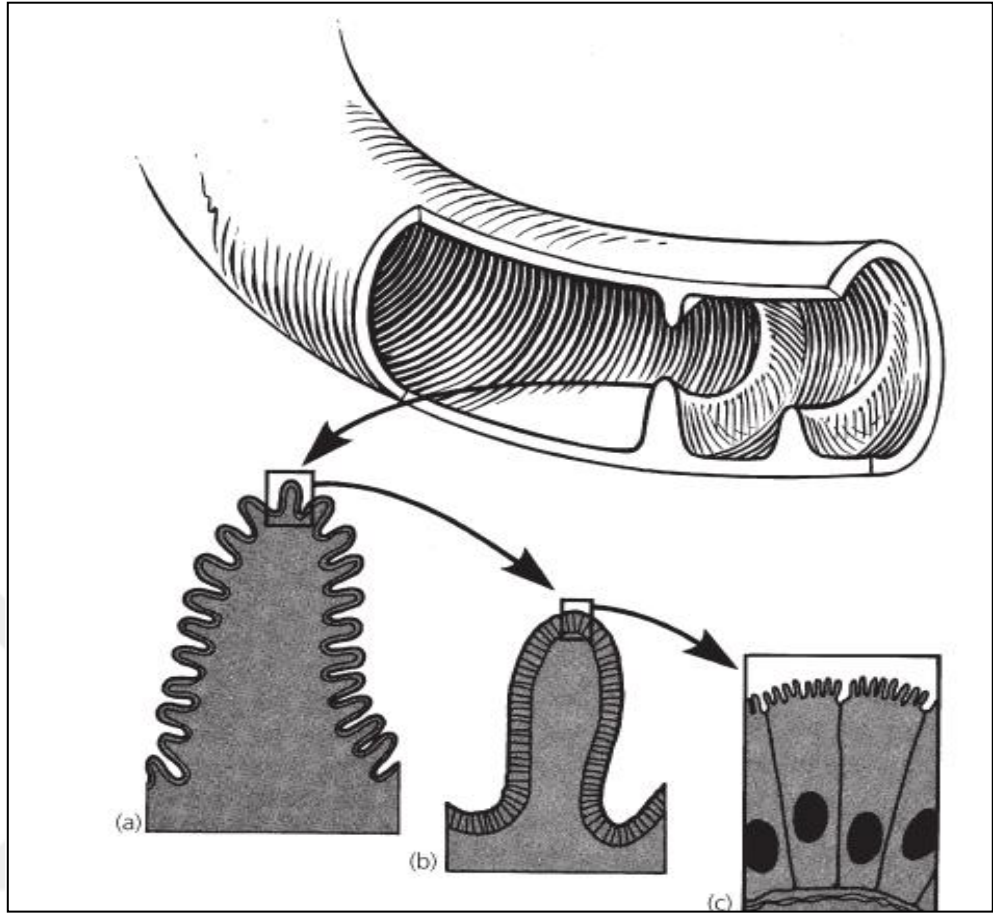
Sistemik etki elde etmek amacıyla ilaçlar oral, parenteral, sublingual, transdermal, rektal gibi farklı yollardan uygulanmaktadır. Bu uygulama yolları arasında oral yol en fazla tercih edilen yoldur (1). Oral yolla verilen bir ilacın farmakolojik etki gösterebilmesi için gastrointestinal (GI) kanal ve karaciğeri geçerek sistemik dolaşıma sonra da etki yerine ulaşması gerekir. Oral yolla verilen bir ilacın sistemik dolaşıma geçmesini kontrol eden iki temel etken vardır. Bunlar ilacın dozaj şeklinden çözünmesi(dissolüsyon) ve çözülmüş ilacın gastrointestinal kanal membranından geçme hızı (permeabilite)'dir. Çözünürlüğü düşük olan ilaçlar için çözünme hızı, permeabilitesi düşük olan ilaçlar için membranlardan geçme hızı, hız sınırlayan basamak olarak kabul edilmektedir (2, 3).

Gastrointestinal kanal ağız yoluyla alınan besinlerin sindirilmesi, absorplanması ve sindirilemeyen besinlerin vücuttan atılmasından sorumlu olan, ağızdan başlayıp anüsle sonlanan iki ucu açık bir kanal olarak kabul edilmektedir. Oral yolla kullanılan ve sistemik etki gösteren ilaçların absorpsiyonunda da oldukça önemli rolü olan gastrointestinal kanal fonksiyonel özelliklerine göre ağız, özefagus, mide; ince bağırsak (duodenum, jejunum, ileum); ve kalın bağırsak (çekum, kolon, rektum) olmak üzere üç başlık altında toplanabilir.

Ağız, besinlerin ya da ilaçların ilk işleme uğradığı kısımdır. Oral mukozada absorpsiyon genellikle pasif difüzyonla veya konvektif taşıma ile gerçekleşmektedir (4). Ancak ilacın tükürükle uzaklaştırılmasına bağlı olarak absorpsiyonda değişiklikler olabilmektedir (5). Özefagus ise, besinlerin ya da ilaçların ağızdan mideye taşınmasını sağlayan yaklaşık 20-22 cm uzunluğunda, 2,5 cm çapında düz kaslardan ve iskelet kaslarından oluşan kaslı bir borudur (pH:5-6). Sağlıklı kişilerde yapılan bir çalışmada özefagustan geçiş süresi  $9,4 \pm 2$  saniye olarak ölçülmüştür (6). Bu nedenle özefagustan ilaç absorpsiyonu yoktur. Mide (20 cm uzunluğunda, 15 cm genişliğinde, pH:1,2-3,5); fundus, gövde ve pilor olarak adlandırılan üç kısımdan oluşur, mukus, hidroklorik asit ve pepsin (bir proteaz) salgılar. Midenin absorpsiyon

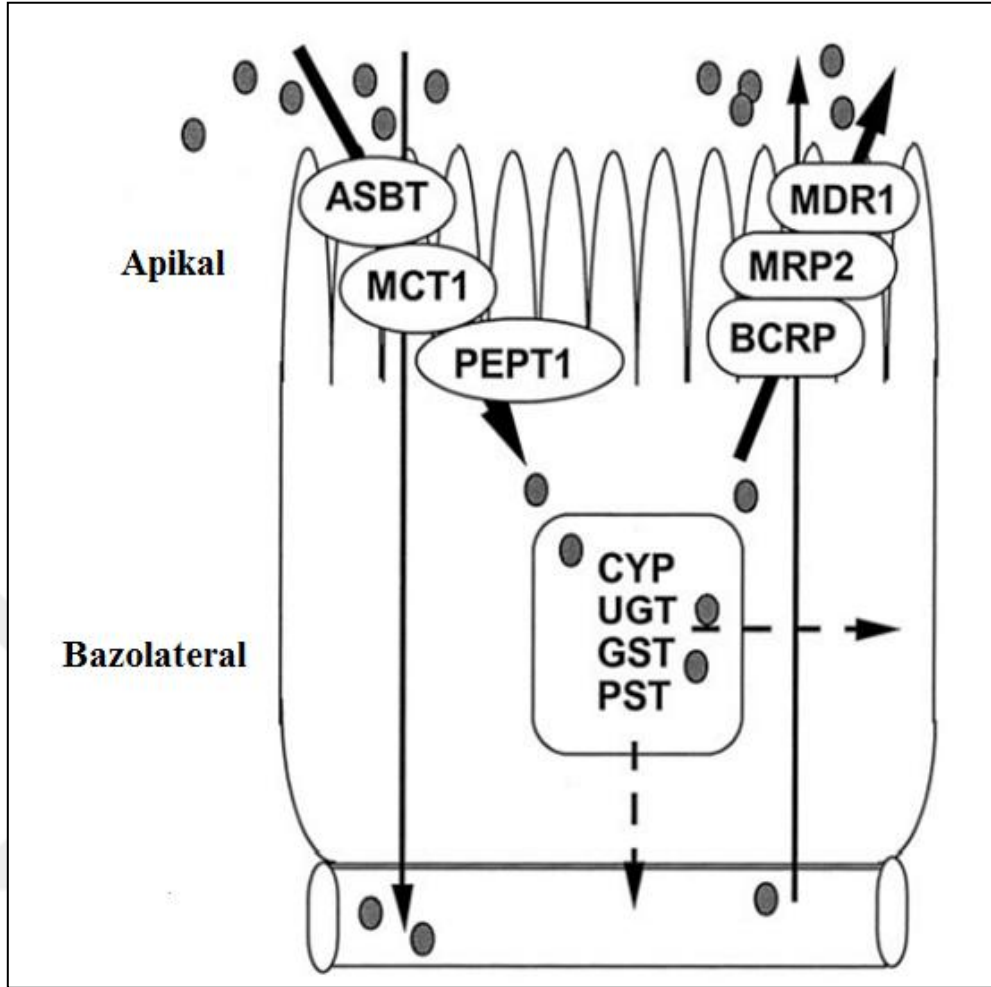
alanı (yaklaşık 1 m<sup>2</sup>) düşük olmakla birlikte bazı ilaçlar mideden absorplanmaktadır (aspirin, fenitoin, varfarin, tolbutamid gibi).

İnce bağırsak pilorik sfinkterten başlayıp çekuma kadar uzanmaktadır. İnce bağırsak yaklaşık 6 metre uzunluğunda olup duodenum (25 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde), jejunum (300 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde) ve ileum (300 cm uzunluğunda, 2,5 - 5 cm genişliğinde) olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Bu segmentler arasında tam bir ayırım olmamakla birlikte, jejunum genellikle duodenumdan sonra ince bağırsağın proksimalinde 2/5'lik kısmı, ileum ise distalinde 3/5'lik kısmı olarak tanımlanır. Dolayısıyla bu segmentler arasında absorpsiyon ve sekresyon açısından da farklılıklar vardır. İnce bağırsağın yüzey alanı (yaklaşık 200 m<sup>2</sup>) dairesel plikalar, vili ve mikrovili adı verilen oluşumlar nedeniyle oldukça artmıştır (Şekil 2.1). Görünür mukozal veya submukozal invajinasyonları içeren dairesel plikalar çoğunlukla jejunum ve duodenumda yer almaktadır. Parmak benzeri şekilleri ile bağırsak lümeni içine doğru çıkıntı yapan vililer yaklaşık 0,5-1,5 mm uzunluğunda olup mukozal yüzeyi kaplamaktadır. Duodenal vililer geniş ve yaprak şeklinde, jejunal vililer uzun ve ince, ileal vililer ise kısa ve geniş şekilleri ile karakterize edilmektedirler. Apikal hücre zarına uzanan ve fırça kenar oluşturan mikrovililer mikroskobik tübüler bir görüntüye sahiptir. Mikrovililerin yüzey alanındaki artışa katkısı vililere göre yaklaşık 600 kat daha fazladır. 1 inç karelik alanda 20 bin vili ve 130 milyar mikrovili olduğu belirtilmiştir. Bu karmaşık membranöz ağ, sindirim ve absorpsiyonun son aşaması için gerekli olan enzimleri, reseptörleri ve taşıyıcıları içermektedir (7). İnce bağırsak hem oldukça büyük yüzey alanı hem de yüksek kan akımı (25 mL/dkx100 g) nedeniyle gastrointestinal kanalın absorpsiyon için en önemli bölgesini oluşturmaktadır (8). Yüksek kan akım hızı intestinal lümenle kan dolaşımı arasında konsantrasyon gradyanı oluşumuna yardım ettiği için pek çok ilacın absorpsiyonu bu bölgeden pasif difüzyonla gerçekleşir. İlaçların absorpsiyonu yapılarındaki vili ve mikrovili yoğunluğundan dolayı duodenum ve jejunumda ileuma göre daha fazladır.



**Şekil 2.1.** İnce bağırsağın yüzey alanını artıran oluşumlar: dairesel plikalar (a), vili (b), ve mikrovili (c) (7).

İnce bağırsakta bulunan enterositlerin apikal (lümen) ve bazolateral (kan) yüzeylerinde ilaçların absorpsiyonundan sorumlu birçok absorptif (influx) ve eksorptif (efflux) taşıyıcı protein bulunmaktadır. Ayrıca ilaç metabolizasyonundan sorumlu olan bazı sitokrom enzimlerinin de (CYP3A4 gibi) ince bağırsaktaki mikrovililerin uç kısımlarında bulunduğu bilinmektedir (Şekil 2.2). Bu taşıyıcı proteinler ve enzimler, substratı olan ilaçların absorpsiyonunu önemli derecede etkileyebilirler. Absorptif taşıyıcılar (OATP-B, PEPT-1, MCT1, OCTN2, HPT2 gibi) absorpsiyonu artırırken eksorptif taşıyıcılar (MDR1, MRP2, BCRP2 gibi) substratı olan ilaçların absorpsiyonunu genellikle azaltmaktadırlar.



**Şekil 2.2.** Hücreiçi metabolizasyon ve apikal-bazolateral membranlardaki absorptif ve eksorptif taşıyıcıları gösteren enterositlerin şematik gösterimi (9).

Kalın bağırsak (pH:7,5-8); çekum (10-30 cm uzunluğunda, 7 cm genişliğinde), kolon (150 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde) ve rektumdan (15-19 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde) oluşmaktadır. Kalın bağırsağın sindirilmeyen besinlerin feçes ile uzaklaştırılması, bağırsak bakterileri tarafından üretilen esansiyel vitaminlerin emilmesi ve feçesden suyun geri emilmesi gibi işlevleri vardır. Kalın bağırsak, villiler olmadığı için ince bağırsağa göre çok daha küçük yüzey alanına sahiptir. Kolon ve rektumun mukozal yüzeyleri villilerden yoksun olmasına rağmen düz değildir. Kolonun duvarlarında, kolonun bir akeordeon gibi genişlemesine ve uzamasına yardımcı olan, kese şeklinde katlanmalar (haustra) bulunur. Bu bölgeden ilaç absorpsiyonu sınırlı olmakla birlikte çözünürlüğü az olan maddelerin ve geciktirilmiş salım yapan ürünlerin absorpsiyonunda önemli bir bölgedir. Ayrıca

kolonda bulunan aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar bazı maddelerin (sülfosalazin, L-dopa, laktüloz gibi) metabolizasyonunu gerçekleştirir (10). İlaç taşıyıcı sistemler için rektal yolun bazı üstünlükleri bulunmaktadır. Bunlar, birçok düşük molekül ağırlıklı ilacın hızlı emilimi, ilk geçiş etkisinden kısmi olarak kaçış, kontrollü salım sağlayan sistemlerin emilimine imkan sağlaması ve absorpsiyonun artırılabilmesidir. Bunun yanı sıra birçok ilacın rektal mukozadan kötü ve düzensiz emilmesi, yüzey alanının küçük olmasından dolayı sınırlı ilaç emilimi, rektumun düşük sıvı hacminden dolayı çözünme hızı problemleri, mikroorganizmalar tarafından ilaç metabolizasyonu gibi birçok sakıncası da bulunmaktadır (11).

Ayrıca gastrointestinal kanalın bir parçası olmamakla birlikte pankreas, karaciğer ve safra kesesi gibi organlar sindirime yardımcı olan salgılarını gastrointestinal kanala salgırlar.

Oral yolla uygulanan ve sistemik etki gösteren bir ilaç etki edeceği bölgeye ulaşana kadar gastrointestinal kanal membranı da dahil olmak birkaç biyolojik membrandan geçmek zorundadır. Gastrointestinal kanaldan ilaçların absorpsiyonu transselüler ve paraselüler yol olmak üzere başlıca iki mekanizmaya göre gerçekleşir. Transselüler yol epitel hücre membranından ilaçların absorpsiyonu olup pasif difüzyon, kolaylaştırılmış pasif difüzyon ve aktif transport gibi mekanizmalarla gerçekleşir. Paraselüler absorpsiyon ise epitel hücreler arasındaki boşluklardan ilaç absorpsiyonu olup sıkı kavşaklar (tight junction) tarafından kontrol edilir. Ayrıca endositoz (pinositöz, fagositöz, reseptör aracılıklı endositöz), ve absorptif /eksorptif taşıyıcı sistemler de gastrointestinal kanaldan ilaç absorpsiyonuna katkıda bulunmaktadır (5, 12, 13).

Gastrointesinal kanaldan etkin maddenin absorpsiyonunu etkileyen etkenler üç grup altında toplanabilir:

1. Etkin maddeye ait fizikokimyasal etkenler
2. Farmasötik dozaj şekline ait etkenler

### 3. Fizyolojik etkenler

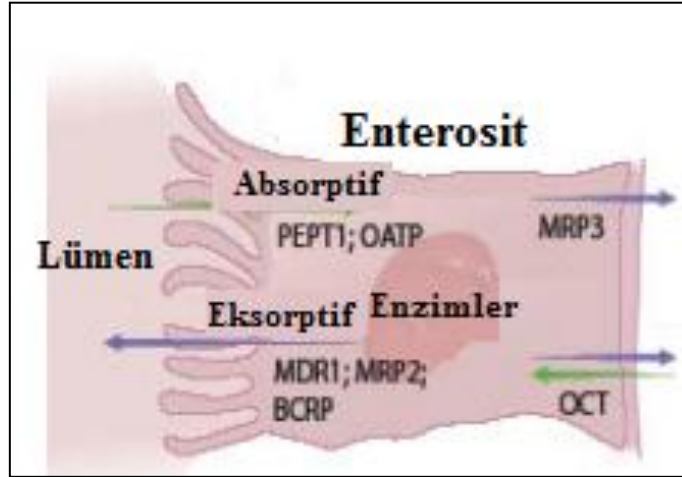
Sadece çözünmüş haldeki madde gastrointestinal membrandan geçebildiği için çözünürlüğe etki eden etkenler (partikül büyüklüğü, tuz şekli, kristal şekli, polimorfizm, solvatlar, kompleks oluşumu gibi) ilacın absorpsiyonunu da etkileyecektir (14-16). Ayrıca etkin maddenin yağ/su partiyon katsayısı, iyonizasyon derecesi ve pKa değeri absorpsiyonu etkileyen diğer etkenlerdir. Hücre membranı lipid özellikte olduğu için yağda çözünürlüğü yüksek olan ilaçların membran permeabiliteleri daha yüksektir (17-19). Oral yolla kullanılan bir dozaj şeklinin tipi, içerdiği etkin maddenin biyoyararlanımını önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Ayrıca bir dozaj şeklinin formülasyonunda kullanılan yardımcı maddeler (dağıtıcı, bağlayıcı, yüzey etkin madde gibi) ilacın çözünürlüğünü, GI kanalda kalış süresini veya membranlardan difüzyonunu etkileyerek biyoyararlanımını değiştirebilir. Örneğin magnezyum stearat, formülasyondaki maddeler etrafında ince bir hidrofobik tabaka oluşturarak suyun penetrasyonunu yavaşlatır ve dağılmayı geciktirir. Magnezyum stearat yüksek oranda kullanıldığında ise ilacın çözünme hızını yavaşlatarak absorpsiyonun yavaş bir şekilde gerçekleşmesine yol açar. Yüzey etkin maddeler düşük konsantrasyonlarda kullanıldığı zaman yüzey gerilimini düşürerek çözünürlüğü artırırken, yüksek konsantrasyonlarda misel oluşturarak ilacın çözünürlüğünü azaltır. Ayrıca etkin madde ile yardımcı maddeler arasındaki fiziksel ve kimyasal etkileşmelere bağlı olarak ilacın GI kanaldan absorpsiyonu azalabilir (20). Bir ilacın optimum absorpsiyonu, absorpsiyon bölgesinde yeterli süre kalmasına bağlıdır. Peristaltik hareketler, duodenumdaki ilaç partiküllerinin mukozal hücrelerle temasını artırır. Peristaltik hareketleri etkileyen etkenler (fiziksel aktivitenin derecesi, yaş, hastalık durumu, diğer ilaçlar gibi) intestinal motiliteyi değiştireceği için ilacın absorpsiyonunu etkileyecektir (21, 22). İshal gibi intestinal motilitenin yüksek olduğu durumlarda ilacın absorpsiyonu azalırken çeşitli nedenlerden dolayı (antikolinergik ilaçlar gibi) bağırsak motilitesindeki azalmaya bağlı olarak ilacın absorpsiyonu beklenenden daha düşük olabilir (1, 21). Mide içeriğinin hacminin artması, yağlı ve sıcak besinler, heyecan, yüksek konsantrasyonda elektrolit ve hidrojen iyonu, bazı ilaçlar (antikolinergik ilaçlar, trisiklik antidepressanlar, narkotik

analjezikler gibi) ve mide ülseri gibi etkenler mide boşalmasını geciktirirken açlık, soğuk besinler, hafif egzersiz ve yatma (özellikle sağ yan üzerine) gibi etkenler midenin boşalmasını hızlandırır. Mide boşalma süresindeki gecikmeler ilacın absorpsiyon hızını yavaşlatacak ve muhtemelen absorpsiyon derecesini etkileyecektir (1, 21, 22). Gastrointestinal kanaldaki kan akış hızını etkileyen etkenler (konjestif kalp yetmezliği gibi) ilacın ince barsaktan uzaklaştırılma hızını ve biyoyararlanımını azaltacaktır. Ayrıca bireysel farklılıklar (yaş, cinsiyet, genetik, patolojik durumlar gibi) ilaç absorpsiyonunda farklılıklara yol açabilmektedir.

Taşıyıcı proteinler genel olarak spesifik molekülleri (substrat) çeşitli membranlardan geçirmeye aracılık eden moleküllerdir. İki önemli taşıyıcı ailesi mevcuttur: ABC (ATP binding cassette) ve SLC (solute carrier). ABC protein ailesinde 7 alt sınıfa (ABCA-ABCG) ayrılacak toplam 49 ABC protein geni tanımlanmıştır (23). Bağırsaklarda bulunan absorptif (OATP-B, PEPT-1, MCT1, OCTN2, HPT2, PMAT gibi) ve eksorptif (MDR1, MRP2, BCRP gibi) taşıyıcılar substratı olan ilaçların absorpsiyonu üzerinde önemli rol oynarlar (Şekil 2.3, 24).

Patolojik durumlar ilaçların biyoyararlanımını önemli oranda etkileyebilmektedir. Örneğin hepatik (viral hepatit, siroz gibi), renal (böbrek yetmezliği gibi), kardiyovasküler fonksiyonlardaki bozukluklar ve diyabet ilacın biyoyararlanımı üzerine etki edecektir (25). Ayrıca gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu etkileyen hastalıklarda (malabsorpsiyon, Crohn hastalığı, total gastrektomi gibi) ilaçların (metronidazol, propranolol, rifampin, trimetoprim, folik asit gibi) biyoyararlanımı değişecektir (1). Bu çalışmada diyabetin, model ilaç olarak seçilen metformin hidroklorürün bağırsaklardan (jejunum, ileum ve kolon) absorpsiyon ve permeabilitesi üzerine etkisi incelenmiştir.





**Şekil 2.3.** Gastrointestinal kanalda bulunan eksorptif ve absorptif taşıyıcıların lokalizasyonu (26).

## 2.2. Bağırsak Permeabilitesini Tayin Yöntemleri

Bir ilaç etkin maddesinin permeabilitesi; fizikokimyasal özellikleri [molekül büyüklüğü, lipofilisite, polar van der Waals yüzey alanı ve moleküler esneklik (molekül içi hidrojen bağlarının konumu)], bağırsak membran yapısı ve bütünlüğü, ve spesifik transport mekanizmaları gibi birçok etkene bağlıdır. Hidrojen bağı donörlerinin sayısı arttıkça biyoyararlanım azalırken düşük molekül ağırlığı ve hidrojen bağı akseptörlerinin varlığında biyoyararlanım artmaktadır. Lipid membranlardan moleküllerin geçişi, membranların polaritesinin, yoğunluğunun, hidrofobikliğinin farklı olması nedeniyle son derece karmaşıktır. Yağda çözünürlük arttıkça membranlardan geçiş genellikle artmaktadır. Buna karşın, polar van der Waals yüzey alanı intestinal geçişi ters orantılı olarak etkilemektedir. İlaç etkin maddelerinin membranlardan geçişi aktif transport, pasif transport gibi mekanizmalarla ve lipid /safra asidi taşıyıcıları, monokarboksilat taşıyıcıları, organik katyon taşıyıcıları, nükleosit taşıyıcıları, intestinal dipeptid taşıyıcıları, amino asid taşıyıcıları, vitamin taşıyıcıları, fosfat taşıyıcıları ve P-glikoprotein (P-gp) aracılığı ile gerçekleşmektedir (27, 28). Avrupa İlaç Ajansı (EMA)'na göre, insanlarda tam absorpsiyonun kanıtlanması, biyofarmasötik sınıflandırma sistemine (BSS) göre biyoyararlanım başvuruları için tercih edilmektedir. Bu amaçla, ölçülen absorpsiyon

derecesinin  $\geq$  %85 olduğu durumlarda absorpsiyonun tam olduğu kabul edilmektedir. Tam absorpsiyon ise yüksek permeabilite ile ilişkilidir ve tayin edilebilmesi için mutlak biyoyararlanım veya kütle denge çalışmalarının yapılması önerilmektedir. Kütle denge çalışmalarından elde edilen veriler tam absorpsiyonu desteklemek için kullanıldığında, absorbe edilen fraksiyonun tayin edilmesinde kullanılan metabolitlerin absorpsiyondan sonra oluştuğundan emin olunmalıdır. Bu nedenle idrarla atılan total radyoaktivite ölçüldüğünde, değişmemiş ilaç etkin maddesinin mide veya bağırsak sıvılarında parçalanmadığından veya metabolize olmadığından emin olunmalıdır. Faz 1 oksidasyon ve Faz 2 konjugasyon metabolizasyonun sadece absorpsiyondan sonra meydana gelebileceği belirtilmiştir. Faz 1 oksidasyon ve Faz 2 konjugasyon metabolitlerinin idrar ve feçesten geri kazanılan miktarı ile ana ilacın idrardan geri kazanılan miktarının toplamı verilen dozun  $\geq$  %85 ise kütle denge çalışmalarında elde edilen verilerin tam absorpsiyonu destekleyeceği belirtilmektedir (29). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), etkin maddenin gastrointestinal kanalda instabilite sorunu olmadığında, kütle denge çalışmaları veya mutlak biyoyararlanım çalışmaları ile verilen dozun absorpsiyon derecesinin %90 ya da daha fazla olduğu gösterildiğinde etkin maddenin permeabilitesinin yüksek olduğunu kabul etmektedir. Bir ilaç etkin maddesinin permeabilite sınıfını tayin etmek amacıyla insanlarda yapılan kütle denge çalışmaları, mutlak biyoyararlanım çalışmaları veya intestinal perfüzyon yöntemleri kullanılabilir. Ayrıca, insan gönüllülerin kullanılmadığı yöntemler arasında uygun bir hayvan modelinde (sıçan gibi) *in vivo* ya da *in situ* intestinal perfüzyon yöntemi ve/veya intestinal doku kesitlerinin kullanıldığı *in vitro* permeabilite yöntemleri ya da uygun bir epitel hücre tek tabakasından permeabilite tayini önerilmektedir. Bu yöntemler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

### 1. İnsanlarda farmakokinetik çalışmalar

- **Kütle denge çalışmaları:** Farmakokinetik kütle denge çalışmaları işaretli olmayan, dayanıklı izotop veya radyoaktif işaretli ilaç etkin maddesi kullanılarak bir ilacın absorpsiyon derecesini tayin etmek amacıyla kullanılabilir. Absorpsiyon derecesinin güvenilir bir şekilde tayin edilebilmesi için yeterli sayıda

gönüllü gereklidir. Yüksek permeabiliteyi göstermek için kütle denge çalışmaları kullanıldığı zaman, ilacın %85'i veya daha fazlasının idrarla değişmeden atılmadığı durumlarda ilacın gastrointestinal kanalda dayanıklı olduğunun da gösterilmesi gerekmektedir.

- **Mutlak biyoyararlanım çalışmaları:** Oral yolla verilen bir ilacın biyoyararlılığının intravenöz yolla sistemik dolaşıma giren ilaç miktarına oranlanması ile bulunan biyoyararlanımdır. Çalışmalar arasındaki değişkenliğe bağlı olarak, absorpsiyon derecesinin güvenilir bir şekilde tayin edilmesi için yeterli sayıda gönüllü olmalıdır. FDA'ya göre bir ilacın mutlak biyoyararlanımının %90 veya daha fazla olduğu gösterildiğinde gastrointestinal sıvıdaki dayanıklılığının kanıtlanması için ek veriye gerek yoktur.

## 2. İntestinal permeabilite yöntemleri

Pasif difüzyonla taşınan etkin maddeler için uygun yöntemlerdir. İnsanlarda bazı ilaçlarda gözlenen düşük permeabilite, P- gp gibi eksorptif taşıyıcılar tarafından taşınmasına bağlı olabilmektedir. Kullanılan sistemlerde effluks taşıyıcı proteinleri yoksa ya da ekspresyon derecesi düşükse bu ilaçların permeabilite sınıfının hatalı tayin edilmesine yol açabilir. Bu nedenle permeabilite sınıfını tayin etmek amacıyla kullanılan sistemlerde effluks sistemlerinin varlığı model ilaçlar kullanılarak (siklosporin A, vinblastine, rodamine 123 gibi) çift yönlü transport çalışmaları ile gösterilmelidir. FDA tarafından bir etkin maddenin permeabilite sınıfının tayininde kullanılması önerilen yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

- İnsalarda *in vivo* bağırsak perfüzyon çalışmaları
- Uygun hayvan modelleri kullanılarak *in vivo* veya *in situ* bağırsak perfüzyon çalışmaları
- İnsan ya da hayvan bağırsak dokuları çıkarılıp kullanılarak *in vitro* permeasyon çalışmaları
- Tek tabakalı epitel hücre kültürlerinden *in vitro* permeasyon çalışmaları

Pek çok durumda sadece tek bir yöntemle permeabilite belirlemek yeterli olmaktadır. Mutlak biyoyararlanım %90 veya daha fazla ise, uygulanan ilacın %90 veya daha fazlası idrarla değişmeden atılıyorsa, uygulanan ilacın %90 veya daha fazlası GI kanalda dayanıklı olup idrardan aynen veya metaboliti olarak geri elde ediliyorsa tek bir yöntem yeterli olmaktadır. Ancak bir etkin maddenin permeabilite sınıfını tayin etmede tek bir yöntem yetersiz oluyorsa FDA tarafından iki farklı yöntem kullanılması tavsiye edilmektedir. FDA'nın 2015 yılında yayınladığı taslak rehberde, farklı yöntemler arasında çelişkili veriler elde edildiğinde, insan verilerinin *in vitro* veya hayvan verilerinin yerini alacağı belirtilmiştir. Permeabilite sınıfının sınırı dolaylı olarak ilaç etkin maddesinin insanlardaki absorpsiyon derecesine ve direkt olarak insan intestinal membranından kütle transferinin hızının ölçümüne dayanmaktadır (30). Yüksek permeabilitenin göstergesi olarak kabul edilen %90 absorpsiyon derecesi taslak rehberde %85'e indirilmiştir (31).

Bu çalışmada seçilen model ilacın (metformin hidroklorür) bağırsak permeabilitesinin tayini amacıyla lümen kayıp esasına dayanan *in situ* üçlü intestinal bağırsak perfüzyonu yöntemi kullanılmıştır.

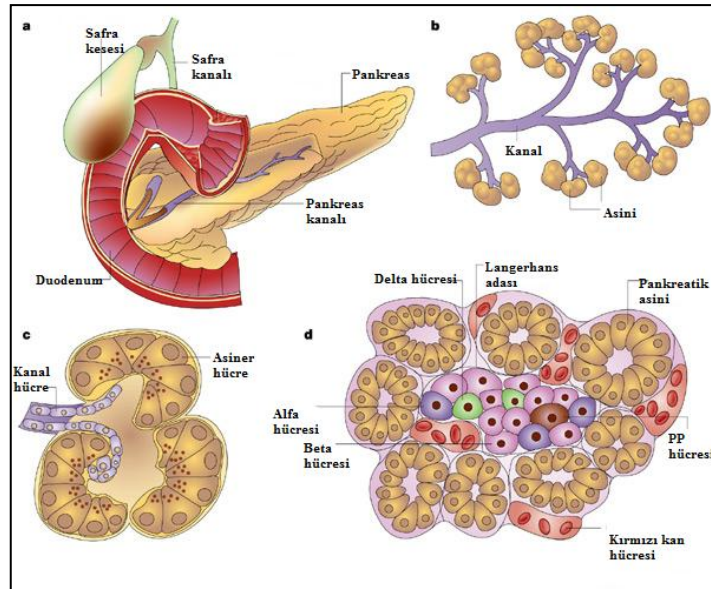
## 2.3. Diyabet

### 2.3.1. Pankreas

Pankreas (Şekil 2.4) karın boşluğunda yer alan sindirim enzimleri ve hormonlar üreten ekzokrin ve endokrin dokulardan oluşmuş 2. ve 3. lomber vertebralar hizasında bulunan 15-25 cm uzunluğunda, yaklaşık 55-100 g ağırlığında bir organdır. Pankreas baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölgeye ayrılmaktadır. Gastrointestinal kanalın duodenal kıvrımının iç kısmında yer alan şişkin sağ ucu baş, omurga ile onun önünde yerleşik bulunan, kan damarlarının üstünde uzunlamasına yer alan ve daha dar olan orta bölüm gövde, ince uzun olan ve dalağa kadar uzanan son bölüm ise kuyruk olarak adlandırılmaktadır (32). Pankreas ince, gevşek bir bağ dokusu kılıfı ile sarılmıştır. Bağ dokusunun dış tabakası pankreas lob ve lobüllere ayırır. Lobüller arasında kanallar, kan damarları ve sinirler bulunmaktadır. Pankreasa

ait asinüsler ve kanallar endodermden; bağ doku yapısındaki kılıf, interlobüler septa ve kan damarları ise mezodermden köken almaktadır (33).

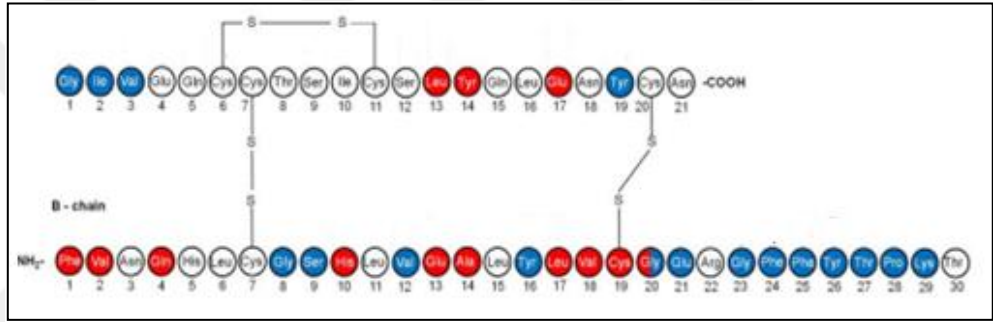
Pankreasın ekzokrin bölümü saf seröz asinüslerden oluşmuştur ve sindirim enzimlerini (lipaz, proteaz, amilaz gibi) salgılamaktadır. Bu enzimler bir kanal aracılığıyla duodenuma dökülür. Pankreasın endokrin bölümü ise ekzokrin parenkimada düzensiz olarak dağılmış hücre toplulukları olan Langerhans adacıklarından oluşmuştur. Pankreasın Langerhans adacıklarında dört farklı hücre tipi (alfa, beta, delta, F) bulunmaktadır ve karbonhidrat metabolizmasını düzenleyen hormonları salgılamaktadır. Alfa hücreleri glukagon, beta hücreleri insülin, delta hücreleri somatostatin, F tipi hücreler ise pankreatik polipeptid hormonunu salgılamaktadır. Glukagon, kandaki düşük glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak salgılanırken insülin, kandaki yüksek glikoz konsantrasyonuna yanıt olarak salgılanmaktadır. Somatostatin, insulin ve glukagon salınmasını parakrin bir şekilde inhibe etmektedir. Bunun yanı sıra ekzokrin pankreas enzimlerinin salınmasını, mide pariyetal hücrelerinden HCl salınmasını, enteroendokrin hücrelerden gastrin salınmasını, safra kesesinin kasılmasını inhibe etmektedir. Pankreatik polipeptid hormonunu pankreas ve safra kesesi salgılarını azaltan bir hormondur (34).



Şekil 2.4. a) Pankreasın anatomisi, b) Ekzokrin pankreas, c) Tek bir asini, d) Ekzokrin dokusuna gömülü bir pankreas adacığı (23).

### 2.3.2. İnsülin

İnsülin, pankreastaki Langerhans adacıklarından salgılanan, molekül ağırlığı 5,8 kilodalton olan, kimyasal olarak birbirine disülfid köprüleriyle bağlanmış iki polipeptid zinciri ve 51 amino asitten oluşan ayrıca vücuttaki karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan anabolik bir hormondur (Şekil 2.5). İnsülin ilk defa 1921 yılında Banting ve Best tarafından pankreastan izole edilerek diyabet tedavisinde kullanılmıştır (35).

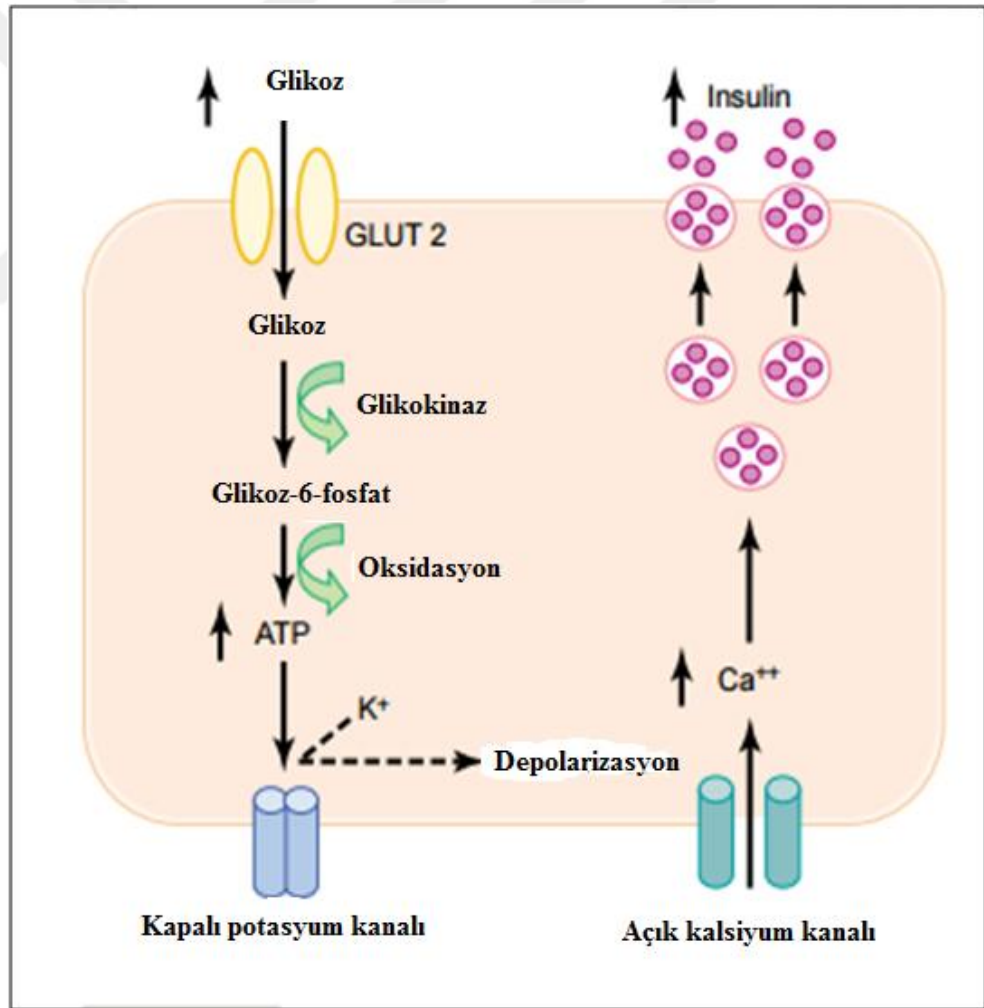


Şekil 2.5. İnsan insülininin primer yapısı (36).

Kanda serbest halde bulunan insülinin plazmadaki yarılanma ömrü çok kısadır (yaklaşık 6 dk). Genellikle karaciğer ve böbreklerde parçalanıp, 10-15 dk içinde plazmadan tamamen uzaklaştırılmaktadır (37).

İnsülin karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını düzenlemektedir. Karbonhidrat metabolizmasında insülin glikozun hücre içerisine alınmasında görev almaktadır. Pankreastaki beta hücrelerinden insülin salgılanması, kan glikoz düzeyinin yükselmesi ile tetiklenmektedir. GLUT2 taşıyıcısı tarafından glikoz alımının başlaması glikozun glikolitik fosforilasyonu ATP/ADP oranının yükselmesine neden olurken bu yükselme membranı depolarize eden potasyum kanallarını inaktive etmektedir. Kalsiyum kanalları açılarak kalsiyum iyonları hücre içine girmektedir. Kalsiyum düzeyinin yükselişini takiben insülin depo granüllerinden salınmaktadır (Şekil 2.6). Glikozun glikojene çevrilmesinde rol

oynayan glikokinaz enzimi karaciğer tarafından üretilmektedir ve insülini kontrol altına almaktadır. Yağ metabolizmasında ise trigliseritlerin serbest yağ asitlerine hidrolizini sağlayan lipoprotein lipazı inhibe etmektedir. Ayrıca yağ dokusu ve karaciğer hücrelerinde trigliserit sentezini ve depolanmasını artırmaktadır. İnsülin aminoasitlerin hücre içine alımını artırırken proteinlerin yıkımını ise azaltmaktadır. Ayrıca alin, lösin, izolösin, tirozin, fenilalanin gibi aminoasitlerin hücre içine alınmasını hızlandırmaktadır. Diğer yandan, bazı iyonların ( $K^+$ ,  $Mg^{++}$  ve fosfat gibi) hücre içine alımını hızlandırmaktadır. Daha uzun vadede insülin seçilmiş DNA genetik sekanslarının transkripsiyon hızını artırmaktadır. Böylelikle, RNA miktarı ve protein sentezi artmaktadır (38).



**Şekil 2.6.** Pankreasın beta hücreleri tarafından insülin salgılanması ve glikoz stimülasyonunun temel mekanizmaları (38).

### 2.3.3. Diyabetin Tanımı ve Tarihçesi

Dünya nüfusunun önemli bir kısmını etkileyen diyabet (Diabetes Mellitus), karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozuklukla karakterize edilen, yüksek kan glikoz düzeyleri ile seyreden, karmaşık metabolik bir hastalıktır (39). Diyabet halk dilinde şeker hastalığı olarak bilinmektedir. İlk olarak M.Ö. 1552 yılında çok idrara çıkma belirtileri ile bu hastalıktan bahsedilmiştir. Diyabet kelimesi ilk olarak Arateus tarafından M.S. ikinci yüzyılda kullanılmıştır (40). 1764 yılında ise, Thomas Wills tarafından mellitus (bal tadı anlamında) kelimesi diyabetin sonuna eklenmiştir. 1776'da ise, Dobson isimli bir araştırmacı diyabet hastalarının kanında ve idrarında normalden fazla miktarda şeker olduğunu tespit etmiştir (41). 1921 yılında Frederick Banting ve Charles Best tarafından insülinin sentezlenmesiyle diyabetin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu bilim adamları 1923 yılında insülini keşfettikleri için Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir (42).

### 2.3.4. Diyabet Prevelansı (Görülme Sıklığı)

Diyabetli insan sayısı; dünya nüfusunun artması, yaşlanma, kentleşme, obezite sıklığı ve fiziksel hareketsizlik gibi nedenlerden dolayı artmaktadır (43). Dünya Sağlık Örgütü, diyabet prevelansının gelecek 20 yıl içinde iki katına çıkacağını öngörmektedir. Tüm dünyada, 2013 yılında toplam 381 milyon diyabet hastası olduğu bildirilmiştir (44). Diyabet, dünyada ölüme neden olan hastalıklar arasında ilk beş sırada yer almaktadır. 2014 yılında Tip 2 diyabet nedeniyle 4,9 milyon kişi ölüyorken bu rakam her geçen yıl artmaktadır. Çağın yeni vebası olarak görülen diyabet ile ilgili araştırma sonuçlarına göre tüm dünyada 2014 yılında 387 milyon diyabet hastası bulunurken bu sayının 2025 yılında tüm dünyada yaklaşık 300 milyon, 2030 yılında yaklaşık 366 milyon, 2035 yılında ise 592 milyona çıkacağı öngörülmektedir. Bu sayının %90-95'ini ise insüline bağımlı olmayan Tip 2 diyabetli hastalar oluşturmaktadır (43, 45). Ayrıca, diyabete bağlı komplikasyonların bireye ve topluma getirdiği doğrudan (tedavi) ve dolaylı (sakatlık, iş kaybı, erken ölüm) maliyet çok fazladır. Çeşitli ülkelerde toplam sağlık hizmeti harcamalarının %3-



12'sini diyabet giderleri oluşturmaktadır (46). 2013 yılı Sosyal Güvenlik Kurumu verilerine göre Türkiye'de diyabet hastası 2.421.483 kişi bulunmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 21. Dünya Diyabet Kongresi'nde, 2011 yılında Türkiye'de yıllık Tip 2 diyabet doğrudan maliyeti 12.810.623.435 TL olarak belirtilmiştir. Bu nedenlerle, diyabet tüm dünyada öncelikli araştırma alanlarına girmiştir ve bu hastalıkla ilgili çalışmalar giderek artan bir önem kazanmıştır.

### **2.3.5. Diyabetin Tanısı ve Komplikasyonları**

Diyabetin belirtileri; kilo kaybı, yorgunluk, poliüri, polidipsi, polifaji, ketoasidoz ve pruritis olarak sıralanabilir (47). Diyabette, insülin salımında azalma sonucunda karbonhidrat, yağ, protein metabolizmalarında bozulmalar ile akut veya kronik komplikasyonlar görülmektedir. Akut komplikasyonları; hipoglisemi, hiperglisemi, ketoasidoz, laktik asidoz, bakteriyel veya fungal enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Diyabetli hastalarda, zamanın ve metabolik bozulmanın fonksiyonu olarak özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp, kan damarları, ayak, karaciğer gibi çeşitli organlarda uzun süreli ciddi hasar ve fonksiyon bozukluğu oluşmaktadır. Dokularda oluşan hasar veya vasküler hasar; hastalık ilerledikçe retinopati, nöropati, nefropati, kardiyovasküler ve ülser gibi ciddi diyabetik kronik komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olur (48, 49). Diyabetin tanısında genellikle açlık plazma glikoz düzeyine bakılmaktadır. Ayrıca, oral glikoz tolerans testi, glikolize hemoglobin testi, idrarda şeker aranması, solukta aseton kokusu tayini yapılarak da diyabet teşhis edilebilmektedir (Tablo 2.1, 50).

Bir bireyin diyabet tipini belirlemek genellikle tanı anında mevcut koşullara bağlıdır ve birçok diyabetik birey kolayca tek bir sınıfa uymaz (51). 1997 yılında Amerikan Diyabet Birliği bozulmuş açlık glikozu (IFG) tanısını da içeren diyabet tanı ve sınıflandırma kriterlerini yayınlamıştır ve hemen ardından 1999 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bu değişiklikleri kabul etmiş ve yayınlamıştır. 2003 yılında ise Amerikan Diyabet Birliği tarafından IFG tanısı ile ilgili modifikasyonlar yapılmıştır. DSÖ tarafından önerilen Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT)'ne

alternatif olarak Amerikan Diyabet Birliği tarafından ortaya atılan yeni tanı sistemi en son kabul gören sınıflandırmadır. Buna göre, diyabet tanısı için plazma açlık glikoz düzeyine bakılarak normal, IFG ve diyabet şeklinde bir sınıflandırma yapılması tavsiye edilmektedir (52). 2011 yılından itibaren HbA1c ölçümü DSÖ tarafından diyabet tanı kriterleri arasına katılmıştır.

**Tablo 2.1.** Diyabet tanısı için kan düzeyleri (53).

	<b>Açlık Kan Glikozu (mg/dL)</b>	<b>Oral Glikoz Tolerans Testi (Kan glikoz düzeyi mg/dL)</b>	<b>HbA1c</b>
Normal	<100	<140	%5 civarında
Bozulmuş glikoz toleransı (diyabet adayı, prediyabet)	100-125	141-200	%5,7-%6,4
Diyabetik	>125	>200	>%6,5

### 2.3.6. Diyabet Sınıflandırılması

1997 yılında American Diabetes Association® (ADA) etiolojinin ön plana çıkarıldığı ve halen kullanılan yeni bir sınıflandırma yapmıştır. Bu sınıflandırmada diyabet Tip 1, Tip 2, Diyabetin diğer spesifik türleri, gestasyonel diyabet olarak kategorize edilmiştir. DSÖ ise Tip 1, Tip 2 ve gestasyonel diyabet olarak üç sınıfa ayırmaktadır.

Tip 1 diyabette vücut, bağışıklık sistemindeki hatadan dolayı antikorlar üretmekte, bunlar ise pankreasın insülin üreten hücrelerini yok etmektedirler. Tip 1 diyabet insüline bağımlı diyabet olarak da bilinir. Pankreas bezinden insülin sentezi

ve salımı ya yoktur ya da yok denecek kadar azdır. Bu tip diyabeti olan hastalar mutlaka dışarıdan insülin almak zorundadırlar. Daha çok çocuklarda ve genç erişkinlerde görülür. Diyabetli tüm bireylerin yaklaşık %5-10'u Tip 1 diyabetli hastalardır ve Tip 1 diyabetlilerin %75'inde hastalık 15 yaşından önce başlamaktadır (54, 55). DSÖ ve IDF'nin verilerine göre tüm yaş gruplarında toplam olarak 4,9 milyon civarında Tip 1 diyabetli birey bulunduğu ve prevalansın ise %0,09 olduğu bildirilmiştir (46).

Tip 2 diyabet ise, insülinin etkisine karşı direnç gelişmesi ya da insülin duyarlılığının azalması ile insülin sentezi ve salgılanmasının azalması ya da bazen tamamen ortadan kalkması ile ortaya çıkan bir hastalıktır (56). İnsüline bağımlı olmayan diyabet veya erişkin diyabet olarak da adlandırılmaktadır. Erişkin diyabet denilmesinin sebebi, genellikle 40 yaşından sonra görülmesidir. Fakat son yıllarda yaşam tarzı değişikliklerine bağlı olarak (özellikle obezitenin görülme sıklığının artmasıyla ilişkili olarak) çocuk ve gençlerde de görülmeye başlamıştır. Diyabetli hastaların ~% 90–95'i Tip 2 diyabete sahiptir. İnsülin direnci, insüline karşı biyolojik yanıtın bozulmasıdır. İnsülin karaciğerde glikoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek glikoz üretimini baskımlarken aynı zamanda glikozun kas ve yağ dokusuna alınımını ve burada enerji kaynağı olarak biriktirilmesini sağlar. İnsülin direnci olan hastalarda, kan glikozunun kas, yağ ve karaciğer hücrelerine girmesi zorlaşmıştır. Bu nedenle kanda glikoz artar ve hiperglisemi oluşur. Bu durumda pankreas hiperglisemiyi azaltmak için daha çok insülin üretmeye ve normalden daha fazla çalışmaya başlar. En sonunda ise pankreastaki  $\beta$  hücreleri yeterli insülin sağlama yeteneğini kaybeder ve insülinin vücutta tam olarak kullanılamamasına insülin direnci denir. Bunu takiben diyabet gelişir (57).

Gestasyonel diyabet hamileliğe bağlı diyabettir (58, 59). İlk gebelik sırasında tespit edilir ve çeşitli derecelerde glikoz intoleransı olarak tanımlanmaktadır. Belirtileri genelde Tip 2 diyabete benzer, doğumdan sonra genellikle düzelir; ancak hamile değilken de diyabet gelişimi için yüksek risk taşırlar (60). Diyabetin diğer spesifik türleri ise nadir görülürler ve spesifik bir bozukluk nedeniyle oluşan hiperglisemi türlerini içermektedir. Bunlar, aşağıdaki şekilde sıralanabilir (61).

1.  $\beta$  hücrelerinin fonksiyonun genetik hasarı (Kromozom 12, HNF-1  $\alpha$  (MODY3), Kromozom 7, glikokinaz (MODY2), Kromozom 20, HNF-4  $\alpha$  (MODY1), Kromozom 13, insulin düzenleyici faktör-1 (IPF-1; MODY4), Kromozom 17, HNF-1 (MODY5), Kromozom 2, NeuroD1 (MODY6), Mitokondriyal DNA ve diğerleri)
2. İnsülin aktivitesinde genetik hasarlar (Tip A insülin direnci, Leprechaunizm, Rabson-Mendenhall sendromu, Lipoatropik diyabet ve diğerleri)
3. Ekzokrin pankreas hastalıkları (pankreatit, pankreotektomi, neoplazi, kistik fibrozis, hemokratozis ve diğerleri)
4. Endokrinopatiler (Akromegali, Cushing sendromu, glukagonema, feokromaitoma, hipertirodizm, somatostatinoma, aldosteronoma ve diğerleri)
5. İlaçlar veya kimyasallar (Glukokortikoidler, tiazidler, nikotinik asit, vakor, pentamidin, tiroid hormonu, diazoksid, dilantin,  $\beta$ -adrenerjik agonistler,  $\alpha$ -interferon ve diğerleri)
6. Enfeksiyonlar (Konjenital kızamık, Sitomegalovirüs ve diğerleri)
7. İmmün aracılıklı diyabetin sık olmayan formları (Stiffman Sendromu, Anti insülin reseptör antikoları ve diğerleri)
8. Diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar (Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu, Wolfram sendromu, Prader-Willi sendromu ve diğerleri).

### **2.3.7. Diyabette Değişen Enzim ve Taşıyıcı Proteinler**

Absorptif ve eksorptif taşıyıcı proteinlerin ekspresyonu patolojik durumlarda değişebildiği için substrat olan ilaçların absorpsiyonları diyabette de önemli ölçüde etkilenebilecektir. Diyabette ilaç metabolize eden enzimlerin diferansiyel

düzenlemesi sonucunda albümin ve metabolitlerinin enzimatik olmayan glikolizlenmesi ile ilaç emiliminin etkilenmesi, trigliserid ve serbest yağ asitlerinin plazma konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak plazma proteinlerine bağlanmadaki değişiklikler ilaçların hem farmakokinetik hem de farmakodinamik özelliklerinde değişikliklere yol açabilmektedir (62). Diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlar (metformin, repaglinid, gliburid) bağırsaklarda yüksek oranlarda bulunan enzim [CYP3A4: repaglinid (63), CYP3A4: gliburid (64)] ve taşıyıcıların [P-MAT: metformin (65), OATP1B1: repaglinid (66), OCT3: metformin (67) gibi] substratıdır.

Yapılan araştırmalarda, ilaç metabolizasyonundan sorumlu olan bazı sitokrom (CYP) P450 enzim düzeylerinin diyabette değiştiği gösterilmiştir. Bunlardan CYP1A2 (68), CYP2B1/2 (69), CYP2E1 (70), CYP3A1 (71), CYP3A2 (69) enzimlerinin düzeyleri artarken CYP2C11 (70) düzeyinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca vücutta ilaçların taşınmasından sorumlu olan absorptif ve eksorptif taşıyıcıların düzeylerinde de diyabete bağlı olarak değişikliklerin olabileceği belirtilmiştir (Tablo 2.2). Bu taşıyıcılardan Mdr2, Mrp2 ve 4, Oatp2b1, GLUT2, GLUT4 düzeyleri diyabete bağlı olarak artarken Oatp1a1, Oatp1a4 ve Oatp1b2 düzeyleri azalmıştır (72). Diyabette enzim ve taşıyıcı düzeylerinin değişmesine bağlı olarak ilaçların absorpsiyon, dağılma ve metabolizasyon gibi farmakokinetik özellikleri etkilenebilir. İlaçların farmakokinetik özelliklerinde diyabete bağlı olarak ortaya çıkabilecek olası değişiklikler terapötik yanıtın da farklı olmasına yol açabilir. Bu nedenle güvenli ve etkin bir ilaç tedavisi için ilaçların farmakokinetiği üzerine diyabetin etkisinin araştırılması önemlidir.

**Tablo 2.2.** Diyabette değişen enzim ve taşıyıcılar.

<b>Artan enzimler</b>	<b>Azalan enzimler</b>	<b>Artan taşıyıcılar</b>	<b>Azalan taşıyıcılar</b>
CYP1A	Lipoprotein lipaz	GLUT2	Oatp1a1
CYP1A1	CYP2A2	GLUT4	Oatp1a4
CYP1A2	CYP2C11	Mdr2	Oatp1b2
CYP2B1/2	CYP2C13	Mrp2	
CYP2B10		Mrp4	
CYP2C		Oatp2b1	
CYP2D			
CYP2E1			
CYP3A1			
CYP3A2			
CYP3A4			

### 2.3.8. Diyabet Tedavisi

Diyabet tedavisinin amaçları; kan şekerini normal sınırlarda tutmak, diyabete bağlı gelişebilecek akut ve kronik komplikasyonların ortaya çıkışını engellemek, yaşam süresini ve kalitesini artırmaktır. Diyabetteki tedavi yaklaşımları ise, diyabet eğitimi, beslenme, egzersiz, yaşam tarzı değişiklikleri ve ilaç tedavisi (oral antidiyabetikler ve insülin gibi)' dir (73).

Diyabetin oral monoterapisinde sülfonilüreler (gliburid, gliklazid, glipizid, glimepid vb.), biguanidler (metformin vb.), alfa-glikosidaz inhibitörleri (akarboz vb.), glinidler (repaglinid, nateglinid vb.), tiazolidinedionlar (rosiglitazon, pioglitazon, rivoglitazon, troglitazon vb.) kullanılmaktadır (74). Ayrıca metformin+sülfonilüre, metformin+tiazolidinedion, metformin+meglitinid, metformin+alfa-glukosidaz inhibitörleri, sülfonilüre+tiazolidinedion, sülfonilüre+alfa-glukosidaz inhibitörü gibi kombine ilaç tedavisi de uygulanmaktadır (75, 76). Oral kombine tedavilerin yetersiz kaldığı durumlarda Tip 2 diyabette ve

neredeşye Tip 1 diyabetli hastaların tamamında insülin tedavisi gerekli görölmektedir. İnsülin tedavisinin amacı vücuttaki insülin salımını taklit edip plazma insülin ve kan glikoz düzeylerini normal sınırlarda tutmaktır.

### 2.3.9. Deneysel Diyabet Geliştirme Yöntemleri

İnsanlarda görölen diyabetin tanısı, tedavisi ve önlenbilmesi için deney hayvanlarında deneysel diyabet modelleri oluşturulmaktadır. Klinik çalışmaların yanı sıra bu modeller de araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Hayvanlarda deneysel diyabet geliştirmek amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar:

**Cerrahi diyabet:** Kısmi (parsiyel) veya total pankreatektomi, hipotalamik lezyon gibi cerrahi müdahaleler sonucu hayvanlarda diyabet geliştirilmektedir.

**Spontan diyabet:** Ağır düzeyde hiperglisemili hayvan modelleri (db/db fare, Rhesus maymunu, çöl kemirgenleri) ve ılımlı hiperglisemili hayvan modelleri (ob/ob fare) kullanılarak Tip 2 diyabet çalışmaları, BioBreeding sıçan, obez olmayan diyabetik fare ve diğerleri (Macaca nigra maymunu, Keeshand köpeği, Çin hamsteri, kobay, Yeni Zelanda beyaz tavşanı, Komedo Diabetes Prone sıçan kullanılarak da Tip 1 diyabet çalışmaları gerçekleştirilebilir. Genellikle gen mutasyonu ile bu hayvanlar üretilmektedirler (77).

**Viral diyabet:** İnsanlarda ve hayvanlarda diyabet gelişimi ile ilişkili virüsler bulunmaktadır. Bu virüslerin hayvanlara enjeksiyonu sonucu hayvanlarda diyabet geliştirilebilmektedir. Cocksackie B virüsleri, Hepatitis A virüsü, Rubella virüsü, Mumps virüsü, Rotavirüs, Retrovirüs gibi RNA virüsleri, Sitomegalovirüsü, Epstein-Barr virüsü, İnsan Herpes virüsü gibi DNA virüsleri insanlarda diyabet gelişmesine neden olurken benzer şekilde Cocksackie B virüsleri Ensefalomiyokart virüsü, Mengo virüsü, Reovirüs ve Retrovirüs gibi RNA virüsleri, Kilham sıçan virüsü ve Sitomegalovirüs gibi DNA virüsleri deneysel hayvanlarda diyabet geliştirilmesine neden olmaktadır (78).

**Transgenik diyabet:** Biyoteknolojik yöntemlerle kendi türü haricinde bir türden hayvanlara gen aktararak belirli özellikleri değiştirilmektedir ve bu hayvanlarda diyabet geliştirmek mümkün olmaktadır (77).

**Kimyasal diyabet:** Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntem kimyasal diyabettir. Deneysel diyabet geliştirmek amacıyla uygulanan kimyasal maddeler arasında özellikle streptozotosin (25-80 mg/kg) ve alloksan (40-80 mg/kg) yaygın olarak kullanılmaktadır. Alloksan kullanıldığında 24-72 saat içinde hepatik glikojen azalmasına neden olur. Streptozotosin uygulandıktan 48 saat sonra pankreasın beta hücrelerinde yapısal değişiklikler (toplam degranülasyon) meydana gelir ve 4 ay kadar devam eder. Alloksan, streptozotosin ve çinko şelatları gibi kimyasal maddelerin uygulanmasıyla hayvan modellerinde insüline bağımlı diyabet geliştirildiği bildirilmiştir. Deneysel diyabet gelişmesi birkaç aşamada gerçekleşir. Kimyasal ajanlar verildikten sonra, ilk aşamada hiperglisemi oluşur. Bunun nedeni dokuların glikoz kullanımına yapılan inhibisyon nedeniyle karaciğer glikojeninin ani yıkımına bağlı olarak aşırı glikoz serbestleşmesidir. Daha sonraki aşamada ise hipoglisemi oluşur. Hipogliseminin, glikozun dokular tarafından kullanımının artması glikozun dokulardan kana geçmesinin baskılanması ve özellikle tahrip sırasında beta hücrelerinden serbestleşen insülden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Son olarak kalıcı hiperglisemik faz oluşur. Bu aşamada insülin düzeyi, kullanılan ajanın dozu ile orantılı olarak düşer ve kan şekeri yükselir (79). Bu tez kapsamında diyabet geliştirmek amacıyla kullanılan streptozotosin, ilk defa 1959 yılında Herr ve Eble tarafından *Streptomyces achromogenes* kültürlerinden elde edilmiştir. Streptozotosin diyabetojenik özelliği olan dar spektrumlu bir antibiyotiktir ve pankreastaki Langerhans adacıklarının beta hücreleri üzerine toksik etkisi vardır. Ayrıca genotoksik etkisi de vardır. Deney hayvanlarında yapılan araştırmalarda orta derecede insan karsinogeni olduğu tespit edilmiştir (80). Streptozotosin ile sıçan, fare, hamster, köpek, kuzu ve maymunlarda diyabet geliştiği tespit edilmiştir (81). Ayrıca beta hücreleri üzerine etkisinin alloksandan fazla olduğu gösterilmiştir. Streptozotosin pH 4,5'da çözüldüğü zaman dayanıklıdır ancak bu pH dışında hemen parçalanır. Streptozotosin diyabet geliştirmek amacıyla genellikle 40-65 mg/kg tek dozda kullanılmaktadır. Bu doz artırılabilir ya da daha düşük dozlarda birkaç kere

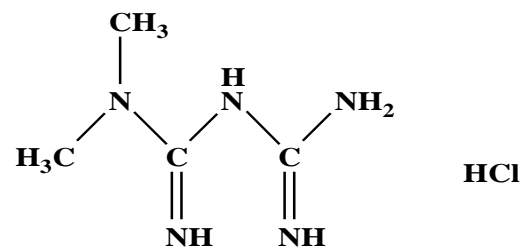


uygulama yapılabilir. Ancak 40 mg/kg dozun altında etkili olmadığı belirtilmiştir. Streptozotosin kullanılarak geliştirilen deneysel diyabetin tipi ile ilgili olarak literatürde farklı sonuçlar mevcuttur. Bazı çalışmalarda streptozotosin kullanılarak Tip 1 diyabet geliştirildiği belirtilirken bazı çalışmalarda Tip 2 diyabet geliştirildiği rapor edilmiştir (82-85). Ayrıca streptozotosinin pankreastaki beta hücrelerindeki sitotoksik etkisini azaltmak amacıyla, uygun dozda niktotinamidin streptozotosinle birlikte verildiği Tip 2 diyabet modeli de mevcuttur (86,87). Bu yöntemde, hayvanlar 12 saat öncesinden aç bırakılır. Önce uygun dozda (110 mg/kg) niktotinamid intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanır. 15 dakika sonra uygun dozda (65 mg/kg) streptozotosin i.p. uygulanır. 6 saat sonra %10 glikoz çözeltisi 24 saat süreyle sıçanlara içirilir. 3 gün ve 1 hafta sonra açlık kan glikoz düzeyleri kuyruk veninden kan alınarak ölçülür. Açlık kan glikoz düzeyi 250 mg/dL üzerinde çıkan hayvanlarda diyabet geliştiği kabul edilir.

## 2.4. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri

### 2.4.1. Metformin Hidroklorür

Bu çalışmada model ilaç olarak seçilen metformin hidroklorür (N,N-dimetilimidodikarbonimidik diamid hidroklorür;  $C_4H_{11}N_5.HCl$ , Şekil 2.7) biguanid grubu oral antidiyabetik bir ilaçtır. Biguanidler Galega officinalis (Fransız leylağı) bitkisinde bulunan guanidinin türevleridir.



Şekil 2.7. Metformin hidroklorürün kimyasal yapısı.

Molekül ağırlığı 165,63 g/mol olan metformin hidroklorür suda kolayca çözünür, aseton, eter ve diklorometanda pratik olarak çözünmez. pKa'sı 12,4'dür. Erime derecesi 223-226°C'dir (88). Metformin hidroklorür'ün miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), yaklaşık kızılötesi yansıma spektroskopisi (Near infra-red reflectance spectroscopy), UV-görünür bölge spektroskopisi, spektrofotometri, potansiyometri, sıvı kromatografisi-kütle/kütle spektrometrisi (LC-MS-MS) yöntemleri kullanılmıştır (89, 90). Bu çalışmada metformin hidroklorürün miktarını tayin etmek için HPLC yöntemi kullanılmasına karar verilmiştir. Metformin oda sıcaklığında insan plazmasında 48 saat boyunca dayanıklı bulunmuştur. -80°C'de dondurularak saklanmış insan plazması içindeki metforminin 2 yıl boyunca dayanıklı olduğu gösterilmiştir. UV ışığı, sıcaklık, asit, baz, peroksidasyon ve oksidasyon gibi stres koşullarında metformin hidroklorürün bozunmadığı gözlenmiştir (91, 92).

Metforminin oral biyoyararlanımı %50-60 olup alındıktan 6 saat sonra gastrointestinal kanaldan emilimi tamamlanır. Emilim sonrasında metformin hızla vücutta dağılır ve plazma proteinlerine bağlanmaz. Metforminin hiçbir metabolitine rastlanmaması hepatic metabolizasyona uğramadığını göstermektedir. Böbrek fonksiyon bozukluğu ve kreatinin klerensi ile bağlantılı olarak metforminin eliminasyon hızı azalmaktadır. Bu nedenle metformin böbrek yetmezliği olan hastalarda kullanılmamalıdır. Metforminin farmakokinetik özellikleri Tablo 2.3'de verilmiştir (93). Yapılan araştırmalarda metformin hidroklorürün yüksek dozlarda (500,850,1000 mg) nonlineer farmakokinetik özellik gösterdiği belirtilmiştir.

Metformin hidroklorürün başlangıç dozu yemeklerle beraber günde iki kere 500 mg veya bir kere 850 mg'dır. Günde iki kere 500 mg metformin kullanımı yetmediğinde günde iki kere 850 mg'a geçilir. Dozaj haftada 500 mg veya iki haftada 850 mg olarak artırılır. Gliseminin kontrolü için gerektiğinde günlük doz bölünerek 2550 mg'a kadar çıkılabilir. Klorpropamid dışındaki standart oral hipoglisemik ajanlardan metformine geçilmek istenildiğinde tedaviye ara vermek gerekmez. Film tabletlerin yemeklerden sonra çiğnenmeden az miktarda sıvı ile alınması gerekir. Böbrek fonksiyon bozukluklarında serum kreatinin düzeyi

erkeklerde 1,5 mg/dl veya kadınlarda 1,4 mg/dl üzerindeyse veya kreatinin klerensi 60 mL/dk altındaysa metformin kullanılmamalıdır. 17 yaşın altında kullanımı önerilmemektedir. Diyabet tedavisinin başarılı olmadığı durumlarda ve özellikle Tip 2 diyabetli şişman hastalarda etkili olur. Başlangıç tedavisi olarak tek başına veya diğer antidiyabetik ajanlarla ya da insülinle kombine halde verilebilir. Tip 1 diyabetli hastalarda ise, insülin tedavisine yardımcı olarak özellikle belirtilerin iyi kontrol edilemediği hastalarda kullanılabilir (94).

**Tablo 2.3.** Metformin hidroklorürün farmakokinetik özellikleri (93).

<b>Farmakokinetik Parametre</b>	<b>Değer/Özellik</b>
Oral biyoyararlanım	%50-60 ince bağırsaklardan emilir
Metabolizasyon	Ölçülebilecek kadar metabolize olmaz
Eliminasyon	%90 idrarla atılır
$t_{maks}$	2 – 3,3 saat
$t_{1/2}$	1.5-4,7 saat
$V_d$	63-276 L
$C_{maks}$ (850 mg doz)	1,5-2 mg/L
AUC (850 mg doz)	8,7-9,6 mg saat/L
$CL_T$	26,5-42,4 (L/saat)

Alkol, beta blokörler ve MAO inhibitörleri metforminin etkisini artırır. Alkol ayrıca laktik asidoz riskini artırır. Bezafibrat ve klofibrat toleransını arttırabilirler, ilacın etkisini çoğaltabilirler. Kortikosteroidler, diazoksit, bumetanid, furosemid ve tiyazid grubu diğer diüretikler ve oral kontraseptifler antagonist etki göstererek dozun yeniden ayarlanmasını gerektirebilirler. Lityum tuzları glikoz toleransını azaltabilirler. Antikoagülanlarla etkileşebileceğinden birlikte

kullanıldıkları durumlarda antikoagulan dozunun yeniden ayarlanması gerekebilir. Metformin, B12 vitamini emilmesini azaltabilir. Bu nedenle sürekli tedavi gören hastaların B12 vitamini düzeyleri yılda bir kez ölçülmelidir. Tek başına kullanıldığı zaman hipoglisemiye neden olmaz. Ancak insülin ya da antidiyabetiklerin etkilerini arttırabileceği unutulmamalıdır. Metformin ile tedavi edilen hastalar alkol kullanmamalıdır (95). Metforminin ilaç etkileşimleri Tablo 2.4’de verilmiştir.



**Tablo 2.4.** Metforminle diğ er bazı ilaçların etkileşmeleri (94).

<b>İlaçlar</b>	<b>Etkileşimler</b>
Gliburid	Metforminin farmakokinetiğ inde ve farmakodinamiğ inde değ işiklik yapmaz. Ancak gliburidin AUC ve $C_{maks}$ 'ının azalmasına neden olabilir
Furosemid	Furosemid ve gliburidle birlikte alındığında, furosemidin $C_{maks}$ (%22 oranında ) ve AUC'si (%15 oranında ) artar fakat metforminin renal klerensi değ işmez
Nifedipin	Metforminin $C_{maks}$ 'ının %20 oranında, AUC'sinin %9 oranında artmasına ve idrardaki miktarının artmasına neden olabilir
Katyonik İlaçlar (amilorid, digoksin, morfin, prokainamid, kinin, kinidin, ranitidin, triamteren, trimetoprim, veya vankomisin gibi)	Proksimal renal túbüler sekresyonla elimine olurlar ve metforminin farmakokinetiğ ini etkileyebilirler
Diğ erleri (tiazidler ve diğ er diüretikler, kortikosteroidler, fenotiazinler, östrojenler, oral kontraseptifler, fenitoin, nikotinik asid, semptomimetikler, kalsiyum kanal blokörleri ve izoniazid gibi)	Yeterli glisemik kontrolü sağlamak için hasta yakından izlenmelidir

Metformin genellikle iyi tolere edilmesine rağmen bazen gastrointestinal kanalda iritasyona bağlı olarak bulantı, kusma, ağızda metalik tat, diyare, epigastrik ağrı ve kilo kaybına neden olabilmektedir. Bu nedenle yemeklerle birlikte kullanılması önerilmektedir. Nadiren kronik kullanımda vitamin B12 ve folat absorpsiyonunda azalmaya neden olmaktadır. Metformin kullanımı çok az da olsa laktik asidoz, cilt rahatsızlıkları, karaciğer problemleri ve anormal laboratuvar bulgularına da sebep olabilmektedir. Metformin hidroklorür böbrek hastalığı olanlarda, akut veya kronik asidozu olanlarda kontrendikedir.

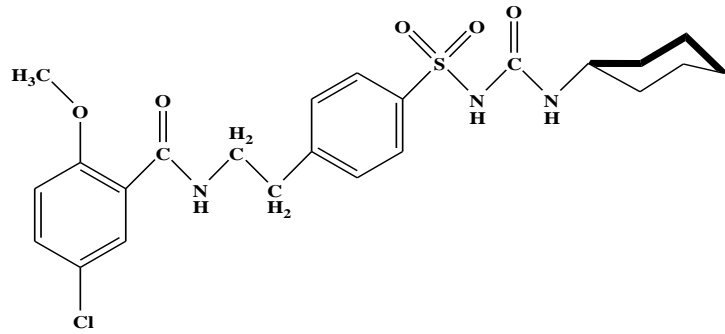
Biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre Sınıf 3 (yüksek çözünürlük ve düşük permeabilite)'te yer alan (96) metformin insan organik katyon taşıyıcılarının (OCT1, OCT2, OCT3) substratıdır (65, 97). OCT1 metforminin hepatik alımından sorumludur. Yapılan bir çalışmada, normal ve Oct 1 (-/-) farelere metformin 210 dakika boyunca i.v. infüzyonla 150 mg/sa/kg dozda verilmiştir. Daha sonra, metforminin plazma, karaciğer ve kasdaki konsantrasyonu tayin edilmiştir. Metforminin hepatik konsantrasyonu Oct1(-/-) ve normal farelerde sırası ile  $49,3 \pm 10,4 \mu\text{g/g}$  ve  $417 \pm 178 \mu\text{g/g}$  bulunmuştur. Buna karşın, metforminin Oct1(-/-) ( $107 \pm 17 \mu\text{g/g}$ ) ve normal farelerin ( $153 \pm 18 \mu\text{g/g}$ ) iskelet kaslarındaki konsantrasyonu kıyaslanabilir bulunmuştur (98). Bir başka çalışmada, Higgins ve diğ. (99) metforminin farmakokinetiği üzerine taşıyıcıların etkisini incelemek amacıyla Oct1/Oct2 çift-knockout ve normal FVB erkek fareler kullanmışlardır. Her iki gruba da 5 mg/kg dozda metformin intravenöz olarak verilmiştir. Tüm plazma konsantrasyonları Oct1/2-knockout farelerde yüksek bulunmuştur. Sistemik maruziyet Oct1/2-knockout farelerde ortalama 4,4 kat daha fazla bulunmuştur. Normal farelerde renal klerens  $81,7 \text{ mL/dk.kg}$  iken Oct1/2-knockout farelerde  $18 \text{ mL/dk.kg}$  bulunmuştur. Dağılma hacminin normal farelerde 3,5 kat fazla olduğu gösterilmiştir (99). OCT3 insan ince bağırsak epitel hücrelerinin membranlarında lokalize olmuştur (100).

Enterositlerin luminal kısmında lokalize olan plazma membran monoamin taşıyıcı (PMAT) protein metforminin gastrointestinal kanaldan hücre içerisine alınmasından sorumlu majör taşıyıcıdır. Bu nedenle enterositlerdeki metformin

hidroklorür pH'ya bağımlı olarak PMAT aracılığı ile taşınmaktadır (65). Ayrıca, metformin MATE1 ve MATE2-K (human multidrug and toxin extrusion 1 ve 2) için iyi bir substrattır. MATE1 ve MATE2-K böbreklerin fırça kenar membranlarından metforminin tübüler sekresyonunu sağlamaktadırlar. Dolayısıyla metforminin dağılıma hacmini ve renal klerensini etkilemektedirler. MATE1'in metformini safra kanalının içine taşıdığı da savunulmaktadır. Ayrıca MATE1 metformini böbrekten idrara taşımaktadır. Yoon ve diğ. (101) OCT1-3, OCTN1, MATE1, ve MATE2'nin metforminin eğri altında kalan alan ve maksimum konsantrasyon gibi farmakokinetik parametrelerini etkilediğini göstermişlerdir.

#### 2.4.2. Gliburid

Gliburid (5-kloro-N-(4-[N-(sikloheksilkarbamil)sulfamoil] fenetil)-2-metoksibenzamid;  $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ ; Şekil 2.8) sülfonilüre grubu oral antidiyabetik bir ilaçtır.



Şekil 2. 8. Gliburidin kimyasal yapısı.

Molekül ağırlığı 494,004 g/mol olan gliburid suda çözünmez, etanol ve metanolde kısmen çözünür. Diklorometanda biraz çözünür. pKa'sı 13,72'dür. Erime derecesi 169-170°C'dir (88). Gliburid sudaki düşük çözünürlüğü ve yüksek geçirgenliği nedeniyle Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre Sınıf 2'de yer

alan bir ilaçtır ve CYP2C9, BCRP, CYP3A4, CYP3A5 substratıdır (102-105). Gliburid diğer sülfonilüreler gibi pankreas beta hücrelerinden insülin salgılanmasını artırmaktadır. Sülfonilüreler pankreasın beta hücrelerinin yüzeyinde yer alan ATP-bağımlı potasyum kanallarına bağlanarak hiperpolarize edici potasyum akımını engeller. Potasyumun hücre dışına çıkamaması hücre içerisindeki elektriksel potansiyeli, hücre dışına göre daha pozitif hale getirir ve hücre depolarize olur. Bu depolarizasyon voltaj-duyarlı kalsiyum kanallarının açılmasına neden olur ve hücre içerisine giren kalsiyum molekülleri, sentezlendikten sonra granüller halinde depolanmış insülinin ekzositoz yoluyla hücre dışına çıkmasına yol açar.

Gliburid'in miktar tayini amacıyla literatürde HPLC, LC-MS ve yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemleri kullanılmıştır (106). Yapılan bir çalışmada, dondurulup çözündürülmüş örneklerde, -40°C'de 14 gün boyunca saklanmış örneklerde ve 24 saat boyunca saklanmış örneklerde glibanklamidin dayanıklı olduğu bulunmuştur (107). Gliburid oral yoldan alımını takiben hızla absorbe olur. Plazma pik konsantrasyonuna 4 saatte ulaşır. Normal sağlıklı kişilerde serumdan uzaklaştırılması bifaziktir, eliminasyon yarı ömrü 10 saattir. Gliburid karaciğerde ana metaboliti olan 4-transhidroksil türevine dönüşür. Ayrıca 3-sishidroksil türevi de vardır. Ancak bu metabolitlerin hipoglisemik etkileri belirgin değildir. Gliburid vücuttan metabolitler halinde %50 safra ve % 50 idrar yolu ile atılır. Gliburid albümine yüksek oranda (%98) bağlanır (108). Ancak diğer ilaçlar tarafından gliburidin proteinlere bağlanma bölgesinden ayrılması hipoglisemik etkide artmaya yol açabilir. Gliburidin farmakokinetik özellikleri Tablo 2.5'de verilmiştir (109).



**Tablo 2.5.** Gliburidin farmakokinetik özellikleri (109, 110).

<b>Farmakokinetik Parametre</b>	<b>Değer/Özellik</b>
Oral biyoyararlanım	%84-93 emilir: %98'u serum proteinlerine bağlanır
Plazma eliminasyon yarı ömrü	Yaklaşık 10 saat
Metabolizasyon	Karaciğerde major metaboliti 4-transhidroksil türevine dönüşür. Ayrıca 3-sishidroksil türevi de vardır
Eliminasyon	%50 safra ve %50 idrarla atılır
$t_{maks}$	1,4 saat
$C_{maks}$ (7 mg doz)	0,46 mg/L
AUC (7 mg doz)	2,086 mg saat/L
$V_d$	56,8 L
$CL_T$	3,1 L/saat

Gliburid için sabit bir doz şeması yoktur. Minimum etkili dozu saptamak için kan ve idrardaki glikoz değerleri periyodik olarak izlenmelidir. Başlangıç dozu günde 1 kez sabahları kahvaltı sırasında alınan 2,5-5 mg'dır. Hipoglisemik ajanlara duyarlı kişilerde başlangıç dozu günde 1 kez 1,25 mg olabilir. Bir başka oral hipoglisemik tedaviden gliburid tedavisine geçen hastalarda başlangıç dozu yine günde 1 kez 2,5-5 mg olmalıdır. Klorpropamid hariç diğer oral hipoglisemik ajanlardan gliburid tedavisine geçişte, geçiş süresine veya başlangıç dozuna gerek yoktur. Klorpropamid kullanan hastalar gliburid tedavisine geçtiklerinde klorpropamidin etkisi uzayabileceğinden ve hipoglisemiye neden olabileceğinden ilk 2 hafta boyunca yakından izlenmelidir. İnsülin ile tedavi edilen hastalarda günlük insülin dozu 20 üniteden az ise günde tek doz 2,5-5 mg gliburid tedavisine geçilebilir. İnsülin dozu günde 20-40 ünite ise günde tek doz 5 mg gliburid

tedavisine geçilebilir. Günlük insülin dozu 40 ünitenin üzerinde ise gliburid tedavisine geçmeden önce 10-20 gün gibi bir geçiş süresine ihtiyaç vardır (111). İnsülin dozu %50 azaltılıp günde 5 mg gliburid tedaviye eklenmelidir.

İdame dozu günde 1,25-20 mg'dır. Bu doz bir defada veya bölünmüş dozlar halinde uygulanır. Doz artırımları kan glikoz düzeylerine göre haftada 2,5 mg'ı aşmamalıdır. 5 mg gliburid, 250-375 mg klorpropamid, 250-375 mg tolazamid, 500-750 mg asetoheksamid ve 1000-1500 mg tolbutamide eşdeğer kan glikoz kontrolü sağlar. Günde 40 ünitenden fazla insülin kullanan hastalar gliburid tedavisine geçeceklerse insülin dozu %50 azaltılıp, 5 mg gliburid tedaviye eklenir. Daha sonra insülin dozu giderek azaltılır. Gliburid dozu ise 2-10 günlük aralar ile 1,25-2,5 mg dozunda artırılır. Bu değişim süreci içerisinde hem insülin hem gliburid kullanıldığı dönemlerde nadiren hipoglisemi oluşabilir. İnsülin dozu azaltılırken idrarda glikoz ve aseton sıkça kontrol edilmelidir. İnatçı glikozüri ve asetonüri hastanın Tip 1 diyabeti olduğunu ve insülin tedavisine gerek duyduğunu gösterir.

Günlük maksimum doz 20 mg'ı aşmamalıdır. Günde tek doz şeklinde uygulanan gliburid, özellikle 10 mg'dan daha yüksek dozlarla tedavi edilen hastalarda günlük doz 2'ye bölünerek uygulanabilir. Yaşlı hastalarda, zayıf düşmüş malnütrisyonlu hastalarda, böbrek ve karaciğer fonksiyonları bozuk hastalarda başlangıç ve idame dozları hipoglisemik reaksiyona yol açmayacak şekilde ayarlanmalıdır (112).

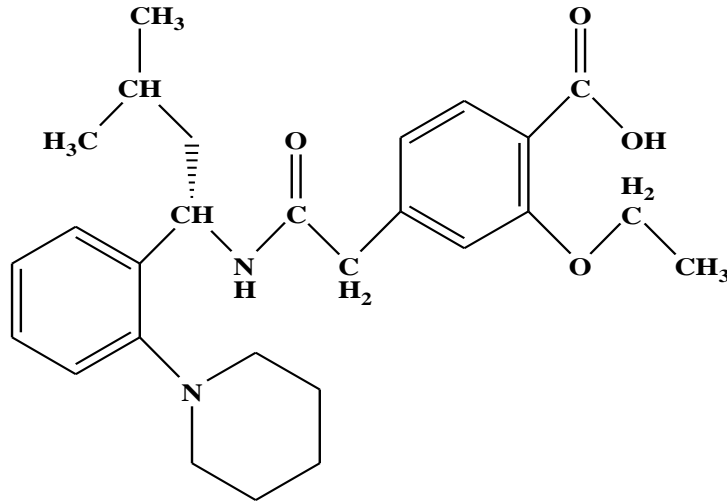
Sülfonilürelerin hipoglisemik etkileri non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar, salisilatlar, sülfonamidler, kloramfenikol, probenesid, kumarin, monoamino oksidaz inhibitörleri ve  $\beta$ -1-adrenerjik blokör ilaçlar gibi proteinlere yüksek oranda bağlanan ilaçlar tarafından artırılabilir. Bu ilaçlarla birlikte kullanım sırasında ve tedavi kesilirken hastalar hipoglisemi yönünden dikkatle gözlenmelidir. Tiazidler ve diğer diüretikler, kortikosteroidler, fenotiazinler, tiroid ürünleri, östrojenler, oral kontraseptifler, fenitoin, nikotinik asit, sempatomimetikler, kalsiyum kanal blokörleri, izoniazid hiperglisemiye neden olabilirler. Bu ilaçlarla birlikte kullanım

sırasında ve tedavi kesilirken hastalar hipoglisemi yönünden dikkatle gözlenmelidir (112).

Gliburid ile siprofloksazin arasında, gliburidin hipoglisemik etkisinin artması şeklinde sonuçlanan olası bir etkileşim bildirilmiştir. Ancak bu etkileşimin mekanizması bilinmemektedir. Gliburid oral mikonazol preparatları ile birlikte kullanıldığında ciddi hipoglisemi görülebilir. Bu etkileşiminin i.v., topikal vajinal mikonazol preparatları ile oluşup oluşmadığı bilinmemektedir (112).

### 2.4.3. Repaglinid

Repaglinid (S)-(+)-2-etoksi-4-[2-(3-metil-1-[2-(piperidin-1-il)fenil] butilamino)-2-okzoetil]benzoik asit;  $C_{27}H_{36}N_2O_4$ ; Şekil 2.9) glinid grubu oral antidiyabetik bir ilaçtır.



Şekil 2.9. Repaglinidin kimyasal yapısı.

Molekül ağırlığı 452,58 g/mol olan repaglinid suda çözünmez, diklorometanda ve metanolde kolayca çözünür. pKa'sı 15,52'dir. Erime derecesi

130-131°C'dir (88). Repaglinid pankreastaki beta hücrelerinden insülin salgılanmasını stimüle eder ve kan glikoz düzeylerini düşürür. Beta hücrelerinin membranlarındaki ATP bağımlı potasyum kanallarının kapanmasını sağlayarak kalsiyum kanallarının açılmasını sağlar ve insülin salgılanır. Repaglinid Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre Sınıf 2 (düşük çözünürlük, yüksek geçirgenlik)'de yer alan bir ilaçtır ve CYP3A4, CYP2C8, OATP1B1 substratıdır (113).

Repaglinid'in miktar tayini amacıyla literatürde HPLC, UV, HPTLC, spektrofotometri ve LC-MS-MS yöntemleri bulunmaktadır (114). Repaglinid, 20°C'de 5 saat, 1 hafta, 1 ay ve 3 ay bekletildikten sonra analiz edildiğinde, plazma içinde dayanıklı olduğu bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, repaglinid 0,1 N HCl içinde 4 saat bekletildikten sonra %15,3'nün, 0,1 N NaOH içinde 4 saat bekletildikten sonra %38,5'ünün, %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenip 36 saat bekletildikten sonra %33,9'nun, güneş ışığına 3 gün maruz kaldıktan sonra %22,5'inin ve 60°C'de bırakıldığında %23'ünün bozunduğu bulunmuştur (115, 116).

Repaglinid, oral kullanım sonrasında gastrointestinal kanaldan hızla ve tamamen emilir ve 1 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır ve 4-6 saat içinde elimine edilir. Repaglinidin plazma düzeyi, yaklaşık 1 saat olan yarılanma süresi nedeniyle hızla düşer. Repaglinidin oral biyoyararlanımı %56'dır. Dağılım hacminin 30 litre olduğu saptanmıştır. Plazma proteinlerine (albümin) bağlanma oranı %98'dir (117, 118). Bunun yanı sıra repaglinidin nöronal kalsiyum sensör proteinlerine bağlandığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (119). Repaglinid, oksidasyon ve konjugasyonla tamamen metabolize edilir ancak metabolitlerin farmakolojik ve klinik belirgin bir etkisi yoktur. CYP3A4 repaglinidin metabolizasyonunda etkilidir. Repaglinid ve metabolitleri, başlıca safra yoluyla atılır. Tek doz oral uygulama sonrası 96 saat içinde, radyoaktif işaretli repaglinidin %90'ı feçeste, %8'i idrarda saptanmıştır. Feçeste metabolize edilmemiş repaglinid miktarı %1'in altındadır. Repaglinidin farmakokinetik özellikleri Tablo 2.6'da verilmiştir (120).

Repaglinidin yeterince sıvı ile birlikte, ağız yoluyla ve yemeklerden 15-30 dakika önce veya yemekle birlikte bütün olarak alınması önerilir. Günde 2, 3 veya 4 kez kullanılabilir. Alındıktan sonra yemek yenmesi gerekir.

Daha önce antidiyabetik tedavi görmemiş veya HbA1C düzeyi 8 mg/dL altında olan hastalarda, önerilen başlangıç tedavi dozu 0,5 mg'lık tek tablettir. Daha önce antidiyabetik tedavi almış veya HbA1C düzeyi 8 mg/dL üstünde olan hastalarda, tedaviye başlangıç dozu 1 veya 2 mg'lık tek tablettir. İdame dozu 0,5 ile 4 mg arasında değişebilmektedir. Hastanın klinik yanıt, kan glikoz ve HbA1C düzeylerine göre tedavi dozu bireyselleştirilmelidir. Doz artırımları, iki katına çıkarma suretiyle ve birer hafta aralarla yapılmalıdır. Önerilen günlük maksimum toplam doz 16 mg'dır. Diğer kısa süre etkili antidiyabetik ilaçlardan repaglinid tedavisine geçildiğinde, bekleme süresi gerekmez. Diğer ilacın son dozunun alınmasından sonraki gün repaglinid tedavisine başlanabilir. Uzun süre antidiyabetik ilaçların kullanımında, 1 hafta veya daha uzun süreli gözlem gerekebilir. Önerilen tedavi dozunun yeterli klinik yararlanımı sağlamaması durumunda, repaglinid diğer antidiyabetik ilaçlarla kombine olarak kullanılabilir. Metforminle yeterince kontrol altına alınamayan hastalarda, repaglinid ile metformin kombine olarak kullanılabilir (121).

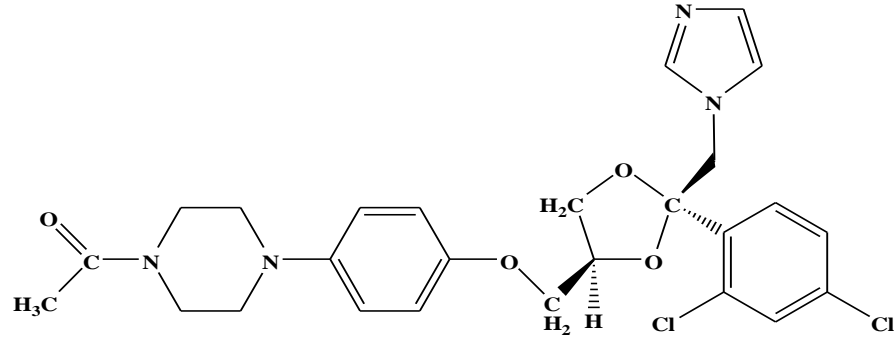
Hipoglisemik etkiyi güçlendirebilecek ilaçlar, diğer antidiyabetik ilaçlar, mono-aminoksidaz inhibitörleri, selektif olmayan beta-blokör ilaçlar, angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, salisilatlar, steroid olmayan anti-enflamatuvar ilaçlar, alkol ve anabolizan steroidler ve hipoglisemik etkiyi azaltabilecek ilaçlar, oral kontraseptifler, tiyazid grubu diüretikler, kortikosteroidler, tiroid hormonları, danazol ve sempatomimetik ilaçlar ile birlikte verildiğinde dikkat edilmelidir. CYP3A4 üzerine etkili olan ilaçlarla ilgili herhangi bir sistematik bilgi olmamasına karşın, imidazol grubu antifungal ilaçlar (ketokonazol, itrakonazol), simetidin, rifampisin ve nifedipin gibi ilaçlar repaglinidin metabolizasyonunu artırabilir veya azaltabilir (117).

**Tablo 2.6.** Repaglinidin farmakokinetik özellikleri (122, 123).

<b>Farmakokinetik Parametre</b>	<b>Değer/Özellik</b>
Oral biyoyararlanım	%56-63 ince bağırsaklardan emilir
Plazma eliminasyon yarı ömrü	1 saatten az
Metabolizasyon	Hepatik oksidasyon ve konjugasyon ile (CYP3A4 aracılı) tamamen metabolize edilir
Eliminasyon	%90 feçesle ve %8 böbreklerden atılır
Doku dağılımı	%98 oranında plazma proteinlere bağlanır
$t_{maks}$	0,6-0,8 saat
$C_{maks}$ (4 mg doz)	46,7 ng/mL
AUC (4 mg doz)	91,6 ng.mL/saat
$CL_T$	33-38 (L/saat)

#### 2.4.4. 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; Şekil 2.10) beyaz veya beyaza yakın renkte ışıktan korunması gereken bir tozdur. Suda pratik olarak çözünmez, diklorometanda kolayca çözünür ve metil alkolde çözünür (88). Ketokonazol BSS'e göre Sınıf 2 (düşük çözünürlük, yüksek geçirgenlik)'de yer alan bir ilaçtır (124).



**Şekil 2.10.** Ketokonazolün kimyasal yapısı.

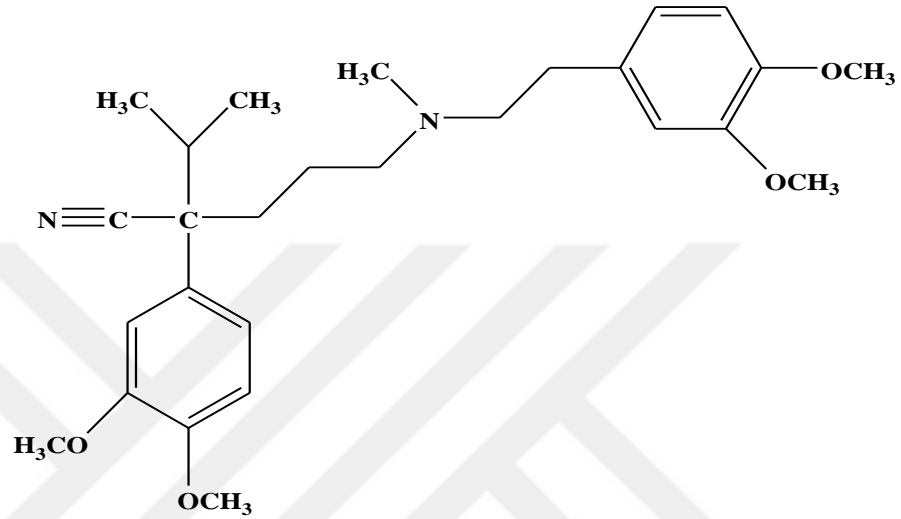
Ketokonazol imidazol yapısında antifungal bir ilaç olup çeşitli mantar enfeksiyonlarında hem sistemik hem de topikal olarak uygulanabilmektedir. Tedavide, dört enantiyomerinden, (2R,4S)-(+)-Ketokonazol ve (2S,4R)-(2)-Ketokonazol olmak üzere iki cis enantiyomerinin rasemik karışımı kullanılmaktadır (125). Ayrıca ketokonazol literatürde ve çeşitli kılavuzlarda referans ilaç olarak gösterilen güçlü bir CYP3A4 inhibitörüdür (126).

Ketokonazolün GI kanaldan absorpsiyonu mide pH'sının düşmesine bağlı olarak artar. 200 mg dozda oral olarak uygulandıktan 2 saat sonra ortalama pik plazma konsantrasyonu 3,5 µg/mL olarak tayin edilmiştir. Sağlıklı gönüllülerde topikal ve vajinal uygulama sonrası sistemik absorpsiyon minimumdur. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %90'ndan fazla olup yüksek oranda albümine bağlanır. Anne sütüne geçer. Serebrospinal sıvıya geçişi zayıftır. Bifazik eliminasyon göstermekte olup yarılanma ömrü 2 saat ve terminal yarılanma ömrü yaklaşık 8 saat olarak rapor edilmiştir. Karaciğerde inaktif metabolitlerine dönüştürülür. Metabolitler ve değişmemiş ilaç büyük oranda feçesle bir miktarı da idrar ile atılır (88).

#### 2.4.5. Verapamil

Kimyasal adı 5-[N-(3,4-Dimetoksifenil)-N-metilamino]-2-(3,4-dimetoksifenil)-2-izopropilvaleronitril hidroklorür olan verapamil (C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.HCl, MA: 491,1; Şekil 2.11) beyaz, pratik olarak kokusuz kristal bir tozudur. Suda çözünür,

alkolde az çözünür, kloroformda kolayca çözünür, eterde pratik olarak çözünmez. Sudaki %5'lik çözeltisinin pH değeri 4,5 ile 6,5 arasındadır. Işıktan korunarak 25°C'de saklanmalıdır (88).



Şekil 2.11. Verapamilin kimyasal yapısı.

Verapamil selektif olmayan bir kalsiyum kanal blokörü olup antianjinal, antihipertansif ve antiaritmik etkileri olan bir ilaçtır. Ticari formülasyonunda, farklı farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahip (+)-(R)-Verapamil ve (-)-(S)-Verapamil optik izomerlerini eşit oranda içeren rasemik karışım halinde bulunmaktadır. Her iki enantiyomer de insan jejunumundan yüksek permeabiliteye sahiptir ve esas olarak pasif transsellüler difüzyon ile taşınır. Verapamilin metabolizması stereoselektif olup S-Verapamil hızlı, R-Verapamil orta oranda hepatik ekstraksiyona uğrar. 160 mg'lık tekli dozun oral uygulanmasından sonra insanlardaki biyoyararlanım S- ve R- izomerleri için sırasıyla %20 ve %45 olarak bulunmuştur. Metabolizasyonu majör olarak CYP3A4 enzimi ile gerçekleşir (127).

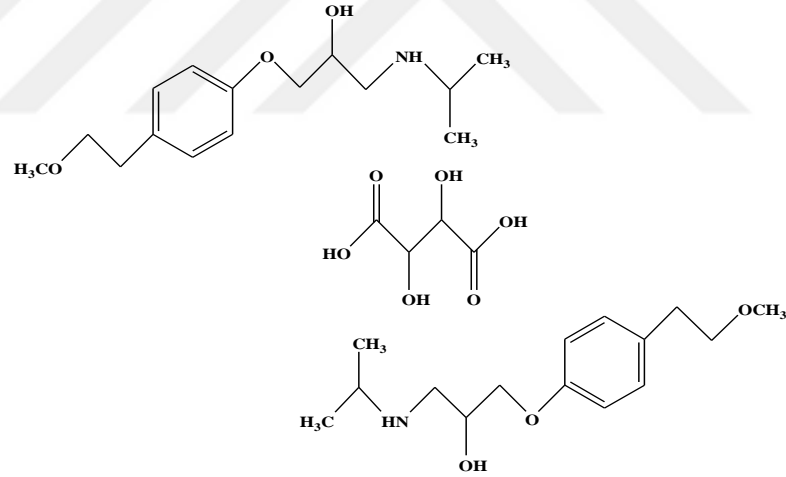
Verapamil FDA kılavuzunda orta dereceli bir CYP3A4 inhibitörü olarak tanımlanmıştır (126). Ayrıca yapılan son çalışmalarda PMAT inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Verapamil BSS'e göre, düşük çözünürlük ve yüksek geçirgenlik



gösteren Sınıf 2’de yer almaktadır. Verapamilin pH 7,3 - 8 arasında çözünürlük problemi vardır. Bunun yanı sıra pH 1 – 6,8 arasında çözünürlük sorunu olmadığı için Dünya Sağlık Örgütü tarafından Sınıf 1 olabileceği belirtilmektedir (128).

#### 2.4.6. Metoprolol Tartarat

Kimyasal adı 1-(izopropilamino)-3-(p-(2-metoksietil)fenoksi)-2-propanol (2:1) dekstro tartarat tuzu olan metoprolol tartarat ( $C_{15}H_{25}NO_3$ ) $_2 \cdot C_4H_6O_6$ , MA: 684,82; Şekil 2.12) renksiz, kokusuz kristal bir tozudur (88). Suda çok çözünür, kloroform, diklorometan, alkolde çözünür, benzen, dietil eter ve asetonunda çözünmez (129).



Şekil 2.12. Metoprolol tartaratın kimyasal yapısı.

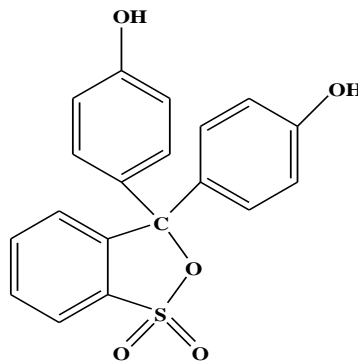
Beta-adrenerjik reseptör blokörü olan metoprolol tartarat R- ve S-enantiyomerlerin rasemik bir karışımıdır. Klinikte genellikle anjina, hipertansiyon gibi bazı kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (130). Oral alınmasını takiben GI kanaldan absorpsiyonu hızlı ve neredeyse tamdır (%95). Ancak presistemik metabolizasyona uğraması nedeniyle sistemik biyoyararlanımı %40-60

civarındadır (129). Maksimum plazma konsantrasyonuna 1,5-2 saat içerisinde ulaşır. Plazma yarılanma ömrünün 4 saat olması nedeniyle terapötik kan düzeyini korumak için sık dozlama yapılması gerekmektedir. Düşük oranda (%12) albümine bağlanır. Metoprolol tartarat karaciğerde bulunan CYP2D6 izoenzimi tarafından metabolize edilir. Oral verilen dozun %5'ten daha az bir kısmı idrardan değişmeden atılır (131).

Hem çözünürlüğü hem de permeabilitesi yüksek olan metoprolol tartarat BSS'de Sınıf 1 (yüksek çözünürlük, yüksek permeabilite)'de yer alır. Metoprolol tartarat hem kullanılacak permeabilite yönteminin uygunluğunun değerlendirilmesinde hem de permeabilitesi tayin edilecek maddelerin permeabilitelerini karşılaştırmak amacıyla referans madde olarak kullanılmaktadır (132).

#### 2.4.7. Fenol Kırmızısı

Kimyasal adı phenolsulfonphthalein olan fenol kırmızısı ( $C_{19}H_{14}O_5S$ ), MA: 354,37; Şekil 2.13) kırmızı renkte, kokusuz kristal bir tozdur (88). Çoğunlukla hücre kültürü çalışmalarında pH indikatörü olarak kullanılmaktadır. Suda (3 mg/mL), etanolde (4 mg/mL), metanolde (3 mg/mL) çözünür. Kloroformda çözünmez (133). Bağırsaklarda su dengesini incelemek amacıyla fenol kırmızısı çok tercih edilen referans maddedir. Böbrek fonksiyonlarını takip etmek amacıyla da fenol kırmızısı çözeltisi i.v. olarak verilmektedir.



Şekil 2.13. Fenol kırmızısının kimyasal yapısı.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

Asetonitril	Sigma-Aldrich / Almanya
Fenol Kırmızısı	Sigma-Aldrich / Almanya
Gliburid	Nobel Farma / Türkiye
Ketokonazol	Sandoz / Türkiye
Metformin Hidroklorür	Bilim İlaç / Türkiye
Metoprolol Tartarat	Novartis Pharma AG / İsviçre
Nikotinamid	Sigma-Aldrich / Almanya
Orto-fosforik asit	Merck / Almanya
Repaglinid	Biofarma İlaç / Türkiye
Streptozotisin	Sigma-Aldrich / Almanya
Verapamil	Sigma-Aldrich / Almanya

##### 3.1.2. HPLC Gereçleri

Dedektör (Shimadzu, SPD-M20A DAD)	Shimadzu / Japonya
Kolon (Waters C18 250 x 4.6 mm, 5 µm)	Waters HPLC Coloums / ABD
Vakumlu Pompa (Shimadzu, LC-20AT)	Shimadzu / Japonya

##### 3.1.3. Perfüzyon Gereçleri

Peristaltik Pompa	Gilson / Fransa
Tubingler	Gilson / Fransa

##### 3.1.4. Aletler

Derin Dondurucu (-20 °C)	Beko / Türkiye
Glikometre	BayerContour TS / Almanya
Mikropipet (10-100 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf / Almanya
pH Metre	Sartorius / Türkiye
Ultrasonik Banyo	AdvantageLab / Almanya

##### 3.1.5. Deneysel Hayvanı

Sprague-Dawley Erkek Sıçan	Hacettepe Üniversitesi/ Türkiye
----------------------------	---------------------------------

### 3.2. Yöntem

Tüm perfüzyon deneylerinde lümeden kayıp esasına dayanan ve farklı bağırsak segmentelerinin (jejunum, ileum, kolon) simultane olarak perfüze edildiği *in situ* single pass bağırsak perfüzyon tekniği kullanılmıştır (10, 134-137). Bağırsaklardan ilaç absorpsiyonu üzerine diyabetin etkisini incelemek amacıyla model ilaç olarak metformin hidroklorür, PMAT inhibitörü olarak verapamil, CYP3A4 inhibitörü olarak ketokonazol kullanılmıştır. Ayrıca klinikte metformin hidroklorür ile birlikte kullanılan diğer diyabet ilaçlarının (gliburid ve repaglinid) seçilen model ilacın bağırsaklardan absorpsiyon ve permeabilitesi üzerine etkisi de incelenmiştir. Diyabetin metformin hidroklorürün absorpsiyonu ve permeabilitesi üzerine etkisini karşılaştırabilmek amacıyla tüm perfüzyon deneyleri kontrol grubunda da gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.1. Sıçanlarda Streptozotosin ve Nikotinamid Uygulaması ile Diyabet Geliştirilmesi

Bu tez kapsamında Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların permeabilite değerleri tayin edileceğinden deney hayvanlarında (sıçanlarda) Tip 2 diyabet geliştirilmesi hedeflenmiştir. Literatürde streptozotosin tek dozda uygulandığında insüline bağımlı (Tip 1) ve insüline bağımlı olmayan (Tip 2) diyabet geliştiğini gösteren yayınlar mevcuttur (82-85). Ayrıca streptozotosinin pankreastaki beta hücrelerindeki sitotoksik etkisini azaltmak amacıyla, uygun dozda nikotinamidin streptozotosinle birlikte verildiği Tip 2 diyabet modeli de literatürde bulunmaktadır (82, 86). Streptozotosin kullanılarak geliştirilmiş diyabet modelinde hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan ilaçlarla yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (138-140). Bu nedenle, Tip 2 diyabet oluşturmak amacıyla hem streptozotosin hem de nikotinamid ve streptozotosinin beraber verildiği yöntemin denenmesine ve elde edilen bulgular doğrultusunda en uygun yöntemin seçilmesine karar verilmiştir (87). Bu amaçla, dokuz (9) Sprague-Dawley erkek sıçanları rastgele üç gruba ayrılmıştır. Bu gruplar:

**Grup 1:** Kontrol (K) grubu

**Grup 2:** Streptozotosin (S) grubu

**Grup 3:** Nikotinamid+streptozotosin (N+S) grubu

Her bir gruba yapılan uygulamalar Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Diyabet geliştirmek için oluşturulan gruplar, diyabet ajanları, uygulama dozları ve yolları (n=3).

<b>Gruplar</b>	<b>Diyabet ajanları</b>	<b>Uygulanan Doz</b>	<b>Uygulama Yolu</b>
<b>Kontrol grubu (Grup 1)</b>	Steril 0,1 M soğuk sitrat tamponu		i.p.
<b>Streptozotosin grubu (Grup 2)</b>	0,1 M soğuk sitrat tamponu içinde çözüldürülmüş streptozotosin (steril)	65 mg/kg	i.p.
<b>Nikotinamid +Streptozotosin grubu (Grup 3)</b>	Serum fizyolojik içerisinde çözüldürülmüş nikotinamid (steril)	110 mg/kg	i.p.
	15 dakika sonra 0,1 M sitrat tamponu içinde çözüldürülmüş streptozotosin (steril)	65 mg/kg	i.p.

Kontrol grubuna (Grup 1) ve kimyasal ajanların uygulandığı gruplara (Grup 2 ve Grup 3), enjeksiyondan 6 saat sonra %10 glikoz çözeltilisi 24 saat boyunca verilmiştir. Kimyasal ajanların uygulanmasından 3 gün ve 1 hafta sonra sıçanların kuyruk verinden kan örnekleri alınarak kan glikoz düzeyleri glikometre kullanılarak

ölçülmüştür. Ayrıca, diyabetin tipini tayin etmek amacıyla, çalışmaya dahil olan sıçanlara 1 hafta sonra ötenazi uygulanarak pankreasları çıkarılıp histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Pankreas dokuları diseksiyondan sonra %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisinde 1 hafta süre ile tespit edilmiştir. Histopatolojik inceleme için rutin takip ve Hematoksilen&eoziin boyamaları gerçekleştirilmiştir. Sıçanlara uygulanan tüm çözeltiler laminar akış kabini altında 0,22 µm por çapına sahip filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin hazırlanması aşağıda verilmiştir.

**Serum fizyolojik:** 0,9 g NaCl tartılarak balon jodede distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**%10 glikoz çözeltisi:** 100 g glikoz tartılarak balon jodede 1000 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

**0,1 M sitrik asit monohidrat:** 2,101 g sitrik asit monohidrat tartılarak balon jodede 100 mL'ye soğuk distile su ile tamamlanmıştır.

**0,1 M trisodyum sitrat dihidrat:** 2,941 g trisodyum sitrat dihidrat tartılarak balon jodede 100 mL'ye soğuk distile su ile tamamlanmıştır.

**Soğuk sitrat tamponu:** 44,5 mL 0,1 M sitrik asit monohidrat ve 55,5 mL 0,1 M trisodyum sitrat dihidrat hazırlandıktan sonra karıştırılmıştır. Laminar akış kabini altında 0,22 µm por çapına sahip filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Deney boyunca buz kalıpları arasında tutularak stabil kalması sağlanmıştır.

**Formalin çözeltisi:** Pankreasların tespit edilmesi (sabitlenmesi) amacıyla formalin çözeltisi kullanılmıştır. Formalin çözeltisi hazırlanırken 4 g monobazik sodyum fosfat ve 6,5 g dibazik sodyum fosfat tartılarak bir behere alınmış ve üzerlerine 100 mL formaldehit ve 900 mL distile su eklenerek iyice karıştırılmıştır.

### 3.2.2. *In situ* Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Tekniği

- **Deney Hayvanı**

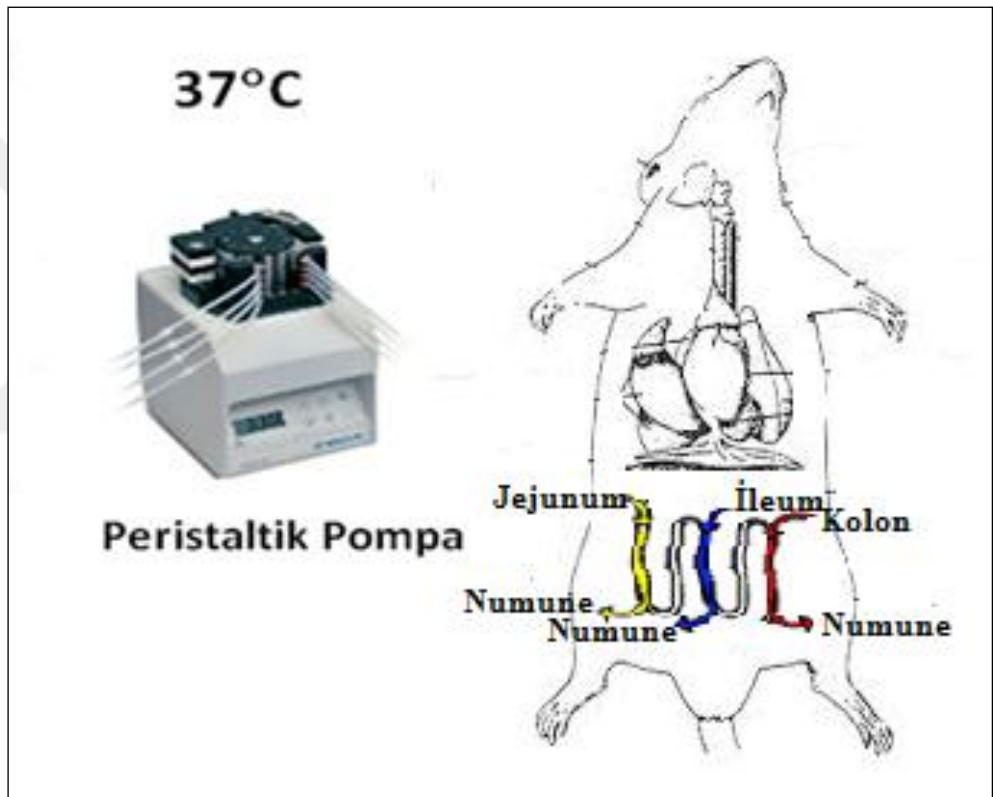
*In situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarında deney hayvanı olarak literatürde çok sayıda veri bulunması, büyüklüğünün uygun olması nedeniyle 250-350 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi sağlıklı erkek sıçanlar kullanılmıştır (141). Tez kapsamında kullanılan deney hayvanları Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Laboratuvarından sağlanmıştır ve bu laboratuvarında deney yapılana kadar barındırılmıştır.

- **Cerrahi İşlemler**

Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlarda gerçekleştirilen tüm perfüzyon deneyleri Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan izinle (12 Temmuz 2011, Karar Numarası: 2011/33-4) gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK I).

Hayvanlar standart sıçan diyeti ile beslenmiş ve deneyden bir gece önce içme suları kısıtlanmadan aç bırakılmışlardır. Cerrahi işlemler anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Anestezi ketamin (90 mg/kg)-ksilazin (5 mg/kg) kombinasyonunun i.p. olarak verilmesiyle sağlanmıştır. Anestezi derinliği sıçanların ayak parmaklarının sıkıştırılmasına verilen reaksiyona göre değerlendirilmiştir. Deney boyunca anestezi derinliği takip edilerek gerektiğinde ek doz ketamin-ksilazin kombinasyonu uygulanmıştır. 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 çözeltilinin berrak gelmesi esas alınmıştır. Peristaltik pompa aracılığıyla akış hızı 0,2 mL/dk olacak şekilde ayarlanmış ve deney sırasında perfüzyon çözeltisi sirküle edilmemiştir.

Deneyler 37°C'ye ayarlanmış bir perfüzyon kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Perfüze edilen bağırsak segmentlerin deneyler sırasında kurumasını önlemek amacıyla serum fizyolojik ile ara ara ıslatılmış ve üzerleri parafilm ile kapatılmıştır. Her deney sonunda hayvanlar eksanguinasyon yöntemi ile öldürülmüş ve perfüze edilen segmentler çıkartılarak uzunlukları tekrar ölçülmüştür. Perfüzyon sistemi ve cerrahi işlem şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Perfüzyon sistemi ve cerrahi yöntemin şematik olarak gösterilmesi (135).

- **Perfüzyon Çözeltisi**

Ön denemelerde 'Golytely' olarak adlandırılan izoozmotik çözelti perfüzyon çözeltisi olarak kullanılmış olmakla birlikte perfüzyon deneylerinde Dahan ve diğ.'nin bağırsak perfüzyon çalışmalarında kullandığı MES tamponu kullanılmıştır (132, Tablo 3.2). Perfüzyon çözeltisi taze olarak hazırlanmış, model ilaçların ilavesinden sonra istenen hacme tamamlanıp iyice karıştırılmıştır. Perfüzyon



deneylerinde su dengesine ulaşıp ulaşılmadığını tayin etmek amacıyla fenol kırmızısı referans madde olarak perfüzyon çözeltisine eklenmiştir.

**Tablo 3.2.** Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi.

<b>Madde</b>	<b>Konsantrasyon</b>
MES tamponu	10 mM
NaCl	135 mM
KCl	5 mM
Fenol kırmızısı	0,1 mg/mL

Perfüzyon çözeltisine eklenecek etkin (metformin hidroklorür, repaglinid, gliburid) ve referans (metoprolol tartarat) maddelerin konsantrasyonları literatür esas alınarak belirlenmiştir. Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında etkin madde dozunu belirlemek amacıyla en sık kullanılan yaklaşım etkin maddenin piyasada mevcut en yüksek dozunun 250 mL'ye bölünmesidir (132). Bu nedenle, tez kapsamında kullanılacak repaglinid ve gliburidin dozlarının seçiminde bu yaklaşım benimsenmiştir. Metforminle yapılan ön denemelerde metformin hidroklorürün piyasadaki dozu 250 mL'ye bölünmüş ve 2000 µg/mL konsantrasyonda çalışmaya karar verilmiştir. Metformin hidroklorür BSS'e göre Sınıf 3 (yüksek çözünürlük, düşük permeabilite)'te yer alan bir ilaçtır. Literatürde, metformin hidroklorürün duodenumdan permeabilitesinin doza bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir. Duodenum 50 ve 200 µg/mL dozda metformin hidroklorür ile perfüze edildiğinde, metformin hidroklorürün permeabilitesinin doz arttıkça %60 oranında azaldığı bulunmuştur (142). Bu nedenle çalışmada kullanmak üzere seçtiğimiz dozun (2000 µg/mL) literatüre göre oldukça yüksek olması nedeniyle tüm perfüzyon deneylerinde 200 µg/mL konsantrasyonda metformin hidroklorür kullanılmasına karar verilmiştir (142). Perfüzyon deneylerinde kullanılması planlanan model ve referans ilaçların konsantrasyonları Tablo 3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Perfüzyon deneylerinde kullanılacak model ve referans ilaçlar ve perfüzyon çözeltisine eklenecek konsantrasyonları.

Model/Referans İlaç	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )
Metformin Hidroklorür	200
Gliburid	20
Repaglinid	8
Metoprolol Tartarat	100
Verapamil	480
Ketokonazol	50

Metformin hidroklorürün permeabilitesini karşılaştırmak amacıyla bağırsak permeabilitesi oldukça yüksek olan metoprolol tartarat referans madde olarak perfüzyon çözeltisine eklenmiştir (143). Perfüzyon çalışmalarında verapamil PMAT inhibitörü (132), ketokonazol ise CYP3A4 inhibitörü olarak kullanılmıştır (144).

### 3.2.3. Perfüzyon Sisteminde Yapılan Çalışmalar

Tez kapsamında yapılması planlanan perfüzyon deneylerine başlamadan önce geliştirmiş olduğumuz analitik yöntemi test etmek amacıyla bazı ön denemeler yapılmıştır. Ön denemeler sırasında perfüzyon çalışmalarından elde edilen ilk numunelerde maddelere ait pikler gözlenemediği için perfüzyon sisteminden kaynaklanan bir gecikme olup olmadığının incelenmesine karar verilmiştir. Ayrıca, metformin hidroklorür ile perfüzyon sisteminde kullanılan plastik tüpler arasında etkileşim olup olmadığı da araştırılmıştır.

- **Perfüzyon Sisteminden Kaynaklanan Gecikme Süresinin Tayini**

Metformin hidroklorürle yapılan ön deneyler sırasında ilk 15 dakikada toplanan numunelerde etkin maddeye ait pik HPLC'de görülmemiştir. 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 olması kaçınılmazdır. Bu 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 ölçülmüş ve bu süre 7 dakika olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, perfüzyon çözeltisinin bağırsak segmentlerini doldurarak izole segmentin diğer ucundan toplanabilmesi için de bir süre gerekecektir. Bu süre perfüzyon çözeltisinin akış hızı (Q: mL/dk) ve bağırsak segmentlerinin hacmi ile alakalı bir değerdir. Her bir bağırsak segmentinin hacmi (V) silindirin hacmini hesaplamak amacıyla kullanılan formül (Formül 3.1) vasıtasıyla hesaplanmıştır.

$$V = \Pi \cdot r^2 \cdot h \quad (3.1)$$

Formülde:

r= Bağırsak segmentlerinin yarıçapı (jejunum ve ileum: 0,18 cm; kolon:0,2 cm)

h=Perfüze edilen segment uzunluğu (cm)

Perfüzyon çözeltisinin bağırsak segmentlerinden ortalama geçiş süresi (MTT)

Formül 3.2 kullanılarak tayin edilmiştir.

$$MTT = V/Q \quad (3.2)$$

Formülde:

V= bağırsak segmentinin hacmi (mL)

Q= perfüzyon çözeltisinin akış hızı (mL/dk)

- **Perfüzyon Sistemi ile Etkileşmenin İncelenmesi**

Metformin hidroklorür 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 metformin hidroklorür çözeltisi hazırlanarak rezervuara konmuştur. Peristaltik pompa çalıştırılarak rezervardaki çözelti 0,2 mL/dk akış hızında olacak şekilde plastik ve silikon tüplerden geçirilmiş ve 140 dk süreyle belirli zaman aralıklarında örnekler toplanmıştır. Numunelerdeki metformin hidroklorür konsantrasyonu HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir. Rezervuardaki metformin hidroklorür konsantrasyonu ile toplanan numunelerdeki konsantrasyon karşılaştırılarak perfüzyon sisteminde bulunan plastik ve silikon tüplerle etkileşme olup olmadığına karar verilmiştir.

- **Perfüzyon Deneyleri**

Bölüm 3.2.2’de belirtilen yöntem kullanılarak izole edilen bağırsak segmentleri (jejunum, ileum ve kolon) serum fizyolojikle yıkandıktan sonra perfüzyon çözeltisiyle 0,2 mL/dk hızda dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 30 dk) perfüze edilmiştir. Perfüze edilen bağırsak segmentleri dengeye ulaştıktan sonra metformin hidroklorürün bağırsaklardan absorpsiyon ve permeabilitesini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar 6 grup altında gerçekleştirilmiştir.

Grup 1: metformin hidroklorür (kontrol grubu, 200 µg/mL) kullanılarak yapılan çalışmalar

Grup 2: metformin hidroklorür (200 µg/mL) ve verapamil (480 µg/mL) kullanılarak yapılan çalışmalar

Grup 3: metformin hidroklorür (200 µg/mL) ve repaglinid (8 µg/mL) kullanılarak yapılan çalışmalar

Grup 4: metformin hidroklorür (200 µg/mL) ve gliburid (20 µg/mL) kullanılarak yapılan çalışmalar

Grup 5: metformin hidroklorür (200 µg/mL), gliburid (20 µg/mL) ve ketakonazol (50 µg/mL) kullanılarak yapılan çalışmalar

Grup 6: metformin hidroklorür (200 µg/mL), repaglinid (8 µg/mL) ve ketakonazol (50 µg/mL) kullanılarak yapılan çalışmalar

Her bir grup kapsamında yapılan çalışmalar aşağıda belirtildiği üzere gerçekleştirilmiş ve perfüzyon akış şeması Şekil 3.2’de verilmiştir.

•**Grup 1 (Metformin Hidroklorür; Kontrol Grubu):** Uygun konsantrasyonda metformin hidroklorür perfüzyon çözeltisine eklenerek her bir bağırsak segmenti (jejunum, ileum ve kolon) 60 dk süreyle perfüze edilmiş ve her 5 dakikada bir örnek toplanmıştır.

•**Grup 2 (Metformin Hidroklorür +Verapamil) :** İzole segment perfüzyon çözeltisiyle dengeye ulaşana kadar (30 dk) perfüze edilmiştir. Ardından uygun konsantrasyonda metformin hidroklorür (200 µg/mL), metoprolol tartarat (100 µg/mL) ve fenol kırmızısı (0,1 mg/mL) içeren perfüzyon çözeltisi ile her bir bağırsak segmenti (jejunum, ileum ve kolon) 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra spesifik bir PMAT inhibitörü olan verapamil (480 µg/mL) perfüzyon çözeltisine eklenerek jejunum, ileum ve kolon 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda izole edilen segmentler metformin hidroklorür ve verapamil içeren perfüzyon çözeltisiyle tekrar 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmış ve metforminin absorpsiyonunda/permeabilitesinde bir değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

•**Grup 3 (Metformin hidroklorür+Repaglinid):** İzole edilen bağırsak segmentleri perfüzyon çözeltisiyle dengeye ulaşana kadar (30 dk) perfüze edilmiştir. Ardından uygun konsantrasyonda metformin hidroklorür (200 µg/mL), metoprolol tartarat (100 µg/mL) ve fenol kırmızısı (0,1 mg/mL) içeren perfüzyon çözeltisi ile

her bir bağırsak segmenti (jejunum, ileum ve kolon) 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra repaglinid (8 µg/mL) perfüzyon çözeltisine eklenerek jejunum, ileum ve kolon 30 dk süreyle perfüze edilerek perfüzyon dengesine ulaşılması sağlanmıştır. Bu süre sonunda izole edilen segmentler metformin ve repaglinid içeren perfüzyon çözeltisiyle tekrar 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmış ve metforminin absorpsiyonunda/permeabilitesinde bir değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

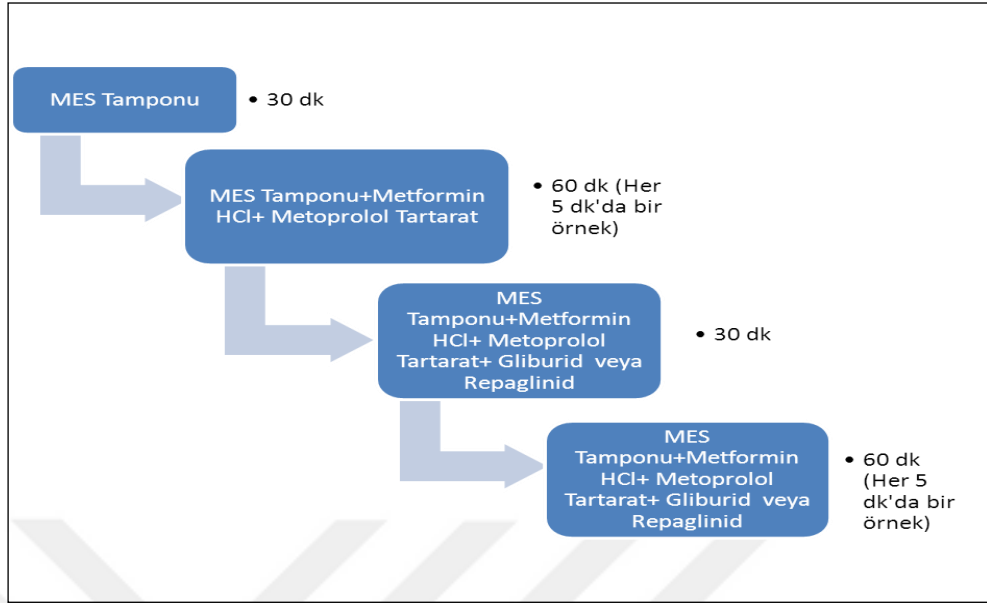
•**Grup 4 (Metformin hidroklorür+Gliburid):** İzole edilen bağırsak segmentleri perfüzyon çözeltisiyle dengeye ulaşana kadar (30 dk) perfüze edilmiştir. Ardından uygun konsantrasyonda metformin hidroklorür (200 µg/mL), metoprolol tartarat (100 µg/mL) ve fenol kırmızısı (0,1 mg/mL) içeren perfüzyon çözeltisi ile her bir bağırsak segmenti (jejunum, ileum ve kolon) 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra gliburid (20 µg/mL) perfüzyon çözeltisine eklenerek jejunum, ileum ve kolon 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda gliburid içeren perfüzyon çözeltisiyle tekrar 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmış ve metforminin absorpsiyonunda/permeabilitesinde bir değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

•**Grup 5 (Metformin hidroklorür+Gliburid+Ketakonazol):** İzole edilen bağırsak segmentleri metformin hidroklorür (200 µg/mL), metoprolol tartarat (100 µg/mL), fenol kırmızısı (0,1 mg/mL) ve gliburid (20 µg/mL) içeren perfüzyon çözeltisiyle 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda izole edilen segmentler aynı perfüzyon çözeltisiyle 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra bir CYP3A4 inhibitörü olan ketakonazol (50 µg/mL) metformin (200 µg/mL) ve gliburid (20 µg/mL) içeren perfüzyon çözeltisine eklenerek 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda izole edilen segmentler metformin, gliburid ve ketokonazol içeren perfüzyon çözeltisiyle 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmış ve gliburidin metabolizasyonundaki olası değişikliklerin metformin hidroklorürün absorpsiyonu/permeabilitesi üzerine etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.

•**Grup 6 (Metformin hidroklorür+Repaglinid+Ketakonazol):** İzole edilen bağırsak segmentleri metformin hidroklorür (200 µg/mL), metoprolol tartarat (100 µg/mL), fenol kırmızısı (0,1 mg/mL) ve repaglinid (8 µg/mL) içeren perfüzyon çözeltisiyle 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda izole edilen segmentler aynı perfüzyon çözeltisiyle 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra uygun bir CYP3A4 inhibitörü olan ketakonazol (50 µg/mL), metformin (200 µg/mL) ve repaglinid (8 µg/mL) içeren perfüzyon çözeltisine eklenerek 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda izole edilen segmentler metformin, repaglinid ve ketakonazol içeren perfüzyon çözeltisiyle tekrar 60 dk süreyle perfüze edilerek her 5 dakikada bir örnek toplanmış ve repaglinidin metabolizasyonundaki olası değişikliklerin metformin hidroklorürün absorpsiyon/permeabilitesi üzerine etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.

Perfüzyon deneylerinin tamamlanmasını takiben hayvanlar eksanguinasyon yöntemiyle öldürülerek her bir bağırsak segmenti çıkarılarak uzunlukları yeniden ölçülmüştür. Deney süresince toplanan tüm perfüzyon örnekleri analiz edilinceye kadar -20°C' de dondurularak saklanmıştır. Toplanan örnekler analiz öncesi çözündürülerek, perfüzyon çözeltisi ile kalibrasyon denklemindeki konsantrasyon aralığında kalacak şekilde seyreltildikten sonra 0,45 µm'lik membran filtrelerden süzölmüştür. Numunelerdeki metformin hidroklorür, metoprolol tartarat ve fenol kırmızısı konsantrasyonları bu tez kapsamında geliştirilen ve valide edilen HPLC yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

Ayrıca perfüzyon deneylerinin gerçekleştirildiği tüm hayvanların pankreasında histopatolojik değerlendirme yapılmıştır (Bölüm 3.2.1).



Şekil 3.2. Perfüzyon deneyi akış şeması.

### 3.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Merformin hidroklorürün permeabilitesini tayin etmek amacıyla hücre kültüründe yapılan çalışmalar bağırsak epitel hücrelerini taklit eden kolon adenokarsinom (Caco-2) hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Pasaj sayıları 28-32 arasında olan Caco-2 hücreleri 37°C'lik su banyosunda sıvılaştırıldıktan sonra kültür ortamı üzerine laminar akış kabini altında eklenmiştir. Hücreler 1000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmıştır. Hücreler taze kültür ortamında (%10 fetal bovine serum- FBS, 50 ünite/mL penisilin ve 50 µg/mL streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) süspansiyonunda edildikten sonra 25 cm<sup>2</sup> hücre kültür kaplarına (flask) aktararak 37°C'de nemli hava %5 CO<sub>2</sub> içeren atmosferde 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda kültür kaplarındaki ortam laminar akış kabini altında uzaklaştırılmış, yerine taze kültür ortamı eklenmiş ve inkübasyona aynı koşullar altında devam edilmiştir. Hücre kültür ortamı her 2 günde bir aynı şekilde değiştirilmiştir. Hücre yoğunluğu %70-80 oranına ulaştığında hücre kültür kaplarındaki kültür ortamı laminar akış kabini



altında uzaklaştırılarak hücreler fosfatla tamponlanmış salin (phosphate buffered saline- PBS; pH 7,4) ile iki kez yıkanmıştır. Flasklara yapışmış halde bulunan hücreler üzerine %0,025 tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 10 dakika süreyle inkübatörde tutulmuştur. İnkübatörden alınan hücre süspansiyonu besleme ortamı içeren kaba eklenmiştir.

Caco-2 hücre süspansiyonları 24 kuyucuklu ( $0,333 \text{ cm}^2$ ,  $1 \mu\text{m}$ ) insertlere tripan mavisi ile sayım yapıldıktan sonra apikalde 30000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ( $250 \mu\text{L}$  hücre süspansiyonu) eklenmiştir. Bazolaterale  $750 \mu\text{L}$  büyüme ortamı eklendikten sonra plakalar  $37^\circ\text{C}$ 'de % 5  $\text{CO}_2$  içeren nemli havada inkübe edilmiştir. Ortam gün aşırı değiştirilmiş, 21 gün sonra Caco-2 hücrelerinin transepitel elektrik rezistans (TEER) değerleri Millicell-ERS epitel voltmetre ile ölçülmüştür. TEER değeri  $600 \Omega/\text{cm}^2$  den büyük olan hücreler permeabilite deneylerinde kullanılmıştır

Permeabilite deneylerinde 25 mM D-glikoz ve 10 mM HEPES içeren HBSS transport ortamı olarak kullanılmıştır. Hücreler deneyden önce bu ortamla  $37^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika süreyle bir ön inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Metformin hidroklorürün ( $80 \mu\text{M}$ ) 25 mM D-glikoz ve 10 mM HEPES içeren HBSS tampon içindeki çözeltisi hazırlanmıştır. Apikale  $250 \mu\text{L}$  hacimde metformin içeren ( $80 \mu\text{M}$ ) transport ortamı, bazolaterale ise  $750 \mu\text{L}$  transport ortamı eklenmiştir.  $37^\circ\text{C}$ 'de 50-60 rpm'de 2 saat inkübasyondan sonra bazolateralden örnekler alınarak HPLC ile analiz edilmiş ve konsantrasyon değerleri kalibrasyon doğrusu yardımıyla hesaplanmıştır.

Metformin hidroklorürün Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi üzerine verapamilin etkisini incelemek amacıyla apikale metformin hidroklorür ( $80 \mu\text{M}$ ) ve verapamil ( $50 \mu\text{M}$ ) içeren  $250 \mu\text{L}$  transport ortamı, bazolaterale ise sadece transport ortamı ( $750 \mu\text{L}$ ) eklenmiştir.  $37^\circ\text{C}$ 'de 50-60 rpm'de 2 saat inkübasyondan sonra bazolateralden örnekler alınarak HPLC ile analiz edilmiş ve konsantrasyon değerleri kalibrasyon doğrusu yardımıyla hesaplanmıştır.

### 3.2.5. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Deneysel çalışmalarda kullanılacak model ilaç (metformin hidroklorür) ve referans maddeler (metoprolol tartarat, fenol kırmızısı) ile ilgili fizikokimyasal özellikleri, miktar tayini yöntemleri gibi konularda literatür taraması yapılmıştır. Literatürden derlenen bilgiler ışığında etkin madde ve referans maddelerin tayininde kullanılacak optimum bir analitik yöntem geliştirmek amacıyla farklı HPLC koşullarının kullanılmasına karar verilmiştir. Farklı koşullarda denemeler yapılarak en uygun mobil faz, akış hızı, dalga boyu ve enjeksiyon hacmi tayin edilmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalar analitik yöntem optimizasyonu başlığı altında verilmiştir.

#### Analitik Yöntem Optimizasyonu

Etkin ve referans maddelerin miktar tayini amacıyla optimum bir analitik yöntem geliştirmek amacıyla kullanılan HPLC koşulları aşağıda verilmiştir.

**Kolon:** Waters Spherisorb® 5 $\mu$  ODS 2 (5  $\mu$ m; 4,6 mm x 250 mm)

**HPLC:** Shimadzu

**Mobil faz:** pH 3 fosfat tamponu: Asetonitril (değişen oranlarda)

pH 2,5 fosfat tamponu: Asetonitril (değişen oranlarda)

pH 3 fosfat tamponu: Metanol (değişen oranlarda)

**Akış hızı:** 0,5 mL/dk'dan 1 mL/dk'ya kadar değişen akış hızlarında

**Dalga boyu:** 218, 230, 232, 240, 244, 254 nm gibi değişik dalga boylarında

**Enjeksiyon hacmi:** 10  $\mu$ L'den 50  $\mu$ L'ye kadar değişen enjeksiyon hacimlerinde denemeler yapılarak her üç maddenin aynı dalga boyunda pik verdiği optimum bir yöntem tespit edilmiştir.

Uygun konsantrasyonlarda metformin hidroklorürün (1000 µg/mL) sudaki, stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler mobil fazla seyreltikten sonra HPLC'ye enjekte edilmiştir. Farklı HPLC koşulları kullanılarak elde edilen kromatogram örnekleri incelenerek, etkin maddenin miktar tayini için analitik yöntem geliştirilmesi ve validasyonunda kullanılacak en uygun HPLC koşulları tespit edilmiştir. Bu amaçla, her bir bağırsak segmentinden toplanan örneklerdeki etkin madde ve referans maddelerin konsantrasyonları HPLC yöntemi kullanılarak aşağıdaki koşullar altında eş zamanlı olarak tayin edilmiştir (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4.** Analitik yöntem ve validasyonunda kullanılan HPLC koşulları.

Mobil Faz	30:70 (pH:3 fosfat tamponu:asetonitril)
Akış hızı	1 mL/dk
Kolon	Waters Spherisorb® 5µ ODS 2 (5 µm; 4,6 mm x 250 mm)
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Dedektör	Diode array (DAD) dedektör
Dalga boyu	232 nm
Analiz süresi	8 dk
Kolon sıcaklığı	25°C
Alıkonma zamanları	Fenol kırmızısı: 2,02 dk Metformin hidroklorür: 4,31 dk Metoprolol tartarat: 5,68 dk

### Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, kullanılan analitik yöntemden elde edilen verilerin doğru ve kesin bir şekilde bekleneni gerçekleştirip gerçekleştirmediği konusunda bilgi verir. Kullanılacak analitik yöntemin geçerliliğini kontrol etmek

amacıyla ICH kılavuzuna göre özgülük, doğrusallık, duyarlılık, saptanabilirlik sınırı ve tayin edilebilirlik sınırı, kesinlik, doğruluk parametreleri ve sistem uygunluk testleri incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (145).

- **Özgüllük (Specificity)**

Bir analitik yöntemin özgülüğü; ortamda bulunan etkin maddelerin, yardımcı maddeler, safsızlıklar veya parçalanma ürünleri varlığında analiz edebilmesidir. Kullanılacak analitik yöntemin sadece tayini yapılacak madde veya maddeleri tayin edebilmesi özgülük olarak tanımlanmaktadır.

**Metformin Hidroklorür:** Jejunum, ileum ve kolonun perfüzyon çözeltisi ile perfüzyonundan toplanan perfüzet karışımın, ayrıca çalışmada kullanılacak maddelerden (repaglinid, gliburid, ketakonazol, verapamil) sadece birini içeren perfüzyon çözeltisinin metformin hidroklorürün alıkonma zamanında pik vererek girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir.

**Metoprolol Tartarat:** Jejunum, ileum ve kolonun perfüzyon çözeltisi ile perfüzyonundan toplanan perfüzet karışımın, ayrıca çalışmada kullanılacak maddelerden (repaglinid, gliburid, ketakonazol, verapamil) sadece birini içeren perfüzyon çözeltisinin metoprolol tartaratın alıkonma zamanında pik vererek girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir.

**Fenol Kırmızısı:** Jejunum, ileum ve kolonun perfüzyon çözeltisi ile perfüzyonundan toplanan perfüzet karışımın, ayrıca çalışmada kullanılacak maddelerden (repaglinid, gliburid, ketakonazol, verapamil) sadece birini içeren %40 metanol ve %60 perfüzyon çözeltisi karışımının fenol kırmızısının alıkonma zamanında pik vererek girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir.

- **Doğrusallık (Linearity)**

**Metformin Hidroklorür:** Metformin hidroklorürün perfüzyon çözeltisi içerisindeki stok çözeltisinden (1000 µg/mL) uygun seyreltmeler yapılarak 2,5, 7,5, 10, 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltilerin hazırlanmasında jejunum, ileum ve kolonun perfüzyon çözeltisi ile perfüzyonundan toplanan boş perfüzet karışımı kullanılmıştır. Standart çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak standart doğru denklemi ve korelasyon katsayısı tayin edilmiştir. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre değerlendirme yapılmıştır.

**Metoprolol Tartarat:** Metoprolol tartaratın perfüzyon çözeltisi içerisindeki stok çözeltisinden (400 µg/mL) uygun seyreltmeler yapılarak 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltilerin hazırlanmasında jejunum, ileum ve kolonun perfüzyon çözeltisi ile perfüzyonundan toplanan boş perfüzet karışımı kullanılmıştır. Standart çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak standart doğru denklemi ve korelasyon katsayısı tayin edilmiştir. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre değerlendirme yapılmıştır.

**Fenol Kırmızısı:** Fenol kırmızısının %40 metanol ve %60 perfüzyon çözeltisi içindeki stok çözeltisinden (200 µg/mL) uygun uygun seyreltmeler yapılarak 1, 2,5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20 ve 30 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Fenol kırmızısının perfüzyon çözeltisindeki çözünürlüğünün sınırlı olması nedeniyle hem stok çözeltinin hazırlanmasında hem de stok çözeltinin seyreltilmesinde %40 metanol ve %60 jejunum, ileum ve kolonun perfüzyon çözeltisi ile perfüzyonundan toplanan boş perfüzet karışımı kullanılmıştır. Standart çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak

standart doğru denklemi ve korelasyon katsayısı tayin edilmiştir. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre değerlendirme yapılmıştır.

- **Kesinlik (Precision)**

Kesinlik, bir yöntemin birbirini izleyen ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun bir derecesidir. Kesinlik yalnız tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerle ilgisi yoktur. Sayısal bir değeri yoktur. Analitik yöntemin kesinliğini tayin etmek amacıyla gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Analitik yöntemin kesinliğini göstermek için ortalama değer, standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) değerleri hesaplanmıştır.

Gün içi kesinlik çalışmaları için, kalibrasyon doğrusu aralığında kalan ve çalışılacak numunelerin konsantrasyonları da göz önüne alınarak düşük (kalibrasyonun düşük noktası), orta (kalibrasyonun orta noktası) ve yüksek (kalibrasyonun en yüksek noktası) düzeyde üç konsantrasyon belirlenerek her konsantrasyon noktası için 6 tane standart hazırlanmıştır (Tablo 3.5). Hazırlanan standartların aynı gün içerisinde maddeye ait miktar tayini yöntemi kullanılarak analizleri yapılmış ve elde edilen bulgulardan hareketle ortalama, SS ve VK hesaplanmıştır.

Günler arası kesinlik çalışmaları için ise, kalibrasyon doğrusu aralığında kalan ve çalışılacak numunelerin konsantrasyonları da göz önüne alınarak düşük (kalibrasyonun düşük noktası), orta (kalibrasyonun orta noktası) ve yüksek (kalibrasyonun en yüksek noktası) düzeyde üç konsantrasyon belirlenerek her konsantrasyon noktası için 6 farklı günde standartlar hazırlanmıştır (Tablo 3.5). Hazırlanan standartların maddeye ait miktar tayini yöntemi kullanılarak analizleri yapılmış ve elde edilen bulgulardan hareketle ortalama, SS ve VK hesaplanmıştır.

**Tablo 3.5.** Gün içi ve günler arası kesinlik deneylerinde kullanılan konsantrasyonlar.

Deney	Düzy	Çalışılan Madde ve Konsantrasyonu (µg/mL)		
		Metformin Hidroklörür	Metoprolol Tartarat	Fenol Kırmızısı
Bağırsak permeabilitesi	Düşük	10	5	2,5
	Orta	25	30	12,5
	Yüksek	200	60	30

- **Doğruluk (Accuracy)**

Doğruluk, deneysel verilerin gerçek verilere olan yakınlığının ölçütüdür. Doğruluk, % ortalama bağıl hata (OBH) olarak ifade edilmiştir (Formül 3.3). Değerlendirme OBH'nın  $\pm\%20$ 'den küçük olmasına göre yapılmıştır (146).

$$\% \text{ OBH} = (A-B) / B \times 100 \quad (3.3)$$

Formülde, A: Tayin edilen konsantrasyon ve B: Gerçek konsantrasyon olarak verilmiştir.

Metformin hidroklorür, metoprolol tartarat ve fenol kırmızısının miktar tayininde kullanılan analiz yönteminin doğruluğunun tayini için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar kullanılmıştır.

- **Duyarlılık (Sensitivity)**

Duyarlılık, bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeri olup saptayabilme sınırı (LOD) ve kantitatif olarak tayin edebileceği en küçük konsantrasyon (kantitasyon sınırı; LLOQ) değeri ile ifade edilir. LOD sinyal: gürültü

oranının 3:1 olduğu konsantrasyondur. LLOQ ise sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyondur.

- **Dayanıklılık (Stability)**

Analiz süresince kullanılan etkin maddenin dayanıklı olup olmadığının saptanabilmesi için yapılan bir validasyon ölçütüdür. Perfüzyon deneylerine başlamadan önce gerçekleştirilen ön deneme çalışmasından elde edilen numuneler hemen ve -20°C’de dondurulduktan 24 saat, 1 hafta ve 1 ay sonra kullanılan miktar tayin yöntemi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

- **Sistem Uygunluk Testleri**

Analiz esnasında sistemin doğru olarak işlediğini göstermek amacıyla sistem uygunluk parametreleri incelenmiştir (147).

- **-Kapasite Faktörü (k')**

Kapasite faktörü ile analizi yapılan maddelerin kolondaki göç etme hızları tayin edilmektedir. k' birden küçükse maddenin çok hızlı elüe olduğu ve alıkonma zamanının doğru tayin edilmediği düşünölmektedir. İdeal kromatografik koşullarda maddelerin kapasite faktörlerinin 0,5 ile 10 arasında olması istenmektedir. Kapasite faktörü Formöl 3.4'e göre hesaplanmıştır.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3.4)$$

$t_R$ : Maddenin alıkonma zamanı

$t_0$ : Ölü zaman (kolonda tutunamayan maddenin alıkonma zamanı)



### **-Kolon Etkinliği (Teorik Tabaka Sayısı)**

Teorik tabaka sayısı kromatografik kolon etkinliğini kantitatif olarak ifade etmek için kullanılmaktadır. Teorik tabaka sayısı Formül 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{t_w} \right)^2 \quad (3.5)$$

N: Teorik tabaka sayısı

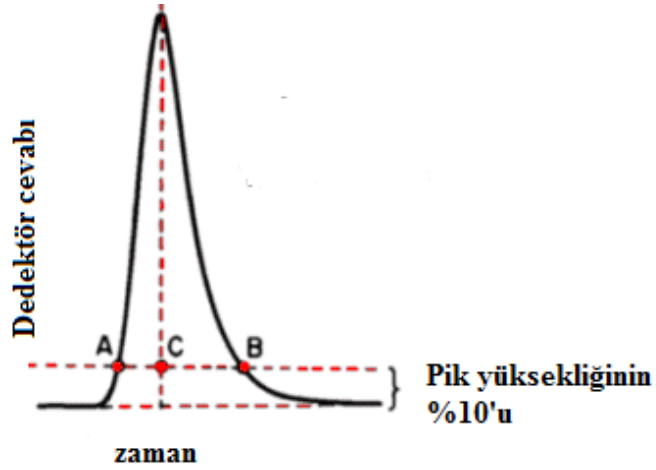
$t_R$ : Maddenin alıkonma zamanı

w: Pikin taban genişliği

### **-Kuyruklanma Faktörü (T)**

Kuyruklanma faktörü pik asimetrisini göstermektedir. Pik kuyruklanma faktörünün 1 olması pikin simetrik olduğunu gösterirken bu değerin 2'den küçük olması istenmektedir. Kuyruklanma faktörü Formül 3.6 ve Şekil 3.3'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Pik kuyruklanma faktörü} = \frac{AC+BC}{2AC} \quad (3.6)$$



Şekil 3.3. Pik kuyruklanma faktörünün tayini (148).

### -Ölü Hacim Tayini

Ölü hacim kolonda tutunamayan bir maddenin alıkonma zamanını ifade etmektedir ve bunun mutlaka tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla belirli konsantrasyondaki (0,1 mg/mL) urasil (ölü hacim belirteci) çözeltisi kolona enjekte edilerek alıkonma zamanı tespit edilmiştir (149).

### 3.2.6. Veri Analizi

Bağırsak perfüzyonu çalışmaları sonunda zamanın fonksiyonu olarak toplanan numunelerdeki madde miktarları hazırlanan standart doğru denklemleri kullanılarak konsantrasyon olarak ifade edilmiştir. Tayin edilen konsantrasyon değerleri rezervuardaki madde konsantrasyonuna oranlanarak normalize edilmiştir. Normalize edilen 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.

In situ intestinal perfüzyon deneylerinden elde edilen verilerden efektif permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) hesaplanmıştır. Metformin hidroklorürün efektif permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) üzerine diğer diyabet ilaçlarının (gliburid, repaglinid),

CYP3A4 enzim inhibitörü (ketokonazol) ve PMAT inhibitörünün (verapamil) etkisini incelemek amacıyla her grup kendi kontrol değerleri ile karşılaştırılmıştır.  $P_{eff}$  değerlerinin hesaplanmasında Formül 3.7 kullanılmıştır (150).

$$P_{eff} = \frac{Q \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)^l}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L} \quad (3.7)$$

Q : Akış hızı (mL/s)

$C_{out}$  : Segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu

$C_{in}$  : Segmente giren perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu

R : Perfüze edilen bağırsak segmentinin yarıçapı (cm)

L : Perfüze edilen bağırsak segmentinin uzunluğu (cm)

Segmentlerin ortalama yarıçapları jejunum ve ileum için 0,18 cm, kolon için 0,2 cm olarak kabul edilmiştir (134).

Formülde verilen  $(C_{out}/C_{in})^l$  oranı  $(C_{out}/C_{in}$  düzeltilmiş) aşağıda verilen formül (Formül 3.8) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)^l = \left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right) \text{ ilaç} \times \left(\frac{C_{in}}{C_{out}}\right) \text{ fenol kırmızısı} \quad (3.8)$$

Segmente giren ve segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki fenol kırmızısı konsantrasyon değerleri kullanılarak net su akışı değeri (net water flux; NWF, Formül 3.9) hesaplanmıştır (143).

$$NWF = \frac{Q \cdot \left[ 1 - \left( \frac{C_{out}}{C_{in}} \right) \text{fenol kırmızısı} \right]}{L} \quad (3.9)$$

Yapılan hesaplamalar sonucunda net su akışı değerinin negatif çıkması mukozal bölgeden (lümen) serozal bölgeye (kan) sıvı kaybı (absorpsiyon) olduğunu ifade etmektedir. Bu değer pozitif çıkması ise mukozal bölgeye sıvı girişi (sekresyon) olduğunu ifade etmektedir. Yapılan deneyler sonucunda hesaplanan net su akışı değerleri bu doğrultuda değerlendirilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen görünür permeabilite katsayısı ( $P_{app}$ ) Formül 3.8 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$P_{app} = dC/dt \left( \frac{1}{AC_0} \right) \quad (3.10)$$

$dC/dt$ = İlaç permeasyon oranı ( $\mu\text{g/s}$ )

$A$ = çalışmalarında kullanılan insertin yüzey alanı ( $\text{cm}^2$ )

$C_0$ = Apikaldeki başlangıç konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )

Sıçanlardan tayin edilen permeabilite değerleri kullanılarak Formül 3.11 ve 3.12'deki denklemler aracılığı ile insanlardaki tahmini absorpsiyon dereceleri hesaplanmıştır (151).

$$P_{\text{eff,man}} = 3,6 \cdot P_{\text{eff,rat}} + 0,03 \cdot 10^{-4} \quad (3.11)$$

$$f_{\text{a,man}} = 1 - e^{-[2 \cdot P_{\text{eff,man}} \cdot \text{tres} / r \cdot 2,8]} \quad (3.12)$$

$f_{\text{a,man}}$ =insanlarda absorplanan fraksiyon

tres= ortalama ince bağırsak geçiş zamanı (3 saat)

r=insan ince bağırsağının yarıçapı (1,75 cm)

### 3.2.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen bütün veriler Ortalama±SS olarak tablolanmıştır. Konsantrasyon-zaman profillerinin karşılaştırılmasında yapılan istatistiksel analizlerde güven aralığı %95 olarak seçilmiştir. Grup içi verilerin istatistiksel karşılaştırılmasında non-parametrik bir test olan Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılmıştır. İnhibitörler ve diğer diyabet ilaçlarının varlığında farklı bağırsak segmentlerindeki metformin hidroklorür konsantrasyonlarındaki değişimleri karşılaştırmak amacıyla tek yönlü-ANOVA testi uygulanmıştır. Analizler lisanslı IBM SPSS Statistics Versiyon 23 (Hacettepe Üniversitesi Bilgi İşlem Daire Başkanlığı-Lisanslı Yazılım Sunucusu) programı kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farkın önemliliği elde edilen p değerinin  $\alpha$  yanılma düzeyinden büyük ( $p > \alpha$ ; istatistiksel olarak anlamsız) veya küçük ( $p < \alpha$ ; istatistiksel olarak anlamlı) olmasına göre değerlendirilmiştir. Analitik yöntem için ise validasyon ölçütlerinin varyasyon katsayısı (VK) değerleri hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

#### 4.1.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu

Etkin ve referans maddelerin miktar tayini için optimum bir analitik yöntem geliştirmek amacıyla farklı koşullarda (farklı akış hızı, farklı dalga boyu, farklı mobil faz bileşimi, farklı enjeksiyon hacmi gibi) HPLC çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan HPLC koşulları aşağıda verilmiştir.

**Enjeksiyon hacmi:** 10 µL - 20 µL - 50 µL

**Akış hızı:** 0,5 mL/dk-1 mL/dk

**Dalga boyu:** 230, 232, 240, 244, 254 nm

**Mobil faz:** 30:70 (pH:3 fosfat tamponu:metanol) - 30:70 (pH:3 fosfat tamponu:asetonitril)

Mobil faz olarak pH:3 fosfat tamponu:metanol (30:70) kullanıldığında her üç maddenin alıkonma sürelerinin birbirine çok yakın olduğu ve tam bir ayırım yapılamadığı görülmüştür. Bu nedenle, mobil fazda metanol yerine asetonitril kullanılmasına karar verilmiştir. Akış hızı 0,5 mL/dk'dan 1 mL/dk'ya çıkarıldığında alıkonma süresinin azaldığı görülmüştür. Alıkonma süresinin kısılması total analiz süresini de kısıltacağı için mobil fazın akış hızı 1 mL/dk olarak seçilmiştir. Ayrıca 218, 230, 232, 240, 244, 254 nm gibi farklı dalga boyları kullanılarak yapılan denemelerde en iyi pikler 232 nm dalga boyunda elde edilmiştir. Enjeksiyon hacmini artırdıkça pik alanının da artmakta olduğu görülmüştür. Ancak 50 µL'ye göre daha az miktarda numune ile analiz yapıldığı ve 10 µL'ye göre de daha yüksek pik alanı verdiği için 20 µL'de çalışılmaya karar verilmiştir.

Tez çalışmasında model ilaç olarak metformin hidroklorür kullanıldığından metformin hidroklorür için analitik yöntem geliştirilmiştir. Ayrıca, permeabilite

çalışmalarında BSS Sınıf 1 (yüksek çözünürlük, yüksek permeabilite) kapsamında yer alan metoprolol tartarat hem kullanılacak permeabilite yönteminin uygunluğunun değerlendirilmesinde hem de permeabilitesi tayin edilecek maddenin permeabilitesini karşılaştırmak amacıyla referans madde olarak kullanılmıştır. Bu nedenle metoprolol tartaratın da metformin hidroklorürün tayininde kullanılacak aynı analitik yöntemle tespit edilmesi gerekmektedir. Perfüzyon deneylerinde bağırsaklardaki NWF'ın tayin edilmesi ve permeabilite değeri hesaplanırken etkin madde konsantrasyonlarının net su akışına göre düzeltilmesi gerekmektedir. Bu amaçla perfüzyon çözeltisine referans madde olarak fenol kırmızısı (0,1 mg/mL) eklenmiştir. Bu nedenle metformin hidroklorür ve referans maddelerin (fenol kırmızısı ve metoprolol tartarat) tayini ve validasyonu HPLC yöntemi kullanarak aşağıda verilen optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 4.1'de verilmiştir.

**Analitik yöntem ve validasyonunda kullanılan optimum HPLC koşulları:**

**Kolon:** Waters Spherisorb® 5µ ODS 2 (5 µm; 4,6 mm x 250 mm)

**Mobil Faz:** 30:70 (pH:3 fosfat tamponu:asetonitril)

**Akış hızı:** 1 mL/dk

**Enjeksiyon hacmi:** 20 µL

**Dalga boyu:** 232 nm

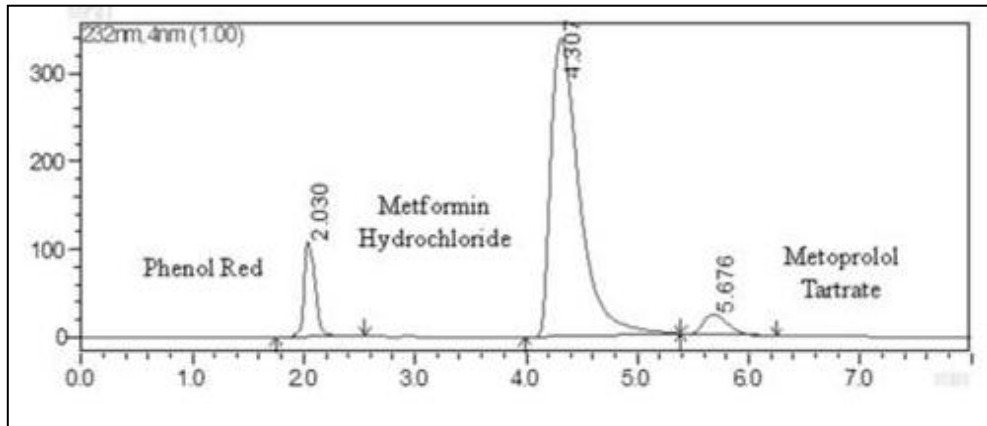
**Alıkonma zamanları:**

**Fenol kırmızısı:** 2,030 dk

**Metformin hidroklorür:** 4,307 dk

**Metoprolol tartarat:** 5,676 dk

**Analiz süresi:** 8 dk



**Şekil 4.1.** Fenol kırmızısı, metformin hidroklorür, metoprolol tartaratın birlikte enjeksiyonuyla elde edilen HPLC kromatogramı.

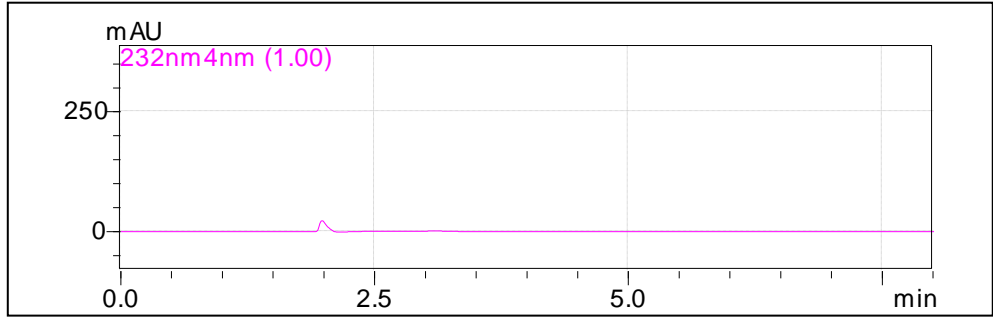
#### 4.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Etkin (metformin hidroklorür) ve referans (metoprolol tartarat ve fenol kırmızısı) maddelerin miktar tayininde kullanılacak analitik yöntemin uygunluğunu kontrol etmek amacıyla özgüllük, doğrusalılık, duyarlılık, saptanabilirlik sınırı ve tayin edilebilirlik sınırı, kesinlik, doğruluk parametreleri incelenmiş ve bu çalışmalardan elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

- **Özgüllük**

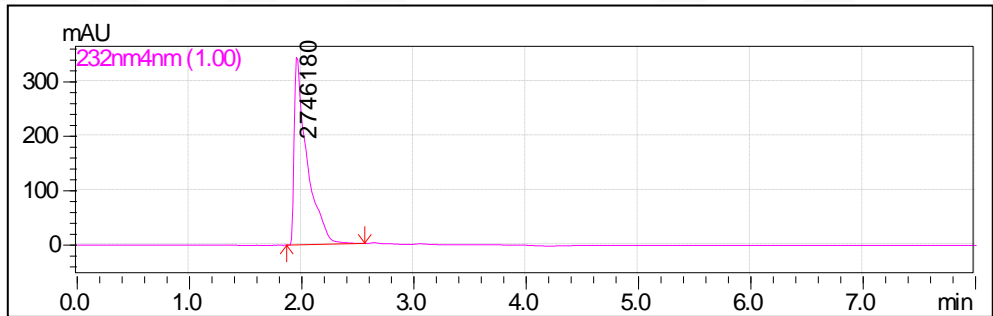
Üç farklı bağırsak segmentinin (jejunum, ileum, kolon) fenol kırmızısı eklenmeden hazırlanan perfüzyon çözeltisiyle perfüzyonundan toplanan perfüzetler birleştirilerek 232 nm’de HPLC’de kromatogramı çekildiğinde fenol kırmızısı (2,030 dk), metformin hidroklorür (4,307 dk) ve metoprolol tartaratın (5,676 dk) alıkonma zamanlarında (Şekil 4.2) pik vererek girişim yapmadıkları gözlenmiştir.





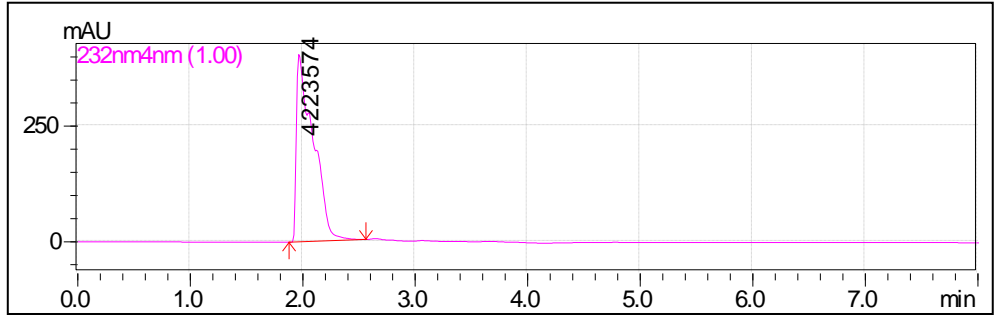
**Şekil 4.2.** Jejunum, ileum, kolondan toplanan ve fenol kırmızısı içermeyen perfüzet çözeltisi karışımının 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı.

Perfüzyon deneylerinde kullanılacak olan perfüzyon çözeltisi fenol kırmızısı da içerdiği için (Bkz. Tablo 3.1) jejunum, ileum ve kolondan toplanan perfüzetlerin karışımıyla yapılan özgüllük çalışmalarında sadece fenol kırmızısına ait pik gözlenmektedir (Şekil 4.3).

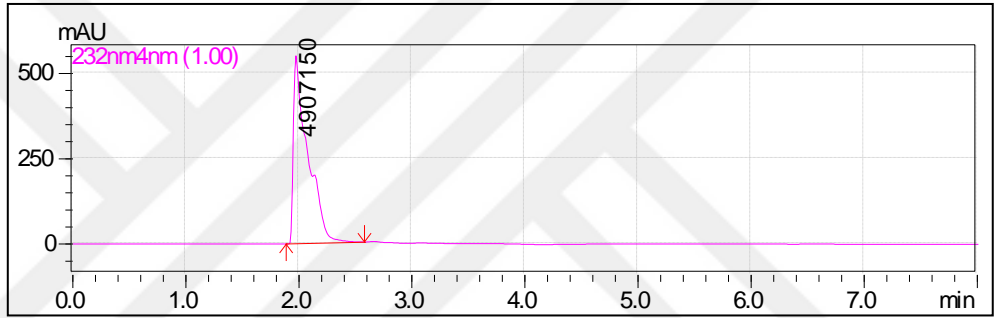


**Şekil 4.3.** Jejunum, ileum, kolondan toplanan ve fenol kırmızısı içeren perfüzet çözeltisi karışımının 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı.

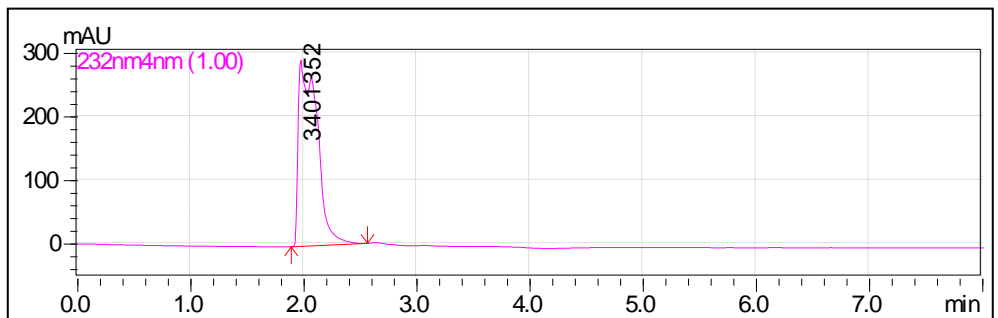
Perfüzyon deneylerinde kullanılması planlanan inhibitörler (ketokonazol, verapamil) ve metforminle kombine olarak kullanılan gliburid ve repaglinidin perfüzyon çözeltisine ayrı ayrı eklenerek 232 nm'de HPLC'de kromatogramı çekildiğinde fenol kırmızısı, metformin hidroklorür ve metoprolol tartaratin alıkonma zamanlarında pik vererek girişim yapmadıkları gözlenmiştir (Şekil 4.4- 4.7). Elde edilen bu sonuçlar geliştirilen analitik yöntemin özgül olduğunu göstermektedir.



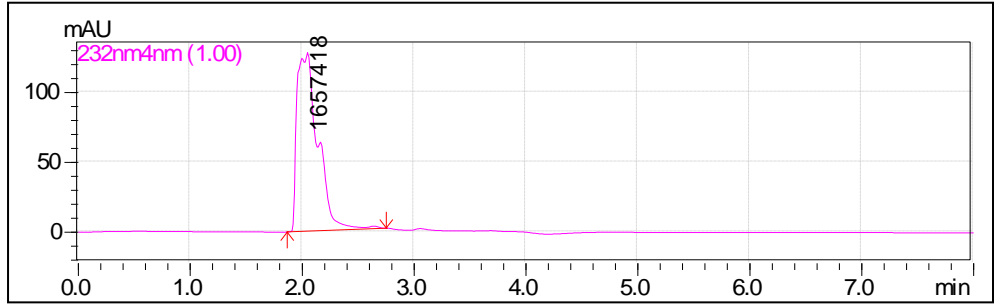
Şekil 4.4. Ketokonazol içeren perfüzyon çözeltisinin 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı.



Şekil 4.5. Verapamil içeren perfüzyon çözeltisinin 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı.



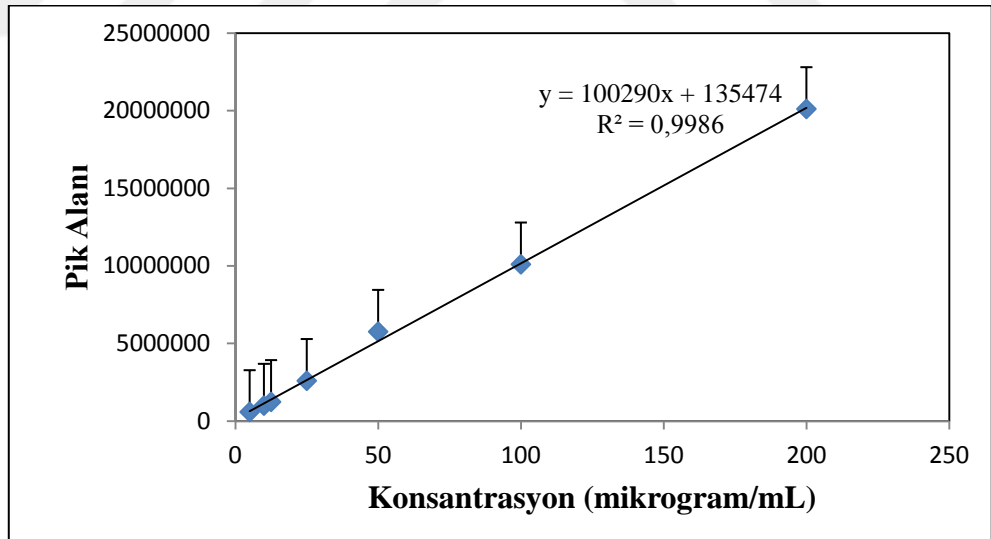
Şekil 4.6. Repaglinid içeren perfüzyon çözeltisinin 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı.



Şekil 4.7. Gliburid içeren perfüzyon çözeltisinin 232 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı.

- Doğrusallık

Metformin hidroklorürün kalibrasyon doğrusu Şekil 4.8’de, doğrusallık bulguları Tablo 4.1’de verilmiştir.

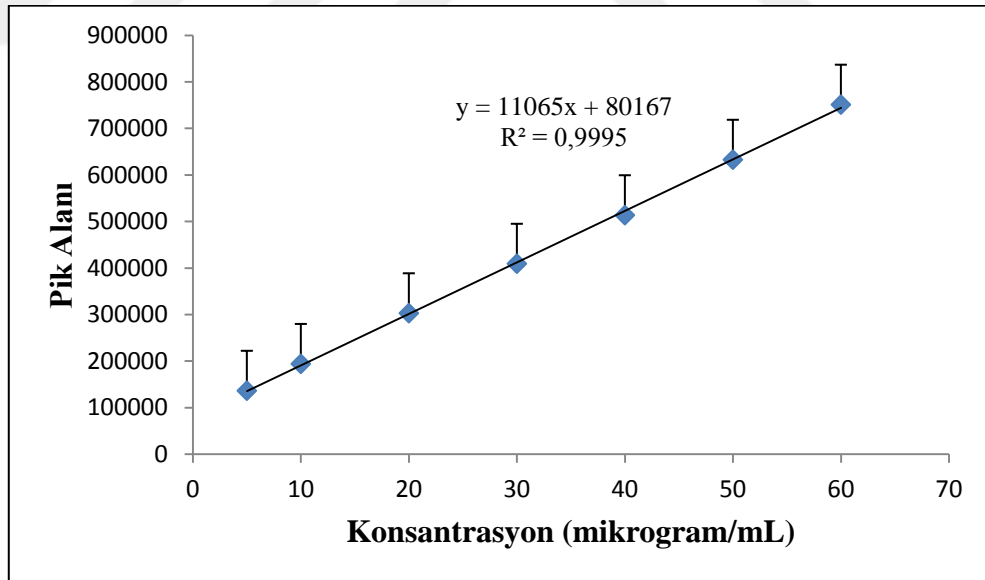


Şekil 4.8. Perfüzyon çözeltisi ile uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan metformin hidroklorür çözeltilerine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ortalama±Standart Hata (SH); n=6).

**Tablo 4.1.** Metformin hidroklorüre ait doğrusallık bulguları (n=6).

<b>Doğru Denklemi</b>	$y=100290x+135474$
<b>Eğimin Standart Hatası</b>	49,21
<b>Kesişimin Standart Hatası</b>	3595,06
<b>Determinasyon Katsayısı (<math>r^2</math>)</b>	0,9986
<b>Doğrusallık Aralığı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	2,5-200
<b>Nokta Sayısı</b>	8
<b>LOD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,85
<b>LLOQ (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	2,5

Metoprolol tartaratin kalibrasyon doğrusu Şekil 4.9’da, doğrusallık bulguları Tablo 4.2’de verilmiştir.

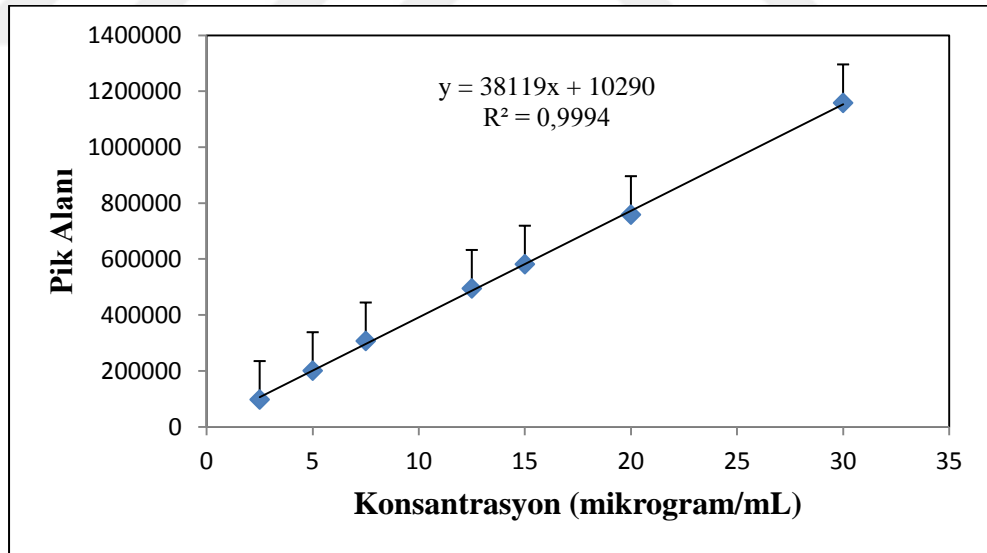


**Şekil 4.9.** Perfüzyon çözeltisi ile uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan metoprolol tartarat çözeltilerine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ortalama $\pm$ SH; n=6).

**Tablo 4.2.** Metoprolol tartarata ait doğrusallık bulguları (n=6).

<b>Doğru Denklemi</b>	$y=11065x+80167$
<b>Eğimin Standart Hatası</b>	88,32
<b>Kesişimin Standart Hatası</b>	1715,63
<b>Determinasyon Katsayısı (<math>r^2</math>)</b>	0,9995
<b>Doğrusallık Aralığı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	1-60
<b>Nokta Sayısı</b>	8
<b>LOD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,25
<b>LLOQ (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,77

Fenol kırmızısının kalibrasyon doğrusu Şekil 4.10'da, doğrusallık bulguları Tablo 4.3'de verilmiştir.



**Şekil 4.10.** Perfüzyon çözeltisi ile uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan fenol kırmızısı çözeltilerine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ortalama $\pm$ SH; n=6).

**Tablo 4.3.** Fenol kırmızısına ait doğrusallık bulguları (n=6).

<b>Doğru Denklemi</b>	$y=38119x +10290$
<b>Eğimin Standart Hatası</b>	402,8
<b>Kesişimin Standart Hatası</b>	4568,2
<b>Determinasyon Katsayısı (<math>r^2</math>)</b>	0,9994
<b>Doğrusallık Aralığı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	1-30
<b>Nokta Sayısı</b>	8
<b>LOD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,12
<b>LLOQ (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,38

Daha önce belirtildiği gibi stok çözeltilerden hareketle hazırlanan standart çözeltilerin pik alanları tayin edilmiştir. Konsantrasyonlar ve bu konsantrasyona karşılık gelen pik alanları en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilerek doğru denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Metformin hidroklorür, metoprolol tartarat ve fenol kırmızısı için elde edilen kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayıları 1'e yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar, her madde için çalışılan konsantrasyon aralığında pik alanları ile konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

- **Kesinlik**

Metformin hidroklorür, metoprolol tartarat ve fenol kırmızısının miktar tayini amacıyla kullanılan yöntemin kesinliğini tayin etmek amacıyla yapılan gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında metformin hidroklorür, metoprolol tartarat ve fenol kırmızısı için elde edilen bulgular Tablo 4.4'de verilmiştir.

Bu tez kapsamında bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen tüm örnekler biyolojik bileşenler içeren bir matriks (bağırsak perfüzyonu sonucu toplanan örnekler gibi) içerisinden tayin edildiği için validasyon bulguları biyoanalitik yöntem kabul kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir (varyasyon katsayısının %20'den

küçük olması). Metformin hidroklorür, metoprolol tartarat ve fenol kırmızısının tayininde kullanılan analitik yöntemin gün içi, günler arası kesinliğini göstermek amacıyla yapılan çalışmalarından elde edilen bulgular incelendiğinde çalışılan tüm konsantrasyonlarda varyasyon katsayısı değerlerinin %8'den küçük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar kullanılan analitik yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır.

- **Doğruluk**

Metformin hidroklorür, metoprolol tartarat, fenol kırmızısı tayininde kullanılan analitik yönteminin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.4'de verilmiştir. Her bir maddenin her bir konsantrasyonu için hesaplanan ortalama bağıl hata değeri %4'den küçük bulunmuştur.

**Tablo 4.4.** Metformin hidroklorür, fenol kırmızısı ve metoprolol tartaratın günler arası ve gün içi kesinlik ve doğruluk sonuçları (Ortalama±SH; n=6).

Maddeler	Gerçek Konsantrasyon (µg/mL)	Günler Arası			Gün İçi		
		Tayin Edilen Konsantrasyon <sup>a</sup> (µg/mL)	Kesinlik <sup>b</sup> RSS (%)	Doğruluk <sup>c</sup> (% OBH)	Tayin Edilen Konsantrasyon <sup>a</sup> (µg/mL)	Kesinlik <sup>b</sup> RSS (%)	Doğruluk <sup>c</sup> (% OBH)
Metformin Hidroklorür	10	8,45±0,04	0,10	-15,49	10,37±0,22	0,55	3,72
	25	24,40±0,15	0,37	-2,36	24,75±0,23	0,58	-0,99
	200	199,13±0,08	0,21	-0,43	199,29±2,93	7,18	-0,35
Fenol Kırmızısı	2.5	2,28±0,01	0,04	-8,56	2,43±0,05	0,13	-2,54
	12.5	12,70±0,10	0,25	1,66	12,68±0,04	0,11	1,51
	30	30,11±0,30	0,75	0,38	30,00±0,41	1,02	0,02
Metoprolol Tartarat	5	5,08±0,09	0,23	1,60	5,09±0,05	0,14	1,80
	30	29,74±0,11	0,28	-0,86	29,65±0,20	0,50	-1,16
	60	60,63±0,62	1,52	1,05	60,34±0,26	0,64	0,58

<sup>a</sup>Ortalama±SH, <sup>b</sup>RSS, Relatif Standart Sapma, <sup>c</sup>%OBH=Ortalama Bağıl Hata= (Tayin Edilen Konsantrasyon-Gerçek Konsantrasyon)/ Gerçek Konsantrasyonx100



- **Duyarlılık**

Etkin ve referans maddelerin tayininde kullanılan analitik yöntemin LOD ve LLOQ değerleri metformin hidroklorür için Tablo 4.1’de, metoprolol tartarat için Tablo 4.2’de, fenol kırmızı için Tablo 4.3’de verilmiştir.

- **Dayanıklılık**

Deneyden hemen sonra ve  $-20^{\circ}\text{C}$ ’de dondurulduktan 24 saat, 1 hafta ve 1 ay sonra numuneler HPLC’de analiz edilerek geri kazanım değerleri (%) hesaplanmıştır (Tablo 4.5). Geri kazanım değerlerinin %100’e yakın olması nedeniyle perfüzyon deneylerinden toplanan numuneler analiz edilinceye kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ ’de saklanmıştır.

**Tablo 4.5.**  $-20^{\circ}\text{C}$ ’de saklanan metformin hidroklorür, fenol kırmızısı ve metoprolol tartaratın perfüzyon çözetisindeki 24 saat, 1 hafta ve 1 ay boyunca dayanıklılığı (ortalama  $\pm$  SS; n=3).

% Kazanılan	24 saat	1 hafta	1 ay
<b>Metformin Hidroklorür</b>	99,67 $\pm$ 0,62	100,85 $\pm$ 150	99,22 $\pm$ 0,45
<b>Fenol Kırmızısı</b>	98,14 $\pm$ 0,86	104,76 $\pm$ 1,37	98,52 $\pm$ 0,43
<b>Metoprolol Tartrat</b>	98,68 $\pm$ 0,29	112,28 $\pm$ 4,27	101,52 $\pm$ 2,21

- **Sistem Uygunluk Testleri**

Sistem uygunluk testleri Bölüm daha önce belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Fenol kırmızısı, metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen kapasite faktörleri ( $k'$ ) sırasıyla 2,05; 1,17; 1,87 olarak bulunmuştur. Teorik tabaka sayıları ise aynı maddeler için sırasıyla 1567, 1864, 2138 olarak tayin edilmiştir. Kuyruklanma faktörü metformin hidroklorür için 1,66, metoprolol tartarat

için 1,25 ve fenol kırmızısı için 1,5 olarak bulunmuştur. Analizde kullanılan HPLC kolonuna urasilin enjeksiyonu sonrasında ölü hacim değeri 1,1 dakika olarak tayin edilmiştir.

#### 4.2. Sıçanlarda Streptozotosin ve Nikotinamid Uygulaması ile Diyabet Geliştirilmesi

Bölüm 3.2.1’de bahsedildiği üzere dokuz (9) Sprague-Dawley sıçanları rastgele olacak şekilde üç gruba ayrılmıştır.

**Grup 1:** Kontrol (K) grubu

**Grup 2:** Streptozotosin (S) grubu

**Grup 3:** Nikotinamid+streptozotosin (N+S) grubu

Grup 1-3’de yer alan sıçanların kodları, vücut ağırlıkları ve enjeksiyon hacimleri Tablo 4.6- 4.8’de verilmiştir.

**Tablo 4.6.** Kontrol grubunda yer alan sıçanların kodları, vücut ağırlıkları ve enjeksiyon hacimleri (n=3).

Hayvan Kodu	Vücut Ağırlığı (g)	Sitrat Tamponu için Enjeksiyon Hacmi (mL)	1 hafta sonra Vücut Ağırlığı (g)	Ağırlık Farkı
K1	279,9	0,18	303,0	+23,1
K2	333,1	0,22	348,0	+14,9
K3	365,5	0,24	371,0	+5,5

**Tablo 4.7.** Streptozotosin grubunda yer alan sıçanların kodları, vücut ağırlıkları ve enjeksiyon hacimleri (n=3).

Hayvan Kodu	Vücut Ağırlığı (g)	Streptozotosin için Enjeksiyon Hacmi (mL)	1 hafta sonra Vücut Ağırlığı (g)	Ağırlık Farkı
S1	335,4	0,22	311,1	-24,3
S2	314,3	0,21	268,5	-45,8
S3	320,2	0,21	275,5	-44,7

**Tablo 4.8.** Nikotinamid + Streptozotosin grubunda yer alan sıçanların kodları, vücut ağırlıkları ve enjeksiyon hacimleri (n=3).

Hayvan Kodu	Vücut Ağırlığı (g)	Nikotinamid için Enjeksiyon Hacmi (mL)	Streptozotosin için Enjeksiyon Hacmi (mL)	1 hafta sonra Vücut Ağırlığı (g)	Ağırlık Farkı
N+S1	354,9	0,12	0,23	342,8	-12,1
N+S2	335,1	0,11	0,22	293,8	-41,3
N+S3	347,7	0,11	0,23	330,4	-17,3

Tablolarda da görüldüğü üzere kontrol grubunda (Grup 1) yer alan sıçanların vücut ağırlıklarında artma gözlenirken, streptozotosin (Grup 2) ve nikotinamid + streptozotosin (Grup 3) uygulanan sıçanların vücut ağırlıklarında azalma olmuştur.

Tüm gruplarda enjeksiyondan 3 gün ve 1 hafta sonra glikometre kullanılarak tayin edilen glikoz düzeyleri Tablo 4.9'da verilmiştir.

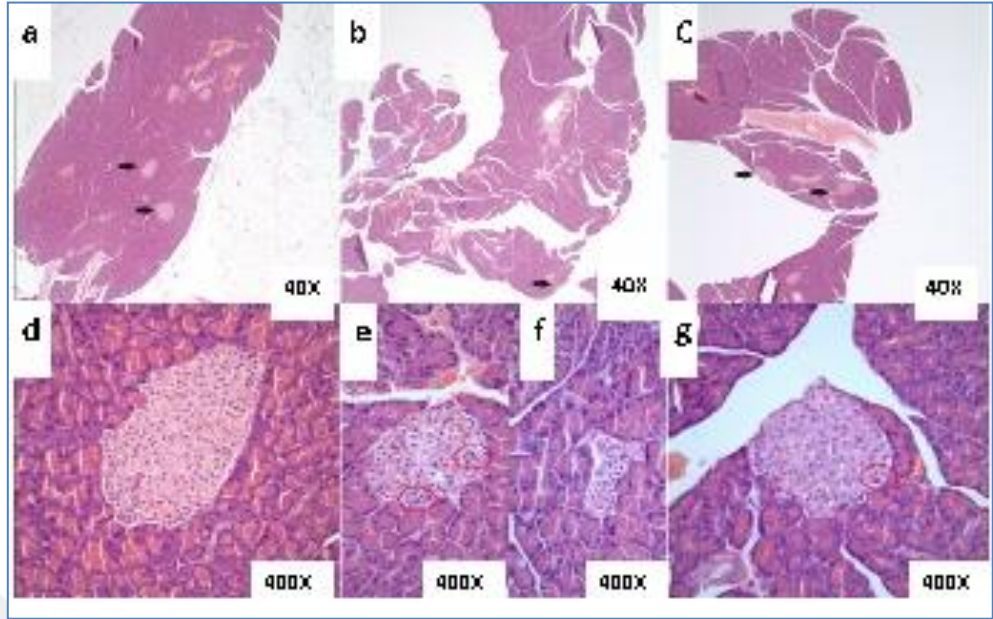
**Tablo 4.9.** Streptozotosin ve nikotinamid + streptozotosin uygulanmasından 3 gün ve 1 hafta sonra tüm gruplarda tayin edilen kan glikoz düzeyleri (n=3).

<b>Hayvan kodu</b>	<b>3 gün sonra kan glikoz düzeyi (mg/dL)</b>	<b>1 hafta sonra kan glikoz düzeyi (mg/dL)</b>
<b>K1</b>	107	H1
<b>K2</b>	76	139
<b>K3</b>	73	153
<b>S1</b>	H1	H1
<b>S2</b>	545	494
<b>S3</b>	83	120
<b>N+S1</b>	H1	H1
<b>N+S2</b>	H1	H1
<b>N+S3</b>	106	421

H1: 600 mg/dL'nin üzeri

Kontrol grubunda glikoz düzeyi 250 mg/dL'nin altında iken streptozotosin ve nikotinamid+streptozotosin gruplarında bu değer 250 mg/dL'nin üzerinde bulunmuştur (Tablo 4.9). Kan glikoz değerleri streptozotosin ve nikotinamid+streptozotosin gruplarında diyabet geliştiğini göstermekle birlikte gelişen diyabetin tipi hakkında bilgi vermemektedir (87).

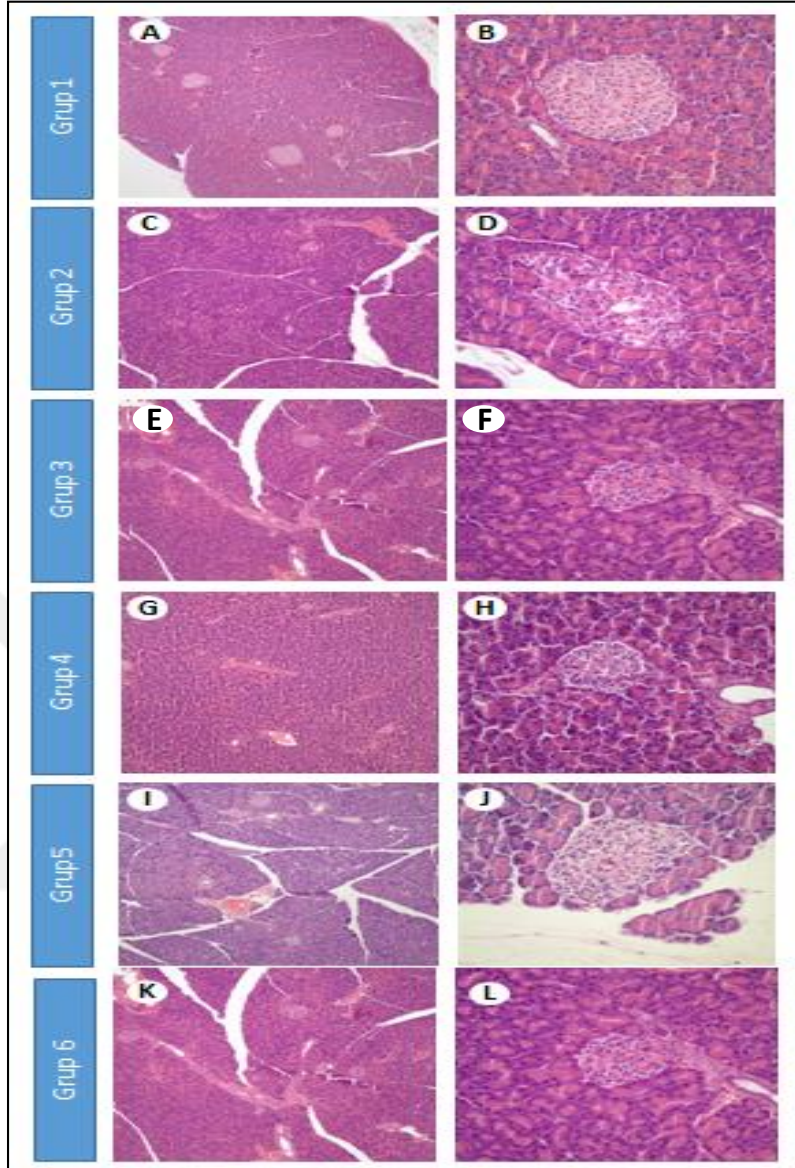
Geliştirilen diyabetin tipini tayin etmek amacıyla, çalışmaya dahil olan sıçanlara 1 hafta sonra ötenazi uygulanarak pankreasları çıkarılıp histopatolojik değerlendirme yapılmıştır ve elde edilen bulgular Şekil 4.11'de verilmiştir. Histopatolojik değerlendirme sonuçları, streptozotosin grubunda Tip 1 diyabet, nikotinamid+streptozotosin grubunda ise Tip 2 diyabet geliştiğini göstermektedir.



**Şekil 4.11.** 40x büyütmede normal (a), streptozotosin (b) ve nikotinamid (c) gruplarında Langerhans adacıklarının (ok) pankreas lobülündeki sayısı ve dağılımı görülmektedir. 400x büyütmede Langerhans adacıklarının normal gruba kıyasla (d) streptozotosin grubunda hücre sitoplazmalarında küçülme, nükleer hiperkromazi ve piknozis (elips), nükleol belirginliği görülmektedir (e); dolayısıyla adacık hacmi küçülmüştür (f). Nikotinamid grubunda da benzer değişiklikler görülmekle birlikte bunlar streptozotosin grubundan daha hafif şiddetlidir (g).

Bu bulgular ışığında Tip 2 diyabet geliştirmek amacıyla nikotinamid ve streptozotosinin birlikte kullanıldığı yöntemin kullanılmasına karar verilmiştir.

Perfüzyon deneylerinde kullanılan tüm sıçanların kan glikoz değerleri tayin edilmiş ve bu değer 250 mg/dL'nin üzerinde bulunmuştur. Deney tamamlandıktan sonra pankreaslar toplanmış Bölüm 3.2.1.'de belirtildiği şekilde sabitlenerek histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen bulgular her gruptan birer örnek olacak şekilde Şekil 4.12'de verilmiştir. Histopatolojik incelemede tüm gruplarda Tip 2 diyabetin geliştiğini gösteren patolojik değişiklikler (adacık sayısında azalma, adacık çapında azalma, piknozis, sitoplazmik daralma ve nükleol belirginliği) gözlenmiştir.



**Şekil 4.12.** Perfüzyon deneylerinde kullanılan tüm sıçanlarda pankreas adacıklarında çeşitli değişiklikler dikkati çekmiştir: 1) adacık sayısında azalma (A, C, E, G, I, K), 2) lobül çapında azalma (F, H, L), 3) vakuolizasyon ve dejeneratif değişiklikler (D), 4) piknozis (D, F, H), 5) nükleol belirginliği (D, F, L), ve 6) sitoplazma hacminde azalma (D, F, H, J). Bazı adacıklarda bu değişiklikler minimaldir (J).

(Hematoksilen&Eozin; A, C, E, G, I: 100x; B, D, F, H, J: 400x)

### 4.3. Perfüzyon Sisteminde Yapılan Çalışmalar

Perfüzyon sisteminde yapılan çalışmalar Bölüm 3.2.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

#### 4.3.1. Gecikme Süresinin Tayini

Perfüzyon sisteminde bir gecikme olup olmadığını incelemek amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular Tablo 4.10'da verilmiştir.

**Tablo 4.10.** Farklı bağırsak segmentleri için tayin edilen hacim ve ortalama geçiş süreleri.

<b>Segment</b>	<b>Tayin Edilen Segment Hacimi (mL)</b>	<b>Segmentten Ortalama Geçiş Süresi (dk)</b>
<b>Jejunum</b>	0,77	3,85
<b>İleum</b>	0,61	3,05
<b>Kolon</b>	0,37	1,85

Hem perfüzyon sistemindeki gecikme (7 dakika) hem de bağırsak segmentlerinden ortalama geçiş süreleri göz önüne alınarak perfüzyon deneylerinde 60'ar dakika süreyle örnek toplanmasına karar verilmiştir.

#### 4.3.2. Perfüzyon Sistemi ile Etkileşmenin İncelenmesi

Metformin hidroklorürün perfüzyon sistemindeki plastik ve silikon tüplerle etkileşip etkileşmediğini incelemek amacıyla hem rezervuardaki hem de 140 dakika süreyle toplanan numunelerdeki etkin madde konsantrasyonları HPLC ile tayin

edilmiştir. Metformin hidroklorürün rezervuardaki konsantrasyonu (1283 $\mu$ g/mL) ile 140 dakika sonraki konsantrasyonu (1272  $\mu$ g/mL) arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Bu sonuç metformin hidroklorürle perfüzyon sisteminde kullanılan plastik ve silikon tüpler arasında bir etkileşme olmadığına göstergesi olarak alınmıştır.

#### **4.4. Perfüzyon Deneyleri**

Tüm perfüzyon çalışmalarında kullanılan (kontrol ve diyabet grupları) sıçanlara ait bilgiler (perfüzyon akış hızı, sıçan ağırlığı, perfüze edilen segment uzunlukları gibi) Tablo 4.11’de verilmiştir.



**Tablo 4.11.** Kontrol ve diyabet gruplarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler (Ortalama±SS, n=6).

<b>Gruplar</b>	<b>Kontrol Grubu</b>	<b>Diyabet grubu</b>
<b>Grup 1</b>		
Sıçan Ağırlığı (g)	368,83 ± 44,16	300,83 ± 24,21
Akış Hızı (mL/dak)	0,2	0,2
Segment Uzunlukları		
Jejunum	10,35 ± 4,99	10,33 ± 1,28
İleum	7,43 ± 2,72	6,32 ± 0,81
Kolon	3,21 ± 0,64	3,14 ± 0,57
<b>Grup 2</b>		
Sıçan Ağırlığı (g)	368,33±37,76	302,83±40,24
Akış Hızı (mL/dak)	0,2	0,2
Segment Uzunlukları		
Jejunum	9,36±2,77	10,58±2,22
İleum	5,74±1,46	5,72±1,15
Kolon	3,12±0,61	3,52±0,42
<b>Grup 3</b>		
Sıçan Ağırlığı (g)	372,00±37,44	303,33±28,80
Akış Hızı (mL/dak)	0,2	0,2
Segment Uzunlukları		
Jejunum	10,50±1,40	10,08±3,42
İleum	6,15±1,63	6,06±0,85
Kolon	3,19±0,53	3,42±1,13

**Tablo 4.11 (devam).** Kontrol ve diyabet gruplarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler (Ortalama $\pm$ SS, n=6).

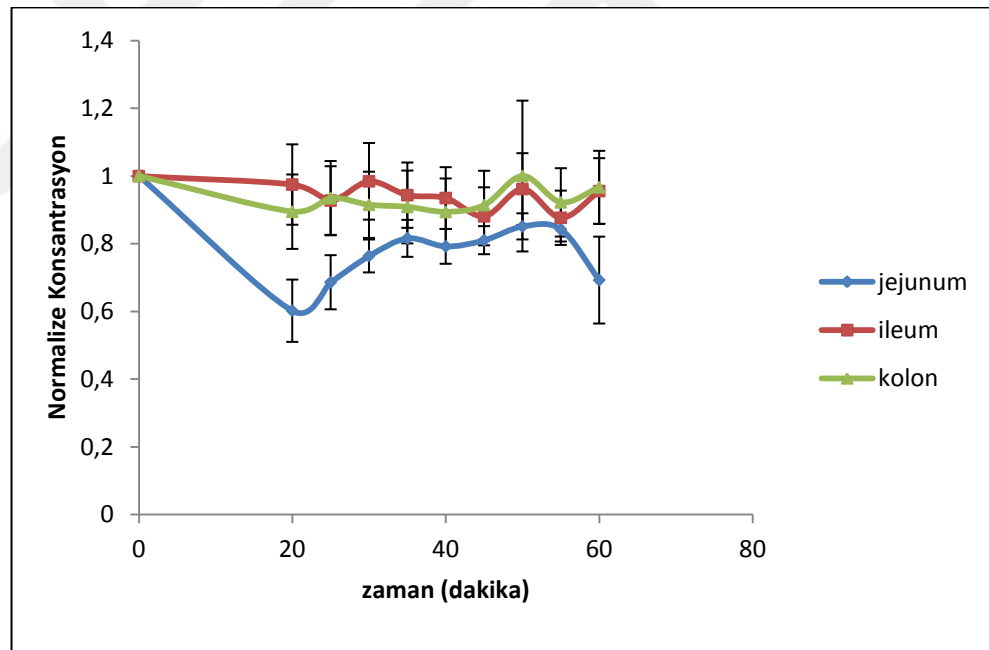
<b>Gruplar</b>	<b>Kontrol Grubu</b>	<b>Diyabet grubu</b>
<b>Grup 4</b>		
Sıçan Ağırlığı (g)	368,83 $\pm$ 44,16	300,83 $\pm$ 24,21
Akış Hızı (mL/dak)	0,2	0,2
Segment Uzunlukları (cm)		
Jejunum	10,35 $\pm$ 4,99	10,33 $\pm$ 1,28
İleum	7,43 $\pm$ 2,72	6,32 $\pm$ 0,81
Kolon	3,21 $\pm$ 0,64	3,14 $\pm$ 0,57
<b>Grup 5</b>		
Sıçan Ağırlığı (g)	367,66 $\pm$ 49,30	289,33 $\pm$ 30,21
Akış Hızı (mL/dak)	0,2	0,2
Segment Uzunlukları (cm)		
Jejunum	10,15 $\pm$ 1,74	9,08 $\pm$ 2,43
İleum	5,82 $\pm$ 1,70	5,75 $\pm$ 1,03
Kolon	2,75 $\pm$ 0,63	3,53 $\pm$ 0,93
<b>Grup 6</b>		
Sıçan Ağırlığı (g)	372,00 $\pm$ 37,44	
Akış Hızı (mL/dak)	0,2	0,2
Segment Uzunlukları (cm)		
Jejunum	10,50 $\pm$ 1,40	10,08 $\pm$ 3,42
İleum	6,15 $\pm$ 1,63	6,06 $\pm$ 0,85
Kolon	3,19 $\pm$ 0,53	3,42 $\pm$ 1,13

Bölüm 3.2.2’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen perfüzyon deneylerine ait bulgular aşağıda verilmiştir.

#### 4.4.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular

- **Grup 1 (Metformin Hidroklorür; Kontrol Grubu):**

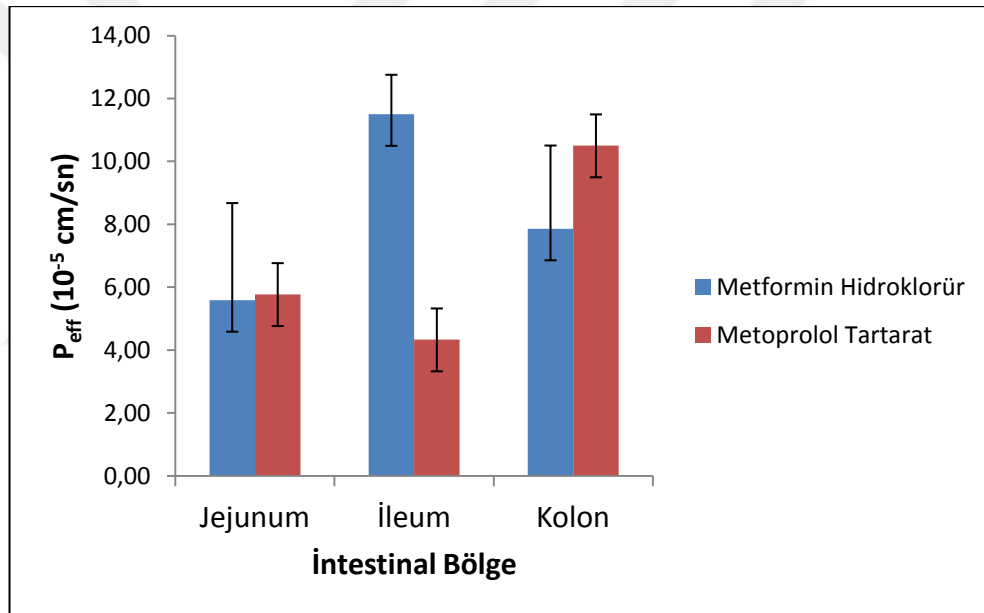
Herhangi bir inhibitör veya kombine kullanılan etkin maddelerin olmadığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.13’de verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) Tablo 4.12’de özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.14’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Kontrol grubunda jejunum, ileum ve kolonun metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri (Ortalama±SH; n=6).

**Tablo 4.12.** Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{\text{eff}}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{\text{eff}}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)	
	Metformin Hidroklorür	Metoprolol Tartarat
Jejunum	5,59 $\pm$ 3,09	5,77 $\pm$ 3,37
İleum	11,50 $\pm$ 1,26	4,33 $\pm$ 0,48
Kolon	7,86 $\pm$ 2,69	10,50 $\pm$ 3,15



**Şekil 4.14.** Sağlıklı sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{\text{eff}}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

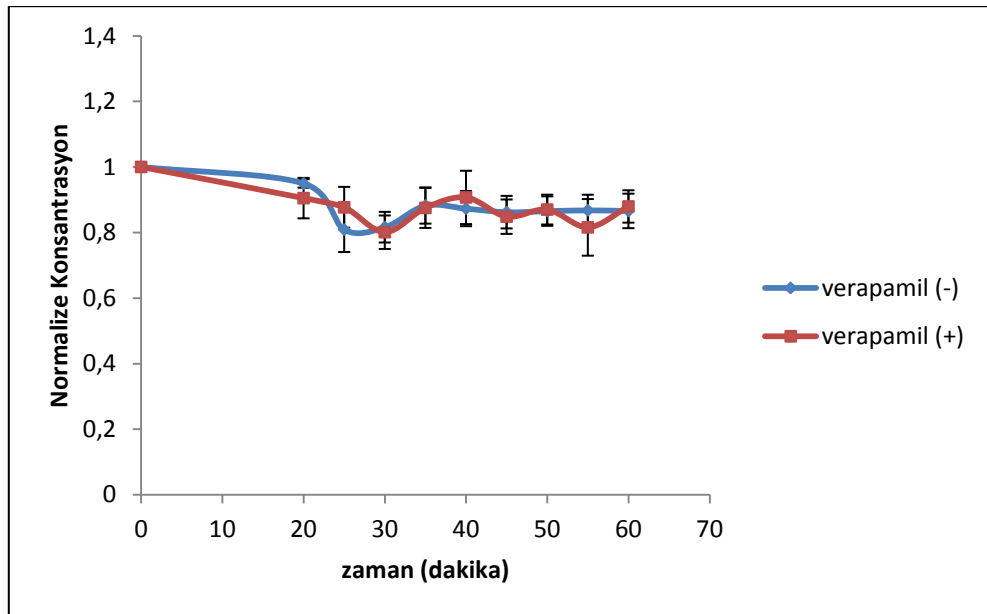
Kontrol grubunda yapılan çalışmalar (Grup 1) metformin hidroklorürün bağırsaklardan absorpsiyonunun en yüksek olduğu segmentin ileum ve en düşük olduğu segmentin ise jejunum olduğunu göstermiştir (Tablo 4.12). Jejunum-kolon ve ileum-kolon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızken ( $p>0,05$ ) jejunum-ileum arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Metoprolol tartaratin permeabilitesi ileumdan ( $4,33 \pm 0,48 \times 10^{-5}$  cm/s) kolona ( $10,5 \pm 3,15 \times 10^{-5}$  cm/sn) doğru artış göstermiştir (Tablo 4.12). Segmentler arasındaki permeabilite farkı jejunum-kolon ve ileum-kolon arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $p < 0,05$ ) jejunum-ileum arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).

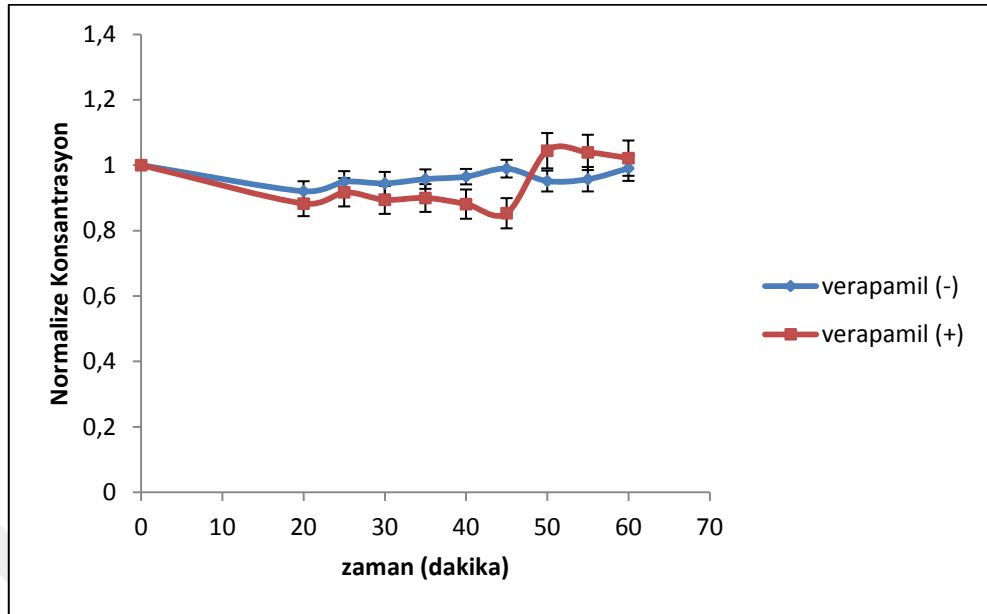
- **Grup 2 (Metformin Hidroklorür+Verapamil)**

Verapamilin PMAT inhibitörü olarak kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.15'te verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri Tablo 4.13'da özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.16'da gösterilmiştir.

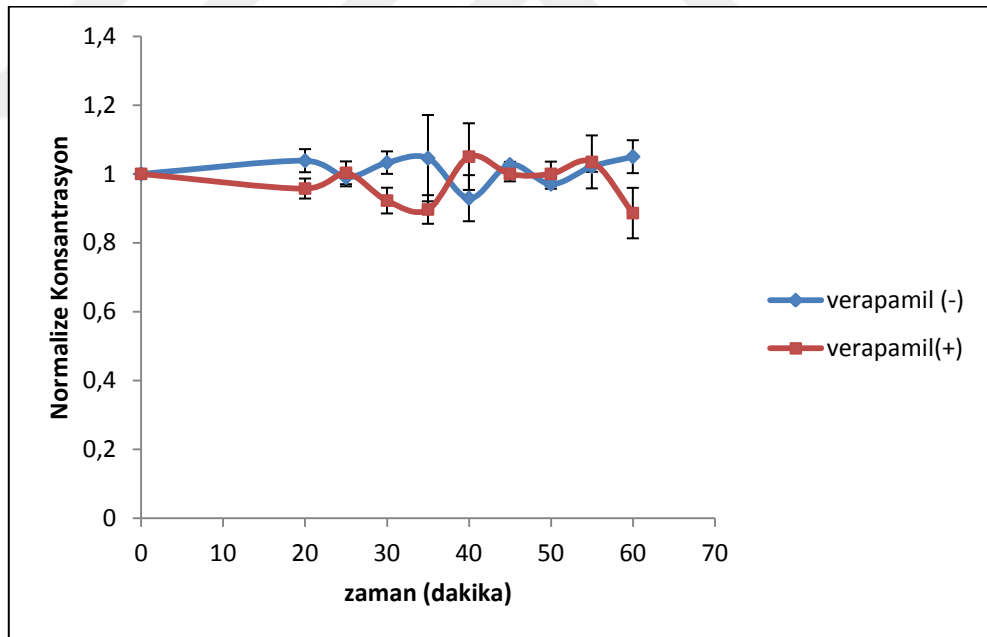
(A)



(B)



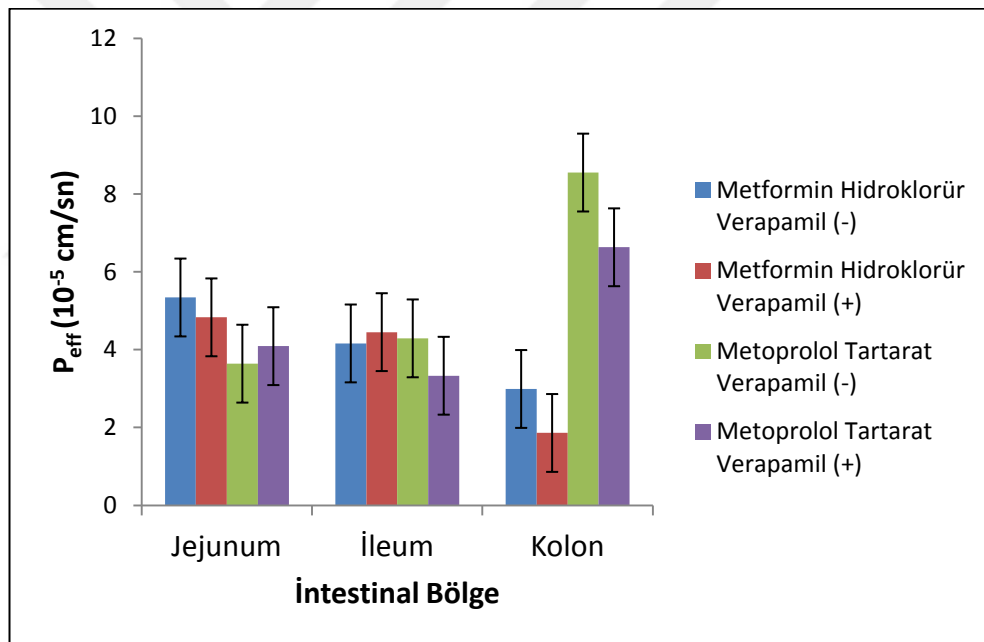
(C)



**Şekil 4.15.** Kontrol grubunda PMAT inhibitörü olarak verapamil kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): verapamil yok; (+):verapamil var].

**Tablo 4.13.** Verapamil yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Verapamil (+)	Kontrol	Verapamil (+)
Jejunum	5,34 $\pm$ 0,75	4,83 $\pm$ 0,69	3,64 $\pm$ 0,18	4,09 $\pm$ 0,82
İleum	4,16 $\pm$ 0,00	4,45 $\pm$ 0,73	4,29 $\pm$ 0,60	3,33 $\pm$ 0,12
Kolon	2,99 $\pm$ 0,12	1,86 $\pm$ 0,50	8,55 $\pm$ 0,01	6,63 $\pm$ 0,21



**Şekil 4.16.** Verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile yapılan analizler, çalışmada PMAT inhibitörü olarak kullanılan verapamilin jejunum, ileum ve kolonda metformin

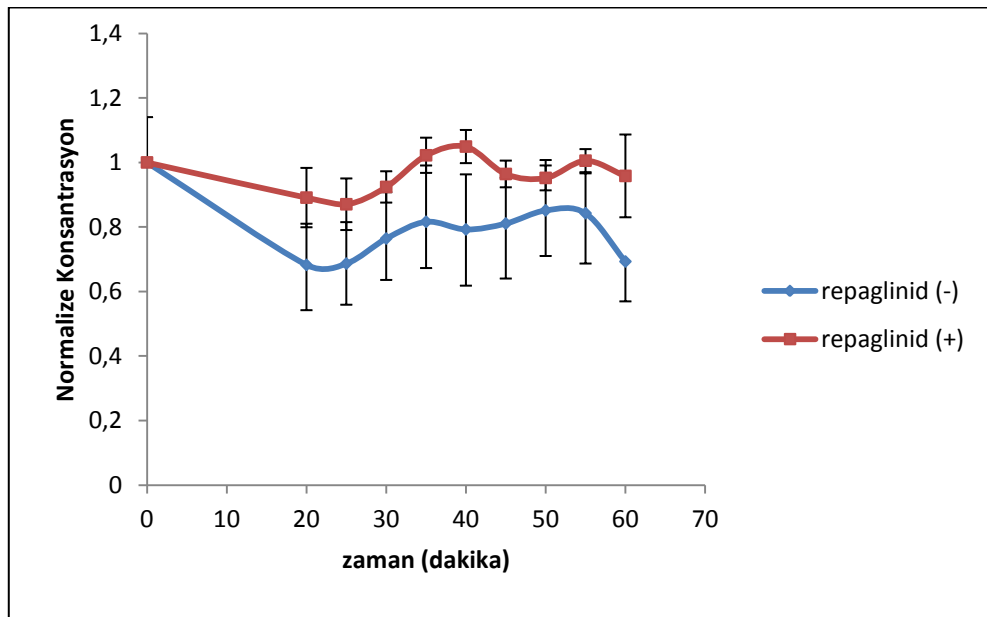
hidroklorürün permeabilitesi üzerine etkisinin istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını göstermiştir ( $p>0,05$ ).

Metoprolol tartaratin permeabilitesinin verapamil varlığında jejunumda artarken, ileum ve kolonda azaldığı ancak aradaki bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

- **Grup 3 (Metformin Hidroklorür+Repaglinid)**

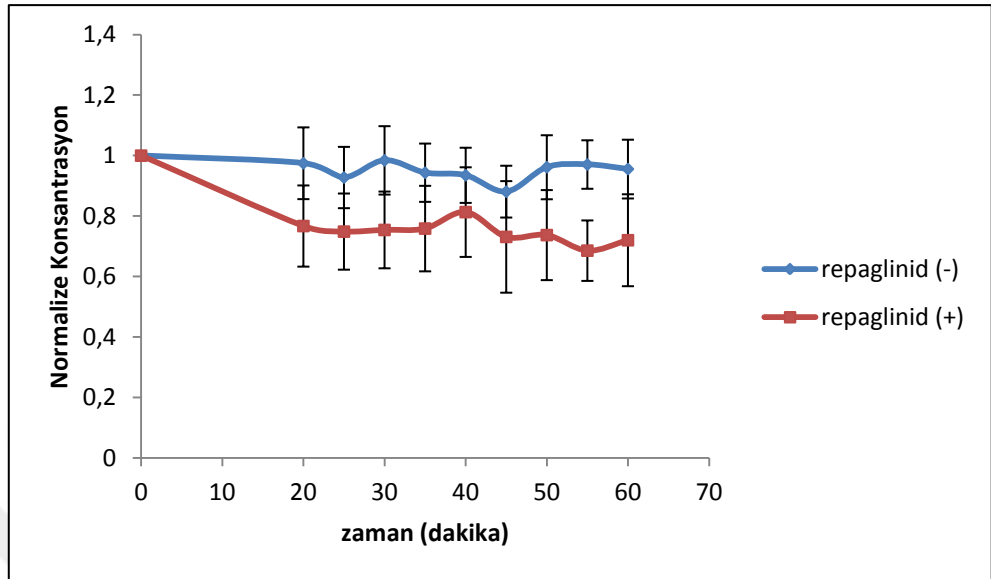
Repaglinidin metformin hidroklorür ile birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.17'de verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri Tablo 4.14'de özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

(A)

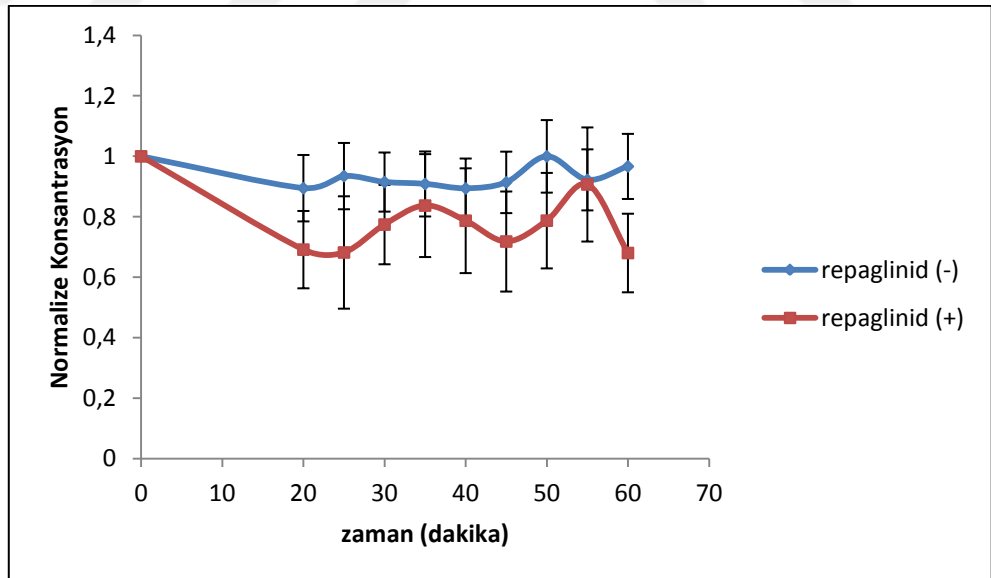




(B)



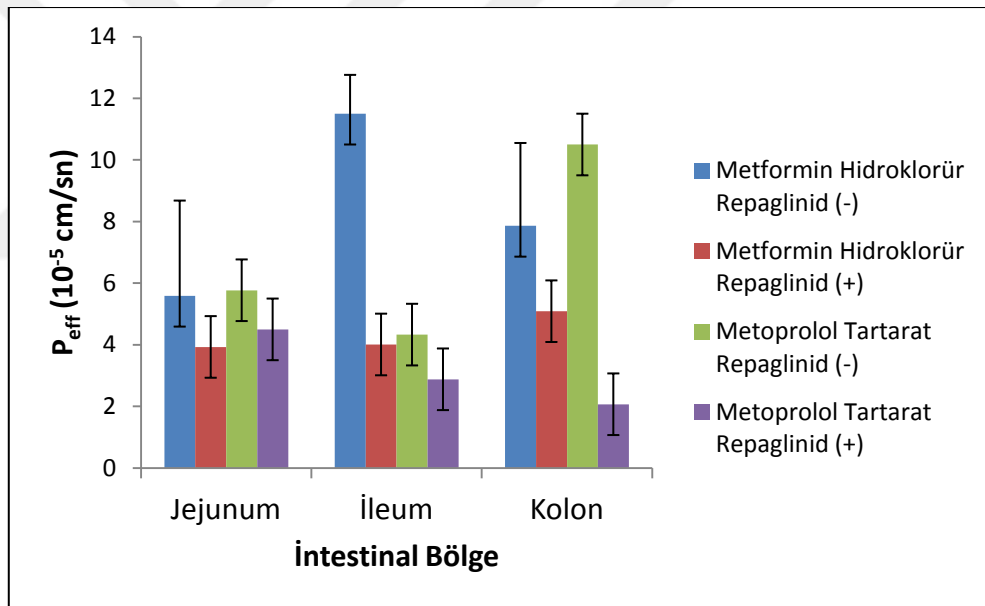
(C)



**Şekil 4.17.** Kontrol grubunda repaglinid kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): repaglinid yok; (+):repaglinid var].

**Tablo 4.14.** Repaglinid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Repaglinid (+)	Kontrol	Repaglinid (+)
<b>Jejunum</b>	5,59 $\pm$ 3,09	3,93 $\pm$ 0,56	5,77 $\pm$ 3,37	4,50 $\pm$ 0,22
<b>İleum</b>	11,50 $\pm$ 1,26	4,01 $\pm$ 0,66	4,33 $\pm$ 0,48	2,88 $\pm$ 0,55
<b>Kolon</b>	7,86 $\pm$ 2,69	5,09 $\pm$ 0,80	10,50 $\pm$ 3,15	2,07 $\pm$ 0,09



**Şekil 4.18.** Repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

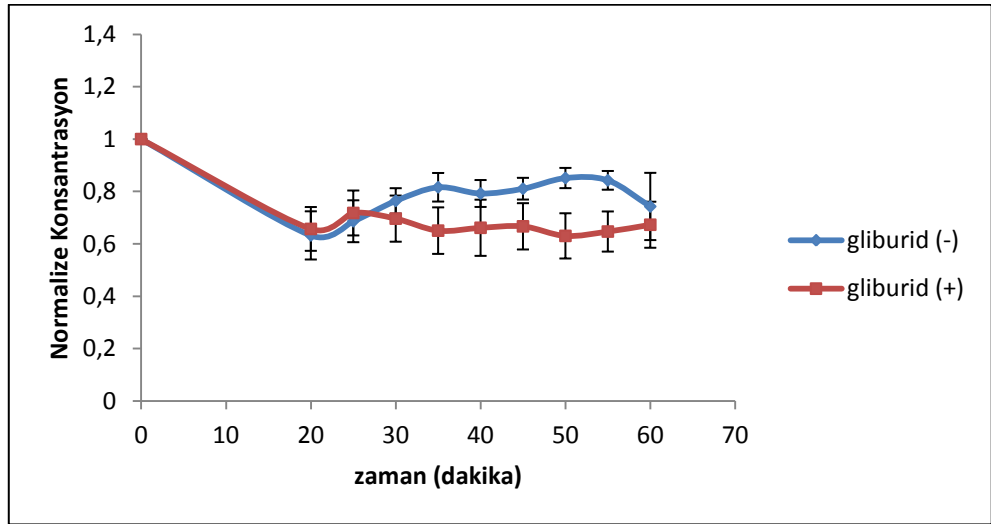
Metformin hidroklorür ve repaglinidin birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarından elde edilen permeabilite değerleri Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile karşılaştırıldığında repaglinidin metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan permeabilitesinde anlamlı derecede azalmaya neden olduğu bulunmuştur

( $p < 0,05$ ). Ayrıca, repaglinidin metoprolol tartaratin tüm bağırsak segmentlerinden (jejunum, ileum ve kolon) permeabilitesinde anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir ( sırasıyla  $p < 0,05$ ).

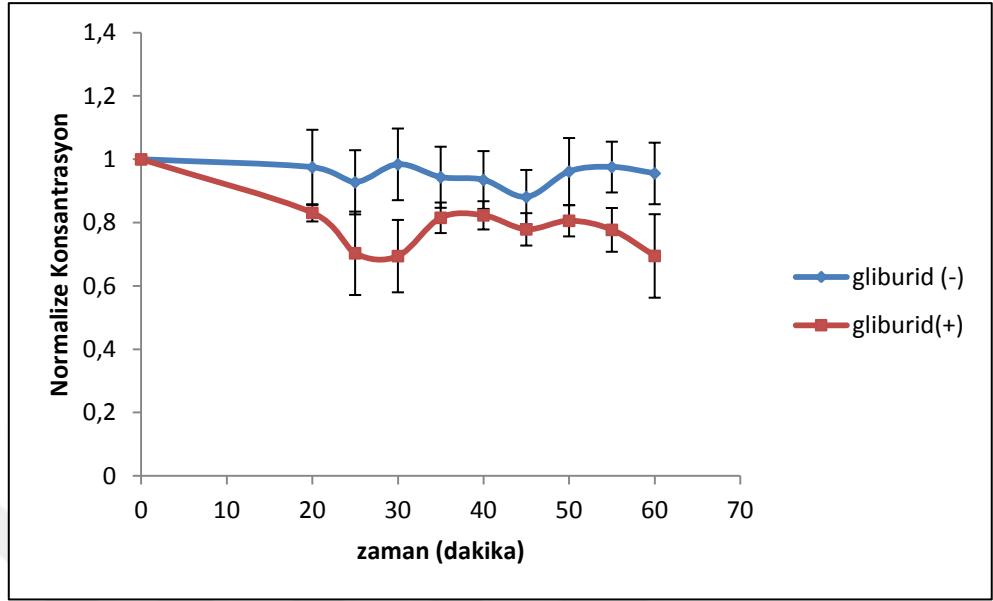
- **Grup 4 (Metformin Hidroklorür+Gliburid)**

Gliburidin metformin hidroklorür ile birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.19'da verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri Tablo 4.15'de özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

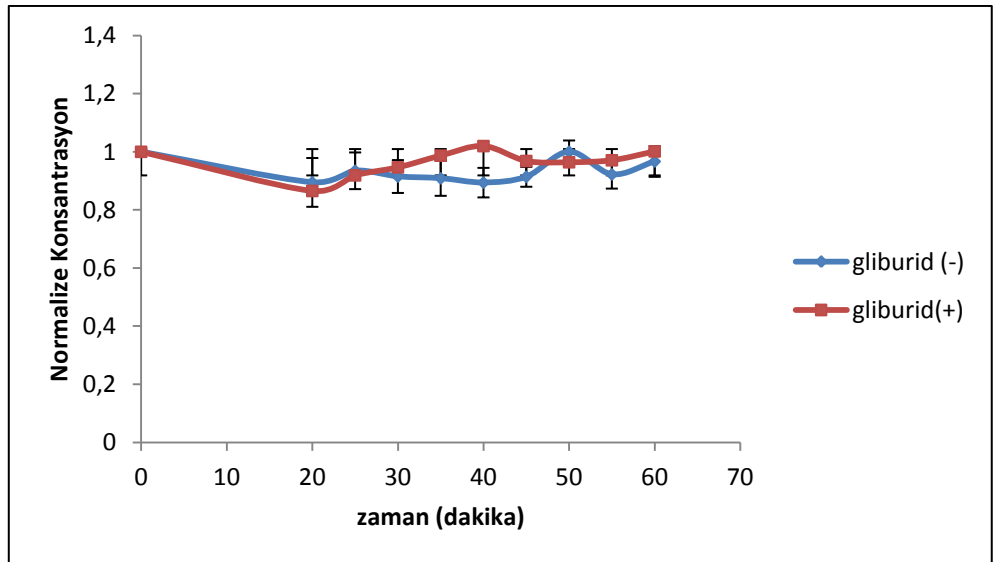
A)



(B)



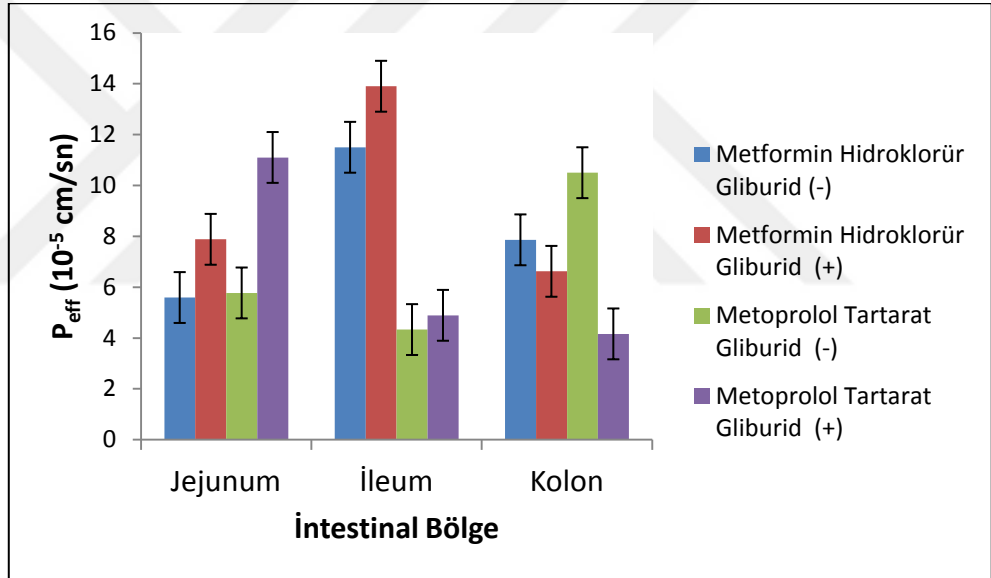
(C)



**Şekil 4.19.** Kontrol grubunda gliburid kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): gliburid yok; (+):gliburid var].

**Tablo 4.15.** Gliburid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Gliburid (+)	Kontrol	Gliburid (+)
Jejunum	5,59 $\pm$ 3,09	7,88 $\pm$ 3,14	5,77 $\pm$ 3,37	11,10 $\pm$ 0,35
İleum	11,50 $\pm$ 1,26	13,90 $\pm$ 3,58	4,33 $\pm$ 0,48	4,89 $\pm$ 0,34
Kolon	7,86 $\pm$ 2,69	6,62 $\pm$ 2,94	10,50 $\pm$ 3,15	4,16 $\pm$ 1,60



**Şekil 4.20.** Gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

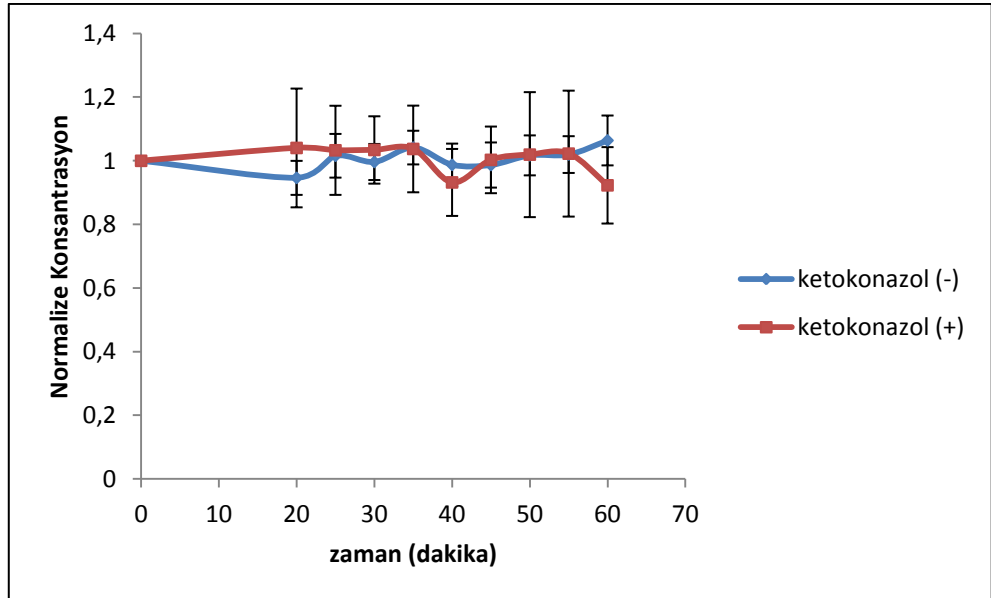
Metformin hidroklorür ve gliburidin birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarından elde edilen permeabilite değerleri (Tablo 4.15) Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile karşılaştırıldığında metformin hidroklorürün tüm segmentlerden permeabiliteleri üzerine gliburidin etkisinin istatistiksel açıdan önemsiz olduğu gözlenmiştir (sırasıyla  $p>0,05$ ).

Gliburidin perfüzyon ortamına eklenmesiyle metoprolol tartaratin jejunumdan permeabilitesi önemli derecede artarken ( $p<0,05$ ) kolondan permeabilitesi azalmıştır ( $p<0,05$ ). Ancak metoprolol tartaratin ileumdan permeabilitesi üzerine gliburidin etkisinin olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

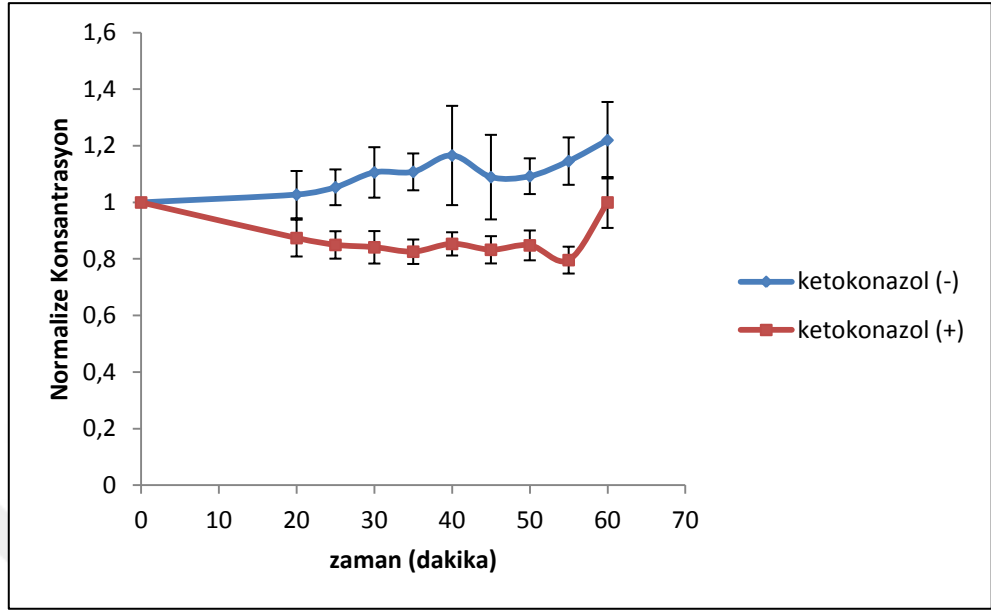
- **Grup 5 (Metformin Hidroklorür+Gliburid+Ketokonazol)**

Metformin hidroklorür, gliburid ve ketokonazol (CYP3A4 inhibitörü)'ün birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.21'de verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için hesaplanan permeabilite değerleri Tablo 4.16'da özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

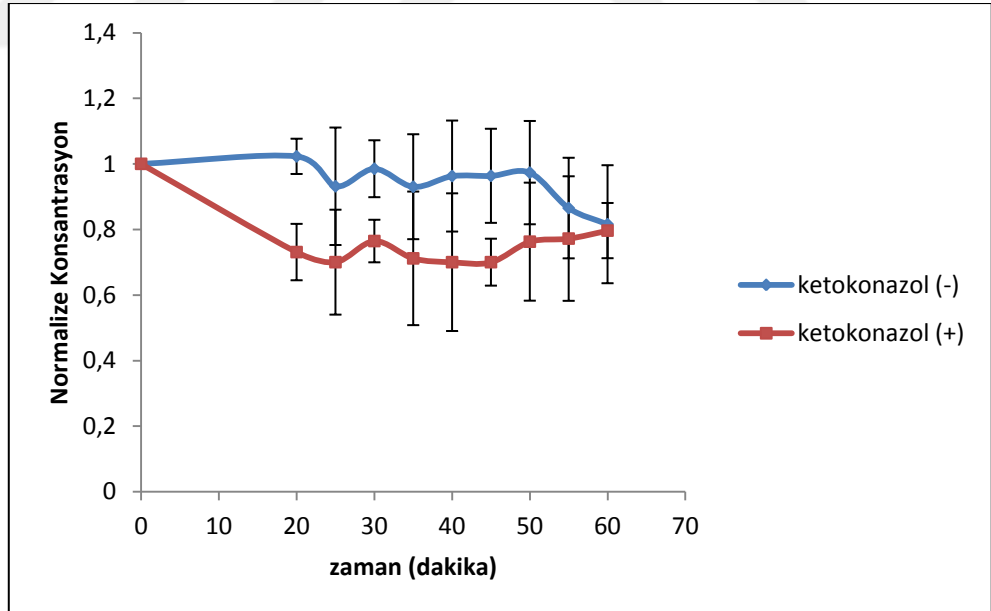
(A)



(B)



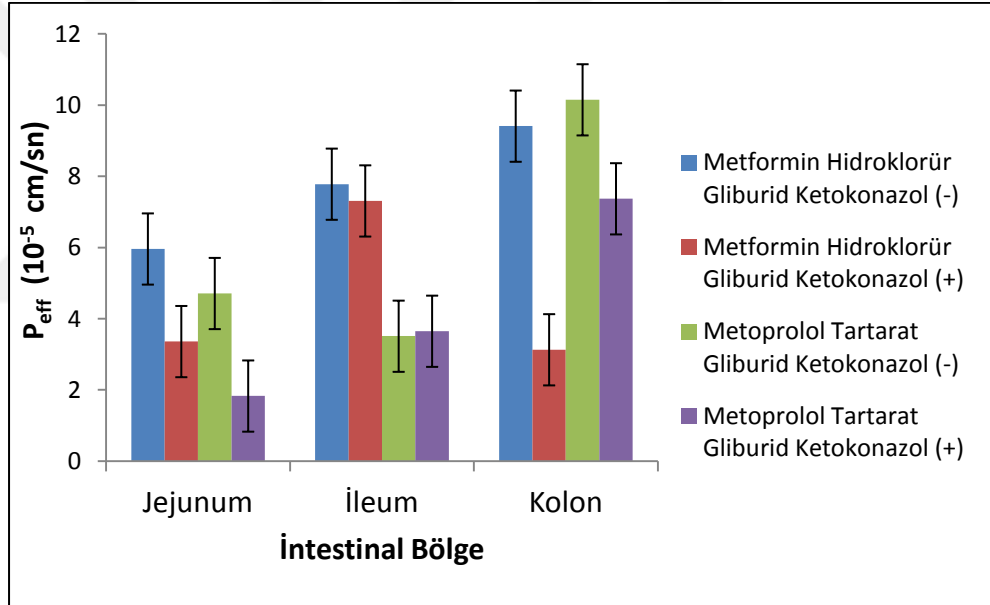
(C)



Şekil 4.21. Kontrol grubunda gliburid ve ketokonazol kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): ketokonazol yok; (+):ketokonazol var].

**Tablo 4.16.** Gliburid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Gliburid(+)	Gliburid(+) Ketokonazol(+)	Gliburid(+)	Gliburid(+) Ketokonazol(+)
Jejunum	5,96 $\pm$ 0,35	3,36 $\pm$ 0,51	4,71 $\pm$ 0,37	1,83 $\pm$ 0,39
İleum	7,78 $\pm$ 0,34	7,31 $\pm$ 0,95	3,51 $\pm$ 0,37	3,65 $\pm$ 0,56
Kolon	9,41 $\pm$ 0,44	3,13 $\pm$ 0,36	10,15 $\pm$ 0,32	7,37 $\pm$ 0,10



**Şekil 4.22.** Gliburid ve ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Metformin hidroklorür, gliburid ve ketokonazolün birlikte kullanıldığı çalışmalardan elde edilen permeabilite değerleri Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılarak incelenmiştir. Metformin hidroklorür ve gliburid içeren perfüzyon ortamına ketokonazol ilave edildiğinde metforminin permeabilitesi jejunumda 0,56



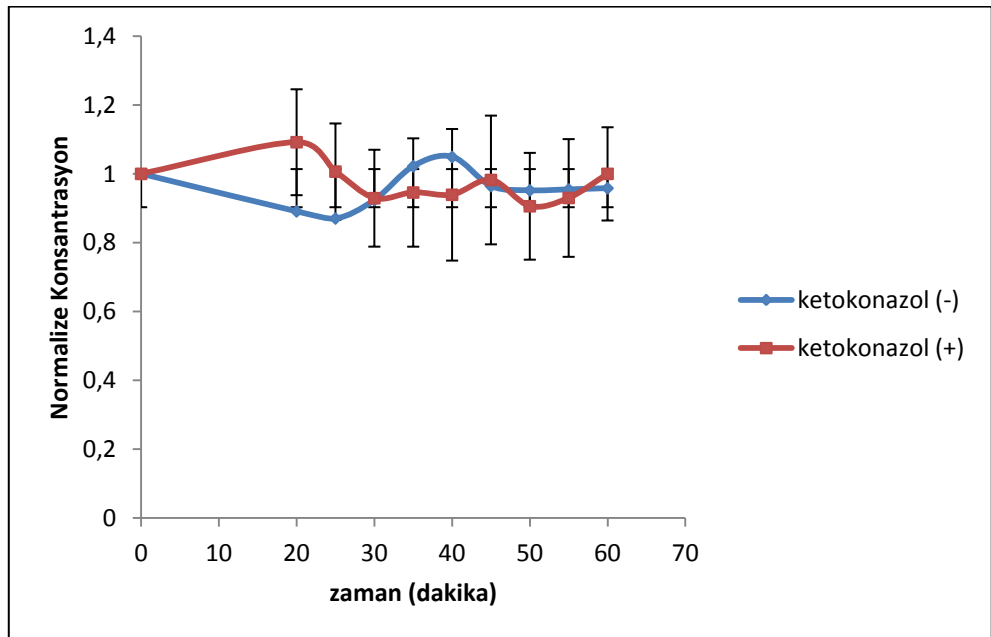
kat, kolonda ise 0,33 kat azalmış ve bu azalmalar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İleumda ise metformin hidroklorürün permeabilitesi ketokonazol ilavesinden anlamlı derecede etkilenmemiştir ( $p>0,05$ ).

Aynı koşullar altında metoprolol tartaratin permeabilitesi jejunumda 0,38 kat azalmıştır ( $p<0,05$ ). Metoprolol tartaratin ileum ve kolondaki permeabiliteyi ise, ketokonazol ilavesinden anlamlı derecede etkilenmemiştir ( $p>0,05$ ).

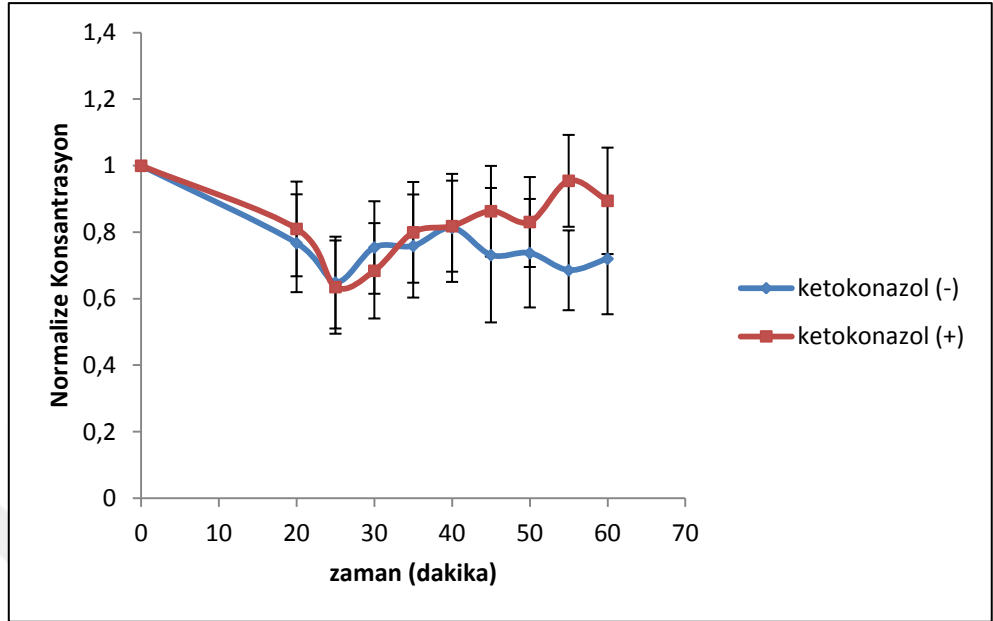
- **Grup 6 (Metformin Hidroklorür+Repaglinid+Ketokonazol)**

Metformin hidroklorür, repaglinid ve ketokonazol (CYP3A4 inhibitörü)'ün birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.23'de verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen permeabilite değerleri Tablo 4.17'de özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.24'de gösterilmiştir.

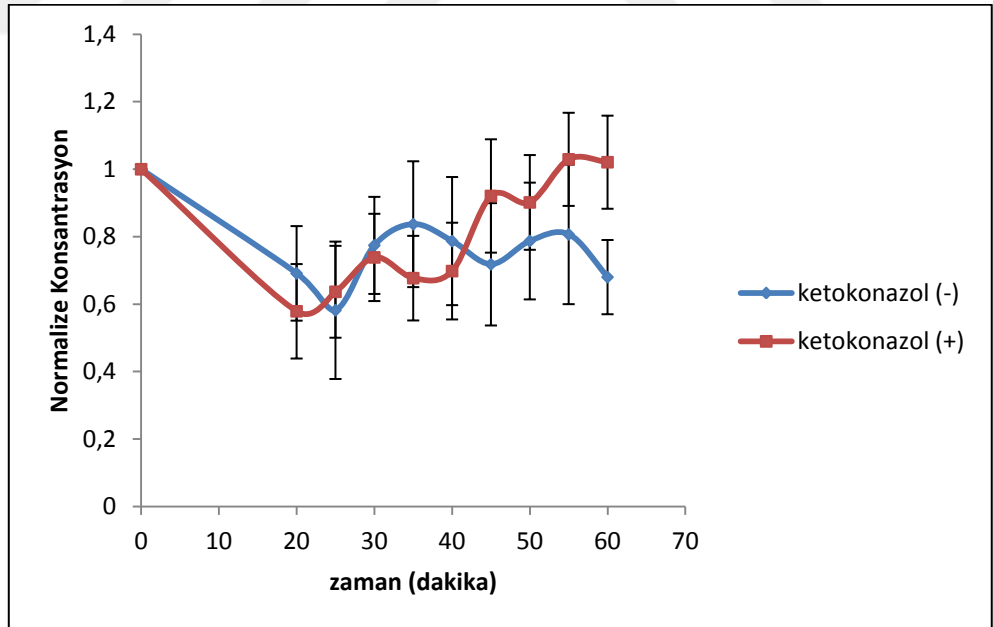
(A)



(B)



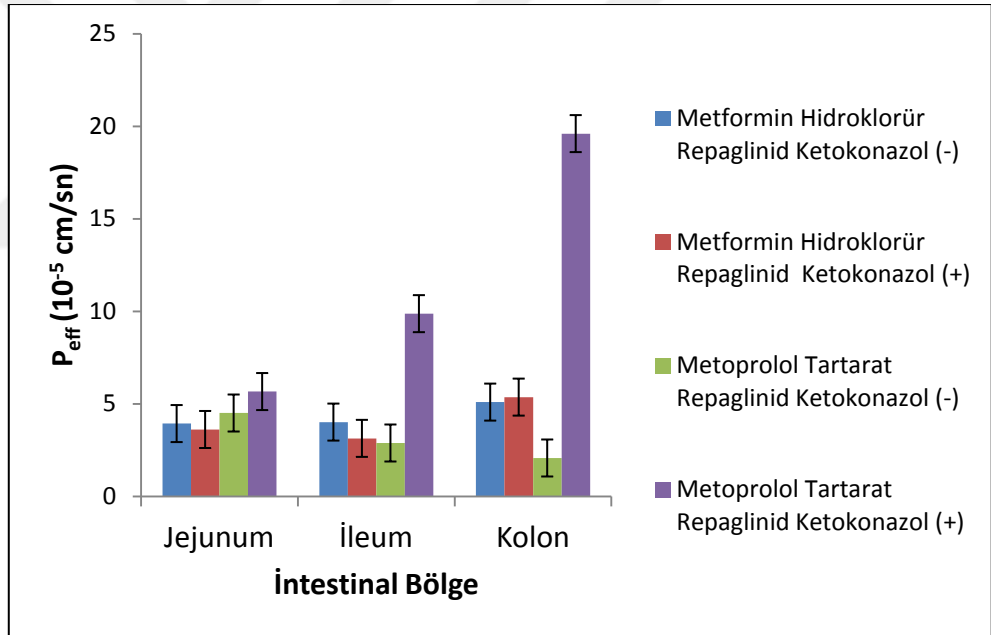
(C)



**Şekil 4.23.** Kontrol grubunda repaglinid ve ketokonazol kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): ketokonazol yok; (+):ketokonazol var].

**Tablo 4.17.** Repaglinid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Repaglinid (+)	Repaglinid(+) Ketokonazol(+)	Repaglinid (+)	Repaglinid(+) Ketokonazol(+)
Jejunum	3,93 $\pm$ 0,56	3,61 $\pm$ 1,01	4,50 $\pm$ 0,22	5,66 $\pm$ 0,37
İleum	4,01 $\pm$ 0,66	3,13 $\pm$ 0,46	2,88 $\pm$ 0,55	9,87 $\pm$ 0,58
Kolon	5,09 $\pm$ 0,80	5,36 $\pm$ 0,87	2,07 $\pm$ 0,09	19,60 $\pm$ 0,11



**Şekil 4.24.** Repaglinid ve ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Metformin hidroklorür ve repaglinid içeren perfüzyon çözeltisine ketokonazol ilavesiyle metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan permeabilitesi anlamlı derecede değişmemiştir ( $p>0,05$ ). Aynı koşullar altında ketokonazol

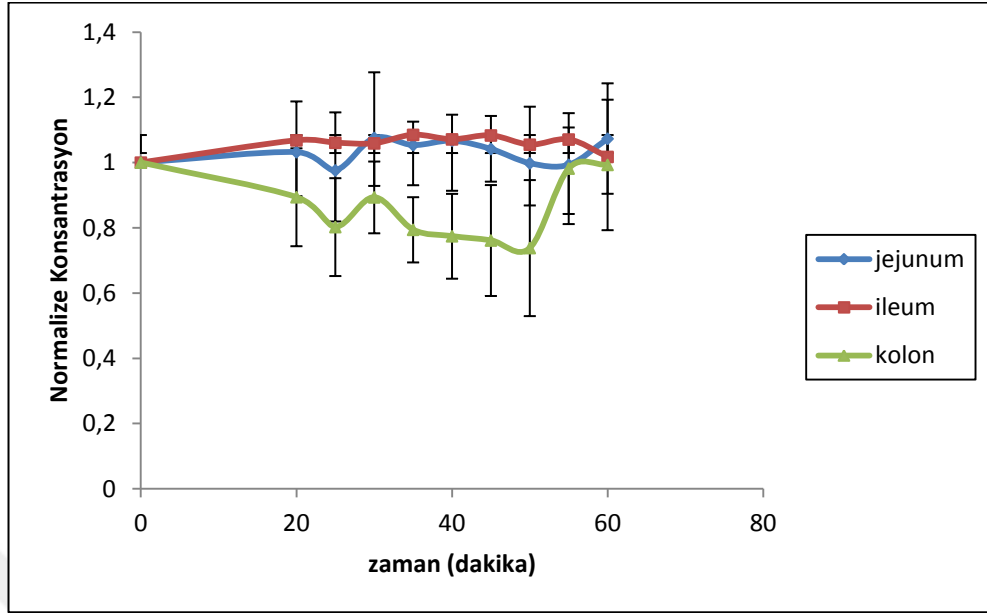
ilavesiyle metoprolol tartaratin permeabilitesi ise her üç segmentte de anlamlı derecede artmıştır ( $p<0,05$ ).

#### 4.4.2. Diyabet Grubuna Ait Bulgular

Streptozotosin ve nikotinamid kullanılarak Tip 2 diyabet geliştirilen sıçanlarda metformin hidroklorürün farklı bağırsak segmentlerinden permeabilitesini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar ve bu çalışmalardan elde edilen bulgular altı grup altında incelenmiştir.

- **Grup 1 (Metformin Hidroklorür)**

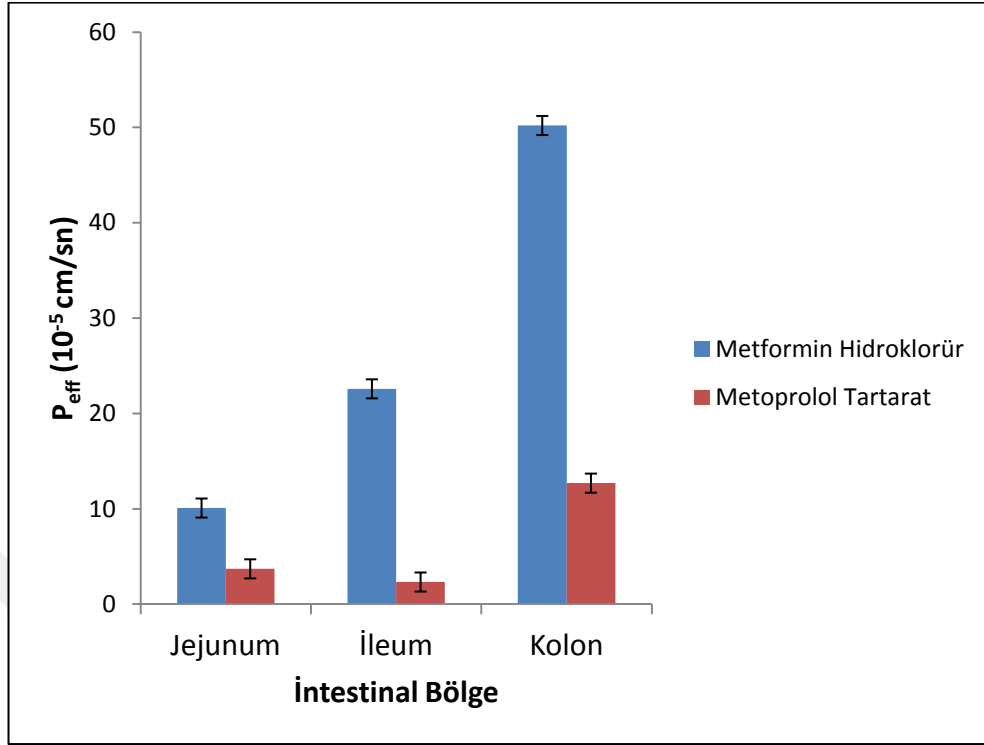
Herhangi bir inhibitör veya kombine kullanılan etkin maddelerin olmadığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.25’de verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için hesaplanan permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) Tablo 4.18’ de özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.26’da gösterilmiştir.



**Şekil 4.25.** Diyabetli sıçanlarda jejunum, ileum ve kolonun metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri.

**Tablo 4.18.** Diyabet grubunda metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)	
	Metformin Hidroklorür	Metoprolol Tartarat
Jejunum	10,09 $\pm$ 0,37	3,71 $\pm$ 0,57
İleum	22,59 $\pm$ 1,11	2,33 $\pm$ 0,54
Kolon	50,21 $\pm$ 0,19	12,70 $\pm$ 0,92



**Şekil 4.26.** Diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama±SS; n=6).

Diyabet grubunda yapılan çalışmalar (Grup 1) metformin hidroklorürün bağırsaklardan absorpsiyonunun en yüksek olduğu segmentin kolon ve en düşük olduğu segmentin ise jejunum olduğunu göstermiştir (Tablo 4.18). Jejunum-ileum arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızken ( $p>0,05$ ), jejunum-kolon ve ileum-kolon arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

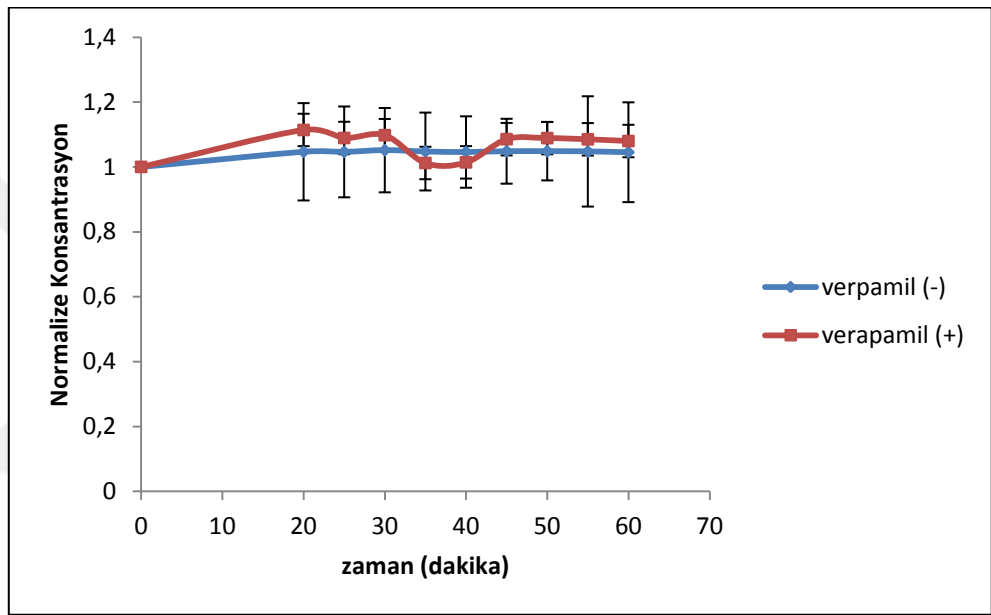
Metoprolol tartaratın permeabilitesi ileumdan ( $2,33 \pm 0,54 \times 10^{-5}$  cm/s) kolona ( $12,7 \pm 3,15 \times 10^{-5}$  cm/sn) doğru artış göstermiştir (Tablo 4.18). Segmentler arasındaki permeabilite farkı jejunum-kolon ve ileum-kolon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $p<0,05$ ), jejunum-ileum arasındaki fark anlamsız bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

- **Grup 2 (Metformin Hidroklorür+Verapamil)**

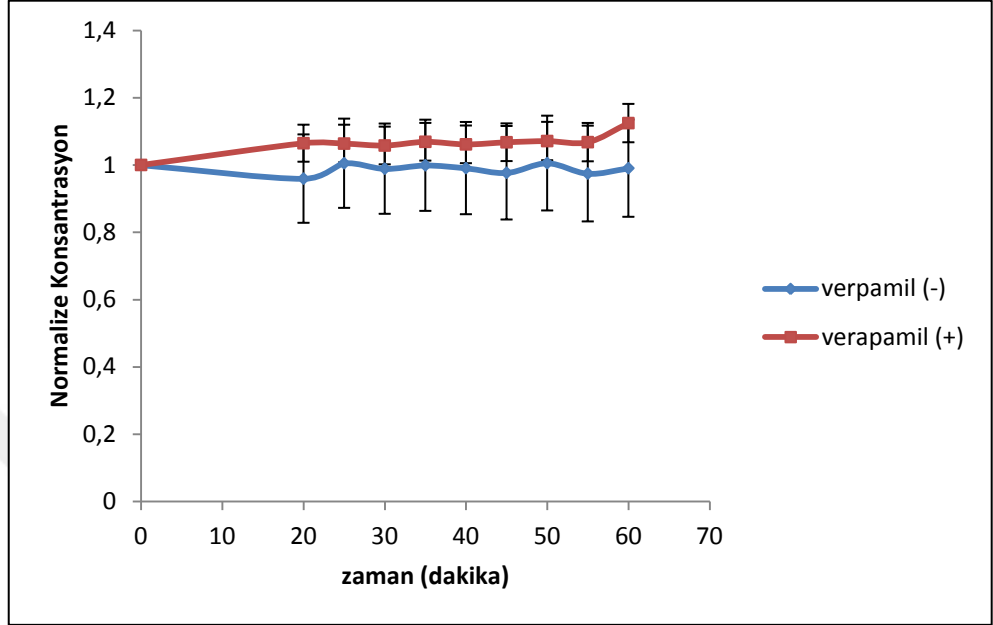
Verapamilin PMAT inhibitörü olarak kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu

olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.27'de verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için hesaplanan permeabilite değerleri Tablo 4.19'da özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.28'de gösterilmiştir.

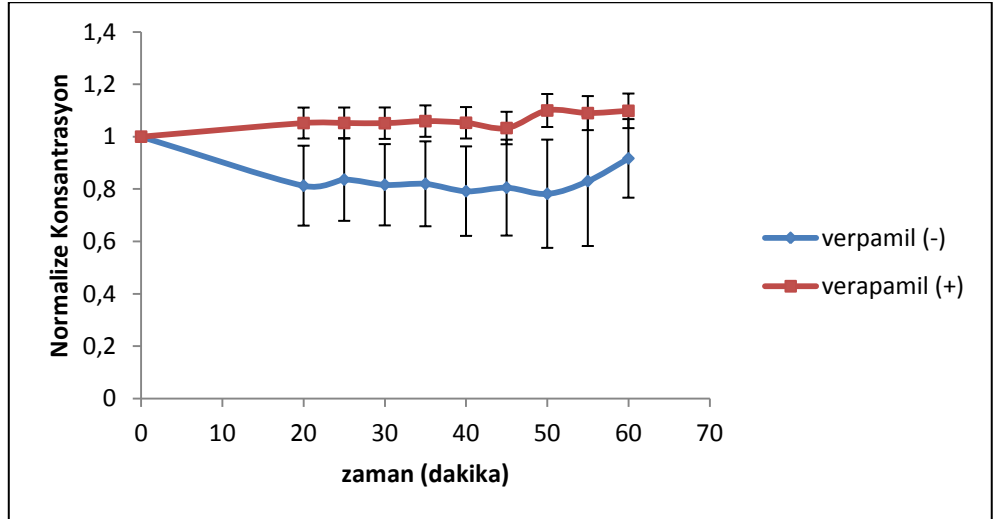
(A)



(B)



(C)

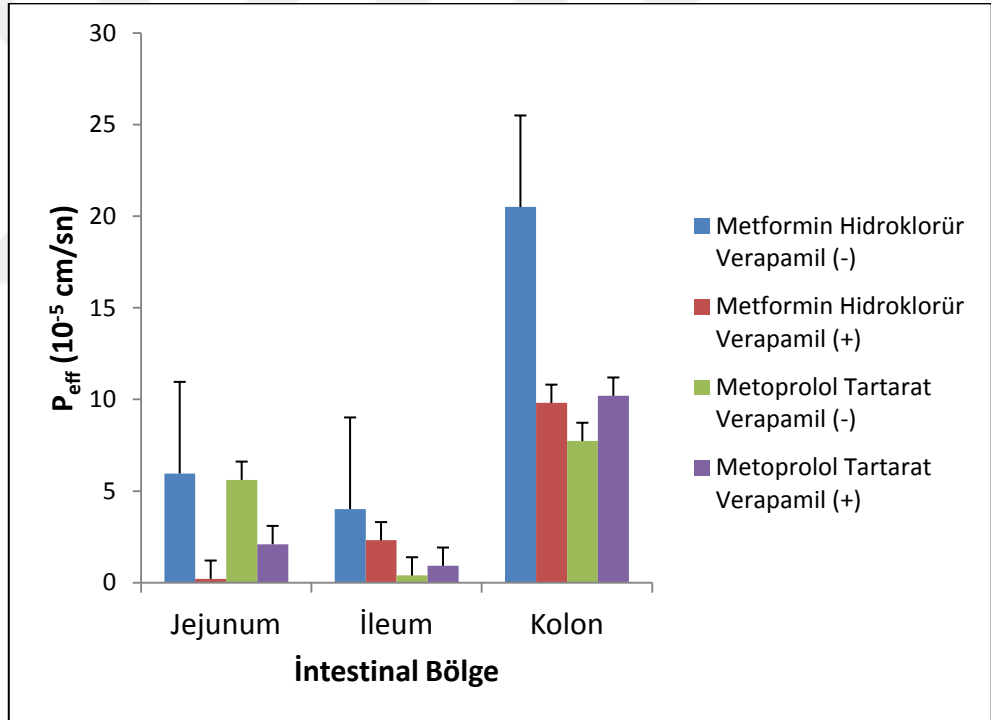


**Şekil 4.27.** Diyabet grubunda PMAT inhibitörü olarak verapamil kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): verapamil yok; (+):verapamil var].



**Tablo 4.19.** Diyabet grubunda verapamil yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Verapamil (+)	Kontrol	Verapamil (+)
Jejunum	5,96 $\pm$ 0,35	0,21 $\pm$ 0,66	5,61 $\pm$ 0,17	2,10 $\pm$ 0,23
İleum	4,02 $\pm$ 0,13	2,31 $\pm$ 0,30	0,39 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,21
Kolon	20,50 $\pm$ 0,13	9,81 $\pm$ 0,10	7,73 $\pm$ 0,70	10,20 $\pm$ 0,25



**Şekil 4.28.** Verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

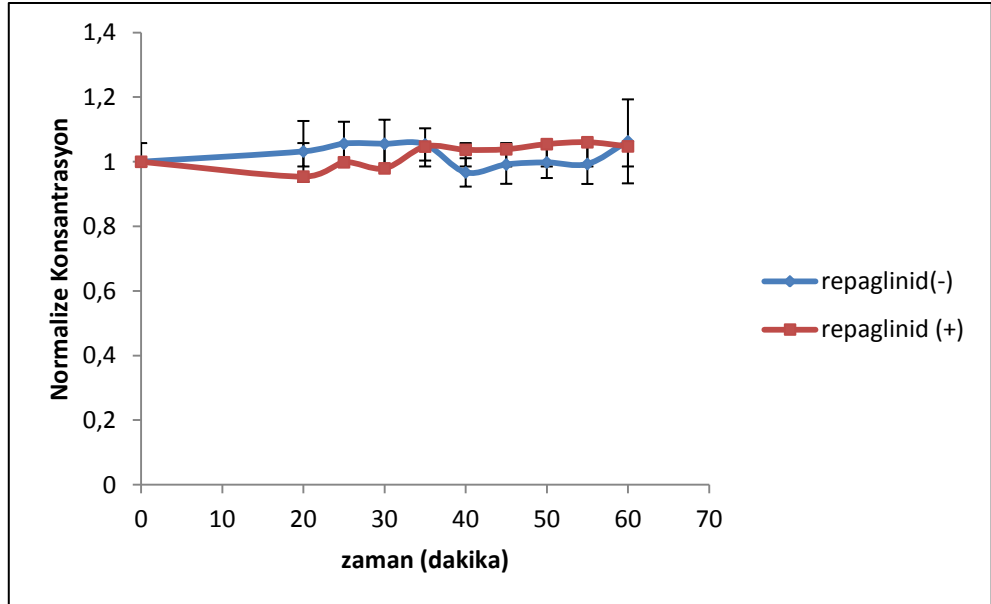
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile yapılan analizler, diyabetli grupta yapılan çalışmada verapamilin jejunum, ileum ve kolonda metformin hidroklorürün

permeabilitesi üzerine etkisinin istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu göstermiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca, metoprolol tartaratin permeabilitesi verapamil varlığında jejunumda 0.37 kat azalırken ( $p<0,05$ ), metoprolol tartaratin jejunumdan permeabilitesi anlamlı derecede artmış ( $p<0,05$ ) ancak kolondaki artış anlamlı bulunamamıştır ( $p<0,05$ ).

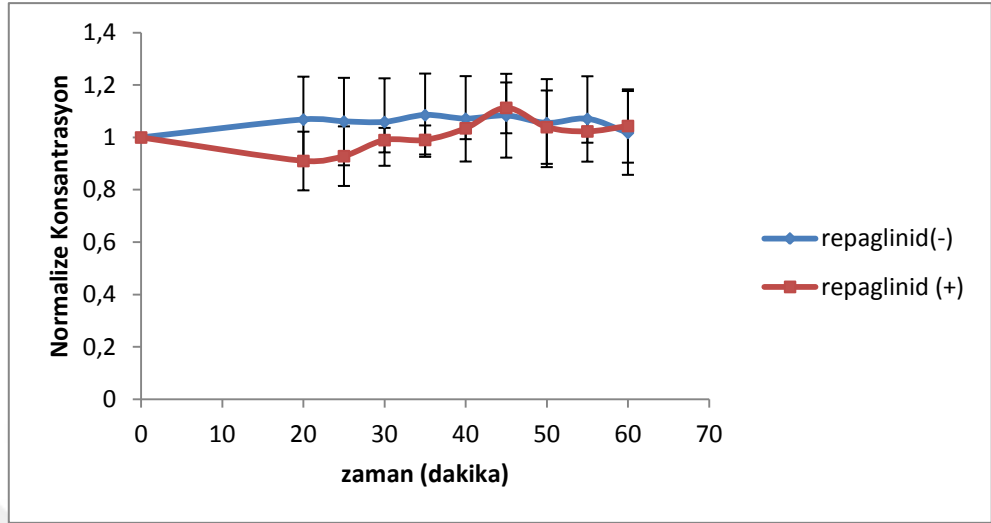
- **Grup 3 (Metformin Hidroklorür+Repaglinid)**

Repaglinidin metformin hidroklorür ile birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.29'da verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için hesaplanan permeabilite değerleri Tablo 4.20'de özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.30'da gösterilmiştir.

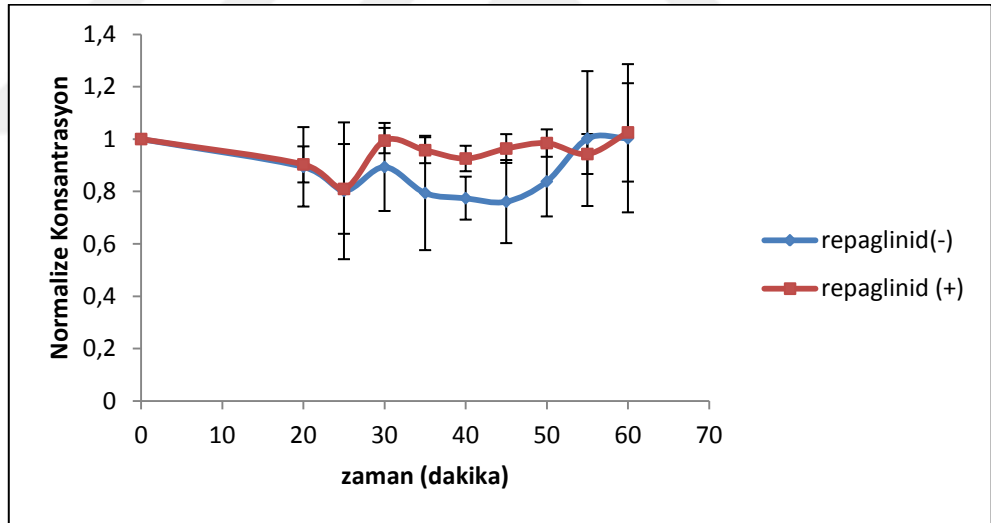
(A)



(B)



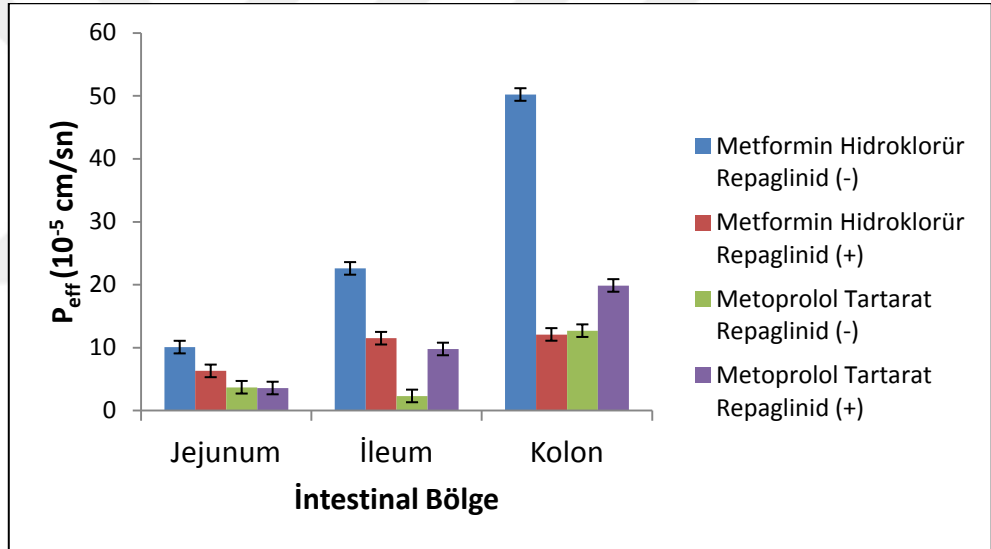
(C)



**Şekil 4.29.** Diyabet grubunda repaglinid kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): repaglinid yok; (+):repaglinid var].

**Tablo 4.20.** Diyabet grubunda repaglinid yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Repaglinid (+)	Kontrol	Repaglinid (+)
Jejunum	10,09 $\pm$ 0,37	6,31 $\pm$ 0,37	3,71 $\pm$ 0,57	3,59 $\pm$ 0,53
İleum	22,59 $\pm$ 1,11	11,50 $\pm$ 0,68	2,33 $\pm$ 0,54	9,79 $\pm$ 0,99
Kolon	50,21 $\pm$ 0,19	12,10 $\pm$ 0,76	12,70 $\pm$ 0,92	19,88 $\pm$ 0,21



**Şekil 4.30.** Repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

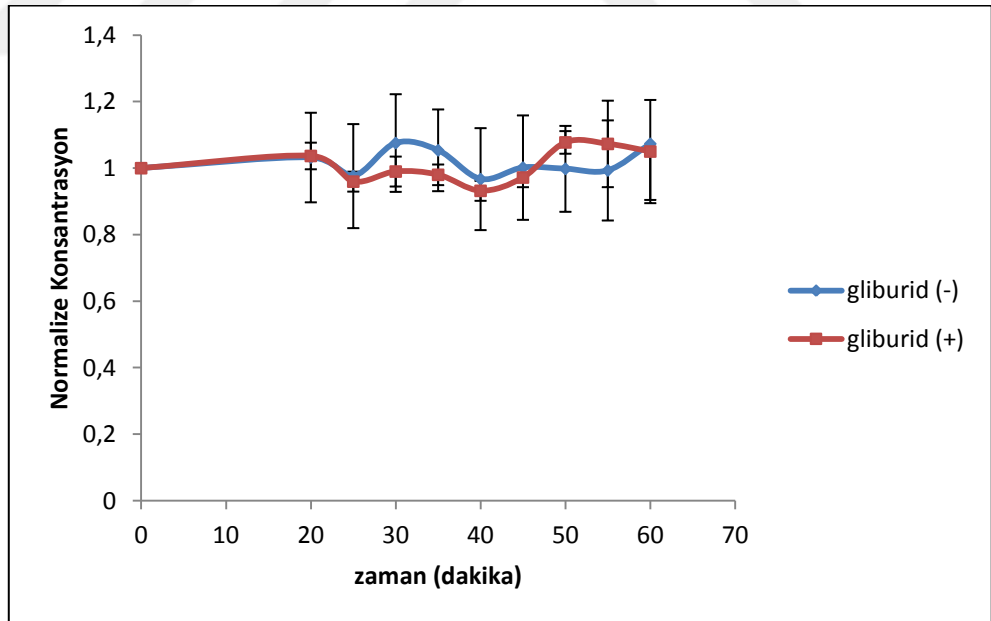
Diyabet grubunda, metformin hidroklorür ve repaglinidin birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarından elde edilen bulgular Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile karşılaştırılmış ve jejunumdaki farkın istatistiksel açıdan anlamsız olduğu bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Ancak perfüzyon ortamına repaglinid ilave edildiğinde metformin hidroklorürün ileum ve kolondan permeabilitesi anlamlı derecede

azalmıştır ( $p<0,05$ ). Ayrıca, repaglinidin metoprolol tartaratin jejunum ve kolondan permeabilitesi üzerine etkisi istatistiksel açıdan anlamsız bulunurken ( $p>0,05$ ) ileumdan anlamlı derecede arttırdığı (Tablo 4.20,  $p<0,05$ ).

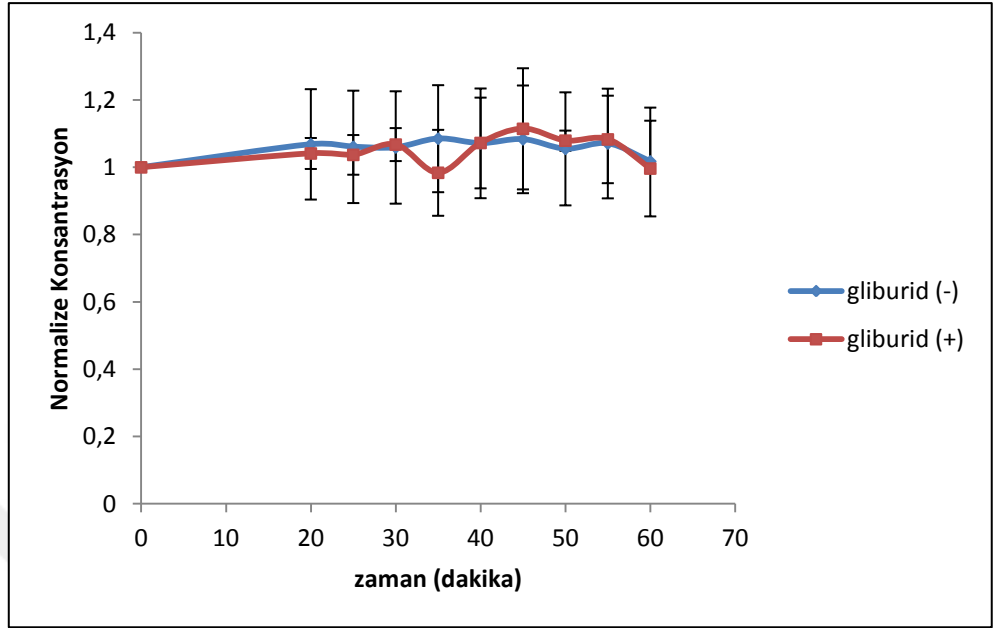
- **Grup 4 (Metformin Hidroklorür+Gliburid)**

Gliburidin metformin hidroklorür ile birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.31’de verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için hesaplanan permeabilite değerleri Tablo 4.21’de özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.32’de gösterilmiştir.

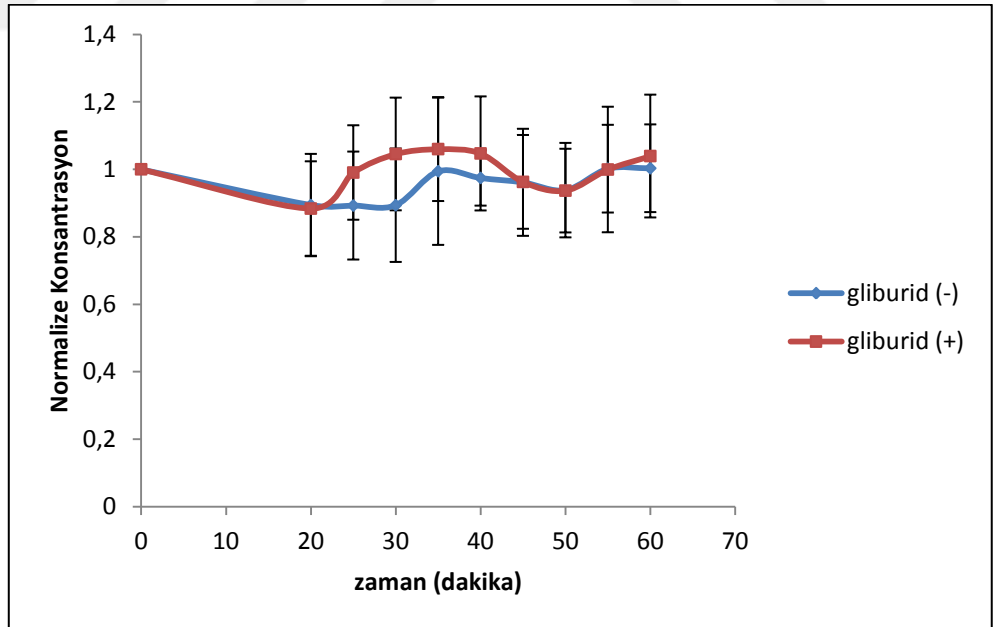
(A)



(B)



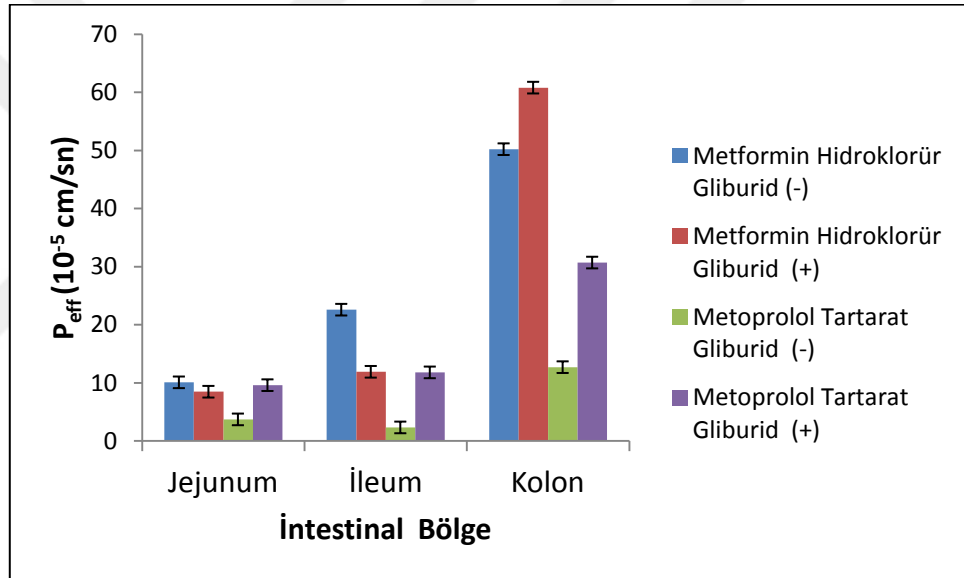
(C)



Şekil 4.31. Diyabet grubunda gliburid kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): gliburid yok; (+):gliburid var].

**Tablo 4.21.** Diyabet grubunda gliburid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Gliburid(+)	Kontrol	Gliburid (+)
Jejunum	10,09 $\pm$ 0,37	8,47 $\pm$ 1,99	3,71 $\pm$ 0,57	9,60 $\pm$ 0,18
İleum	22,59 $\pm$ 1,11	11,90 $\pm$ 1,32	2,33 $\pm$ 0,54	11,80 $\pm$ 0,12
Kolon	50,21 $\pm$ 0,19	60,80 $\pm$ 0,66	12,70 $\pm$ 0,92	30,70 $\pm$ 0,42



**Şekil 4.32.** Gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

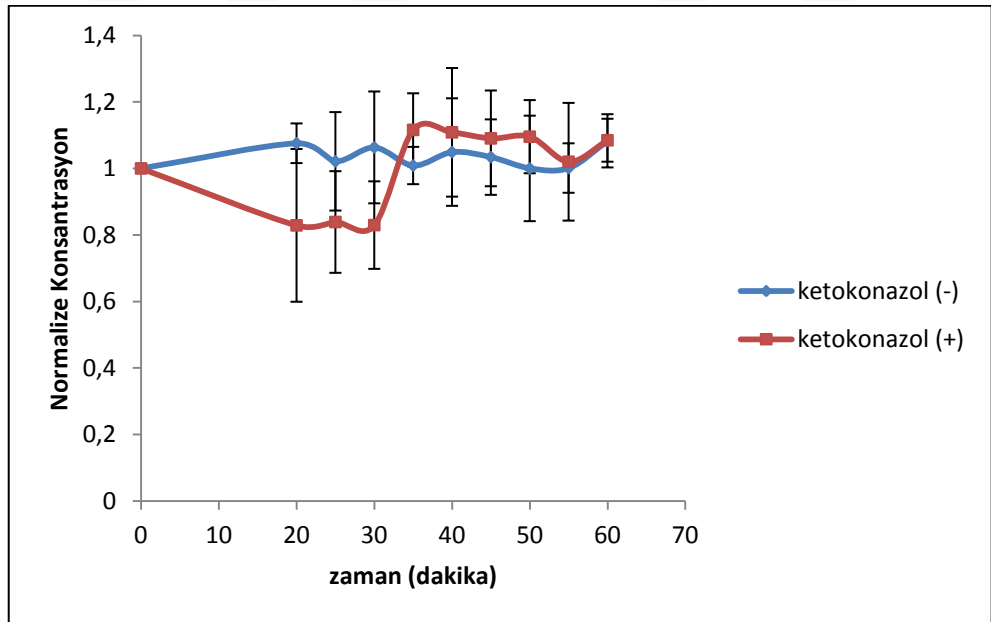
Metformin hidroklorür ve gliburidin birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarından elde edilen permeabilite değerleri (Tablo 4.21) Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile karşılaştırıldığında metformin hidroklorürün jejunumdan ve kolondan permeabilitesinde anlamlı bir fark yokken ( $p>0,05$ ), ileumdan permeabilitesinde anlamlı derecede bir azalma gözlenmiştir ( $p<0,05$ ).

Gliburidin perfüzyon ortamına eklenmesiyle metoprolol tartaratin jejunum, ileum ve kolondan permeabilitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

- **Grup 5 (Metformin Hidroklorür+Gliburid+Ketokonazol)**

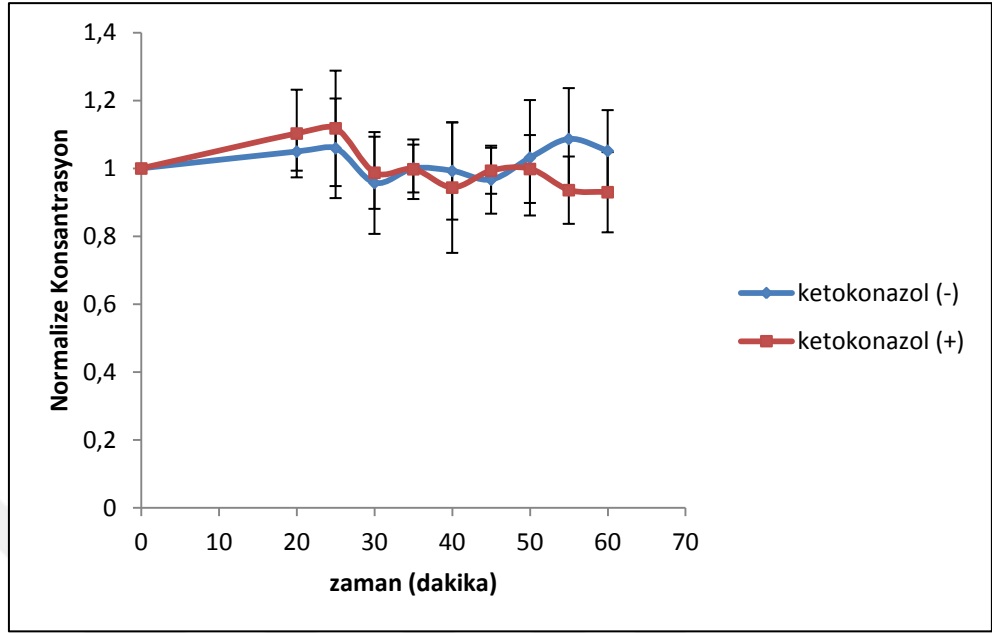
Diyabet grubunda metformin hidroklorür, gliburid ve ketokonazol (CYP3A4 inhibitörü)'ün birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.33'de verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için hesaplanan permeabilite değerleri Tablo 4.22'de özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.34'de gösterilmiştir.

(A)

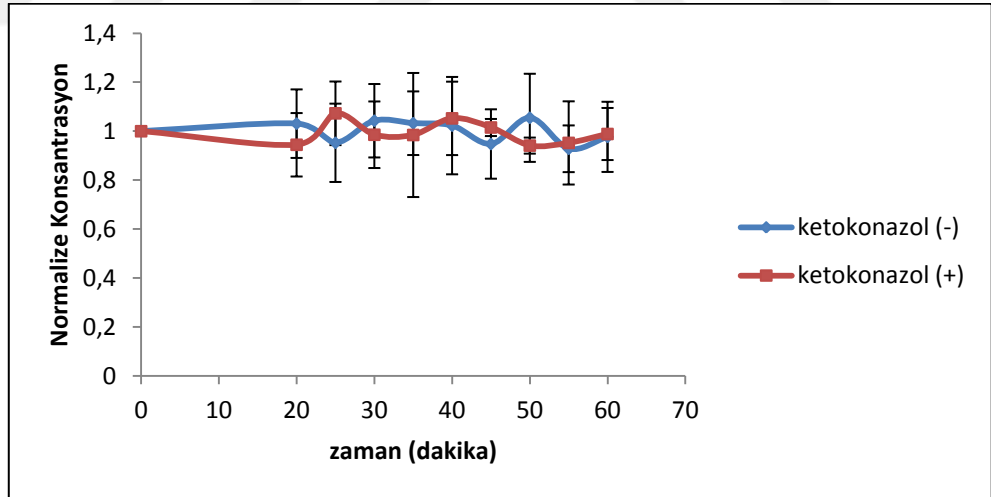




(B)



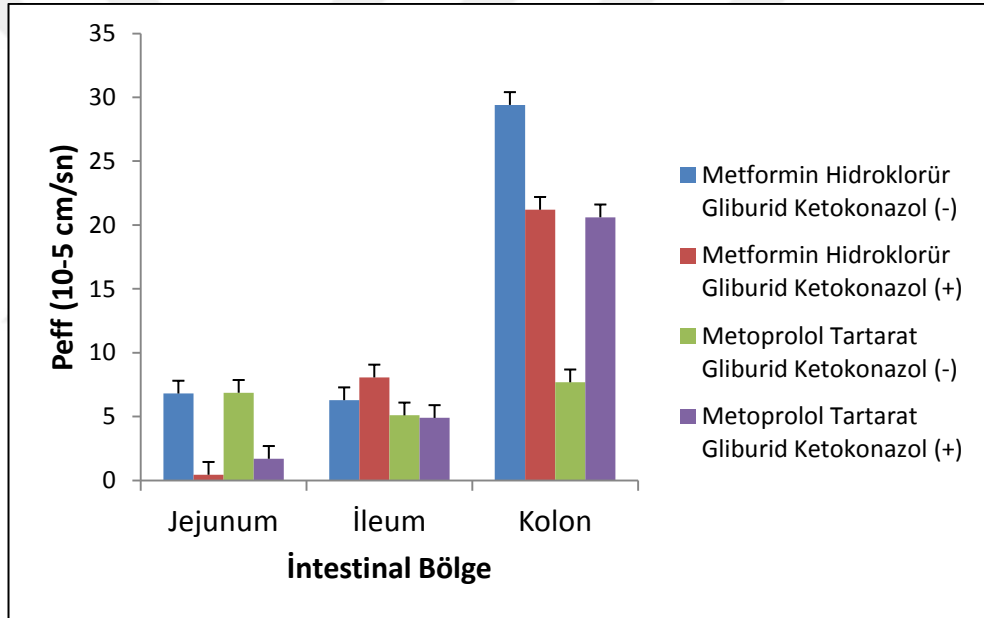
(C)



**Şekil 4.33.** Diyabet grubunda gliburid ve ketokonazol kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): ketokonazol yok; (+):ketokonazol var].

**Tablo 4.22.** Diyabet grubunda gliburid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Gliburid(+)	Gliburid(+) Ketokonazol(+)	Gliburid(+)	Gliburid(+) Ketokonazol(+)
<b>Jejunum</b>	6,81 $\pm$ 0,56	0,45 $\pm$ 0,67	6,87 $\pm$ 0,87	1,70 $\pm$ 0,14
<b>İleum</b>	6,29 $\pm$ 0,10	8,07 $\pm$ 0,10	5,10 $\pm$ 0,64	4,90 $\pm$ 0,78
<b>Kolon</b>	29,41 $\pm$ 0,11	21,20 $\pm$ 0,16	7,69 $\pm$ 0,84	20,61 $\pm$ 0,14



**Şekil 4.34.** Gliburid ve ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Diyabet grubunda, metformin hidroklorür, gliburid ve ketokonazolün birlikte kullanıldığı çalışmalardan elde edilen permeabilite değerleri Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile karşılaştırıldığında, ketokonazol ilavesiyle metformin hidroklorürün permeabilitesi jejunumda anlamlı derecede azalırken ( $p < 0,05$ ), ileum ve kolondaki

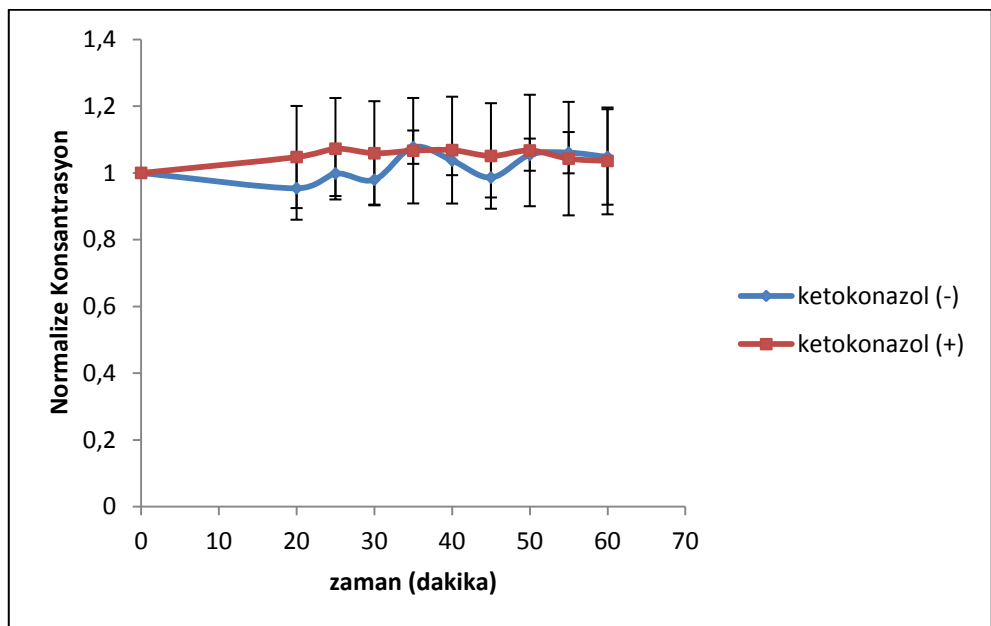
permeabilite değerlerinde gözlenen değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Ketokonazol ilavesiyle metoprolol tartaratın jejunumdan permeabilitesi anlamlı derecede azalırken, kolondan permeabilitesi anlamlı derecede artmıştır ( $p<0,05$ ). Metoprolol tartaratın ileumdan permeabilitesi ise ketokonazol ilavesinden anlamlı derecede etkilenmemiştir ( $p>0,05$ ).

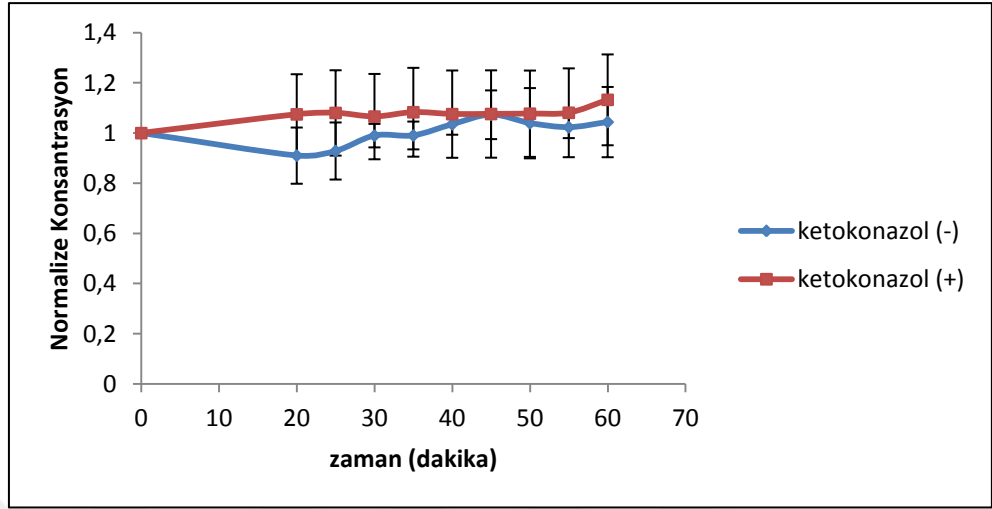
- **Grup 6 (Metformin Hidroklorür+Repaglinid+Ketokonazol)**

Diyabet grubunda metformin hidroklorür, repaglinid ve ketokonazol (CYP3A4 inhibitörü)'ün birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolon lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.35'te verilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için hesaplanan permeabilite değerleri Tablo 4.23'de özetlenmiş ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.36'da gösterilmiştir.

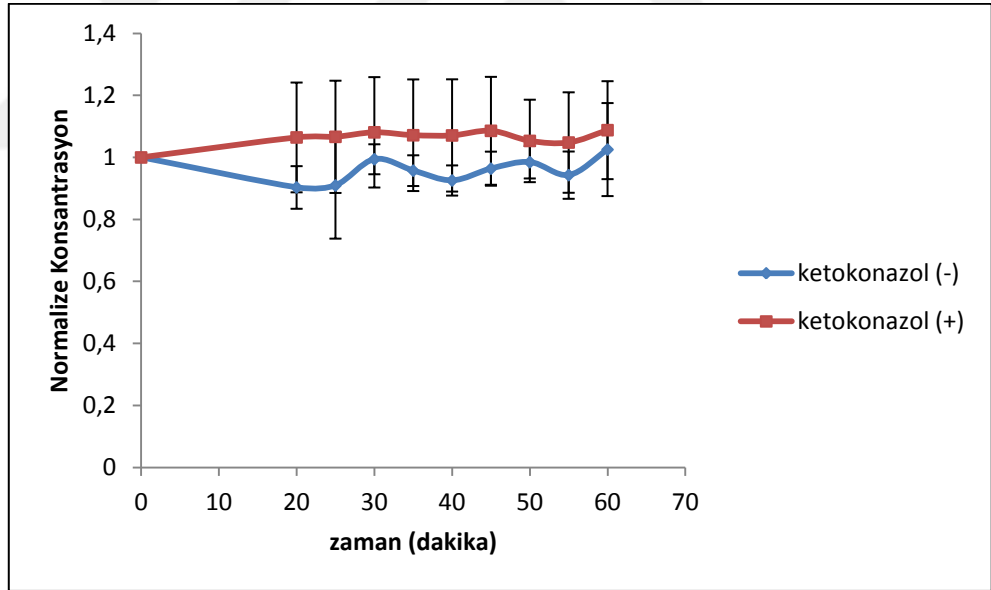
(A)



(B)



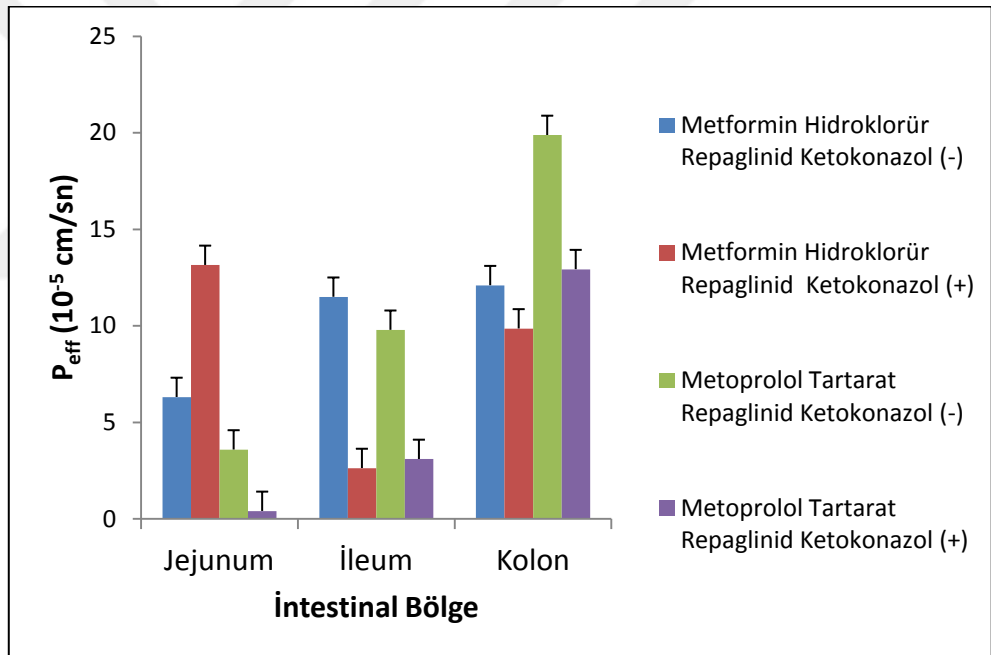
(C)



**Şekil 4.35.** Diyabet grubunda repaglinid ve ketokonazol kullanılan çalışmalarda jejunum (A), ileum (B) ve kolonun (C) metformin hidroklorür ile perfüzyonu sonucu elde edilen konsantrasyon-zaman profilleri [(-): ketokonazol yok; (+):ketokonazol var].

**Tablo 4.23.** Diyabet grubunda repaglinid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	$P_{eff}$ ( $10^{-5}$ cm/sn)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Repaglinid(+)	Repaglinid(+) Ketokonazol(+)	Repaglinid(+)	Repaglinid(+) Ketokonazol(+)
Jejunum	6,31 $\pm$ 0,37	13,15 $\pm$ 0,20	3,59 $\pm$ 0,53	0,41 $\pm$ 0,01
İleum	11,50 $\pm$ 0,68	2,63 $\pm$ 0,43	9,79 $\pm$ 0,99	3,10 $\pm$ 0,42
Kolon	12,10 $\pm$ 0,76	9,86 $\pm$ 1,10	19,88 $\pm$ 0,21	12,93 $\pm$ 0,21



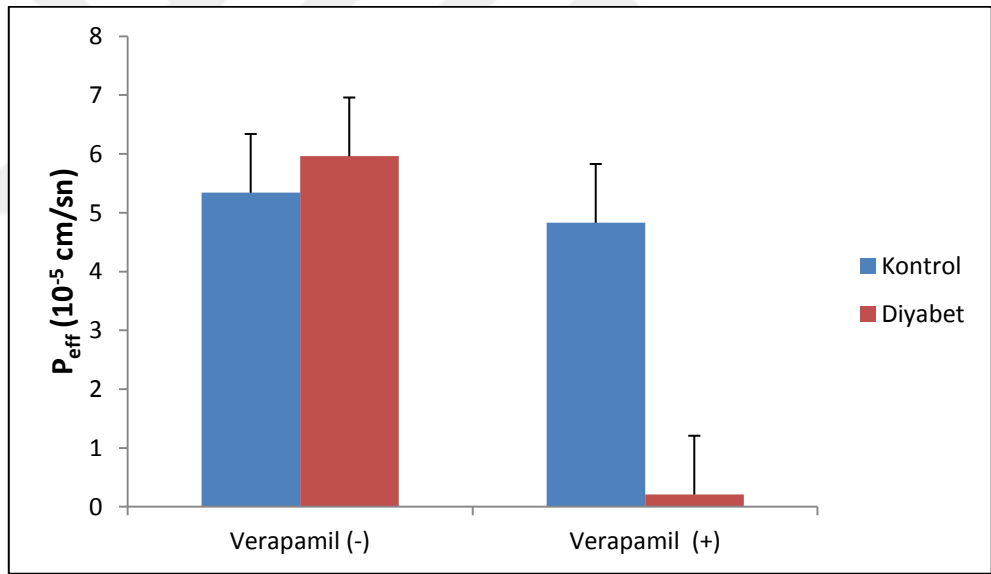
**Şekil 4.36.** Repaglinid ve ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) diyabetli sıçanların farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Diyabet grubunda, metformin hidroklorür ve repaglinid içeren perfüzyon çözeltisine ketokonazol ilave edildiğinde metformin hidroklorürün ileumdan permeabilitesi anlamlı derecede azalmıştır ( $p < 0,05$ ). Metformin hidroklorürün jejunum ve kolondan permeabilitesinde gözlenen farklar ise istatistiksel olarak

anlamli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Ketokonazol ilavesiyle metoprolol tartaratın jejunum ve ileumdan permeabilitesi anlamli derecede azalırken ( $p<0,05$ ) kolondaki azalma anlamli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

#### 4.4.3. Metformin Hidroklorürün Jejunumdan Permeabilitesine Ait Bulgular

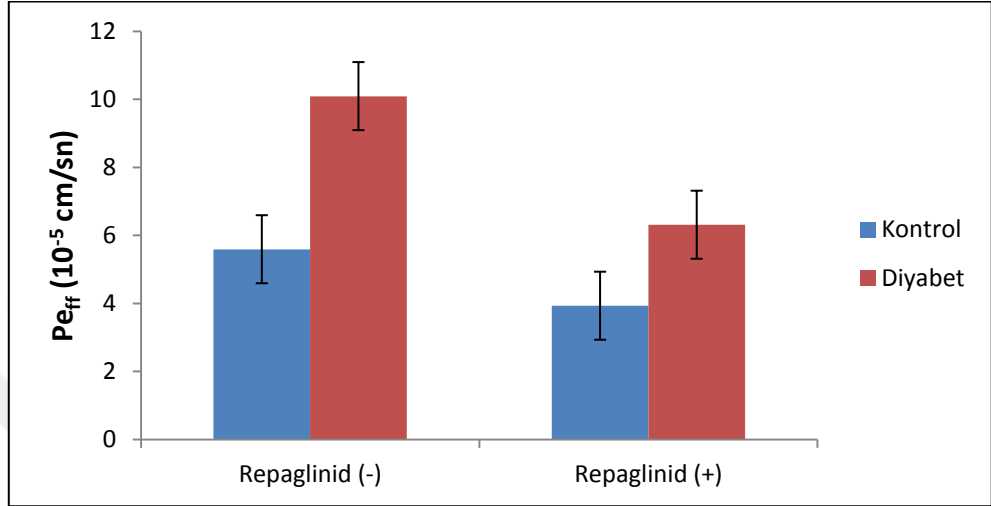
Farklı diyabet ilaçlarının (gliburid ve repaglinid), verapamilin (PMAT inhibitörü) ve ketokonazolün (CYP3A4 inhibitörü) metformin hidroklorürün kontrol ve diyabetli sıçanların jejunumundan permeabilitesi üzerine etkisi Şekil 4.37-4.41’de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. Kontrol ve diyabet gruplarında verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için jejunumdan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

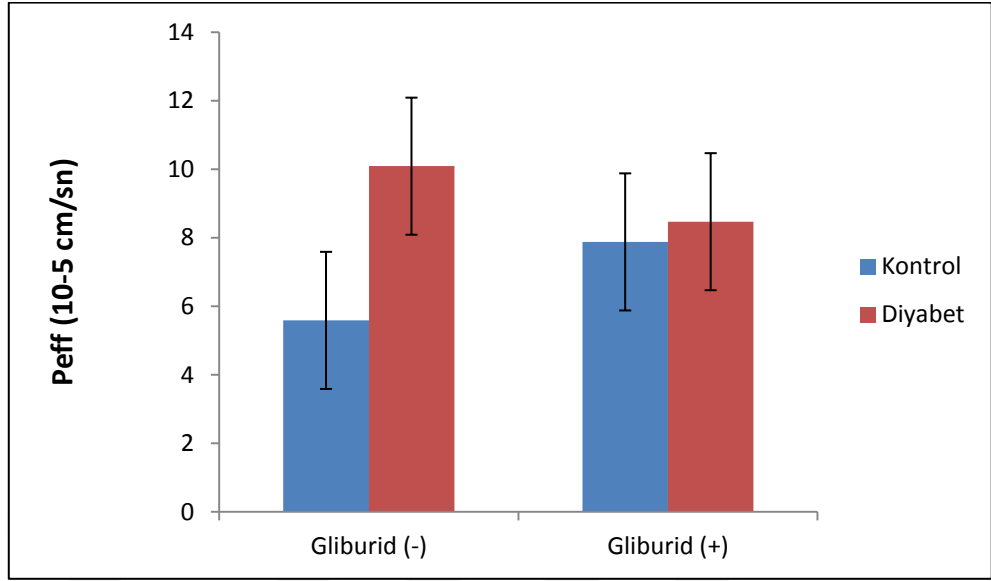
Metformin hidroklorürün diyabet ve kontrol gruplarının jejunumdan permeabilite değerleri karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız iken ( $p>0,05$ ), perfüzyon ortamına verapamil ilave edildiğinde metformin hidroklorürün diyabetli

sıçanların jejunumundan permeabilitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.38.** Kontrol ve diyabet gruplarında repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için jejunumda tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

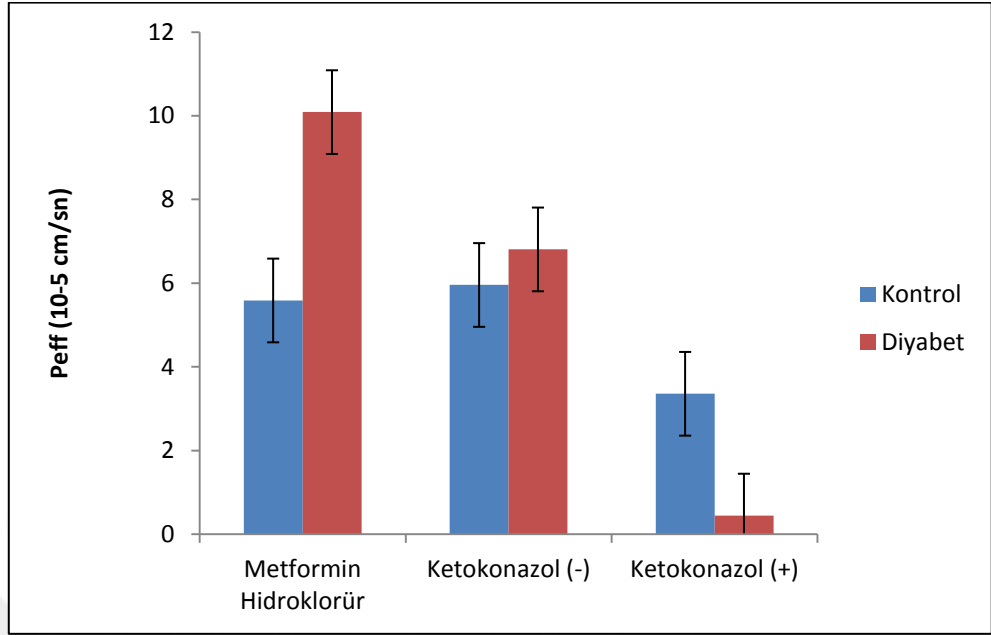
Metformin hidroklorürün kontrol ve diyabetli grupların jejunumundan tayin edilen permeabilite değerleri karşılaştırıldığında hem repaglinid yokluğunda hem de repaglinid varlığında diyabetli gruplarda gözlenen permeabilite artışı anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.39.** Kontrol ve diyabet gruplarında gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için jejunumda tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

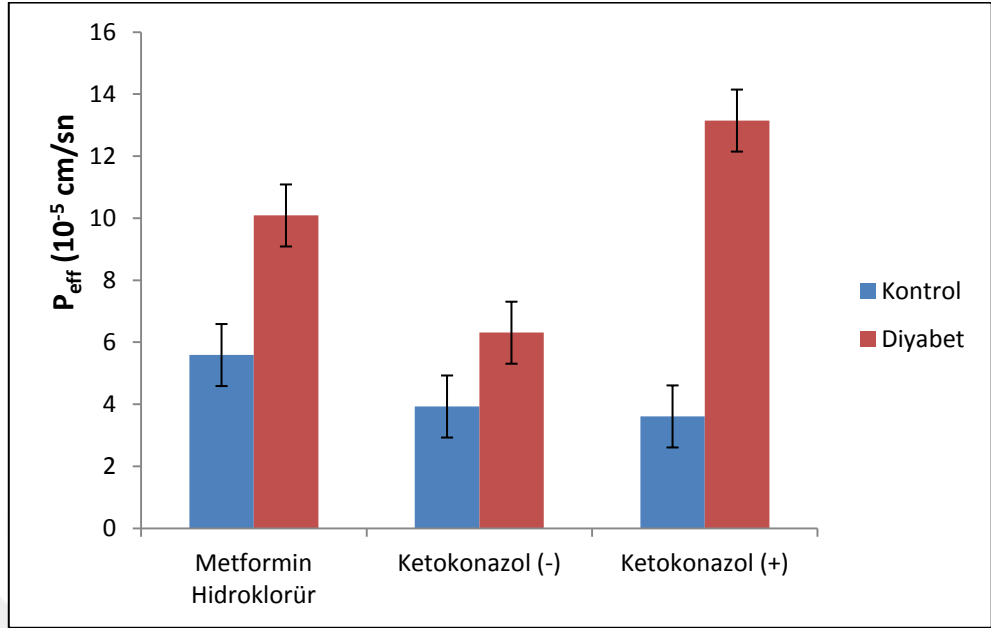
Metformin hidroklorürün diyabetli sıçanların jejunumundan permeabilitesi kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksek iken ( $p < 0,05$ ), perfüzyon ortamına gliburid ilavesi metformin hidroklorürün diyabetli grubun jejunumundan permeabilitesini anlamlı derecede değiştirmemiştir ( $p > 0,05$ ).





**Şekil 4.40.** Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) gliburidle birlikte verilen metformin hidroklorür için jejunumdan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Perfüzyon çözeltisine metformin hidroklorürle birlikte gliburid ve ketokonazol ilave edilerek perfüzyon çalışmaları gerçekleştirildiğinde diyabet ve kontrol grupları kendi aralarında tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yapılarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları kontrol grubunda metformin hidroklorürün jejunumdan permeabilitesi üzerine gliburid ve ketokonazolün anlamlı bir etkisinin olmadığını ( $p>0,05$ ), diyabet grubunda ise metformin hidroklorürün permeabilite değerleri arasındaki farkın gliburid ve ketokonazol varlığında anlamlı derecede farklı olduğunu göstermiştir ( $p<0,05$ ).

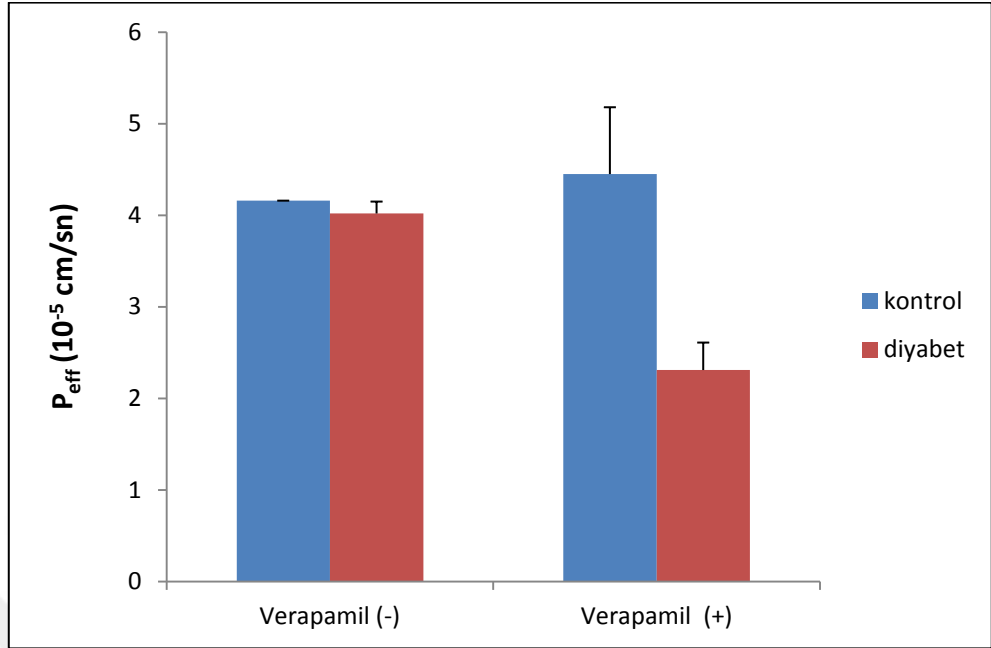


**Şekil 4.41.** Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) repaglinidle birlikte verilen metformin hidroklorür için jejunumdan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Perfüzyon çözeltisine metformin hidroklorürle birlikte repaglinid ilave edilerek perfüzyon çalışmaları gerçekleştirildiğinde ketokonazol varlığında ve yokluğunda diyabet ve kontrol grupları kendi içlerinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yapılarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları hem kontrol hem de diyabetli gruplarda metformin hidroklorürün jejunumdaki permeabilite değerlerinin repaglinid ve ketokonazol tarafından anlamlı derecede etkilenmediğini göstermiştir ( $p>0,05$ ).

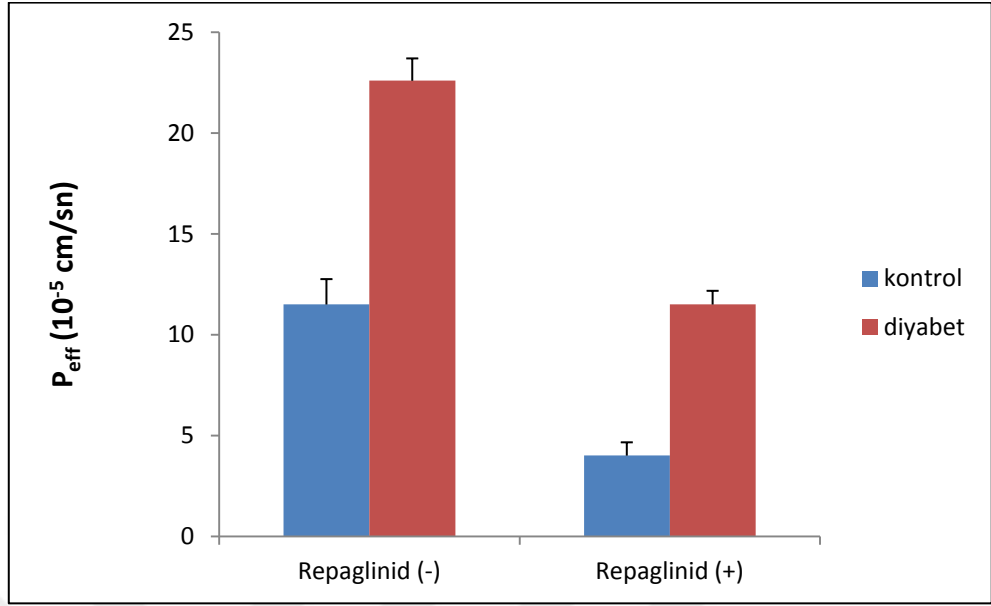
#### 4.4.4. Metformin Hidroklorürün İleumdan Permeabilitesine Ait Bulgular

Farklı diyabet ilaçlarının (gliburid ve repaglinid), verapamilin (PMAT inhibitörü) ve ketokonazolün (CYP3A4 inhibitörü) metformin hidroklorürün kontrol ve diyabetli sıçanların ileumdan permeabilitesi üzerine etkisi Şekil 4.42-4.46'da gösterilmiştir.



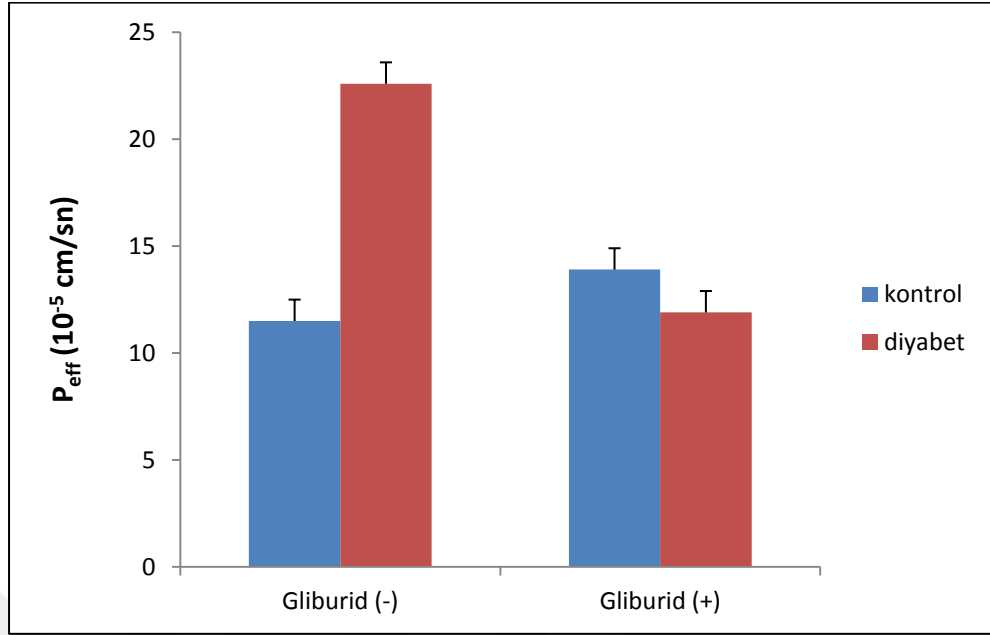
**Şekil 4.42.** Kontrol ve diyabet gruplarında verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Metformin hidroklorürün diyabet ve kontrol gruplarının ileumundan permeabilite değerleri karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız iken ( $p>0,05$ ), perfüzyon ortamına verapamil ilave edildiğinde metformin hidroklorürün diyabetli sıçanların ileumundan permeabilitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ( $p<0,05$ ).



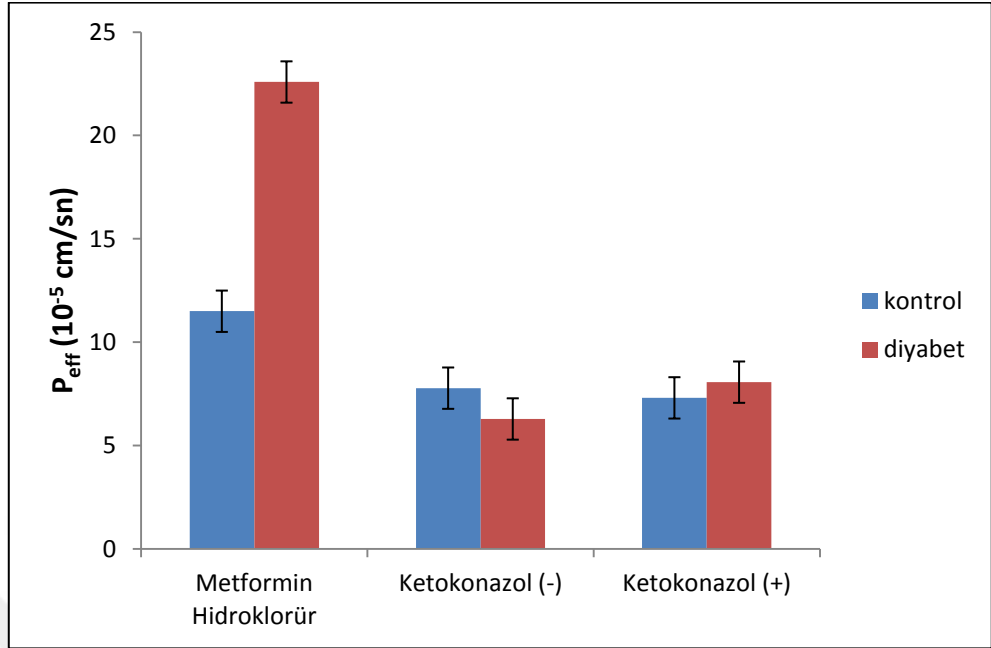
**Şekil 4.43.** Kontrol ve diyabet gruplarında repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Metformin hidroklorürün kontrol ve diyabetli grupların ileumundan tayin edilen permeabilite değerleri karşılaştırıldığında hem repaglinid yokluğunda hem de repaglinid varlığında diyabetli gruplarda gözlenen permeabilite artışı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



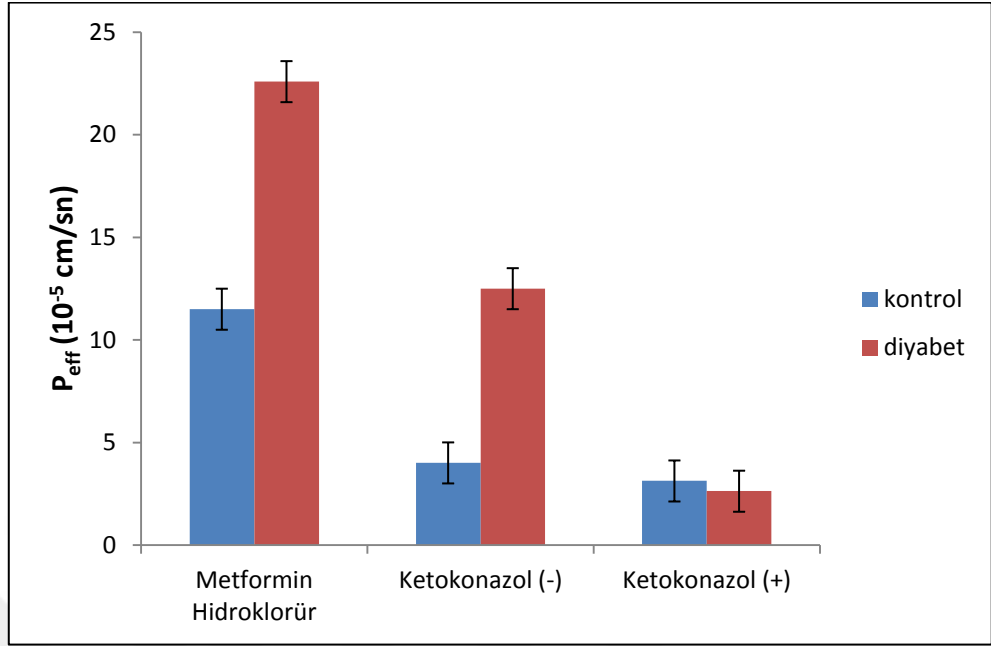
**Şekil 4.44.** Kontrol ve diyabet gruplarında gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama±SS).

Metformin hidroklorürün diyabetli sıçanların ileumundan permeabilitesi kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksek iken ( $p < 0,05$ ), perfüzyon ortamına gliburid ilave edildiğinde diyabetli grupta permeabilite değerinde gözlenen azalma istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ( $p > 0,05$ ).



**Şekil 4.45.** Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) gliburidle birlikte verilen metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Perfüzyon çözeltisine metformin hidroklorürle birlikte gliburid ilave edilerek perfüzyon çalışmaları gerçekleştirildiğinde ketokonazol varlığında ve yokluğunda diyabet ve kontrol grupları kendi içlerinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yapılarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları kontrol grubunda metformin hidroklorürün ileumdan permeabilitesi üzerine gliburid ve ketokonazolün anlamlı bir etkisinin olmadığını ( $p>0,05$ ), diyabet grubunda ise metformin hidroklorürün permeabilite değerleri arasındaki farkın gliburid ve ketokonazol varlığında anlamlı derecede farklı olduğunu göstermiştir ( $p<0,05$ ).



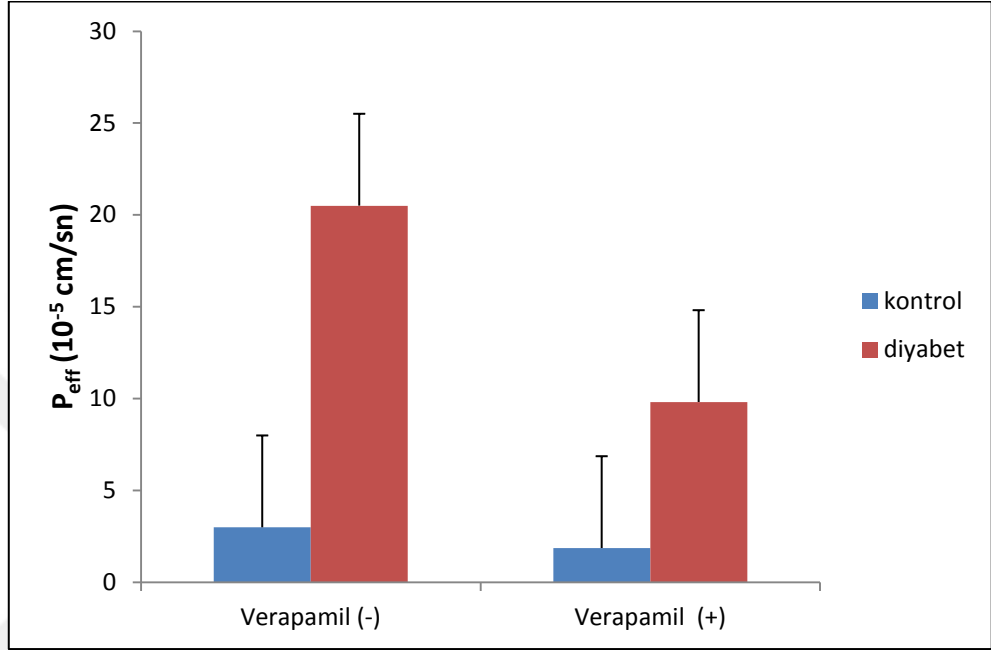
**Şekil 4.46.** Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) repaglinidle birlikte verilen metformin hidroklorür için ileumdan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Perfüzyon çözeltisine metformin hidroklorürle birlikte repaglinid ilave edilerek perfüzyon çalışmaları gerçekleştirildiğinde ketokonazol varlığında ve yokluğunda diyabet ve kontrol grupları kendi içlerinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yapılarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları kontrol grubunda metformin hidroklorürün ileumdan permeabilitesi üzerine repaglinid ve ketokonazolün anlamlı bir etkisinin olmadığını ( $p>0,05$ ), diyabet grubunda ise metformin hidroklorürün permeabilite değerleri arasındaki farkın repaglinid ve ketokonazol varlığında anlamlı derecede farklı olduğunu göstermiştir ( $p<0,05$ ).

#### **4.4.5. Metformin Hidroklorürün Kolondan Permeabilitesine Ait Bulgular**

Farklı diyabet ilaçlarının (gliburid ve repaglinid), verapamilin (PMAT inhibitörü) ve ketokonazolün (CYP3A4 inhibitörü) metformin hidroklorürün kontrol

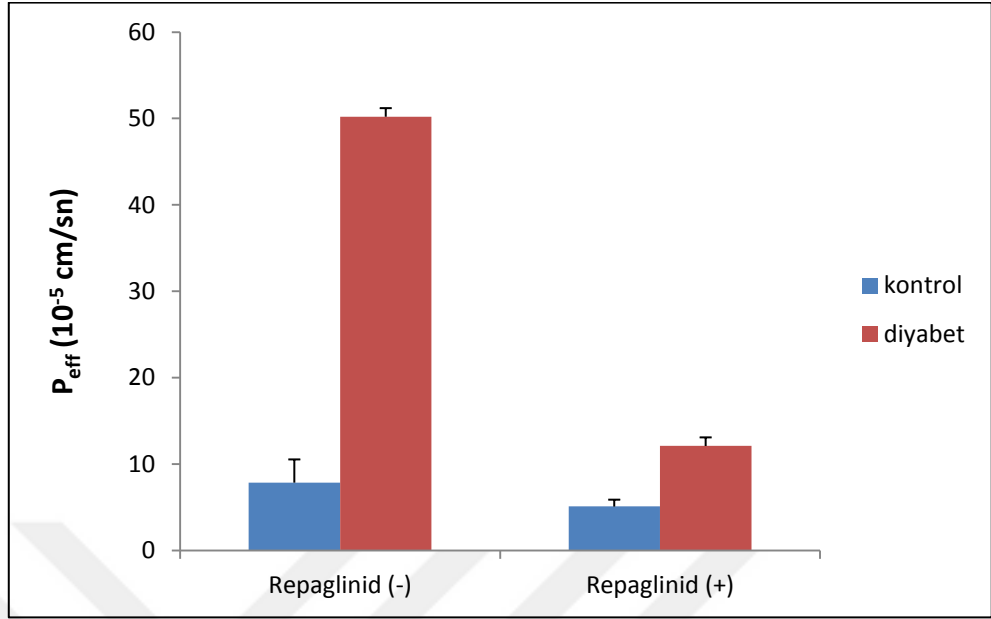
ve diyabetli sıçanların kolondan permeabilitesi üzerine etkisi Şekil 4.47-4.51’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.47.** Kontrol ve diyabet gruplarında verapamil yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için kolondan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

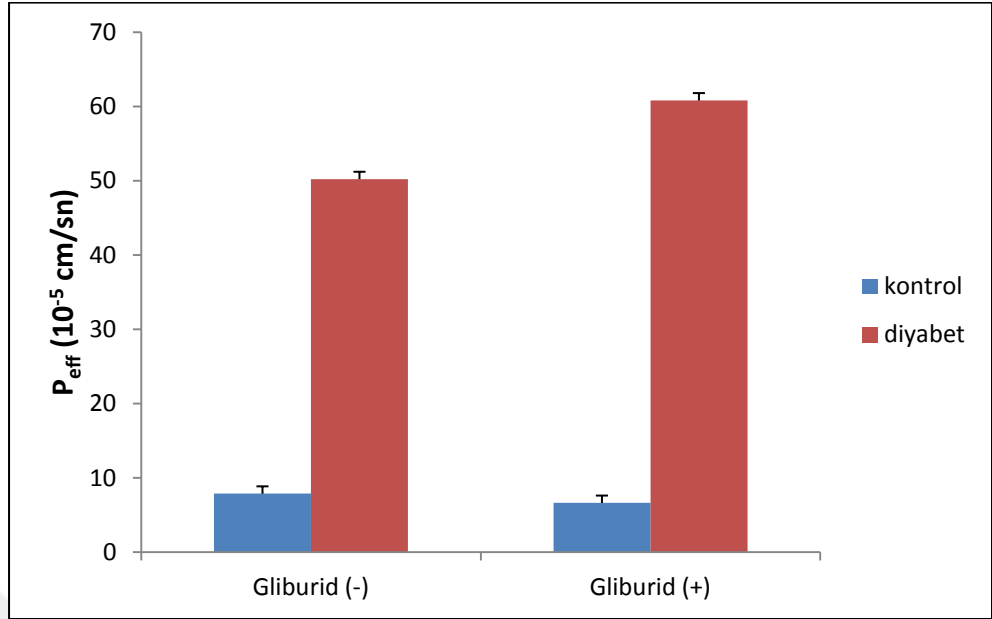
Metformin hidroklorürün kontrol ve diyabetli grupların kolonundan tayin edilen permeabilite değerleri karşılaştırıldığında hem verapamil yokluğunda hem de verapamil varlığında diyabetli gruplarda gözlenen permeabilite artışı anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).





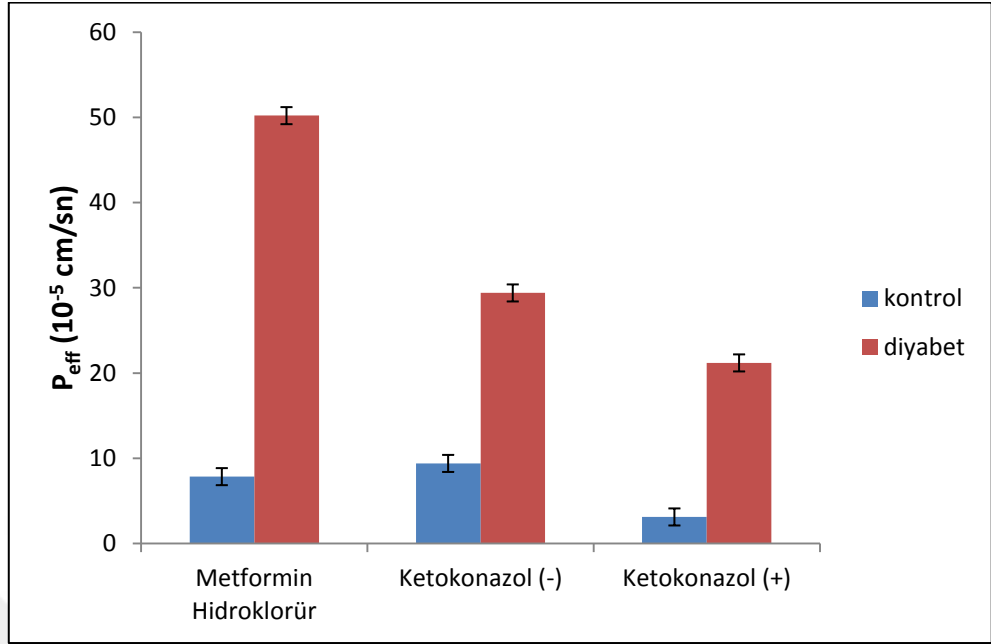
**Şekil 4.48.** Kontrol ve diyabet gruplarında repaglinid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için kolondan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Metformin hidroklorürün kontrol ve diyabetli grupların kolonundan tayin edilen permeabilite değerleri karşılaştırıldığında hem repaglinid yokluğunda hem de repaglinid varlığında diyabetli gruplarda gözlenen permeabilite artışı anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



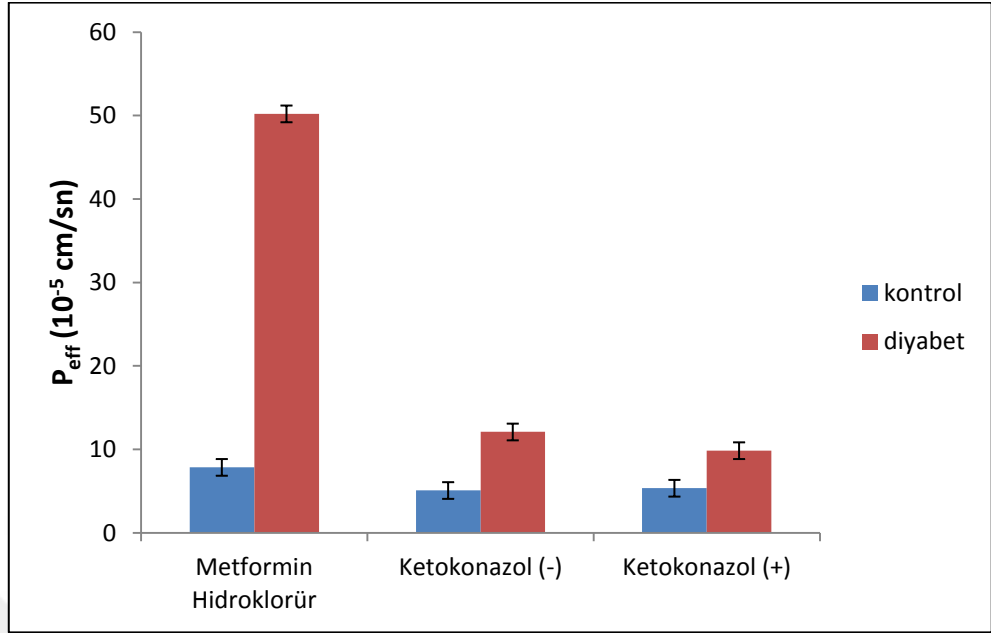
**Şekil 4.49.** Kontrol ve diyabet gruplarında gliburid yokluğunda (-) ve varlığında (+) metformin hidroklorür için kolondan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Metformin hidroklorürün kontrol ve diyabetli grupların kolonundan tayin edilen permeabilite değerleri karşılaştırıldığında hem gliburid yokluğunda hem de gliburid varlığında diyabetli gruplarda gözlenen permeabilite artışı anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4.50.** Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) gliburidle birlikte verilen metformin hidroklorüre ait kolondan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Perfüzyon çözeltisine metformin hidroklorürle birlikte gliburid ilave edilerek perfüzyon çalışmaları gerçekleştirildiğinde ketokonazol varlığında ve yokluğunda diyabet ve kontrol grupları kendi içlerinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yapılarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları hem kontrol hem de diyabetli gruplarda metformin hidroklorürün kolondan permeabilite değerlerinin gliburid ve ketokonazol tarafından anlamlı derecede etkilenmediğini göstermiştir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.51.** Kontrol ve diyabet gruplarında ketokonazol yokluğunda (-) ve varlığında (+) repaglinidle birlikte verilen metformin hidroklorüre ait kolondan tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama $\pm$ SS).

Perfüzyon çözeltisine metformin hidroklorürle birlikte repaglinid ilave edilerek perfüzyon çalışmaları gerçekleştirildiğinde ketokonazol varlığında ve yokluğunda diyabet ve kontrol grupları kendi içlerinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yapılarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları kontrol grubunda metformin hidroklorürün kolondan permeabilitesi üzerine repaglinid ve ketokonazolün anlamlı bir etkisinin olmadığını ( $p>0,05$ ), diyabet grubunda ise metformin hidroklorürün permeabilite değerleri arasındaki farkın repaglinid ve ketokonazol varlığında anlamlı derecede farklı olduğunu göstermiştir ( $p<0,05$ ).

#### 4.4.6. Net Su Akışı Değerlerine Ait Bulgular

Kontrol ve diyabet gruplarında yapılan perfüzyon çalışmalarında intestinal segmente giren ve çıkan perfüzyon çözeltisi içerisindeki fenol kırmızısı konsantrasyonları belirlenerek net su akışı [net water flux (NWF)] değerleri

hesaplanmıştır. Elde edilen değerler Tablo 4.24 ve 4.25’de özetlenmiştir. Net su akışı değerinin negatif çıkması mukozal bölgeden (lümen) serozal bölgeye (kan) sıvı kaybı olduğunu ifade etmektedir. Bu değer pozitif çıkması ise mukozal bölgeye sıvı girişi olduğunu ifade etmektedir. Yapılan deneyler sonucunda hesaplanan net su akışı değerleri bu doğrultuda değerlendirilmiştir. Buna göre metformin hidroklorür hem tek başına hem gliburid ile birlikte verildiğinde lümeden kana sıvı geçişi olduğu görülmektedir.



**Tablo 4.24.** Kontrol gruplarında hesaplanan net su akış değerleri ( $\mu\text{L}/\text{dk}/\text{cm}$ ,  $n=6$ ).

		Grup 1		Grup 2		Grup 3		Grup 4		Grup 5		Grup 6	
		V (-)	V(+)	R(-)	R(+)	G(-)	G(+)	K(-)	K(+)	K(-)	K(+)		
<b>Jejunum</b>	Ortalama	-5,80	-0,26	-3,35	-5,80	0,61	-5,80	-13,58	-0,94	1,82	0,61	1,77	
	SS	0,63	0,15	0,27	0,63	0,08	0,63	1,91	0,38	0,57	0,08	0,56	
<b>İleum</b>	Ortalama	-4,00	3,07	-1,80	-4,00	-5,93	-4,00	-5,51	1,90	4,86	-5,93	-7,52	
	SS	0,81	0,28	1,48	0,81	3,17	20,81	2,30	0,67	1,06	3,17	0,37	
<b>Kolon</b>	Ortalama	-3,58	6,61	-1,48	-3,58	-0,55	-3,58	-0,80	5,16	19,27	-0,55	-2,56	
	SS	1,87	1,05	0,90	1,87	0,03	1,87	0,65	3,47	5,66	0,03	1,70	

Grup 1: Metformin hidroklorür, Grup 2: Metformin hidroklorür+Verapamil(V), Grup 3: Metformin hidroklorür+Repaglinid (R), Grup 4: Metformin hidroklorür+Gliburid (G), Grup 5: Metformin hidroklorür+Gliburid +Ketokonazol(K) Grup 6: Metformin hidroklorür+Repaglinid +Ketokonazol(K)

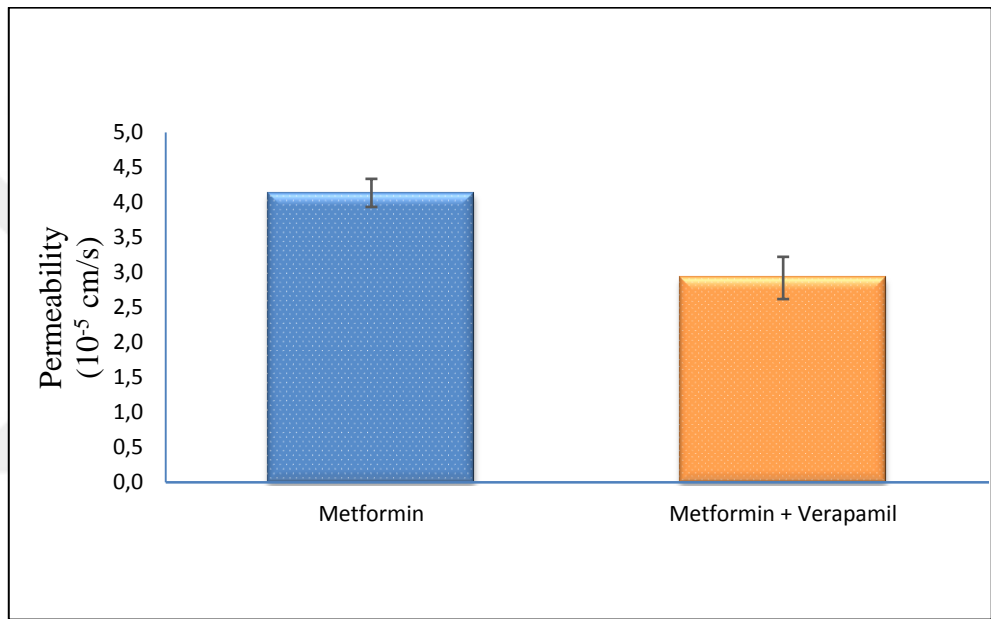
**Tablo 4.25.** Diyabet gruplarında hesaplanan net su akış değerleri ( $\mu\text{L}/\text{dk}/\text{cm}$ , n=6).

		Grup 1	Grup 2		Grup 3		Grup 4		Grup 5		Grup 6	
			V (-)	V(+)	R(-)	R(+)	G(-)	G(+)	K(-)	K(+)	K(-)	K(+)
<b>Jejunum</b>	Ortalama	2,96	8,90	10,75	2,96	-1,97	2,96	-12,51	-2,65	-7,61	-1,97	6,92
	SS	0,72	0,74	0,92	0,72	0,88	0,72	2,46	0,69	0,79	0,88	0,97
<b>İleum</b>	Ortalama	14,89	5,58	19,30	14,89	1,39	14,89	-9,10	0,86	-8,37	1,39	6,89
	SS	2,75	0,80	2,32	2,75	0,79	2,75	3,23	1,60	3,81	0,79	1,04
<b>Kolon</b>	Ortalama	9,77	2,23	21,40	9,77	1,25	9,77	-12,42	21,20	28,79	1,25	14,78
	SS	1,99	0,92	4,86	1,99	2,06	1,99	5,08	1,94	4,23	2,06	5,19

Grup 1: Metformin hidroklorür, Grup 2: Metformin hidroklorür+Verapamil(V), Grup 3: Metformin hidroklorür+Repaglinid (R), Grup 4: Metformin hidroklorür+Gliburid (G), Grup 5: Metformin hidroklorür+Gliburid +Ketokonazol(K) Grup 6: Metformin hidroklorür+Repaglinid +Ketokonazol(K)

#### 4.4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Metformin hidroklorürün permeabilitesi üzerine PMAT inhibitörü olan verapamilin etkisini incelemek amacıyla Caco-2 hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmalar Bölüm 3.2.3’de belirtildiği şekilde yapılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.52’de verilmiştir.



**Şekil 4.52.** Verapamil varlığında ve yokluğunda metformin hidroklorüre ait Caco-2’den geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen permeabilite katsayıları (ortalama±SH, n=6).

Metformin hidroklorürün Caco-2 hücrelerinden permeabilitesinin  $4,14 \times 10^{-5}$  cm/s bulunurken verapamil varlığında bu değer  $2,92 \times 10^{-5}$  cm/s’ye düştüğü gösterilmiştir. Permeabilite değerleri arasındaki bu fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



#### 4.4.8. Metformin Hidroklorürün İnsandaki Absorpsiyon Derecesinin Kestirimi

##### Kontrol Grubuna Ait Absorpsiyon Derecesi

- **Grup 1 (Metformin Hidroklorür)**

Herhangi bir inhibitör veya kombine kullanılan etkin maddelerin olmadığı yalnızca metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu sonucu elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.26'da özetlenmiştir.

**Tablo 4.26.** Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)	
	Metformin Hidroklorür	Metoprolol Tartarat
Jejunum	99,78 $\pm$ 0,29	99,51 $\pm$ 1,05
İleum	99,99 $\pm$ 0,01	97,65 $\pm$ 2,72
Kolon	99,99 $\pm$ 0,02	99,98 $\pm$ 0,03

- **Grup 2 (Metformin Hidroklorür+Verapamil)**

Verapamilin PMAT inhibitörü olarak kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.27'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.27.** Verapamil yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Verapamil (+)	Kontrol	Verapamil (+)
<b>Jejunum</b>	97,72±4,79	99,24±1,76	97,03±4,19	98,72±2,45
<b>İleum</b>	99,48±0,67	99,93±0,05	99,99±0,00	98,76±0,51
<b>Kolon</b>	99,03±1,84	92,27±0,96	99,39±0,91	99,99±0,07

- **Grup 3 (Metformin Hidroklorür+Repaglinid)**

Metformin hidroklorür ve repaglinidin birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.28'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.28.** Repaglinid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Repaglinid (+)	Kontrol	Repaglinid (+)
<b>Jejunum</b>	99,78±0,29	99,41±0,12	99,51±1,05	99,99±0,35
<b>İleum</b>	99,99±0,01	99,38±0,01	97,65±2,72	99,42±1,85
<b>Kolon</b>	99,99±0,02	99,99±0,17	99,98± 0,03	97,12±2,95

- **Grup 4 (Metformin Hidroklorür+Gliburid)**

Metformin hidroklorür ve gliburidin birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.29'da özetlenmiştir.

**Tablo 4.29.** Gliburid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Gliburid(+)	Kontrol	Gliburid(+)
<b>Jejunum</b>	99,78±0,29	99,99±0,92	99,51±1,05	99,99±0,02
<b>İleum</b>	99,99±0,01	99,99±0,05	97,65±2,72	99,26±0,71
<b>Kolon</b>	99,99±0,02	99,28±0,84	99,98±0,03	99,82±0,35

- **Grup 5 (Metformin Hidroklorür+Gliburid +Ketokonazol)**

Metformin hidroklorür, gliburid ve ketokonazol (CYP3A4 inhibitörü)'ün birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için elde edilen permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.30'da özetlenmiştir.

**Tablo 4.30.** Gliburid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Gliburid(+)	Gliburid(+) Ketokonazol(+)	Gliburid(+)	Gliburid(+) Ketokonazol(+)
<b>Jejunum</b>	99,94±0,05	91,44±9,70	97,24±2,22	93,16±5,56
<b>İleum</b>	98,90±1,55	99,99±0,06	99,21±0,51	98,61±0,95
<b>Kolon</b>	99,99±0,02	99,94±1,63	99,37±1,46	99,80±0,43

- **Grup 6 (Metformin Hidroklorür+Repaglinid +Ketokonazol)**

Metformin hidroklorür, repaglinid ve ketokonazol (CYP3A4 inhibitörü)'ün birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için elde edilen permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.31'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.31.** Repaglinid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Repaglinid (+)	Repaglinid(+) Ketokonazol(+)	Repaglinid (+)	Repaglinid(+) Ketokonazol(+)
<b>Jejunum</b>	99,41±0,12	99,25±1,10	99,99±0,35	99,99±0,13
<b>İleum</b>	99,38±0,01	99,99±0,01	99,42±1,85	100,00±0,01
<b>Kolon</b>	99,99±0,17	99,99±0,11	97,12±2,95	100,00±0,01

### Diyabet Grubuna Ait Absorpsiyon Derecesi

- **Grup 1 (Metformin Hidroklorür)**

Diyabet grubunda herhangi bir inhibitör veya kombine kullanılan etkin maddelerin olmadığı yalnızca metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu sonucu elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.32’de özetlenmiştir.

**Tablo 4.32.** Diyabet grubunda metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama $\pm$ SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)	
	Metformin Hidroklorür	Metoprolol Tartarat
Jejunum	99,97 $\pm$ 0,02	94,03 $\pm$ 7,20
İleum	99,54 $\pm$ 0,84	98,84 $\pm$ 3,51
Kolon	100,00 $\pm$ 0,01	98,26 $\pm$ 4,87

- **Grup 2 (Metformin Hidroklorür+Verapamil)**

Diyabet grubunda verapamilin PMAT inhibitörü olarak kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.33’de özetlenmiştir.

**Tablo 4.33.** Diyabet grubunda verapamil yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Verapamil (+)	Kontrol	Verapamil (+)
<b>Jejunum</b>	97,40±3,62	34,90±4,84	99,99±0,08	95,62±2,59
<b>İleum</b>	99,99±0,18	94,66±4,18	44,87±0,01	71,99±0,66
<b>Kolon</b>	100,00±0,01	99,99±0,02	99,93±0,07	95,24±7,44

- **Grup 3 (Metformin Hidroklorür+Repaglinid)**

Diyabet grubunda metformin hidroklorür ve repaglinidin birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa) Tablo 4.34’de özetlenmiştir.

**Tablo 4.34.** Diyabet grubunda repaglinid yokluğunda ve varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (% fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Repaglinid (+)	Kontrol	Repaglinid (+)
<b>Jejunum</b>	99,97±0,02	99,96±0,07	94,03±7,20	95,63±7,40
<b>İleum</b>	99,54±0,84	99,94±0,07	98,84±1,51	99,99±0,09
<b>Kolon</b>	100,00±0,01	99,99±0,01	98,26±4,87	99,95±0,12

- **Grup 4 (Metformin Hidroklorür+Gliburid)**

Diyabet grubunda metformin hidroklorür ve gliburidin birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.35’de özetlenmiştir.

**Tablo 4.35.** Diyabet grubunda gliburid varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Kontrol	Gliburid(+)	Kontrol	Gliburid (+)
<b>Jejunum</b>	99,97±0,02	99,99±3,23	94,03±7,20	99,99±0,08
<b>İleum</b>	99,54±0,84	97,80±4,11	98,84±1,51	99,93±0,11
<b>Kolon</b>	100,00±0,01	100,00±0,01	98,26±4,87	100,00±0,01

- **Grup 5 (Metformin Hidroklorür+Gliburid +Ketokonazol)**

Diyabet grubunda metformin hidroklorür, gliburid ve ketokonazol (CYP3A4 inhibitörü)’ün birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için elde edilen permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.36’da özetlenmiştir.

**Tablo 4.36.** Diyabet grubunda gliburid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Gliburid(+)	Gliburid(+) Ketokonazol(+)	Gliburid(+)	Gliburid(+) Ketokonazol(+)
<b>Jejunum</b>	92,98±12,12	48,68±0,01	98,85±1,61	99,22±1,56
<b>İleum</b>	99,99±0,09	98,88±1,50	97,57±3,83	96,46±3,73
<b>Kolon</b>	99,99±0,05	99,97±0,04	98,90±2,42	99,99±0,01

• **Grup 6 (Metformin Hidroklorür+Repaglinid +Ketokonazol)**

Diyabet grubunda metformin hidroklorür, repaglinid ve ketokonazol (CYP3A4 inhibitörü)'ün birlikte kullanıldığı perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün jejunum, ileum ve kolondan perfüzyonu ile elde edilen metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için elde edilen permeabilite değerleri ( $P_{eff}$ ) kullanılarak tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) Tablo 4.37'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.37.** Diyabet grubunda repaglinid ve ketokonazol varlığında metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tahmin edilen insan absorpsiyon dereceleri (%fa) (Ortalama±SS; n=6).

Bağırsak Segmenti	fa(%)			
	Metformin Hidroklorür		Metoprolol Tartarat	
	Repaglinid(+)	Repaglinid(+) Ketokonazol(+)	Repaglinid(+)	Repaglinid(+) Ketokonazol(+)
<b>Jejunum</b>	99,96±0,07	99,08±0,91	95,63±7,40	64,35±19,25
<b>İleum</b>	99,94±0,07	95,53±3,04	99,99±0,09	92,66±5,73
<b>Kolon</b>	99,99±0,01	99,90±0,19	99,95±0,12	99,24±1,48



## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, geliştirilen analiz yönteminin özelliklerinin istenilen amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemler bütünü olarak tanımlanmaktadır. Analizi yapılacak olan bir maddenin biyolojik bir matriks (kan, serum, idrar gibi) veya sentetik bir çözücü içinde bulunmasına bağlı olarak kullanılan analiz yöntemi; biyoanalitik ya da analitik yöntem olarak sınıflandırılır ve validasyon çalışmalarından elde edilen bulgular bu sınıflandırmaya göre değerlendirilir. Bu çalışmada bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen tüm örnekler biyolojik bileşenler içeren bir matriks (bağırsak perfüzyonu sonucu toplanan örnekler) içerisinden tayin edildiği için validasyon bulguları biyoanalitik yöntem kabul kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir. Biyoanalitik yöntem validasyonunda gerekli temel parametreler FDA tarafından doğruluk, kesinlik, duyarlılık, özgüllük ve dayanıklılık olarak belirtilmiştir. FDA'nın 2013 yılında yayınladığı biyoanalitik metod validasyonu ile ilgili taslak rehberde kabul kriterleri için gerekli olan varyasyon katsayısı değerlerinin %20 den küçük olması istenmektedir (146).

Metformin hidroklorürün bağırsaklardan absorpsiyonunu incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılan model (metformin hidroklorür) ve referans (metoprolol tartarat, fenol kırmızısı) maddelerin perfüzyon örneklerinden eş zamanlı olarak tayini HPLC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatürde metformin hidroklorür (152-156), metoprolol tartarat (157, 158) ve fenol kırmızısının (158) tek tek tayini amacıyla çalışmalar bulunmakla birlikte bu üç maddenin eş zamanlı tayini için hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle metformin hidroklorür, metoprolol tartarat ve fenol kırmızısının bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen numunelerden eş zamanlı olarak tayini amacıyla bir HPLC yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda yapılan özgüllük, kesinlik (gün içi ve günler arası kesinlik, cihaz ve yöntem kesinliği), doğrusallık, doğruluk ve duyarlılık (LOD ve LLOQ) gibi validasyon çalışmalarından elde edilen bulgular HPLC yönteminin güvenle kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca tüm validasyon

parametreleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve FDA'in kabul kriterlerine uygun olduğu bulunmuştur.

## **5.2. Sıçanlarda Streptozotosin ve Nikotinamid Uygulaması ile Diyabet Geliştirilmesi**

Diyabetik hayvan modelleri insanlardaki semptomları tam olarak göstermemelerine rağmen diyabetin gelişmesini, ilerlemesini ve patogenezi aydınlatmaya ve antidiyabetik ilaçları tanımlayıp karakterize etmeye yardımcı olan modellerdir. Hayvanlarda deneysel diyabet geliştirmek amacıyla kimyasal diyabet (159), cerrahi diyabet (160), spontan diyabet (161), viral diyabet (162) ve transgenik diyabet (163) gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntem kimyasal diyabetdir. Diğer yöntemlerin kısmi veya total pankreatektomi gerektirmesi (cerrahi diyabet gibi; 164, 165), pahalı olması (transgenik diyabet gibi; 81), daha uzun sürede diyabet gelişmesi (spontan diyabet gibi; 77), ve daha komplike olması (viral diyabet gibi; 165) nedenleriyle bu çalışma kapsamında tercih edilmemiştir.

Bu çalışmada kolay uygulanması, ucuz olması ve en fazla bir hafta gibi kısa bir sürede diyabet geliştirilebilmesi gibi nedenlerle kimyasal diyabet yöntemi kullanılmıştır. Hayvanlarda deneysel diyabet geliştirmek amacıyla uygulanan kimyasal maddeler arasında özellikle streptozotosin (25-80 mg/kg) ve alloksan (40-80 mg/kg) yaygın olarak kullanılmaktadır (166). Alloksan ve streptozotosin uygulanmasıyla insüline bağımlı diyabet geliştirildiği bildirilmiştir. Streptozotosinin beta hücreleri üzerine etkisinin alloksandan fazla olması nedeniyle bu çalışmada diyabet geliştirmek amacıyla streptozotosin kullanılmasına karar verilmiştir. Ancak streptozotosin kullanılarak geliştirilen deneysel diyabetin tipi ile ilgili olarak literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bazı çalışmalarda streptozotosin kullanılarak Tip 1 diyabet geliştirildiği belirtilirken bazı çalışmalarda Tip 2 diyabet geliştirildiği rapor edilmiştir (82, 84, 85, 167). Literatürde streptozotosinin pankreastaki beta

hücrelerindeki sitotoksik etkisini azaltmak amacıyla, uygun dozda niktotinamidin streptozotosinle birlikte verildiği Tip 2 diyabet modeli de mevcuttur (86, 87).

Perfüzyon çalışmalarına başlamadan önce diyabet geliştirmek amacıyla yapılan pilot çalışmada sıçanlara hem streptozotosin (65 mg/kg) hem de niktotinamid (110 mg/kg) + streptozotosin (65 mg/kg) uygulanmıştır. Her iki grupta hayvanların vücut ağırlığı ve kan glikoz düzeylerindeki değişimler incelenmiş ve sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda yer alan sıçanların vücut ağırlıklarında artma gözlenirken, streptozotosin ve niktotinamid + streptozotosin uygulanan sıçanların vücut ağırlıklarında azalma olmuştur. Kan glikoz değerlerinin streptozotosin ve niktotinamid+streptozotosin gruplarında 250 mg/dL'nin üzerinde olması her iki grupta da diyabet geliştiğini göstermekte ancak gelişen diyabetin tipi hakkında hiçbir bilgi vermemektedir (87). Diyabetin tipini belirlemek amacıyla çalışmaya dahil edilen hayvanların pankreasları histopatolojik olarak incelenmiştir. Normal pankreas dokusundaki Langerhans adacıklarının dağılımı bir pankreatik lobülde 7-8 tane olacak şekildedir (Bkz. Şekil 4.21a). Normal pankreas ile karşılaştırıldığında, streptozotosin grubunda bu sayının oldukça azaldığı (0-1 adacık/lobül; Bkz. Şekil 4.21b), niktotinamid +streptozotosin grubunda ise lobül başına 4-5 adacığın mevcut olduğu gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.21c). Bu sonuçlar, streptozotosin grubunda adacıkların kaybolduğunu ve Tip 1 diyabet geliştiğini, buna karşın niktotinamid+streptozotosin grubunda ise adacıkların korunduğunu ve Tip 2 diyabet geliştiğini göstermektedir (168).

Langerhans adacıklarını oluşturan nöroendokrin hücrelerin detaylı incelenmesinde, normal adacıklara (Bkz. Şekil 4.21d) kıyasla streptozotosin grubunda hücre sayısında azalma ve hücre sitoplazmalarında daralma (Bkz. Şekil 4.21e) nedeniyle adacık çaplarında azalma (Bkz. Şekil 21f) görülmüştür. Özellikle sitoplazmaları daralan hücrelerde nükleol belirginliğine ilave olarak çekirdekte hiperkromazi ve piknozis (Bkz. Şekil 4.21e) dikkati çekmiştir. Nikotinamid grubunda ise hücrelerde nükleol belirginliği izlenmekle birlikte hücre sitoplazmalarındaki daralmanın minimal olduğu ve dolayısıyla adacık hacminin nispeten korunduğu kaydedilmiştir. Piknotik hücreler görülmekle birlikte bu

hücrelerin sayısı streptozotosin grubuna göre oldukça azdır (Bkz. Şekil 4.21g). Tüm bu sonuçlarda streptozotosin grubunda Tip 1, nikotinamid+streptozotosin grubunda ise Tip 2 diyabet geliştiğini desteklemektedir (169). Elde edilen bu bulgular ışığında perfüzyon deneylerinde kullanılacak hayvanlarda Tip 2 diyabet geliştirmek amacıyla nikotinamid+streptozotosin kullanılmasına karar verilmiştir.

Perfüzyon deneylerinde kullanılan tüm sıçanların kan glikoz değerleri tayin edilmiş ve bu değer 250 mg/dL'nin üzerinde bulunmuştur. Perfüzyon deneyi tamamlandıktan sonra pankreaslar histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplarda Tip 2 diyabetin geliştiğini gösteren patolojik değişiklikler (adacık sayısında azalma, adacık çapında azalma, piknozis, sitoplazmik daralma ve nükleol belirginliği) gözlenmiştir.

### 5.3. *In situ* Üçlü Bağırsak Perfüzyonu Tekniği

Bir ilacın permeabilitesini tayin etmek amacıyla insanlarda farmakokinetik çalışmalar (kütle denge çalışmaları, mutlak biyoyararlanım çalışmaları gibi) ve insanlarda *in vivo* bağırsak perfüzyon çalışmaları (uygun hayvan modelleri kullanılarak *in vivo* veya *in situ* bağırsak perfüzyon çalışmaları, insan ya da hayvan bağırsak dokuları çıkarılıp kullanılarak *in vitro* permeasyon çalışmaları, tek tabakalı epitel hücre kültürlerinden *in vitro* permeasyon çalışmaları gibi) yapılması önerilmektedir. Bu yöntemler arasında *in situ* bağırsak perfüzyonu yöntemi nöral endokrin, lenfatik ve mezenterik kan dolaşımının korunması ve insanlarda yapılan *in vivo* deneylere benzer sonuçlar vermesi nedenleriyle sıklıkla kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda da bu yöntem tercih edilmiştir (170).

İntestinal perfüzyon tekniği, 1958 yılında Schanker ve diğ. tarafından önerilmiş olup basitliği, ucuzluğu ve cerrahi tekniğin kolaylığından dolayı yaygın olarak kullanılmıştır (171). Bir ilacın bağırsaklardan absorpsiyon ve permeabilitesini incelemek amacıyla perfüzyon çözeltilisinin tek geçişli (single pass) veya sirkülasyonlu (recirculation) olarak gerçekleştirildiği yöntemler mevcuttur. Doluisio ve diğ. tarafından tanımlanan ve perfüzyon çözeltilisinin sirküle edildiği yöntemde (172) zamanın fonksiyonu olarak perfüzyon çözeltilisinden eksilen kısım ölçüldüğü

için, absorpsiyonu düşük olan maddelerle çalışıldığında hatalı sonuçlar elde edilebilmektedir (173). Bu nedenle çalışmamızda Higuchi ve diğ. tarafından önerilen ve bağırsak segmentinin perfüzyon çözeltisinin tek geçişli (single pass) olarak perfüze edildiği yöntem kullanılmıştır (174).

Çalışmamızda model ilaç olarak seçilen metformin hidroklorürün sağlıklı ve diyabetli sıçanların bağırsaklarından permeabilitesi ve absorpsiyonu üzerine Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan diğer ilaçların (gliburid, repaglinid), verapamilin (PMAT inhibitörü) ve ketokonazolün (CYP3A4 inhibitörü) etkisini incelemek amacıyla lümeninden kayıp esasına dayanan ve üç farklı bağırsak segmenti (jejunum, ileum, kolon)'nin eş zamanlı olarak sirküle edilmeden perfüze edildiği son yıllarda literatürde de sıkça geçen ve bölümümüzde de daha önce başarıyla uygulanan *in situ single pass* perfüzyon tekniği kullanılmıştır (10, 134-136, 175-178). Bu yöntemin seçilme nedenleri; cerrahi yöntemin kolay olması, farklı bağırsak segmentlerinin eş zamanlı olarak perfüzyonunun gerçekleştirilebilmesi, perfüze edilen her segmentin kan, lenf ve sinir sistemlerinin bütünlüğünün korunması ve *in vivo* koşullara yakın bir teknik olmasıdır (179). Yöntemin dezavantajları ise; perfüzyon çözeltisi sirküle edilmediği için daha fazla miktarlarda çözeltiye ihtiyaç duyulması, cerrahi işlem esnasında bağırsakların iyi temizlenememesi ve perfüze edilen segmentlerden kan sızıntısının olmasına bağlı olarak numunelerin lümen içeriği ile kontamine olmasıdır (170). Bu sakıncaların oluşmasını engellemek için perfüzyon çözeltisi fazlası üzerinden hazırlanmıştır. Perfüze edilecek bağırsak segmentleri izole edildikten hemen sonra serum fizyolojikle temiz olduğundan emin olana kadar yıkanmıştır. Ayrıca bağırsakların kanülasyonu sırasında gerekli önlem alınarak kan sızıntısı oluşumu engellenmiştir. Kontaminasyon olması durumunda ise örnekler kullanılmayıp deneyler tekrarlanmıştır.

Perfüzyon deneylerinde deney hayvanı olarak boyutunun uygun olması, ekonomik olması, kolay üremesi ve literatürde de yaygın olarak kullanılması nedenleriyle Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır (180).

Perfüzyon çözültisi olarak kolay hazırlanan, kimyasal ve enzimatik olarak dayanıklı olan, biyoanalitik uygulamalarda sıklıkla kullanılan, suda çözünen, pKa'sı sıcaklıktan etkilenmeyen MES tamponu seçilmiştir (132, 181).

#### 5.4. Perfüzyon Deneyleri

Oral yolla verilen bir ilacın sistemik dolaşıma geçmesi ilacın dozaj şeklinden çözünme hızı (dissolüsyon) ve çözünmüş ilacın gastrointestinal kanal membranından geçme hızı (permeabilite) gibi iki temel etken tarafından kontrol edilmektedir. Çözünürlüğü düşük olan ilaçlar için çözünme hızı, permeabilitesi düşük olan ilaçlar için membranlardan geçme hızı, bir ilacın sistemik dolaşıma geçişini sınırlayan basamak olarak kabul edilmektedir. İlaçların gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu bağırsak epitel hücreleri içinden (transselüler yol) veya hücrelerarası boşluklardan (paraselüler yol) pasif difüzyon, aktif transport, kolaylaştırılmış difüzyon gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu çalışmada kullanılan metformin hidroklorürün gastrointestinal kanaldan sistemik dolaşıma geçişinde hız kısıtlayıcı basamağın absorpsiyon basamağı olduğu, ve flip-flop farmakokinetik özellik gösterdiği (eliminasyon hızı > absorpsiyon hızı) belirtilmiştir (182). Ayrıca, Caco-2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, metformin hidroklorürün paraselüler yoldan pasif difüzyonla absorplandığı gösterilmiştir (183).

Gastrointestinal kanaldan ilaç absorpsiyonu üzerine pek çok etken (etkin maddeye ait fizikokimyasal etkenler, dozaj şekline ait etkenler, fizyolojik etkenler gibi) etki etmektedir. Ayrıca hepatik, renal, kardiyovasküler fonksiyonlardaki bozukluklar, ve bu organların fonksiyonlarında bozulmaya yol açan diyabet gibi hastalıklar da ilaçların biyoyararlanımını önemli oranda etkileyebilmektedir. Diyabet, zamanın ve metabolik bozulmanın fonksiyonu olarak özellikle böbrekler, karaciğer ve kalp gibi çeşitli organlarda uzun süreli ciddi hasar ve fonksiyon bozukluğu oluşmaktadır. Bu nedenle diyabetli hastalarda sadece diyabetin değil diyabetin neden olduğu diğer organların fonksiyon bozukluklarının tedavisi amacıyla çoklu ilaç uygulaması yaygın olarak kullanılmaktadır. Diyabetin oral yoldan tedavisinde en çok tercih edilen ilaç metformin hidroklorürdür (184). Ancak metforminin yetersiz

olması durumunda kombine ilaç tedavisi de (metformin+sülfonilüre, metformin+tiazolidinedion, metformin+meglitinid, metformin+alfa-glukosidaz inhibitörleri, sülfonilüre+tiazolidinedion, sülfonilüre+alfa-glukosidaz inhibitörü gibi) sıklıkla uygulanmaktadır. Kombine ilaç tedavisi sırasında ortaya çıkabilecek olası etkileşimler de (hem enzimatik hem de taşıyıcı protein düzeyinde) ilacın biyoyararlanımı etkileyebilecektir. Bu çalışmada model ilaç olarak biguanid grubu oral antidiyabetik bir ilaç olan metformin hidroklorür seçilmiştir. Metformin hidroklorür BSS'ye göre Sınıf 3 (yüksek çözünürlük ve düşük permeabilite)'de yer alan bir ilaç olup hepatic metabolizasyona uğramaz ancak GI kanal, karaciğer ve böbreklerde yer alan çeşitli taşıyıcı proteinlerin (OCT1 - OCT3, PMAT, MATE1 ve MATE2-K) substratıdır (185, 186). Bu taşıyıcı proteinlerden PMAT (Plazma membran monoamin taşıyıcısı)'ın gastrointestinal kanalda lokalize olması nedeniyle metformin hidroklorürün bağırsaklardan absorpsiyonunda rol oynayabileceği belirtilmiştir (65). Bu nedenle PMAT'ın metformin hidroklorürün sağlıklı ve diyabetli sıçanların bağırsaklarından permeabilitesi ve absorpsiyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla perfüzyon deneyleri PMAT inhibitörü verapamil (187) kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca PMAT'ın metformin hidroklorürün permeabilitesindeki rolü Caco-2 hücreleri kullanılarak da tayin edilmiştir.

Gliburid ve repaglinidin metformin hidroklorürle kombine halde kullanılması nedeniyle, bu iki ilacın metformin hidroklorürün bağırsaklardan permeabilitesi ve absorpsiyonu üzerine etkileri hem sağlıklı hem de diyabetli sıçanlarda araştırılmıştır. Gliburid ve repaglinid bağırsaklarda yüksek oranda bulunan CYP3A4 enziminin substratıdır (188, 189). Bu ilaçların gastrointestinal kanal duvarında metabolizasyonu sonucu oluşabilecek metabolitlerin metformin hidroklorürün permeabilitesi ve absorpsiyonu üzerine olası etkileri bir CYP3A4 inhibitörü olan ketokonazol (190) kullanılarak incelenmiştir.

Tüm perfüzyon çalışmalarında metformin hidroklorürün permeabilitesini karşılaştırmak amacıyla BSS'e göre Sınıf 1 (yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite)'de yer alan metoprolol tartarat referans madde olarak kullanılmıştır.

Bağırsaklardan ilaç absorpsiyonunu etkileyen bir diğer etken de intestinal su akışıdır (intestinal water flux, net water flux, NWF). Literatürde bağırsaklardan paraselüler yolla taşınan küçük moleküllü referans maddelerin absorpsiyonlarının net su absorpsiyonuyla doğru orantılı bir şekilde arttığı ve bu referans maddelerin absorpsiyon derecesinin paraselüler yolla absorbe edilen suyun akışına bağlı olduğu gösterilmiştir (191). Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında etkin maddenin permeabilitesinin doğru olarak tayin edilebilmesi için olası su absorpsiyonu veya sekresyonu için düzeltme yapılması gerekmektedir. Bağırsaklardaki su dengesini incelemek amacıyla bağırsaklardan absorplanmayan referans maddeler (hemoglobin, radyoaktif olarak işaretlenmiş polietilen glikol, fenol kırmızısı gibi) yaygın olarak kullanılmaktadır (192-194). Bunlardan hemoglobinin biyolojik bir ajan olması ve radyoaktif işaretli PEG'in güvenlik açısından sorun yaratması nedeniyle bu referans maddeler araştırmamızda tercih edilmemiştir. Perfüzyon çalışmalarımızda bağırsaklardan net su akışının tayin edilmesi amacıyla fenol kırmızısı kullanılmıştır (195). Literatürde referans madde olarak yaygın olarak kullanılan fenol kırmızısının kullanım aralığı oldukça geniş olmakla birlikte (5-100 µg/mL) bizim çalışmamızda fenol kırmızısı 100 µg/mL konsantrasyonda (10, 135, 196) perfüzyon çözeltisine eklenmiş ve net su akış değerleri tayin edilmiştir. Metformin hidroklorür ve metoprolol tartarat için tayin edilen permeabilite değerleri fenol kırmızısı kullanılarak tayin edilen net su akış değerlerine göre düzeltilmiştir. Fenol kırmızısının kararlı duruma ulaşma zamanı (giriş ve çıkış konsantrasyonlarının oranının 1'e yakın olması) bağırsak segmentlerinde su dengesine ulaşıldığının göstergesi olarak alınmıştır. Bölümüzde daha önce yapılan bağırsak perfüzyonu çalışmalarında fenol kırmızısının kararlı duruma ulaşması için geçen süreler jejunum için 20 dk, ileum için 15 dk ve kolon için 30 dk olarak bulunduğu için bizim çalışmamızda da bu süre 30 dk olarak alınmıştır (135). Bu çalışmada tayin edilen net su akışı değerleri incelendiğinde kontrol ve diyabet gruplarında hem lümen den kana absorpsiyon hem de kandan lümen e doğru sekresyonu olduğu görülmüştür (Bkz. Tablo 4.24 ve Tablo 4.25). Bu konuyla ilgili literatür çalışmaları (137, 148) incelendiğinde hem negatif (lümen den kana sıvı geçişi; ör. metoprolol için -8 µL/sa/cm) hem de pozitif (kandan lümen e sıvı geçişi; ör. propranolol için 28



$\mu\text{L/sa/cm}$  ) NWF değerleri mevcuttur. Stabil su akışının olması intestinal bariyer fonksiyonunun korunduğunun göstergesi olarak da alınmıştır (143).

#### **5.4.1. Metformin Hidroklorür ve Metoprolol Tartaratın Permeabilitesini İncelemek Amacıyla Yapılan Çalışmalar**

##### **Metformin Hidroklorür**

**Kontrol grubunda** yapılan çalışmalarda farklı bağırsak segmentlerinden tayin edilen permeabilite değerleri (jejunum:  $5,59 \pm 3,09 \times 10^{-5} \text{ cm/sn}$ ; ileum:  $11,50 \pm 1,26 \times 10^{-5} \text{ cm/sn}$ , kolon:  $7,86 \pm 2,69 \times 10^{-5} \text{ cm/sn}$ ) metformin hidroklorürün absorpsiyonunun en yüksek olduğu segmentin ileum ve en düşük olduğu segmentin ise jejunum olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.12). Her bir segment için tayin edilen permeabilite değerleri karşılaştırıldığında jejunum- ileum ( $p < 0,05$ ) arasındaki farkın anlamlı olduğu, jejunum-kolon ( $p > 0,05$ ) ve ileum-kolon ( $p > 0,05$ ) arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

**Diyabet grubunda** yapılan çalışmalarda ise farklı bağırsak segmentlerinden tayin edilen permeabilite değerleri (jejunum:  $10,09 \pm 0,37 \times 10^{-5} \text{ cm/sn}$ ; ileum:  $22,59 \pm 1,11 \times 10^{-5} \text{ cm/sn}$ , kolon:  $50,21 \pm 0,19 \times 10^{-5} \text{ cm/sn}$ ) metformin hidroklorürün absorpsiyonunun en yüksek olduğu segmentin kolon ve en düşük olduğu segmentin ise jejunum olduğunu göstermiştir. Kontrol ve diyabet grupları karşılaştırıldığında metformin hidroklorürün jejunumdan permeabilitesi diyabetten etkilenmezken ( $p > 0,05$ ), diyabette ileumdan ve kolondan permeabilitesi sırasıyla 1,96 ( $p < 0,05$ ) ve 6,4 kat artmıştır ( $p < 0,05$ ).

Literatürde metformin hidroklorürün permeabilitesinin farklı yöntemler kullanılarak incelendiği çalışmalar mevcuttur. Metformin hidroklorür için Caco-2 hücre hatları kullanılarak tayin edilen permeabilite değerleri  $3,7 \times 10^{-7} \text{ cm/sn}$  ile  $7,68 \times 10^{-6} \text{ cm/sn}$  arasında değişmektedir (183, 197-199). Everted gut sac yöntemi ( $7,37 \times 10^{-7} \text{ cm/sn}$ ) ve Sartorius SM 16750 Absorpsiyon Simulatör aparatı ( $6,13 \times 10^{-7} \text{ cm/sn}$ ) kullanılarak tayin edilen permeabilite değerleri Caco-2 hücre hatlarından

tain edilen permeabilite değerlerine oldukça benzer bulunmuştur (200). Bizim alışmamızda metformin hidroklorürün Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi ( $4,14 \times 10^{-5}$  cm/s) literatürde verilen değerlere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu farkın kullanılan hücre hattının pasaj sayısına (pasaj sayısı: 18, 25-40, 95-115 gibi), çalışılan etkin madde konsantrasyonuna (0,05-10 mM,  $80 \text{mC}_i/\text{mmol}$ ,  $0,5 \mu\text{C}_i$  gibi) ve deneysel koşullardaki farklılıklara bağlı olabileceği düşünölmektedir. Literatürde metformin hidroklorürün bağırsaklardan permeabilitesini inceleyen sadece bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada metformin hidroklorürün (10, 50, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sıçanların farklı bağırsak segmenlerinden (duodenum, jejunum, ileum) permeabilitesi incelenmiştir. Metformin hidroklorürün 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonda permeabilitesi ileumda  $2,96 \pm 0,36 \times 10^{-5}$  cm/sn, duodenumda  $4,51 \pm 1,08 \times 10^{-5}$  cm/sn ve jejunumda  $3,26 \pm 0,73 \times 10^{-5}$  cm/sn olarak bulunmuştur. Metforminin hidroklorürün duodenumdan permeabilitesi iki farklı konsantrasyonda (10 ve 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) incelendiğinde düşük konsantrasyonlarda tain edilen permeabilite değerleri hemen hemen aynı bulunurken (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  için  $4,71 \pm 0,86 \times 10^{-5}$  cm/sn; 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  için  $4,51 \pm 1,08 \times 10^{-5}$  cm/sn) yüksek konsantrasyonda (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) permeabilite daha düşük ( $2,70 \pm 0,63 \times 10^{-5}$  cm/sn) bulunmuştur (142). Bizim alışmamızda metformin hidroklorür (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) için jejunum ( $5,59 \pm 3,09 \times 10^{-5}$  cm/sn) ve ileumdan ( $11,50 \pm 1,26 \times 10^{-5}$  cm/sn) tain edilen permeabilite değerleri literatürdeki mevcut permeabilite değerlerine benzer bulunmuştur. Ancak metforminin hidroklorürün kolondan permeabilitesi ile ilgili literatürde herhangi bir bilgi bulunmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır. Ayrıca, diyabet geliştirilmiş sıçanlarda *in situ* intestinal perfüzyon tekniği kullanılarak metformin hidroklorürün permeabilitesini inceleyen herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir.

### **Metoprolol Tartarat**

**Kontrol grubunda** yapılan çalışmalarda metoprolol tartaratın permeabilitesi ileumdan ( $4,33 \pm 0,48 \times 10^{-5}$  cm/s) kolona ( $10,50 \pm 3,15 \times 10^{-5}$  cm/sn) doğru artış göstermiştir (Bkz. Tablo 4.12). Her bir segment için tain edilen permeabilite değerleri karşılaştırıldığında jejunumla kolon ve ileumla kolon arasındaki fark

anlamli bulunurken ( $p < 0,05$ ) jejunumla ileum arasında anlamlı fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).

**Diyabet grubunda** yapılan çalışmalarda da kontrol grubuna benzer şekilde metoprolol tartaratın permeabilitesi ileumdan ( $2,33 \pm 0,54 \times 10^{-5}$  cm/s) kolona ( $12,70 \pm 0,92 \times 10^{-5}$  cm/sn) doğru artış göstermiştir (Bkz. Tablo 4.21). Kontrol ve diyabet grupları karşılaştırıldığında metoprolol tartaratın her üç segmentte de permeabilite diyabette anlamlı derecede değişmemiştir ( $p > 0,05$ ).

Bölümümüzde iki farklı perfüzyon ortamı (HBSS: Hank's dengeli tuz çözeltisi ve Golytely) kullanılarak gerçekleştirilen bağırsak perfüzyonu çalışmalarında metoprolol tartarat referans madde olarak kullanılmıştır. Perfüzyon ortamı olarak HBSS kullanıldığında metoprolol tartaratın permeabilite değerleri segmentler arasında farklılık gösterirken (jejunum, ileum, kolon için sırasıyla  $1,37$ ;  $4,83$ ;  $3,27 \times 10^{-5}$  cm/sn), Golytely çözeltisi kullanıldığında tüm segmentler için hemen hemen aynı permeabilite değerleri (jejunum, ileum, kolon için sırasıyla  $2,90$ ;  $2,71$ ;  $2,91 \times 10^{-5}$  cm/sn) bulunmuştur (135). Bu sonuçlar perfüzyon çözeltisinin permeabilite değerleri üzerine etkisi olabileceğini göstermektedir. Ayrıca Kaynak ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada, Golytely perfüzyon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen üçlü bağırsak perfüzyonu çalışmalarında metoprolol tartaratın 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 tespit edilmiştir (137). Literatürde metoprolol tartarat için verilen diğer permeabilite değerleri incelendiğinde, PAMPA'dan tayin edilen permeabilite değerinin ( $1,53 \pm 0,05 \times 10^{-6}$  cm/sn) oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (201). Caco-2 ( $4,0 \times 10^{-5}$  cm/sn; 201) ve bağırsak perfüzyonu çalışmalarından tayin edilen permeabilite değerleri ( $2,0 \times 10^{-5}$  –  $3,3 \times 10^{-5}$  cm/sn; 143, 150, 202) ise benzer bulunmuştur. Bizim çalışmamızda farklı perfüzyon ortamı (MES tamponu) kullanılmasına rağmen tayin edilen permeabilite değerleri jejunumdan kolona doğru artmış ve literatürde verilen değerlere benzer bulunmuştur (137). Literatürde, diyabette metoprolol tartaratın permeabilitesini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bu maddenin permeabilitesinin diyabetten önemli derecede etkilenmediğini işaret etmektedir.

Metoprolol tartarat BSS sistemine göre Sınıf 1 (yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite)'de yer alan bir ilaç olup (203) bir etkin maddenin permeabilite sınıfını tayin etmek amacıyla referans madde olarak sıklıkla kullanılmaktadır (30, 204). Permeabilitesi metoprolol tartarattan daha düşük olan ilaçların düşük permeabiliteye sahip olduğu kabul edilmektedir (150). Ayrıca logP değeri metoprololün logP değerinden (1,72) daha düşük olan maddelerin permeabilitesinin düşük olduğu kabul edilmektedir (205). Çalışmamızda, jejunum ve kolonda metformin hidroklorürün permeabilitesi metoprolol tartarattan daha düşük bulunurken ileumda yüksek bulunmuştur. İlave olarak metformin hidroklorürün logP değeri (-2,6) metoprololün logP değerinden daha düşüktür (206). Tüm bu veriler metforminin düşük permeabiliteye sahip olduğunu göstermektedir.

#### **5.4.2. Metformin Hidroklorür ve Metoprolol Tartaratın Permeabilitesi Üzerine Diyabet İlaçlarının ve İnhibitörlerin Etkisini İncelemek Amacıyla Yapılan Çalışmalar**

##### **Verapamil Kullanılarak Yapılan Çalışmalar**

##### **Hücre Kültürü Çalışmaları:**

Bir etkin maddenin gastrointestinal kanaldan permeabilitesini tayin etmek amacıyla epitel hücre tek tabakaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla insan kolorektal adenokarsinoma'dan elde edilen Caco-2 hücreleri, uygun koşullarda ve destekler üzerinde (0,4  $\mu$  insertler gibi) büyütüldüğünde polarize olarak sağlıklı bağırsak epitel hücrelerinin özelliklerini göstermeleri (enzim ve taşıyıcı protein ekspresyonu, sıkı kavşakların oluşması gibi) sebebiyle intestinal permeabilitenin tayininde en çok tercih edilen hücre hattıdır (207-209). Bu çalışmada metformin hidroklorürün Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi hem tek başına hem de PMAT inhibitörü olan verapamil varlığında incelenmiştir. Metformin hidroklorürün Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi ( $4,14 \times 10^{-5}$  cm/s) verapamil varlığında ( $2,92 \times 10^{-5}$  cm/s) önemli derecede azalmıştır ( $p < 0,05$ ). Bu bulgu literatür verileriyle uyumlu

bulunmuştur (65). Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile in situ intestinal perfüzyon deneylerinden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında hem kontrol grubunda ( $p>0,05$ ) hem diyabet grubunda ( $p<0,05$ ) verapamil eklendiğinde benzer şekilde permeabilitede azalma görülmüştür. Bu azalmalar metformin hidroklorürün intestinal absorpsiyonunda PMAT'ın bir rolü olduğunu desteklemektedir.

### Perfüzyon Çalışmaları

#### Metformin Hidroklorür:

**Kontrol grubunda** PMAT inhibitörü olarak kullanılan verapamilin perfüzyon ortamına ilave edilmesiyle metformin hidroklorürün perfüze edilen bağırsak segmentlerinden permeabilitesinde önemsiz derece azalmaya (jejunum: verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,34\pm 0,75 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,83\pm 0,69 \times 10^{-5}$  cm/s,  $p>0,05$ ; kolon: verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,99\pm 0,12 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $1,86\pm 0,50 \times 10^{-5}$  cm/s,  $p>0,05$ ) ya da artmaya (ileum: verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,16\pm 0,00 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,45\pm 0,73 \times 10^{-5}$  cm/s,  $p>0,05$ ) neden olduğu gözlenmiştir.

**Diyabet grubunda** perfüzyon ortamında verapamil yokken metformin hidroklorürün permeabilitesi jejunum ve ileum için kontrol grubunda tayin edilen değerlere oldukça benzerken (jejunum:  $5,34\pm 0,75 \times 10^{-5}$  cm/s vs  $5,96\pm 0,35 \times 10^{-5}$  cm/s; ileum:  $4,16\pm 0,00 \times 10^{-5}$  cm/s vs.  $4,02\pm 0,13 \times 10^{-5}$  cm/s) kolondan permeabilite önemli oranda artmıştır ( $2,99\pm 0,12 \times 10^{-5}$  cm/s vs.  $20,50\pm 0,13 \times 10^{-5}$  cm/s). Perfüzyon ortamına verapamil ilavesi metformin hidroklorürün tüm segmentlerden permeabilitesini önemli derecede azaltmıştır (jejunum: verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,96\pm 0,35 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $0,21\pm 0,66 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p<0,05$ ; ileum: verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,02\pm 0,13 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,31\pm 0,30 \times 10^{-5}$  cm/s,  $p<0,05$ ; kolon: verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $20,50\pm 0,13 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $9,81\pm 0,10 \times 10^{-5}$  cm/s,  $p<0,05$ ). Verapamil ilavesi ile diyabet grubunda gözlenen bu

azalma tüm segmentlerde PMAT ekspresyonunda olası bir azalmaya ve verapamilin kullanılan konsantrasyonda PMAT aktivitesini etkin bir şekilde inhibe etmesine bağlanabilir.

### **Metoprolol Tartarat:**

**Kontrol grubunda** metoprolol tartaratın jejunum (verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,64 \pm 0,18 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,09 \pm 0,82 \times 10^{-5}$  cm/s), ileum (verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,29 \pm 0,6 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,33 \pm 0,12 \times 10^{-5}$  cm/s) ve kolondan permeabilitesi (verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $8,55 \pm 0,01 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $6,63 \pm 0,21 \times 10^{-5}$  cm/s) üzerine verapamilin etkisi önemli bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

**Diyabet grubunda** ise verapamil metoprolol tartaratın jejunumdan permeabilitesini önemli oranda azaltırken (verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,61 \pm 0,17 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,10 \pm 0,23 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) ileumdan permeabilitesini önemli oranda attırmıştır (verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $0,39 \pm 0,03 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $0,92 \pm 0,21 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ). Bununla birlikte kolondan permeabilitesi üzerine verapamilin etkisinin önemli olmadığı bulunmuştur (verapamil bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $7,73 \pm 0,70 \times 10^{-5}$  cm/s, verapamil bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $10,20 \pm 0,25 \times 10^{-5}$  cm;  $p > 0,05$ ).

Wu ve Benet (96), BSS’de farklı sınıflarda yer alan ilaçların oral yoldan absorpsiyonu üzerine taşıyıcı proteinlerin olası etkilerini incelemiştir. Sınıf 1 (yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite)’de yer alan ilaçların (ör. metoprolol tartarat) çözünürlüklerinin yüksek olmasına bağlı olarak gastrointestinal kanalda eksorptif taşıyıcıları doygunluğa ulaştıracak kadar yüksek oranda bulunacağından Sınıf 1’de yer alan ilaçların absorpsiyonu üzerine taşıyıcı proteinlerin etkisinin minimal düzeyde olacağı varsayılmıştır (96). Sınıf 3 (yüksek çözünürlük ve düşük permeabilite)’de yer alan ilaçlar için absorptif taşıyıcıların etkisinin daha baskın olması öngörülmektedir. Bu çalışmada hem metformin hidroklorür hem de metoprolol tartarat için verapamil yokken ve varken tayin edilen değerler bu varsayımları destekler niteliktedir.

## Gliburid Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

### Metformin hidroklorür

**Kontrol grubunda** perfüzyon ortamına gliburid eklendiğinde metformin hidroklorürün perfüze edilen tüm segmentlerden permeabilitesinde önemli derecede bir değişme olmadığı gözlenmiştir (jejunum: gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,59 \pm 3,09 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $7,88 \pm 3,14 \times 10^{-5}$  cm/s; ileum: gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $11,50 \pm 1,26 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $13,9 \pm 3,58 \times 10^{-5}$  cm/s; kolon: gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $7,86 \pm 2,69 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $6,62 \pm 2,94 \times 10^{-5}$  cm/s).

Kontrol grubunda perfüzyon ortamına gliburidle birlikte CYP3A4 inhibitörü ketokonazol eklendiğinde metformin hidroklorürün jejunum (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,96 \pm 0,35 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,36 \pm 0,51 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) ve kolondan permeabilitesi (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $9,41 \pm 0,44 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,13 \pm 0,36 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) anlamlı derecede azalırken ileumdan permeabilitesi oldukça benzer (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $7,78 \pm 0,34 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $7,31 \pm 0,95 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) bulunmuştur.

**Diyabet grubunda** perfüzyon ortamında gliburid yokken metformin hidroklorürün tüm segmentlerden permeabilitesi kontrol grubuna göre daha yüksektir. Perfüzyon ortamına gliburid ilave edildiğinde metformin hidroklorürün jejunumdan (gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $10,09 \pm 0,37 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $8,47 \pm 1,99 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) ve kolondan permeabilitesinde (gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $50,21 \pm 0,19 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $60,80 \pm 0,66 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) önemli bir fark gözlenmezken, ileumdan permeabilitesi önemli derece azalmıştır (gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $22,59 \pm 1,11 \times 10^{-5}$  cm/s; gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $11,90 \pm 1,32 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ).

Diyabet grubunda perfüzyon çözeltisine gliburidle birlikte ketokonazol eklendiğinde metformin hidroklorürün jejunumdan permeabilitesi anlamlı derecede

azalırken (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $6,81 \pm 0,56 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $0,45 \pm 0,67 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ), ileum (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $6,29 \pm 0,10 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $8,07 \pm 0,10 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) ve kolondan (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $29,41 \pm 0,11 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $21,20 \pm 0,16 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) permeabilitesinde gözlenen farklar önemsiz bulunmuştur. Bunun birlikte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, metformin hidroklorürün jejunumdan ve kolondan permeabilitesi gliburid ve ketokonazol varlığında diyabet grubunda anlamlı derecede farklı iken ( $p < 0,05$ ) ileumdan permeabilitesinin gliburid ve ketokonazol tarafından anlamlı derecede etkilenmediği gözlenmiştir.

### **Metoprolol tartarat**

**Kontrol grubunda** perfüzyon çözeltisine gliburid ilave edildiğinde metoprolol tartaratın jejunum (gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,77 \pm 3,37 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $11,10 \pm 0,35 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) ve kolondan permeabilitesi (gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $10,50 \pm 3,15 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,16 \pm 1,6 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) önemli oranda değişirken, ileumdan permeabilitesi değişmemiştir (gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,33 \pm 0,48 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,89 \pm 0,34 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ).

Kontrol grubunda perfüzyon ortamına gliburidle birlikte CYP3A4 inhibitörü ketokonazol eklendiğinde metoprolol tartaratın jejunumdan permeabilitesi önemli derecede azalırken (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,71 \pm 0,37 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $1,83 \pm 0,39 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ), ileum (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,51 \pm 0,37 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,65 \pm 0,56 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) ve kolondan (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $10,15 \pm 0,32 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $7,37 \pm 0,10 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) permeabilitesinde önemli derecede bir değişiklik gözlenmemiştir.

**Diyabet grubunda** perfüzyon çözeltisine gliburid ilave edildiğinde metoprolol tartaratın jejunum (gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,71 \pm 0,57 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $9,60 \pm 0,18 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ), ileum (gliburid



bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,33 \pm 0,54 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $11,80 \pm 0,12 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ), ve kolondan (gliburid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $12,70 \pm 0,92 \times 10^{-5}$  cm/s, gliburid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $30,70 \pm 0,42 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) permeabilitesi anlamlı derecede artmıştır.

Diyabet grubunda perfüzyon çözeltilisine gliburidle birlikte ketokonazol ilave edildiğinde metoprolol tartaratın jejunumdan permeabilitesi önemli derecede azalırken (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $6,87 \pm 0,87 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $1,70 \pm 0,14 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) kolondan permeabilitesi önemli derecede artmıştır (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $7,69 \pm 0,84 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $20,61 \pm 0,14 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ). Ancak metoprolol tartaratın ileumdan permeabilitesi üzerine ketokonazolün önemli bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,10 \pm 0,64 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,90 \pm 0,78 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ).

### **Repaglinid Kullanılarak Yapılan Çalışmalar**

#### **Metformin hidroklorür**

**Kontrol grubunda** perfüzyon ortamına repaglinid ilavesi metformin hidroklorürün jejunum (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,59 \pm 3,09 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,93 \pm 0,56 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ), ileum (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $11,50 \pm 1,26 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,01 \pm 0,66 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) ve kolondan (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $7,86 \pm 2,69 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,09 \pm 0,80 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p = 0,05$ ) permeabilitesinde anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur.

Kontrol grubunda perfüzyon çözeltilisine repaglinidle birlikte ketokonazol ilave edildiğinde, metformin hidroklorürün jejunum (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,93 \pm 0,56 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,61 \pm 1,01 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ), ileum (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,01 \pm 0,66 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,13 \pm 0,46 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ), ve kolondan

(ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,09 \pm 0,80 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,36 \pm 0,87 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) permeabilitesi üzerine CYP3A4 inhibitörünün önemli bir etkisinin olmadığı bulunmuştur.

**Diyabet grubunda** perfüzyon ortamına repaglinid ilave edildiğinde metformin hidroklorürün jejunumdan permeabilitesi (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $10,09 \pm 0,37 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $6,31 \pm 0,37 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) önemli derecede değişmezken, ileum (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $22,59 \pm 1,11 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $11,50 \pm 0,68 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) ve kolondan (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $50,21 \pm 0,19 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $12,10 \pm 0,76 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) permeabilitesi önemli derecede azalmıştır.

Diyabet grubunda perfüzyon ortamına repaglinidle birlikte ketokonazol ilave edildiğinde metformin hidroklorürün jejunumdan (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $6,31 \pm 0,37 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $13,15 \pm 0,20 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ), ve kolondan (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $12,10 \pm 0,76 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $9,86 \pm 1,10 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) permeabilitesi önemli derecede etkilenmezken, ileumdan permeabilitesi önemli derecede azalmıştır (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $11,50 \pm 0,76 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,63 \pm 0,43 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ).

### **Metoprolol tartarat**

**Kontrol grubunda** perfüzyon çözeltisine repaglinid ilavesi metoprolol tartaratın jejunum (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,77 \pm 3,37 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,50 \pm 0,22 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ), ileum (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,33 \pm 0,48 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,88 \pm 0,55 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) ve kolondan permeabilitesini önemli oranda azaltmıştır (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $10,50 \pm 3,15 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,07 \pm 0,09 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ).

Kontrol grubunda perfüzyon çözeltisine repaglinidle birlikte ketokonazol ilavesi metoprolol tartaratın jejunumdan (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $4,50 \pm 0,22 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $5,66 \pm 0,37 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) ileumdan (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,88 \pm 0,55 \times 10^{-5}$  cm/s; ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $9,87 \pm 0,58 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) ve kolondan permeabilitesini önemli derecede artırmıştır (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,07 \pm 0,09 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $19,60 \pm 0,11 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ).

**Diyabet grubunda** perfüzyon çözeltisine repaglinid ilave edildiğinde metoprolol tartaratın jejunumdan (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,71 \pm 0,57 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,59 \pm 0,53 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) ve kolondan permeabilitesinde (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $12,70 \pm 0,92 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $19,88 \pm 0,21 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ) gözlenen değişimler önemli bulunmazken ileumdan permeabilitesi (repaglinid bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $2,33 \pm 0,54 \times 10^{-5}$  cm/s, repaglinid bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $9,79 \pm 0,99 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) önemli oranda artmıştır.

Diyabet grubunda perfüzyon ortamına repaglinidle birlikte ketokonazol ilave edildiğinde metoprolol tartaratın jejunumdan (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,59 \pm 0,53 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $0,41 \pm 0,01 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) ve ileumdan permeabilitesi anlamlı derecede azalırken (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $9,79 \pm 0,99 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $3,10 \pm 0,42 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p < 0,05$ ) kolondan permeabilitesine gözlenen farklar önemsiz bulunmuştur (ketokonazol bulunmayan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $19,88 \pm 0,21 \times 10^{-5}$  cm/s, ketokonazol bulunan ortamda  $P_{\text{eff}}$ :  $12,93 \pm 0,21 \times 10^{-5}$  cm/s;  $p > 0,05$ ).

Literatürde Tip 1 diyabette ilaçların absorpsiyonunun değiştiğini belirten çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte Tip 2 diyabette bu konuyla ilgili çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. 1999 yılında, Secondulfo ve diğ. (210) Tip 2 diyabeti olan 18 hastada intestinal permeabiliteyi Cellobiose (kript'lerdeki sıkı kavşaklardan geçer)/mannitol (vililerden geçer) çit-şeker testi (CE/MA) kullanarak incelemiştir.

Diyabetli hastalardan elde edilen sonuçlar sağlıklı gönüllülerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında arada fark olmadığı ve Tip 2 diyabette intestinal permeabilitenin değişmediği belirtilmiştir. Ancak, bu çalışmada kullanılan testin ince bağırsaklardan permeabilityyi incelemek için uygun olduğu ve yaş, cinsiyet açısından uyumlu bir kontrol grubu kullanılmadığı için sonuçların kesin olamayacağı bir başka grup tarafından ifade edilmiştir (211). 2014 yılında, Horton ve diğ. (211) Tip 2 diyabeti olan 20 erkek hastada oral yolla tek dozda (2-MBq) verilen krom (51Cr)-EDTA'nın idrardan geri kazanımını tayin ederek intestinal permeabilityyi incelemiştir. Elde edilen sonuçlar yaş, cinsiyet ve vücut kitle indeksi açısından uyumlu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, Tip 2 diyabeti olan hastalarda intestinal permeabilitenin önemli derecede arttığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, bu sonuçların Tip 2 diyabette insanlarda intestinal permeabilitenin arttığını gösteren literatürdeki ilk bulgu olduğunu da ifade etmiştir. Ayrıca permeabilitydeki artışın enflamatuvar belirteçlerin [C-reaktif protein (CRP), interlekin 6 (IL-6), ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF $\alpha$ )] serum düzeyindeki artışla ilişkili olduğuda belirtilmiştir.

Sıçanlarda cerrahi olarak izole edilen kolonik segmentler *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ve *Streptococcus viridans* gibi bazı bakterilerle yeniden kolonize edildiğinde intestinal permeabilitenin arttığı, *Lactobacillus brevis*'nin ise intestinal permeabilityyi azalttığı gösterilmiştir (212). Bu sonuçlar bağırsak florası ile intestinal bariyer arasındaki etkileşmelerin intestinal permeabilityyi etkileyebileceğini göstermektedir. Hayvanlarda geliştirilen obesite ve Tip 2 diyabet modellerinde sıkı kavşak proteinlerinin bozulmasına bağlı olarak intestinal permeabilitenin arttığı, bunun sonucu bakteriyel endotoksinlerin yer değiştirdiği ve düşük dereceli sistemik enflamasyona neden olduğu tespit edilmiştir (213). İntestinal permeabilitydeki artışın sıkı kavşak proteinlerinin bozulması ve mikrobiotadaki değişikliklerle ilgili olduğu varsayıldığında değişikliklerin daha çok ince bağırsağın alt kısmı ve kalın bağırsakta olabileceği ifade edilmiştir (212).

Diyabette metformin hidroklorür (ya da bir başka maddenin) tek başına veya kombine halde verildiğinde intestinal permeabilitesini inceleyen bir çalışma bildiğimiz kadarıyla literatürde mevcut değildir. Bu nedenle bu çalışmadan elde edilen bulgular bir ilk niteliğindedir. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar

metformin hidroklorürün intestinal permeabilitesinin (jejunum hariç) Tip 2 diyabette kontrol grubuna göre önemli derecede arttığını göstermiştir. Ayrıca diyabette intestinal permeabilitenin kolon > ileum > jejunum sırasına göre azalması değişikliklerin daha çok ince bağırsağın alt kısmı ve kalın bağırsakta olabileceği tezini destekler niteliktedir. Ayrıca PMAT inhibitörü verapamilin diyabette tüm segmentlerden (jejunum, ileum ve kolon) permeabiliteyi önemli derecede azaltması bu absorptif taşıyıcı proteinin metformin hidroklorürün bağırsaklardan absorpsiyonu üzerindeki rolünü açıkça ortaya koymaktadır. Dolayısıyla metformin hidroklorürün sadece verapamille değil başka PMAT inhibitörleriyle birlikte kullanılması bu etkin maddenin intestinal permeabilite/absorpsiyon ve biyoyararlanımını önemli oranda azaltabilecektir. Metformin hidroklorür repaglinidle birlikte kullanıldığında ileum ve kolondaki permeabilitesi diyabette önemli derecede azalmıştır. Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada metformin hidroklorürün absorpsiyonunun tüm bağırsak segmentlerinden gerçekleştiği (verilen dozun %20'si duodenumdan, %60'ı jejunum ve ileumdan absorplanmaktadır, kolona dozun %20'si ulaşmakla birlikte bu segmentten absorplanmamaktadır) belirtilmiştir (214) ancak diyabette bağırsak segmentlerinden absorpsiyon konusunda literatürde herhangi bir bilgi yoktur. Diyabette, intestinal permeabilitedeki değişikliklerin daha çok ince bağırsağın alt kısmı ve kalın bağırsakta olabileceği (212) varsayıldığında, repaglinidle birlikte verildiğinde ileal ve kolonik permeabilitede gözlenen bu azalma metformin hidroklorürün absorpsiyon ve biyoyararlanımı üzerinde etkili olabileceğini işaret etmektedir. Permeabilitedeki bu azalma metforminin biyoyararlanımını azaltabileceği için klinikte metformin ve repaglinidi kombine kullanan hastalarda aynı etkinin görülebilmesi için metforminin dozunun artırılması gerekebilir. Metformin hidroklorür gliburid ile birlikte kullanıldığında ise sadece ileumdan permeabilitesi diyabette önemli derecede azalmıştır. Yine benzer şekilde gliburidle yapılan kombine tedavide metforminin biyoyararlanımı azalabileceği için klinikte doz ayarlaması gerekebilir. Çalışmamızda CYP3A4 inhibitörü ketokonazol gliburid veya repaglinidle birlikte kullanılarak metforminin permeabilitesi üzerine etkisi araştırılmış olup, gliburidle birlikte kullanıldığında sadece jejunumda, repaglinidle birlikte kullanıldığında ise sadece ileumda permeabilitede azalmaya neden olduğu

bulunmuştur. Diyabette farklı bağırsak segmentlerinden metformin hidroklorürün absorpsiyon derecesi bilinmediğinden ketokonazolün gliburidle veya repaglinidle birlikte kullanıldığında biyoyararlanımı ne oranda etkileyebileceğini öngörmek zordur. Bu maddeler kullanılarak gerçekleştirilecek *in vivo* çalışmalar bu konuya açıklık getirecektir. Yapılan araştırmalarda diyabette kan ve plazma viskozitesinin arttığı (215), gastrik pH'nın arttığı (214), gastrik ve intestinal boşalmanın geciktiği (216) ve peristaltik hareketlerin değiştiği (217) tespit edilmiştir. Bu değişikliklere bağlı olarak diyabette ilaç biyoyararlanımının da değişmesi söz konusudur. Ancak ilaçların biyoyararlanımı üzerine diyabetin etkisi inceleyen *in vivo* çalışmalarda bazı ilaçların biyoyararlanımı artarken (domperidon gibi), bazılarının biyoyararlanımının azaldığı (tolazamid, antipirin, aminoglikazid, benzilpenisilin gibi), bazılarında ise biyoyararlanımda değişme olmadığı (metoklopramit gibi) bulunmuştur (218-222). Genelleme yapmak zor olduğu için durum her madde için ayrı ayrı incelenmelidir.

### 5.5. İnsan Absorpsiyon Derecesinin Kestirimi Çalışmaları

Farklı türler arasında farmakokinetik parametrelerin ekstrapolasyonu amacıyla farklı yöntemler (alometri, fizyolojik farmakokinetik model gibi) kullanılmaktadır. Fagerholm ve diğ. 1996 yılında sıçanlarda yapılan *in situ* perfüzyon deneylerinden elde edilen permeabilite değerlerini kullanarak bir takım denklemler aracılığı ile insan absorpsiyon derecelerinin kestirilebileceğini göstermişlerdir (151). Bizim çalışmamızda da bu denklemler kullanılarak metformin için tüm gruplarda her bir bağırsak segmentinden insan absorpsiyon dereceleri kestirimi yapılmıştır.

Fizyolojik pH'larda net pozitif yüküne ve önemli derecede hidrofilik özelliğine rağmen metforminin GI kanaldan absorpsiyonunun yüksek olduğu belirtilmiştir. Metforminin absorplanan fraksiyonu %65-80 civarında olup verilen dozun %20-35'i feçesle atılmaktadır (223). Metformin hidroklorürün oral biyoyararlanımı ise %50-60 arasındadır (224). Bir ilacın ölçülen biyoyararlanımı (F), absorplanan fraksiyon (Fa), GI kanal duvarındaki metabolizasyondan kaçan ilaç fraksiyonu (Fg) ve karaciğerdeki metabolizasyondan kaçan ilaç fraksiyonunun (Fh)

net sonucudur ( $F = F_a \times F_g \times F_h$ ). Metforminin GI kanal duvarında ve karaciğerde metabolize olmadığı (225) göz önünde bulundurulduğunda oral biyoyararlanımın düşük olması enterositlerde (226) ve karaciğerde (227) birikmesine, verilen dozun bir kısmının absorplanmadan feçesle atılmasına bağlanabilir. Çalışmamızda sıçanlardan tayin edilen intestinal permeabilite değerleri kullanılarak metformin hidroklorürün insanlardaki absorpsiyon derecesi kestirilmiş ve bu değerler tüm gruplarda %100'e yakın bulunmuştur. Absorplanan fraksiyonun bu kadar yüksek olması türler arasında intestinal permeabilitenin farklı olmasına, hesaplamada kullanılan denklemlerin metformin hidroklorür sonuçlarına uygulanabilirliğinde sorun olmasına bağlı olabilir.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

1. Nikotinamid ve streptozotosin kullanılarak Tip 2 diyabet başarıyla geliştirilmiştir.
2. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre Sınıf 1'de yer alan metoprolol tartarat referans olarak kullanıldığında, metformin hidroklorür permeabilitesi kontrol grubunda jejunumda benzer, ileumda yüksek ve kolonda düşük bulunmuştur. Diyabet geliştirilmiş hayvanlarda ise metformin hidroklorürün permeabilitesi tüm bağırsak segmentlerinde metoprolol tartarattan daha yüksek bulunmuştur.
3. Metformin hidroklorürün bağırsaklardan permeabilitesi üzerine diyabet ilaçları (gliburid, repaglinid), PMAT inhibitörü (verapamil) ve CYP3A4 inhibitörü (ketokonazol) etkisi hem kontrol hem de diyabet geliştirilmiş sıçanlarda farklı bağırsak segmentlerinin eş zamanlı perfüzyonuna imkan veren üçlü bağırsak perfüzyonu tekniği kullanılarak incelenmiştir.
  - a. Metformin hidroklorürün intestinal permeabilitesinin (jejunum hariç) Tip 2 diyabette kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı, diyabette intestinal permeabilitenin kolon > ileum > jejunum sırasına göre azaldığı bulunmuştur.
  - b. PMAT inhibitörü verapamil diyabette tüm segmentlerden (jejunum, ileum ve kolon) metformin hidroklorürün permeabilitesini önemli derecede azalttığı bulunmuştur. Verapamilin Caco-2 hücrelerinden metformin hidroklorürün permeabilitesini önemli derecede azalttığı bulunmuştur.
  - c. Metformin hidroklorür repaglinidle birlikte kullanıldığında ileum ve kolondaki permeabilitesinin diyabette önemli derecede azaldığı bulunmuştur. Perfüzyon çözeltilisine repaglinidle birlikte CYP3A4



inhibitörü ketokonazol ilave edildiğinde metformin hidroklorürün ileumdan permeabilitesinde anlamlı derecede azalmaya neden olduğu bulunmuştur.

d. Metformin hidroklorür gliburid ile birlikte kullanıldığında ileumdan permeabilitesinin diyabette önemli derecede azaldığı bulunmuştur. Perfüzyon çözeltisine gliburidle birlikte CYP3A4 inhibitörü ketokonazol ilave edildiğinde metformin hidroklorürün jejunumdan permeabilitesinde anlamlı derecede azalmaya neden olduğu bulunmuştur.

4. Sıçanlarda yapılan *in situ* bağırsak perfüzyonu tekniği ile elde edilen permeabilite değerleri kullanılarak insan absorpsiyon dereceleri kestirilmiş, ve bu değerler %100'e yakın bulunmuştur.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular diyabette intestinal permeabilitenin değiştiğini kanıtlar niteliktedir (Tablo 5.1).

**Tablo 5.1.** Permeabilitede gözlenen değişimler

	Kontrol (K) /Diyabet (D)	Jejunum	İleum	Kolon
Grup 2	K	↓	↑	↓
	D	↓	↓	↓
Grup 3	K	↓	↓	↓
	D	↓	↓	↓
Grup 4	K	↑	↑	↓
	D	↓	↓	↑
Grup 5	K	↓	↓	↓
	D	↓	↑	↓
Grup 6	K	↓	↓	↑
	D	↑	↓	↓

↓ Permeabilitedeki azalmayı ifade eder

↑ Permeabilitedeki artışı ifade eder

Değişikliğin kaynağını araştırmak amacıyla kontrol ve diyabet geliştirilmiş sıçanlarda model ilaç uygulamadan önce ve uygulandıktan sonra perfüze edilen bağırsak segmentleri histopatolojik olarak incelenerek sıkı kavşak yapısında değişiklik olup olmadığı araştırılabilir. Ayrıca diyabette permeabilitede gözlenen değişikliklerin metformin hidroklorürün biyoyararlanımına ne derecede yansıtacağını incelemek amacıyla hem kontrol hem de diyabet geliştirilmiş sıçanlarda repaglinid, gliburid, verapamil ve ketokonazol kullanılarak *in vivo* çalışma yapılabilir. Ayrıca Caco-2 hücre hatlarından metformin hidroklorürün permeabilitesine gliburid, repaglinid ve ketokonazolün etkisi araştırılabilir.



**KAYNAKLAR**

1. Kayaalp, S.O. (1981). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (c. 1). Ankara: Nüve Matbaası.
2. Rowland, M., Tozer, T. N. (2011). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
3. Aulton, M. E. (2007). Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. London: Churchill Livingstone Elsevier.
4. Singh, R. P., Rathore, D. S. (2012). Gastroretention: a means to address regional variability in intestinal drug absorption. *Pharmacophore*, 3 (6), 287-300.
5. Washington, N., Washington, C., Wilson, C.G. (2001). Physiological Pharmaceutics: Barriers to Drug Absorption (2 bs.). New York: Taylor and Francis, Cornwall.
6. Channer, K. S., Virjee, J. P. (1986). The effect of size and shape of tablets on their esophageal transit. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 26 (2), 141-146.
7. Rubin, D. C. (2009). Small Intestine: Anatomy and Structural Anomalies. Textbook of Gastroenterology (s. 1085-1107): Blackwell Publishing Ltd.
8. Biber, B., Lundgren, O., Svanvik, J. (1973). The influence of blood flow on the rate of absorption of <sup>85</sup>Kr from the small intestine of the cat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 89 (2), 227-238.
9. Pang, K. S. (2003). Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series). *Drug Metabolism and Disposition*, 31 (12), 1507-1519.
10. Şener, E. (2010). Barsaklardan İlaç Absorpsiyonu Üzerine Kapsaisin Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

11. Lakshmi, P. J., Deepthi, B., Rama, R. N. (2012). Rectal drug delivery: a promising route for enhancing drug absorption. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 2 (4), 143-149.
12. Hillyer, J. F., Albrecht, R. M. (2001). Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90 (12), 1927-1936.
13. Jonker, J. W., Wagenaar, E., van Deemter, L., Gottschlich, R., Bender, H. M., Dasenbrock, J. ve diğeri. (1999). Role of blood-brain barrier P-glycoprotein in limiting brain accumulation and sedative side-effects of asimadoline, a peripherally acting analgaesic drug. *British Journal of Pharmacology*, 127 (1), 43-50.
14. Kwon, Y. (2002). Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists. San Diego, California: Bioneer Life Science.
15. Chillistone, S., Hardman, J. (2008). Factors affecting drug absorption and distribution. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 9 (4), 167-171.
16. Horter, D., Dressman, J.B. (2001). Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46 (1-3), 75-87.
17. Grass, G.M. (1997). Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23 (1-3), 199-219.
18. Schanker, L.S. (1960). On the mechanism of absorption of drugs from the gastrointestinal tract. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 2 (4), 343-359.
19. Egan, W.J., Lauri, G. (2002). Prediction of intestinal permeability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (3), 273-289.

20. Shargel, L., Yu, A. (1993). *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*: London: Prentice-Hall International Inc.
21. Jamei, M., Turner, D., Yang, J., Neuhoff, S., Polak, S., Rostami-Hodjegan, A. ve diğeri. (2009). Population-based mechanistic prediction of oral drug absorption. *The AAPS Journal*, 11 (2), 225-237.
22. Hirtz, J. (1985). The gastrointestinal absorption of drugs in man: a review of current concepts and methods of investigation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 19 Suppl 2, 77S-83S.
23. Bardeesy, N., DePinho, R.A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*, 2 (12), 897-909.
24. Brunton, L., Chabner, B., Knollman, B. (2011). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12 bs.). San Diego, California.
25. Ritschel, W.A., Denson, D.D. (1991). *Influence of Disease on Bioavailability*. New York: Marcel Dekker.
26. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (2012). *Guidance for Industry Drug Interaction Studies —Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations*. Erişim: 5.7.2015, Ağ Sitesi: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>
27. Martinez, M. N., Amidon, G. L. (2002). A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42 (6), 620-643.
28. Takamatsu, N., Welage, L. S., Idkaidek, N. M., Liu, D.-Y., Lee, P.I.-D., Hayashi, Y. ve diğeri. Human intestinal permeability of piroxicam,

propranolol, phenylalanine, and peg 400 determined by jejunal perfusion. *Pharmaceutical Research*, 14 (9), 1127-1132.

29. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products For Human Use. (2010). Guideline on the Investigation of Bioequivalence. Erişim: 3.8.2015, Ağ Sitesi: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf)
30. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (2000). Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Erişim: 8.8.2015, Ağ Sitesi: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/3657gd3.pdf>
31. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (2015). 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. Erişim: 1.9.2015, Ağ Sitesi: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>
32. Fawcett, D. (1994). *A Text Book of Histology*. New York: Chapman&Hall.
33. Moore, K. L., Persaud, T.V. N., Torchia, M. G. (1993). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* (10 bs.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
34. Ross, M. H., Kaye, G. I., Pawlina, W. (2011). *Histology: A Text and Atlas: With Cell and Molecular Biology* (6 bs.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
35. Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R., Fletcher, A. A. (1991). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. *Canadian Medical Association Journal*, 145 (10), 1281-1286.

36. Correia, M., Neves-Petersen, M. T., Jeppesen, P. B., Gregersen, S., Petersen, S. B. (2012). UV-Light Exposure of Insulin: Pharmaceutical Implications upon Covalent Insulin Dityrosine Dimerization and Disulphide Bond Photolysis. *PLoS ONE*, 7 (12), 1-19.
37. MacDonald, P. E., Rorsman, P. (2006). Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic beta cells. *PLoS Biology*, 4 (2), 167-171.
38. Guyton, A. C., Hall, J. E. (2006). Textbook of Medical Physiology (11 bs.). Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders.
39. Mealey, B. L., Ocampo, G. L. (2007). Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology 2000*, 44, 127-153.
40. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (t.y.). Erişim: 19.10.2015, Ağ Sitesi: <http://diyabet.gov.tr/index.php?lang=tr&page=32>
41. Society for Endocrinology BES 2014 (t.y.). Erişim: 5.9.2015, Ağ Sitesi: <http://www.endocrine-abstracts.org/ea/0034/SFEBES2014AbstractBook.pdf>
42. Rosenfeld, L. (2002). Insulin: discovery and controversy. *Clinical Chemistry*, 48 (12), 2270-2288.
43. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27 (5), 1047-1053.
44. Health Intelligence Prevalence of Diabetes in the World, 2013 (t.y.). Erişim: 9.12.2014, Ağ Sitesi: <http://healthintelligence.drupalgardens.com/content/prevalence-diabetes-world-2013>
45. Navas-Acien, A., Silbergeld, E. K., Streeter, R. A., Clark, J. M., Burke, T. A., Guallar, E. (2006). Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of

- the experimental and epidemiological evidence. *Environmental Health Perspectives*, 114 (5), 641-648.
46. Donovan, D. (2002). *Principles of Diabetes Mellitus*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.
  47. Bastaki, W., Mothaffer, F., Varro, J., Al-Ghanim, M., Malak, L., Ayyash, E. ve diğeri. (2005). Primary hepatic carcinoid tumor. *Medical Principles Practice*, 14 (4), 288-291.
  48. Skyler, J. S. (2004). Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (17), 4113-4117.
  49. Clark, C. M. Jr., Lee, D. A. (1995). Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 332 (18), 1210-1217.
  50. Sacks, D. B., Arnold, M., Bakris, G. L., Bruns, D. E., Horvath, A. R., Kirkman, M. S. ve diğeri. (2011). Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 34 (6), e61-99.
  51. American Diabetes Association. (2004). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 27 Suppl 1, S5-S10.
  52. American Diabetes Association. (2007). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 30 Suppl 1, S42-47.
  53. US. Department of Health and Human Services. Diagnosis of Diabetes and Prediabetes. (t.y.). Erişim: 7.7.2015, Ağ Sitesi: <http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/diagnosis/>
  54. Krook, A. (2011). A balancing act of optimising insulin dose and insulin sensitivity in type 1 diabetes. *Journal of Endocrinology*, 211 (1), 1-2.



55. American Diabetes Association. (2007). Standards of medical care in diabetes-2007. *Diabetes Care*, 30 Suppl 1, S4-S41.
56. Barag, S. H. (2011). Insulin therapy for management of type 2 diabetes mellitus: strategies for initiation and long-term patient adherence. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 111 (7 Suppl 5), S13-19.
57. U.S. Department of Health and Human Services. Diabetes. (t.y.) Erişim: 2.5.2015, Ağ Sitesi: <http://www.niddk.nih.gov/about-niddk/research-areas/diabetes/Pages/diabetes.aspx>
58. Karakurt, F. (2009). Gestasyonel diabetes mellitus tanı ve tedavisi. *Yeni Tıp Dergisi*, 26 (3), 134-138.
59. Setji, T. L., Brown, A.J.,Feinglos, M.N. (2005). Gestational diabetes mellitus. *Clinical Diabetes*, 23 (1), 17-24.
60. Buchanan, T. A., Xiang, A. H. (2005). Gestational diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 115 (3), 485-491.
61. American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 34 Suppl 1, S62-69.
62. Alkharfy, K. M. (2009). Influence of overt diabetes mellitus on cyclosporine pharmacokinetics in a canine model. *Experimental Diabetes Research* 2009, 1-6.
63. Daily, E. B., Aquilante, C. L. (2009). Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies. *Pharmacogenomics*, 10 (9), 1489-1510.
64. Kim, K. A., Park, J. Y. (2003). Inhibitory effect of glyburide on human cytochrome p450 isoforms in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 31 (9), 1090-1092.
65. Zhou, M., Xia, L.,Wang, J. (2007). Metformin transport by a newly cloned proton-stimulated organic cation transporter (plasma membrane monoamine

- transporter) expressed in human intestine. *Drug Metabolism and Disposition*, 35 (10), 1956-1962.
66. Kalliokoski, A., Neuvonen, M., Neuvonen, P. J., Niemi, M. (2008). The effect of SLCO1B1 polymorphism on repaglinide pharmacokinetics persists over a wide dose range. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 66 (6), 818-825.
67. Graham, G. G., Punt, J., Arora, M., Day, R. O., Doogue, M. P., Duong, J. K. ve diğerleri. (2011). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, 50 (2), 81-98.
68. Lee, D. Y., Lee, M. G., Shin, H. S., Lee, I. (2007). Changes in omeprazole pharmacokinetics in rats with diabetes induced by alloxan or streptozotocin: faster clearance of omeprazole due to induction of hepatic CYP1A2 and 3A1. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 10 (4), 420-433.
69. Nakamoto, T., Oda, Y., Imaoka, S., Funae, Y., Fujimori, M. (1997). Effect of phenobarbital on the pharmacokinetics of lidocaine, monoethylglycinexylidide and 3-hydroxylidocaine in the rat: correlation with P450 isoform levels. *Drug Metabolism and Disposition*, 25 (3), 296-300.
70. Yang, K. H., Choi, Y. H., Lee, U., Lee, J. H., Lee, M. G. (2009). Effects of cytochrome P450 inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous furosemide in rats: involvement of CYP2C11, 2E1, 3A1 and 3A2 in furosemide metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61 (1), 47-54.
71. Lee, J. H., Lee, M.G. (2008). Telithromycin pharmacokinetics in rat model of diabetes mellitus induced by alloxan or streptozotocin. *Pharmaceutical Research*, 25 (8), 1915-1924.
72. Cheng, Q., Aleksunes, L. M., Manautou, J. E., Cherrington, N. J., Scheffer, G. L., Yamasaki, H. ve diğerleri. (2008). Drug-metabolizing enzyme and transporter expression in a mouse model of diabetes and obesity. *Molecular Pharmaceutics*, 5 (1), 77-91.

73. Havas, S., Donner, T. (2006). Tight control of type 1 diabetes: recommendations for patients. *American Family Physician*, 74 (6), 971-978.
74. Chakrabarti, R., Rajagopalan, R. (2002). Diabetes and insulin resistance associated disorders: disease and the therapy. *Current Science-Bangalore-*, 83 (12), 1533-1538.
75. Krentz, A. J., Ferner, R. E., Bailey, C. J. (1994). Comparative tolerability profiles of oral antidiabetic agents. *Drug Safety*, 11 (4), 223-241.
76. Çorakçı, A. (15.6.2011). Tip II Diabetes Mellitus'da İlaç Seçimi. Erişim, <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastalıkları/files/kitaplar/130.pdf>.
77. İrer, S.V., Alper, G. (2004). Deneysel diyabet modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 127-136.
78. Nagafuchi, S., Toniolo, A. (2015). Viral diabetes: Virus diabetogenicity and host susceptibility. *Immunoendocrinology*, 2, 1-13.
79. Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50 (6), 537-546.
80. Bolzan, A. D., Bianchi, M. S. (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research*, 512 (2-3), 121-134.
81. Srinivasan, K., Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian Journal of Medical Research*, 125 (3), 451-472.
82. Shirwaikar, A., Rajendran, K., Dinesh Kumar, C., Bodla, R. (2004). Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 91 (1), 171-175.
83. Degirmenci, I., Kalender, S., Ustuner, M. C., Kalender, Y., Gunes, H.V., Unal, N. ve diğerleri. (2002). The effects of acarbose and *Rumex patientia* on liver

- ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic (type II) rats. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 28 (6), 229-234.
84. Sokeng, S., Rokeya, B., Mostafa, M., Nahar, N., Mosihuzzaman, M., Ali, L. ve diğeri. (2005). Antihyperglycemic effect of *bridelia ndellensis* ethanol extract and fractions in streptozotocin induced diabetic rats. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative medicines*, 2(2), 94-102.
85. Abeeleh, M. A., Ismail, Z. B., Alzaben, K. R., Abu-Halaweh, S. A., Al-Essa, M. K., Abuabeeleh, J. ve diğeri. (2009). Induction of diabetes mellitus in rats using intraperitoneal streptozotocin: a comparison between 2 strains of rats. *European Journal of Scientific Research*, 32 (3), 398.
86. Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A., Nakano, R., Someya, Y., Shibasaki, M. (2008). Effects of antidiabetic drugs on glucose tolerance in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic mice. *Hormone and Metabolic Research*, 40 (12), 880-886.
87. Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D. ve diğeri. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 47 (2), 224-229.
88. Martindale. (2009). *The Complete Drug Reference* (32 bs.). London: Pharmaceutical Press.
89. Deng, B., Shi, A., Kang, Y., Li, L. (2011). Determination of metformin hydrochloride using precolumn derivatization with acetaldehyde and capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence. *Luminescence*, 26 (6), 592-597.
90. Madhukar, A., Prince, A., Vijay Kumar, R., Sanjeeva, Y., Jagadeeshwar, K., Raghupratap, D. (2011). Simple and sensitive analytical method development

and validation metformin hydrochloride by RP-HPLC. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 117-120.

91. Cheng, C.L., Chou, C.H. (2001). Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 762 (1), 51-58.
92. Bhamare, P. C., Bari, S. B., Natarajan, S., Patil, A. A., Patil, S. H., Shirode, P. T. (2011). Development and Validation of a precise single stability indicating HPLC method for determinations of metformin hydrochloride and fenofibrate, in pure form and in pharmaceutical tablets. *International Journal of PharmTech Research*, 3 (1), 505-515.
93. Davidson, M. B., Peters, A. L. (1997). An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Medicine*, 102 (1), 99-110.
94. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Metformin Hydrochloride Tablets. (t.y.). Erişim: 12.08.2015, Ağ Sitesi: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/May02/053102/800471e6.pdf>
95. Setter, S. M., Iltz, J. L., Thams, J., Campbell, R. K. (2003). Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical review with a focus on dual therapy. *Clinical Therapeutics*, 25 (12), 2991-3026.
96. Wu, C.Y., Benet, L. Z. (2005). Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical Research*, 22 (1), 11-23.
97. Choi, M.-K., Song, I.-S. (2008). Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23 (4), 243-253.

98. Wang, D. S., Kusuhara, H., Kato, Y., Jonker, J. W., Schinkel, A. H., Sugiyama, Y. (2003). Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Molecular Pharmacology*, 63 (4), 844-848.
99. Higgins, J. W., Bedwell, D. W., Zamek-Gliszczyński, M. J. (2012). Ablation of both organic cation transporter (OCT)1 and OCT2 alters metformin pharmacokinetics but has no effect on tissue drug exposure and pharmacodynamics. *Drug Metabolism and Disposition*, 40 (6), 1170-1177.
100. Muller, J., Lips, K. S., Metzner, L., Neubert, R. H., Koepsell, H., Brandsch, M. (2005). Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochemical Pharmacology*, 70 (12), 1851-1860.
101. Yoon, H., Cho, H. Y., Yoo, H. D., Kim, S. M., Lee, Y. B. (2013). Influences of organic cation transporter polymorphisms on the population pharmacokinetics of metformin in healthy subjects. *The AAPS Journal*, 15 (2), 571-580.
102. Sachin, S., Srinivasan, K., Gowthamarajan, K., Narayan, G. (2010). Development and validation of discriminatory dissolution procedure for poorly soluble glyburide. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 205-212.
103. Shuster, D. L., Risler, L. J., Prasad, B., Calamia, J. C., Voellinger, J. L., Kelly, E. J. ve diğerleri. (2014). Identification of CYP3A7 for glyburide metabolism in human fetal livers. *Biochemical Pharmacology*, 92 (4), 690-700.
104. Cygalova, L. H., Hofman, J., Ceckova, M., Staud, F. (2009). Transplacental pharmacokinetics of glyburide, rhodamine 123, and BODIPY FL prazosin: effect of drug efflux transporters and lipid solubility. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331 (3), 1118-1125.
105. Kirchheiner, J., Brockmoller, J., Meineke, I., Bauer, S., Rohde, W., Meisel, C. ve diğerleri. (2002). Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 71 (4), 286-296.

106. Lakshmi, K.S., Rajesh, T. (2011). Separation and quantification of eight antidiabetic drugs on a high-performance liquid chromatography: its application to human plasma assay. *International Scholarly Research Notices: Pharmaceutics*, 2011, 1-7.
107. Georgita, C., Albu, F., David, V., Medvedovici, A. (2007). Simultaneous assay of metformin and glibenclamide in human plasma based on extraction-less sample preparation procedure and LC/(APCI)MS. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 854 (1-2), 211-218.
108. Olsen, K. M., Kearns, G. L., Kemp, S.F. (1995). Glyburide protein binding and the effect of albumin glycation in children, young adults, and older adults with diabetes. *Journal of Clinical Pharmacology*, 35 (7), 739-745.
109. Jonsson, A., Rydberg, T., Sterner, G., Melander, A. (1998). Pharmacokinetics of glibenclamide and its metabolites in diabetic patients with impaired renal function. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 53 (6), 429-435.
110. Jaber, L.A., Antal, E. J., Slaughter, R. L., Welshman, I. R. (1993). The pharmacokinetics and pharmacodynamics of 12 weeks of glyburide therapy in obese diabetics. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 45 (5), 459-463.
111. Yetiv, J. Z. (1981). Recent Advances in Diabetes Research and Therapy. Hypertension, Cardiovascular Disease, Analgesics, and Endocrine Disorders (s. 141-173): Academic Press.
112. Nobel İlaç Gliben Tablet. (t.y.). Erişim: 12.12.2014, Ağ Sitesi: <http://www.nobel.com.tr/Dosyalar/Gliben.pdf>
113. Sugiyama, Y., Steffansen, B. (2013). Transporters in Drug Development Discovery, Optimization, Clinical Study and Regulation (1 bs.): Springer-Verlag New York.

114. Jiladia, M. A., Pandya, S. S. (2009). Estimation of repaglinide in bulk and tablet dosage forms by HPTLC method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1 (1), 141-144.
115. Ruzilawati, A. B., Wahab, M. S. A., Imran, A., Ismail, Z., Gan, S. H. (2007). Method development and validation of repaglinide in human plasma by HPLC and its application in pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (5), 1831-1835.
116. Kumar, D.A., Kumar, P. K., Ranjita, D., Murthy, P.N., Kumar, P.A. (2011). Method development, validation and stability study of repaglinide in bulk and pharmaceutical dosage form by UV spectrometric method. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 2 (1), 7-10.
117. Ambavane, V., Patil, R., Ainapure, S. S. (2002). Repaglinide: a short acting insulin secretagogue for postprandial hyperglycaemia. *Journal of Postgraduate Medicine*, 48 (3), 246-248.
118. Niemi, M., Backman, J. T., Juntti-Patinen, L., Neuvonen, M., Neuvonen, P. J. (2005). Coadministration of gemfibrozil and itraconazole has only a minor effect on the pharmacokinetics of the CYP2C9 and CYP3A4 substrate nateglinide. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 60 (2), 208-217.
119. Okada, M., Takezawa, D., Tachibanaki, S., Kawamura, S., Tokumitsu, H., Kobayashi, R. (2003). Neuronal calcium sensor proteins are direct targets of the insulinotropic agent repaglinide. *Biochemical Journal*, 375 (1), 87-97.
120. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Prandin (Repaglinide Tablets). (t.y.). Erişim: 22.10.2014, Ağ Sitesi:  
[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/020741s0351bl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020741s0351bl.pdf)
121. Medicinet. Repaglinide, Prandin. (t.y.). Erişim: 11.12.2014, Ağ Sitesi:  
<http://www.medicinenet.com/repaglinide/article.htm>



122. Balfour, J.A., Faulds, D. (2012). Repaglinide. *Drugs & Aging*, 13 (2), 173-180.
123. Hatorp, V., Walther, K.H., Christensen, M. S., Haug-Pihale, G. (2000). Single-dose pharmacokinetics of repaglinide in subjects with chronic liver disease. *Journal of Clinical Pharmacology*, 40 (2), 142-152.
124. Tsume, Y., Amidon, G. L., Takeuchi, S. (2013). Dissolution effect of gastric and intestinal pH for a BCS class II drug, pioglitazone: New in vitro dissolution system to predict in vivo dissolution. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, 5 (6), 224-227.
125. Novotna, A., Krasulova, K., Bartonkova, I., Korhonova, M., Bachleda, P., Anzenbacher, P. ve diğeri. (2014). Dual effects of ketoconazole cis-enantiomers on CYP3A4 in human hepatocytes and HepG2 Cells. *PLoS One*, 9 (10), e111286.
126. Perdaems, N., Blasco, H., Vinson, C., Chenel, M., Whalley, S., Cazade, F. ve diğeri. (2010). Predictions of metabolic drug-drug interactions using physiologically based modelling: Two cytochrome P450 3A4 substrates coadministered with ketoconazole or verapamil. *Clinical Pharmacokinetics*, 49 (4), 239-258.
127. Thorn, H. A., Hedeland, M., Bondesson, U., Knutson, L., Yasin, M., Dickinson, P. ve diğeri. (2009). 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. *Drug Metabolism and Disposition*, 37 (11), 2186-2196.
128. Vogelpoel, H., Welink, J., Amidon, G. L., Junginger, H. E., Midha, K. K., Moller, H. ve diğeri. (2004). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93 (8), 1945-1956.

129. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Lopressor. (t.y.). Erişim: 31.01.2015, Ağ Sitesi: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/017963s064lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/017963s064lbl.pdf)
130. Cleland, J. G., Bristow, M.R., Erdmann, E., Remme, W. J., Swedberg, K., Waagstein, F. (1996). Beta-blocking agents in heart failure. Should they be used and how? *European Heart Journal*, 17 (11), 1629-1639.
131. Bristow, M. R. (2000). Beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*, 101 (5), 558-569.
132. Dahan, A., West, B. T., Amidon, G. L. (2009). Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36 (2-3), 320-329.
133. Santa Cruz Biotechnology. Phenol Red (CAS 143-74-8) (t.y.). Erişim: 27.11.2012, Ağ Sitesi: <http://www.scbt.com/datasheet-203752-phenol-red.html>
134. Wagner, D., Spahn-Langguth, H., Hanafy, A., Koggel, A., Langguth, P. (2001). Intestinal drug efflux: formulation and food effects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50 Suppl 1, S13-31.
135. Güder, F. (2011). Kurkuminin Barsaklardan İlaç absorpsiyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
136. Ateş, M. (2013). Barsaklardan Paraselüler İlaç Absorpsiyonu Üzerine Permeabilite Artırıcı Ajanların Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
137. Kaynak, M. S., Buyutuncel, E., Cagler, H. J., Sahin, S. (2015). Determination of regional intestinal permeability of diclofenac and metoprolol using a newly-developed and validated high performance liquid chromatographic method. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (1), 163-170.

138. Kravchuk, E., Grineva, E., Bairamov, A., Galagudza, M., Vlasov, T. (2011). The effect of metformin on the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the rat model of diabetes mellitus type II. *Experimental Diabetes Research*, 2011, 1-5.
139. Jain, S., Saraf, S. (2009). Repaglinide-loaded long-circulating biodegradable nanoparticles: Rational approach for the management of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes*, 1 (1), 29-35.
140. Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N., Salleh, M.S., Gurtu, S. (2011). Glibenclamide or metformin combined with honey improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Sciences*, 7 (2), 244-252.
141. Varma, M. V., Kapoor, N., Sarkar, M., Panchagnula, R. (2004). Simultaneous determination of digoxin and permeability markers in rat in situ intestinal perfusion samples by RP-HPLC. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 813 (1-2), 347-352.
142. Song, N. N., Li, Q. S., Liu, C. X. (2006). Intestinal permeability of metformin using single-pass intestinal perfusion in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 12 (25), 4064-4070.
143. Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Azarmi, Y., Jalali, M. B., Tajerzadeh, H. (2006). Simultaneous determination of metoprolol, propranolol and phenol red in samples from rat in situ intestinal perfusion studies. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 (2), 102-108.
144. Tannergren, C., Knutson, T., Knutson, L., Lennernas, H. (2003). The effect of ketoconazole on the in vivo intestinal permeability of fexofenadine using a regional perfusion technique. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55 (2), 182-190.

145. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use Harmonisation. (1996). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2R1. Erişim: 2.5.2015. Ağ Sitesi: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)
146. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (2001). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Erişim: 14.5.2011. Ağ Sitesi: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>
147. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (1994). Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods. Erişim: 14.5.2011, Ağ Sitesi: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM134409.pdf%20CDER%20Validation%20of%20Chromatographic%20methods>
148. Definition: Tailing factor. (t.y.). Erişim: 12.12.2015, Ağ Sitesi: <http://www.lcresources.com/resources/TSWiz/hs160.htm>
149. Bidlingmeyer, B.A., Warren, F. V., Weston, A., Nugent, C., Froehlich, P. M. (1991). Some practical considerations when determining the void volume in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 29 (7), 275-279.
150. Kim, J. S., Mitchell, S., Kijek, P., Tsume, Y., Hilfinger, J., Amidon, G. L. (2006). The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I biowaiver requests. *Molecular Pharmaceutics*, 3 (6), 686-694.

151. Fagerholm, U., Johansson, M., Lennernas, H. (1996). Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharmaceutical Research*, 13 (9), 1336-1342.
152. Bhaskar, R., Bhaskar, R., Sagar, M. K., Saini, V. (2013). Multivariate chemometric assisted analysis of metformin hydrochloride, gliclazide and pioglitazone hydrochloride in bulk drug and dosage forms. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3 (1), 79-84.
153. Majidano, S. A., Khuhawar, M. Y. (2012). GC Determination of famotidine, ranitidine, cimetidine, and metformin in pharmaceutical preparations and serum using methylglyoxal as derivatizing reagent. *Chromatographia*, 75 (21), 1311-1317.
154. Shankar, M. B., Modi, V. D., Shah, D. A., Bhatt, K. K., Mehta, R. S., Geetha, M. ve diğerleri. (2005). Estimation of pioglitazone hydrochloride and metformin hydrochloride in tablets by derivative spectrophotometry and liquid chromatographic methods. *Journal of AOAC International*, 88 (4), 1167-1172.
155. Kolte, B. L., Raut, B. B., Deo, A. A., Bagool, M. A., Shinde, D. B. (2004). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of pioglitazone and metformin in pharmaceutical-dosage form. *Journal of Chromatographic Science*, 42 (1), 27-31.
156. Sharma, K., Pawar, G., Yadav, S., Giri, S., Rajagopal, S., Mullangi, R. (2013). LC-MS/MS-ESI method for simultaneous quantitation of metformin and repaglinide in rat plasma and its application to pharmacokinetic study in rats. *Biomedical Chromatography*, 27 (3), 356-364.
157. Garg, G., Saraf, S., Saraf, S. (2008). Spectrophotometric and column high-performance liquid chromatographic methods for simultaneous estimation of metoprolol tartrate and hydrochlorothiazide in tablets. *Journal of AOAC International*, 91 (5), 1045-1050.

158. Wahajuddin, Singh, S. P., Raju, K. S., Nafis, A., Jain, G. K. (2012). Simultaneous determination of nine model compounds in permeability samples using RP-HPLC: application to prove the cassette administration principle in single pass intestinal perfusion study in rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 67-68, 71-76.
159. Silva, F.R.M.B., Szpoganicz, B., Pizzolatti, M.G., Willrich, M.A.V., de Sousa, E. (2002). Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 83 (1–2), 33-37.
160. Usman, U., Bakar, A., Mohamed, M. (2015). A review on experimental methods of diabetic research: advantages and limitations. *Annual Research & Review in Biology*, 7 (2), 100-108.
161. Man, Z.W., Zhu, M., Noma, Y., Toide, K., Sato, T., Asahi, Y. ve diğeri. (1997). Impaired beta-cell function and deposition of fat droplets in the pancreas as a consequence of hypertriglyceridemia in OLETF rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes*, 46 (11), 1718-1724.
162. Yoon , J.-W., Austin , M., Onodera , T.,Notkins , A.L. (1979). Virus-induced diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 300 (21), 1173-1179.
163. Lipes, M.A., Eisenbarth, G. S. (1990). Transgenic mouse models of type I diabetes. *Diabetes*, 39 (8), 879-884.
164. Bonner-Weir, S., Trent, D.F., Weir, G.C. (1983). Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *Journal of Clinical Investigation*, 71 (6), 1544-1553.
165. Etuk, E. U. (2010). Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(2), 130-134.

166. Kumar, S., Singh, R., Vasudeva, N., Sharma, S. (2012). Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. *Cardiovascular Diabetology*, 11 (9), 1-13.
167. Degirmenci, I., Kalender, S., Ustuner, M. C., Kalender, Y., Gunes, H. V., Unal, N. ve diğeri. (2002). The effects of acarbose and Rumex patientia on liver ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic (type II) rats. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 28 (6), 229-234.
168. Shirwaikar, A., Rajendran, K., Barik, R. (2006). Effect of aqueous bark extract of *Garuga pinnata* Roxb. in streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 107 (2), 285-290.
169. Palsamy, P., Subramanian, S. (2009). Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 179 (2-3), 356-362.
170. Griffin, B., O'Driscoll, C. (2008). Models of the Small Intestine. C. Ehrhardt & K.-J. Kim (Ed.). *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models* (s. 34-76). Boston, MA: Springer US
171. Schanker, L. S., Tocco, D. J., Brodie, B. B., Hogben, C. A. (1958). Absorption of drugs from the rat small intestine. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 123 (1), 81-88.
172. Doluisio, J. T., Billups, N. F., Dittert, L. W., Sugita, E. T., Swintosky, J. V. (1969). Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58 (10), 1196-1200.
173. Barr, W. H. (1991). The Role of Intestinal Metabolism on Bioavailability. P. Welling, T. FLS. & D. SV. (Ed.). *Pharmaceutical bioequivalence* (s. 149-168). New York: Marcel Bekker

174. Komiya, I., Park, J. Y., Kamani, A., Ho, N. F. H., Higuchi, W. I. (1980). Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes. *International Journal of Pharmaceutics*, 4 (3), 249-262.
175. Ho, Y. F., Lai, M. Y., Yu, H. Y., Huang, D. K., Hsueh, W. C., Tsai, T. H. ve diğeri. (2008). Application of rat in situ single-pass intestinal perfusion in the evaluation of presystemic extraction of indinavir under different perfusion rates. *Journal of the Formosan Medical Association*, 107 (1), 37-45.
176. Kunes, M., Svoboda, Z., Kvetina, J., Herout, V., Herink, J., Bajgar, J. (2005). Intestinal single-pass in situ perfusion technique in rat: the influence of L-carnitine on absorption of 7-methoxytacrine. *Biomedical papers of the Medical Faculty of Palacký University, Olomouc, Czech Republic*, 149 (2), 433-435.
177. Crowe, A., Lemaire, M. In Vitro and In Situ Absorption of SDZ-RAD Using a human intestinal cell line (caco-2) and a single pass perfusion model in rats: comparison with rapamycin. *Pharmaceutical Research*, 15 (11), 1666-1672.
178. Cummins, C. L., Salphati, L., Reid, M. J., Benet, L.Z. (2003). In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by p-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305 (1), 306-314.
179. Patel, J. R., Barve, K. H. (2012). Intestinal permeability of lamivudine using single pass intestinal perfusion. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74 (5), 478-481.
180. Güneli, E. G., Ateş, M., Gümüştekin, M. (2012). Deneysel Hayvan Araştırmalarının Planlamasında Dikkat Edilecek Hususlar. O. Yücel (Ed.). Küçük Deney Hayvanlarından Rat. Ankara: Journal of Clinical and Analytical Medicine



181. MES hydrate (t.y.). Erişim: 09.08.2013, Ağ Sitesi: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/m2933pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/m2933pis.pdf)
182. Garrison, K. L., Sahin, S., Benet, L. Z. (2015). Few drugs display flip-flop pharmacokinetics and these are primarily associated with classes 3 and 4 of the BDDCS. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104 (9), 3229-3235.
183. Nicklin, P., Keates, A. C., Page, T., Bailey, C. J. (1996). Transfer of metformin across monolayers of human intestinal Caco-2 cells and across rat intestine. *International Journal of Pharmaceutics*, 128 (1-2), 155-162.
184. Harper, W., Clement, M., Goldenberg, R., Hanna, A., Main, A., Retnakaran, R. ve diğerleri. (2013). Canadian Diabetes Association 2013 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. *Canadian Journal of Diabetes*, 37(1), 10-227.
185. Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K. M., Altman, R. B., Klein, T. E. (2012). Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics*, 22 (11), 820-827.
186. Liang, X., Chien, H.-C., Yee, S. W., Giacomini, M. M., Chen, E.C., Piao, M. ve diğerleri. (2015). Metformin is a substrate and inhibitor of the human thiamine transporter, THTR-2 (SLC19A3). *Molecular Pharmaceutics*, 12 (12), 4301-4310.
187. Engel, K., Wang, J. (2005). Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Molecular Pharmacology*, 68 (5), 1397-1407.
188. Graefe-Mody, U., Rose, P., Ring, A., Zander, K., Iovino, M., Woerle, H. J. (2011). Assessment of the pharmacokinetic interaction between the novel DPP-4 inhibitor linagliptin and a sulfonylurea, glyburide, in healthy subjects. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26 (2), 123-129.

189. Jaakkola, T., Backman, J. T., Neuvonen, M., Laitila, J., Neuvonen, P. J. (2006). Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of pioglitazone. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 61 (1), 70-78.
190. Lorusso, P., Heath, E. I., McGreivy, J., Sun, Y. N., Melara, R., Yan, L. ve diğerleri. (2008). Effect of coadministration of ketoconazole, a strong CYP3A4 inhibitor, on pharmacokinetics and tolerability of motesanib diphosphate (AMG 706) in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 26 (5), 455-462.
191. Lane, M. E., Levis, K. A., Corrigan, O. I. (2006). Effect of intestinal fluid flux on ibuprofen absorption in the rat intestine. *International Journal of Pharmaceutics*, 309 (1-2), 60-66.
192. Curran, P. F., Solomon, A. K. (1957). Ion and water fluxes in the ileum of rats. *The Journal of General Physiology*, 41 (1), 143-168.
193. Wood, C. M., Grosell, M. (2012). Independence of net water flux from paracellular permeability in the intestine of *Fundulus heteroclitus*, a euryhaline teleost. *Journal of Experimental Biology*, 215 (3), 508-517.
194. Sutton, S. C., Rinaldi, M. T., Vukovinsky, K. E. (2001). Comparison of the gravimetric, phenol red, and <sup>14</sup>C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. *AAPS PharmSciTech*, 3 (3), 1-5.
195. French, A. B., Brown, I. F., Good, C. J., McLeod, G. M. Comparison of phenol red and polyethyleneglycol as nonabsorbable markers for the study of intestinal absorption in humans. *The American Journal of Digestive Diseases*, 13 (6), 558-564.
196. Dahan, A., Sabit, H., Amidon, G. L. (2009). Multiple efflux pumps are involved in the transepithelial transport of colchicine: combined effect of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 leads to decreased intestinal

- absorption throughout the entire small intestine. *Drug Metabolism and Disposition*, 37 (10), 2028-2036.
197. Rozehnal, V., Nakai, D., Hoepner, U., Fischer, T., Kamiyama, E., Takahashi, M. ve diğerleri. (2012). Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46 (5), 367-373.
198. Alvi, M. M., Chatterjee, P. (2014). A prospective analysis of co-processed non-ionic surfactants in enhancing permeability of a model hydrophilic drug. *AAPS PharmSciTech*, 15 (2), 339-353.
199. Proctor, W. R., Bourdet, D. L., Thakker, D. R. (2008). Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *Drug Metabolism and Disposition*, 36 (8), 1650-1658.
200. Lassoued, M. A., Khemiss, F., Sfar, S. (2011). Comparative study of two in vitro methods for assessing drug absorption: sartorius SM 16750 apparatus versus everted gut sac. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 14 (1), 117-127.
201. Teksin, Z. S., Seo, P. R., Polli, J. E. (2010). Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers. *The AAPS Journal*, 12 (2), 238-241.
202. Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Islambolchilar, Z., Barzegar, S. ve diğerleri. (2007). Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10 (3), 368-379.
203. Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12 (3), 413-420.

204. Bansal, T., Singh, M., Mishra, G., Talegaonkar, S., Khar, R. K., Jaggi, M. ve diğeri. (2007). 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. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 859 (2), 261-266.
205. Kasim, N. A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernas, H., Hussain, A. S. ve diğeri. (2004). Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, 1 (1), 85-96.
206. El-Wasseef, D. R. (2012). Simultaneous Determination of Metformin, Nateglinide and Gliclazide in Pharmaceutical Preparations Using Micellar Liquid Chromatography. *International Journal of Biomedical Science*, 8 (2), 144-151.
207. Masungi, C., Borremans, C., Willems, B., Mensch, J., Van Dijck, A., Augustijns, P. ve diğeri. (2004). Usefulness of a novel Caco-2 cell perfusion system. I. In vitro prediction of the absorption potential of passively diffused compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93 (10), 2507-2521.
208. Larregieu, C. A., Benet, L. Z. (2013). Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. *The AAPS Journal*, 15 (2), 483-497.
209. Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46 (1-3), 27-43.

210. Secondulfo, M., de Magistris, L., Sapone, A., Di Monda, G., Esposito, P., Carratu, R. (1999). Intestinal permeability and diabetes mellitus type 2. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica*, 45 (3), 187-192.
211. Horton, F., Wright, J., Smith, L., Hinton, P. J., Robertson, M. D. (2014). Increased intestinal permeability to oral chromium (51 Cr) -EDTA in human Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 31 (5), 559-563.
212. Garcia-Lafuente, A., Antolin, M., Guarner, F., Crespo, E., Malagelada, J. R. (2001). Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut*, 48 (4), 503-507.
213. Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L., Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*, 3 (4), 279-288.
214. Vidon, N., Chaussade, S., Noel, M., Franchisseur, C., Huchet, B., Bernier, J. J. (1988). Metformin in the digestive tract. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 4 (3), 223-229.
215. Zhu, L. (1993). Gastric mucosal blood flow and blood viscosity in patients with diabetes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 73 (8), 476-478, 511.
216. Jones, K. L., Russo, A., Stevens, J. E., Wishart, J. M., Berry, M. K., Horowitz, M. (2001). Predictors of delayed gastric emptying in diabetes. *Diabetes Care*, 24 (7), 1264-1269.
217. Rafsanjani, F. N., Adeli, S., Ardakani, Z. V., Ardakani, J. V., Ghotbi, P. (2009). Effects of diabetes mellitus on gastric motility in rats. *Pakistan Journal of Physiology*, 5 (1), 1-5.
218. Della-Coletta, A., Eller, M. (1988). The bioavailability of tolazamide in diabetic patients and healthy subjects. *Pharmacological Research*, 5, 174.

219. Adithan, C., Danda, D., Shashindran, C. H., Bapna, J. S., Swaminathan, R. P., Chandrasekar, S. (1989). Differential effect of type I and type II diabetes mellitus on antipyrine elimination. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 11 (12), 755-758.
220. O'Connell, M. E., Awni, W. M., Goodman, M., Cass, O., Melikian, A. P., Wright, G. J. ve diğeri. (1987). Bioavailability and disposition of metoclopramide after single- and multiple-dose administration in diabetic patients with gastroparesis. *Journal of Clinical Pharmacology*, 27 (8), 610-614.
221. Lerner, P. I., Weinstein, L. (1964). Abnormalities of absorption of benzylpenicillin G and sulfoxazole in patients with diabetes mellitus. *The American Journal of the Medical Sciences*, 248, 37-51.
222. Yee, G.C., Evans, W. E. (1981). Reappraisal of guidelines for pharmacokinetic monitoring of aminoglycosides. *Pharmacotherapy*, 1 (1), 55-75.
223. Tucker, G. T., Casey, C., Phillips, P.J., Connor, H., Ward, J. D., Woods, H. F. (1981). Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 12 (2), 235-246.
224. Scheen, A. J. (1996). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, 30 (5), 359-371.
225. Chou, C. H. (2000). Uptake and dispersion of metformin in the isolated perfused rat liver. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52 (8), 1011-1016.
226. Bailey, C. J., Wilcock, C., Scarpello, J. H. (2008). Metformin and the intestine. *Diabetologia*, 51 (8), 1552-1553.
227. Shu, Y., Brown, C., Castro, R. A., Shi, R. J., Lin, E. T., Owen, R. P. ve diğeri. (2008). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83 (2), 273-280.

## EK I- Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul İzni



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/55

12 Temmuz 2011

### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 05.07.2011 (SALI)  
TOPLANTI SAYISI : 2011/4  
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2011/33  
KARAR NUMARASI : 2011/33-4  
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof. Dr. Selma Şahin  
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI : Uzm. Ecz. Tuğba Gülşin İnal  
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Ecz. Ertan Özdemir  
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : 78 adet Sprague Dawley sıçan  
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ : 18 ay

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Selma Şahin'in yürütücüsü olduğu 2011/33 dosya numaralı ve "Normal ve Diyabet Geliştirilmiş sıçanlarda İlaçların İntestinal Permeabilitesinin Araştırılması" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

*Hakan Orer*  
Prof. Dr. Hakan S. ORER  
Etik Kurul Başkanı

ASLI GİRİDİR



Av. Serpil DESNİ  
Fakülte Sekreteri

## **EK II-Tez Kapsamında Yapılan Çalışmalar**

Normal ve diyabet geliştirilmiş sıçanlarda ilaçların intestinal permeabilitesinin araştırılması, 19.07.2012-01.02.2015, Tübitak 1001 Projesi, Proje Yürütücüsü: Selma Şahin **Bursiyer: Tuğba Gülsün.**

**Gulsun Tuğba**, Sahin Selma (2016). Development and Validation of a RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Metformin Hydrochloride, Phenol Red and Metoprolol Tartrate for Intestinal Perfusion Studies. Latin American Journal of Pharmacy, 35(1), 50-57.

**Gulsun Tuğba**, Muhammed Karim Haidar, Kosemehmetoğlu Kemal, Sahin Selma (2015). Development of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus in Rats Using Streptozotocin and Nicotinamide/Streptozocin. 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition (Özet bildiri).

**Gulsun Tuğba**, Sahin Selma (2015). Importance of Experimental Animal Models for Diabetes Studies, AAPS 2015 blog

**Gulsun Tuğba**, Sahin Selma (2014). Development and Validation of a RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Metformin Hydrochloride, Phenol Red and Metoprolol Tartrate. AAPS Annual Meeting and Exposition (Özet bildiri) ve bu bildiri ile AAPS Annual Meeting and Exposition Travelship Ödülü, AAPS Annual Meeting and Exposition, ABD, 2014.



**EK III- Özgeçmiş**

İsim : Tuğba Gülsün İnal  
Doğum Tarihi ve Yeri : 28/11/1983, TOKAT  
İş Adresi : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı  
E-mail Adresi : [tgulsun@hacettepe.edu.tr](mailto:tgulsun@hacettepe.edu.tr)

**EĞİTİM DURUMU**

**Lise** (1998-2001): Tokat Gazi Osman Paşa Süper Lisesi

**Üniversite** (2001- 2005): Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara

**Yüksek Lisans** (2006-2009): Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji AD, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi: *Nanoteknoloji Uygulaması ile İlaç Biyoyararlanımının Artırılmasına Yönelik Yaklaşımlar* (**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Levent Öner**)

**Doktora** (2009- ) : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji AD, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı Doktora Programı

**Doktora Tezi:** *İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Diyabetin Etkisinin İncelenmesi* (**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Selma Şahin**)

## İŞ DENEYİMİ

- İbn-i Sina Hastanesi Eczanesi (2005 - 2006)
- Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji AD Araştırma Görevlisi (2006- )

## STAJ

- Elif Eczanesi- Tokat (2002)
- Eczacıbaşı İlaç Sanayi- Kırklareli (2003)

**Yabancı Dil:** İNGİLİZCE (71.25- ÜDS 2009)

## YAYINLAR

1. **Gülsün T**, Gürsoy RN, Öner L. Nanocrystal technology for oral delivery of poorly water-soluble drugs, FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 34(1), 55-65, 2009 (Derleme makalesi).
2. **Gülsün T**, Gürsoy RN, Öner L. Design and characterization of nanocrystal formulations containing ezetimibe, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 59(1), 41-45, 2011.
3. **Gülsün T**, Budak Ç, Vural İ, Sahin S, Öner L. Preparation and characterization of nimesulide containing nanocrystal formulations, Pharmaceutical Development and Technology, 18(3), 653-659, 2013.
4. **Gülsün 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, Latin American Journal of Pharmacy, 35 (1), 50-57, 2016.

## **BİLDİRİLER**

### **- SÖZLÜ BİLDİRİLER**

1. **Gülsün T**, Gürsoy RN, Öner L. Characterization of Nanocrystal Formulations Which Contain Poorly Water Soluble Drug, Ezetimibe, 7th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology& Biodelivery Systems, 18-20 September 2008, Ljubljana- Slovenya
2. Budak C, **Gulsun T**, Vural I, Sahin S, Oner L. Enhancement of Solubility of Nimesulide by Preparing Nanocrystal Formulation, Globalization of Pharmaceutics Education Network: Eighth Meeting, 2010, Chapel Hill, North Carolina-USA

### **- POSTER BİLDİRİLERİ**

1. **Gülsün T**, Gürsoy RN, Öner L. Application of nanotechnology for the improvement of dissolution properties of a poorly water-soluble drug, ezetimibe, 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 7-10 April 2008, Barselona- İspanya
2. **Gülsün T**, Gürsoy RN, Öner L. Improving Dissolution Profile of Ezetimibe, EUFEPS Conference, When Variability Becomes an Issue in Drug Development: How to Understand, Predict and Manage?, 13-14 Mayıs 2008, Verona- İtalya
3. **Gülsün T**, Gürsoy RN, Öner L. Improving Dissolution Profile of Poorly Water-soluble Drug, Ezetimibe, Using Nanocrystal Tablet Formulations, FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World, Congress in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition, 14-18 Kasım 2010, New Orleans, Louisiana- USA
4. **Gülsün T**, Gürsoy RN, Öner L. Nanokristal teknolojisi kullanılarak suda çözünürlüğü zayıf olan ezetimibin biyoyararlanımının artırılması, Kimyevi Maddeler ve Mamülleri Sektöründe 1. AR-GE Proje Pazarı, 27-28 Aralık 2011, İstanbul

5. Borna SE, **Gülsün T**, GURSOY RN, VURAL I, SAHİN S. Preparation and Characterization of Furosemide Nanosuspensions, AAPS Annual Meeting and Exposition, 14-18 Ekim 2012, Chicago- USA
6. **Gülsün T**, Borna SE, GURSOY RN, VURAL I, SAHİN S. Preparation of Furosemide Nanosuspensions by High Pressure Homogenization and Its In vivo Characterization, 16<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium, 10-12 Eylül 2012, Antalya- Türkiye
7. **Gülsün T**. GURSOY RN, ÖNER L. Ezetimib Nanokristallerinin Hazırlanması için Yöntem ve Farmasötik Formülasyonları, 2. Ege Ar-ge ve Teknoloji Günleri, 2012, İzmir- Türkiye
8. OZTURK N, **Gulsun Inal T**, SAHİN S, VURAL I. Comparison of Furosemide Nanocrystals and Nanosuspensions in Terms of Solubility and Permeability, 17<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 Eylül 2014, Antalya- Türkiye
9. **Gülsün T**, Borna SE, GURSOY RN, VURAL I, SAHİN S. Preparation and In vitro Evaluation of Furosemide Nanosuspensions for Enhancement of its Solubility and Permeability, 17<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 Eylül 2014, Antalya- Türkiye
10. **Gulsun Inal T**, OZTURK N, PEHLİVAN S, SAHİN S, VURAL I. Effect of Milling Time on the Formulation Parameters of Nanosuspensions, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 Kasım 2014, San Diego, CA, USA
11. **Gulsun Inal T**, OZTURK N, KAYNAK MS, SAHİN S, VURAL I. Preparation and Evaluation of Furosemide Containing Orally Disintegrating Tablets by Direct Compression, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 Kasım 2014, San Diego, CA, USA

12. Ozturk N, Kara A, **Gulsun Inal T**, Pehlivan S, Vural I, Sahin S. Effect of Precipitation Inhibitors on Supersaturation and Solubility of Furosemide, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 Kasım 2014, San Diego, CA, USA
13. Ozturk N, **Gulsun Inal T**, Kaynak MS, Vural I, Sahin S. Development of Orally Disintegrating Tablets Containing Olmesartan Medoxomil and Amlodipine Besylate, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 Kasım 2014, San Diego, CA, USA
14. **Gulsun Inal T**, Sahin S. Development and Validation of a RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Metformin Hydrochloride, Phenol Red and Metoprolol Tartrate, AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 Kasım 2014, San Diego, CA, USA
15. **Gülsün T**, Borna SE, Vural I, Sahin S. Formulation and In Vitro Evaluation of Furosemide Nanosuspensions, 1st European Conference on Pharmaceutics : Drug Delivery, 13-14 Nisan 2015, Reims, Fransa
16. Demir H, **Gülsün T**, Sahin S, Oner L. Preparation and Characterization of Rivaroxaban Nanocrystals, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences Strategies to Improve The Quality and Performance of Modern Drug Delivery Systems, 10-12 Eylül 2015, Helsinki, Finlandiya
17. Sahin S, Akdag Cayli Y, **Gulsun T**, Izat N, Oner L. Permeability studies of orally disintegrating tablets containing deferasirox, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences Strategies to Improve The Quality and Performance of Modern Drug Delivery Systems, 10-12 Eylül 2015, Helsinki, Finlandiya.
18. Sahin S, Izat N, Akdag Cayli Y, **Gulsun T**, Oner L. Investigation of metformin permeability from commercially available metformin hydrochloride tablets, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences Strategies to Improve The Quality and Performance of Modern Drug Delivery Systems, 10-12 Eylül 2015, Helsinki, Finlandiya.

19. Sahin S, **Gulsun T**, Izat N, Akdag Cayli Y, Oner L. Investigation of permeabilities of metformin and glyburide from orally disintegrating tablets, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences Strategies to Improve The Quality and Performance of Modern Drug Delivery Systems, 10-12 Eylül 2015, Helsinki, Finlandiya.

20. **Gulsun T**, Izat N, Akdag Cayli Y, Kaynak MS, Oner L, Sahin S. Development of Metformin Hydrochloride and Glyburide Containing Orally Disintegrating Tablets, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando, USA.

21. Izat N, Akdag Cayli Y, **Gulsun T**, Oner L, Sahin S. Evaluation of Dissolution Results of Commercially Available Metformin Hydrochloride Tablets, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando, USA.

22. Akdag Cayli Y, **Gulsun T**, Izat N, Sahin S, Oner L. Preparation and Evaluation of Deferasirox Containing Orally Disintegrating Tablets by Direct Compression Method, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando, USA.

23. **Gulsun T**, Haidar MK, Kosemehmetoglu K, Sahin S. Development of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus in Rats Using Streptozotocin and Nicotinamide/Streptozocin, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando, USA.

24. **Gulsun T**, Izat N, Akdag Cayli Y, Oner L, Sahin S. Influence of Verapamil On Metformin Permeability Across Caco-2 Cells, GPSS 2015, 12-15 Kasım 2015, Antalya, Türkiye.

## **YAPILAN PROJELER**

Nanoteknoloji uygulaması ile ilaç biyoyararlanımının artırılması, 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı TÜBİTAK (Proje no: 107S216), Bursiyer (2007- 2009)

Normal ve diyabet geliştirilmiş sıçanlarda ilaçların intestinal permeabilitesinin araştırılması, 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı TÜBİTAK (Proje no: 112S638), Bursiyer (2012-2015)

Farklı kolloidal sistemlerin üretim ve kalite kontrol parametrelerinin değerlendirilmesi, Bilimsel Araştırmalar Birimi Alt yapı projesi (Proje no: 6242) Yardımcı Araştırmacı (2013-2015)

### **PATENTLER**

1.Method for the Preparation of Ezetimib Nanocrystals, WIPO Patent Application WO/2010/144066, WIPO patent başvurusu, 2010

2.Ezetimib nanokristallerinin hazırlanması için yöntem ve farmasötik formülasyonları, TPE patent no: TR 2009 04500 B, 2013

### **ÖDÜLLER**

1. **Gulsun T**, Gursoy RN, Oner L. 2009-2010 Yılı Novartis Farmasötik Teknoloji Araştırma Ödülleri, 3.lük Ödülü

2. **Gulsun T**. FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World, Congress in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition, 14-18 Kasım 2010, New Orleans, Louisiana- USA, Travelship Ödülü

3. **Gulsun T**. AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 Kasım 2014, San Diego, CA, USA, Travelship Ödülü

### **BLOGLAR**

1. **Tuğba Gülsün**, Selma Şahin, AAPS Blog, 2015, Importance of Experimental Animal Models for Diabetes Studies

## ÜYE OLDUĞU TOPLULUKLAR

Farmasötik Bilimler Araştırma Derneği (FABAD, 2006- )

Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD, 2006- )

Hacettepe Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Derneği (HETEK, 2006- )

Türk Eczacıları Birliği (TEB, 2005- )

Ankara Eczacı Odası (AEO, 2005- )

American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS, 2010- )

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği (2005- )

## KATILDIĞI TOPLANTILAR

4. Ulusal Eczacılık Fuarı, 15-17 Nisan 2005, İstanbul-Türkiye

13<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium, 10-13 Eylül, 2006, Antalya-Türkiye

Nano TR – III , Nanoscience- Nanotechnology, Nanobiotechnology- Nanomedicine Conference, 11-14 Haziran 2007, Bilkent Üniversitesi, Ankara-Türkiye

8. EUCHIS ( 8<sup>th</sup> International Conference of European Chitin Society), 8-11 Eylül 2007, Antalya-Türkiye

FATUM Türkiye’de İlaç Fiyatlandırma ve Geri Ödemede Güncel Yaklaşımlar, 2 Kasım 2007, Ankara-Türkiye

FATUM Farmakoekonomi Çalıştayı: Temel Prensipler ve Referans Sağlık Sistemlerindeki Uygulamalar, 24-25 Ocak 2008, Ankara-Türkiye



6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 7-10 Nisan 2008, Barselona- İspanya

EUFEPS Conference, When Variability Becomes an Issue in Drug Development: How to Understand, Predict and Manage?, 13-14 Mayıs 2008, Verona- İtalya

14<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium “Overcoming biological barriers in innovative delivery systems” 6-11 Eylül 2008, Antalya - Türkiye

7th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology & Biodelivery Systems, 18-20 Eylül 2008, Ljubljana- Slovenya

Patent in Pharmaceutical Industry, 26-27 Mart 2009, Ankara-Türkiye

Teknologlar Toplantısı, 11-12 Nisan 2009, İstanbul-Türkiye

15<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium, 13-15 Eylül 2010, Antalya - Türkiye

Globalization of Pharmaceutics Education Network (GPEN) 2010, 10-12 Kasım 2010, Chapel Hill, North Carolina, Amerika

FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World, Congress in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition, 14-18 Kasım 2010, New Orleans, Louisiana, Amerika

Sağlık Bilimleri Enstitüsü 3. Lisansüstü Eğitim Sempozyumu, 8 Aralık 2010, Ankara-Türkiye

MEDIPLAT Medikal İnovasyon Platformu, 25 Şubat 2011, Ankara- Türkiye

18<sup>th</sup> International Symposium on Microencapsulation, 12-14 Eylül 2011, Antalya

Kimyevi Maddeler ve Mamülleri Sektöründe 1. AR-GE Proje Pazarı, 27-28 Aralık 2011, İstanbul

16<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium, 2012, Antalya

17<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium, 2014, Antalya

AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 Kasım 2014, San Diego, CA, USA

Kozmetik Ürünlerde Teknik Dosya Hazırlanması, Testler ve Değerlendirmeler, 2014, Ankara

How to Publish a Scientific Journal Article Workshop by Springer, 2014, Ankara

Eğiticilerin Eğitimi, 2014, Ankara

Laboratuvar Güvenliği, 2014, Ankara

GPSS 1st International Gazi Pharma Symposium Series, 12-15 Kasım 2015, Antalya