

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİROZ GELİŞTİRİLMİŞ SIÇANLARDA İLAÇ DAĞILIMI VE
ELİMİNASYONU ÜZERİNE VERİLİŞ YOLUNUN ETKİSİ**

Uzm. Ecz. Mustafa Sinan KAYNAK

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2008

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİROZ GELİŞTİRİLMİŞ SIÇANLARDA İLAÇ DAĞILIMI VE
ELİMİNASYONU ÜZERİNE VERİLİŞ YOLUNUN ETKİSİ**

Uzm. Ecz. Mustafa Sinan KAYNAK

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Selma ŞAHİN

ANKARA

2008

ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Teknoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof.Dr. Levent Öner
Hacettepe Üniversitesi



Danışman : Doç Dr. Selma Şahin
Hacettepe Üniversitesi



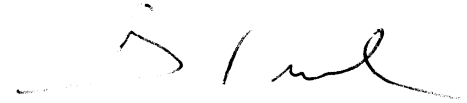
Üye : Prof.Dr. Sema Çalış
Hacettepe Üniversitesi



Üye : Doç.Dr. Sevgi Takka
Gazi Üniversitesi

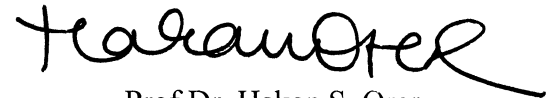


Üye : Doç.Dr. İmran Vural
Hacettepe Üniversitesi



ONAY :

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof.Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında benden bilgi, emek ve dostluğunu esirgemeyen ve kıymetli desteğini her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Doç. Dr. Selma Şahin'e bu tezin oluşmasında gösterdiği özveri ve yardım için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başta Eczacılık Teknoloji Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Murat Şumnu'ya, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Yılmaz Çapan'a, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Levent Öner'e ve Anabilim Dalımızdan kısa bir süre önce emekli olan hocam sayın Prof. Dr. A.Atilla Hıncal olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalın'daki değerli hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında siroz geliştirilmiş hayvanların siroz derecelendirilmesi konusunda benden yardımlarını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Uzm. Dr. Aytekin Akyol'a ve tezimin verilerinin istatistiksel değerlendirmelerindeki katkılarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Dr. Erdem Karabulut'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da sınırsız sevgi ve desteğiyle yanımda olan sevgili anneme, babama, kardeşlerime, tüm aile büyüklerime ve küçüklerime gösterdikleri sabır, anlayış ve sevgi için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin bitirme sürecindeki zorluklara, benimle birlikte göğüs geren ve karşılaştığım sıkıntılarda varlığı ile hep bir itici güç olan sevgili eşim Emel Kaynak'a teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Bilimsel Araştırmalar Birimi (H.Ü.B.A.B.) tarafından desteklenmiştir [08T09102003(4634)].

ÖZET

Kaynak M.S., Siroz Geliştirilmiş Sıçanlarda İlaç Dağılımı ve Eliminasyonu Üzerine Veriliş Yolunun Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı, Doktora Tezi, Ankara 2008. Sirozda azalan karaciğer fonksiyonları ilaçların farmakokinetiğinde önemli değişikliklere yol açabilmektedir. Bu çalışmanın amacı model ilaçların [naproksen sodyum (NAS) ve furosemidin (FSM)] sirozdaki dağılım ve eliminasyonunu veriliş yolunun [portal ven (PV) ve hepatik arter (HA)] fonksiyonu olarak ikili karaciğer perfüzyonu tekniği kullanarak incelemektir. İlk olarak, model ilaçların biyofarmasötik sınıflandırma sistemindeki (BSS) yerini tayin etmek amacıyla NAS ve FSM'nin pH'nın fonksiyonu (pH 1-7.5) olarak çözünürlükleri incelenmiş ve *in situ* barsak perfüzyonu tekniği kullanarak intestinal permeabiliteleri tayin edilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar naproksen sodyumun BSS'ye göre Sınıf 1 (yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite) ve furosemidin Sınıf 4 (düşük çözünürlük ve düşük permeabilite) ilaçlarının özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir. Siroz indüksiyonu için, tiyoasetamid (%0.03) 12-20 hafta süreyle içme suyunda verilmiştir. Patolojik incelemeler indüksiyon sonunda karaciğer sirozunun (skor: 2-6) geliştiğini göstermiştir. NAS'ın permeabilitesi sirozdan etkilenmezken FSM'nin barsak permeabilitesi ($P_{kontrol}$: 1.39×10^{-4} cm/sn ve P_{siroz} : 0.584×10^{-4} cm/sn) azalmıştır. İkili karaciğer perfüzyonu çalışmalarından elde edilen sonuçlar kontrol grubuna göre sirozda vasküler hacim değişmezken ekstraselüler hacmin %5 (HA)-%25 (PV) azaldığını göstermiştir. Ayrıca sirozda total hacim de %11 oranında azalmıştır. İlave olarak sadece HA tarafından perfüze edilen özel alan sirozda daha fazladır (kontrol: %9.5, siroz %16). NAS'ın hepatik ekstraksiyonu her iki veriliş yolunda da orta derecedir ($E_{kontrol,PV}$: 0.334; $E_{kontrol,HA}$:0.454). Sirozda ise özellikle PV yolla verilikten sonraki ekstraksiyonu ($E_{siroz,PV}$:0.220) azalarak düşük derece olmuştur. Diğer taraftan FSM'nin hepatik ekstraksiyonu veriliş yoluna göre düşük ($E_{kontrol,PV}$: 0.200) ve orta ($E_{kontrol,HA}$:0.351) derecededir. Sirozda ise özellikle PV verilikten sonraki ekstraksiyonu ($E_{siroz,PV}$: 0.319) artarak orta derece olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Siroz, Furosemid, Naproksen sodyum, İkili Karaciğer Perfüzyonu, Çözünürlük, Barsak Permeabilitesi

Destekleyen Kurumlar: H.Ü.B.A.B., Tez Destekleme [08T09102003(4634)].

ABSTRACT

Kaynak, M.S., Effect of Route of Input on Drug Distribution and Elimination in Cirrhosis Developed Rats. Hacettepe University Health Sciences Institute, Ph.D. Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara, 2008.

Impaired liver functions in cirrhosis may lead to significant alterations in the pharmacokinetics of many compounds. The aim of this study was to investigate the distribution and elimination of model compounds [naproxen sodium (NAS) and furosemide (FSM)] as a function of route of input [portal vein (PV) and hepatic artery (HA)] in cirrhosis using dual liver perfusion. Initially, to determine the positioning of model compounds in the Biopharmaceutic Classification System (BCS), solubilities of NAS and FSM were investigated as a function of pH (pH 1-7.5), and their intestinal permeabilities were determined using *in situ* intestinal perfusion technique. The results of these studies revealed that according to BCS, NAS has Class 1 (high solubility and high permeability) and FSM Class 4 (low solubility and low permeability) drugs characteristics. For induction of cirrhosis, thioacetamide (0.03%) was administered for 12-20 weeks in drinking water. Pathological investigation demonstrated that liver cirrhosis (score: 2-6) was developed at the end of induction period. Although permeability of NAS was not influenced in cirrhosis, FSM's permeability (P_{control} : 1.39×10^{-4} cm/s and $P_{\text{cirrhosis}}$: 0.584×10^{-4} cm/s) was decreased. Results of the dual perfusion studies revealed that in comparison to the control group, extravascular volume was decreased by 5% (HA) – 25% (PV) in cirrhosis, whereas vascular volume was unaltered. Also, total volume was decreased by 11% in cirrhosis. In addition, the specific space perfused solely by HA was larger in cirrhosis (control: 9.5%, cirrhosis: 16%). Hepatic extraction of NAS was intermediate for both route of administration ($E_{\text{control,PV}}$: 0.334; $E_{\text{control,HA}}$: 0.454). In cirrhosis, its hepatic extraction especially after PV administration ($E_{\text{cirrhosis,PV}}$: 0.220) decreased and became low. On the other hand, hepatic extraction of FSM was found to be low ($E_{\text{control,PV}}$: 0.200) and intermediate ($E_{\text{control,HA}}$: 0.351) as a function of route of input. In cirrhosis, its hepatic extraction especially after PV administration ($E_{\text{cirrhosis,PV}}$: 0.319) increased and became intermediate.

Keywords: Cirrhosis, Furosemide, Naproxen Sodium, Dual Liver Perfusion, Solubility, Intestinal Permeability

Supported by H.Ü.B.A.B., Ph.D. Thesis Grant [08T09102003(4634)].

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
TABLolar DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gastrointestinal Kanal.....	4
2.1.1. Gastrointestinal Kanalin Yapısı	7
2.2. Membranlardan Geçiş Mekanizmaları.....	9
2.2.1. Transselüler Absorpsiyon Mekanizmaları	10
2.2.1.1. Pasif Difüzyon.....	10
2.2.1.2. Taşıyıcılar Aracılığıyla (Carrier-mediated) Transport.....	13
2.2.1.3. Veziküler Transport	14
2.2.1.4. Konvektif (Por) Transport.....	14
2.2.1.5. İyon Çifti Oluşumu	14
2.2.2. Paraselüler (İnterselüler) Transport.....	15
2.2.3. Persorpsiyon.....	16
2.3. Barsak Permeabilitesini Tayin Yöntemleri	16
2.4. Karaciğer	17
2.4.1. Karaciğer ve Görevleri.....	17
2.4.2. Karaciğerin Fonksiyonel Birimi.....	19

2.4.3.1. Endotel Hücreleri	24
2.4.3.2. Kupfer Hücreleri	24
2.4.3.3. Perisinusoidal Yağ Depolayan Hücreler (İto hücreleri, Stellate hücreler)....	24
2.4.3.4. Pit Hücreleri	25
2.4.4. Disse Boşluğu (Space of Disse)	25
2.4.5. Hepatositler	25
2.4.6. Karaciğerde Mikrodolaşım	28
2.4.7. Karaciğerde Metabolizasyon ve Hepatik Klerens.....	29
2.4.8. Hepatik Fonksiyonları Tayin Yöntemleri	30
2.5. Siroz	30
2.5.1. Sirozun Sınıflandırılması ve Derecelendirilmesi	34
2.5.2. Deneysel Siroz Oluşturma Yöntemleri	36
2.5.2.1. Safra Kanalı Blokajı Yöntemi	36
2.5.2.2. Karbon Tetraklorür Uygulaması	37
2.5.2.3. Tiyoasetamid Uygulaması.....	37
2.5.3. Sirozda İlaç Dağılımı ve Eliminasyonu	38
2.6. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri.....	40
2.6.1. Naproksen Sodyum	40
2.6.2. Furosemid.....	42
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	45
3.1. Kimyasal Maddeler	45
3.2. Genel Aletler	46
3.3. HPLC Gereçleri.....	46
3.4. Perfüzyon Gereçleri	46
3.5. Kullanılan Deney Hayvanı	47
3.6. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar	48

3.6.1. UV Spektrumu	48
3.6.2. IR Spektrumu	48
3.7. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayini	48
3.7.1. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemleri.....	51
3.7.1.1. Naproksen Sodyum	51
3.7.1.2. Furosemid.....	51
3.7.2. Veri Analizi.....	52
3.8. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitelerinin Tayini (<i>İn Situ</i> Barsak Perfüzyonu Tekniği).....	53
3.8.1. Deney Hayvanı.....	53
3.8.2. Deneysel Siroz Geliştirilmesi ve Siroz Derecesinin Tayini.....	54
3.8.3. Barsak Perfüzyonu Çalışmalarında Kullanılan Perfüzyon Çözeltisi	54
3.8.4. Cerrahi İşlemler.....	55
3.8.5. Perfüzyon Çalışmaları.....	56
3.8.6. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitelerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemi	57
3.8.7. Veri Analizi.....	59
3.9. Karaciğer Perfüzyonu Çalışmaları	61
3.9.1. Deney Hayvanı.....	61
3.9.2. Deneysel Siroz Geliştirilmesi.....	61
3.9.3. Karaciğer Perfüzyonu Çalışmalarında Kullanılan Perfüzyon Çözeltisi.....	61
3.9.4. Perfüzyon Sistemi	62
3.9.5. Cerrahi İşlemler.....	63
3.10. Perfüzyon Deneyleri.....	67
3.10.1. Gecikme Zamanının Tayini.....	67
3.10.2. Referans Maddelerle Yapılan Çalışmalar	68

3.10.2.1. Dağılma Hacmi ve Spesifik Alan Tayininde Kullanılacak Referans Maddelerin Hazırlanması	68
3.10.2.2. Karaciğerin Dağılma Hacimlerinin ve Hepatik Artere Özgü Spesifik Alanın Tayini	69
3.10.2.3. Referans Maddelerin Miktar Tayini Yöntemleri.....	71
3.10.3. Etkin Maddelerle Yapılan Çalışmalar	72
3.10.3.1. Etkin Maddelerin Enjeksiyonluk Preparatlarının Hazırlanması	72
3.10.3.2. Etkin Maddelerle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları	72
3.10.3.3. Etkin Maddelerle Yapılan Perfüzyon Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemler.....	74
3.10.3.4. Veri Analizi.....	75
3.11. Referans ve Etkin Maddelerin Miktar Tayininde Kullanılan Analitik Yöntemlerinin Validasyonu	78
3.11.1. Özgünlük (Specificity).....	78
3.11.2. Doğrusallık (Linearity)	79
3.11.3. Kesinlik (Precision).....	81
3.11.4. Doğruluk (Accuracy)	83
3.11.5. Duyarlılık (Sensitivity)	83
3.11.6. İstatistiksel Analiz.....	83
4. BULGULAR.....	85
4.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar	85
4.1.1. Etkin Maddelerin UV Spektrumu	85
4.1.1.1. Naproksen Sodyum	85
4.1.1.2. Furosemid.....	85
4.1.2. IR Spektrumu	86
4.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayini Amacıyla Yapılan Deneyler	88

4.2.1. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemleri.....	88
4.2.1.1. Naproksen Sodyum	88
4.2.1.2. Furosemid.....	89
4.2.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemlerinin Validasyonu	91
4.2.2.1. Özgünlük	91
4.2.2.2. Doğrusallık.....	93
4.2.2.3. Kesinlik	93
4.2.2.4. Doğruluk	95
4.2.2.5. Duyarlılık	95
4.2.3. Etkin Maddelerin Çözünürlük Bulguları.....	96
4.3. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitesinin Tayini Amacıyla Yapılan Deneyler	99
4.3.1. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitelerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemi	99
4.3.2. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitelerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu	104
4.3.2.1. Özgünlük	104
4.3.2.2. Doğrusallık.....	104
4.3.2.3. Kesinlik	105
4.3.2.4. Doğruluk	109
4.3.2.5. Duyarlılık	110
4.3.3. Barsak Perfüzyonu Bulguları	110
4.3.3.1. Deneysel Siroz Geliştirilmesi ve Geliştirilmiş Sirozun Derecesinin Tayini Bulguları.....	110
4.3.3.2. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitesi Bulguları	113
4.4. Karaciğer Perfüzyonu Çalışmalarına Ait Bulgular	116

4.4.1. Referans Maddelerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	116
4.4.1.1. Referans Maddeler İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu ..	116
4.4.1.1.1. Eritrositler	116
4.4.1.1.2. Evans Mavisi.....	120
4.4.1.2. Referans Maddelerle Yapılan Perfüzyon Deneyleri	124
4.4.1.2.1. Dağılma Hacimlerinin Tayini	125
4.4.1.2.2. Hepatik Artere Özgü Spesifik Alanın Tayini.....	136
4.4.2. Etkin Maddelerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	141
4.4.2.1. Etkin Maddelerle Yapılan Karaciğer Perfüzyonu Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemler.....	141
4.4.2.2. Etkin Maddelerle Yapılan Karaciğer Perfüzyonu Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemlerin Validasyonu	143
4.4.2.2.1. Özgünlük	143
4.4.2.2.2. Doğrusallık.....	143
4.4.2.2.3. Kesinlik	144
4.4.2.2.4. Doğruluk	147
4.4.2.2.5. Duyarlılık	147
4.4.2.3. Etkin Maddelerle Yapılan Perfüzyon Deneyleri.....	148
4.4.2.3.1. Naproksen Sodyum	148
4.4.2.3.2. Furosemid.....	151
5. TARTIŞMA	154
5. 1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler.....	154
5.1. 1. Analitik Yöntem ve Validasyonu.....	154
5.1.2. Deneysel Siroz Geliştirilmesi.....	155
5.1.3. Barsak Perfüzyonu Tekniği.....	156
5.1.4. Karaciğer Perfüzyonu Tekniği	157

5.2. Etkin ve Referans Maddelerle Yapılan Çalışmalar	158
5.2.1. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayini	158
5.2.2. Etkin Maddelerin Permeabilitelerinin Tayini	159
5.2.3. Etkin Maddelerin Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemindeki Yeri.....	163
5.2.4. Karaciğer Perfüzyonu Deneyleri.....	165
5.2.4.1. Karaciğerde Dağılım Hacimlerinin Tayini.....	165
5.2.4.2. Hepatik Artere Özgü Spesifik Alanın Tayini.....	168
5.2.4.3. Etkin Maddelerin Karaciğerde Dağılımı ve Eliminasyonu.....	168
5.3. SONUÇLAR	171
KAYNAKLAR	173
ÖZGEÇMİŞ	189
EKLER.....	190
Barsak permeabilitesi çalışmaları için etik kurul onayı.....	191
Karaciğer perfüzyonu çalışmaları için etik kurul onayı.....	192

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$AUC_{0-\infty}$	Sonsuza kadar plazma konsantrasyon – zaman eğrisi altında kalan alan
CL_H	Hepatik klerens
D_0	Doz sayısı
E	Ekstraksiyon Oranı
EB	Evans mavisi
F	Hepatik geri kazanım
f_{maks}	Maksimum frekans
GI	Gastrointestinal kanal
HA	Hepatik arter
k_a	Absorpsiyon hız sabiti
LOD	Teşhis sınırı (limit of detection)
LOQ	Kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük konsantrasyon (Limit of quantification)
MTT	Ortalama geçiş zamanı
OBH	Ortalama bağıl hata
Ort	Ortalama
P	Permeabilite katsayısı
PV	Portal ven
Q	Perfüzyon akış hızı
R^2	Determinasyon katsayısı
RBC	Eritrosit
SH	Standart hata
SS	Standart sapma

TAA	Tiyoasetamid
t_{maks}	Maksimum frekansa ulaşılan zaman
V	Dağılma hacmi
VK	Varyasyon katsayısı
λ_{maks}	Maksimum dalga boyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. GI Kanal bileşenleri (1).	4
Şekil 2.2. Kerckring kıvrımları, villi ve mikrovillinin intestinal yüzey alanına katkısı (2).	6
Şekil 2.3. Gastrointestinal kanalın yapısı (2).	7
Şekil 2.4. Mukozal bariyerin yaklaşık boyutları (9).	8
Şekil 2.5. Barsak epitelinden absorpsiyon mekanizmaları (15).	10
Şekil 2.6. Karaciğerin makroskopik görünümü (31).	17
Şekil 2.7. Hepatik lobülün şematik (A) ve mikroskobik (B) gösterimi (45).	20
Şekil 2.8. Karaciğerdeki lobüllerin şematik gösterimi A: Klasik lobül, B: Portal lobül, C: Hepatik asinus (liver acinus) (51).	22
Şekil 2.9. Hepatik asinus. PV: portal venül; HA: hepatik arteriol; BD: bile ductule THV: terminal hepatik venül; 1: periportal bölge; 2: ara bölge; 3: perivenöz bölge (47) .	23
Şekil 2.10. Sinüs, sinüs hücreleri, Disse boşluğu ve hepatositlerin şematik gösterimi.	27
Şekil 2.11. Sıçanlarda portal ven ve hepatik arterin sinüslere bağlanma yolları (80). APA: Arterioportal anastomoz. AST: Arteriosinuziodal twigs, AVS:Arteriovenöz shunt.	28
Şekil 2.12. Karbon tetraklorür ile oluşturulmuş mikronodüler (A) ve tiyoasetamid ile oluşturulmuş makronodüler (B) sirozun makroskopik karaciğer görüntüleri (109).	38
Şekil 2.13. Naproksen sodyumun kimyasal yapısı (141).	41
Şekil 2.14. Furosemidin kimyasal yapısı (151).	42
Şekil 3.1. In situ perfüze barsak preparatı (175).	57
Şekil 3.2. Karaciğer perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon sisteminin şematik olarak gösterimi.	63

Şekil 3.3.	Karaciğerin portal ven ve hepatik arterden perfüzyonu amacıyla yapılan cerrahi işlemler.	66
Şekil 3.4.	Karaciğer ve karaciğer dışı hacimlerin şematik gösterimi.	67
Şekil 4.1.	Naproksen sodyumun 200-400 nm aralığındaki UV Spektrumu.	85
Şekil 4.2.	Furosemidin 200-400 nm aralığındaki UV Spektrumu.	86
Şekil 4.3.	Naproksen sodyum (A) ve furosemidin (B) 400-2000 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki IR spektrumu.	87
Şekil 4.4.	Naproksen sodyumun farklı tamponlarda, 230 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramları.	88
Şekil 4.5.	Naproksen sodyumun çözünürlük deneylerinde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi [Güven aralığı (%95) eğim: 167123 - 160159, kesişim: 2731 - (-15147)].	89
Şekil 4.6.	Furosemidin farklı tamponlarda, 235 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramları.	90
Şekil 4.7.	Furosemidin çözünürlük deneylerinde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi [Güven aralığı (%95) eğim: 48643 - 46409, kesişim: 2367 - (-13672)].	91
Şekil 4.8.	Naproksen sodyum (A) ve furosemidin (B) çözünürlük deneylerinde kullanılan ve etkin madde içermeyen tamponlara ait HPLC kromatogramları.	92
Şekil 4.9.	Naproksen sodyum (A) ve furosemidin (B) pH'nın fonksiyonu olarak çözünürlük profili.	97
Şekil 4.10.	Barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan perfüzyon çözeltisinin tek başına (A) ve antipirin ilavesinden sonra (B) 242 nm'de elde edilen HPLC kromatogramları.	100
Şekil 4.11.	Barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan perfüzyon çözeltisinin tek başına (A) ve furosemid ilavesinden sonra (B) 227.6 nm'de elde edilen HPLC kromatogramları.	101
Şekil 4.12.	Barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan perfüzyon çözeltisinin tek başına (A) ve naproksen sodyum ilavesinden sonra (B) 271 nm'de elde edilen HPLC kromatogramları.	102
Şekil 4.13.	Antipirinin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi [Güven aralığı (%95) eğim: 137808 - 135267, kesişim: 105683 - (-6189)].	103

Şekil 4.14.	Furosemidin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi [Güven aralığı (%95) eğim: 299815 - 286497, kesişim: 19601 - (-48196)].	103
Şekil 4.15.	Naproksen sodyumun barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi [Güven aralığı (%95) eğim: 54619 - 53698, kesişim: 97431 - (-67320)].	104
Şekil 4.16.	Siroz geliştirilmiş sıçan karaciğerlerinin fotoğrafları. (A: Normal 10x büyütme, B: Normal 40x büyütme, C: İndüksiyon aşamasında 10x, D: İndüksiyon aşamasında 40x, E: Siroz gelişmiş 10x, F: Siroz gelişmiş 40x, G: Kolanjiyoselüler karsinom 10x, H: Kolanjiyoselüler karsinom 40x).	112
Şekil 4.17.	Kontrol ve siroz (S) geliştirilmiş sıçanlardaki barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan etkin madde naproksen sodyum ve referans madde antipirine ait lineer (A) ve semilogaritmik (B) profiller (Ort \pm SH, n=5).	114
Şekil 4.18.	Kontrol ve siroz (S) geliştirilmiş sıçanlardaki barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan etkin madde furosemid ve referans madde antipirine ait lineer (A) ve semilogaritmik (B) profiller (Ort \pm SH, n=5).	115
Şekil 4.19.	Sıçan eritrositinin 300-600 nm aralığındaki spektrumu.	116
Şekil 4.20.	Sıçan eritrositinden hazırlanan çözeltinin kalibrasyon doğrusu ve kalibrasyon denklemi ($\lambda_{maks}=412$ nm) (Güven aralığı (%95) eğim: 0.008 - 0.007, kesişim: 0.041 - 0.021).	117
Şekil 4.21.	400-700 nm aralığında boş perfuzata ait spektrum.	118
Şekil 4.22.	Evans mavisinin 400-800 nm aralığındaki spektrumu.	121
Şekil 4.23.	EB'nin spektrofotometrik miktar tayini için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Güven aralığı (%95) eğim: 0.075 - 0.072, kesişim: 0.012 - 0.001).	121
Şekil 4.24.	RBC (kırmızı) ve EB (mavi)'nin kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve siroz (C: Lineer, D: Semilogaritmik) geliştirilmiş sıçanların portal venine bolus dozda uygulanmasıyla elde edilen dilüsyon profilleri.	126
Şekil 4.25.	RBC (kırmızı) ve EB (mavi)'nin kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve siroz (C: Lineer, D: Semilogaritmik) geliştirilmiş sıçanların hepatik arterine bolus dozda uygulanmasıyla elde edilen dilüsyon profilleri.	127
Şekil 4.26.	RBC'nin kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) karaciğerlerin portal ven (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve hepatik arter (C:	128

- Lineer, D: Semilogaritmik)'ine bolus dozda uygulanmasıyla elde edilen dilüsyon profilleri.
- Şekil 4.27.** EB'nin kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) karaciğerlerin portal ven (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve hepatik arter (C: Lineer, D: Semilogaritmik)'ine bolus dozda uygulanmasıyla elde edilen dilüsyon profilleri. **129**
- Şekil 4.28.** RBC'nin bolus dozda portal ven (mavi) ve hepatik arter (kırmızı)'e uygulanmasıyla kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer, D: Semilogaritmik) gruplardan elde edilen dilüsyon profilleri. **130**
- Şekil 4.29.** EB'nin bolus dozda portal ven (mavi) ve hepatik arter (kırmızı)'e uygulanmasıyla kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer, D: Semilogaritmik) gruplardan elde edilen dilüsyon profilleri. **131**
- Şekil 4.30.** Kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) gruplara ait total hacim grafiği. **133**
- Şekil 4.31.** Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda veriliş yolunun fonksiyonu olarak intravasküler, intersitisiyel ve intraselüler dağılıma hacimleri. *p=0.012 **135**
- Şekil 4.32.** Kontrol (A) ve sirozlu (B) gruplarda hepatik artere özgü spesifik alanın tayini için yapılan regresyon analizi. **137**
- Şekil 4.33.** Kontrol (A: Lineer; B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer; D: Semilogaritmik) grupların PV'ne bolus dozda enjekte edilen RBC'nin dilüsyon profilleri üzerine akış hızlarının (Mavi: 15 mL/dk; Kırmızı; 16.5 mL/dk; Yeşil: 18 mL/dk) etkisi. **138**
- Şekil 4.34.** Kontrol (A: Lineer; B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer; D: Semilogaritmik) grupların HA'ne bolus dozda enjekte edilen RBC'nin dilüsyon profilleri üzerine akış hızlarının (Mavi: 15 mL/dk; Kırmızı; 16.5 mL/dk; Yeşil: 18 mL/dk) etkisi. **139**
- Şekil 4.35.** Naproksen sodyum (A) ve furosemid (B) için elde edilen HPLC kromatogramları. **141**
- Şekil 4.36.** Naproksen sodyum (A) (Güven aralığı (%95) eğim: 222359276 - 221404329, kesişim: 14176755 - 12805269) ve furosemidin (B) (Güven aralığı (%95) eğim: 24211051 - 23954549, kesişim: 15399451 - 13253681). karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan kalibrasyon doğruları ve denklemleri. **142**

- Şekil 4.37.** Karaciğer perfüzyonu deneylerinde toplanan ve etkin madde içermeyen (A: Naproksen sodyum, B: Furosemid) boş perfüzetin HPLC kromatogramı. **143**
- Şekil 4.38.** Naproksen sodyumun kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer, D: Semilogaritmik) sıçanların portal ven (mavi) ve hepatik arter (kırmızı)'ine bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen dilüsyon profilleri. **148**
- Şekil 4.39.** Naproksen sodyumun kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) karaciğerlerin portal ven (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve hepatik arterine (C: Lineer, D: Semilogaritmik) bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen dilüsyon profilleri. **149**
- Şekil 4.40.** Furosemidin kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer, S: Semilogaritmik) sıçanların portal ven (mavi) ve hepatik arterine (kırmızı) bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen dilüsyon profilleri. **151**
- Şekil 4.41.** Furosemidin kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) karaciğerlerin portal ven (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve hepatik arterine (C: Lineer, S: Semilogaritmik) bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen dilüsyon profilleri. **152**

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 2.1.	Gastrointestinal kanalın değişik bölgelerinden absorpsiyon mekanizmaları (20).	15
Tablo 2.2.	Siroz oluşturan sebepler (94).	32
Tablo 2.3.	Modifiye Child-Pugh skorlama tablosu (97).	35
Tablo 2.4.	Ihsak histolojik skorlama tablosu (98).	36
Tablo 2.5.	Naproksen ve furosemidin farmakokinetik parametreleri ve bu parametrelerin sirozdaki durumu (170).	44
Tablo 3.1.	Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlük sınıfının tayini için kullanılan tamponların pH'ları.	49
Tablo 3.2.	Naproksen sodyum ve furosemidin maksimum çözünürlüklerinin tayini için kullanılan tamponların içerikleri.	50
Tablo 3.3.	Furosemid ve naproksen sodyumun miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemine ait koşullar.	52
Tablo 3.4.	Barsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi.	55
Tablo 3.5.	Barsak permeabilitesi çalışmalarında kullanılan HPLC yönteminin gradyan tablosu.	58
Tablo 3.6.	Barsak permeabilitesi çalışmalarında kullanılan standart doğru denklemi için seçilen standart çözeltilerin konsantrasyonları.	59
Tablo 3.7.	Karaciğer perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon.	62
Tablo 3.8.	Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda karaciğer dağılma hacimlerinin ve hepatik artere özgü spesifik alanın tayini amacıyla yapılan deneyler.	70
Tablo 3.9.	Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda etkin maddelerle yapılan deneyler ve örnekleme şeması.	73
Tablo 3.10.	Referans maddeler için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlar.	82
Tablo 3.11.	Etkin maddeler için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlar.	82
Tablo 4.1.	Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlüklerinin	94

	tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.	
Tablo 4.2.	Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlüklerinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (ort \pm SS, n=6).	95
Tablo 4.3.	Naproksen sodyum ve furosemidin çalışılan pH'lardaki maksimum çözünürlük değerleri (Ort \pm SS; n=6).	96
Tablo 4.4.	Naproksen sodyum ve furosemidin en yüksek dozlarını çözmek için gerekli çözücü hacmi.	98
Tablo 4.5.	Naproksen sodyum ve furosemidin çalışılan pH'lardaki doz sayısı (Do) değerleri.	99
Tablo 4.6.	Naproksen sodyumun barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.	106
Tablo 4.7.	Furosemidin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.	107
Tablo 4.8.	Antipirinin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.	108
Tablo 4.9.	Naproksen sodyum, furosemid ve antipirinin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (Ort \pm SS; n=6).	109
Tablo 4.10.	Deneysel çalışmalarda kullanılan sirozlu hayvanlarda gelişen sirozun dereceleri.	111
Tablo 4.11.	Etkin ve referans maddelerin kontrol ve sirozlu sıçanlardaki absorpsiyon hız sabiti (k_a) ve permeabilite (P) değerleri (Ort \pm SS, n=5).	113
Tablo 4.12.	Eritrositlerin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.	119
Tablo 4.13.	Eritrositlerin tayinininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (Ort \pm SS, n=6).	120
Tablo 4.14.	Evans mavisinin tayinininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.	123
Tablo 4.15.	Evans mavisinin tayinininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (Ort \pm SS, n=6).	124
Tablo 4.16.	Perfüzyon çalışmalarında kullanılan hayvanlara ait bilgiler ve	125

	hemodinamik parametreler (Ort \pm SS).	
Tablo 4.17.	RBC ve EB'nin portal ven (PV) ve hepatik artere (HA) bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen farmakokinetik parametreler (Ort \pm SS). Perfüzyon deneyleri sabit akış hızında (PV:12 mL/dk, HA:3 mL/dk) gerçekleştirilmiştir.	132
Tablo 4.18.	Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda veriliş yolunun fonksiyonu olarak intravasküler, intersitisyel ve intraselüler dağılıma hacimleri (Ort \pm SS).	134
Tablo 4.19.	Eritrositler için farklı akış hızlarında elde edilen farmakokinetik parametreler (Ort \pm SS).	140
Tablo 4.20.	Naproksen sodyumun karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan miktar tayini yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.	145
Tablo 4.21.	Furosemidin karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan miktar tayini yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.	146
Tablo 4.22.	Naproksen sodyum ve furosemidin karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan miktar tayini yöntemlerinin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (Ort \pm SS; n=6).	147
Tablo 4.23.	Kontrol ve sirozlu gruplarda naproksen sodyumun, portal ven ve hepatik artere bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen farmakokinetik parametreleri (Ort \pm SS, n= 7).	150
Tablo 4.24.	Kontrol ve sirozlu gruplarda furosemidin bolus dozda portal ven ve hepatik artere enjeksiyonuyla elde edilen farmakokinetik parametreler (Ort \pm SS, n=7).	153
Tablo 5.1.	Deneysel çalışmalarda kullanılan analitik yöntemler.	155
Tablo 5.2.	Naproksen ve furosemid için beş kuralında yer alan parametreler.	161
Tablo 5.3.	Naproksen sodyum ve furosemidin biyofarmasötik sınıflandırma sistemindeki (BSS) yeri.	164

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ölüme neden olan hastalıklar sıralamasında 7. sırayı işgal eden siroz fibrotik doku ve nodül oluşumu ile karakterize edilen difüze bir hastalıktır. Sirozda tahrip olan parenkim hücrelerinin yerini fibrotik doku olarak kan damarlarında daralmaya yol açar. Bu daralmaya bağlı olarak venöz kan akışına karşı direnç gelişerek portal hipertansiyon gelişir. Yapılan morfolojik analizlerde sinüslerin çaplarının azalarak por içermeyen kapiler görünümünü aldığı ve intersitisyel boşlukta kollajen birikiminde önemli bir artış olduğu gösterilmiştir. Siroza bağlı olarak gözlenen bu bozukluklar karaciğerde fonksiyon gören hücrelerin azalmasına neden olduğu için ilaçların farmakokinetiğinin bilinmesi klinik açıdan önemlidir.

Siroza bağlı karaciğer hasarı geri dönüşümsüzdür. Tedavi genellikle hastalık nedenine ve hastanın şikayetlerine yönelik olarak yapılır. Sirozda albumin üretiminin azalmasına bağlı olarak gelişen asit ve ödemin tedavisi amacıyla diüretik bir ajan kullanılmaktadır. Bu çalışmada, diüretik olarak sıklıkla kullanılan, düşük çözünürlük, düşük permeabilite ve düşük metabolizasyon özelliği gösteren furosemid model ilaç olarak seçilmiştir. Ayrıca yüksek çözünürlük, yüksek permeabilite ve yüksek metabolizasyon özelliği gösteren bir ilacın da sirozdaki davranışını incelemek amacıyla nonsteroidal antiinflamatuvar bir ilaç olan naproksen sodyum ikinci bir model ilaç olarak çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

In situ perfüze sıçan karaciğeri, organın anatomik pozisyonu değiştirilmeksizin izole edilmesine ve normal fizyolojik koşullar korunarak çalışılmasına olanak veren, fizyolojik ve farmakolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Karaciğer diğer organlardan farklı olarak iki kaynaktan (portal ven ve hepatik arter) kan almasına rağmen perfüzyon çalışmalarında cerrahi işlemlerin kolay olması nedeniyle portal ven ana ilgi kaynağı olmuştur. Ancak hepatik arterden gelebilecek muhtemel katkıları ihmal ettiği için bu yöntem fizyolojik değildir. Bu nedenle, bu çalışmada seçilen model ilaçların (naproksen sodyum ve furosemid) kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlardaki hepatik dağılım ve eliminasyonlarını verilmiş yolunun fonksiyonu olarak incelemek amacıyla karaciğerin

portal ven ve hepatik arterden perfüzyonuna olanak veren ikili perfüzyon yöntemi seçilmiştir.

Bu tez kapsamında,

- Naproksen sodyum ve furosemidin fizyolojik pH sınırları içerisinde (pH 1-7.5) çözünürlüklerinin incelenmesi,
- Naproksen sodyum ve furosemidin kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlardaki barsak permeabilitelerinin *in situ* barsak perfüzyonu yöntemi kullanarak incelenmesi,
- Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda, karaciğerin vasküler ve ekstraselüler dağılma hacimlerinin radyoaktif işaretli olmayan eritrosit ve Evans mavisi kullanılarak veriliş yolunun (portal ven ve hepatik arter) fonksiyonu olarak tayin edilmesi,
- Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda sadece hepatik arter tarafından perfüze edilen alanın radyoaktif işaretli olmayan eritrosit kullanarak tayin edilmesi,
- Naproksen sodyum ve furosemidin karaciğerdeki dağılma ve eliminasyonlarının kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda veriliş yolunun (portal ven ve hepatik arter) fonksiyonu olarak tayin edilmesi

amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Sistemik etki elde etmek amacıyla ilaçlar sublingual, oral, rektal, parenteral gibi farklı yollardan uygulanmaktadır. Bu uygulama yolları arasında, uygulama kolaylığı, yüksek miktarda ilaç verilebilmesi gibi nedenlerden dolayı en fazla oral yol tercih edilmektedir. Ancak oral yolla verilen bir ilacın farmakolojik etki gösterebilmesi için öncelikle gastrointestinal (GI) kanalı ve karaciğeri geçerek sistemik dolaşıma (kan) sonra da etki yerine ulaşması gerekir. Sistemik dolaşıma geçene kadar oral yolla verilen bir ilaç:

- Gastrointestinal lümeninde dekompozisyona uğrayabilir
- Gastrointestinal kanal duvarından geçerken yıkımlanabilir
- Karaciğerde metabolize edilebilir

Ancak tüm bu etkilerden kurtulan ilaç sistemik dolaşıma geçebilmektedir. Bu faktörler gözönüne alındığında kana geçen ilaç fraksiyonu (F) aşağıdaki eşitlikle verilebilir.

$$F = F_F \cdot F_G \cdot F_H \quad (2.1)$$

F_F : Gastrointestinal kanaldaki dekompozisyondan kurtulan fraksiyon

F_G : Gastrointestinal kanal duvarındaki yıkımdan kurtulan fraksiyon

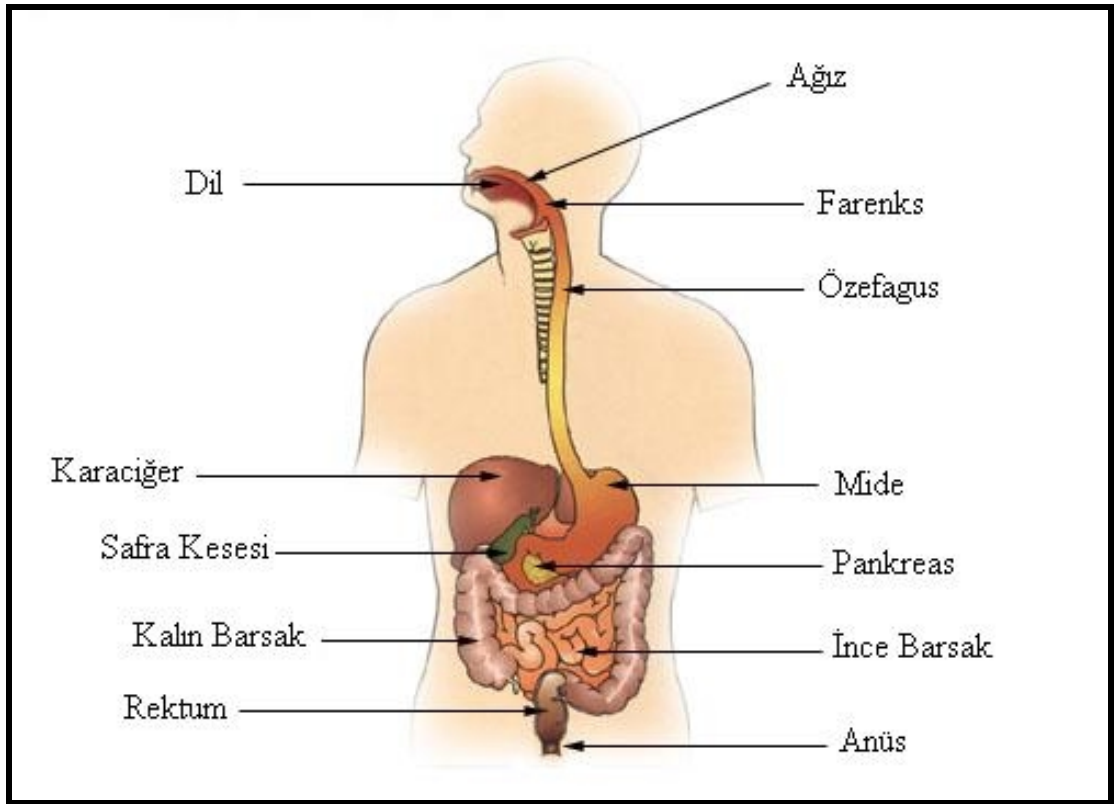
F_H : Hepatik ekstraksiyondan kurtulan fraksiyon

Oral yolla verilen ilaçların absorpsiyonunda seri halde bağlanmış olan GI kanal ve karaciğer oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle GI kanal ve karaciğerin özellikleri, membrandan geçiş mekanizmaları konunun bütünlüğü açısından önem taşımaktadır.

2.1. Gastrointestinal Kanal

İlaçların absorpsiyonu için oldukça önemli bir organ olan GI kanal (Şekil 2.1):

- Ağız, özefagus, mide,
- İnce barsak (duodenum, jejunum, ileum),
- Kalın barsak (çekum, kolon, rektum) olmak üzere üç kısımda incelenebilir.



Şekil 2.1. GI Kanal bileşenleri (1).

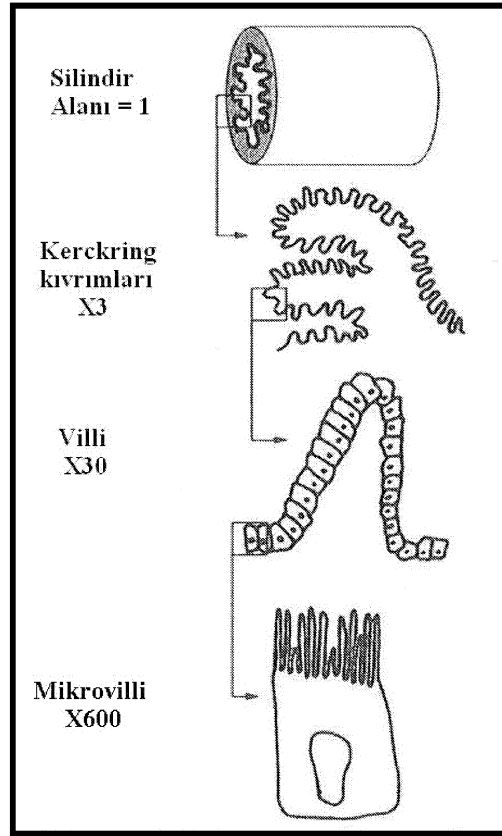
Ağız boşluğu, besinlerin ve ilaçların vücuda giriş noktası olup ana salgısı tükürük (1500 ml/gün, pH: 6.2-7.4)'tür. Oral mukozanın yüzey alanı düşük olmakla birlikte (100 cm²) lipofilik yapıdaki küçük moleküller genelde pasif difüzyonla emilir. Oral mukozadan verilecek ilaçlar doğrudan sistemik dolaşıma katıldıkları için intravenöz uygulamaya benzer bir biyoyararlanım oluştururlar. Ancak ilacın tükürükle

uzaklaştırılmasına bağlı olarak absorpsiyon düzensizdir. Ayrıca plak oluşumu ve epiteldeki değişiklikler absorpsiyon derecesini etkileyebilir (2).

Özefagus, besinlerin ya da ilaçların ağız boşluğundan mideye taşınmasını sağlayan kaslı bir borudur (uzunluk: 25 cm, çap: 2-2.5 cm, pH: 6-7). Sağlıklı kişilerde yutulan materyallerin özefagustan geçiş zamanı oldukça kısa (10-14 sn) olduğu için özefagus mukozasından ilaç absorpsiyonu söz konusu değildir. Ancak dozaj şeklinin özefagusa yapışmasına bağlı olarak ilacın absorpsiyonu ve etkisinin başlaması gecikebilir, yapışmanın olduğu bölgede irritasyon ve ülserasyon görülebilir (2).

Mide, her biri farklı fonksiyona sahip olan üç bölgeden (fundus, gövde ve pilor) oluşur. Bunlardan fundus sindirim gazlarını toplar, gövde (body) pepsinojen ve hidroklorik asit salgılar. Pilorik kısım ise mukus, gastrin ve pepsinojen salgılamaktadır. Mukus mideyi yüksek asit içeriğinden korurken gastrin hidroklorik asit salgılanmasını uyarır. Gastrik sıvıda ayrıca enzimler (gastrik lipaz ve gastrik amilaz gibi), B₁₂ vitamininin absorpsiyonundan sorumlu intrinsik faktör ve prostaglandinler de bulunmaktadır. Sağlıklı bir kişide mide pH'sı 1-3 arasında olup, bu kadar düşük pH besinlerle yutulan mikroorganizmaların yok edilmesi ve proteinlerin sindiriminden sorumlu olan pepsinin aktivasyonu için gereklidir. Midenin absorpsiyon alanı (1m²) düşük olmakla birlikte glikoz, bazı basit şekerler, amino asitler, yağda çözünen bazı maddeler, alkol ve aspirin mideden absorplanmaktadır (2-4).

İnce barsak 5-6 m uzunluğunda olup duodenum (20-30 cm, pH: 6.5-7.6), jejunum (2.5 m, pH:6.3-7.3) ve ileum (3.5 m pH:7.6) olmak üzere üç kısımdan oluşur. Bu bölgeler arasında anatomik olarak kesin bir ayırım olmamakla birlikte absorpsiyon ve sekresyon açısından farklılıklar vardır. Absorpsiyon ve sindirim için önemli olan safra ve pankreas salgıları duodenuma dökülür. İnce barsağın yüzey alanı Kerckring kıvrımları, villi ve mikrovilli (firça kenar) adı verilen özel oluşumlar tarafından oldukça fazla artırılmıştır (200 m², Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kerckring kıvrımları, villi ve mikrovillinin intestinal yüzey alanına katkısı (2).

Bunlardan Kerckring kıvrımları duodenum ve jejunumda iyi gelişmiş olup barsak yüzey alanında üç katlık bir artışa neden olur. Genelde parmak şeklinde olan villiler (0.5-1 mm, Şekil 2.2) yüzey alanda 30 katlık bir artışa yol açarken fırça kenar (brush border) olarak adlandırılan mikrovillilerin yüzey alana katkısı ise çok daha fazladır (yaklaşık 600 kat). Bir inç karelik alanda 20.000 villi ve 10 milyar mikrovilli olduğu belirtilmiştir .

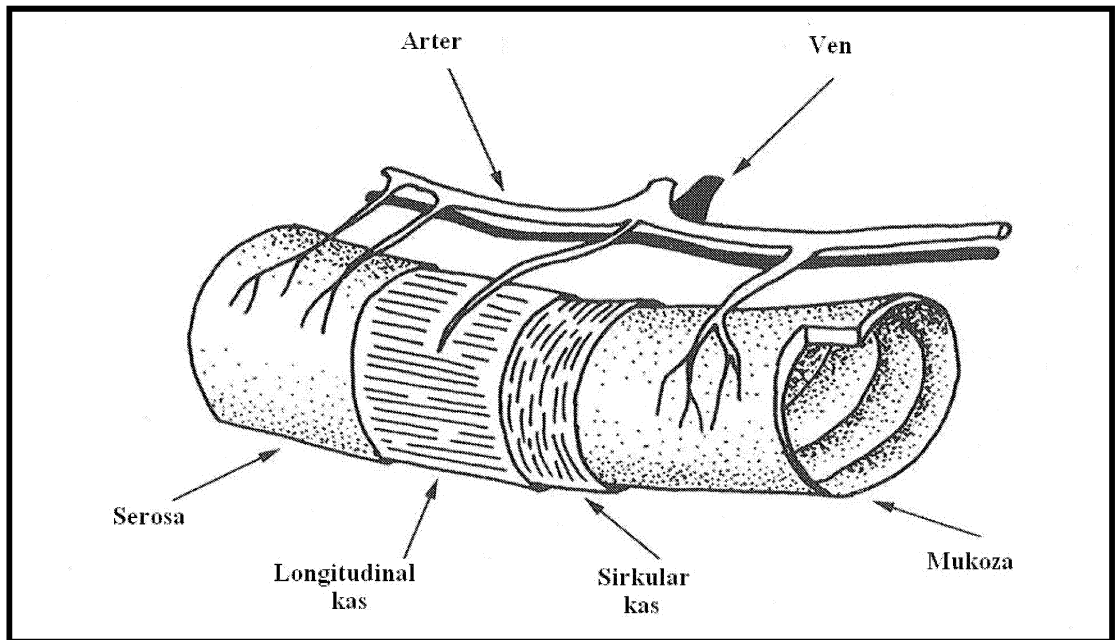
İnce barsak oldukça büyük yüzey alanı ve yüksek kan akımı (25 mL/dk) nedeniyle GI kanalın absorpsiyon için en önemli bölgesidir. Yüksek kan akım hızı intestinal lümenle kan dolaşımı arasında konsantrasyon gradyanı oluşumuna yardım ettiği için pek çok ilacın absorpsiyonu bu bölgeden gerçekleşir.

Kalın barsak yaklaşık 1.5 metre uzunluğunda olup (pH 5.5-7) çekum, kolon (yükselen, ters, inen ve sigmoid kolonlar) ve rektumdan oluşur. Villiler olmadığı için kalın barsağın yüzey alanı ince barsağa göre çok daha küçüktür. Kolon su ve

elektrolitlerin emilmesinden ve sindirilmeyen besinlerin uzaklaştırılmasından sorumludur. Bu bölgeden ilaç absorpsiyonu sınırlı olmakla birlikte çözünürlüğü az olan maddelerin ve geciktirilmiş salım yapan ürünlerin absorpsiyonunda önemli bir bölgedir (5). Ayrıca kolonda bulunan aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar bazı maddelerin (ör. sülfosalazin, L-dopa, laktüloz) metabolizasyonunu gerçekleştirir. Ağız yoluyla ilaç alınmadığı durumlarda ilaç uygulanması için kullanılan rektum, hemoroidal venler tarafından perfüze edilmektedir. Bunlardan alt ve orta hemoroidal venler doğrudan sistemik dolaşıma katılırken üst hemoroidal ven mezenterik dolaşım aracılığıyla karaciğere ulaşır. Dolayısıyla, rektumdaki uygulama yerine bağlı olarak ilaç absorpsiyonu değişkenlik gösterir (4).

2.1.1. Gastrointestinal Kanalın Yapısı

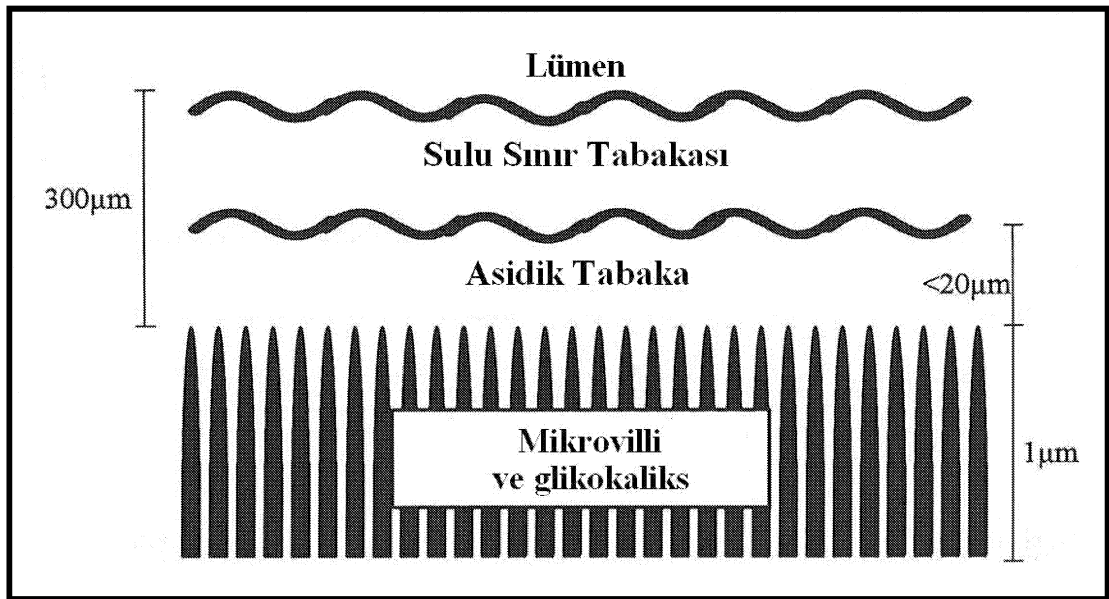
Gastrointestinal kanal duvarı bölgesel farklılıklar göstermekle birlikte genelde mukoza, submukoza, muskularis externa ve seroza olmak üzere dört tabakadan oluşur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Gastrointestinal kanalın yapısı (2).

Mukoza epitel, lamina propria ve muscularis mukoza olmak üzere üç kısımdan oluşur. Bunlardan **epitel** ince barsağın lümene bakan tüm yüzeyini kesintisiz olarak kaplar ve yapısında dört hücre tipi (absorptif, goblet, paneth ve değişmemiş hücreler) bulunur. Epitel hücreler her üç günde bir yenilenecek lümene dökülür ve vücuttan uzaklaştırılır. Epitel hücre bütünlüğünün bozulması mikroorganizmalara karşı görev yapan ilk engeli tehlikeye sokar, malabsorpsiyon ve diyareye neden olur. Mukozanın diğer bileşeni olan **Lamina propria** epitelin hemen altında yer alır ve yapısında lenf folikülleri (*Peyer's patch*) bulunur. Bunlar mikroorganizmalara karşı savunmada ikinci engeli oluşturur. **Muscularis mukosa** ise mukoza ve submukozayı birbirinden ayıran, ince, dairesel ve uzun kas liflerinden oluşan iki tabakalı bir yapıdır (6).

Mukozal yüzeyin hemen üzerinde ortama göre daha asidik olan asidik bir tabaka (acidic microenvironment) vardır. Zayıf elektrolitlerin pH-partisyon hipotezinden gösterdikleri sapmayı açıklamak üzere önerilen bu tabakanın (20 μm) varlığı *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir (7,8). Asidik tabakanın hemen üzerinde, karışmayan su tabakası (unstirred water layer) olarak da adlandırılan sulu sınır tabakası (aqueous boundary layer; Şekil 2.4) bulunur (9).



Şekil 2.4. Mukozal bariyerin yaklaşık boyutları (9).

Yaklaşık 200-800 µm kalınlığında olan (10-12) bu tabakadan absorpsiyon basit difüzyonla gerçekleşir. Bu tabaka, difüzyon hızı hücre membranından geçiş hızından daha düşük olan moleküllerin absorpsiyonunda bir engel oluşturur (13).

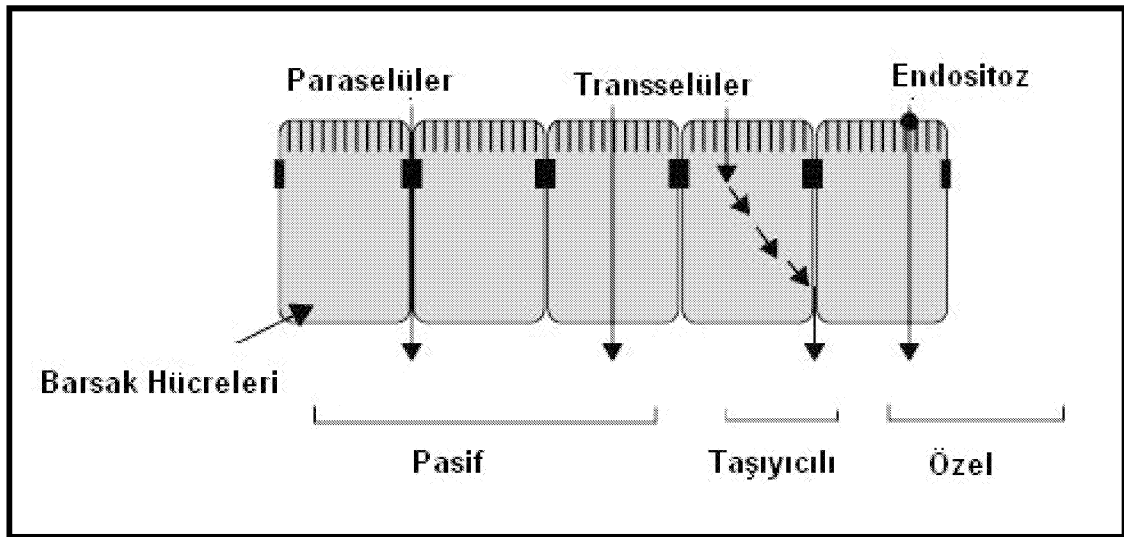
Gastrointestinal kanalın ikinci tabakası olan **Submukoza** yoğun bir bağ dokusundan oluşur ve yapısında kan damarları, lenf ve sinirler bulunmaktadır. Özefagus ve duodenumdaki salgı bezleri bu bölgede yer almaktadır. Üçüncü tabaka olan **Muskularis externa** kalın iki düz kas tabakası olarak düzenlenmiş olup ritmik bir şekilde kasılarak peristaltik hareketleri oluşturur. Gastrointestinal kanalın en dış tabakası olan **Seroza** ise peritonun bir uzantısı olup mezotelyum ve gevşek bağ dokusundan oluşur.

Seroza'dan mukozaya doğru gidildikçe yüzey alandaki artma, serozal-mukozal büyüme faktörü (serosal to mucosal amplification factor) olarak adlandırılmaktadır. Sıçan ince barsağında bu faktör 8.7 olarak tayin edilmiştir. Yüzey alandaki artışın %85'i villilere, %15'i ise kript hücrelerine bağlı olarak gerçekleşmektedir (14).

2.2. Membranlardan Geçiş Mekanizmaları

İlaçların barsak epitelinden geçişi (absorpsiyon) başlıca üç mekanizmaya göre gerçekleşmektedir (5,15). Bunlar ;

- Epitel hücre membranlarından absorpsiyon (Transselüler yol).
- Epitel hücreler arasındaki sıkı kavşaklar (tight junction)'dan absorpsiyon (Şekil 2.5).
- Persorpsiyon



Şekil 2.5. Barsak epitelinden absorpsiyon mekanizmaları (15).

2.2.1. Transselüler Absorpsiyon Mekanizmaları

2.2.1.1. Pasif Difüzyon

Birçok ilacın biyolojik membranlardan transferi, daha yüksek konsantrasyonda buldukları bölgeden daha düşük konsantrasyonda oldukları tarafa doğru pasif difüzyonla gerçekleşir. Moleküllerin rastgele hareketlerine bağlı olarak gerçekleşen pasif difüzyon, membranın iki tarafındaki ilaç konsantrasyonu dengeye ulaşmaya kadar devam eder. Ancak membranı geçen ilaç kan tarafından hızla uzaklaştırıldığı için vücuttaki difüzyon olaylarında çoğu zaman dengeye ulaşılmaz. Herhangi bir dış enerjiye gerek olmayan bu işlem Fick kanunuyla açıklanır.

$$dQ / dt = D \cdot A \cdot K / h (C_{GI} - C_P) \quad (2.2)$$

Eşitlikte;

dQ/dt : Difüzyon hızı

D : Difüzyon katsayısı

K : Partisyon katsayısı

A : Membranın yüzey alanı

h : Membran kalınlığı

$C_{GI}-C_P$: GI kanalla plazma arasındaki konsantrasyon farkı

olarak verilmiştir.

Belirli koşullar altında D , A , K ve h sabit olup bunlar bir sabite altında (P , permeabilite katsayısı) birleştirilebilir. Ayrıca oral yolla verilen ilaçlar için $C_{GI} \gg C_P$ olup absorpsiyon süresi boyunca bir konsantrasyon gradyanı oluşturulur. Pasif difüzyonda absorpsiyon hızı ile ilaç konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki vardır.

$$dQ / dt = P(C_{GI}) \quad (2.3)$$

Pek çok ilacın gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu 1. derece kinetiğine göre gerçekleşir. Ayrıca gastrointestinal kanalla plazma arasındaki büyük konsantrasyon gradyanına bağlı olarak absorpsiyon genelde eliminasyondan daha hızlıdır (2,4,16).

Pek çok ilaç zayıf asidik ya da zayıf bazik yapıda olup kendine ait bir pKa (iyonize ve non-iyonize şekillerin dengede bulunduğu pH'dır) değeri ile tanımlanır. pH partiyon hipotezine göre sadece non-iyonize şekil membranı geçer ve denge halinde, membranın her iki tarafındaki non-iyonize ilaç konsantrasyonu eşittir. Bir ilacın iyonizasyon derecesi dolayısıyla absorpsiyonu o ilacın pKa'sına ve ortamın pH'sına bağlı olarak değişir ve Henderson-Hasselbalch denklemi kullanılarak hesaplanabilir.

Asit

$$pH = pKa + \log \frac{\text{iyonize formun konsantrasyonu}}{\text{non - iyonize formun konsantrasyonu}} \quad (2.4)$$

Baz

$$pH = pKa + \log \frac{\text{non - iyonize formun konsantrasyonu}}{\text{iyonize formun konsantrasyonu}} \quad (2.5)$$

pH ve pKa'nın fonksiyonu olarak ilaç absorpsiyonu asitler ve bazlar için aşağıdaki şekilde verilmiştir.

Asitler

pKa > 7.5 olan zayıf asitler (ör. fenitoin, barbitüratlar) tüm pH'larda non-iyonize halde buldukları için absorpsiyonları pH'dan bağımsız olarak gerçekleşir.

pKa 2.5-7.5 arasında olan zayıf asitlerin iyonizasyonu pH'ya bağımlı olduğu için absorpsiyon derecesi de pH'nın bir fonksiyonudur.

pKa < 2.5 olan kuvvetli asitlerin difüzyonu teorik olarak pH'ya bağlı olmakla birlikte non-iyonize form çok az olduğu için absorpsiyon her zaman düşüktür.

Bazlar

pKa < 5.0 ise absorpsiyon pH'dan bağımsızdır.

pKa 5.0-11.0 arasında yer alan kuvvetli bazların absorpsiyonu pH'ya bağımlı olarak gerçekleşir. Düşük pH'larda bu moleküller tamamen iyonize halde olup absorpsiyonları çok azdır. Absorpsiyonları alkali ortamda artar (17).

pH-partisyon hipotezi ilaç absorpsiyonunun bir göstergesi olarak kullanılmakla birlikte en büyük eksikliği, dengedeki ilaç dağılımından ilacın absorpsiyonunun hesaplanmasıdır. Ayrıca oral yolla verildiğinde yüksek oranda iyonize halde bulunan katerner amonyum bileşiklerinin absorpsiyonunu açıklamada yetersiz kalmaktadır (2).

2.2.1.2. Taşıyıcılar Aracılığıyla (Carrier-mediated) Transport

Yağda çözünürlüğü düşük olan polar yapıdaki pek çok ilaç, lipid yapıdaki membranı “*permeaz*” adı verilen membran proteinleri aracılığıyla kolayca geçmektedir. Bu proteinlerin bir kısmı konsantrasyon yönünde molekülleri taşıırken (*kolaylaştırılmış pasif difüzyon*) bir kısmı konsantrasyon gradyanına karşı taşıma işlemini (*aktif transport*) gerçekleştirir (2,17).

Kolaylaştırılmış pasif difüzyonda enerjiye gereksinim yoktur. Ancak sistem doyumluğa ulaşabilir ve benzer yapıdaki ilaçlar arasında taşıyıcı için yarışma görülebilir.

Aktif transport konsantrasyon gradyanına karşı (düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru) gerçekleşir. Sistem doyumluğa ulaşana kadar absorpsiyon hızı ilaç konsantrasyonu ile orantılı olarak artar ancak yüksek ilaç konsantrasyonunda absorpsiyon hızı sabittir. Aktif transport enerji gerektiren bir olay olup taşıyıcılar intraselüler ATP'nin hidroliziyle açığa çıkan enerjiyi kullanırlar. Sistemde doyumluk ve taşıyıcı için yarışma söz konusudur. Ayrıca taşıyıcı moleküller her madde için spesifiktir. Bazı amino β -laktam antibiyotikleri ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin intestinal absorpsiyonu dipeptit taşıyıcı sistemi ile gerçekleşir. Ayrıca 5-fluorourasil ve dijital gibi kalp glikozitlerinin taşıyıcılar aracılığıyla taşındıkları düşünülmektedir (2,4,16-18).

2.2.1.3. Veziküler Transport

Membranlardan pasif difüzyon ve taşıyıcı proteinlerle taşınma sadece küçük moleküller için geçerlidir. Oysa makromoleküller ve partiküller de hücre içerisine alınmaktadır. Bunların hücre içine alınması “*Cytosis*” adı verilen bir mekanizmayla gerçekleşmektedir. Bu işlemde hücre membranının bir kısmı uzayarak nesneyi sarar ve hücre içine doğru çekerek vakuol oluşumuna yol açar. Makromoleküllerin bu şekilde hücre içerisine alınması *endositoz*, hücre dışına verilmesi ise *eksositoz* olarak adlandırılmaktadır. Eğer makromolekül membran yüzeyindeki bir reseptöre bağlanarak hücre içerisine alınıyorsa, bu işlem *reseptör aracılıklı endositoz* olarak adlandırılmaktadır. *Pinositoz* ve *fagositoz* veziküler transport şekilleri olup hücre içine alınan materyal bakımından farklılık gösterirler. *Pinositoz*da küçük partiküller ya da sıvılar hücre içine alınırken, daha büyük partiküllerin ya da makromoleküllerin makrofajlar tarafından alınması *fagositoz* olarak adlandırılır (2,4).

2.2.1.4. Konvektif (Por) Transport

Su ve üre gibi küçük moleküllerin membranlardan permeabilitelerinin tahmin edilenden çok yüksek olması (suyun permeabilitesi 1000 kat, ürenin ise 10-100 kat daha fazla) üzerine, membranlarda sulu porların varlığı gündeme gelmiştir. Sadece küçük moleküllerin (M.A.< 60.000 D) geçişine izin veren bu porlar (30 Å), ilaçların böbreklerden atılımını ya da karaciğer tarafından alınmalarını açıklamak amacıyla kullanılmıştır (4,19).

2.2.1.5. İyon Çifti Oluşumu

Kuvvetli elektrolit özellikteki ilaçlar (ör. katerner amonyum bileşikleri) yüksek derecede iyonize oldukları için biyolojik membranlardan çok az miktarda geçebilirler. Ancak bunlar zıt yüklü bir iyonla iyon çifti oluşturduklarında nötral bir kompleks oluşur ve bu kompleks membranlardan kolayca geçer. Bu mekanizmayla absorplanan ilaçlara örnek olarak propranolol’ün oleik asitle, kininin heksilsalisilat’la iyon çifti oluşturması verilebilir (4).

Gastrointestinal kanalın değişik bölgelerinden absorpsiyon mekanizmaları Tablo 2.1.’de verilmiştir (20).

Tablo 2.1. Gastrointestinal kanalın değişik bölgelerinden absorpsiyon mekanizmaları (20).

Anatomik Birim	L (cm)	D (cm)	Villi*	Absorpsiyon Mekanizması**	pH	Salgı Miktarı (L/gün)
Ağız Boşluğu	15-20	10	-	PD, KT	6.4	Tükürük: 0.5-1.5
Özefagus	25	2.5	-	-	5-6	-
Mide	20	15	-	PD, KT, AT	1-3.5	Gastrik sıvı: 2-3
Duodenum	25	5	+	PD, KT, AT, KD, İÇÖ, P	6.5-7.6	Safra: 0.25-1.1 Pankreatik salgı: 0.3-0.5
Jejunum	300	5	++	PD, KT, AT, KD	6.3-7.3	İntestinal sıvı: 3
İleum	300	2.5-5	++	PD, KT, AT, KD, İÇÖ, P	7.6	-
Çekum	10-30	7	+	PD, KT, AT, P	7.5-8	-
Kolon	150	5	-	PD, KT	7.9-8	-
Rektum	15-19	2.5	-	PD, KT, P	7.5-8	-

L: Uzunluk; D: Çap; *villi yok (-) ve villi var (+)

**PD: Pasif Difüzyon; KT: Konvektif Transport; AT: Aktif Transport; P: Pinositöz; KD: Kolaylaştırılmış Difüzyon; İÇÖ: İyon Çifti Oluşumu

2.2.2. Paraselüler (İnterselüler) Transport

Moleküllerin hücreler arasında bulunan boşluklardan (tight junctions, sıkı kavşak) geçmesi işlemi paraselüler (interselüler) transport olarak adlandırılmaktadır. Yaklaşık 80 nm uzunluğundaki bu sıkı kavşaklar fırça kenarın hemen altında yer alır

(14). Sıçan barsağında bulunan sıkı kavşakların ortalama uzunluğu birim yüzey alanı (cm^2) başına 35-45 m olarak hesaplanmıştır. Norris ve diğ. (21) molekül çapı 1.1 nm'den büyük olan moleküllerin intestinal paraselüler boşluklardan geçemeyeceğini belirtmiştir. Por çapının jejunumda 0.8 nm, ileum ve kolonda 0.3 nm olduğu düşünülürse büyük moleküllerin paraselüler yolla barsaktan absorplanmaları olası değildir (2). Paraselüler yolla absorplanan ilaçlara örnek olarak atenolol (22) hidrokloriyazid (23), simetidin (24), ranitidin (25) ve mannitol (19,26) verilebilir.

2.2.3. Persorpsiyon

İntestinal hücreler, villiler arasında bulunan bezlerle (crypt of Lieberkühn) sürekli olarak üretilerek villilerin ucuna doğru hareket ederler. Sindirim sırasında bu hücreler dökülerek geçici bir boşluk bırakırlar ve büyük partiküller bu boşluklardan dolaşıma geçebilir. Persorpsiyon olarak adlandırılan bu işlem (2) yoluyla az sayıda polimer partikülünün dolaşıma geçtiğine dair kanıtlar bulunmuştur (27).

2.3. Barsak Permeabilitesini Tayin Yöntemleri

Bir ilacın permeabilitesi, barsak membranının yapısı, bütünlüğü, ilacın fizikokimyasal özellikleri (molekül büyüklüğü, hidrojen bağı yapabilme kapasitesi vb) ve spesifik transport mekanizmaları gibi faktörlere bağlıdır (28). Bir ilacın dahil olduğu permeabilite sınıfı,

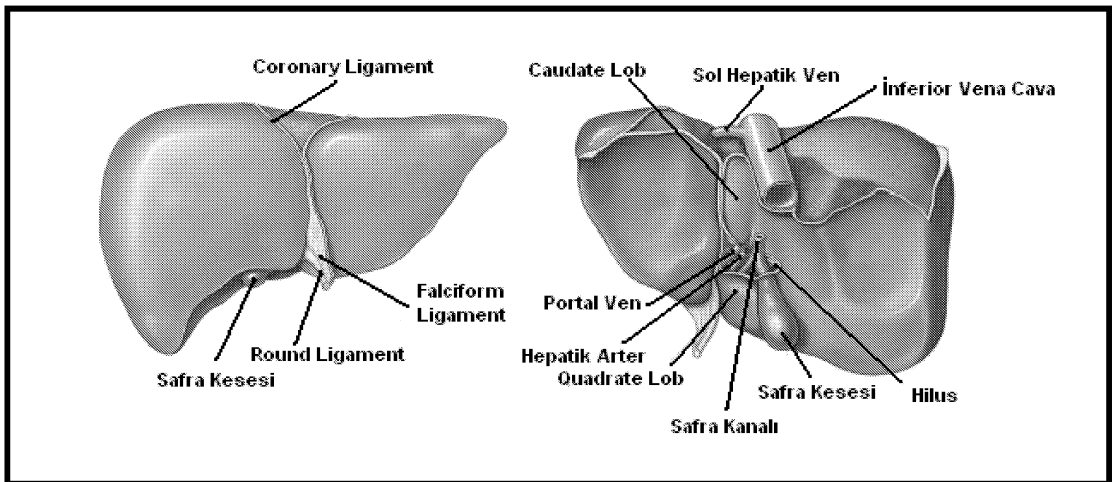
- Kütle denge çalışmaları
- Mutlak biyoyararlanım çalışmaları
- Barsak perfüzyonu çalışmaları
 - İnsanda *in vivo* barsak perfüzyonu
 - Uygun hayvan modeli (ör. Sıçan) kullanılarak *in vivo* ya da *in situ* barsak perfüzyonu,
 - İnsan ya da hayvan barsak dokuları kullanılarak *in vitro* permeasyon
 - Tek tabakalı epitel hücre (ör. CaCo-2) kültüründen permeasyon

çalışmaları yapılarak tayin edilebilir. İntravenöz referans doza oranla absorpsiyon derecesinin %90'dan fazla olması durumunda etkin maddenin permeabilitesinin yüksek olduğu kabul edilir. Yüksek permeabilitenin bir göstergesi olarak kabul edilen doğrusal ve tam absorpsiyon durumlarında biyoyararlanımın etkilenme olasılığının az olduğu belirtilmiştir (29). Bu çalışmada seçilen model ilaçların (naproksen sodyum, furosemid) barsak permeabiliteleri lümenenden kayıp esasına dayanan barsak perfüzyonu yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

2.4. Karaciğer

2.4.1. Karaciğer ve Görevleri

Diyaframın hemen altında bulunan ve vücudun en büyük organı olan karaciğerin toplam vücut ağırlığına oranı normal bir erişkinde 1/50 kadardır (1200-1500 g) (30,31). Karaciğerin yüzeyi Glisson kapsülü olarak adlandırılan kalın bir bağ dokusu ile kaplanmıştır. *Falciform ligament*, karaciğeri sağ ve sol loba ayırmaktadır. Sağ lobdan 6 kez daha küçük olan sol lob ise *ligamentum teres* ve *ligamentum venosum* aracılığıyla yapısında bulunan *caudate* ve *quadrate* loblardan ayrılmaktadır (Şekil 2.6). Yapılan araştırmalarda, karaciğerde bulunan lobların fonksiyonel olarak herhangi bir farklılık göstermediği belirtilmiştir (31,32).



Şekil 2.6. Karaciğerin makroskopik görünümü (31).

Karaciğer kalpten pompalanan kanın yaklaşık % 20'sini (pek çok canlıda kan akım hızı 1.5 mL/dk/g) almaktadır. Kan akım hızının yüksek olmasına bağlı olarak

karaciğerin kan hacmi oldukça yüksektir ve kardiyovasküler hemostazın sağlanmasında önemli bir role sahiptir (33). Vücuttaki diğer organlardan farklı olarak karaciğere kan iki kaynaktan sağlanır. Bunlar, sistemik dolaşımdan gelen yüksek basınçlı (85-90 mmHg) (34), ve iyi oksijenlenmiş kanı sağlayan hepatik arter (%20-25) ve gastrointestinal kanal, pankreas ve dalaktan gelen düşük basınçlı, oksijen içeriği düşük, ancak besinler bakımından zengin kanı sağlayan portal vendir (%75-80), (35). Hepatik arter yapı ve genel özellikler bakımından vücuttaki diğer arterlere benzer. Ancak portal ven diğer venlerden farklı olarak kapakçık içermez. Bu nedenle siroz gibi bazı hastalık durumlarında kan akışı tersine dönebilir (36).

Metabolik ve atılımla ilgili pek çok işlemde oldukça önemli bir role sahip olan karaciğerin görevleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir (30,35,37-41).

- Hepatik hücreler (hepatositler) farklı kimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimleri üretir
- Karbohidratların metabolizasyonunu gerçekleştirir
- Yağları sentezler ve yıkımlar. Karaciğer, karbohidrat ve proteinin fazlasını yağ asidine dönüştürerek kandaki yağ asitlerini düzenler
- Yağların sindirimi ve yağda çözünen vitaminlerin absorpsiyonu için gerekli olan safra (pH 8.1) hepatositler tarafından salgılanır (800 –1000 mL/gün)
- Yağda çözünen ilaçların absorpsiyonunu ve inaktivasyonunu sağlar. Toksinlerin inaktivasyonunu gerçekleştirir
- A, D, E, K, B₁₂, vitaminlerini depolar
- Esansiyel olmayan amino asitleri sentezler. Amino asit konsantrasyonlarını ve kan glikozunu normal düzeyde devam ettirir
- Plazma proteinlerini (alfa ve beta globülin, albümin gibi), pıhtılaşma faktörlerini (fibrinojen ve protrombin gibi), anjiotensinojen ve kolesterolü sentezler. Kolesterolü steroid hormonlara (androjen ve östrojen) dönüştürür

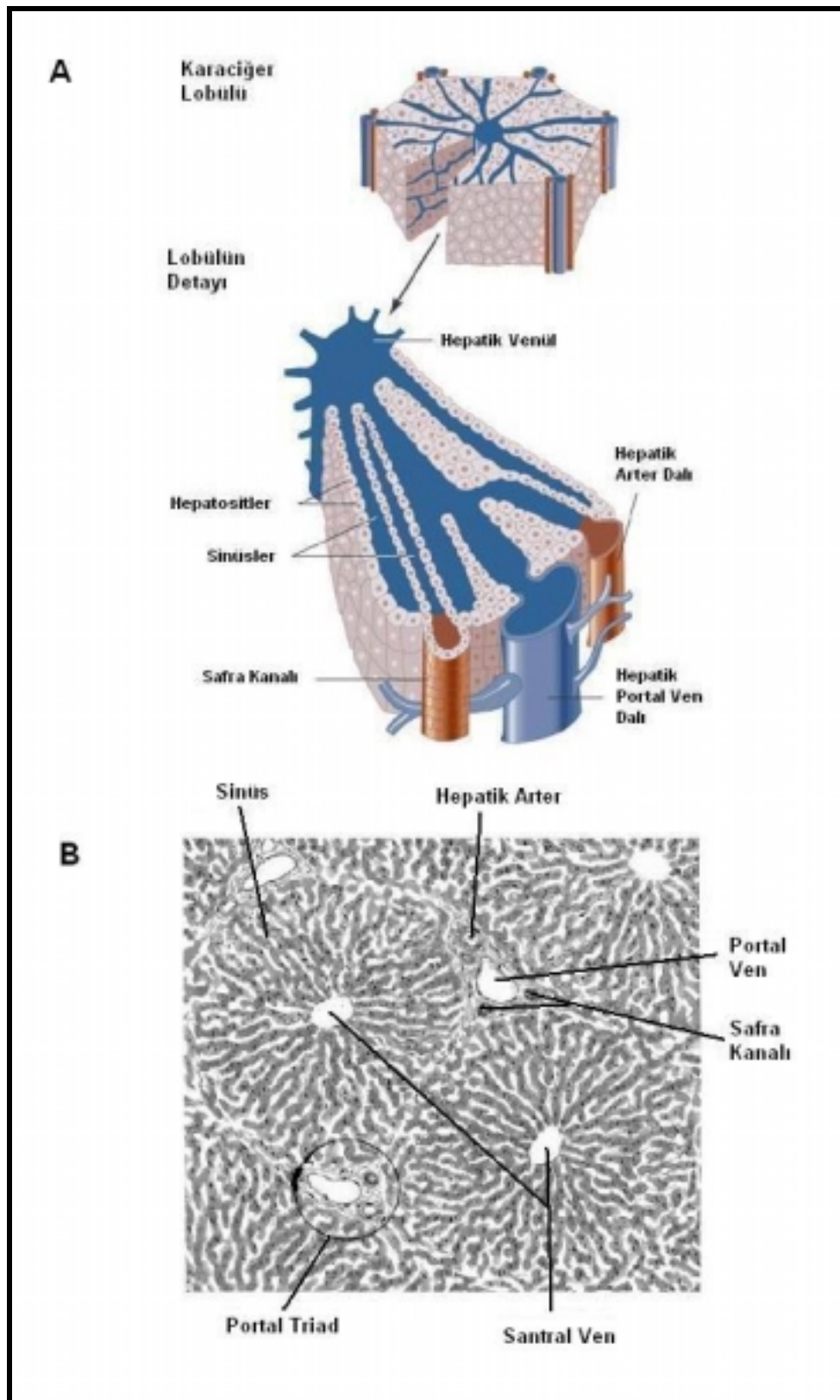
- Kanı süzer ve depolar. Dolaşım sisteminden büyük miktarda kan kaybının söz konusu olduğu durumlarda, depolanan kanın büyük bölümü dolaşıma karışarak bu kayıp telafi edilir. Hasara uğramış eritrositleri, bakterileri vb. Kupfer hücreleri aracılığıyla *fagosit* eder. Hemoglobinin yıkımlanması sonucu ortaya çıkan demiri ferritin şeklinde depolar
- Dolaşımdaki hormonların (insülin ve epinefrin) ve immünoglobulinlerin absorpsiyonunu ve yıkımlanmasını sağlar
- Böbreklerle beraber tiroid hormonlarının kontrolünden sorumludur.

2.4.2. Karaciğerin Fonksiyonel Birimi

Karaciğerin fonksiyonel birimi olan lobüller 0.8-2 mm çapında ve 1 mm yüksekliğinde olup, hegzagonal olarak sıralanmış hepatik hücrelerden (hepatosit) meydana gelir (Şekil 2.7). Kan ve hepatik hücreler arasındaki madde alışverişi bu lobüller düzeyinde gerçekleşmektedir. İnsan karaciğerinde yaklaşık olarak 50.000–100.000 adet lobül bulunmaktadır (30,42). Hepatik lobülleri tanımlamak amacıyla farklı zamanlarda ortaya atılmış üç farklı kavram (klasik lobül, portal lobül ve hepatik asinus) söz konusudur (43).

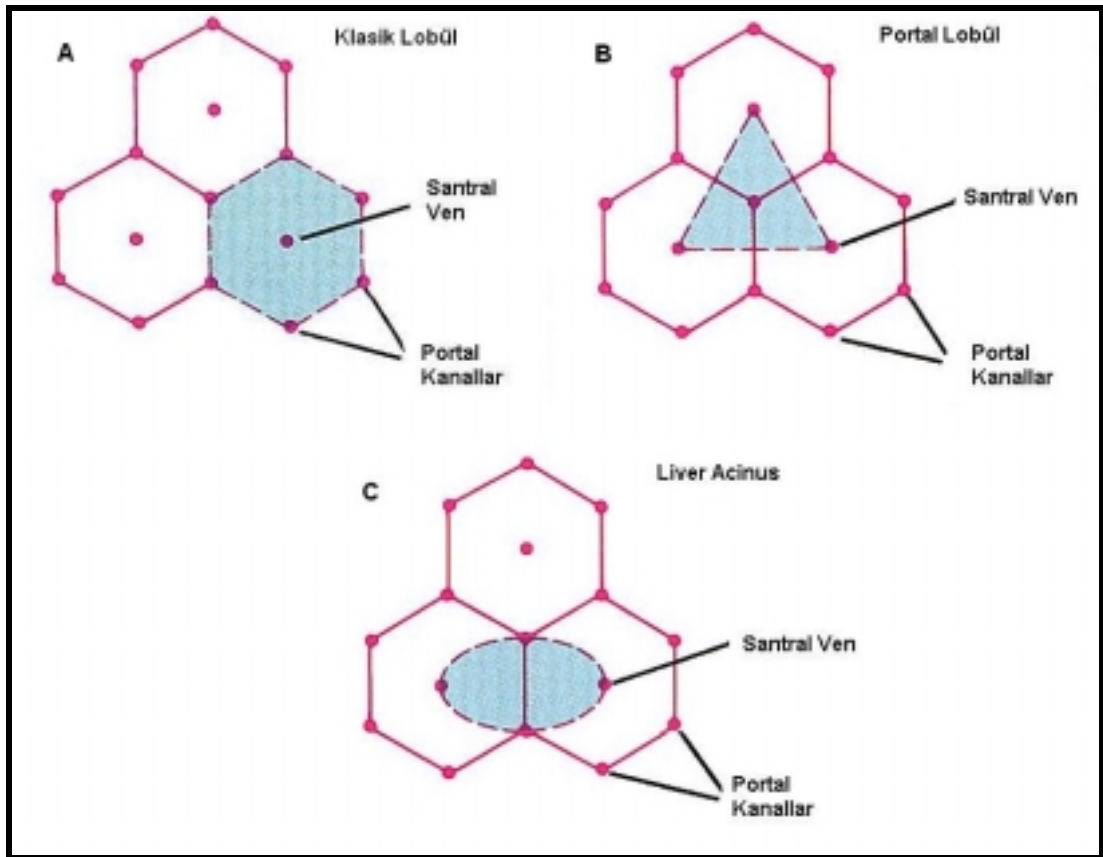
Klasik lobül: ilk kez 1833 yılında Kiernan (44) tarafından tanımlanmıştır. Merkezinde santral (hepatik) ven, köşelerinde ise portal üçlünün (hepatik arter, portal ven ve safra kanalı) yer aldığı çoğunlukla altıgen şeklindeki birimlerdir (Şekil 2.8A).

Portal lobül: morfolojik ekseni portal üçlüden safra kanalı olan, köşelerinde ise santral venlerin yer aldığı lobüldür. Portal lobülde safra sekresyonu esas alınarak geliştirilmiş bir lobül yaklaşımıdır (Şekil 2.8B).

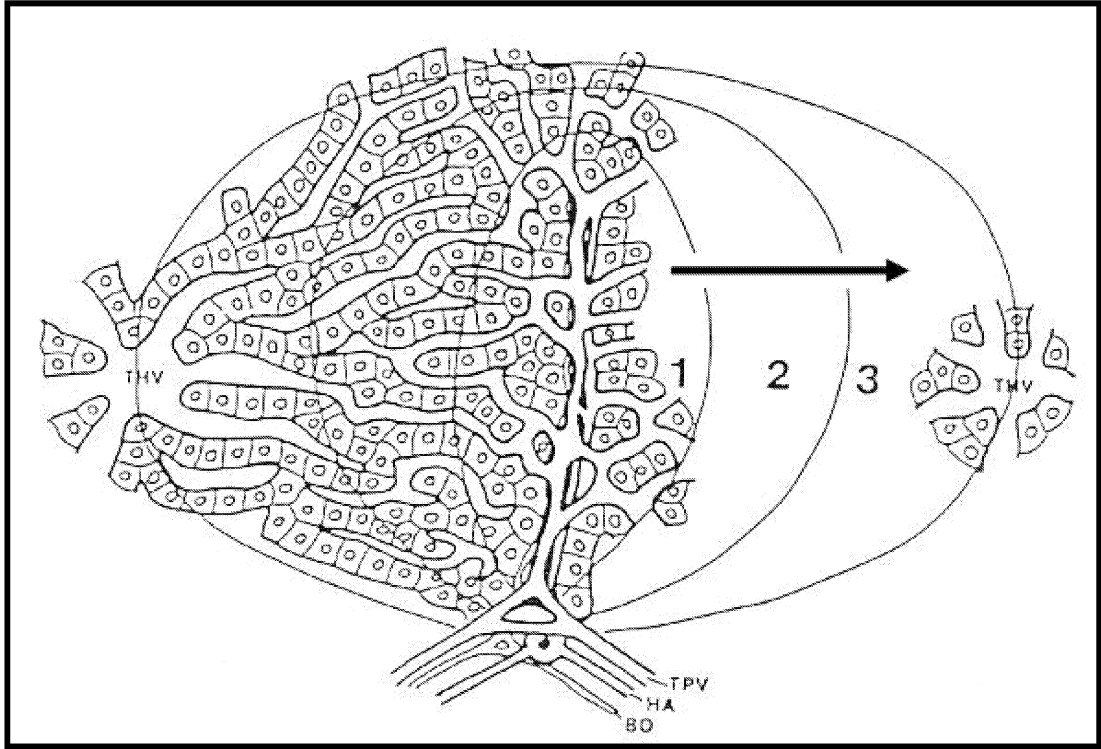


Şekil 2.7. Hepatik lobülün şematik (A) ve mikroskobik (B) gösterimi (45).

Hepatik asinus (acinus): Rappaport ve diğ. tarafından 1954 yılında geliştirilmiş olup fonksiyonel ve fizyolojik olarak oldukça faydalı bir modeldir (46). *Asinus* terminal portal venül (<40 µm), terminal hepatik arteriyol (15-50 µm), safra kanalcıkları, lenf damarları ve sinirlerden oluşan bir eksen etrafında olacak şekilde düzenlenmiştir ve dolaşım bakımından üç bölgeye (zon) ayrılmıştır (Şekil 2.8C ve Şekil 2.9). Bunlar; periportal (zon 1), ara (zon 2) ve perivenöz (zon 3) zonlardır (47). Hepatik asinus'taki kan akımı 1 numaralı zondan 3 numaralı zona doğru gerçekleşir. Bu nedenle oksijen ve kandaki diğer bileşenler yönünden bir konsantrasyon gradyanı vardır. Periportal ve ara zon oksijenleme derecesi yönünden zengindir. Perivenöz bölge ise zon 1 ve zon 2'den gelen kan ile perfüze olduğu için oksijen bakımından fakir ancak mikrozomal enzimler açısından zengin kan ile perfüze olmaktadır (33). Bu nedenle farklı zonlarda bulunan hepatositlerin farklı metabolik kapasiteleri vardır. Örneğin oksidatif enerji metabolizması, glikoneogenez, üre sentezi ve safra üretimi periportal bölgede gerçekleşirken, liponeogenez, glutamin sentezi ve ilaçların metabolizasyonunun perivenöz bölgede daha baskın olduğu ileri sürülmektedir ancak bu bölgeleşmenin statik değil dinamik olduğu bildirilmiştir (48-50).



Şekil 2.8. Karaciğerdeki lobüllerin şematik gösterimi A: Klasik lobül, B: Portal lobül, C: Hepatik asinus (liver acinus) (51).



Şekil 2.9. Hepatik asinus. PV: portal venül; HA: hepatik arteriöl; BD: bile ductule THV: terminal hepatik venül; 1: periportal bölge; 2: ara bölge; 3: perivenöz bölge (47) .

2.4.3. Sinüsler ve Sinüslerde Bulunan Hücreler

Plazmanın karaciğer içerisindeki dağılımı sinüs adı verilen ve çok sayıda endotelial fenestreler içeren özel kapillerler aracılığıyla gerçekleşir. 10-30 hepatosit tarafından oluşturulan sinüsler 200-500 μm uzunluğunda ve 8-10 μm çapındadır. Sinüslerin bu özelliği sayesinde belirli bir büyüklüğe kadar olan kan bileşenleri hepatosit membranı ile doğrudan etkileşir ve kanla hepatositler arasındaki madde değişimi kolaylaştırır (Şekil 2.10) (52,53).

Dört tip sinüs hücresi vardır. Bu hücrelerin %44'ü endotel hücreleri, %33'ü Kupfer hücreleri, %10-15'i yağ depolayan hücreler ve %5'i pit hücreleridir. Bu hücreler parenkimal olmayan hücrelerdir (32,54-56).

2.4.3.1. Endotel Hücreleri

İlk olarak 1970 yılında Wisse tarafından tanımlanan endotel hücreleri, sinuslerin duvarını oluştururlar (57) ve ortalama çapı 150-175 nm olan fenestrelere içerirler (32,58). Diğer endotel hücrelerinden farklı olarak basal membranları olmadığı için plazmanın Disse boşluğu içine geçmesi konveksiyon yolu ile olur (59). Sinüslerdeki kan ile Disse boşluğundaki plazma arasında bir biyofiltre gibi davranan fenestrelere filtre kapasitesi 0.15 µm olup 0.2 µm'den büyük partiküller fenestrelere geçemezler (31). Endotel hücreleri endositöz aktiviteye sahiptirler ve Kupfer hücreleri ile birlikte hepatik retikuloendotelial sistemi oluşturarak küçük partikülleri ve makromolekülleri dolaşımdan temizler, prostoglandin üretirler ayrıca ekstraselüler matriksin üretiminde rol alırlar (58).

2.4.3.2. Kupfer Hücreleri

Sinüs lümeni içerisinde yer alan Kupfer hücreleri doku makrofajları olarak da adlandırılırlar ve karaciğer hücrelerinin % 15'ini oluştururlar. Periportal bölgede sayıları daha fazladır (periportal bölgede %43, ara bölgede %28 ve merkezi bölgede %29) (60). Oldukça yüksek hareket kabiliyetine sahip olan bu hücreler gerekli durumlarda karaciğer dışına da çıkabilirler (31). Endojen ve eksojen maddelerin yok edilmesinde önemli rol oynayan Kupfer hücreleri peptid düzenleyiciler ve prostanoitleri (prostaglandin v.b.) salgırlar.

2.4.3.3. Perisinusoidal Yağ Depolayan Hücreler (İto hücreleri, Stellate hücreler)

Genellikle Disse boşluğunda bazende hepatositler arasında yer alan bu hücreler vitamin A'dan zengin yağ damlaları içerirler ve ekstraselüler matriks proteinlerini sentezlerler. Yağda çözünen vitaminlerin aşırı miktarda alınması İto hücrelerinin patolojik olarak büyümesine ardından da kollajen oluşturarak fibroz ve siroz oluşumuna neden olabilmektedir. Bu hücreler normal ve fibrotik yapıdaki karaciğer bağ dokusunun sentezinde rol alırlar, sinir uçlarına yakın olmaları ve kasılabilme özellikleri nedeniyle kan akımını düzenleyerek portal hipertansiyonu etkilerler (31,32,61).

2.4.3.4. Pit Hücreleri

Wisse ve diğ.(61) tarafından 1976'da tanımlanan bu hücreler sinüs lümeninde yer alırlar. Karaciğere spesifik doğal katil hücreler olarak da adlandırılan bu hücreler tümör ve virüsle enfekte olmuş hücrelere karşı savunmadan sorumludurlar (32,36,60,62).

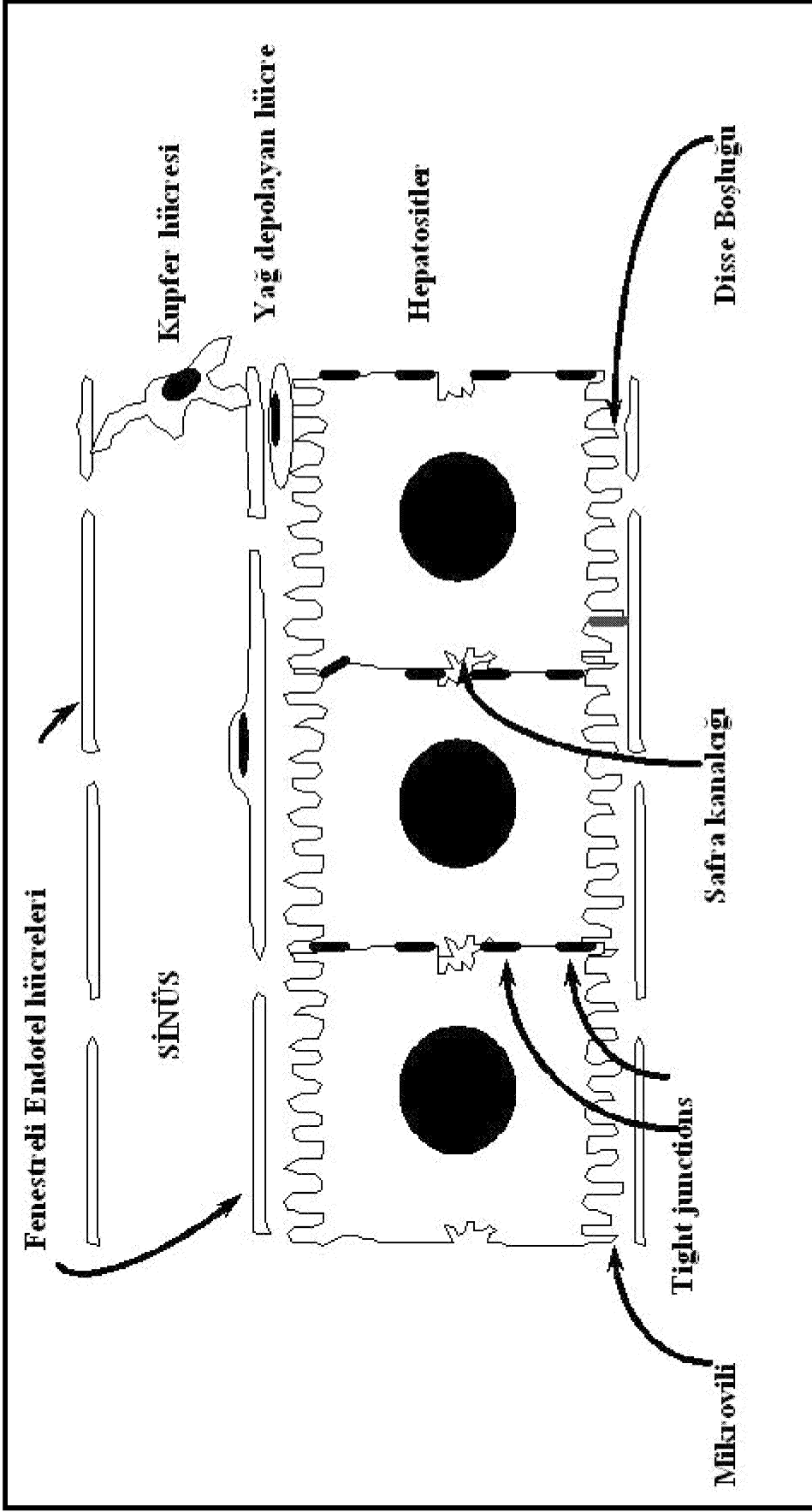
2.4.4. Disse Boşluğu (Space of Disse)

Alman anatomici Joseph Disse'nin adı verilen Disse boşluğu (intersitisyel boşluk), sinüsleri hepatositlerden ayıran ve yaklaşık 1-2 μm kalınlığında olan bir boşluktur. Sinüslerdeki plazmada bulunan moleküller, hepatositlere ulaşabilmek için Disse boşluğundan geçmek zorundadır (32,58). Bu boşluk ekstraselüler matriksin ana bileşenleri olan glikozaminoglikanlar (hyalüronat, proteoglikan), kollajen (kısmen tip I ve az miktarda tip III, IV, V ve VI) ve glikoproteinleri (laminin, fibronektin) içerir. Glikozaminoglikanlar, molekülleri büyüklüğüne ve yüküne göre filtre eden porlu bir jel oluşturur (63). Molekül büyüklüğü arttıkça ekstraselüler matrikste dağılma sınırlanır (64,65). Hepatositlerin mikrovillileri ve İto hücreleri Disse boşluğunda bulunur. Karaciğer hasarında ise bu boşluk tıkanabilir (32,66,67).

2.4.5. Hepatositler

Aralarında sinüsler olacak şekilde santral venden başlayarak perifere doğru tek yada çift hücreli tabakalar oluşturacak şekilde düzenlenmiş olan hepatositler (Şekil 2.10), karaciğerdeki baskın hücre tipi olup toplam hücre sayısının %60' ını oluştururlar. Yaklaşık olarak 30 μm çapında olan bu hücreler poligonal şekilde olup kenarları sinüslerle (sinüs yüzeyi) ya da komşu hepatositlerle (lateral yüzey) temas halinde olabilir. Hepatositlerin lateral yüzeylerinin bir kısmı safra kanalcığını oluşturacak şekilde değişikliğe uğramıştır. Hepatositlerin sinüsle temasta olan yüzeyi ise Disse boşluğunu dolduran ve yüzey alanını altı kat artıran mikrovillilerle kaplanmıştır (25-50 mikrovili/ μm^2) (68,69). Disse boşluğu ile temasta olan hepatosit membran alanı 2000 μ^2 olarak hesaplanmıştır. Hepatosit membranının %50'sinin komşu hepatositlerle, %37'sinin sinüsoidal alanla ve %13'ünün ise safra kanalı duvarıyla temas halinde olduğu belirtilmiştir (68). Hidrofobik özellikteki bileşikler

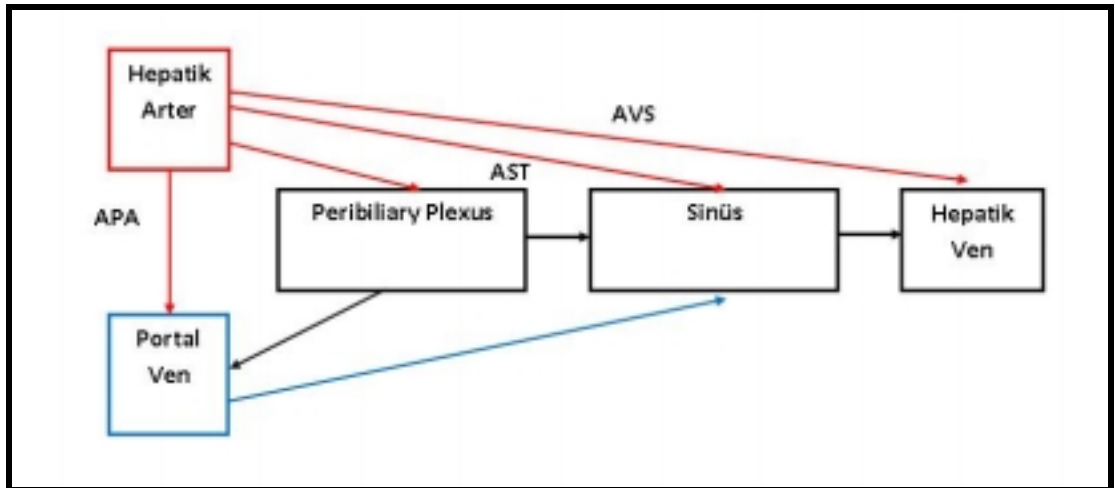
hepatosit membranının (membran kalınlığı: $7 \times 10^{-3} \mu\text{m}$) (70) lipid tabakasından kolaylıkla geçerken hidrofilik özellikteki maddelerin hücre içerisine girişinde bir permeabilite engeli söz konusudur (53). Sinusoidal alandan, safra kanalcıklarına doğru gidildikçe hepatosit membranı oldukça kompleks polarize taşıyıcı sistemlere sahiptir. İlaç moleküllerinin hücre içine alımı bazolateral yüzeydeki hepatosit membranında, safra kanalına salgılanması ise apikal yüzeydeki hepatosit membranında yer alan aktif taşıyıcı sistemler tarafından gerçekleştirilir (71).



Şekil 2.10. Sinüs, sinüs hücreleri, Disse boşluğu ve hepatositlerin şematik gösterimi.

2.4.6. Karaciğerde Mikrodolaşım

Karaciğer içerisinde birbirine paralel olarak ilerleyen portal ven ve hepatik arterin terminal dalları (portal venül ve hepatik arteriyol) sinüslere gerekli olan kanı sağlar. Sıçanda portal venüller sinüslerde sonlanırken arteriyoller bir kaç farklı yoldan sinüslere bağlanır. Bazıları doğrudan sinüsle birleşirken (arteriosinuzoidal twigs) bazı arterioller 45-90°'lik bir açı yapacak şekilde venüllere bağlanır (arteriportal anastomoz) (72,73). Bir kısım arteriol ise safra kanalını çevreleyen kompleks kapiler ağ olan *peribiliary capillary plexus* aracılığı ile sinüsle birleşir (35) (Şekil 2.11). Karaciğerde kan akışı periportal bölgeden perivenöz bölgeye doğru tek yönde olmakla birlikte bireysel sinüslerde kan akışının yönü arteriyollerin sinüslerle birleşme açısına, sinüslerin giriş ve çıkışında yer alan kapakçıklara ve Kupfer hücrelerinin yer değiştirmesine bağlı olarak değişebilir. Sinüslerin büyük bir kısmı karışmış kan almakla birlikte, vasküler yatağın küçük bir kısmı (yaklaşık %10) sadece hepatik arter tarafından perfüze edilir (74-79).



Şekil 2.11. Sıçanlarda portal ven ve hepatik arterin sinüslere bağlanma yolları (80). APA: Arteriportal anastomoz. AST: Arteriosinuzoidal twigs, AVS:Arteriovenöz shunt.

2.4.7. Karaciğerde Metabolizasyon ve Hepatik Klerens

Vücudun en yüksek metabolik kapasiteye sahip organı olan karaciğerde ana metabolizasyon yolları oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve konjugasyondur. Eliminasyon, ilacın pasif difüzyon veya aktif taşınım ile hepatositler içine alınmasını takiben metabolize edilmesi ve/veya safra içine atılması ile gerçekleşir. Pekçok metabolik transformasyon hepatositlerin düz yüzeyli endoplazmik retikulumunda bulunan mikrozomal enzimler (sitokrom P-450 enzimleri) tarafından gerçekleştirilir. Ayrıca karaciğerde mikrozomal olmayan enzimler de (ör. monoamin oksidaz) bulunmaktadır. Karaciğer tarafından metabolize edilme ve/veya safra ile atılım sonucu birim zamanda ilahtan temizlenen kan hacmi hepatic klerens olarak tanımlanır. Hepatic klerens (CL_H), kan akım hızı (Q) ve hepatic ekstraksiyon oranının (E) bir fonksiyonudur ve aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir.

$$CL_H = Q \cdot E \quad (2.6)$$

Hepatic ekstraksiyon oranı hepatositlerin kandaki ilacı içlerine alma ve eliminasyon yeteneklerinin bir ölçüsüdür ve karaciğere giren toplam ilaç konsantrasyonu (C_A) ile karaciğerden çıkan ilaç konsantrasyonu (C_V) farkının C_A 'ya oranı olarak ifade edilir.

$$E = \frac{C_A - C_V}{C_A} \quad (2.7)$$

İlaçlar hepatic ekstraksiyon (E) derecelerine göre düşük ($E < 0.3$), orta ($E = 0.3-0.7$) ve yüksek ($E > 0.7$) oranda metabolize edilenler olarak sınıflandırılmaktadır. E değeri 1'e yaklaştıkça CL_H kan akım hızına yaklaşır ($CL_H \rightarrow Q$). Buna bağlı olarak yüksek ekstraksiyon oranına sahip ilaçlar için karaciğerde dağılım ve eliminasyon organ perfüzyonu ile doğrudan ilişkililikten, ekstraksiyon oranı azaldıkça dağılım ve eliminasyon, kan bileşenlerine bağlanma, enzimatik aktivite ve membran

permeabilitesi gibi farklı fizyolojik faktörlerden farklı düzeylerde etkilenmektedir (17).

Karaciğere kan sağlayan damarların (portal ven ve hepatik arter) hepatik eliminasyona etkisi pek çok araştırmaya konu olmuştur. Bromosulfalein ve CrPO₄ kolloidi (81), ⁸⁵Kr (82), taurokolik asit (83) indosiyenin yeşili (84), D₃ vitamini (85), insülin, glukagon, epinefrin (86), 5-fluorourasil (87) gibi maddelerin hepatik ekstraksiyonuna verilmiş yolunun herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Ancak, lidokain ve meperidin (75), epinefrin (88), norepinefrin (89), fenasetin ve asetaminofen (78), adriamisin (90), doksorubisin (91) ve diazepam (92) gibi ilaçların hepatik ekstraksiyonunda verilmiş yoluna bağlı olarak önemli farklar gözlenmiştir. Diazepamla yapılan çalışmada verilmiş yolunun fonksiyonu olarak gözlenen farkın hepatik arter tarafından perfüze edilen spesifik alanın enzim içeriğinin daha düşük olmasına bağlı olabileceği belirtilmiştir (92).

2.4.8. Hepatik Fonksiyonları Tayin Yöntemleri

Karaciğer fonksiyonlarının tayininde sıklıkla kullanılan yöntemler; izole organeller (ör. mikrozomlar), hepatosit kültürleri, karaciğer kesitleri, izole ve in situ karaciğer perfüzyonu, portal venden perfüzyon, portal ven ve hepatik arterden ikili perfüzyon, vena cavadan perfüzyondur (93).

Bu yöntemler arasında organın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü korunduğu için karaciğer perfüzyonu tekniği fizyolojik, farmakolojik ve farmakokinetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada da seçilen model ilaçların (naproksen sodyum, furosemid) hepatik dispozisyonu portal ven ve hepatik arterden ikili perfüzyon yapılarak incelenmiştir.

2.5. Siroz

Ölüme neden olan hastalıklar sıralamasında dünyada 7. sırayı işgal eden siroz fibrotik doku ve nodül oluşumu ile karakterize edilen difüze bir hastalıktır. Türkiyede ise her yıl 25.000 kişinin karaciğer sirozundan öldüğü tahmin edilmektedir.

Siroz fibroz oluşumu ile karakterize edilmekle birlikte fibroz ve siroz sinonim değildir. Fibroz gerçek sirozdan yoksun olarak kalp yetmezliğinde zon 3'de ya da safra tıkanıklığında zon 1'de meydana gelebilir. Ayrıca fibrozda nodül gelişimi yoktur. Siroz ise nodül oluşumu ile birlikte görülen yaygın fibroz gelişimidir. Ancak fibroz olmadan meydana gelen nodüller siroz değildir (31,70,94).

Siroz oluşumuna yol açan pek çok faktör olmakla birlikte ana neden alkol ve hepatit C'dir (Tablo 2.2). Siroza neden olan faktörler (hipoksi, hiperoksi, toksinler enfeksiyonlar, radyasyon, hipernutrisyon gibi) hücrede moleküler düzeyde oksidatif strese sebep olurlar. Oluşan oksidatif stres lipid peroksidasyonun gelişmesini takiben hücre membranlarında hasara yol açar. Karaciğer hücrelerinin fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelir, hücre içinde Ca^{+2} miktarı artar ve hücre ölümü gerçekleşir (nekroz) (94). Karaciğerin hücre ölümüne karşı en önemli cevabı oluşan nekrozun yıkılmasıdır. Ayrıca difüze fibroz septa oluşur ve bölgesel olarak yeni karaciğer hücreleri geliştirilir. Bu aşamada histolojik örnekler arasında pek fark yoktur. Hepatoselüler nekrozu takiben fibroz oluşur. Bir sonraki aşamada ise portal-portal köprüler, santral-portal köprüler meydana gelir. Son aşamada karaciğerin yapısını bozan nodüller gelişerek siroz gelişmiş olur (31,95).

Tablo 2.2. Siroz oluşturan sebepler (94).

Siroz Oluşturan Sebepler	Hastalık ve /veya Alt Etmenler	
Alkol		
Enfeksiyonlar	Viral hepatit A, C, D Konjenital sifilis	Sistomiyazis Toxoplasmosis
Otoimmün hastalıklar	Otoimmün Hepatit Otoimmün kolanjit	Primer Bilier Kolanjit Primer Sklerosing Kolanjit
İlaçlar	Amiodaron Dantrolen Halotan İzoniyaizid MAO inhibitörleri	Metotreksat Metildopa Nitrofurantoin Pereksilin Propiltiyourasil
Kimyasal Ajanlar	Arsenik Karbon Tetraklorür Bakır Miyotoksin	Fosfor Fitotoksin Trikloroetilen
Safra Hastalıkları	Safra Kanalı Atrezisi Safra Kanalı Stenoza	Bilier Sendromu Kronik Safra İltihabı
Venöz Konjestiyonlar	Budd-Chiari Sendromu Konstruktif Perikardit	Kalp Yetmezliği Veno-Oklusif Hastalık
Metabolik Hastalıklar	α 1-antitripsin Bozukluğu A-beta lipoproteinemi Sistinozis Fruktoz İntoleransı Galaktozemi Gaucher Hastalığı Glikogenozis (Tip I, III, IV) Hemokromatozis	Hiper metioninemi Mukoviskidozis Nieman-Pick Hastalığı Non-Alkolik Stetohepatit Seip-Lawrence Sendromu Talassemi Tirosinozis (Tip I) Wilson Hastalığı
Diğer	Çocukluk Sirozu İntestinal Baypas	Kriyoptojenik Siroz <%10 Rendu-Osler-Weber Hastalığı

Hastalığın erken safhalarında hiç bir semptom görülmeyebilir. Ancak ilerleyen aşamalarında yorgunluk, bitkinlik, iştah kaybı, bulantı, kusma, kilo kaybı, karın bölgesinde ağrı ve deride örümcek ağına benzer şekilde kan damarları görülmektedir. Siroza bağlı olarak ortaya çıkan komplikasyonlar (31,94):

- Albumin üretiminin azalmasına bağlı olarak bacaklarda ödem, karında asit oluşumu
- Kanın pıhtılaşmasından sorumlu proteinlerin üretiminin azalması yada durması nedeniyle morarma ve kanama
- Sarılık, safra taşı oluşumu, ve safra ürünlerinin deride birikmesi nedeniyle kaşıntı
- Kanda ve/veya beyinde toksin birikmesi
- İlaçlara duyarlılık
- Portal hipertansiyon
- Varis oluşumu
- İnsülin rezistansı ve tip II diyabet
- Karaciğer kanseri
- Diğer organlarda problemler (böbrek yetmezliği, osteoporoz gibi)

Siroza bağlı karaciğer hasarı geri dönüşümsüzdür. Ancak tedavi hastalığın ilerlemesini yavaşlatır yada durdurarak komplikasyonlarını azaltır. Tedavi hastalık nedenine ve hastanın şikayetlerine yöneliktir. Örneğin hastalık nedeni alkol ise alkol kesilir. Hepatitle bağlantılı ise viral hepatit için interferon, otoimmün hepatit için kortikosteroid verilir. Wilson hastalığıyla bağlantılıysa vücuttan bakır uzaklaştıracak ilaçlar verilir. Ayrıca ödem ve asit için düşük sodyumlu diyet uygulanır veya diüretik bir ajan kullanılır. Kanda ve/veya beyinde toksin birikmesini önlemek amacıyla düşük proteinli diyet uygulanır. Portal hipertansiyon içinse beta blokör bir ajan verilir. Ancak komplikasyonlar kontrol edilemezse veya karaciğer fonksiyonları tamamen durmuşsa organ transplantasyonu gereklidir (31,95).

2.5.1. Sirozun Sınıflandırılması ve Derecelendirilmesi

Siroz etiyolojisi, morfolojisi, patogenetik gelişimi ve klinik özelliklerine göre dört şekilde sınıflandırılmaktadır (94). Bunlar arasında morfolojik sınıflandırma en sık başvurulan sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmaya göre siroz mikronodüler, makronodüler ve ikisinin karışımı olarak nitelendirilen *mixed* (31) olacak şekilde üç grup altında toplanır. Mikronodüler sirozda karaciğerin her lobunda küçük boyutlarda (<3 mm) nodüller yaygın olarak görünmektedir. Makronodüler siroz ise daha büyük boyutta nodüller (>3 mm) tüm karaciğerde gözlenmektedir (31).

Karaciğer sirozunun derecelendirilmesi cerrahi yaklaşımlar açısından önemlidir (96). Bu amaçla 1964 yılında Michigan Üniversitesi'nden Dr. C.G. Child ve Dr. J.G. Turcotte geliştirilen skorlama sistemi 1972 yılında Pugh tarafından modifiye edilerek geliştirilmiştir. "Child-Pugh" (Child-Turcotte-Pugh olarak da bilinir) skorlama sistemi sirozun prognozunda kullanılmaktadır (Tablo 2.3). Child-Pugh skorlamasına göre 5-6 puan alan hastalarda cerrahi sonrası ölüm oranı %10 iken hastanın bir ve iki yıl yaşama şansları sırasıyla %100 ve %85 olarak verilmektedir. Diğer yandan 10-15 arasında puan alan hastaların cerrahi sonrası ölüm oranı %82 iken bu hastaların bir ve iki yıl yaşama şansları da sırasıyla %45 ve %35 olarak öngörülmektedir (97). Ayrıca MELD (Model for End-stage Liver Disease) skorlama sistemi karaciğer transplantasyonu açısından hastaların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Tablo 2.3. Modifiye Child-Pugh skorlama tablosu (97).

Ölçüm	1 Puan	2 Puan	3 Puan
Bilirubin (µmol/L)	<34 (<2)	35-50 (2-3)	>50
Serum Albumin (g/L)	>35	28-35	<28
INR*	<1.7	1.71-2.20	>2.20
Asit	Yok	Hafif-Orta (tedavi ile baskılanabilir)	Tedaviye cevap vermeyen (tense)
Hepatik Ensefalopati	Yok	I-II. derece (tedavi ile baskılanabilir)	II-IV derece (Tedaviye cevap vermeyen)

*INR: Protrombin zamanı için uluslararası normalize zaman (international normalized ratio for prothrombin time).

Sirozunun histolojik değerlendirilmesi amacıyla Ishak ve diğ. tarafından 1995’de geliştirilen skorlama tablosu (Tablo 2.4) sıklıkla kullanılmaktadır. Bu skorlamada oluşan fibroz ve nodüllerin durumuna göre gelişen siroz 0-6 arasında derecelendirilmektedir (98).

Tablo 2.4. Ishak histolojik skorlama tablosu (98).

Değişim	Skor
Fibroz yok	0
Bazı portal alanlarda, kısa fibroz septadan yoksun fibrotik genişlemeler	1
Pek çok portal alanda, kısa fibroz septadan yoksun fibrotik genişlemeler	2
Pek çok portal alanda fibrotik genişlemeler, az miktarda portal –portal (P-P) köprüleşmeler	3
Portal alanlarda fibrotik genişlemeler, göze çarpan köprüleşmeler (P-P ve portal-santral P-C)	4
Göze çarpan köprüleşmeler (P-P, P-C) az miktarda nodüller (tamamlanmamış siroz)	5
Siroz	6

2.5.2. Deneysel Siroz Oluşturma Yöntemleri

Karaciğer sirozu geliştiren hayvan modelleri hastalıkla ilgili tedavilerin ve mekanizmaların araştırılması için önemlidir. Günümüzde sıçanlarda siroz geliştirmek için yaygın olarak kullanılan iki model bulunmaktadır Bunlar; safra kanalı blokajı (Common Bile Duct Ligaton) ve karbontetraklorür (CCl₄), tiyoasetamid (TAA), ethiyonin, dimetilnitrozamid gibi hepatotoksinlerin uygulanmasıdır (99-102). Hepatotoksik ajan olarak, uygulama yolu, dozu, oluşan sirozun derecesi ve uygulama süresi farklı olmakla birlikte TAA ve CCl₄ sıklıkla kullanılmaktadır.

2.5.2.1. Safra Kanalı Blokajı Yöntemi

Safra kanalı blokajı yöntemi, sekonder bilier sirozun geliştirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Özellikle sıçanlarda (99) siroz geliştirmek için kullanılmakla birlikte fare (103) ve tavşanlara (104) uygulandığı örnekler vardır. Bu yöntemde diğerlerinden farklı olarak cerrahi işlem nedeniyle travma vardır (105,106). Karın duvarı açıldıktan sonra öncelikle safra kanalı izole edilerek iki

yerinden bloke edilir. İki blokaj arasındaki safra kanalı parçası repermealizasyonu önlemek için çıkartılır. Siroz gelişimi için 4-6 haftalık bir uygulamanın yeterli olacağı bildirilmiştir. Beş hafta sonunda ölüm oranı %40'lara varabilmektedir (102,106-108). Operasyon öncesi ve sonrası antibiyotik uygulanması (ampisilin: 100mg/kg) veya vitamin K kullanılması (50 µg/hafta) ölüm oranını kayda değer biçimde azaltmıştır (106,107). Uygulama yapılan hayvanların %60'ında asit gelişimi gözlenmektedir.

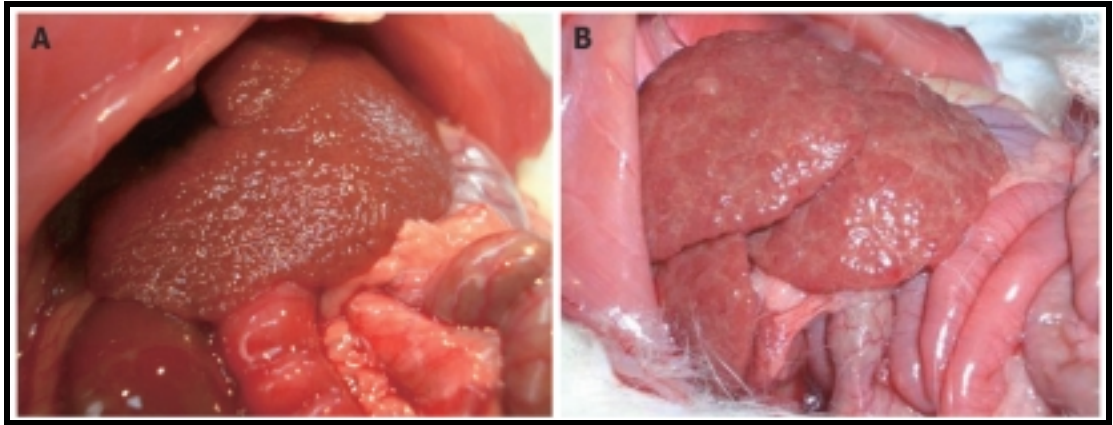
2.5.2.2. Karbon Tetraklorür Uygulaması

Karbon tetraklorürün (CCl₄) akut uygulaması akut hepatit ya da birincil perivenüler lokalizasyon oluştururken uzun süreli uygulaması karaciğerde kronik hasarı takiben mikronodüler siroza (Şekil 2.12 A) neden olmaktadır (109). Siroz geliştirmek amacıyla genellikle fare, sıçan ve tavşanlar kullanılmaktadır (110-112). Karbon tetraklorürün en etkin olduğu uygulama yolları oral (113), subkütan (113) ve inhalasyondur (114,115). Ancak subkütan uygulama verimin (siroz oluşmuş sıçan sayısı) düşük olmasından dolayı pek önerilmemektedir. Uygulamadaki farklılıklar (uygulama yolu, doz ek ajanların kullanılması gibi) siroz oluşum süresi ve veriminde farklılıklara neden olabilmektedir. Karbon tetraklorür uygulamasına başlamadan bir hafta önce içme suyunda fenobarbiton (0.3 g/L) uygulaması yöntemin verimini artırmaktadır. Karbon tetraklorürün 12-20 hafta süreyle uygulaması pek çok sıçanda asit oluşumuna neden olabilmektedir (109).

2.5.2.3. Tiyoasetamid Uygulaması

Siroz geliştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan toksik ajanlardan bir diğeri de tiyoasetamiddir (TAA). Kaynaklarda sıçan ve farelere yapılmış uygulamaları bulunmaktadır. Tiyoasetamid siroz oluşturulacak deney hayvanına içme suyuna ilave edilerek ya da intraperitoneal olarak uygulanmaktadır. İntraperitoneal uygulama ile daha uygun sonuçlar elde edilmektedir. Tiyoasetamidin 12 hafta boyunca deney hayvanlarına uygulaması ile makronodüler siroz oluşmaktadır (Şekil 2.12 B) . İndüksiyon yapılan popülasyonun %40'nda asit gelişmektedir. Uzun süreyle (>18 hafta) yapılan indüksiyonlarda kolanjiyokarsinoma geliştiği bildirilmiştir (108,116-120).

Tiyoasetamidin içme suyunda uygulandığı durumlarda indüksiyon yapılan popülasyonda gelişen sirozun derecesinde bir heterojenlik olmakta ve indüksiyon süresince ölümler gözlenmektedir (121). Bu noktadan hareketle Li ve diğ. (117) yaptıkları bir çalışmada tiyoasetamidi %0.03 konsantrasyonda 12 hafta süreyle içme suyunda uygulamışlardır. Uygulama süresince deney hayvanlarının ağırlık değişimleri haftalık olarak takip edilmiş ve kilo değişimiyle ters orantılı olarak uygulanan tiyoasetamid çözeltisinin konsantrasyonu değiştirilmiştir. 12 hafta sonunda tüm hayvanlarda siroz geliştirilirken yöntem hayvan ölümüne neden olmayan bir model olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 2.12. Karbon tetraklorür ile oluşturulmuş mikronodüler (A) ve tiyoasetamid ile oluşturulmuş makronodüler (B) sirozun makroskopik karaciğer görüntüleri (109).

2.5.3. Sirozda İlaç Dağılımı ve Eliminasyonu

Sirozda tahrip olan parenkim hücrelerinin yerini fibrotik doku alır ve kan damarlarını daraltır. Karaciğer küçülür ve sertleşir. Kan damarlarındaki daralmalar portal vendeki kan akışını azaltır, venöz kan akışına karşı direnç gelişerek portal hipertansiyona yol açar. Yapılan çalışmalarda venöz kan akışında azalma olurken hepatik arter tarafından sağlanan kan akış hızında artma olduğu bulunmuştur. Siroz geliştirilmiş karaciğerlerde yapılan morfolojik analizlerde sinüslerin yüzey alanlarının ve çaplarının azaldığı belirtilmiştir. İntra ve ekstrahepatik portal-sistemik

shuntlar oluşur ayrıca sinüsler por içermeyen kapiller görünümünü almakta, intersitisyel boşlukta kollajen birikiminde önemli bir artış olmaktadır. Siroza bağlı olarak gözlenen bozukluklar karaciğerde fonksiyon gören hücrelerin azalmasına neden olduğu için ilaçların farmakokinetiğinin bilinmesi klinik açıdan önemlidir.

Hepatik ekstraksiyonu orta derecede (0.3-0.7) olan ilaçların biyoyararlanımının sirozda önemli derecede arttığı gösterilmiştir. Sirozlu hastalarda biyoyararlanımdaki artışla birlikte sistemik klerensteki azalma eğri altındaki alanın önemli oranda artmasına yol açabileceği için verilen dozda önemli bir azalma yapmak gerekebilir (122).

Sirozda protein sentezindeki azalmaya ve bilirubin gibi endojen bileşiklerin birikmesine bağlı olarak yüksek oranda proteine bağlanan serbest ilaç fraksiyonunda önemli derecede bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle bazı ilaçların dağılma hacmi sirozda daha yüksek olabilmektedir. Asit gelişmiş hastalarda suda çözünen ilaçların dağılma hacmi artacağı için bu ilaçların yükleme dozunu artırmak gerekebilir (122).

Sirozda karaciğer hücrelerinde ve/veya enzim düzeyinde ya da aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak ilaçların metabolizasyonu azalabilir. Ayrıca sinüslerin kapillerizasyonu nedeniyle bazı ilaçların ve oksijenin hücre içine alımı bozulabilir. Kronik karaciğer hasarında oksidasyon reaksiyonlarının daha fazla etkilendiği belirtilmiştir. Ayrıca her bir CYP izo enzimi üzerine etkisi de farklıdır. Örneğin CYP1A2 ve CYP2C9 düzeyleri ileri derecedeki sirozda önemli derecede azalırken CYP2E1 ve CYP3A düzeylerinin etkilenmediği belirtilmiştir (122).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde etoposid, etodolak ve fentanil, sufentanil, remifentanil gibi bazı opioidlerin dispozisyonun siroz gibi karaciğer hastalıklarından etkilenmediği ancak pek çok ilacın dispozisyonunda önemli değişiklikler olduğu belirtilmiştir (123). Diazepamın yarılanma ömrü sirozda anlamlı şekilde uzamıştır (124). Antihiperlipidemik bir ilaç olan fluvastatinin sirozlu hastalardaki klerensinin %30 azaldığını gösteren veriler bulunmaktadır (125). Opioidlerin oksidasyonu sirozlu hastalarda azaldığı için ilk geçiş etkisi azalmakta ve buna bağlı olarak ilaçların oral biyoyararlanımı artmaktadır. İlave olarak morfinin klerensi sirozda azalmış ve oral biyoyararlanımı artmıştır (123). Ayrıca propranololün klerensinin

sirozda azaldığı bulunmuştur (126). Dipironun metabolitlerinin dispozisyonun karaciğer sirozunda azaldığı belirtilmiştir (127). Orta-ağır sirozu olan hastalarda rasemik ibuprofenin inaktif olan (-)-R ibuprofenden aktif olan (+)-S-ibuprofene dönüşümünün azaldığı gözlenmiştir. Bir başka çalışmada ise ibuprofenin oral yolla uygulanması sonucu sirozlu hastalarda eğri altındaki alan değerleri anlamlı derecede artmıştır (128). Karaciğer hastalıklarında antibiyotiklerin serum konsantrasyonun takip edilerek tedavisinin ayarlanması gerektiği, ayrıca sirozlu hastalarda görülen yüksek plazma seviyeleri göz önüne alındığında günlük gama hidroksi bütirik asit başlangıç dozunun terapötik aralığın alt sınırında tutulması, dozu artırmak gerektiğinde ise hastaların dikkatli olarak takip edilmesi gerektiği önerilmiştir (129).

2.6. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özellikleri

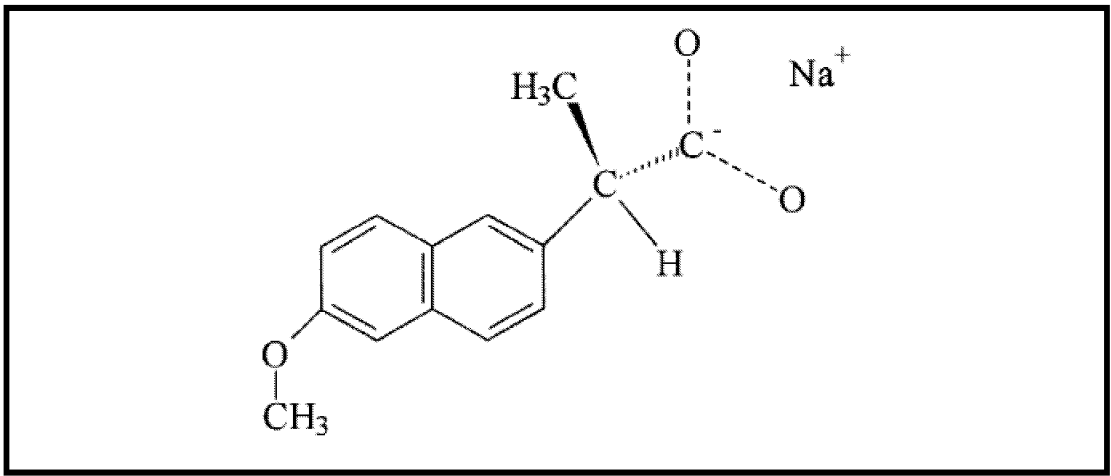
2.6.1. Naproksen Sodyum

Molekül ağırlığı 252.2, pKa'sı 4.2 olan naproksen sodyum (Şekil 2.13), beyaz kremi renkte kristal tozdur. Kimyasal açık adı (+)-2-(6-Metoksi-2-naftil)propiyonik asit sodyumdur. Suda ve metil alkolde çözünür. Etanolde az, asetonda çok az çözünür. Kloroform ve toluende çözünmez.

Naproksenin tayini için çok sayıda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi tanımlanmıştır. Bu yöntem etkin madde (130), tablet (131-133), plazma (134-137), idrar (138) ve intestinal perfüzyon (139) örneklerinden naproksenin tayininde kullanılmaktadır. Tüm bu yöntemler mobil faz, kullanılan kolon ve kullanılan dedektör (UV veya floresans) bakımından farklılıklar göstermektedir.

Naproksen sodyum çeşitli düzeylerdeki ağrılara karşı kullanılan nonsteroidal antiinflamatuvar bir ilaçtır (135,140,141). Naproksen sodyum aktivitesini prostaglandin sentezini inhibe ederek göstermektedir (140,142,143). Biyolojik sıvılarda dağılan naproksen ve naproksen sodyum aynı biyolojik aktiviteye sahiptir. Naproksenin sodyum tuzu olarak uygulanması gastrointestinal kanaldan hızla absorbe olmasına imkan vermektedir (135,140,144). Plazma pik konsantrasyonuna kullanımından sonra 1-2 saat içerisinde ulaşmaktadır (134,144,145). Yemekler absorpsiyon hızını azaltır ancak absorbe olan miktarda bir değişme olmamaktadır

(142). Naproksen karaciğerde yüksek oranda inaktif olan 6-O-desmethyl naproksen'e metabolize olur. Hem naproksen hem de 6-O-desmethyl naproksen kendilerine özgü açılıglukronid konjugatlarına metabolize olurlar. Naproksenin yaklaşık olarak %95'i idrarla itrah edilirken itrah edilenlerin %1'inden azı değişmemiş ilaç, %66-92'si 6-O-desmethyl naproksen olarak atılır (140,146). Uygulanan dozun %3'ü feçesle atılmaktadır. Naproksen terapötik konsantrasyonda plazma proteinlerine %99'dan fazla oranda bağlanan asidik bir ilaçtır (140). Naproksenin bazı farmakokinetik parametreleri ve sirozdaki durumu Tablo 2.5'de verilmiştir.

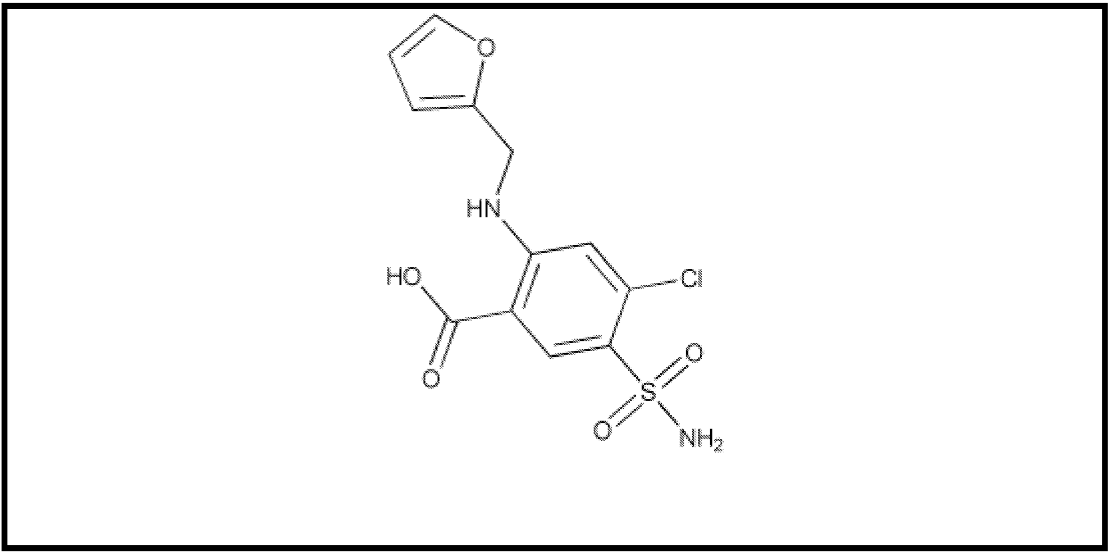


Şekil 2.13. Naproksen sodyumun kimyasal yapısı (141).

Naproksen içeren supozituarların rektal iritasyona ve kanamalara neden olduğu bildirilmiştir. Böbrek yetmezliği olan kişilerde dikkatli kullanılması gerektiği söylenmektedir. Ayrıca kreatinin klerensi 20 mL/dk'dan az olan hastalarda kullanılması önerilmemektedir (135). Aplastik anemi hemolitik anemi ve immüntrombositopeni gibi hematolojik yan etkileri bildirilmiştir. (147,148). Naproksenin en sık bildirilen yan etkisi GI yan etkisidir. Kısa ve uzun süreli kullanımına bağlı olarak görülebilmektedir. Ayrıca akut proktokolit, özefagial ülserasyon gibi yan etkileri de gözlemlenmiştir (149,150).

2.6.2. Furosemid

Molekül ağırlığı 330.7, pKa'sı 3.9 olan furosemid (Şekil 2.14) beyaz hafif sarımsı kristal tozudur. 206°C'da eriyen furosemid 270 ile 345 nm'ler arasında UV absorbans vermektedir. Kimyasal açık adı 4-kloro-N-furfuril-sülfamoylantranilik asittir. Suda çözünmez, etanolde az çözünür, aseton, metil alkol, dimetilformamid, alkali hidroksit çözeltilerinde çözünür. Furosemidin taşıdığı furil metal grubundan dolayı asit ortamlarda dayanıksız olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise furosemidin mide stabil olduğu gösterilmiştir (151).



Şekil 2.14. Furosemidin kimyasal yapısı (151).

Furosemidin HPLC ile safra (152), kan (153-160), serebrospinal sıvı (158), idrar (159-161), farmasötik formülasyon (161) ve çözeltilerden (162) tayini yapılmıştır. Bu yöntemler kullanılan mobil faz sistemleri kolon ve dedeksiyon çeşitlerine (UV ve floresans) göre farklılık göstermektedir.

Kalp, karaciğer ve böbrek kaynaklı ödem belirtilerinin tedavisinde ve kronik hipertansiyonda kullanılan loop diüretik olan furosemid etkisini henle kıvrımının çıkan kısmında göstermektedir (151,163).

Furosemid mide ve jejunumdan %85, ileumdan %20 ve kolondan ise %2-13 oranında absorplanmaktadır (151). Furosemid plazma proteinlerine %95.9 oranında bağlanmaktadır. Furosemidin yarılanma ömrü insanda 30 ile 120 dk arasında değişmektedir. IV uygulamadan sonra vücutta ortalama kalış süresi 51.4 dk iken oral uygulamadan sonra bu süre aç karna 135 dk tok karna 195 dk olarak bildirilmiştir (164). Furosemidin iki metaboliti bulunmaktadır. Bunlardan birincisi maddenin glukuronik asit ile konjugasyonu (4-floro-5-sulfamoil antranilik asit) ile oluşan türevi diğeri ise defurfurilize olmuş türevidir (151). Furosemidin bazı farmakokinetik parametreleri ve sirozdaki durumu Tablo 2.5’de verilmiştir.

Furosemidin en önemli yan etkisi, yüksek dozda kullanımına bağlı olarak görülen hiponatremi, hipokalemi ve hipokloremik alkalozdur (165). Furosemid sefalotin gibi sefalosporin türevi antibiyotiklerin nefrotoksisitesini artırabilmektedir. Ayrıca aminoglikozid grubu antibiyotiklerin ve diğer ototoksik ilaçların ototoksisitesini artırabilmektedir. Antiepileptiklerle birlikte kullanıldığında diüretik etkisi artmaktadır (166,167). Karbamazepin ile birlikte kullanıldığında hiponatremi ortaya çıkmaktadır (168). NSAİ ilaçları furosemid ve diğer diüretiklerin diüretik etkisini antagonize etmektedir. NSAİ’ların diüretiklerle birlikte kullanılması nefrotoksisite riskini artırabilmektedir. Bu yüzden indometazin gibi ilaçların böbreklere olan etkisini önlemek için furosemid ile kullanılması önerilmektedir (169).

Tablo 2.5. Naproksen ve furosemidin farmakokinetik parametreleri ve bu parametrelerin sirozdaki durumu (170).

Farmakokinetik Parametre	Naproksen Sodyum		Furosemid	
	Değer	Sirozdaki durum	Değer	Sirozdaki durum
Plazma proteinlerine bağlanma	%99.7	Bilgi yok	%98.6	Değişmiyor
Klerens (mL/dk.kg)	0.13	Değişmiyor	1.66	Değişmiyor
Dağılma Hacmi (L/kg)	0.16	Bilgi yok	0.13	Artıyor
Yarılanma Ömrü (saat)	14	Bilgi yok	1.3	Artıyor
Pik Zamanı (saat)	2-4	Bilgi yok	1.4	Bilgi yok
Biyoyararlanım	%99	Bilgi yok	%71±35	Değişmiyor

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

Antipirin	Merck / Almanya
Asetonitril	Sigma-Aldrich / Almanya
Evans Mavisi	Sigma-Aldrich / Almanya
Furosemid	Aventis / Türkiye
Glikoz	Merck /Almanya
Kalsiyum Klorür (2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich /Almanya
Ketamin (Ketalar Flakon)	Pfizer / Türkiye
Ksilazin	İntermed / Türkiye
Lasix Ampul (20mg/2 mL)	Aventis / Türkiye
Magnezyum Sülfat (7 H ₂ O)	Sigma-Aldrich / Almanya
Mannitol	Merck / Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich / Almanya
Naproksen Sodyum	Abdi İbrahim / Türkiye
Potasyum Biftalat	Sigma / ABD
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Merck / Almanya
Potasyum Klorür	Merck / Almanya
Sığır Serum Albumini	Sigma-Aldrich / Almanya
Sodyum Bikarbonat	Merck / Almanya
Sodyum Hidroksit	Merck / Almanya
Sodyum Klorür	Merck / Almanya
Sodyum Pentobarbital	İbrahim Ethem Ulagay / Türkiye

Sodyum Sülfat	Merck / Almanya
Sodyum Taurokolat	Sigma-Aldrich / Almanya
Tiyoasetamid	Fluka / Almanya

3.2. Genel Aletler

Derin Dondurucu (-20 °C)	Uğur / Türkiye
Enjektör Filtresi (0.45 µm)	Sartorius / Almanya
Liyofilizatör	Heto-PowerDry PL3000 / Danimarka
Membran Filtre (0.45 µm)	Sartorius / Almanya
Mikropipet (50-200 µl, 200-1000 µl)	Rainin Pipetman / ABD
pH Metre	Sartorius / Almanya
Soğutmalı Santrifüj	IEC / ABD
Tek Kullanımlık UV Küveti (1.5 mL)	İldam / Türkiye
Ultrasonik Banyo	Brasonic 220 / ABD
UV Spektrofotometre	Shimadzu / Japonya
Vorteks Karıştırıcı	Nüve / Türkiye

3.3. HPLC Gereçleri

Ayrım Modülü (Waters 2695)	Waters / ABD
DAD Dedektör (Waters 2996 PDA)	Waters / ABD
Floresans Dedektör (Waters 2475 Multi λ)	Waters / ABD
Vakumlu Pompa	ABM / Almanya

3.4. Perfüzyon Gereçleri

I.V. Kanül (14, 16, 18, 20 GA)	Tyco / İrlanda
Oksijen Tüpü (%5CO ₂ : %95O ₂)	Havaş / Türkiye

Fraksiyonlu Örnek Toplayıcı (May PS 02) Commat / Türkiye

Peristaltik Pompa Gilson / Fransa

3.5. Kullanılan Deney Hayvanı

Sprague-Dawley Erkek Sıçan Hacettepe Üniversitesi / Türkiye

3.6. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

3.6.1. UV Spektrumu

Naproksen sodyumun metanol içerisinde 25 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi hazırlanarak 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınmış ve çözeltinin en fazla absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{maks}) saptanmıştır (171).

Furosemidin 0.02N sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde 8 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi hazırlanarak 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınmış ve çözeltinin en fazla absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{maks}) saptanmıştır (171).

3.6.2. IR Spektrumu

Naproksen sodyum:potasyum bromür karışımının (1:2) 10.000 kg.cm⁻²'lik hidrolik basınç altında 5 dk süre ile sıkıştırılmasıyla oluşan disklerin 400-2000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında IR spektrumları çekilmiştir.

Furosemid:potasyum bromür karışımının (1:2) 10.000 kg.cm⁻²'lik hidrolik basınç altında 5 dk süre ile sıkıştırılmasıyla oluşan disklerin 400-2000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında IR spektrumları çekilmiştir.

3.7. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayini

Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlük sınıfını tayin etmek amacıyla FDA (29)'de belirtilen deney koşulları kullanılmıştır. Rehberde belirtilen pH'lar (pH=1.0, pH=pKa-1, pH=pKa, pH=pKa+1, pH=7.5) maddelerin pKa değerleri de (pKa_{NaproksenSodyum}=4.2, pKa_{Furosemid}=3.9) (172) gözönünde bulundurularak hesaplanmıştır (Tablo 3.1). Bu pH'daki tamponlar USP XXIV'te (173) belirtilen şekilde hazırlanmış olup tampon içerikleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlük sınıfının tayini için kullanılan tamponların pH'ları.

Deney Koşulları (pH=)	Çalışılacak pH Noktaları	
	Naproksen Sodyum	Furosemid
1.0	1.0	1.0
pKa-1	3.2	2.9
pKa	4.2	3.9
pKa+1	5.2	4.9
7.5	7.5	7.5

Naproksen sodyum ve furosemidin çalışılacak pH'lardaki maksimum çözünürlüklerini tespit etmek için, etkin maddelerin yüksek miktarlarda tartımları yapılarak 10 mL'lik flakonlara konulmuş ve üzerine 10 mL çözünme ortamı eklenmiştir. Ağız sıkıca kapatılan flakonlar yatay çalkalayıcıya (37°C, 100 devir/dk) yerleştirilerek deney başlatılmıştır. 24 saat sonunda, her flakondan 5 mL örnek alınarak por çapı 0.45µm olan tek kullanımlık şırınga ucu filtreden süzülmüştür. Örneklerde gerekli seyreltmeler mobil faz sistemi ile yapıldıktan sonra Bölüm 3.7.1'de belirtilen HPLC sistemine enjekte edilerek etkin maddelerin miktarı tayin edilmiştir. Bu çalışma her etkin madde için her pH noktasında 6 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.7.1. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemleri

3.7.1.1. Naproksen Sodyum

Naproksen sodyumun miktar tayini için HPLC yöntemi (Tablo 3.3) kullanılmıştır. Standart doğru denklemini oluşturmak amacıyla etkin maddenin 1 mg/mL konsantrasyonda metanoldeki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stoktan hareketle mobil faz sistemi ile gerekli seyreltmeler yapılarak etkin maddenin 0.1 mg/mL konsantrasyonda ikinci bir stok çözeltisi hazırlanmıştır. İki numaralı stoktan hareketle gerekli konsantrasyon noktalarındaki (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 7.5, 10, 20, 30, 40, 50 μ g/mL) standart çözeltiler mobil faz kullanılarak hazırlanmıştır.

3.7.1.2. Furosemid

Furosemidin miktar tayini amacıyla kullanılan HPLC yöntemine ilişkin koşullar Tablo 3.3.'de verilmiştir. Standart doğru denklemini oluşturmak için furosemidin 1mg/mL konsantrasyonda metanoldeki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stoktan hareketle mobil faz sistemi ile gerekli seyreltme yapılarak etkin maddenin 0.1 mg/mL konsantrasyonda ikinci bir stok çözeltisi hazırlanmıştır. İki numaralı stoktan hareketle gerekli konsantrasyon noktalarındaki (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 7.5, 10, 20, 30, 40, 50 μ g/mL) standart çözeltiler mobil faz kullanılarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan standart çözeltilerin HPLC kolonuna (10 μ L) enjeksiyonuyla elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri grafiklenerek lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemi ve determinasyon katsayıları tayin edilmiştir.

Tablo 3.3. Furosemid ve naproksen sodyumun miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemine ait koşullar.

	Furosemid	Naproksen Sodyum
Çözücü Sistemi	KH ₂ PO ₄ : Metanol (70:30) KH ₂ PO ₄ : 0.01M (pH 5.5)	KH ₂ PO ₄ :Metanol:Asetonitril (50:20:30) KH ₂ PO ₄ : 0.05M (pH 4.0)
Dalga Boyu	235 nm	230 nm
Dedektör	UV	
Akış Hızı	1 mL/dk	
Kolon	Waters Spherisorb ODS2 C ₁₈ (5µm; 250 x 4.6 mm)	
Analiz Süresi	10 dk	
Altkonma Süresi	6.9 ± 0.3 dk	7.1 ± 0.1 dk

3.7.2. Veri Analizi

Tablo 3.1’de belirtilen koşullarda gerçekleştirilen etkin maddelerin çözünürlükleri 24 saatin sonunda çözünen miktar (mg/mL veya µg/mL) olarak ifade edilmiştir. Ayrıca, etkin maddelerin piyasadaki en yüksek dozlarının (furosemid: 80 mg, naproksen sodyum: 550 mg) çözünmesi için gerekli olan çözünme ortamı hacmi Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplanan çözücü miktarının 250 mL’den az çıkması durumunda etkin maddenin çözünürlüğünün yüksek olduğu kabul edilmiştir.

$$V = \frac{D}{S} \quad (3.1)$$

Eşitlikte;

V : Etkin maddenin en yüksek dozunun çözündüğü hacim (mL)

S : Etkin maddenin çözünürlüğü (mg/mL)

D : Etkin maddenin en yüksek dozu (mg) olarak verilmiştir.

Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlüklerini değerlendirmek amacıyla çalışılan her bir pH değerindeki doz sayısı (D_o) değerleri Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır. Doz sayısının 1'den küçük ($D_o < 1$) olması durumunda çözünürlüğün yüksek olduğu kabul edilmiştir.

$$D_o = \frac{D/V_o}{S} \quad (3.2)$$

Eşitlikte V_o ; doz ile alınan su hacmi olup, 250 mL olarak alınmıştır.

3.8. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitelerinin Tayini (*In Situ* Barsak Perfüzyonu Tekniği)

Naproksen sodyum ve furosemidin barsak permeabilitelerinin tayini amacıyla lümenenden kayıp (loss from the lumen) esasına dayanan bir *in situ* barsak perfüzyonu tekniği kullanılmıştır.

3.8.1. Deney Hayvanı

In-situ barsak perfüzyonu çalışmalarında literatürde çok sayıda veri bulunması, büyüklüğünün uygun olması nedeniyle deney hayvanı olarak, Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Perfüzyon deneyleri hem sağlıklı hem de siroz geliştirilmiş sıçanlarda gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. Deneysel Siroz Geliştirilmesi ve Siroz Derecesinin Tayini

Deneysel siroz geliştirmek amacıyla, çalışmada kullanılacak sıçanların içme suyuna %0.03 (a/h) (300 mg/L) oranda tiyoasetamid (TAA) eklenmiştir. Siroz gruplarının %0.03 TAA içeren suları haftada iki kez tazelenerek ilaç uygulaması 12-20 hafta süreyle aralıksız olarak sürdürülmüştür. Kontrol gruplarına ise aynı süre boyunca çeşme suyu verilmiştir.

Sirozun derecesini tayin etmek amacıyla her deney sonunda karaciğer örnekleri alınmış ve 10%'luk formalin çözeltisinde bir gece tutularak fikse edilmiştir. Fikse edilmiş karaciğer dokularından parafine gömülü bloklar hazırlanarak 5µm kalınlığında kesitler alınmış ve *Hematoksilen-Eozin* boyaması ile boyanarak optik mikroskop altında patolojik incelemeye tabi tutulmuştur. Oluşan siroz derecesi Ishak fibroz skorlamasına (Tablo 2.4) göre değerlendirilmiştir.

3.8.3. Barsak Perfüzyonu Çalışmalarında Kullanılan Perfüzyon Çözeltisi

Tüm perfüzyon çalışmalarında perfüzyon ortamı olarak “Golytely” (Tablo 3.4) olarak adlandırılan izo-ozmotik çözelti kullanılmıştır. Taze olarak hazırlanan perfüzyon çözeltisi etkin (naproksen sodyum ve furosemid) ve referans (antipirin) maddelerinin ilavesinden sonra istenen hacme (20 mL) tamamlanarak iyice karıştırılmış ve 0.45 µm çapına sahip bir membran filtreden süzölmüştür. Perfüzyon çözeltisine ilave edilecek etkin madde miktarları naproksen sodyum ve furosemidin sudaki çözünürlükleri [naproksen sodyum: 0.5 mg/mL ve furosemid: 0.1 mg/mL; (174)] esas alınarak belirlenmiştir. Barsak permeabilitesi oldukça yüksek olan antipirin ise referans madde olarak seçilmiş ve perfüzyon çözeltisine 0.5 mg/mL konsantrasyonda ilave edilmiştir.

Tablo 3.4. Barsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi.

Madde	Konsantrasyon (mmol/L)
NaCl	25
KCl	10
Na₂SO₄	40
NaHCO₃	20
Mannitol	80

3.8.4. Cerrahi İşlemler

Perfüze barsak segmenti kullanılarak yapılan çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan alınan izinle gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK 1).

Naproksen sodyumun ve furosemidin barsaklardan permeabilitesini tayin etmek amacıyla yapılan deneylerde erkek Sprague-Dawley sıçanlar (kontrol grubu: 250-300 g, n=5; siroz grubu: 246-359 g, n=5) kullanılmıştır. Hayvanlar standart sıçan diyeti ile beslenmiş ve deneyden önce aç bırakılmamışlardır. Cerrahi işlemler ketamin (90 mg/mL)-ksilazin (5 mg/mL) kombinasyonunun intraperitoneal olarak verilmesiyle sağlanan anestezi altında gerçekleştirilmiş ve anestezi derinliği hayvanların parmaklarının sıkıştırılmasına reaksiyon verip vermediğine bakılarak değerlendirilmiştir.

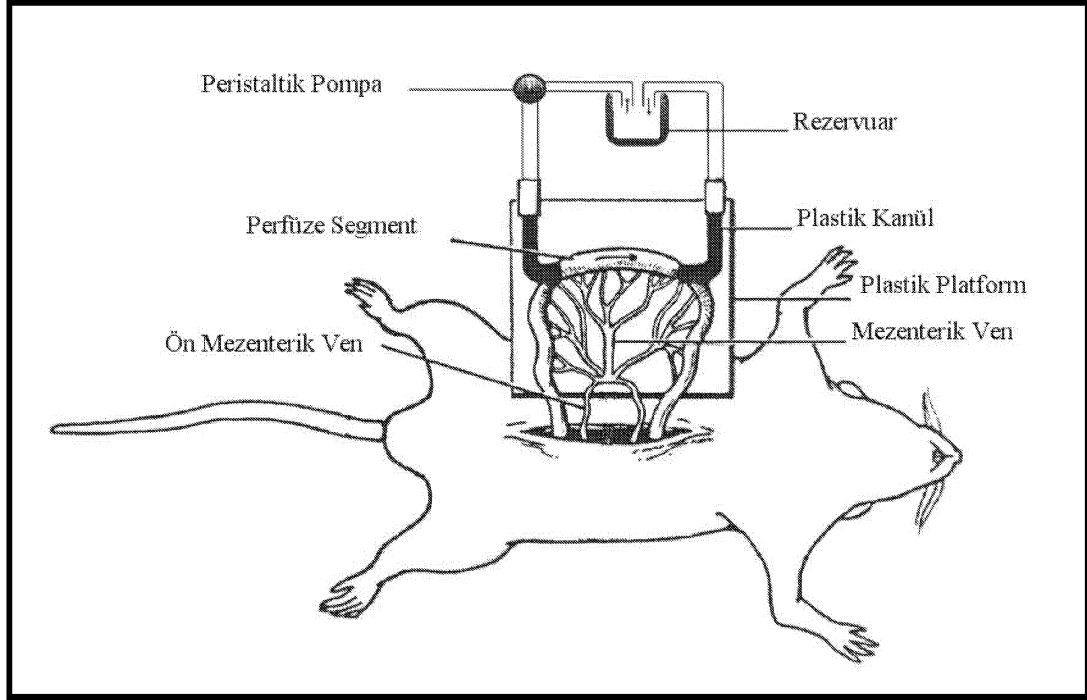
İnce barsağın istenen bölümünü izole etmek amacıyla karın duvarı orta hat boyunca anestezi altında kesildikten sonra jejunumun başlangıcından itibaren 5 cm distalden başlayarak 20 cm uzunluğundaki jejunum segmenti bölgedeki kan akımı korunarak izole edilmiştir. İzole edilen barsak segmentinin proksimal ve distal uçlarına yerleştirilen tüpler cerrahi iplikle bağlanarak sabitlenmiştir (Şekil 3.1). İzole segment serum fizyolojik (50 mL; 37.5°C) ile yıkanarak temizlenmiş ve temizlenme

göstergesi olarak çözeltinin berrak gelmesi esas alınmıştır. Barsakta kalan sıvı segmentten hızla hava geçirilerek uzaklaştırılmıştır. Peristaltik pompa aracılığıyla akış hızı 0.5 mL/dk olacak şekilde ayarlanmış ve deney süresince perfüzyon çözeltisi sirküle edilmiştir.

Hayvanlar deney süresince sıcak tutulmuş ve anestezinin sürekliliğinin sağlanması amacıyla gerektiğinde ek doz anestezik yapılmıştır. Perfüze edilen segment kurumayı önlemek için serum fizyolojik ile aralıklı olarak ıslatılmıştır. Deney sonunda hayvanlar eksanguinasyon yöntemi ile öldürülmüştür. Siroz grubunda ise gelişen siroz derecesini tayin etmek amacıyla hayvanlardan alınan karaciğer örnekleri Bölüm 3.8.2'de belirtildiği şekilde patolojik incelemeye tabi tutulmuştur.

3.8.5. Perfüzyon Çalışmaları

İzole segment serum fizyolojikle yıkandıktan sonra etkin (naproksen sodyum ve furosemid) ve referans (antipirin) maddeleri içeren perfüzyon çözeltisi (20 mL) bir peristaltik pompa aracılığıyla 0.5 mL/dk hızda olacak şekilde sirküle edilmiştir. Perfüzyon çözeltisinin toplandığı rezervuardan 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 ve 180. dk'larda 200 µL örnek alınmış ve örneklerdeki test ve referans madde miktarları Bölüm 3.8.6'da verilen HPLC yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Bu amaçla örnekler (200 µL) hareketli fazla 350 µL'ye seyreltildikten sonra HPLC sistemine 10 µL hacimde enjekte edilmiştir.



Şekil 3.1. In situ perfüze barsak preparatı (175).

3.8.6. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitelerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemi

Etkin (naproksen sodyum ve furosemid) ve referans (antipirin) maddelerin aynı matris içinde eş zamanlı olarak tayini için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Perfüzyon deneyi süresince toplanan numuneler içerisinde birden fazla madde bulunması ve bunların ayrımının isokratik yöntemle mümkün olamamasından dolayı çözücü sistemi Tablo 3.5’de verildiği şekilde gradyan olarak seçilmiştir. Kullanılan HPLC yönteminde Waters Symmetry C₁₈ (3.5 µm 4.6 x 75mm) ayırıcı kolon olarak kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 50 µL, analiz süresi 15 dk. olarak seçilmiştir. Furosemid (227.6 nm), naproksen sodyum (271 nm) ve antipirin (242 nm) UV dedeksiyonla analiz edilmiştir. Bu koşullar altında alıkonma zamanları antipirin için 3.9 ± 0.1 dk, furosemid için 7.8 ± 0.1 dk ve naproksen sodyum için 9.8 ± 0.1 dk olarak bulunmuştur.

Tablo 3.5. Barsak permeabilitesi çalışmalarında kullanılan HPLC yönteminin gradyan tablosu.

Zaman (dk)	Çözücü Sistemi %(hacim)		Akış hızı (mL/dk)
	Fosfat Tamponu (0.05 M; pH 5.5)	Asetonitril	
0	85	15	1
4	85	15	1
8	50	50	1
11	50	50	1
12	85	15	1

Çalışmada kullanılan referans ve etkin maddelerin standart doğru denklemlerini oluşturmak için, perfüzyon çözeltisi içerisinde 0.1 mg/mL furosemid, 0.5 mg/mL naproksen sodyum ve 0.5 mg/mL antipirin içeren 6 adet stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak Tablo 3.6.'da verilen konsantrasyonlarda madde içeren standart çözeltiler elde edilmiştir. Hazırlanan örneklerin HPLC kolonuna enjeksiyonuyla elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri grafiklenerek lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemi ve determinasyon katsayıları tayin edilmiştir.

Tablo 3.6. Barsak permeabilitesi çalışmalarında kullanılan standart doğru denklemi için seçilen standart çözeltilerin konsantrasyonları.

Standart No	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)		
	Furosemid	Naproksen Sodyum	Antipirin
1	1	5	5
2	2.5	12.5	12.5
3	5	25	25
4	7.5	37.5	37.5
5	10	50	50
6	25	100	100
7	50	250	250

3.8.7. Veri Analizi

Barsak perfüzyonu çalışmalarında zamanın fonksiyonu olarak toplanan örneklerdeki etkin ve referans madde miktarları Bölüm 3.8.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan standart doğru denklemi kullanılarak konsantrasyon olarak ifade edilmiştir. Tayin edilen konsantrasyon değerleri rezervuardaki hacim azalmasına göre aşağıdaki eşitlik kullanılarak düzeltilmiştir.

$$C(t) = \frac{V_0}{V_t} \times C_0 \quad (3.3)$$

$C(t)$: t anında rezervuardaki ilaç konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)

C_0 : t=0 anında rezervuardaki ilaç konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)

V_t : t anında rezervuardaki perfüzyon çözeltisi hacmi (mL)

V_0 : t=0 anında rezervuardaki perfüzyon çözeltisi hacmi (20 mL)

Referans (antipirin) ve test (naproksen sodyum, furosemid) maddelerinin perfüze edilen barsak segmentinden absorpsiyon hız sabiti (k_a), rezervuarda kalan madde miktarının (% kalan miktar) logaritmasının örnekleme zamanına karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrunun eğimine eşittir. Lineer regresyon analizi ile hesaplanan eğim (k_a) değerleri kullanılarak her bir madde için permeabilite katsayısı hesaplanmıştır (Eşitlik 3.4).

$$P = \frac{k_a \cdot V_o}{A} \quad (3.4)$$

P : Permeabilite katsayısı (cm/sn)

k_a : Absorpsiyon hız sabiti (1/dk)

V_o : Başlangıçta rezervuardaki perfüzyon çözeltisi hacmi (20 mL)

A : Perfüze edilen barsak segmentinin yüzey alanı (cm²)

Perfüze edilen barsak segmentinin yüzey alanı (A), yarıçapı ($r = 0.18$ cm), uzunluğu ($L = 20$ cm) ve serozal-mukozal büyüme faktörü ($SM=8.7$; (14)'nün fonksiyonu olarak aşağıda verilen eşitlik kullanılarak tayin edilmiştir.

$$A = 2\pi r \cdot L \cdot SM \quad (3.5)$$

Değerler Eşitlik 3.5'de yerine konulduğunda A'nın sayısal değeri kontrol grubu için 213.08 ± 3.17 cm² ve siroz grubu için 203.25 ± 22.75 cm² olarak bulunmuş ve tüm hesaplamalarda bu değerler kullanılmıştır.

3.9. Karaciğer Perfüzyonu Çalışmaları

3.9.1. Deneysel Hayvanı

Karaciğer perfüzyonu deneylerinde büyüklüğünün uygun olması, kolay bulunması üretim ve bakımının kolay olması ayrıca karşılaştırma amacıyla çok sayıda veri bulunması nedeniyle Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar deney hayvanı olarak seçilmiştir. Perfüzyonu deneyleri hem sağlıklı hem de siroz geliştirilmiş sıçanlarda gerçekleştirilmiştir.

3.9.2. Deneysel Siroz Geliştirilmesi

Karaciğer perfüzyonu çalışmalarında kullanılacak hayvanlarda siroz geliştirilmesi ve oluşan sirozun derecesinin tayini Bölüm 3.8.2’de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.9.3. Karaciğer Perfüzyonu Çalışmalarında Kullanılan Perfüzyon Çözeltisi

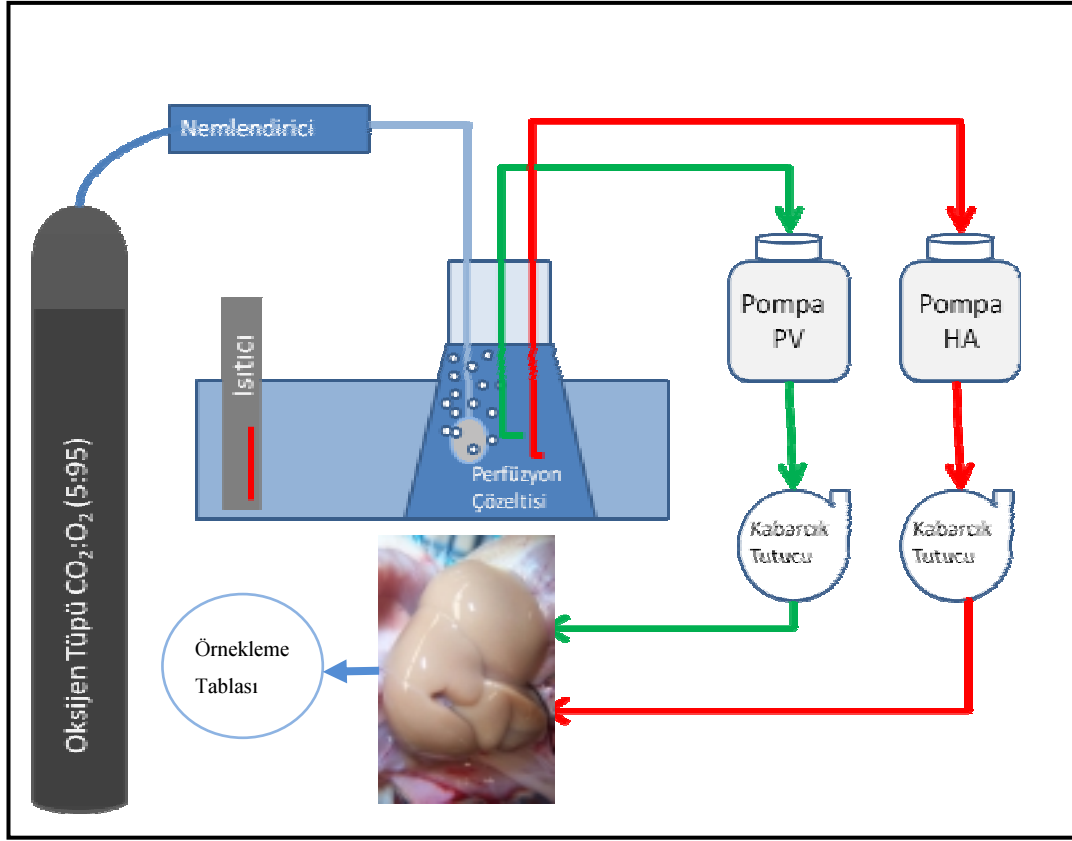
Karaciğer perfüzyonu çalışmalarında glikoz (3 g/L) ve sodyum taurokolat (6 mg/L) içeren Krebs-bikarbonat (Tablo 3.7) perfüzyon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Taze olarak hazırlanan çözelti bir membran filtreden (0.22 µm) süzülüş ve karbojen (%5CO₂ : %95O₂) ile 30 dk oksijenlendirildikten sonra pH’sı 7.4’e ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti perfüzyon işlemi başlayana kadar ve deney süresince 37°C’lik su banyosunda oksijenlendirilerek tutulmuştur.

Tablo 3.7. Karaciğer perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi.

Madde	Miktar (g/L)
NaCl	6.92
NaHCO₃	2.09
CaCl₂. 2H₂O	0.37
KCl	0.35
MgSO₄ .7H₂O	0.29
KH₂PO₄	0.16
Glikoz	3.0
Na taurokolat	0.006

3.9.4. Perfüzyon Sistemi

Perfüzyon sistemi seri olarak bağlanmış bir rezervuar, iki peristaltik pompa, ve iki hava kabarcığı tutucudan oluşmaktadır (Şekil 3.2). Perfüzyon çözeltisinin sıcaklığı termostat kontrollü su banyosu aracılığı ile 37 °C'ye ayarlanmış ve akış hızı peristaltik pompalar yardımı ile hepatic arterden 3 mL/dk, portal venden ise 12 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. İçerisinde distile su bulunan bir rezervuardan geçirilerek nemlendirilen karbojen gazı (%5 CO₂ : %95 O₂), perfüzyon çözeltisinin oksijenlendirilmesi için kullanılmıştır. Sistemden gelebilecek hava kabarcıklarını tutmak için oksijenlendiriciden hemen sonra iki kabarcık tutucu sisteme eklenmiştir. Enjeksiyon sonrasında perfüzyon örneklerini toplamak amacıyla devir hızı 0.5 saniye ile 10 dakika arasında ayarlanabilen bir örnek toplayıcı kullanılmıştır. Her deney sonrası sistem distile su geçirilerek temizlenmiştir. Bakteri üremesini önlemek amacıyla perfüzyon sistemi rutin olarak sırasıyla deterjan, sıcak su ve distile suyla temizlenmiştir.



Şekil 3.2. Karaciğer perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon sisteminin şematik olarak gösterimi.

3.9.5. Cerrahi İşlemler

Perfüze karaciğer preparatı kullanılarak yapılan çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan alınan izinle gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK 2).

Karaciğer donörü olarak erkek Sprague-Dawley sıçanları kullanılmıştır. On iki saat aydınlık on iki saat karanlık döngüsüne tabi tutulan hayvanlar standart sıçan diyeti ile beslenmiş ve deneyden önce aç bırakılmamıştır. Cerrahi işlemler anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Anestezi sodyum pentobarbitalin (60 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanmasıyla sağlanmıştır. Perfüzyon işlemi sırasında karaciğerin kandan temizlenmesini kolaylaştırmak amacıyla 1000 IU sodyum heparin pentobarbitalden hemen sonra intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

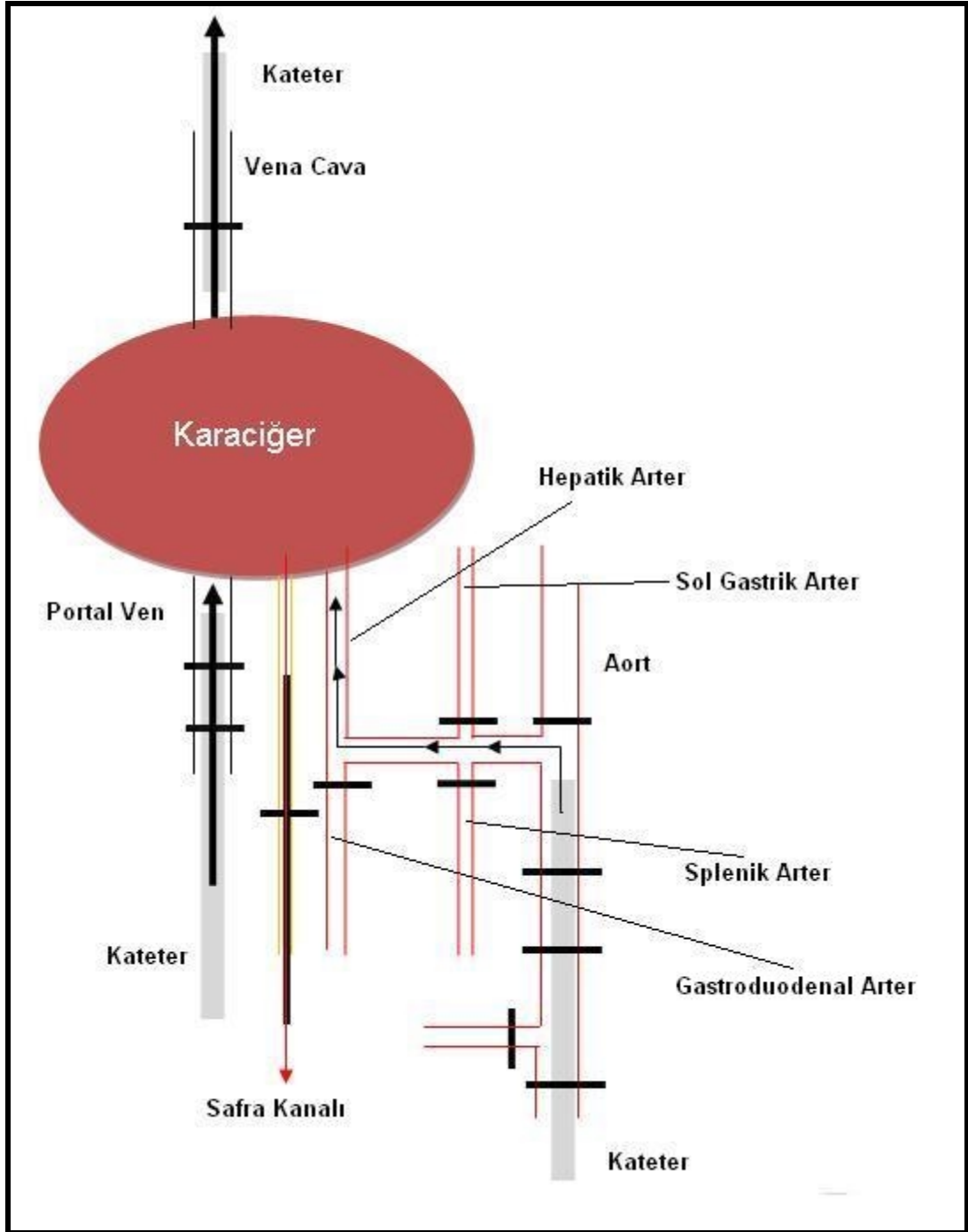
Karın duvarı kuyruk bölgesinden başlayarak göğüs kafesi hizasına kadar anestezi altında kesilmiş ve karın bölgesinin içeriği hayvanın soluna alınarak karaciğer, hepatik portal ven (PV), abdominal vena cava ve safra kanalı açığa çıkarılmıştır. Safra kanalı bir PE10 tüp ile kanüle edilmiş, ve perfüzyon deneyi süresince safra bir ependorf tüp içerisine toplanmıştır. Safra kanalının hemen arkasında bulunan gastroduodenal arter, hepatik arterin hemen karşısından bir cerrahi iplikle bağlanmıştır. Portal ven ile abdominal vena cava arasındaki bölümden sol gastrik arter tespit edilerek sıkıca bağlanmıştır. Portal ven etrafına iki adet, abdominal vena cava etrafına ise bir adet cerrahi iplik (3/0) yerleştirildikten sonra portal ven bir 16GA (1.7 mm dış çap x 45 mm) kateterle kanüle edilerek bir peristaltik pompa aracılığıyla perfüzyon işlemine başlanmıştır (12 mL/dk). Kateter sıkıca bağlandıktan sonra göğüs kafesi kesilmiş ve kalbin sağ atriumundan sokulan bir 14GA kateter (2.1 mm dış çap x 45 mm) aracılığı ile hepatik ven kanüle edilmiştir. Bu aşamada hayvan ölmektedir. Abdominal vena cava sıkıca bağlandıktan sonra karın bölgesi içeriği hayvanın sağına alınarak özefagus iki yerinden sıkıca bağlanmıştır. Bağlanan kısımlar arasından özefagusun kesilmesiyle mide aşağı doğru çekilerek splenik arter görünür hale getirilmiştir. Sol gastrik arterin hemen karşısında yer alan splenik arter bir cerrahi iplikle sıkıca bağlanmıştır. Bu işlem sonunda sadece hepatik arter (HA) yolu açık kalmaktadır (Şekil 3. 3).

Karaciğerin portal ve hepatik arterden perfüzyonu için yapılan cerrahi teknik geliştirme çalışmalarında hepatik arterin kateterizasyonu amacıyla iki farklı yöntem (çölyak arter ve aorttan kateterizasyon) kullanılmıştır. Bu yöntemler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Çölyak (Celiac) Arterden Kateterizasyon: Aort çölyak arterin hemen üstünden ve altından olacak şekilde sıkıca bağlandıktan sonra, çölyak arter bir 20 GA (1.1 mm dış çap x 45 mm) kateter yardımı ile kateterize edilmiştir. Kateter cerrahi iplik ile bloke olmayacak şekilde bağlandıktan sonra sızıntıları önlemek için doku yapıştırıcısı ile yapıştırılmıştır. Bir peristaltik pompa aracılığı ile perfüzyon işlemine başlanmıştır (3 mL/dk). Kateterizasyon işleminin güç olması ve başarı oranının düşük olması nedeniyle bu yöntem deneysel çalışmalarda kullanılamamıştır.

Aorttan Kateterizasyon: Aort etrafına çölyak arterden hemen önce ve sonra olacak şekilde birer adet cerrahi iplik yerleştirilmiştir. Sağ ve sol böbrekleri besleyen damarlar sıkıca bağlandıktan sonra aort bir 18GA kateter (1.3 mm dış çap x 45 mm) yardımıyla kateterize edilerek perfüzyon işlemine başlanmıştır (3 mL/dk). Kanülasyon ve izolasyon etkinliği kateter içerisine bir miktar Evans mavisi enjekte edilerek kontrol edilmiştir. Başarı oranının yüksek olması nedeniyle hepatic arterden perfüzyon amacıyla bu yöntem tercih edilmiştir.

Gevşek haldeki tüm cerrahi iplikler sıkıca bağlandıktan sonra karaciğer izotonik sodyum klorür çözeltisi ile ıslatılmış ve kurumayı önlemek amacıyla bir parça parafilm ile kaplanmıştır. Deneyler sırasında perfüzyon çözeltisi sirküle edilmemiştir. Organın canlılığı görsel olarak, safra akışı ve perfüzatın volumetrik değeri kullanılarak tayin edilmiştir.



Şekil 3.3. Karaciğerin portal ven ve hepatik arterden perfüzyonu amacıyla yapılan cerrahi işlemler.

3.10. Perfüzyon Deneyleri

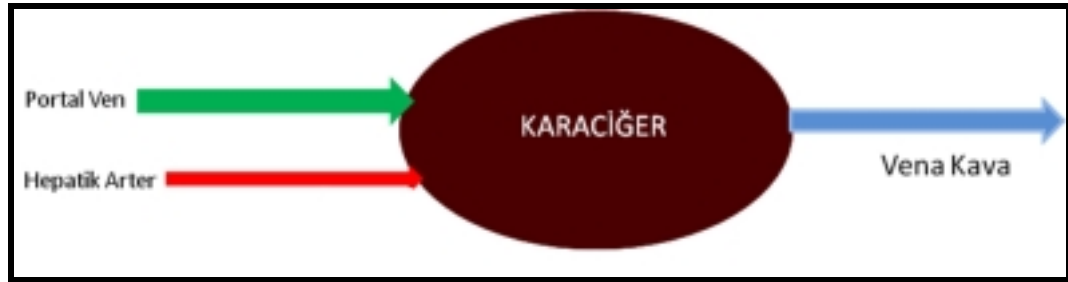
Hem sağlıklı hem de siroz geliştirilmiş sıçanlarda yapılan karaciğer perfüzyonu deneyleri;

- Referans maddelerle yapılan çalışmalar
 - Karaciğerin dağılma hacimlerinin tayini
 - Hepatik artere özgü spesifik alanın tayini
- Etkin maddelerle yapılan çalışmalar
 - Naproksen Sodyum
 - Furosemid

olmak üzere iki grup halinde incelenecektir.

3.10.1. Gecikme Zamanının Tayini

Enjeksiyonu takiben maddeler karaciğer ve karaciğer dışı olmak üzere iki bölgede dağılır (Şekil 3.4). Karaciğer dışı bölgeyi portal vene yerleştirilen kanül, hepatic artere yerleştirilen kanül ve örnek toplamak amacıyla inferior vena kava'ya yerleştirilen tüp oluşturmaktadır.



Şekil 3.4. Karaciğer ve karaciğer dışı hacimlerin şematik gösterimi.

Elde edilen dağılım profillerinden tayin edilen ortalama geçiş zamanı her iki bölgeden geçiş zamanının toplamına eşittir.

$$MTT_{Total} = MTT_{KC} + MTT_{NKC} \quad (3.6)$$

Eşitlikte MTT_{KC} karaciğerden ortalama geçiş zamanını, MTT_{NKC} ise karaciğer dışı bölgeden ortalama geçiş zamanını göstermektedir.

Hesaplamalarda MTT_{KC} kullanılacağı için MTT_{NKC} 'nin tayin edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kanül ve tüp boşken ve distile su ile doldurulduktan sonra tartılmıştır. Bu işlem 10 kez tekrarlanmış ve elde edilen tartımların ortalaması karaciğer dışı hacim (V) olarak kabul edilmiştir. Hacim olarak tayin edilen bu değer ve perfüzyon hızı (Q) kullanılarak hepatic arter ve portal venden gecikme zamanları ($MTT_{NKC} = V/Q$) ayrı ayrı tayin edilmiştir.

3.10.2. Referans Maddelerle Yapılan Çalışmalar

3.10.2.1. Dağılma Hacmi ve Spesifik Alan Tayininde Kullanılacak Referans Maddelerin Hazırlanması

Sıçan Eritrositleri (RBC): Portal venin kateterizasyonu sırasında toplanan tam kan 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra, *buffy coat* ve plazma uzaklaştırılmıştır. Tüpte kalan eritrositler izotonik sodyum klorür çözeltisi ile en az iki kez yıkandıktan sonra üstteki berrak kısım atılmıştır. Son yıkama işleminden sonra elde edilen eritrositler izotonik sodyum klorür çözeltisiyle %50 (h/h) olacak şekilde seyreltilerek vasküler hacmin ve spesifik alanın tayininde kullanılmıştır.

Evans mavisi'nin doku proteinine bağlanmasını önlemek amacıyla enjeksiyon çözeltisine 5:50 mg/mL (EB:BSA) olacak şekilde sığır serum albümini eklenmiştir. Ekstravasküler hacmin tayin edilmesi amacıyla kullanılacak çözelti, albümin ve Evans mavisinin ultrasonik banyoda ısı uygulamadan çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

3.10.2.2. Karaciğerin Dağılma Hacimlerinin ve Hepatik Artere Özgü Spesifik Alanın Tayini

Karaciğerde vasküler, ekstraselüler ve total olmak üzere üç dağılma hacmi tanımlanmıştır. Bu çalışmada sıçan eritrositleri (RBC) vasküler hacmin, Evans mavisi (EB) ise ekstraselüler hacmin tayininde referans madde olarak kullanılmıştır. Karaciğerin total hacminin tayini için dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemi seçilmiştir. Karaciğerin dağılma hacimlerinin ve hepatik artere özgü spesifik alanın tayini amacıyla deneyler hem kontrol (Sıçan ağırlığı: 280–360 g, yaş karaciğer ağırlığı: 8.15-10.73 g; n=7) hemde siroz geliştirilmiş (Sıçan ağırlığı: 233-356 g, yaş karaciğer ağırlığı: 8.10-20.38 g; n=6) sıçanlarda yapılmıştır.

Bölüm 3.9.5’de belirtildiği şekilde hazırlanan perfüze sıçan karaciğeri 15-20 dk süreyle Krebs-bikarbonat çözeltisi kullanılarak stabilize edilmiştir. Perfüzyon deneyleri sırasında portal venden perfüzyon sabit akış hızında (12 mL/dk) gerçekleştirilirken, hepatik arterden perfüzyonda 3, 4.5 ve 6 mL/dk olacak şekilde üç farklı akış hızı kullanılmıştır. Bölüm 3.10.2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan referans maddeler (RBC: %50 ve EB:BSA 5:50) ayrı ayrı ve rastgele olacak şekilde 50 µL hacimde bolus olarak portal vene (veya hepatik arter) uygulanmıştır. Her uygulama arasında uygun bir yıkama süresi (5 dakika) bırakıldıktan sonra referans maddeler hepatik artere (veya portal ven) enjekte edilmiştir. Her enjeksiyonu takiben devir hızı ayarlanabilen bir örnek toplayıcı ile her 0.5 veya 1 saniyede bir olacak şekilde perfüzyon örnekleri toplam 30 saniye veya 1 dakika süreyle toplanmıştır. Her enjeksiyondan önce perfüzyon akış hızı tayin edilmiş ve karaciğer görsel olarak incelenmiştir. Portal venden akış hızı sabit tutularak hepatik arterden perfüzyon akış hızı 4.5 mL/dk olacak şekilde artırılmış ve karaciğer 10 dakika süreyle stabilize edilmiştir. Perfüzyon akış hızı kontrol edildikten sonra sadece RBC enjeksiyonu önce PV’ne daha sonra HA’e olacak şekilde tekrarlanmıştır. HA’dan perfüzyon akış hızı 6 mL/dk olacak şekilde artırılarak karaciğer 10 dakika süreyle stabilize edilmiştir. Perfüzyon hızı kontrol edildikten sonra RBC enjeksiyonu önce PV’ne daha sonra HA’e olacak şekilde tekrarlanmıştır. Karaciğerin dağılma hacimlerinin ve hepatik artere özgü spesifik alanın tayini amacıyla yapılan deneyler Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.8. Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda karaciğer dağılma hacimlerinin ve hepatic artere özgü spesifik alanın tayini amacıyla yapılan deneyler.

Akış Hızı (mL/dk)	Kontrol		Siroz	
	RBC	EB	RBC	EB
PV (12)	+	+	+	+
HA (3)	+	+	+	+
PV (12)	+	-	+	-
HA (4.5)	+	-	+	-
PV (12)	+	-	+	-
HA (6)	+	-	+	-

(+)preparatın deneklere uygulandığını (-) ise uygulanmadığını göstermektedir.

Stabilizasyon ve deney süresi boyunca bir ependorf tüpte toplanan safranin miktarı tartılarak tayin edilmiştir. Her deney sonunda karaciğer orijinal pozisyonundan çıkarılmış ve tartılarak ağırlığı kaydedilmiştir. Siroz geliştirilmiş sıçanlarda ise siroz derecesini tayin etmek amacıyla karaciğer kesitleri patolojik incelemeye tabi tutulmuştur (Bölüm 3.8.2).

Toplanan perfüzyon örneklerindeki referans madde miktarları Bölüm 3.10.2.3'de verilen spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Bu amaçla RBC içeren 100 µl örnek 2 mL'ye, EB içeren 100µl örnek 1.5 mL'ye distile su ile seyreltikten sonra her bir örneğin absorbansı maksimum absorbans verdikleri dalga boylarında ölçülmüştür. Standart doğru denklemleri kullanılarak sonuçlar konsantrasyon (µg/mL) olarak ifade edilmiştir.

Karaciğerin total hacminin tayin edilmesi amacıyla liyofilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Liyofilizasyon yönteminde tartılarak ağırlığı kaydedilen karaciğer dondurulduktan (-20°C) sonra -50°C'de 1 gün boyunca liyofilize edilmiş ve daha sonra tekrar tartılmıştır.

3.10.2.3. Referans Maddelerin Miktar Tayini Yöntemleri

Eritrositler

Herhangi bir tedavi görmemiş Sprague-Dawley cinsi bir erkek sıçanın (300 g) kalbinden geniş uçlu bir enjektör yardımıyla alınan tam kan 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazma ve *buffy coat* uzaklaştırılmıştır. Bölüm 3.10.2.1'de belirtildiği şekilde izotonik sodyum klorür ile yıkanan eritrositler %50 (h/h) oranında seyreltilmiştir. Sıçan eritrositlerinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu 300-600 nm aralığında spektrumu alınarak tayin edilmiştir. Yedi konsantrasyonda (8.72, 17.4, 34.9, 69.8, 104.6, 139.5 ve 174.4 µg hemoglobin/mL) altı seri olarak hazırlanan eritrosit çözeltilerinin absorbansları maksimum dalga boyunda (412 nm) ölçülerek lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemi ve determinasyon katsayısı tayin edilmiştir.

Evans Mavisini

Evans mavisinin (4.5 µg/mL) maksimum absorbans verdiği dalga boyu 400-800 nm aralığında görünür bölge spektrumu alınarak tayin edilmiştir. Standart doğruyu belirlemek amacıyla EB ve sığır serum albümini (BSA) içeren 6 adet stok (EB:BSA 5:50 mg/mL) çözelti hazırlanmıştır. Her stoktan gereken seyreltmeler yapılarak 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler elde edilmiştir. Her bir örneğin verdiği absorbans maksimum dalga boyunda (607.5 nm) ölçülerek standart doğru denklemi ve determinasyon katsayısı regresyon analizi ile hesaplanmıştır.

3.10.3. Etkin Maddelerle Yapılan Çalışmalar

3.10.3.1. Etkin Maddelerin Enjeksiyonluk Preparatlarının Hazırlanması

Naproksen sodyumun izotonik sodyum klorür de hazırlanan 0.05, 0.1, 0.5 ve 1.0 mg/50 μ L konsantrasyondaki çözeltileri perfüze sıçan karaciğerine uygulanmış ve bunlar arasından 0.5mg/50 μ L tüm çalışmalarda kullanılacak konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Furosemidin enjeksiyonluk piyasa preparatı olan Lasix ampul (20 mg/mL Aventis/Türkiye)'den uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan 0.05, 0.1 ve 0.5mg/50 μ L konsantrasyondaki çözeltileri perfüze sıçan karaciğerine uygulanmış ve bunlar arasından 0.5mg/50 μ L tüm çalışmalarda kullanılacak konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

3.10.3.2. Etkin Maddelerle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları

Cerrahi işlemler Bölüm 3.9.5'de belirtildiği şekilde erkek Sprague-Dawley sıçanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Perfüzyon deneyleri naproksen sodyum ve furosemid kullanarak hem kontrol (Sıçan ağırlığı: 281-326 g, yaş karaciğer ağırlığı: 6.72-13.48 g; n=6) hemde siroz geliştirilmiş (Sıçan ağırlığı: 222-302 g, yaş karaciğer ağırlığı: 6.15-15.20 g; n=6) sıçanlarda yapılmıştır. Krebs bikarbonat çözeltisi perfüzyon ortamı olarak kullanılmış ve akış hızları PV'den 12 mL/dk, HA'den 3mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Etkin madde çözeltileri (naproksen sodyum: 0.5mg/50 μ L; furosemid: 0.5mg/50 μ L) ayrı ayrı ve rastgele olacak şekilde 50 μ L hacimde önce portal vene (veya hepatik artere) daha sonra hepatik artere (veya portal vene) uygulanmıştır. Enjeksiyonlar arasında 10 dakikalık bir yıkama süresi verilmiştir. Her enjeksiyondan önce perfüzyon akış hızı saptanmış ve karaciğer görsel olarak incelenmiştir. Naproksen sodyum enjeksiyonunu takiben perfüzyon örnekleri 15 dakika süreyle, furosemid enjeksiyonunu takiben ise 7 dakika süreyle toplanmıştır (Tablo 3.9). Toplanan örnekler etkin madde içerikleri HPLC (Bölüm 3.10.3.3) ile tayin edilinceye kadar -20 °C'de dondurularak bekletilmiştir.

Deney sonunda perfüzyon işlemi süresince toplanan safra miktarı tartılarak tayin edilmiş ve karaciğer orjinal pozisyonundan çıkarılarak tartılmıştır. Siroz

geliştirilmiş sıçanlara ait karaciğerler ise oluşan siroz derecesini tayin etmek amacıyla patolojik incelemeye tabi tutulmuştur (Bölüm 3.8.2).

Tablo 3.9. Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda etkin maddelerle yapılan deneyler ve örnekleme şeması.

Madde	Kontrol		Siroz	
	PV	HA	PV	HA
Naproksen sodyum	+	+	+	+
Örnekleme şeması	0-2 dk: her 2 saniyede bir örnek (örnek toplayıcıyla) 2-5 dk: her 10 saniyede bir örnek (ependorf tüplere) 5-15 dk: her 30 saniyede bir örnek (ependorf tüplere)			
Furosemid	+	+	+	+
Örnekleme şeması	0-1 dk: her 1 saniyede bir örnek (örnek toplayıcıyla) 1-5 dk: her 10 saniyede bir örnek (ependorf tüplere) 5-7 dk: her 30 saniyede bir örnek (ependorf tüplere)			

(+) preparatın sıçanlara uygulandığını göstermektedir.

Naproksen sodyum veya furosemid içeren perfüzyon örnekleri 13500 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra 0.22 µm por açıklığına sahip enjektör filtresi kullanılarak süzülmüştür. Filtrat (100 µL) mobil faz ile 1 mL'ye seyreltildikten sonra Bölüm 3.10.3.3'de verilen HPLC sistemine 10 µL hacimde enjekte edilmiştir.

3.10.3.3. Etkin Maddelerle Yapılan Perfüzyon Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemler

Naproksen sodyum

Naproksen sodyumun matriks (perfüzat) içerisinde kantitatif tayini HPLC yöntemi kullanılarak aşağıdaki şartlar altında gerçekleştirilmiştir.

Kolon: Waters Spherisorb S10 ODS2 C₁₈ (10 µm; 4.6 x 200 mm)

Mobil faz: Ultra saf su (pH 3.2): metanol: asetonitril (35:15:50)

Akış hızı: 1 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Dalga boyu: 230/352 nm(ex/em), florometrik dedeksiyon

Analiz süresi: 7 dk

Alınma Süresi: 5.2 dk

Perfüzyon çözeltisi içerisinde 10 mg/mL naproksen sodyum içeren 6 adet stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 µg/mL konsantrasyonda naproksen sodyum içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerin HPLC kolonuna enjeksiyonuyla elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri grafiklenerek lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemi ve determinasyon katsayıları tayin edilmiştir.

Furosemid

Furosemidin matriks içerisinde kantitatif tayini HPLC yöntemi kullanılarak aşağıdaki şartlar altında gerçekleştirilmiştir.

Kolon: Waters Spherisorb S10 ODS2 C₁₈ (10 µm; 4.6 x 200 mm)

Mobil faz: KH₂PO₄ (0.01 M; pH 3.5): asetonitril (62:38)

Akış hızı: 1 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Dalga boyu: 272/410 nm (ex/em), florometrik dedeksiyon

Analiz süresi: 6 dk

Alınma Süresi: 3.9 dk

Furosemidin standart doğru denklemlerini oluşturmak amacıyla 6 adet Lasix ampul (20 mg/2mL; Aventis/Türkiye) kullanılmıştır. Ampullerden uygun seyreltmeler yapılarak 0.003, 0.01, 0.05, 0.5, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL konsantrasyonda furosemid içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerin HPLC kolonuna enjeksiyonuyla elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri grafiklenerek lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemi ve determinasyon katsayıları tayin edilmiştir.

3.10.3.4. Veri Analizi

Konsantrasyon–zaman profilleri, örnekleme zamanının orta noktasındaki madde konsantrasyonu ($C(t)$) perfüzyon akış hızı (Q ; mL/sn) ve enjekte edilen doz (D) kullanılarak frekans ($f(t)$, 1/sn) dağılımı olarak ifade edilmiştir.

$$f(t) = \frac{C(t) \cdot Q}{D} \quad (3.7)$$

Bölüm 3.10.1’de belirtildiği şekilde tayin edilen gecikme zamanı (PV: 2.52 sn HA: 2.52 sn) tüm örnekleme zamanlarından çıkarılmıştır. Maksimum frekans (f_{maks}) ve maksimum frekansa ulaşma zamanı (t_{maks}) frekans-zaman verilerinden tayin edilmiştir.

Referans (RBC, EB) ve etkin (naproksen sodyum, furosemid) maddelerin karaciğere enjeksiyonunu takiben elde edilen frekans-zaman profilleri altında kalan alan (AUC) ve ortalama geçiş zamanı (MTT) aşağıda verilen eşitlikler kullanılarak tayin edilmiştir.

$$AUC = \int_0^{\infty} f(t) \cdot dt \quad (3.8)$$

$$MTT = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot f(t) \cdot dt}{AUC} \quad (3.9)$$

Referans Maddeler

Referans maddelerin karaciğerdeki dağılma hacmi (V) Eşitlik 3.10 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$V = Q \cdot MTT \quad (3.10)$$

Karaciğerin total hacmi, liyofilizasyon yöntemiyle elde edilen yaş ($W_{yaş}$) ve kuru (W_{kuru}) organ ağırlıkları kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.11). Bu hesaplamada buharlaşan suyun yoğunluğunun 1'e eşit olduğu varsayılarak total hacim mL/g olarak ifade edilmiştir.

$$V_{total} = \frac{W_{yaş} - W_{kuru}}{W_{yaş}} \quad (3.11)$$

Karaciğerin intersitisyel (V_{int}) ve intrasellüler ($V_{hücre}$) hacimleri aşağıda verilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$V_{int} = V_{EB} - V_{RBC} \quad (3.12)$$

$$V_{hücre} = V_{Total} - V_{EB} \quad (3.13)$$

Eşitliklerde (3.12 ve 3.13) verilen dağılım hacimleri vasküler (V_{RBC}), ekstrasellüler (V_{EB}) ve total (V_{Total}) hacimlerdir.

Hepatik artere özgü spesifik alanın tayini için Field ve Andrews (74) tarafından geliştirilen lineer regresyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde arteriyel alan fraksiyonu (V_{HA}/V_T) ile arteriyel akış fraksiyonu (Q_{HA}/Q_T) arasında doğrusal bir ilişki olduğu kabul edilmektedir (Eşitlik 3.14). Regresyon doğrusunun kesim noktası (b) sadece hepatic arter tarafından perfüze edilen karaciğer fraksiyonunu göstermektedir.

$$\frac{V_{HA}}{V_T} = a \frac{Q_{HA}}{Q_T} + b \quad (3.14)$$

Eşitlikte verilen Q_T total akış hızı ($Q_T = Q_{PV} + Q_{HA}$), V_T ise total hacim olup aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$V_T = Q_{PV} \cdot MTT_{PV} + Q_{HA} \cdot MTT_{HA} \quad (3.15)$$

Etkin Maddeler

Naproksen sodyum ve furosemidin geri kazanımı (F), ekstraksiyon oranı (E) ve hepatic klerensi (CL_H) aşağıda verilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$F = \frac{AUC}{DOZ} \cdot Q \quad (3.16)$$

$$E = 1 - F \quad (3.17)$$

$$CL_H = Q \cdot E \quad (3.18)$$

3.11. Referans ve Etkin Maddelerin Miktar Tayininde Kullanılan Analitik Yöntemlerinin Validasyonu

Bir analitik yöntemin validasyonun amacı kullanılan yöntemin planlanan hedefe uygun olup olmadığını göstermektir. Çalışma süresince kullanılan tüm analitik yöntemlerin geçerliliğini kontrol etmek amacıyla özgünlük, duyarlılık, doğrusallık, kesinlik (gün içi ve günler arası kesinlik) ve doğruluk test edilmiştir.

3.11.1. Özgünlük (Specificity)

Ölçümü yapılacak maddenin analiz sonuçlarının ortamda bulunan diğer maddelerden etkilenmemesi gerekmektedir. Kullanılan analitik yöntemin sadece tayini yapılacak madde veya maddeleri tayin edebilmesi özgünlük olarak tanımlanmaktadır.

Referans maddeler

Enjeksiyonlar arasında toplanmış boş perfüzetin seçilen dalga boyu aralığında (RBC: 300-600 nm ve EB: 400-800 nm) referans maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda (RBC: 412 nm ve EB: 607.5 nm) absorbans verip vermediği incelenmiştir.

Etkin maddeler

Çözünürlük deneyleri: Çözünürlük deneylerinin gerçekleştirildiği çözünme ortamları (naproksen sodyum: pH 1.0, pH 3.2, pH 4.2, pH 5.2, pH 7.5; furosemid: pH 1.0, pH 2.9, pH 3.9, pH 4.9, pH 7.5) Bölüm 3.7.1'de verilen HPLC sistemlerine uygulanarak naproksen sodyumun ve furosemidin pik verdiği zamanlarda (naproksen sodyum: ~7 dk; furosemid: ~6.9 dk) pik verip vermediği kontrol edilmiştir.

Barsak permeabilitesi deneyleri: Barsak perfüzyonunda kullanılan ve etkin madde içermeyen izo-ozmotik perfüzyon çözeltisi kullanılarak etkin (naproksen sodyum ve furosemid) ve referans (antipirin) maddelerin alıkonma zamanlarında (antipirin: ~3.9 dk; furosemid: ~7.8 dk; naproksen sodyum: ~9.8 dk) pik vererek girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir.

Karaciğer perfüzyonu deneyleri: Enjeksiyonlardan önce toplanan boş perfüzet Bölüm 3.10.3.3'de verilen HPLC sistemlerine uygulanmış ve etkin maddelerin pik verdiği zamanlarda (naproksen sodyum: ~5.2 dk; furosemid: ~3.9 dk) pik vererek girişim yapıp yapmadığı kontrol edilmiştir.

3.11.2. Doğrusallık (Linearity)

Referans maddeler

Standart doğru için hazırlanan üç stoktan her birinde yedi (RBC: 8.72 - 174.4 µg hemoglobin /mL) veya onüç (EB: 0.25-10 µg/mL) konsantrasyon olan farklı seriler üretilmiş ve absorbans değerleri tayin edilmiştir. Her bir seri için konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilerek standart doğru denklemi ve korelasyon

katsayısı hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre değerlendirilmiştir.

Etkin maddeler

Çözünürlük deneyleri: Standart doğru için hazırlanan stok çözeltiler (naproksen sodyum: 0.1 mg/mL; furosemid: 0.1 mg/mL) uygun şekilde seyreltilerek naproksen sodyum ve furosemid için 0.5-50 µg/mL aralığında her biri 10 konsantrasyon içerecek şekilde altı seri üretilmiş ve pik alanı değerleri tayin edilmiştir. Konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri kullanılarak lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemi ve korelasyon katsayıları tayin edilmiştir. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre değerlendirilmiştir.

Barsak permeabilitesi deneyleri: Standart doğru denklemi oluşturmak amacıyla 0.1 mg/mL furosemid, 0.5 mg/mL naproksen sodyum ve 0.5 mg/mL antipirin içeren altı adet stok çözelti hazırlanmış ve her stoktan uygun seyreltmeler yapılarak Tablo 3.6'da verilen konsantrasyonlarda etkin (naproksen sodyum ve furosemid) ve referans madde (antipirin) içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonuyla elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak standart doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları tayin edilmiştir. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre değerlendirilmiştir.

Karaciğer perfüzyonu deneyleri: Standart doğru denklemi oluşturmak amacıyla hazırlanan stok çözeltilerin (naproksen sodyum: 10 mg/mL; furosemid: 20 mg/2mL) uygun şekilde seyreltilmesiyle (naproksen sodyum : 0.005 – 2.00 µg/mL , furosemid : 0.003 – 60.0 µg/mL) standart çözeltiler elde edilmiştir. Bu çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonuyla elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen pik alanları değerleri kullanılarak standart doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları tayin edilmiştir. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre değerlendirilmiştir.

3.11.3. Kesinlik (Precision)

Kesinlik, aynı analitik koşullar altında yapılan belirli sayıdaki ölçümlerin birbirlerine ne kadar yakın olduğunun göstergesidir. Yöntemlerin kesinliği için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Analitik yöntemin kesinliğini göstermek için ortalama değer (Ort) bulunarak standart sapma (SS), ve varyasyon katsayısı (VK) ölçütleri tayin edilir.

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 (Tablo 3.10 ve Tablo 3.11) her konsantrasyon noktası için 6 tane standart hazırlanmıştır. Hazırlanan standartlar etkin maddenin kendisine ait miktar tayin yöntemine uygulanarak aynı gün içerisinde analiz yapılmış ve elde edilen bulgulardan hareketle ortalama (Ort), SS, ve VK hesaplanmıştır.

Günler arası 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 (Tablo 3.10 ve Tablo 3.11) belirlenerek her konsantrasyon noktası için altı farklı günde 6'şar tane standart hazırlanmıştır. Hazırlanan standartlar etkin maddenin kendisine ait miktar tayin yöntemine uygulanarak aynı gün içerisinde analiz yapılmış ve elde edilen bulgulardan hareketle ortalama (Ort), SS, ve VK hesaplanmıştır.

Tablo 3.10. Referans maddeler için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlar.

Deney	Düzy	Çalışılan Maddeler ve Konsantrasyonları (µg/mL)	
		EB	RBC
Dağılma	Düşük	1	8.72
Hacmi	Orta	4	104.6
Deneyi	Yüksek	8	174.4

Tablo 3.11. Etkin maddeler için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlar.

Deney	Düzy	Çalışılan Maddeler ve Konsantrasyonları (µg/mL)		
		Furosemid	Naproxen Sodyum	Antipirin
Çözünürlük Deneyi	Düşük	1	1	-
	Orta	10	10	-
	Yüksek	40	40	-
Barsak Permeabilitesi	Düşük	2.5	12.5	12.5
	Orta	7.5	37.5	37.5
	Yüksek	20	100	100
Karaciğer Perfüzyonu	Düşük	2	0.01	-
	Orta	10	0.5	-
	Yüksek	40	2	-

3.11.4. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk deneysel verilerin gerçek verilere ne kadar yakın olduğunun ölçütüdür. Doğruluk, % ortalama bağıl hata (OBH) ile ifade edilmiş (Eşitlik 3.19) ve OBH'nin 15'den küçük olmasına göre değerlendirme yapılmıştır (176).

$$\% \text{OBH} = \frac{A-B}{B} \times 100 \quad (3.19)$$

A : Tayin edilen konsantrasyon

B : Gerçek konsantrasyon

Yöntemlerin doğruluğunun tayini için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlardan elde edilen sonuçlar kullanılarak yapılmıştır (Tablo 3.10-Tablo 3.11).

3.11.5. Duyarlılık (Sensitivity)

Bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeri olup saptayabilme sınırı (limit of detection; LOD) ve kantitatif olarak tayin edebileceği (limit of quantitation; LOQ) en küçük konsantrasyon değeri ile ifade edilir.

Naproksen sodyum ve furosemidin bilinen konsantrasyondaki stok çözeltilerinin seyreltilmesiyle elde edilen örneklerin her bir maddeye özgü HPLC metoduyla analizleri yapılarak sinyal/gürültü oranları tespit edilmiştir. Sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olan konsantrasyon LOD, S/G oranı 10 olan konsantrasyon ise LOQ olarak belirlenmiştir (177).

3.11.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen bütün veriler ortalama (Ort) ± standart sapma (SS) olarak tablolanmış. Elde edilen sonuçlardan siroz-kontrol karşılaştırmaları bağımsız örneklerde T testi (independent samples T test) ile yapılmıştır. Aynı deney

hayvanından elde edilen parametrelerin karşılaştırılması için (kontrol-kontrol, siroz-siroz) eşleştirilmiş örnekler testi (paired samples test) kullanılmıştır. Karşılaştırmalar SPSS 11.5 for Windows programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün istatistiksel analizlerde Güven aralığı (%95) en az %95 olarak seçilmiştir. Gruplar arasındaki farkın önemliliği elde edilen p değerinin α yanılma düzeyinden büyük ($p > \alpha$; istatistiksel olarak anlamsız) veya küçük ($p < \alpha$; istatistiksel olarak anlamlı) olmasına göre değerlendirilmiştir. Bunun yanında analitik yöntemin validasyon ölçütlerinin varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır.

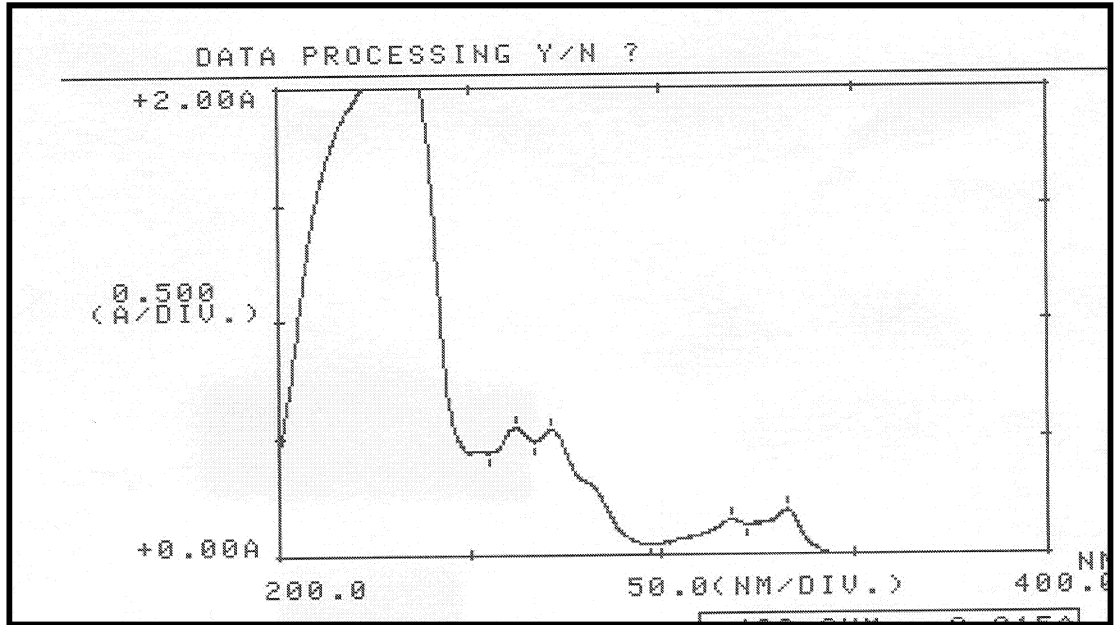
4. BULGULAR

4.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

4.1.1. Etkin Maddelerin UV Spektrumu

4.1.1.1. Naproksen Sodyum

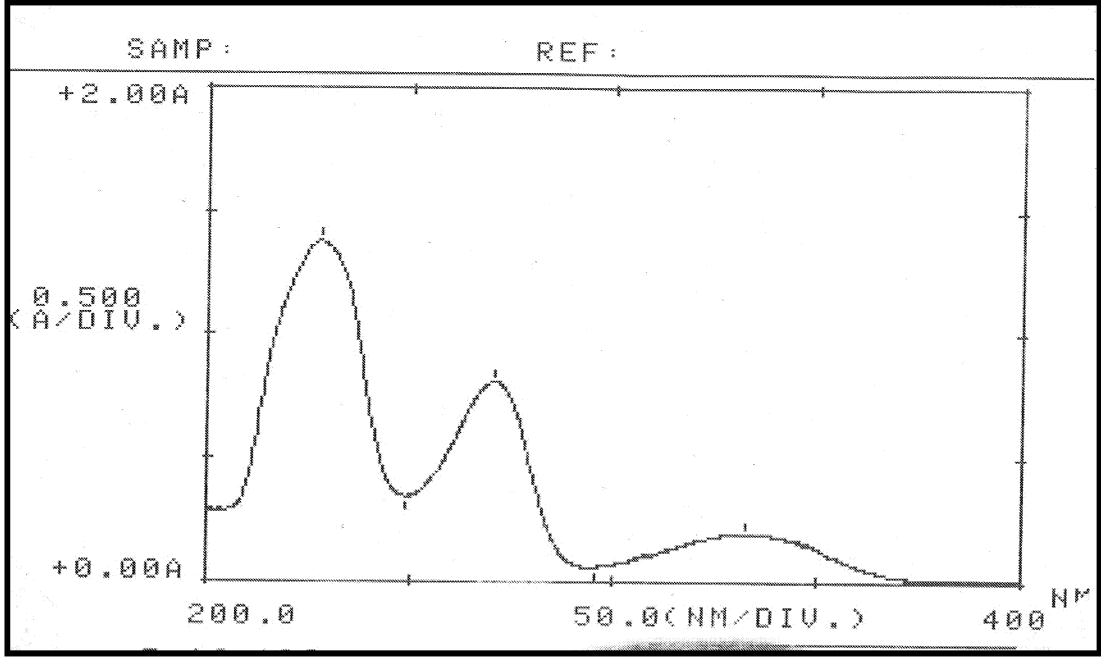
Naproksen sodyum kullanılarak hazırlanan çözeltinin (25 μ g/mL) 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınmış ve maksimum absorbans (λ_{maks}) gösterdiği dört dalga boyu 262, 271, 318 ve 332 nm olarak saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Naproksen sodyumun 200-400 nm aralığındaki UV Spektrumu.

4.1.1.2. Furosemid

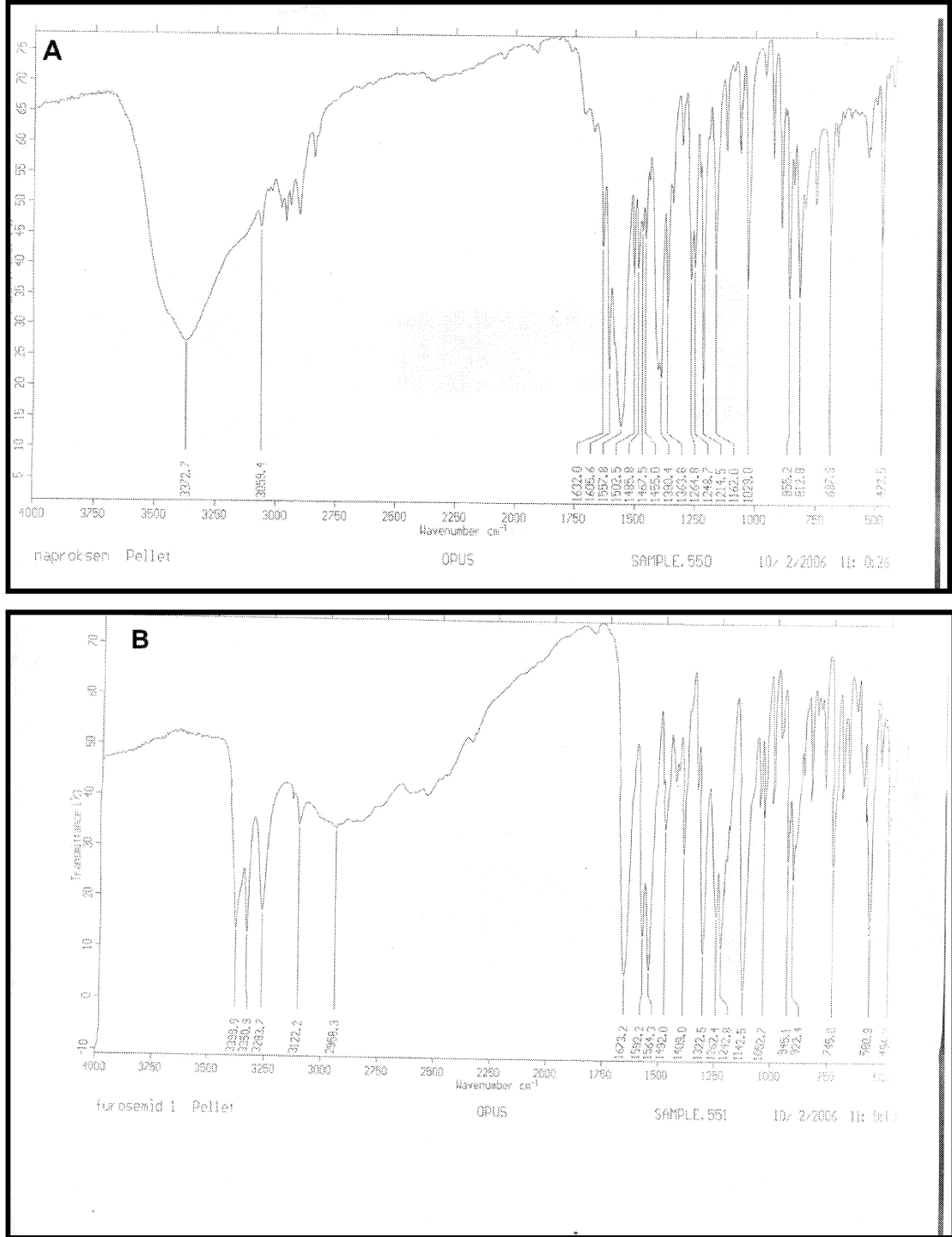
Furosemid kullanılarak hazırlanan çözeltinin (8 μ g/mL) 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınmış ve en fazla absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{maks}) 227.6 ve 270.4 nm olarak saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Furosemidin 200-400 nm aralığındaki UV Spektrumu.

4.1.2. IR Spektrumu

Naproksen sodyum ve furosemidin IR spektrumları Bölüm 3.6.2’de, belirtilen yönteme uygun olarak çekildiğinde elde edilen bulgular Şekil 4.3’de verilmiştir. Gözlenen pikler referans kaynaklarda verilen piklerle uyumlu bulunmuştur.



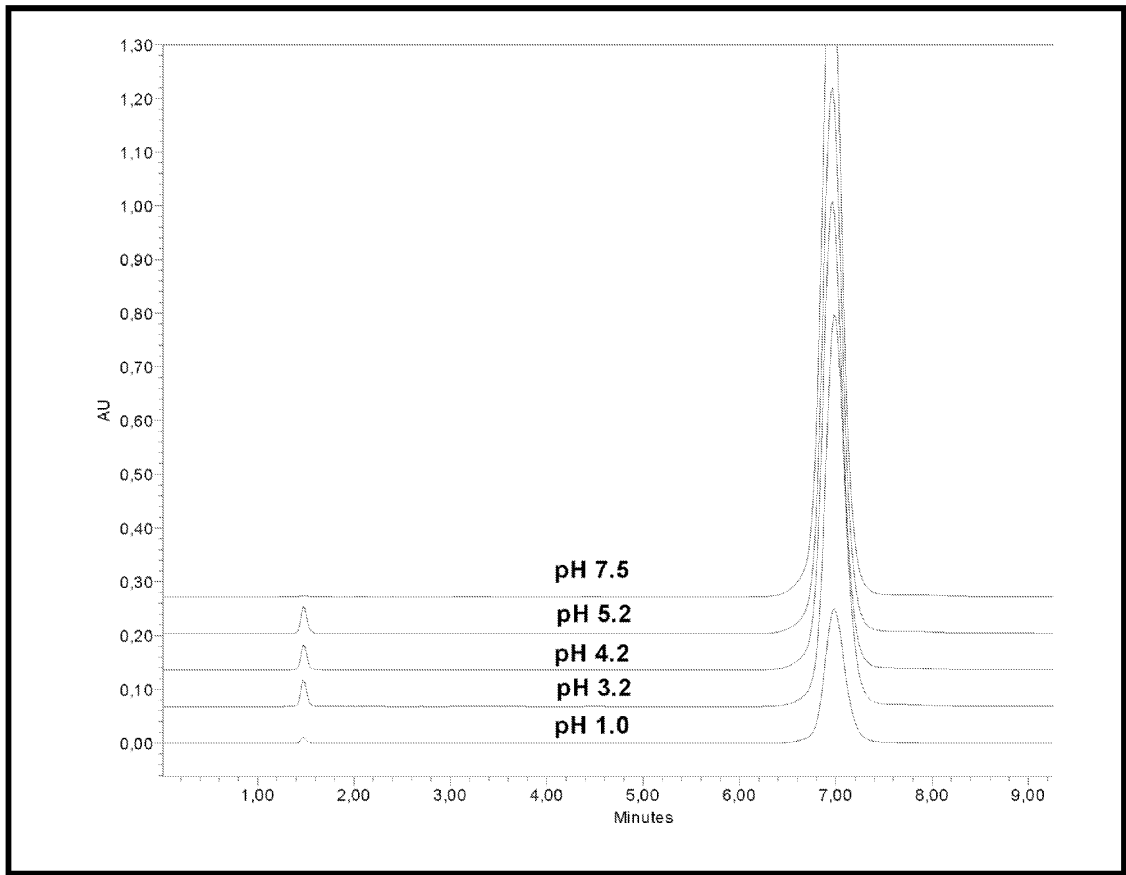
Şekil 4.3. Naproksen sodyum (A) ve furosemidin (B) $400\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığındaki IR spektrumu.

4.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayini Amacıyla Yapılan Deneyler

4.2.1. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemleri

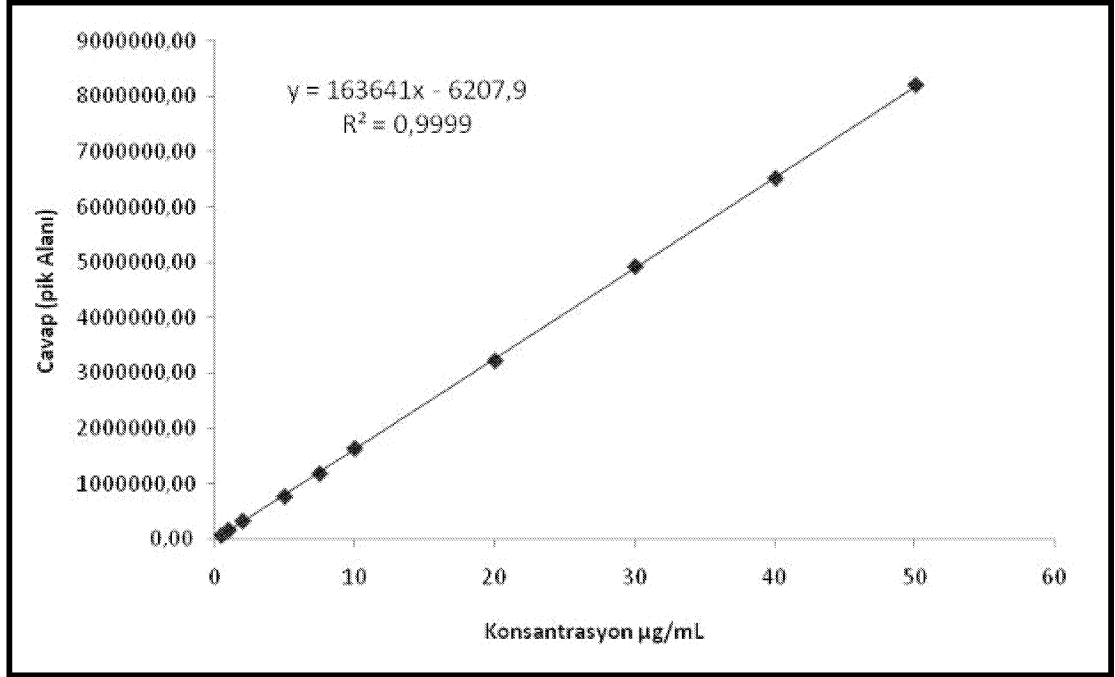
4.2.1.1. Naproksen Sodyum

Bölüm 3.7.1’de belirtilen koşullar altında, naproksen sodyumun beş farklı tampondaki HPLC kromatogramları Şekil 4.4’de verilmiştir. Her bir ortamdaki naproksen sodyumun alıkonma zamanı 7.1 ± 0.1 dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. Naproksen sodyumun farklı tamponlarda, 230 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramları.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayini yapılan naproksen sodyumun çözünürlük deneyleri için kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.5’de verilmiştir.

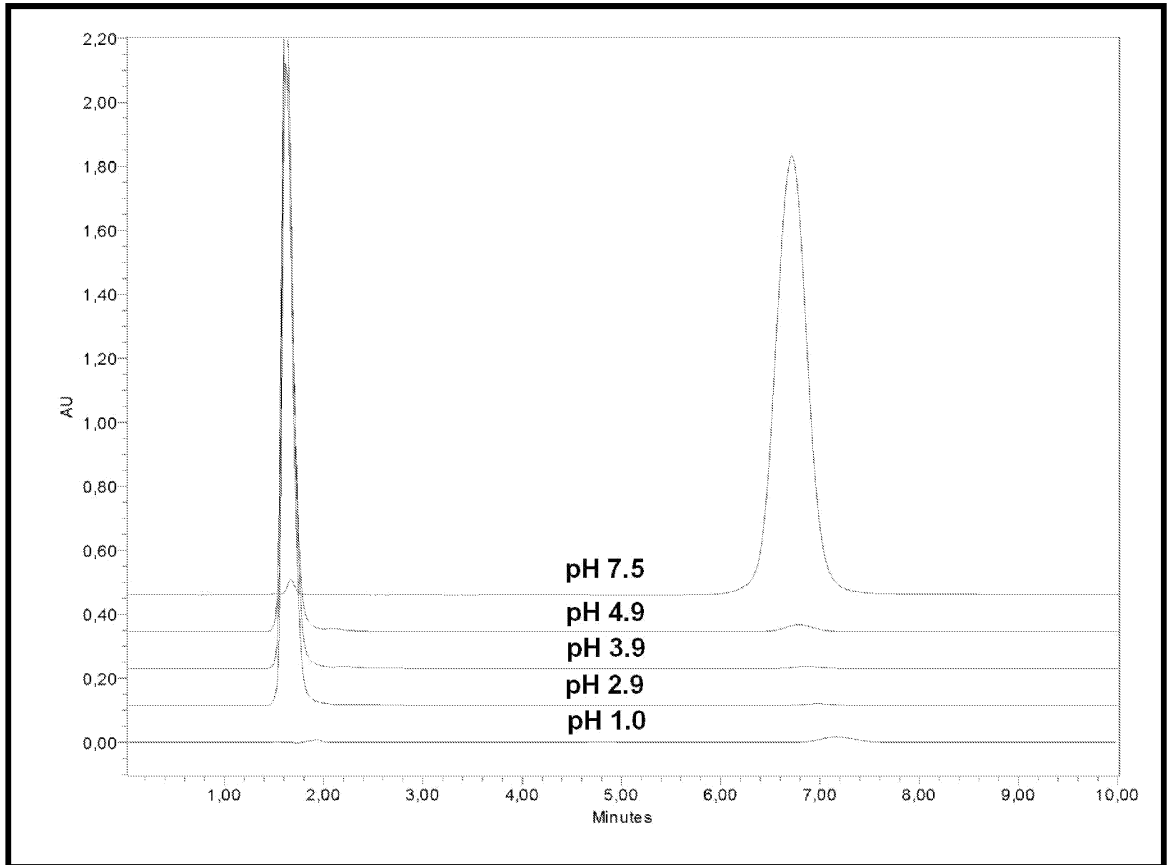


Şekil 4.5. Naproksen sodyumun çözünürlük deneylerinde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemini [Güven aralığı (%95) eğim: 167123 - 160159, kesişim: 2731 - (-15147)].

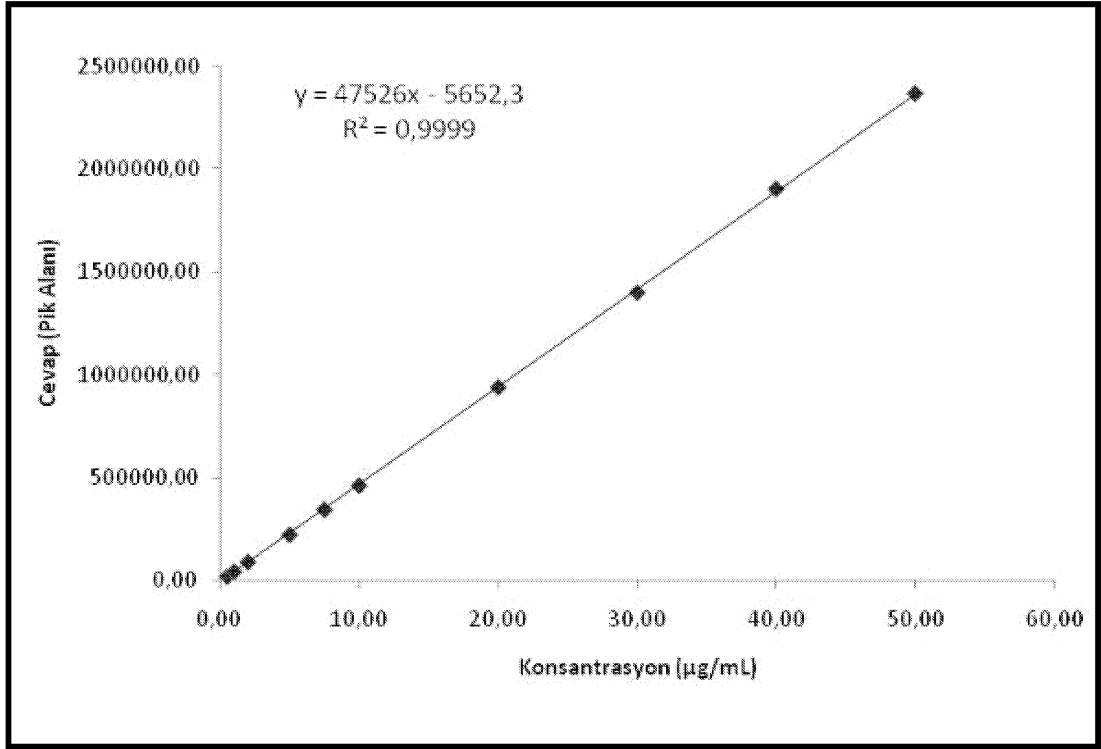
4.2.1.2. Furosemid

Bölüm 3.7.1'de belirtilen koşullar altında, furosemidin 235 nm dalga boyunda beş farklı tampondaki HPLC kromatogramları Şekil 4.6'da verilmiştir. Her bir ortamdaki furosemidin alıkonma zamanı 6.9 ± 0.3 dakika olarak bulunmuştur.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle tayini yapılan furosemidin çözünürlük deneyleri için kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemini Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Furosemidin farklı tamponlarda, 235 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramları.

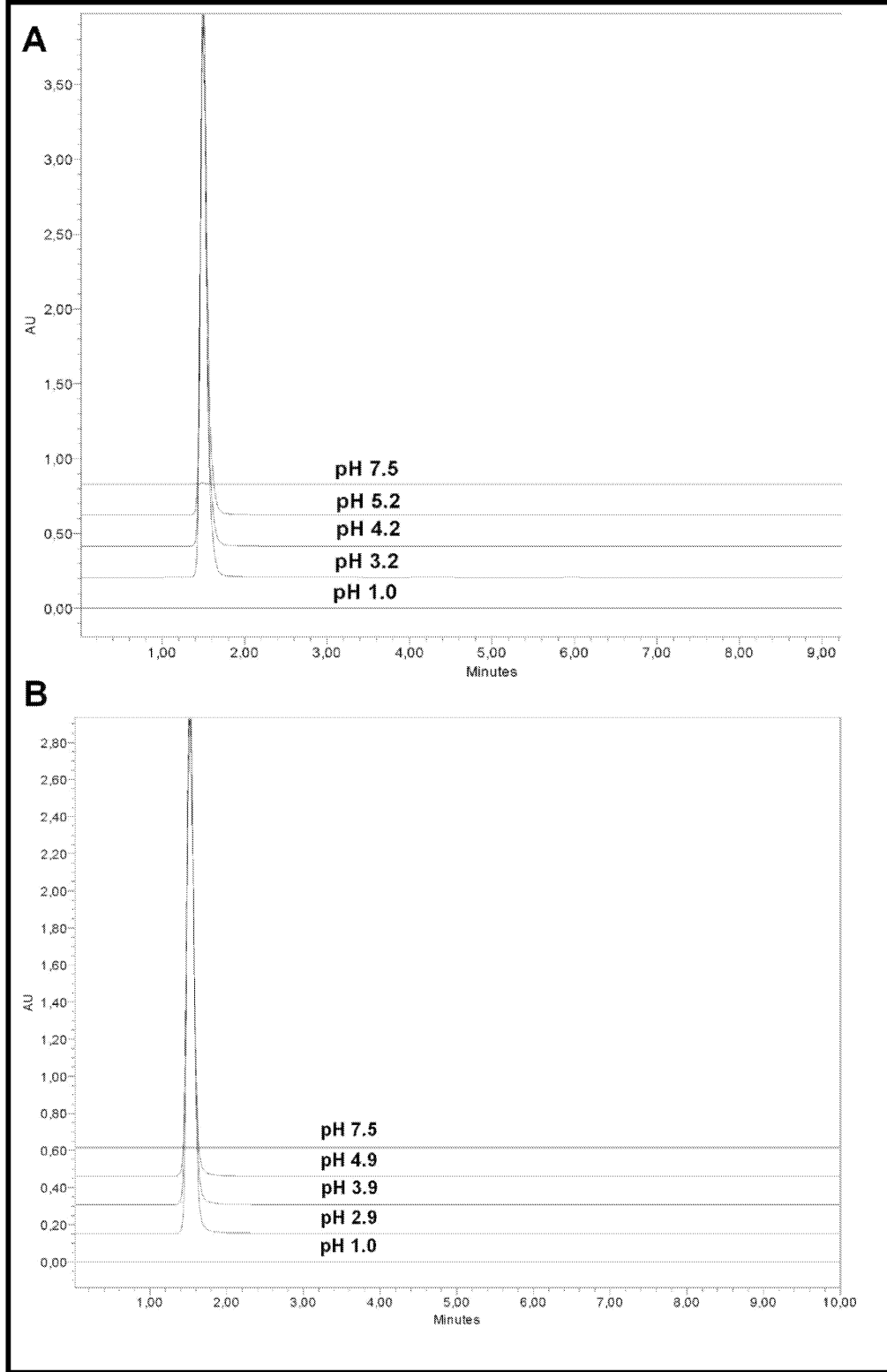


Şekil 4.7. Furosemidin çözünürlük deneylerinde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi [Güven aralığı (%95) eğim: 48643 - 46409, keşişim: 2367 - (-13672)].

4.2.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemlerinin Validasyonu

4.2.2.1. Özgünlük

Etkin madde içermeyen çözünürlük ortamlarından (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2) alınan örnekler Bölüm 3.7.1’de verilen HPLC sistemine enjekte edildiğinde naproksen sodyum ve furosemidin alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim gözlenmemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Naproksen sodyum (A) ve furosemidin (B) çözünürlük deneylerinde kullanılan ve etkin madde içermeyen tamponlara ait HPLC kromatogramları.

4.2.2.2. Doğrusallık

Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlük deneyleri için hazırlanan stok çözeltilerden hareketle gerekli seyreltmeler yapılarak elde edilen çözelti serileri Bölüm 3.7.1’de belirtilen HPLC sistemine enjekte edilmiş ve pik alanları hesaplanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. Regresyon analizi yapılarak konsantrasyon ve pik alanları arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu gösterilmiştir ($R^2 > 0.999$; Şekil 4.5. ve Şekil 4.7).

4.2.2.3. Kesinlik

Etkin maddelerin çözünürlüklerinin tayininde kullanılan miktar tayini yöntemlerinin gün içi ve günler arası kesinliği Bölüm 3.11.3’de belirtildiği şekilde yapılmış ve elde edilen bulgular Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Çalışılan tüm konsantrasyonlara ait varyasyon katsayısı değerleri %2’den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.1. Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlüklerinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Gün İçi		Günler Arası	
	Naproksen Sodyum ($\mu\text{g/mL}$)	Furosemid ($\mu\text{g/mL}$)	Naproksen Sodyum ($\mu\text{g/mL}$)	Furosemid ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.11	1.12	1.11	1.09
	1.14	1.12	1.13	1.09
	1.11	1.09	1.09	1.09
	1.09	1.15	1.09	1.13
	1.13	1.09	1.10	1.08
	1.12	1.10	1.08	1.10
Ort \pm SS	1.12 \pm 0.02	1.11 \pm 0.02	1.10 \pm 0.02	1.10 \pm 0.02
VK (%)	1.56	1.79	1.52	1.60
10	10.03	10.08	9.94	9.69
	10.34	10.30	10.00	10.17
	9.95	9.93	10.03	10.13
	10.27	9.78	9.99	9.86
	10.01	9.80	10.16	9.77
	10.03	9.71	10.06	9.97
Ort \pm SS	10.11 \pm 0.07	9.92 \pm 0.20	10.03 \pm 0.07	9.93 \pm 0.19
VK (%)	1.58	1.97	0.74	1.94
40	40.83	41.60	40.42	39.76
	40.42	40.16	39.50	40.78
	39.52	39.70	39.18	40.98
	39.69	39.86	39.77	40.09
	39.51	40.78	39.67	40.09
	39.19	39.54	39.94	40.81
Ort \pm SS	39.86 \pm 0.63	40.27 \pm 0.72	39.75 \pm 0.42	39.24 \pm 0.69
VK (%)	1.57	1.94	1.05	0.72

4.2.2.4. Doğruluk

Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlüklerinin tayininde kullanılan miktar tayini yöntemlerinin doğruluğunu göstermek amacıyla yapılan deneylerden elde edilen bulgular Tablo 4.2’de verilmiştir. Ortalama bağıl hata (% OBH) değerleri hem naproksen sodyum hemde furosemid için %15’den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.2. Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlüklerinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (ort \pm SS, n=6).

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Gün İçi % OBH		Günler Arası % OBH	
	Naproksen Sodyum	Furosemid	Naproksen Sodyum	Furosemid
1	-11.85 \pm 0.02	-11.14 \pm 0.02	10.01 \pm 0.02	-9.70 \pm 0.02
10	-1.06 \pm 0.07	0.78 \pm 0.02	-0.30 \pm 0.07	0.67 \pm 0.19
40	0.35 \pm 0.63	-0.68 \pm 0.72	1.05 \pm 0.42	-0.69 \pm 0.69

4.2.2.5. Duyarlılık

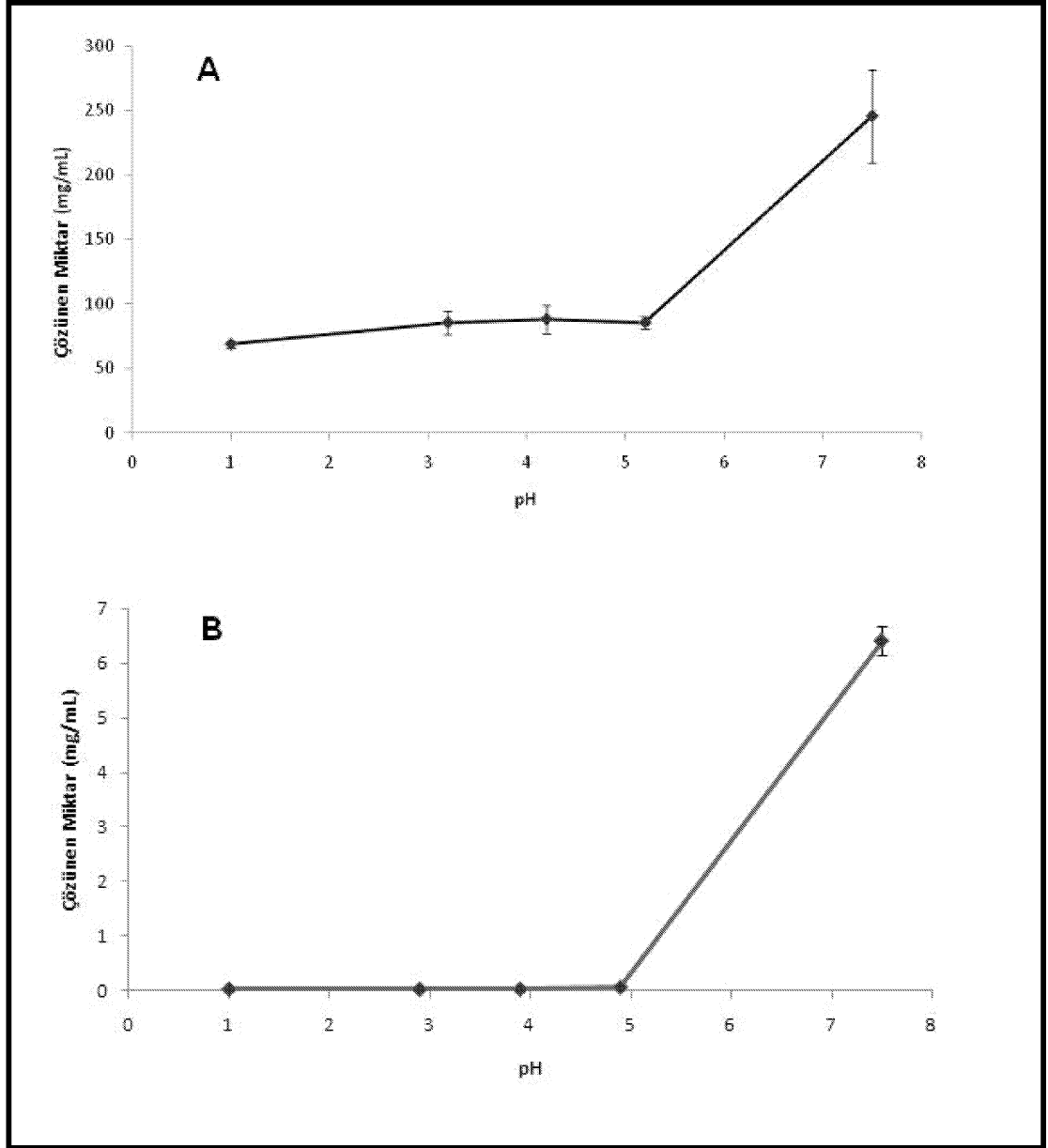
Furosemid (1 mg/mL) ve naproksen sodyum (1 mg/mL)’un stok çözeltilerinden hareketle, mobil faz sistemi ile seyreltilen standart çözeltiler Bölüm 3.7.1. de belirtilen HPLC yöntemlerine uygulanarak sinyal gürültü (S/G) oranları tayin edilmiştir. S/G oranı 3 den büyük olan en küçük konsantrasyon (LOD) furosemid için 80 ng/mL, naproksen sodyum için 20 ng/mL olarak tespit edilmiştir. S/G oranı 10 dan büyük olan en küçük konsantrasyon (LOQ) ise furosemid için 320 ng/mL, naproksen sodyum için 80 ng/mL tespit edilmiştir.

4.2.3. Etkin Maddelerin Çözünürlük Bulguları

Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlükleri Bölüm 3.7’de belirtildiği şekilde beş farklı ortamda yapılmış ve elde edilen bulgular Tablo 4.3, ve Şekil 4.9’da verilmiştir. Her iki maddenin çözünürlüğü de pH’nın fonksiyonu olarak artmış ve çözünürlüğün en yüksek olduğu pH değeri 7.5 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.3. Naproksen sodyum ve furosemidin çalışılan pH’lardaki maksimum çözünürlük değerleri (Ort \pm SS; n=6).

Deney Koşulları (pH=)	Naproksen Sodyum		Furosemid	
	Çalışılan pH	Çözünen Miktar (mg/mL)	Çalışılan pH	Çözünen Miktar (μ g/mL)
1.0	1.0	68.86 \pm 2.47	1.0	28.4 \pm 4.7
pKa-1	3.2	85.68 \pm 9.50	2.9	27.6 \pm 1.0
pKa	4.2	88.37 \pm 10.78	3.9	28.5 \pm 3.0
pKa+1	5.2	85.75 \pm 4.73	4.9	63.3 \pm 4.7
7.5	7.5	254.91 \pm 24.59	7.5	6410.8 \pm 262.1



Şekil 4.9. Naproksen sodyum (A) ve furosemidin (B) pH'nın fonksiyonu olarak çözünürlük profili.

Etkin maddelerin en yüksek dozlarının (naproksen sodyum:550 mg; furosemid:80 mg) çözündüğü çözücü hacmi pH' nın fonksiyonu olarak hesaplanmış ve elde edilen bulgular Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Naproksen sodyum ve furosemidin en yüksek dozlarını çözmek için gerekli çözücü hacmi.

Deney Koşulları (pH=)	Naproksen Sodyum		Furosemid	
	Çalışılan pH	Çözücü Hacmi (mL)	Çalışılan pH	Çözücü Hacmi (mL)
1.0	1.0	7.99	1.0	2816
pKa-1	3.2	6.42	2.9	2898
pKa	4.2	6.22	3.9	2807
pKa+1	5.2	6.41	4.9	1263
7.5	7.5	2.16	7.5	12

Naproksen sodyumun en yüksek dozunu çözmek için gerekli çözücü hacmi çalışılan tüm koşullarda 250 mL'den az iken furosemid için sadece pH 7.5'de 250 mL'den az bulunmuştur.

Naproksen sodyum ve furosemidin çalışılan pH'lardaki doz sayısı (D_o) değerleri Bölüm 3.7.2'de verilen Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.5'de gösterilmiştir. Naproksen sodyumun doz sayısı değerleri tüm koşullarda 1'den küçük ($D_o < 1$) iken furosemid için bu değer sadece pH 7.5'da 1'den küçük ($D_o < 1$) olarak bulunmuştur.

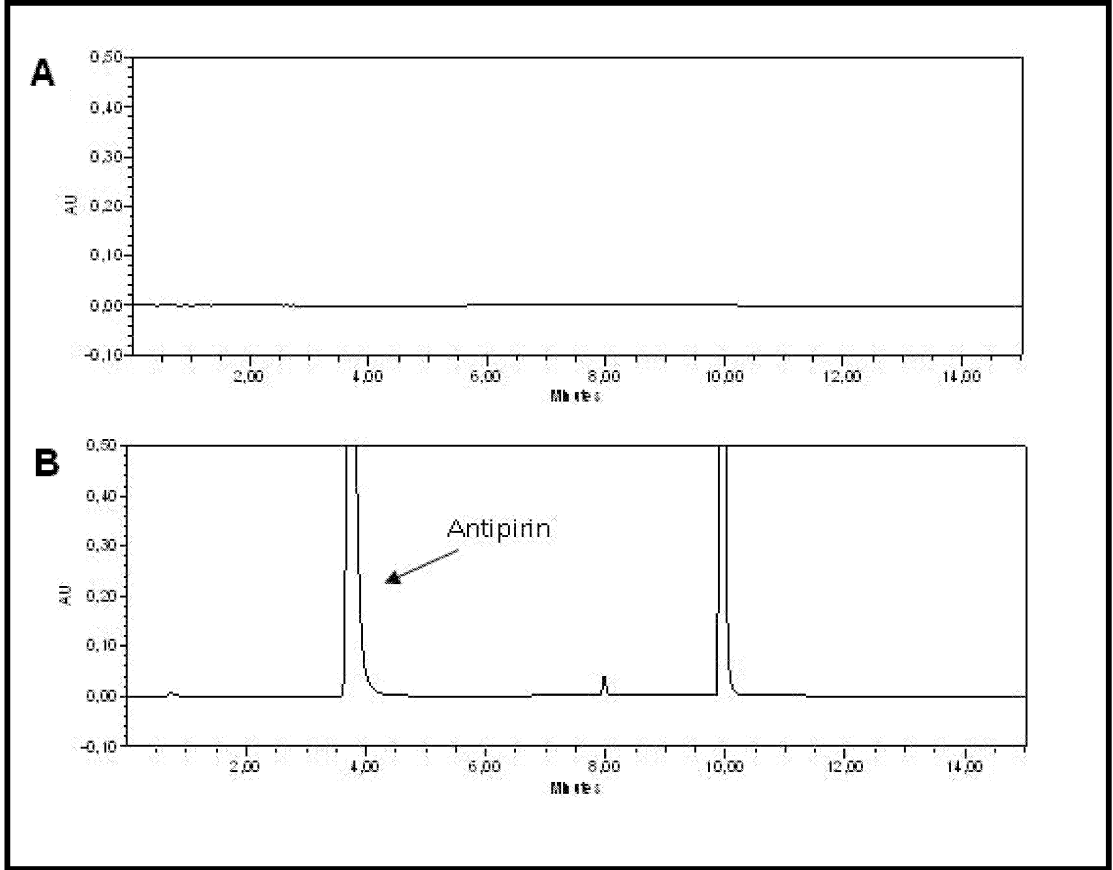
Tablo 4.5. Naproksen sodyum ve furosemidin çalışılan pH'lardaki doz sayısı (Do) değerleri.

Deney Koşulları (pH=)	Naproksen Sodyum		Furosemid	
	Çalışılan pH	Do	Çalışılan pH	Do
1.0	1.0	0.032	1.0	11.794
pKa-1	3.2	0.026	2.9	12.169
pKa	4.2	0.025	3.9	11.768
pKa+1	5.2	0.026	4.9	5.237
7.5	7.5	0.009	7.5	0.051

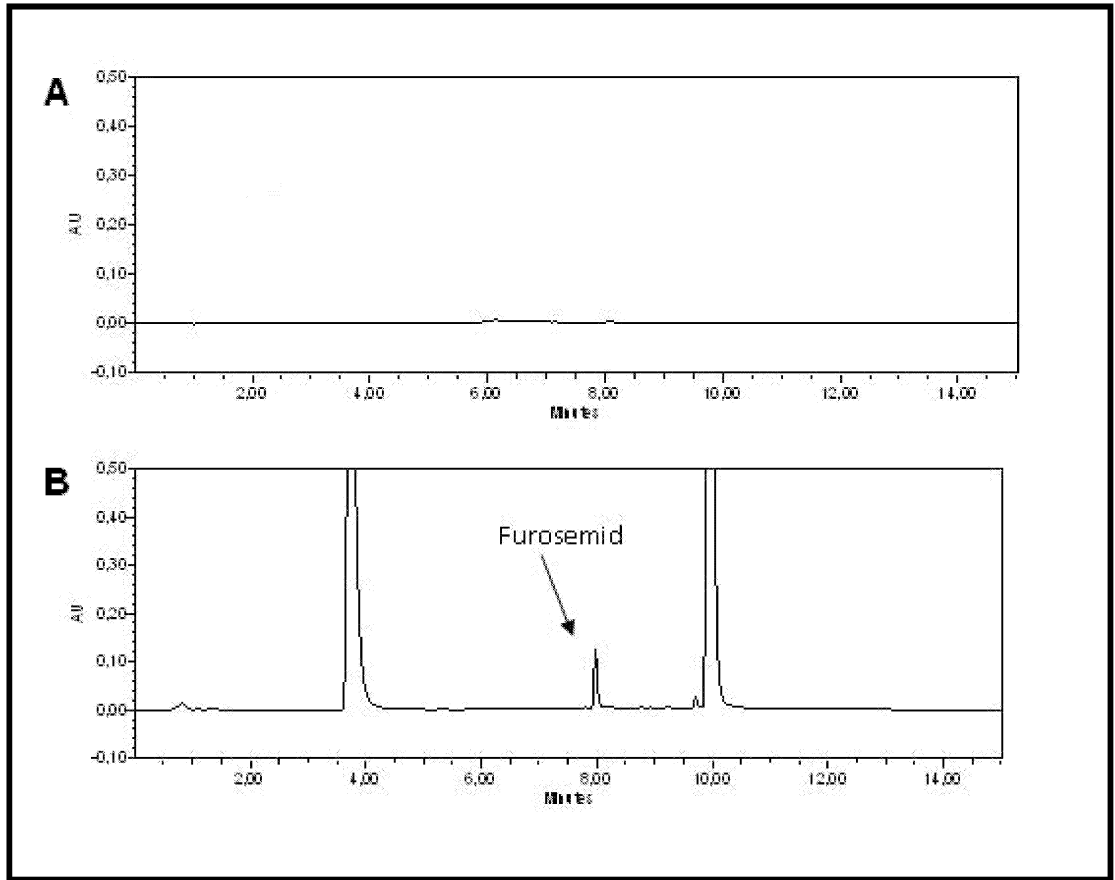
4.3. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitesinin Tayini Amacıyla Yapılan Deneyler

4.3.1. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitelerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yöntemi

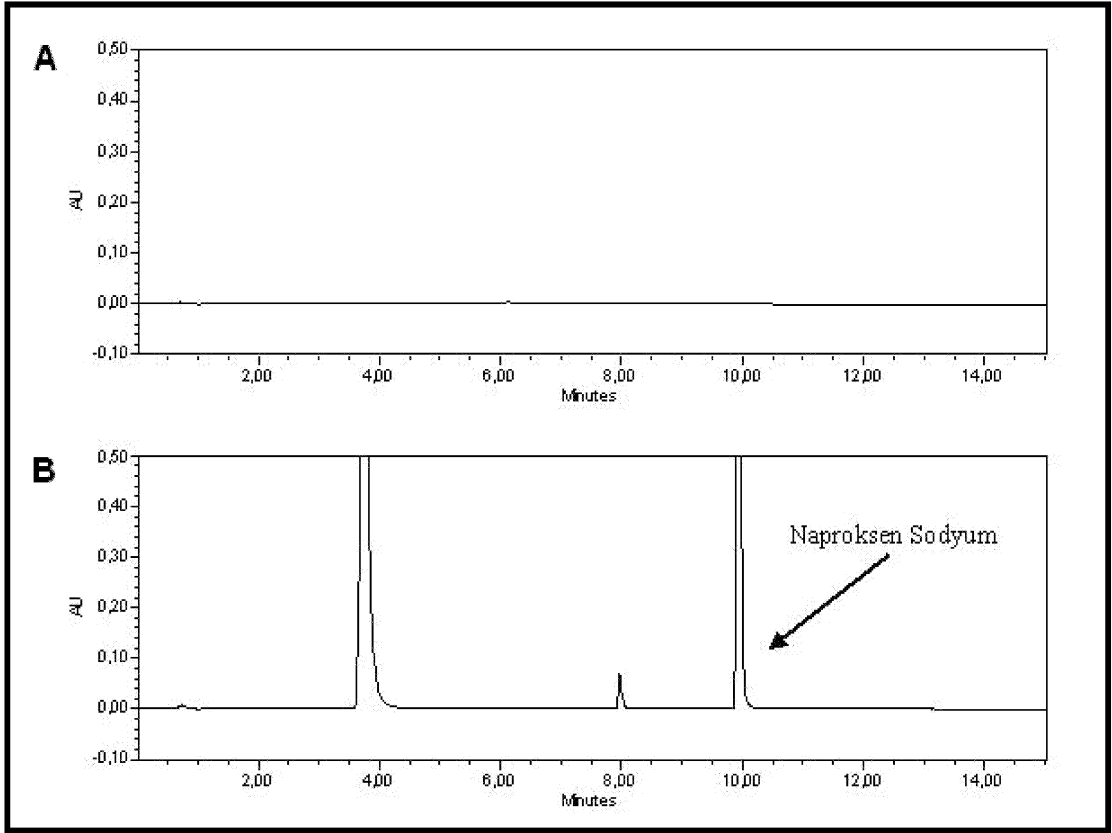
Barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan perfüzyon çözeltisinin tek başına, etkin (naproksen sodyum, furosemid) ve referans (antipirin) maddelerin ilavesinden sonra Bölüm 3.6.8'de belirtilen HPLC sistemine enjekte edilmesiyle elde edilen kromatogramlar Şekil 4.10-4.12'de verilmiştir. Alıkonma zamanı antipirin için 3.9 ± 0.1 dk, furosemid için 7.8 ± 0.1 dk ve naproksen sodyum için 9.8 ± 0.1 dk olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10. Barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan perfüzyon çözeltisinin tek başına (A) ve antipirin ilavesinden sonra (B) 242 nm'de elde edilen HPLC kromatogramları.

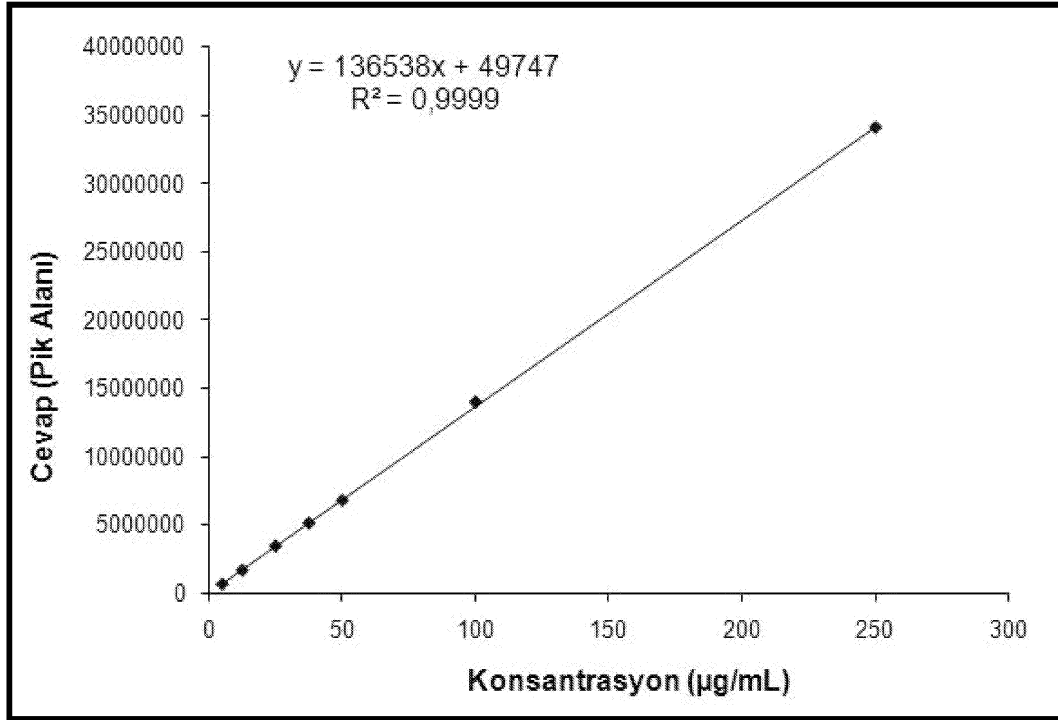


Şekil 4.11. Barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan perfüzyon çözeltisinin tek başına (A) ve furosemid ilavesinden sonra (B) 227.6 nm’de elde edilen HPLC kromatogramları.

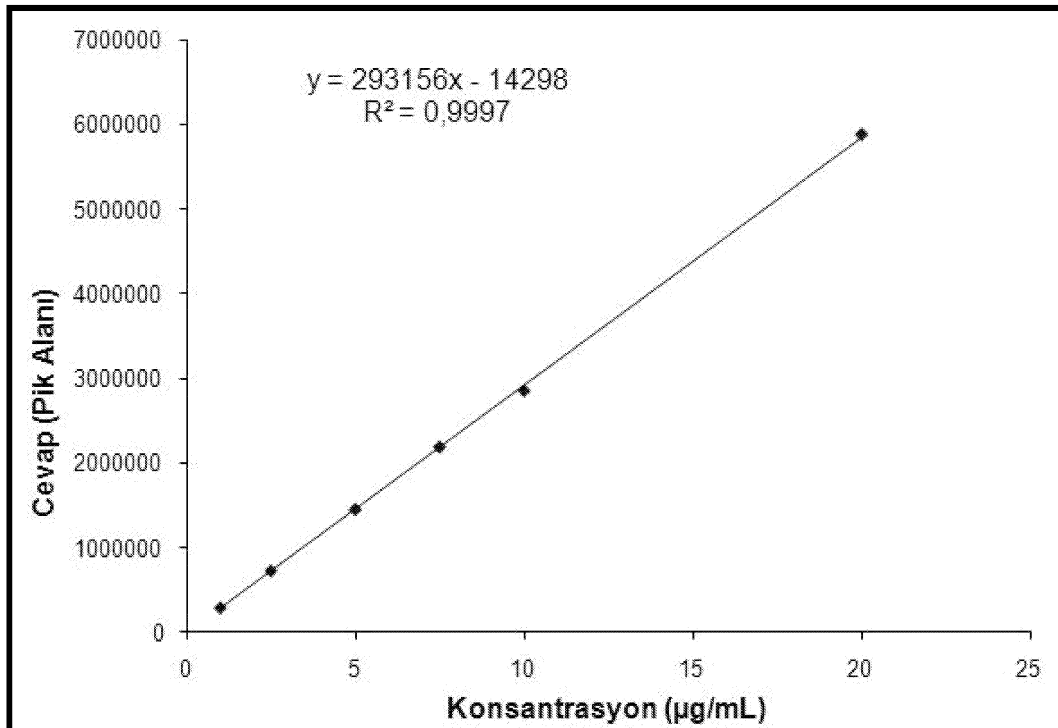


Şekil 4.12. Barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan perfüzyon çözeltisinin tek başına (A) ve naproksen sodyum ilavesinden sonra (B) 271 nm’de elde edilen HPLC kromatogramları.

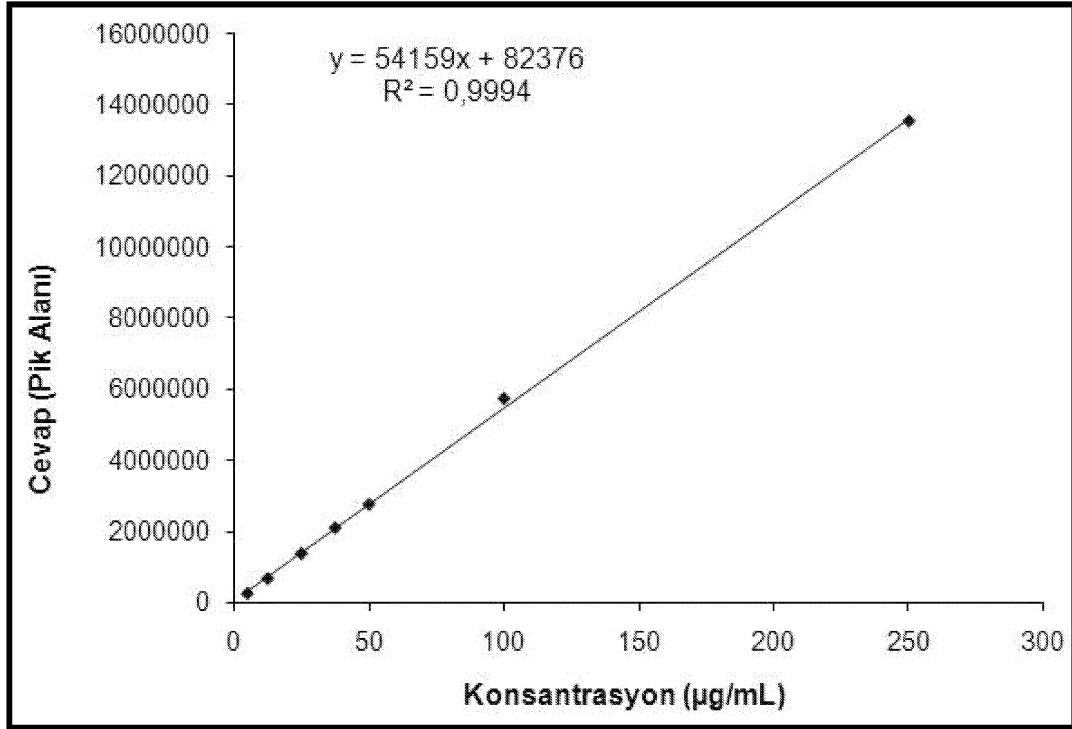
Bölüm 3.6.8’de verilen HPLC yöntemine göre hazırlanan, etkin (naproksen sodyum, furosemid) ve referans (antipirin) maddelerin barsak permeabilitelerinin tayin edilmesi amacıyla kullanılan kalibrasyon doğruları ve denklemleri Şekil 4.13 - 15’de verilmiştir.



Şekil 4.13. Antipirinin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi [Güven aralığı (%95) eğim: 137808 - 135267, kesişim: 105683 - (-6189)].



Şekil 4.14. Furosemidin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi [Güven aralığı (%95) eğim: 299815 - 286497, kesişim: 19601 - (-48196)].



Şekil 4.15. Naproksen sodyumun barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi [Güven aralığı (%95) eğim: 54619 - 53698, keşişim: 97431 - (-67320)].

4.3.2. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitelerinin Tayininde Kullanılan Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

4.3.2.1. Özgünlük

Barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan (Tablo 3.4), etkin ve referans maddeleri içermeyen perfüzyon ortamı Bölüm 3.6.8’de verilen HPLC sistemine enjekte edildiğinde antipirin, furosemid ve naproksen sodyumun alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.10 - 4.12).

4.3.2.2. Doğrusallık

Barsak permeabilitesinin incelenmesi amacıyla hazırlanan stok çözeltilerden hareketle gerekli seyreltmeler yapılarak elde edilen çözelti serileri Bölüm 3.6.8’de verilen HPLC sistemine enjekte edilmiş ve pik alanları hesaplanarak konsantrasyona

karşı grafiğe geçirilmiştir. Regresyon analizi yapılarak etkin ve referans maddeler için tayin edilen konsantrasyon ve pik alanları arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu gösterilmiştir ($R^2 > 0.999$; Şekil 4.13-4.15)

4.3.2.3. Kesinlik

Test (naproksen sodyum, furosemid) ve referans (antipirin) maddelerin barsak permeabilitelerinin tayininde kullanılan miktar tayini yönteminin gün içi ve günler arası kesinliği Bölüm 3.11.3'de belirtildiği şekilde yapılmış ve elde edilen bulgular Tablo 4.6 - 4.8'de gösterilmiştir. Çalışılan tüm konsantrasyonlara ait varyasyon katsayısı değerleri %15'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.6. Naproksen sodyumun barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Naproksen Sodyum ($\mu\text{g/mL}$)	
	Gün İçi	Günler Arası
12.5	11.522	11.528
	11.295	11.373
	11.573	11.402
	11.391	11.503
	11.375	11.865
	11.431	11.535
Ort \pm SS	11.431 \pm 0.042	11.534 \pm 0.072
VK (%)	0.89	1.52
37.5	37.466	37.353
	37.391	37.582
	37.234	38.097
	39.100	37.234
	37.423	37.763
	37.521	36.949
Ort \pm SS	37.689 \pm 0.285	37.496 \pm 0.166
VK (%)	1.85	1.09
100.0	100.253	100.392
	105.070	105.488
	106.579	106.880
	105.670	103.398
	105.508	101.826
	104.757	102.326
Ort \pm SS	104.640 \pm 0.913	103.385 \pm 0.986
VK (%)	2.14	2.34

Tablo 4.7. Furosemidin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Furosemid ($\mu\text{g/mL}$)	
	Gün İçi	Günler Arası
2.5	2.543	2.543
	2.508	2.520
	2.558	2.501
	2.538	2.528
	2.546	2.578
	2.548	2.550
Ort \pm SS	2.540 \pm 0.007	2.537 \pm 0.011
VK (%)	0.67	1.06
7.5	7.554	7.509
	7.467	7.467
	7.478	7.580
	7.541	7.538
	7.538	7.511
	7.558	7.598
Ort \pm SS	7.523 \pm 0.016	7.534 \pm 0.020
VK (%)	0.53	0.65
20.0	19.385	20.507
	20.428	19.492
	20.677	20.171
	19.443	20.390
	20.054	20.521
	20.558	20.426
Ort \pm SS	20.091 \pm 0.231	20.252 \pm 0.160
VK (%)	2.81	1.94

Tablo 4.8. Antipirinin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Antipirin ($\mu\text{g/mL}$)	
	Gün İçi	Günler Arası
12.5	11.973	11.226
	11.876	11.688
	12.353	12.200
	12.487	11.526
	12.022	11.461
	11.592	11.827
Ort \pm SS	12.050 \pm 0.133	11.654 \pm 0.137
VK (%)	2.70	2.89
37.5	37.395	37.224
	37.160	37.827
	37.106	36.954
	37.076	37.232
	38.134	38.678
	37.005	37.524
Ort \pm SS	37.313 \pm 0.173	37.573 \pm 0.252
VK (%)	1.14	1.65
100.0	99.752	101.780
	103.737	101.010
	105.219	107.139
	102.081	98.177
	99.679	102.245
	102.344	106.299
Ort \pm SS	102.135 \pm 0.891	102.775 \pm 1.378
VK (%)	2.14	3.29

4.3.2.4. Doğruluk

Naproksen sodyum, furosemid ve antipirinin barsak permeabilitelerinin tayininde kullanılan miktar tayini yöntemlerinin doğruluğunu göstermek amacıyla yapılan deneylerden elde edilen bulgular Tablo 4.9’da verilmiştir. Ortalama bağıl hata (% OBH) değerleri hem etkin hemde referans maddeler için %15’den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.9. Naproksen sodyum, furosemid ve antipirinin barsak permeabilitesinin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (Ort ± SS; n=6).

Konsantrasyon (µg/mL)	Naproksen Sodyum	
	Gün İçi (%OBH)	Günler Arası (%OBH)
12.5	8.55 ± 0.042	7.73 ± 0.072
37.5	-0.50 ± 0.285	0.01 ± 0.166
100	-4.64 ± 0.913	-3.38 ± 0.986
Furosemid		
2.5	-1.62 ± 0.007	-1.47 ± 0.011
7.5	-0.30 ± 0.016	-0.45 ± 0.020
20	-0.45 ± 0.231	-1.26 ± 0.160
Antipirin		
12.5	3.60 ± 0.133	6.76 ± 0.137
37.5	0.50 ± 0.173	-0.20 ± 0.252
100	-2.14 ± 0.891	-2.78 ± 1.378

4.3.2.5. Duyarlılık

Naproksen sodyum, furosemid ve antipirinin bilinen konsantrasyondaki stok çözeltilerinin seyreltilmesiyle elde edilen standart çözeltiler Bölüm 3.6.8’de belirtilen HPLC yöntemlerine uygulanak sinyal gürültü (S/G) oranları tayin edilmiştir. S/G oranı 3 den büyük olan en küçük konsantrasyon (LOD) furosemid için 400 ng/mL, naproksen sodyum için 80 ng/mL, antipirin için 30 ng/mL olarak tespit edilmiştir. S/G oranı 10 dan büyük olan en küçük konsantrasyon (LOQ) ise furosemid için 1000 ng/mL, naproksen sodyum için 320 ng/mL, antipirin için 100 ng/mL olarak tayin edilmiştir

4.3.3. Barsak Perfüzyonu Bulguları

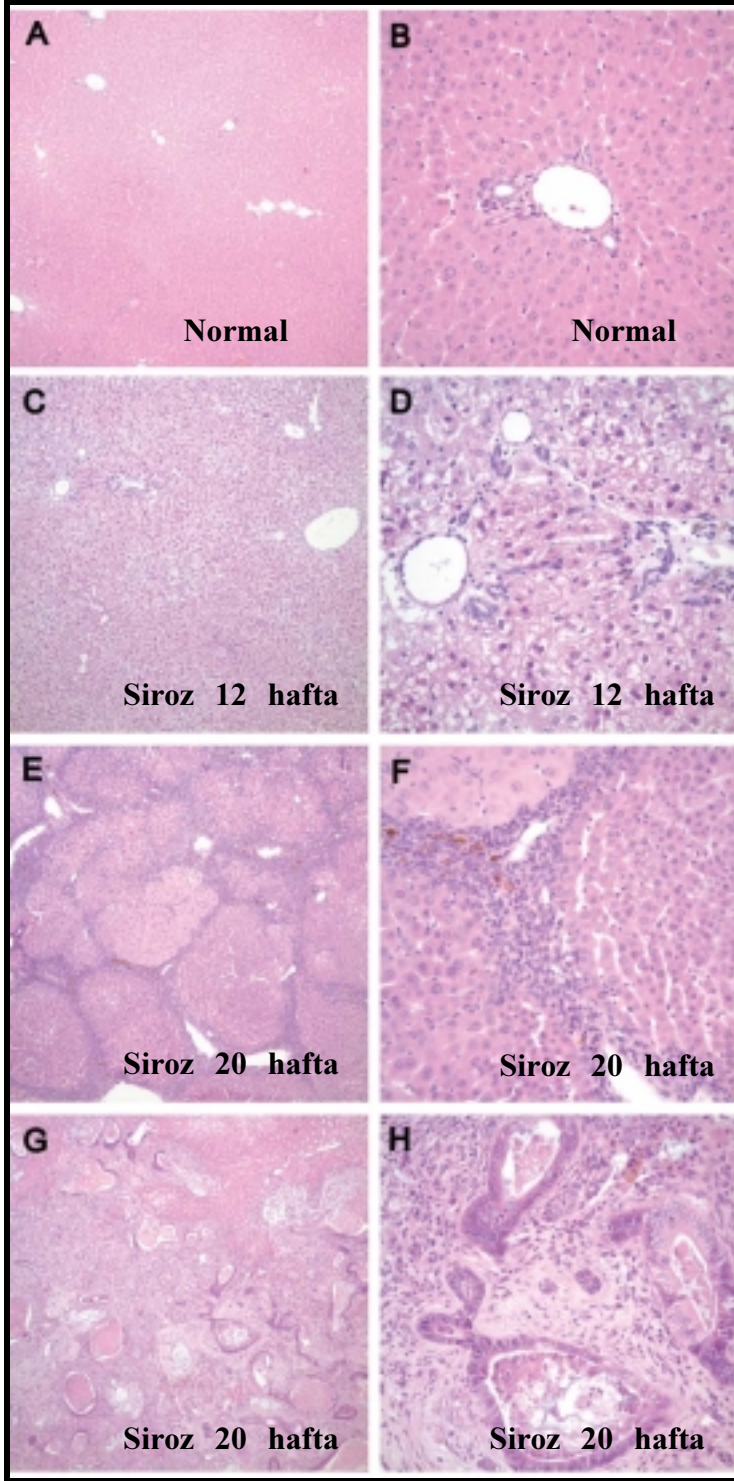
4.3.3.1. Deneysel Siroz Geliştirilmesi ve Geliştirilmiş Sirozun Derecesinin Tayini Bulguları

Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlarda 12-20 hafta süreyle %0.03 tiyoasetamid indüksiyonu sonucu geliştirilen sirozun patolojik olarak değerlendirilmesi ve derecelendirilmesi Bölüm 3.8.2’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Barsak ve karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan sirozlu hayvanlarda gelişmiş siroz Bölüm 2.5.1’de belirtilen Ishak patolojik değerlendirme sistemi esas alınarak Tablo 2.4’e göre değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10.’da verilmiştir. Sirozlu sıçanların karaciğerlerinden alınan kesitlerin optik mikroskopta incelenmesi sonucu elde edilen bulgular Şekil 4.16’da gösterilmiştir.

Tablo 4.10. Deneysel çalışmalarda kullanılan sirozlu hayvanlarda gelişen sirozun dereceleri.

Denek No	Barsak Perfüzyonu Deneyleri* (n=5)	Karaciğer Perfüzyonu Deneyleri*	
		Dağılma Hacmi (n=6)	Etkin Madde (n=7)
1	2	5	2
2	4	5	5
3	3	3	6
4	6	5	5
5	1	1	5
6	-	3	5
7	-	-	5

*Yapılan çalışmalarda kullanılan sirozlu hayvanlarda gelişen sirozun derecelendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Uzm. Dr. Aytekin Akyol tarafından, Ishak fibroz derecelendirilmesi kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.16. Siroz geliştirilmiş sıçan karaciğerlerinin fotoğrafları. (A: Normal 10x büyütme, B: Normal 40x büyütme, C: İndüksiyon aşamasında 10x, D: İndüksiyon aşamasında 40x, E: Siroz gelişmiş 10x, F: Siroz gelişmiş 40x, G: Kolanjiyoselüler karsinom 10x, H: Kolanjiyoselüler karsinom 40x).

4.3.3.2. Etkin Maddelerin Barsak Permeabilitesi Bulguları

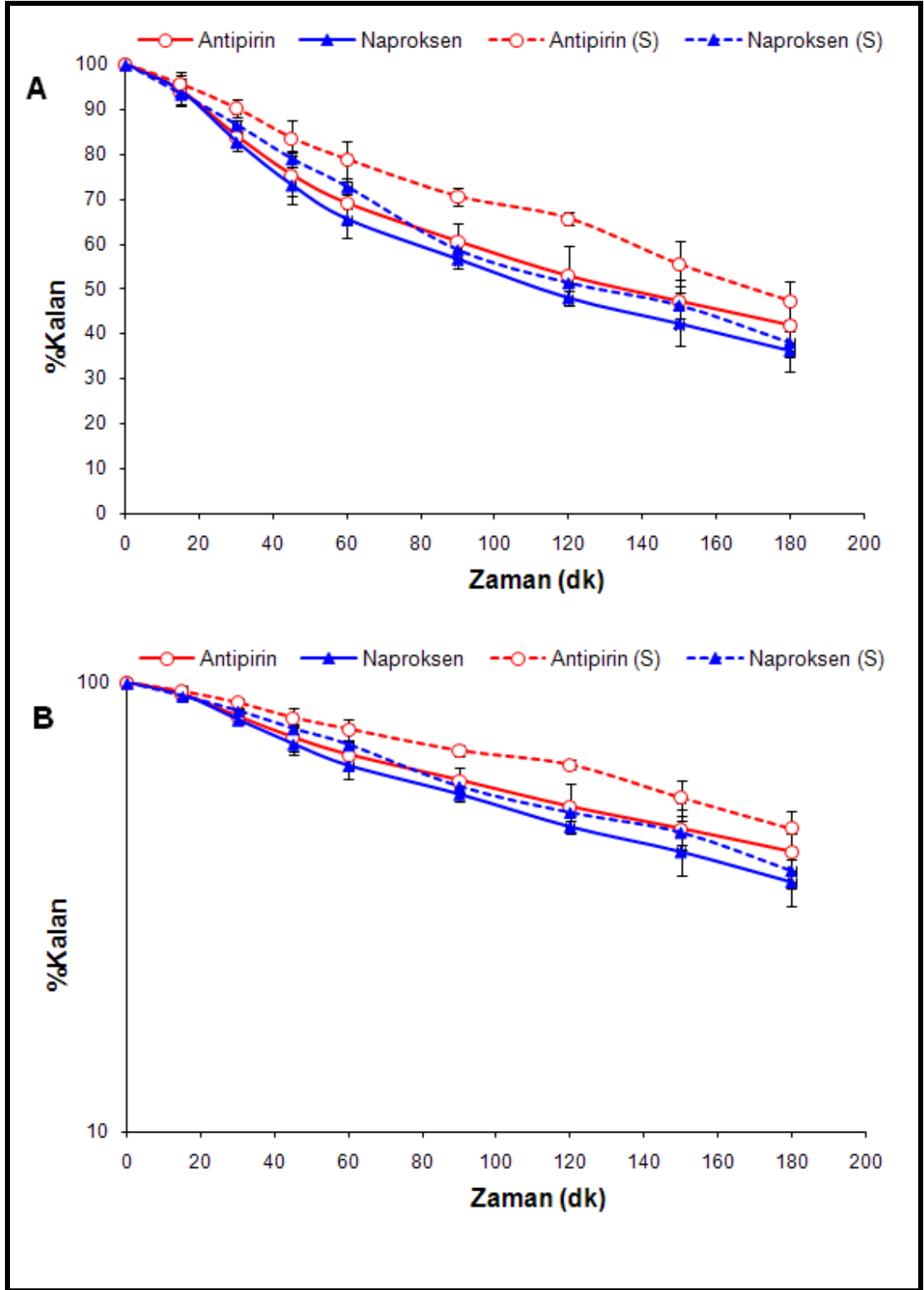
Etkin (naproksen sodyum, furosemid) ve referans (antipirin) maddelerin barsak permeabiliteleri Bölüm 3.8’de belirtilen *in situ* barsak perfüzyonu tekniği kullanılarak tayin edilmiştir. Absorplanmadan kalan madde miktarları (% kalan) zamana karşı grafiklenerek naproksen sodyum için Şekil 4.17, furosemid için Şekil 4.18 verilmiştir.

Etkin (naproksen sodyum, furosemid) ve referans (antipirin) maddelerin sıçan barsağından absorpsiyon hız sabitleri (k_a) ve permeabilite değerleri Tablo 4.11’de verilmiştir. Furosemidin P değeri kontrol grubunda $1.386 \cdot 10^{-4}$ cm/sn iken siroz grubunda $0.584 \cdot 10^{-4}$ cm/sn olarak bulunmuştur ($p=0.076$).

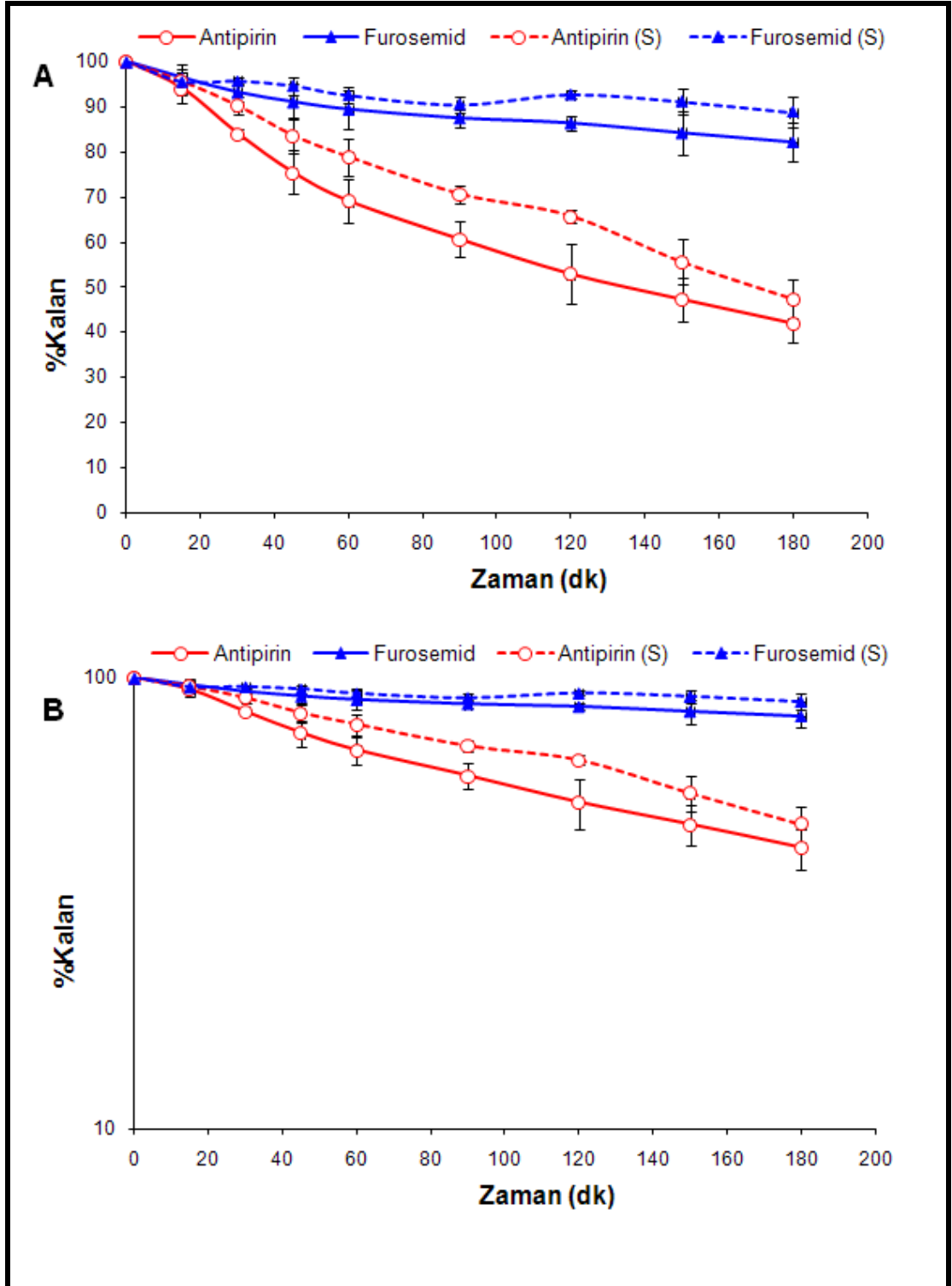
Tablo 4.11. Etkin ve referans maddelerin kontrol ve sirozlu sıçanlardaki absorpsiyon hız sabiti (k_a) ve permeabilite (P) değerleri (Ort \pm SS, n=5).

Madde	k_a (1/dk)		P (cm/sn) x 10^{-4}	
	Kontrol	Siroz	Kontrol	Siroz
Naproksen Sodyum	0.354 \pm 0.065	0.339 \pm 0.053	5.545 \pm 1.019	5.559 \pm 0.410
Furosemid	0.088 \pm 0.036 ¹	0.038 \pm 0.565 ²	1.386 \pm 0.565 ³	0.584 \pm 0.632 ⁴
Antipirin	0.321 \pm 0.050 ¹	0.290 \pm 0.041 ²	5.019 \pm 0.784 ³	4.758 \pm 0.478 ⁴

^{1, 2, 3, 4} p=0.000



Şekil 4.17. Kontrol ve siroz (S) geliştirilmiş sıçanlardaki barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan etkin madde naproksen sodyum ve referans madde antipirine ait lineer (A) ve semilogaritmik (B) profiller (Ort \pm SH, n=5).



Şekil 4.18. Kontrol ve siroz (S) geliştirilmiş sıçanlardaki barsak perfüzyonu deneylerinde kullanılan etkin madde furosemid ve referans madde antipirine ait lineer (A) ve semilogaritmik (B) profiller (Ort \pm SH, n=5).

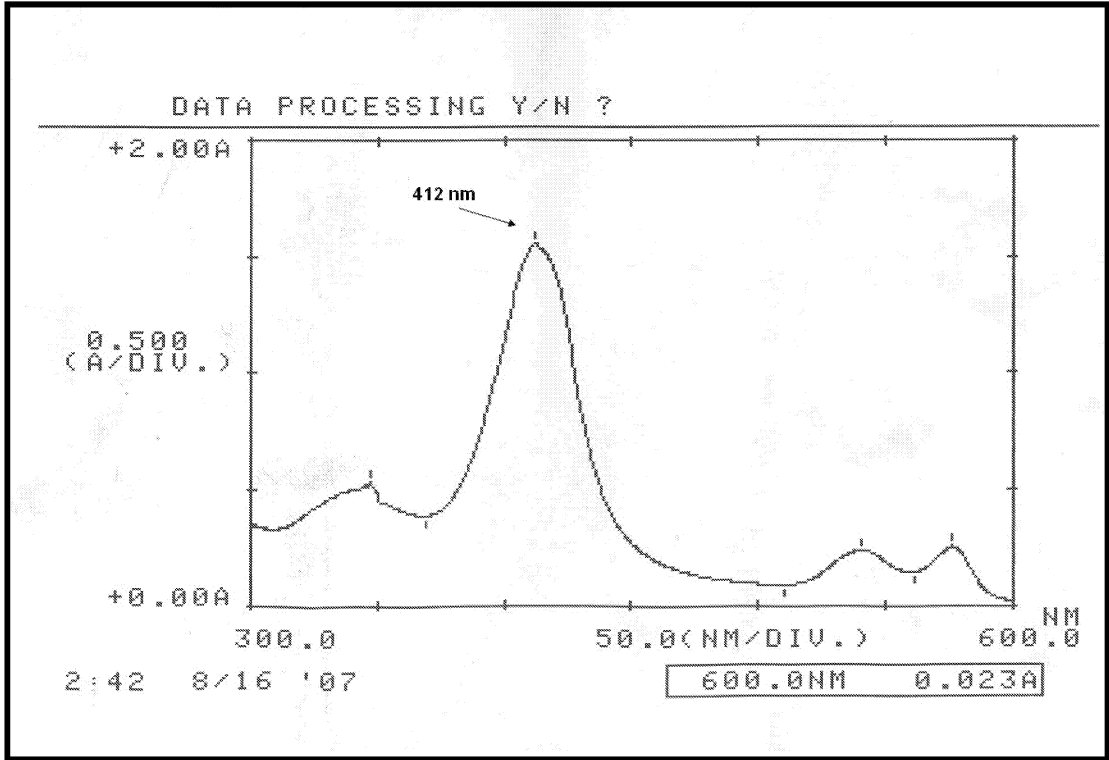
4.4. Karaciğer Perfüzyonu Çalışmalarına Ait Bulgular

4.4.1. Referans Maddelerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

4.4.1.1. Referans Maddeler İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

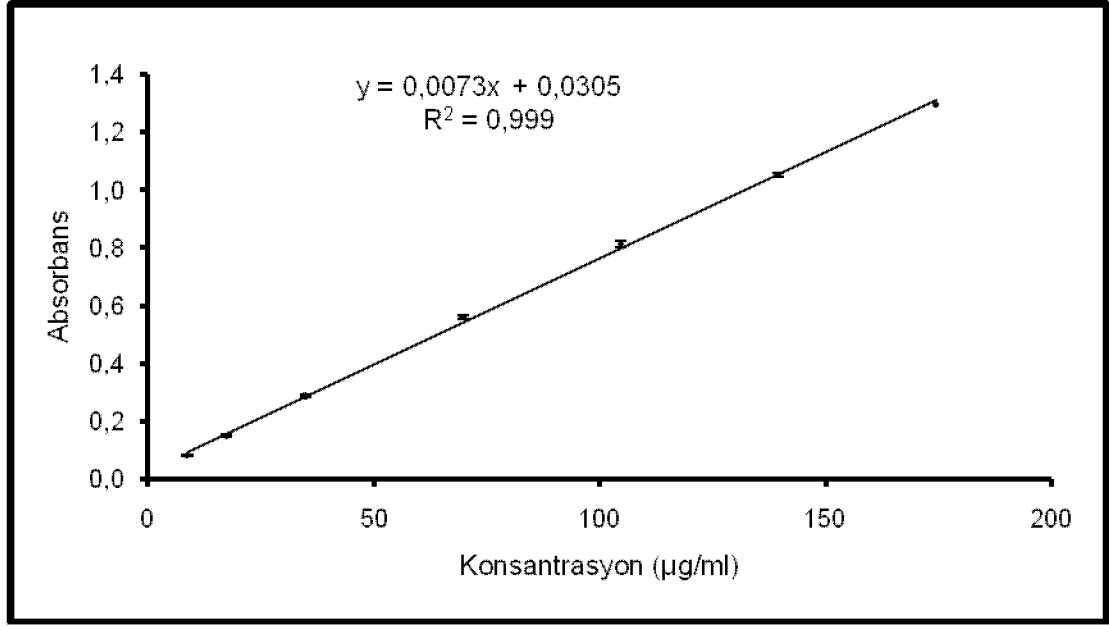
4.4.1.1.1. Eritrositler

Sıçan eritrositleri kullanılarak hazırlanan çözeltinin 300-600 nm aralığında UV+görünür bölge spektrumu çekilmiş ve en yüksek absorbans verdiği dalga boyu (λ_{maks}) 412 nm (Şekil 4.19) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.19. Sıçan eritrositinin 300-600 nm aralığındaki spektrumu.

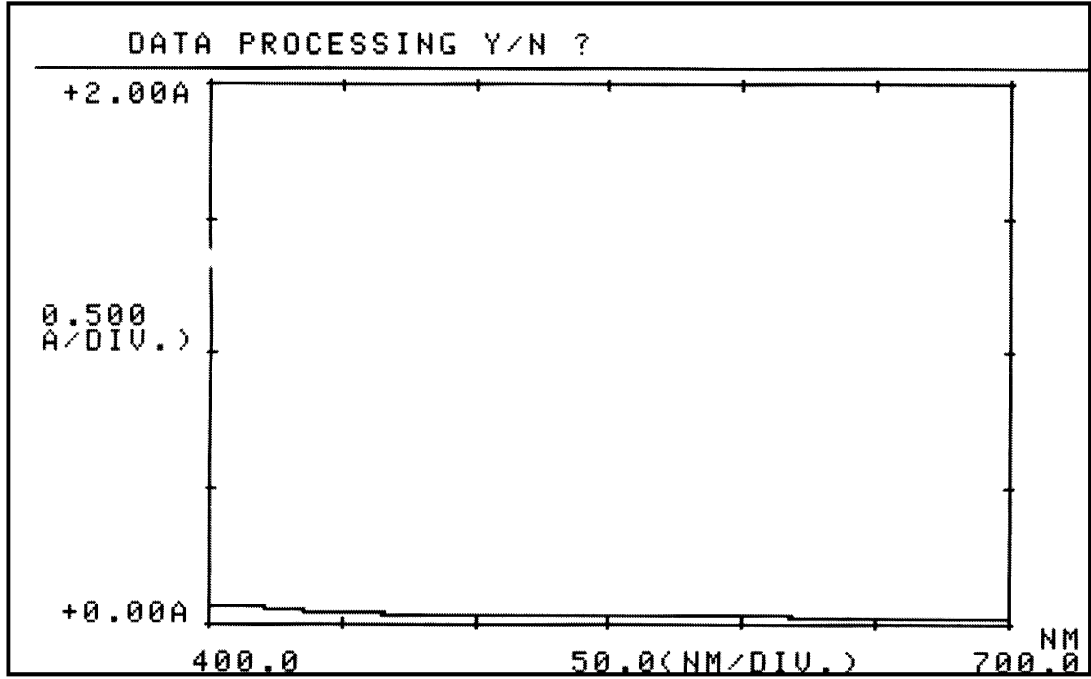
Spektrofotometrik olarak tayini yapılan sıçan eritrositine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20. Sıçan eritrositinden hazırlanan çözeltinin kalibrasyon doğrusu ve kalibrasyon denklemi ($\lambda_{maks}=412$ nm) (Güven aralığı (%95) eğim: 0.008 - 0.007, kesişim: 0.041 - 0.021).

Özgünlük

Eritrositlerin tayini için kullanılan yöntemin özgünlüğünü göstermek amacıyla portal ven veya hepatik artere herhangi bir enjeksiyon yapılmadan önce toplanan boş perfüzyatın UV spektrumu 400-700 nm arasında alındığında eritrositlerin en yüksek absorbans verdiği dalga boyunda (412 nm) herhangi bir absorbans göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. 400-700 nm aralığında boş perfuzata ait spektrum.

Doğrusallık

Eritrositlerin tayini için kullanılan yöntemin doğrusallığını göstermek amacıyla hazırlanan çözelti serilerinin absorbans değerleri eritrositlerin en yüksek absorbans verdiği dalga boyunda (412 nm) ölçülerek konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. Konsantrasyon ile absorbans arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu görülmüştür ($R^2 = 0.999$, Şekil 4.20).

Kesinlik

Eritrositlerin tayini için kullanılan yöntemin kesinliğinin göstermek amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular Tablo 4.12’de verilmiştir. Hesaplanan varyasyon katsayıları %2’den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.12. Eritrositlerin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.

Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Gün İçi	Günler Arası
8.72	8.84	8.70
	8.84	8.97
	8.97	8.56
	8.97	8.70
	8.97	8.70
	8.84	8.56
Ort \pm SS	8.91 \pm 0.07	8.70 \pm 0.02
VK (%)	0.80	1.72
104.6	105.6	105.4
	105.6	106.5
	105.6	107.5
	105.4	109.0
	105.4	109.1
	105.4	108.6
Ort \pm SS	105.5 \pm 0.11	107.7 \pm 1.49
VK (%)	0.10	1.39
176.4	176.5	172.0
	176.5	170.3
	176.5	171.3
	176.5	172.3
	176.4	171.9
	176.4	167.7
Ort \pm SS	176.5 \pm 0.07	171.0 \pm 1.73
VK (%)	0.04	1.01

Doğruluk

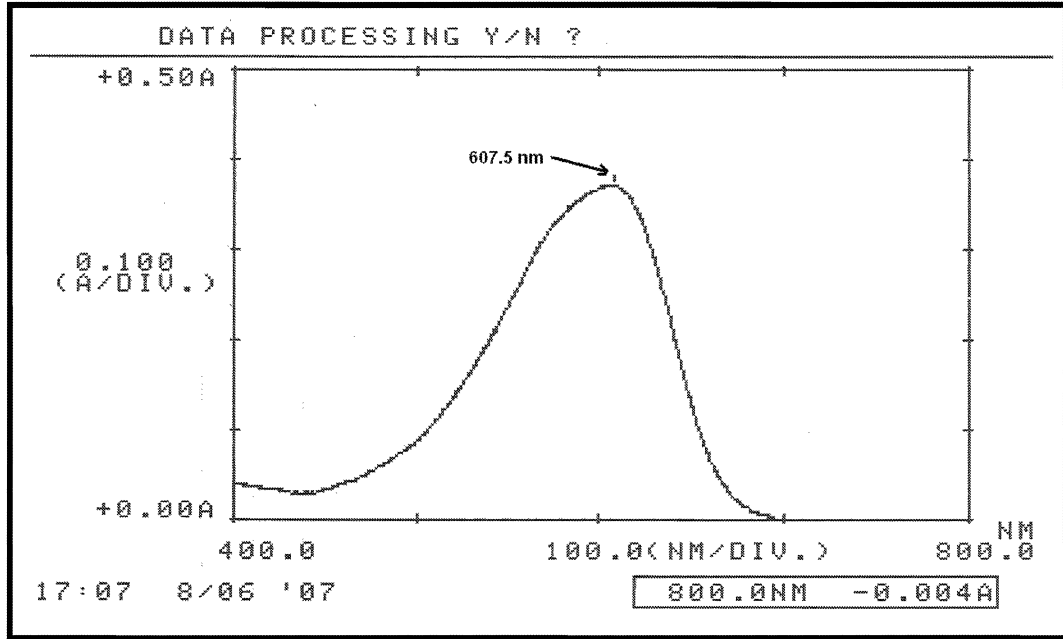
Eritrositlerin tayininde kullanılan miktar tayini yönteminin doğruluğunu göstermek amacıyla yapılan deneylerden elde edilen bulgular Tablo 4.13'de verilmiştir. Ortalama bağıl hata (% OBH) değerleri %15'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.13. Eritrositlerin tayininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (Ort \pm SS, n=6).

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Gün İçi %OBH	Günler Arası %OBH
8.72	2.17 \pm 0.07	0.02 \pm 0.02
104.6	0.86 \pm 0.11	2.94 \pm 1.49
174.4	1.20 \pm 0.07	1.96 \pm 1.01

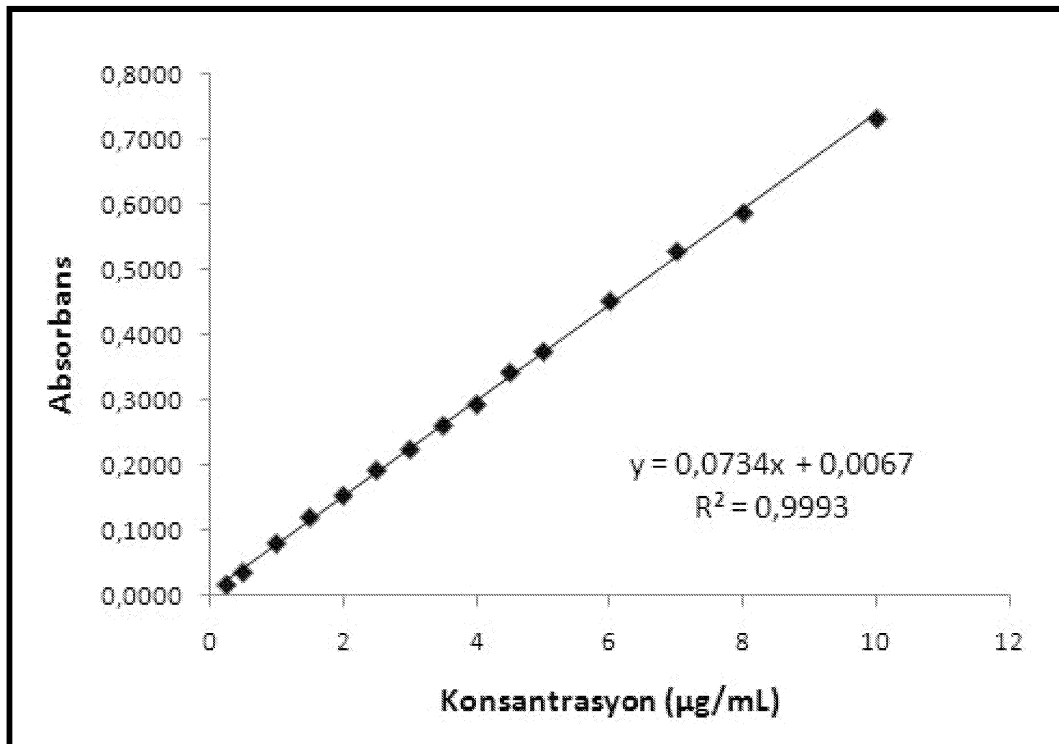
4.4.1.1.2. Evans Mavisi

EB kullanılarak hazırlanan çözeltinin 400-800 nm aralığında görünür bölge spektrumu çekilmiş en yüksek absorbans verdiği dalga boyu (λ_{maks}) 607.5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Evans mavisinin 400-800 nm aralığındaki spektrumu.

Spektrofotometrik olarak tayini yapılan Evans mavisine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi Şekil 4.23’de verilmiştir.



Şekil 4.23. EB’nin spektrofotometrik miktar tayini için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Güven aralığı (%95) eğim: 0.075 - 0.072, kesişim: 0.012 - 0.001).

Özgünlük

Boş perfüzatın 400-700 nm arasında spektrumu alındığında EB'nin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunda (607.5 nm) herhangi bir pik gözlenmemiştir (Şekil 4.21) .

Doğrusallık

EB'nin miktar tayini için kullanılan yöntemin doğrusallığını göstermek amacıyla hazırlanan çözelti serilerinin absorbans değerleri EB'nin en yüksek absorbans verdiği dalga boyunda (607.5 nm) tayin edilerek konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. Konsantrasyon ile absorbans arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu görülmüştür ($R^2 > 0.999$; Şekil 4.23).

Kesinlik

EB'nin miktar tayini için kullanılan yöntemin kesinliğini göstermek amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular Tablo 4.14'da verilmiştir. Hesaplanan varyasyon katsayıları % 15'ten küçük bulunmuştur.

Tablo 4.14. Evans mavisinin tayinininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.

Konsantrasyon (µg/mL)	Gün İçi	Günler Arası
1	1.149	0.972
	0.972	1.012
	0.985	1.026
	1.026	0.985
	0.972	0.931
	1.026	0.999
Ort ± SS	1.021 ± 0.067	0.987 ± 0.034
VK (%)	6.570	3.426
4	3.914	3.724
	4.105	3.928
	3.941	4.105
	3.928	3.996
	3.928	4.010
	3.724	4.064
Ort ± SS	3.923 ± 0.121	3.971 ± 0.136
VK (%)	3.088	3.413
8	7.797	7.838
	8.233	8.029
	8.083	7.920
	7.933	7.947
	7.620	8.219
	7.851	7.879
Ort ± SS	7.920 ± 0.217	7.972 ± 0.137
VK (%)	2.735	1.724

Doğruluk

EB'nin tayini için kullanılan yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular Tablo 4.15.'de verilmiştir. Hesaplanan OBH (%) değerleri %15'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.15. Evans mavisinin tayinininde kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (Ort \pm SS, n=6).

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Gün İçi %OBH	Günler Arası %OBH
1	-2.148 \pm 0.067	1.258 \pm 0.034
4	1.917 \pm 0.121	0.725 \pm 0.136
8	1.005 \pm 0.217	0.351 \pm 0.137

4.4.1.2. Referans Maddelerle Yapılan Perfüzyon Deneyleri

Perfüzyon çalışmalarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler ve hemodinamik parametreler Tablo 4.16'da verilmiştir.

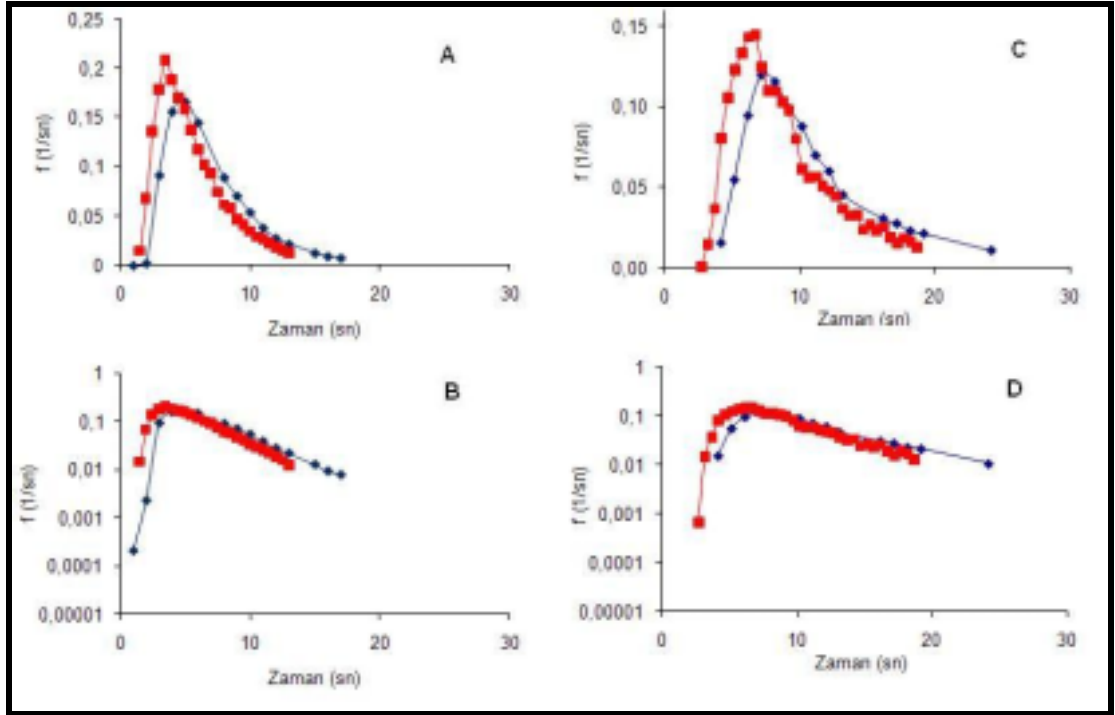
Tablo 4.16. Perfüzyon çalışmalarında kullanılan hayvanlara ait bilgiler ve hemodinamik parametreler (Ort \pm SS).

	Deneyle			
	Dağılma Hacmi Deneyle		Etkin Maddeli Deneyle	
	Normal n=7	Siroz n=6	Normal n=7	Siroz n=7
W_{sıçan} (g)	325 \pm 57	296 \pm 49	304 \pm 15	260 \pm 27
W_{kc} (g)	9.51 \pm 0.87	11.74 \pm 4.44	9.00 \pm 2.05	9.85 \pm 2.84
Q (mL/3 dk)	14.91 \pm 0.42	14.81 \pm 0.24	14.68 \pm 0.21	14.69 \pm 0.51
Safra akış hızı (μL/dk)	5.30 \pm 1.20	8.22 \pm 4.76	5.74 \pm 0.92	5.14 \pm 1.99

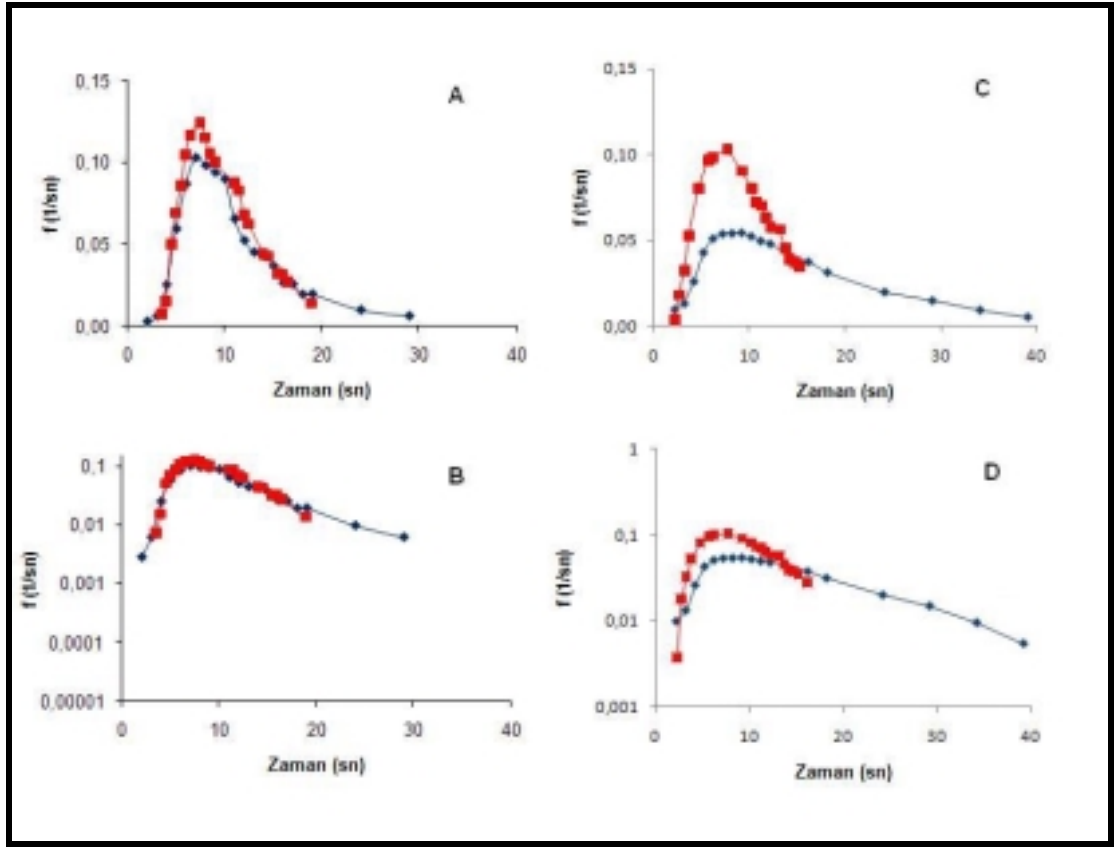
Sirozlu gruplarda gelişen siroz dereceleri Tablo 4.10'de verilmiştir.

4.4.1.2.1. Dağılma Hacimlerinin Tayini

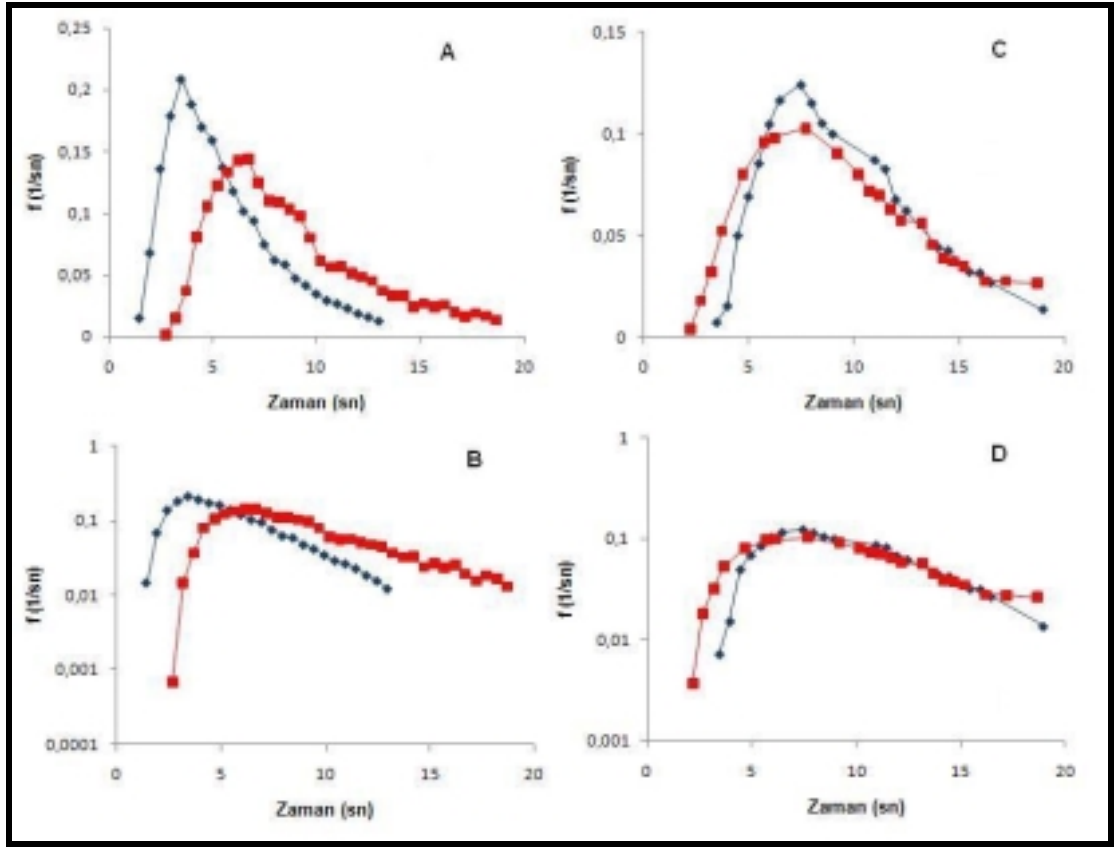
Perfüzyon deneyle Bölüm 3.10.2.2'de belirtildiği şekilde vasküler hacmin tayini için RBC (%50 h/h), ekstraselüler hacmin tayini için EB:BSA (5:50 mg/mL) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu referans maddelerin kontrol ve sirozlu hayvanlara uygulamasıyla elde edilen bulgular Tablo 4.17'de, dağılım profilleri ise Şekil 4.24 ve 4.29'da verilmiştir.



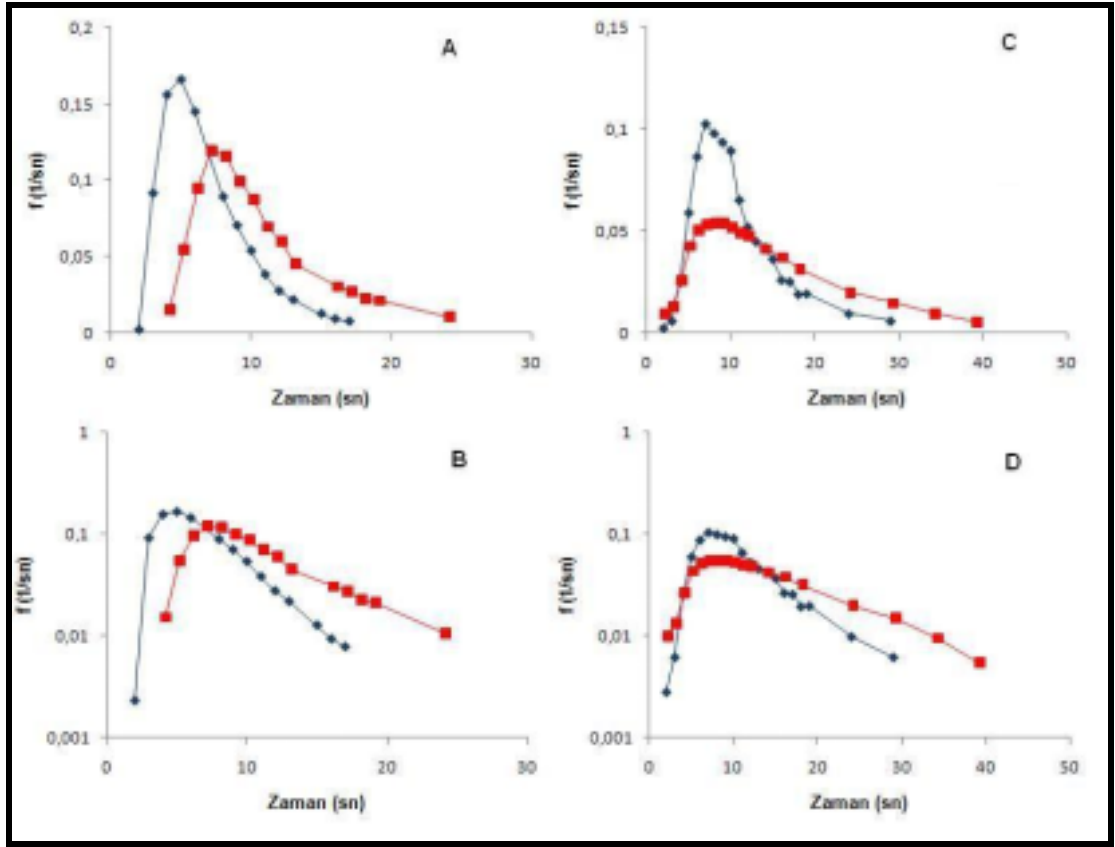
Şekil 4.24. RBC (kırmızı) ve EB (mavi)'nin kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve siroz (C: Lineer, D: Semilogaritmik) geliştirilmiş sıçanların portal venine bolus dozda uygulanmasıyla elde edilen dilüsyon profilleri.



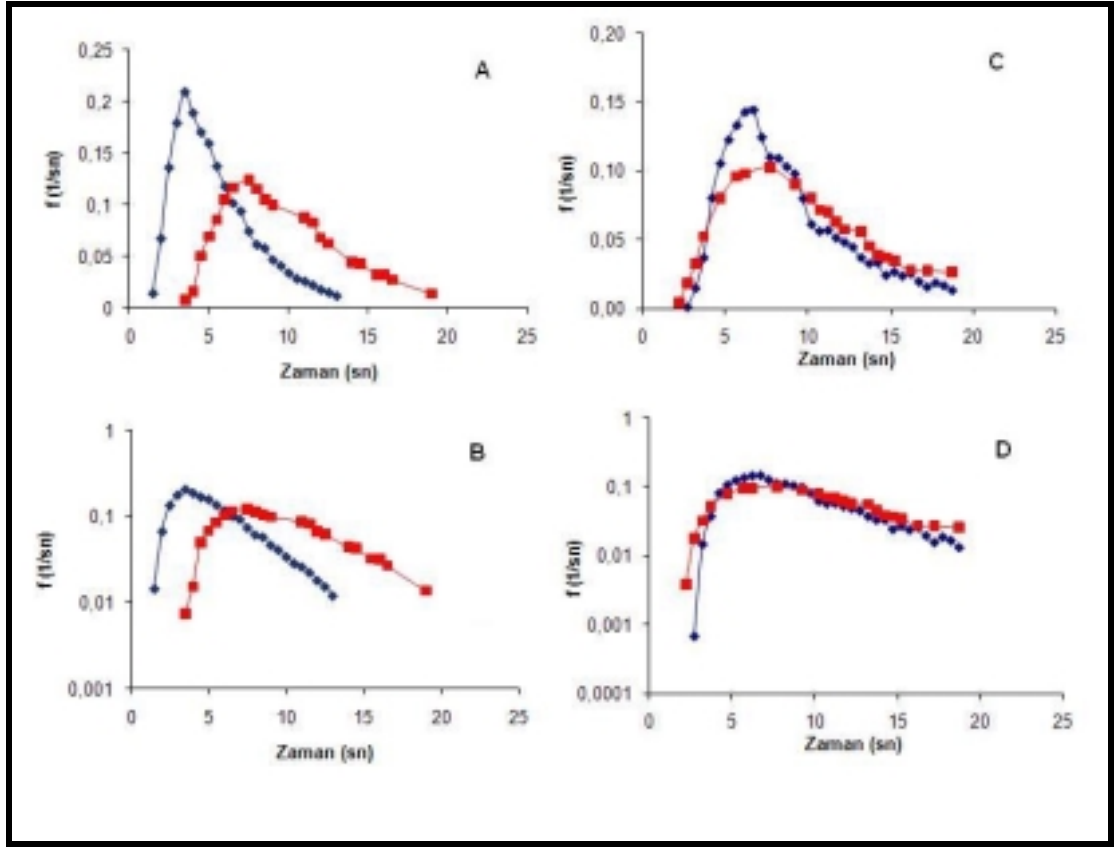
Şekil 4.25. RBC (kırmızı) ve EB (mavi)'nin kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve siroz (C: Lineer, D: Semilogaritmik) geliştirilmiş sıçanların hepatik arterine bolus dozda uygulanmasıyla elde edilen dilüsyon profilleri.



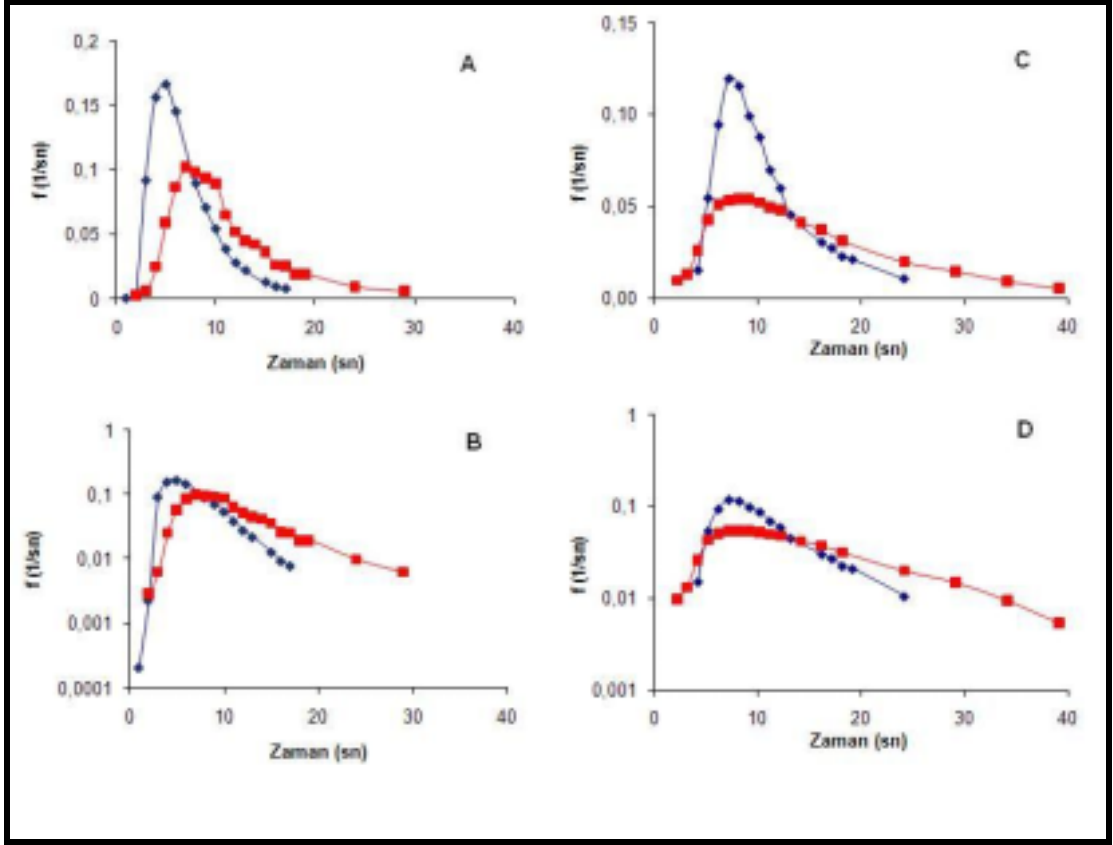
Şekil 4.26. RBC'nin kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) karaciğerlerin portal ven (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve hepatik arter (C: Lineer, D: Semilogaritmik)'ine bolus dozda uygulanmasıyla elde edilen dilüsyon profilleri.



Şekil 4.27. EB'nin kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) karaciğerlerin portal ven (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve hepatik arter (C: Lineer, D: Semilogaritmik)'ine bolus dozda uygulanmasıyla elde edilen dilüsyon profilleri.



Şekil 4.28. RBC'nin bolus dozda portal ven (mavi) ve hepatik arter (kırmızı)'e uygulanmasıyla kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer, D: Semilogaritmik) gruplardan elde edilen dilüsyon profilleri.



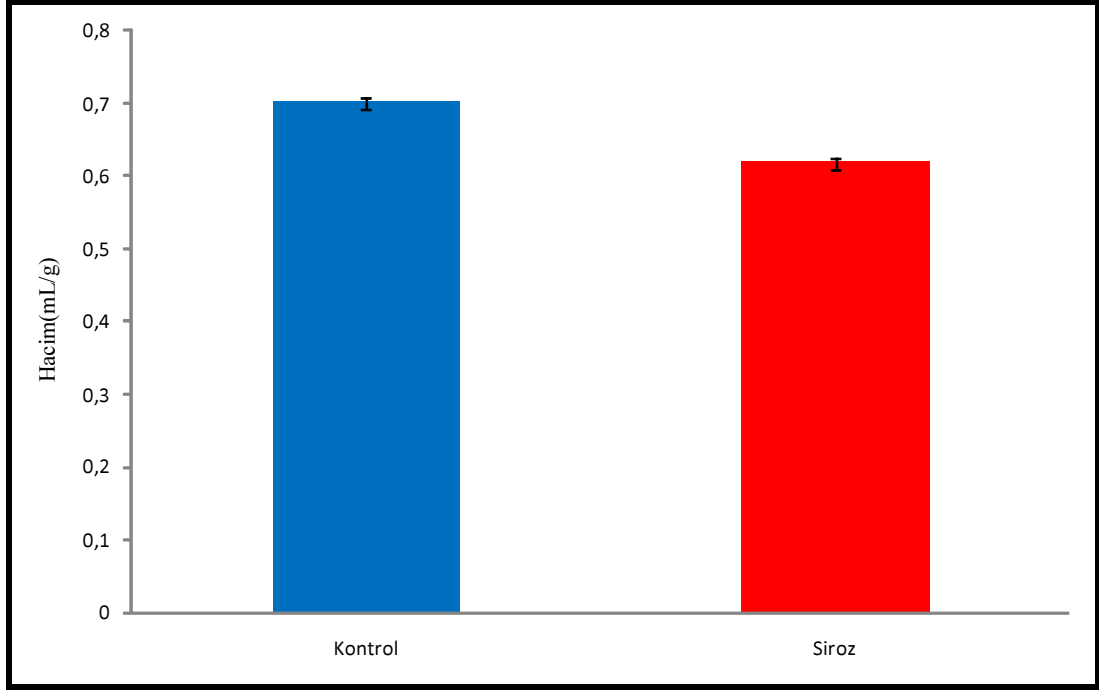
Şekil 4.29. EB'nin bolus dozda portal ven (mavi) ve hepatic arter (kırmızı)'e uygulanmasıyla kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer, D: Semilogaritmik) gruplardan elde edilen dilüsyon profilleri.

Tablo 4.17. RBC ve EB'nin portal ven (PV) ve hepatic artere (HA) bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen farmakokinetik parametreler (Ort \pm SS). Perfüzyon deneyleri sabit akış hızında (PV:12 mL/dk, HA:3 mL/dk) gerçekleştirilmiştir.

Referans	Farmakokinetik Parametreler	PV		HA	
		Kontrol (n=7)	Siroz (n=6)	Kontrol (n=7)	Siroz (n=6)
RBC	T_{maks} (sn)	4.300 \pm 0.947	4.690 \pm 1.423	6.524 \pm 1.599	7.440 \pm 1.728
	f_{maks} (1/sn)	0.171 \pm 0.039	0.167 \pm 0.034	0.131 \pm 0.008	0.117 \pm 0.027
	MTT (sn)	6.597 \pm 1.625	7.566 \pm 1.844	9.789 \pm 1.074	10.956 \pm 2.261
	V (mL/g)	0.172 \pm 0.036 ¹	0.170 \pm 0.060	0.257 \pm 0.039 ¹	0.247 \pm 0.079
EB	T_{maks} (sn)	5.863 \pm 1.270	4.520 \pm 1.872	7.239 \pm 2.597	8.523 \pm 2.323
	f_{maks} (1/sn)	0.168 \pm 0.037	0.242 \pm 0.161	0.117 \pm 0.033	0.082 \pm 0.028
	MTT (sn)	8.223 \pm 1.368	7.186 \pm 2.982	15.115 \pm 5.238	17.307 \pm 5.563
	V (mL/g)	0.215 \pm 0.041 ^{2,4}	0.156 \pm 0.055 ^{3,4}	0.402 \pm 0.157 ²	0.380 \pm 0.117 ³

¹p=0.009, ²p=0.007, ³p=0.01, ⁴p=0.047

Kontrol ve siroz gruplarının total su hacmi liyofilizasyon yöntemi ile tayin edildiğinde bu değer kontrol grubu için 0.70 ± 0.01 mL/g, siroz grubu için 0.62 ± 0.03 mL/g olarak bulunmuştur (Şekil 4.30).



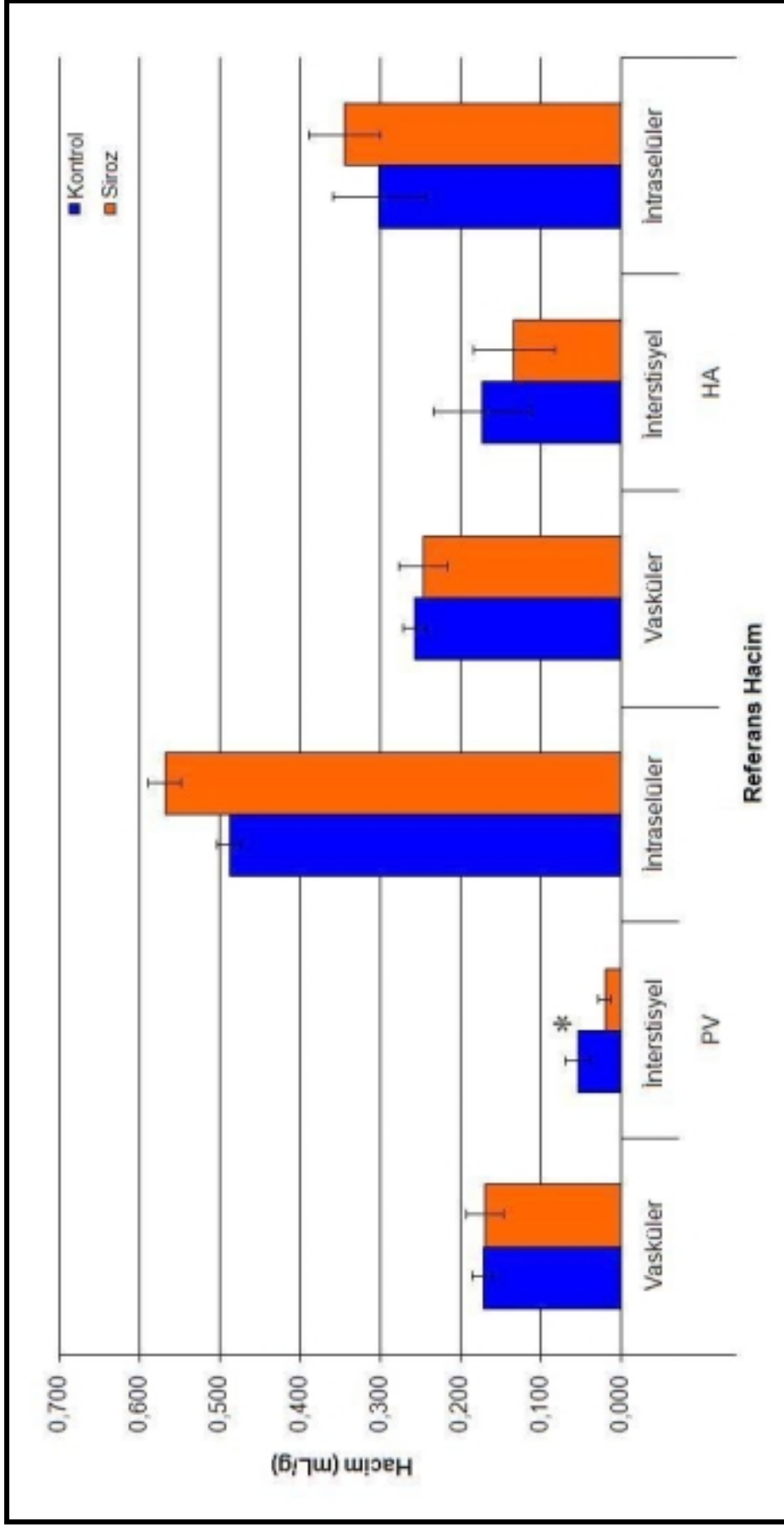
Şekil 4.30. Kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) gruplara ait total hacim grafiği.

Karaciğerin vasküler, intersitisyel ve intraselüler dağılıma hacimleri kontrol ve sirozlu gruplarda hepatik arter ve portal ven için ayrı ayrı hesaplanarak ortalama değerler 4.18'de ve Şekil 4.31'da verilmiştir.

Tablo 4.18. Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda veriliş yolunun fonksiyonu olarak intravasküler, intersitisyel ve intraselüler dağılma hacimleri (Ort \pm SS).

Referans hacim (mL/g)	PV		HA	
	Kontrol (n=7)	Siroz (n=6)	Kontrol (n=7)	Siroz (n=6)
Vasküler	0.172 \pm 0.036	0.170 \pm 0.060	0.257 \pm 0.039	0.247 \pm 0.079
İnterstisyel	0.054 \pm 0.040 ¹	0.020 \pm 0.021 ¹	0.174 \pm 0.150	0.133 \pm 0.125
İntraselüler	0.488 \pm 0.040	0.487 \pm 0.055	0.301 \pm 0.154	0.344 \pm 0.108

¹p= 0.012

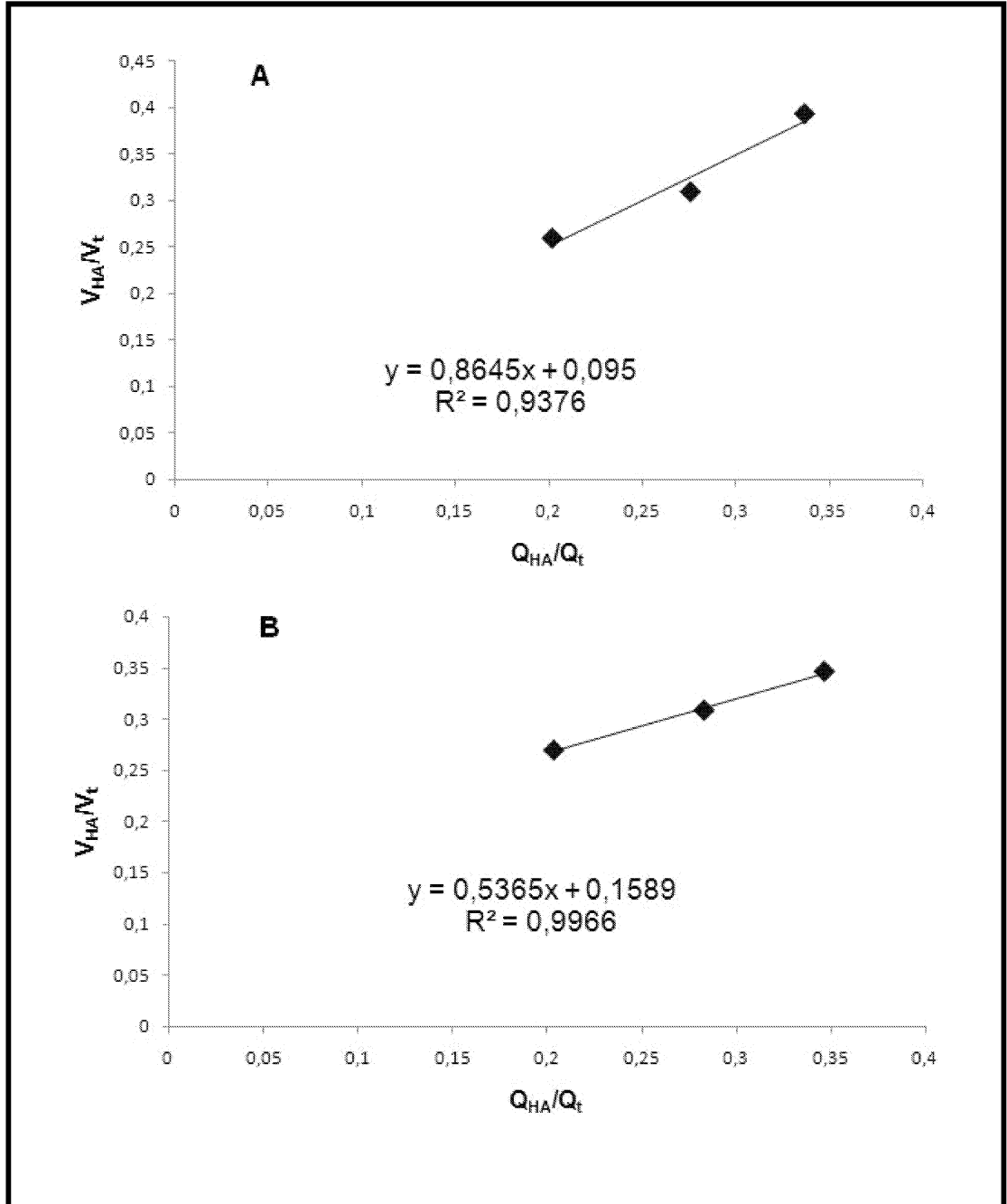


Şekil 4.31 Kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlarda veriliş yolunun fonksiyonu olarak intravasküler, interstitiyel ve intraselüler dağılım hacimleri. *p=0.012

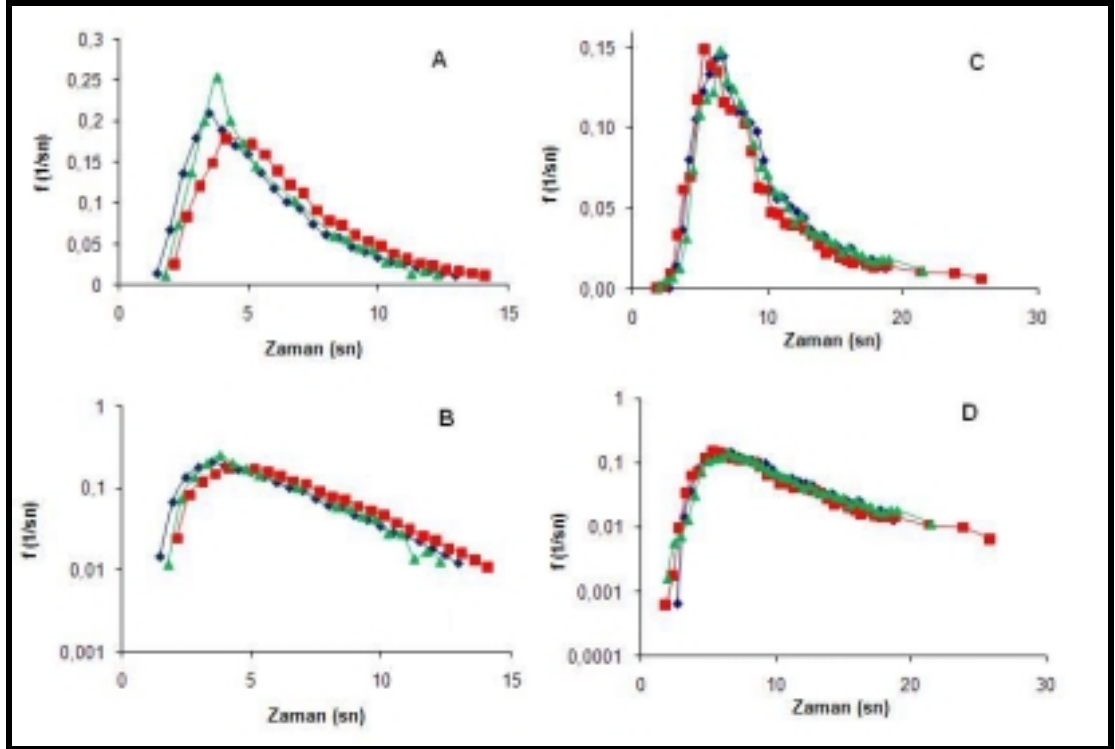
4.4.1.2.2. Hepatik Artere Özgü Spesifik Alanın Tayini

Kontrol ve sirozlu sıçanlarda hepatik artere özgü spesifik alanın tayini amacıyla yapılan çalışmalar akış hızının fonksiyonu olarak portal ven ve hepatik artere bolus dozda RBC enjeksiyonu yapılarak gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.10.2.2). Hepatik arter tarafından perfüze edilen karaciğer fraksiyonu Eşitlik 3.14 kullanılarak hesaplanmış ve bu alanın kontrol grubunda %9.5 sirozlu sıçanlarda ise %16 olduğu bulunmuştur (Şekil 4.32).

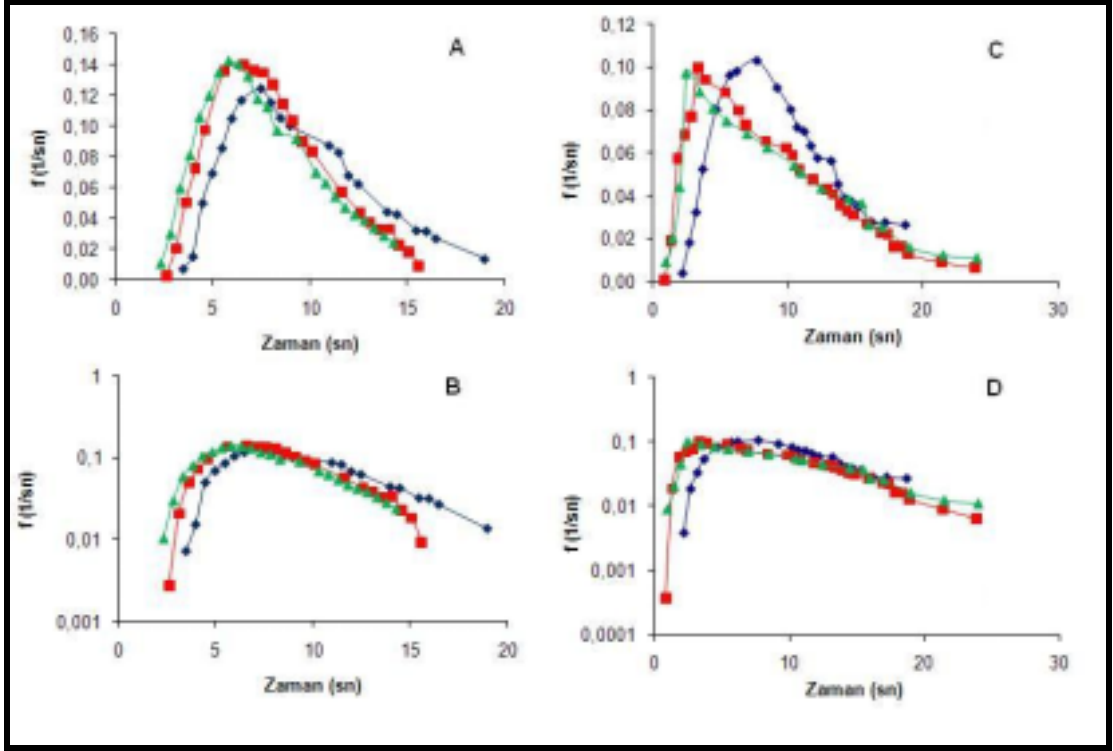
Akış hızının fonksiyonu olarak elde edilen bulgular Tablo 4.19 ve Şekil 4.33-4.34'de verilmiştir.



Şekil 4.32. Kontrol (A) ve sirozlu (B) gruplarda hepatik artere özgü spesifik alanın tayini için yapılan regresyon analizi.



Şekil 4.33. Kontrol (A: Lineer; B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer; D; Semilogaritmik) grupların PV'ne bolus dozda enjekte edilen RBC'nin dilüsyon profilleri üzerine akış hızlarının (Mavi: 15 mL/dk; Kırmızı; 16.5 mL/dk; Yeşil: 18 mL/dk) etkisi.



Şekil 4.34. Kontrol (A: Lineer; B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer; D; Semilogaritmik) grupların HA'ne bolus dozda enjekte edilen RBC'nin dilüsyon profilleri üzerine akış hızlarının (Mavi: 15 mL/dk; Kırmızı; 16.5 mL/dk; Yeşil: 18 mL/dk) etkisi.

Tablo 4.19. Eritrositler için farklı akış hızlarında elde edilen farmakokinetik parametreler (Ort ± SS).

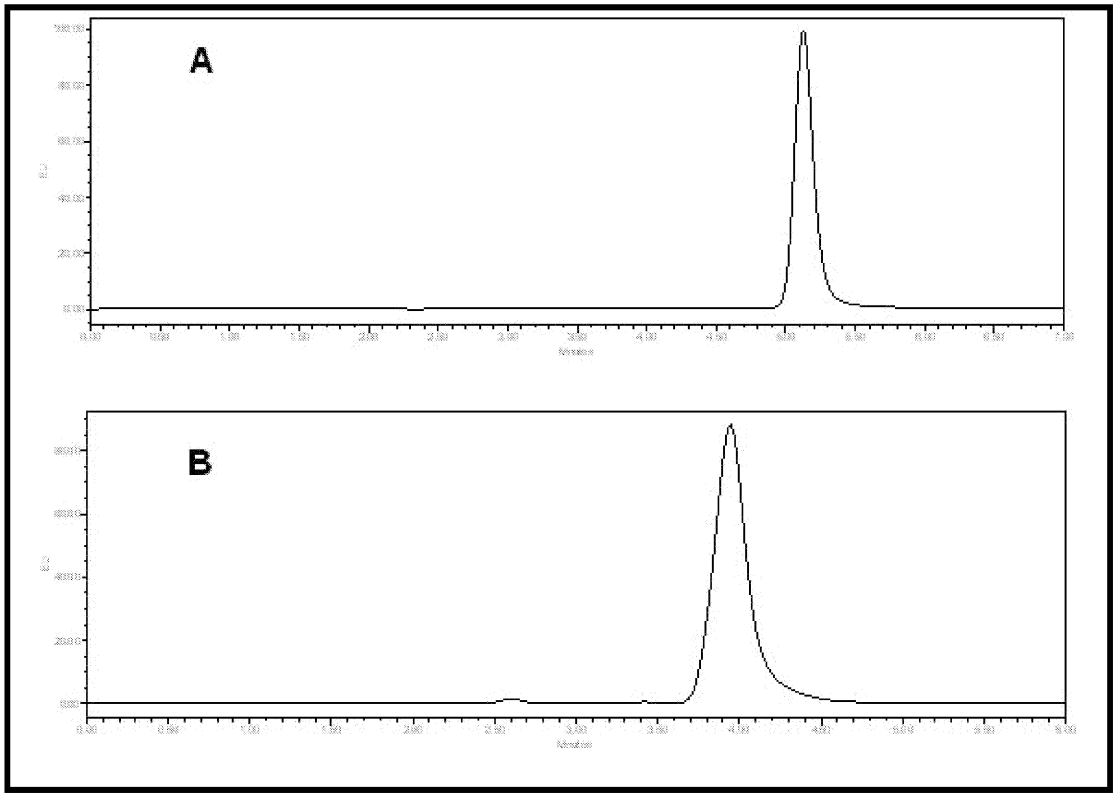
Akış Hızları PV:HA (mL/dk)	Farmakokinetik Parametreler	PV		HA	
		Kontrol (n=7)	Siroz (n=6)	Kontrol (n=7)	Siroz (n=6)
12:3	Tmaks (sn)	4.30 ± 0.947	4.690 ± 1.423	6.524 ± 1.599	7.440 ± 1.728
	fmaks (1/sn)	0.171 ± 0.039	0.167 ± 0.034	0.131 ± 0.008	0.117 ± 0.027
	MTT (sn)	6.597 ± 1.625	7.566 ± 1.844	9.789 ± 1.074	10.956 ± 2.261
	V (mL/g)	0.172 ± 0.036 ¹	0.170 ± 0.060	0.257 ± 0.039 ¹	0.247 ± 0.079
12:4.5	Tmaks (sn)	4.403 ± 0.498	5.540 ± 1.773	5.534 ± 0.874	6.123 ± 1.876
	fmaks (1/sn)	0.184 ± 0.029	0.151 ± 0.026	0.152 ± 0.018	0.120 ± 0.030
	MTT (sn)	6.415 ± 1.342	8.875 ± 0.386	7.791 ± 1.113	10.434 ± 3.029
	V (mL/g)	0.184 ± 0.037	0.217 ± 0.082	0.224 ± 0.034	0.253 ± 0.087
12:6	Tmaks (sn)	4.274 ± 0.822	6.608 ± 1.198	5.213 ± 0.704	5.725 ± 2.229
	fmaks (1/sn)	0.189 ± 0.042	0.155 ± 0.033	0.149 ± 0.042	0.133 ± 0.032
	MTT (sn)	6.224 ± 0.812	8.955 ± 1.980	8.268 ± 2.135	9.485 ± 2.363
	V (mL/g)	0.196 ± 0.030	0.235 ± 0.066	0.259 ± 0.064	0.250 ± 0.084

¹p=0.005

4.4.2. Etkin Maddelerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

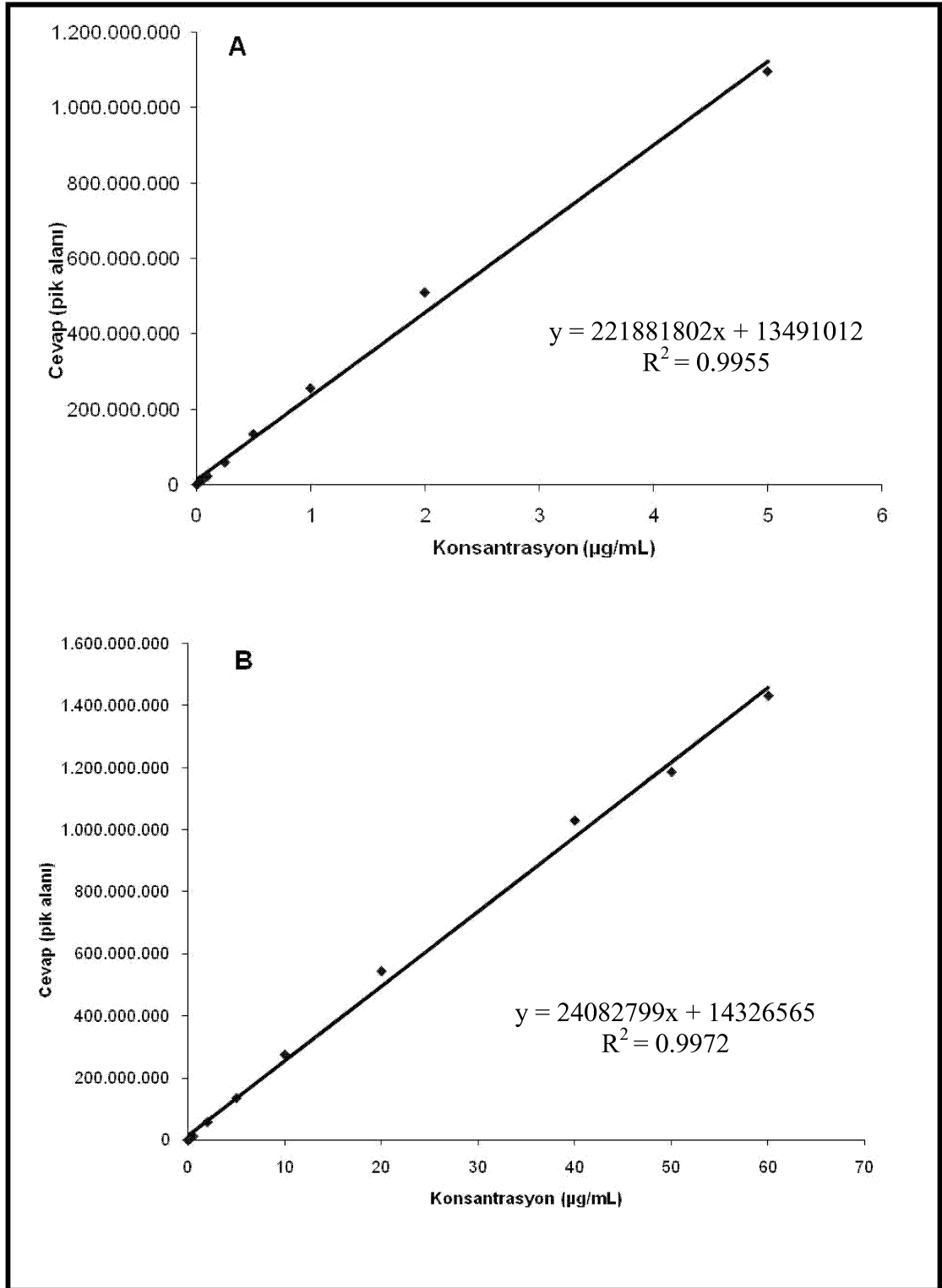
4.4.2.1. Etkin Maddelerle Yapılan Karaciğer Perfüzyonu Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemler

Naproksen sodyum ve furosemidin Bölüm 3.10.3.3’de belirtilen HPLC sistemlerine enjekte edilmesiyle elde edilen kromatogramlar Şekil 4.35’de verilmiştir. Alınma zamanı naproksen sodyum için 5.2 dk, furosemid için 3.9 dk olarak bulunmuştur.



Şekil 4.35. Naproksen sodyum (A) ve furosemid (B) için elde edilen HPLC kromatogramları.

Bölüm 3.10.3.3’de verilen HPLC yöntemlerine göre hazırlanan, naproksen sodyum ve furosemidin karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan kalibrasyon doğruları ve denklemleri Şekil 4.36’da verilmiştir.

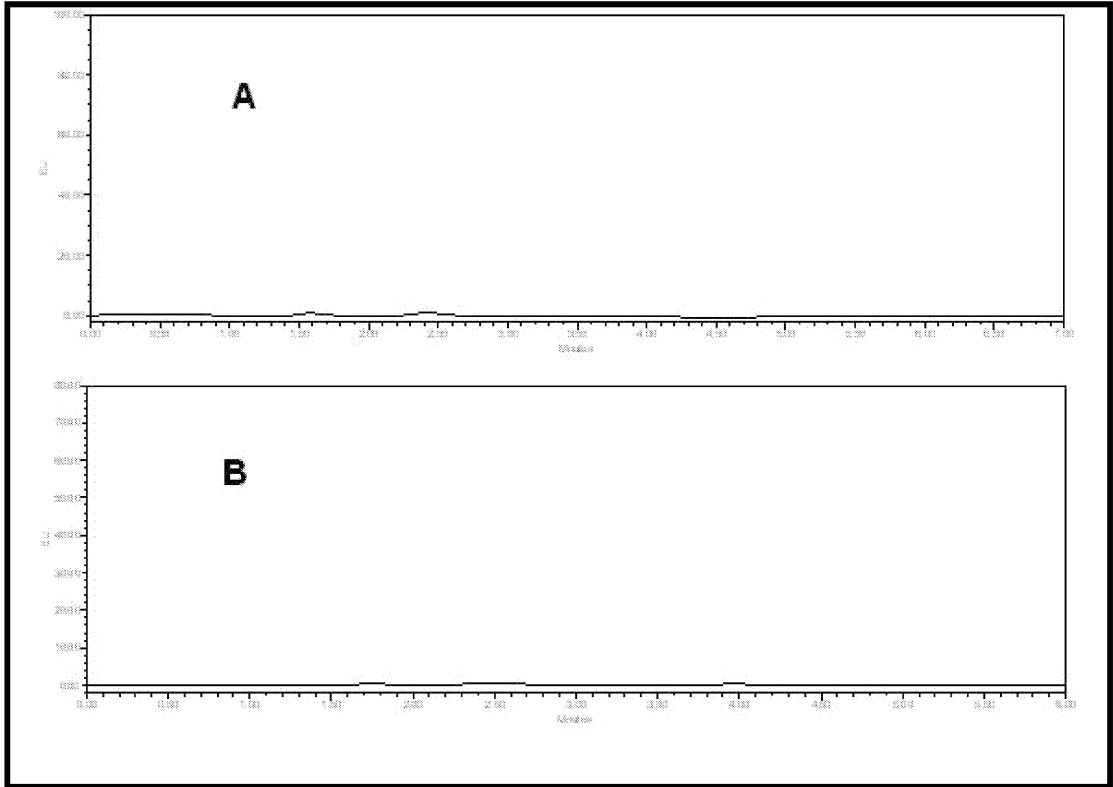


Şekil 4.36. Naproksen sodyum (A) (Güven aralığı (%95) eğim: 222359276 - 221404329, keşişim: 14176755 - 12805269) ve furosemidin (B) (Güven aralığı (%95) eğim: 24211051 - 23954549, keşişim: 15399451 - 13253681). karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan kalibrasyon doğruları ve denklemleri.

4.4.2.2. Etkin Maddelerle Yapılan Karaciğer Perfüzyonu Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemlerin Validasyonu

4.4.2.2.1. Özgünlük

Etkin maddelerin enjeksiyonundan önce toplanan boş perfüzet Bölüm 3.10.3.3'de verilen HPLC sistemlerine enjekte edildiğinde naproksen sodyum ve furosemidin ve alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Karaciğer perfüzyonu deneylerinde toplanan ve etkin madde içermeyen (A: Naproksen sodyum, B: Furosemid) boş perfüzetin HPLC kromatogramı.

4.4.2.2.2. Doğrusallık

Naproksen sodyum ve furosemidin karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan miktar tayini yöntemlerinin doğrusallığını incelemek amacıyla hazırlanan standart çözeltiler Bölüm 3.10.3.3'de belirtilen HPLC sistemine enjekte edilmiş ve

pik alanları hesaplanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. Regresyon analizi yapılarak her iki etkin madde için konsantrasyon ve pik alanları arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu gösterilmiştir ($R^2 > 0.995$; Şekil 4.36)

4.4.2.2.3.Kesinlik

Naproksen sodyum ve furosemidin karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan miktar tayini yöntemlerinin gün içi ve günler arası kesinliği Bölüm 3.11.3'de belirtildiği şekilde yapılmış ve elde edilen bulgular Tablo 4.20 ve Tablo 4.21'de gösterilmiştir. Çalışılan tüm konsantrasyonlara ait varyasyon katsayısı değerleri % 15'ten küçük bulunmuştur.

Tablo 4.20. Naproksen sodyumun karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan miktar tayini yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Naproksen Sodyum ($\mu\text{g/mL}$)	
	Gün İçi	Günler Arası
0.01	0.0102	0.0111
	0.0103	0.0109
	0.0107	0.0115
	0.0107	0.0113
	0.0111	0.0112
	0.0108	0.0116
Ort \pm SS	0.0106 \pm 0.0001	0.0113 \pm 0.0001
VK (%)	3.12	2.17
0.5	0.5102	0.5270
	0.5158	0.5270
	0.5325	0.5406
	0.5332	0.5235
	0.5320	0.5130
	0.5383	0.5166
Ort \pm SS	0.5270 \pm 0.0046	0.5246 \pm 0.0039
VK (%)	2.12	1.83
2.0	2.0105	2.0015
	2.0168	2.0170
	2.0168	2.0168
	2.0211	2.0195
	2.0093	2.0244
	2.0049	2.0174
Ort \pm SS	2.0132 \pm 0.0025	2.0161 \pm 0.0032
VK (%)	0.30	0.38

Tablo 4.21. Furosemidin karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan miktar tayini yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik bulguları.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Furosemid ($\mu\text{g/mL}$)	
	Gün İçi	Günler Arası
2.0	2.0761	2.0406
	1.9894	1.9640
	2.0230	2.0308
	2.0355	2.0450
	2.0224	2.0508
	2.1565	2.0056
Ort \pm SS	2.0505 \pm 0.0241	2.0228 \pm 0.0134
VK (%)	2.88	1.63
10.0	10.3553	10.2764
	10.5561	10.5904
	10.5062	10.5001
	10.5064	10.4647
	10.3296	10.5912
	10.4533	10.4753
Ort \pm SS	10.4512 \pm 0.0370	10.4830 \pm 0.0471
VK (%)	0.87	1.10
40.0	39.8623	39.2400
	40.5892	39.7198
	40.6210	39.3709
	39.1548	38.5435
	38.7733	38.8388
	37.9802	40.0479
Ort \pm SS	39.4968 \pm 0.4294	39.2935 \pm 0.2258
VK (%)	2.66	1.41

4.4.2.2.4. Doğruluk

Naproksen sodyum ve furosemidin karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan miktar tayini yöntemlerinin doğruluğunu göstermek amacıyla yapılan deneylerden elde edilen bulgular Tablo 4.22’de verilmiştir. Ortalama bağıl hata (% OBH) değerleri hem naproksen sodyum hemde furosemid için % 15’den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.22. Naproksen sodyum ve furosemidin karaciğer perfüzyonu deneylerinde kullanılan miktar tayini yöntemlerinin gün içi ve günler arası doğruluk bulguları (Ort \pm SS; n=6).

Konsantrasyon (μ g/mL)	Naproksen Sodyum	
	Gün İçi (% OBH)	Günler Arası (% OBH)
0.01	-6.42 \pm 0.001	-12.78 \pm 0.001
0.5	-5.40 \pm 0.005	-4.92 \pm 0.004
2.0	-0.27 \pm 0.003	-0.32 \pm 0.003
Furosemid		
2.0	-2.53 \pm 0.024	-1.14 \pm 0.013
10.0	-4.51 \pm 0.037	-4.83 \pm 0.047
40.0	1.25 \pm 0.429	1.76 \pm 0.226

4.4.2.2.5. Duyarlılık

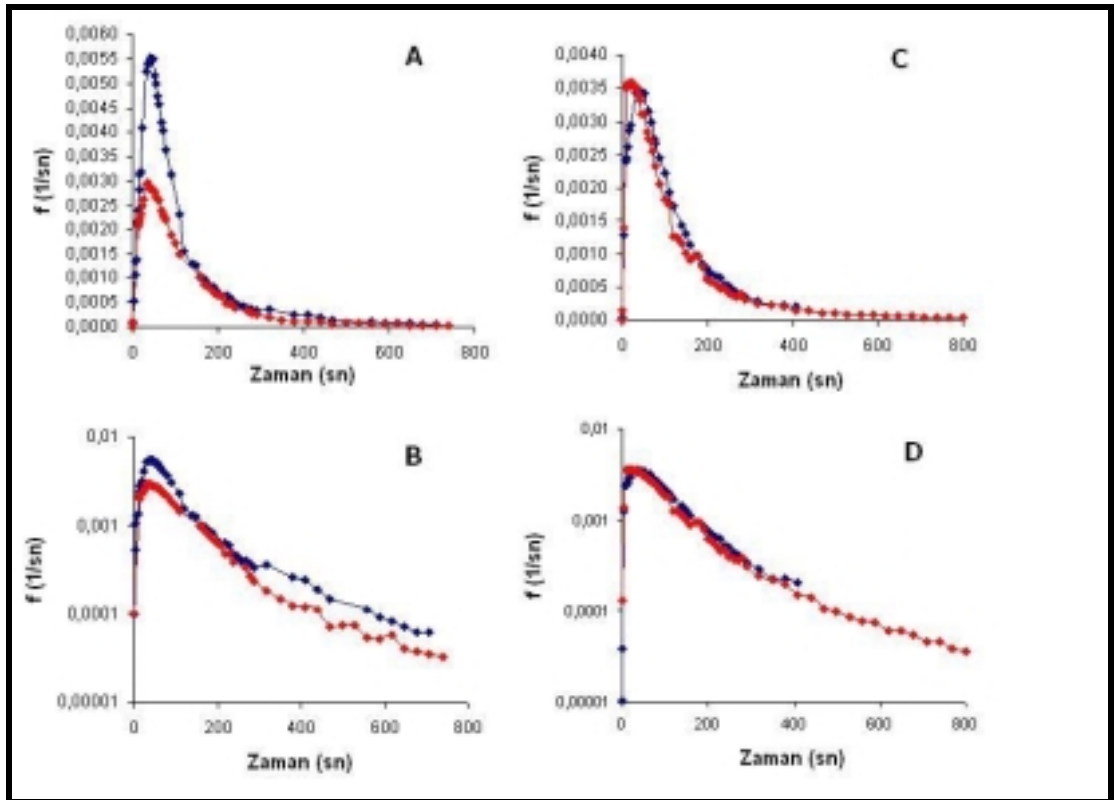
Furosemid (1 mg/mL) ve naproksen sodyum (1 mg/mL)’un stok çözeltilerinden hareketle mobil fazla seyreltilerek hazırlanan, standart çözeltiler Bölüm 3.10.3.3’de belirtilen HPLC yöntemlerine uygulanak sinyal gürültü (S/G) oranları tayin edilmiştir. S/G oranı 3 den büyük olan en küçük konsantrasyon (LOD)

furosemid için 1 ng/mL, naproksen sodyum için 0.5 ng/mL olarak tespit edilmiştir. S/G oranı 10 dan büyük olan en küçük konsantrasyon (LOQ) ise furosemid için 3 ng/mL, naproksen sodyum için 1 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

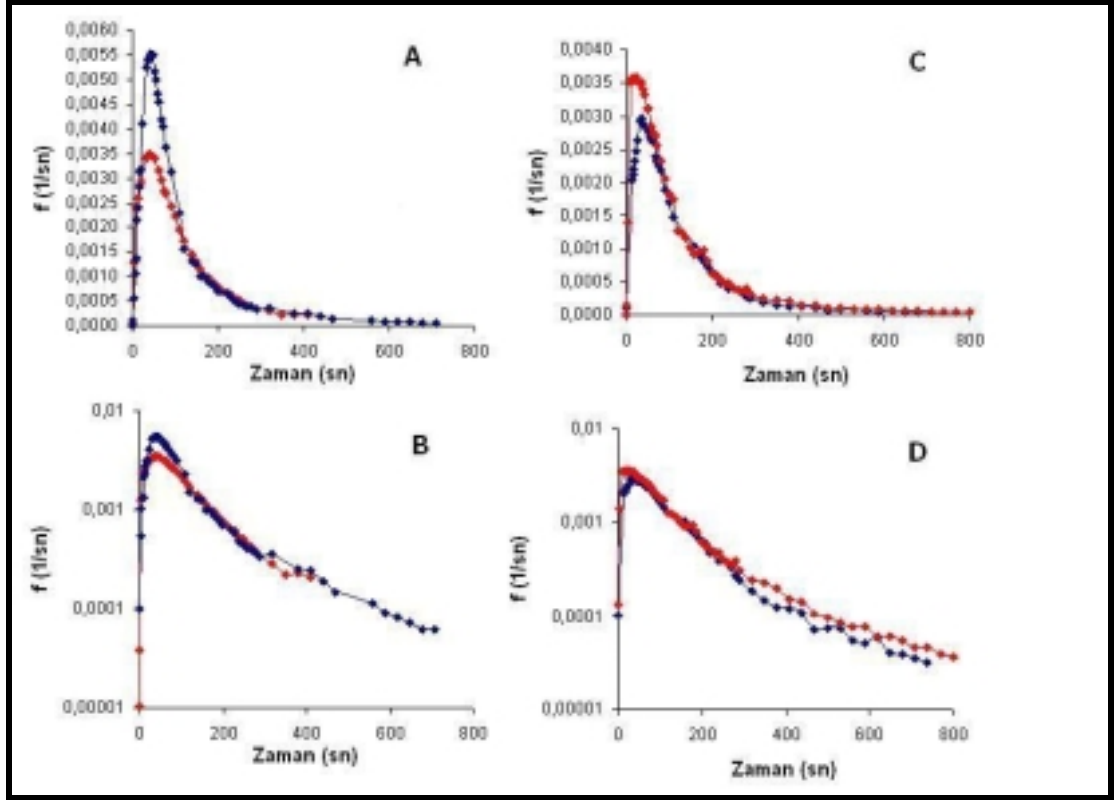
4.4.2.3. Etkin Maddelerle Yapılan Perfüzyon Deneyleri

4.4.2.3.1. Naproksen Sodyum

Naproksen sodyumun kontrol ve sirozlu sıçanlardaki dağılımı ve eliminasyonu verilmiş yolunun fonksiyonu olarak Bölüm 3.10.3.2’de belirtildiği şekilde incelenerek elde edilen dilüsyon profilleri Şekil 4.38 - 4.39’da farmakokinetik parametreleri ise Tablo 4.23’de verilmiştir.



Şekil 4.38. Naproksen sodyumun kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer, D: Semilogaritmik) sıçanların portal ven (mavi) ve hepatic arter (kırmızı)’ine bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen dilüsyon profilleri.



Şekil 4.39. Naproksen sodyumun kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) karaciğerlerin portal ven (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve hepatic arterine (C: Lineer, D: Semilogaritmik) bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen dilüsyon profilleri.

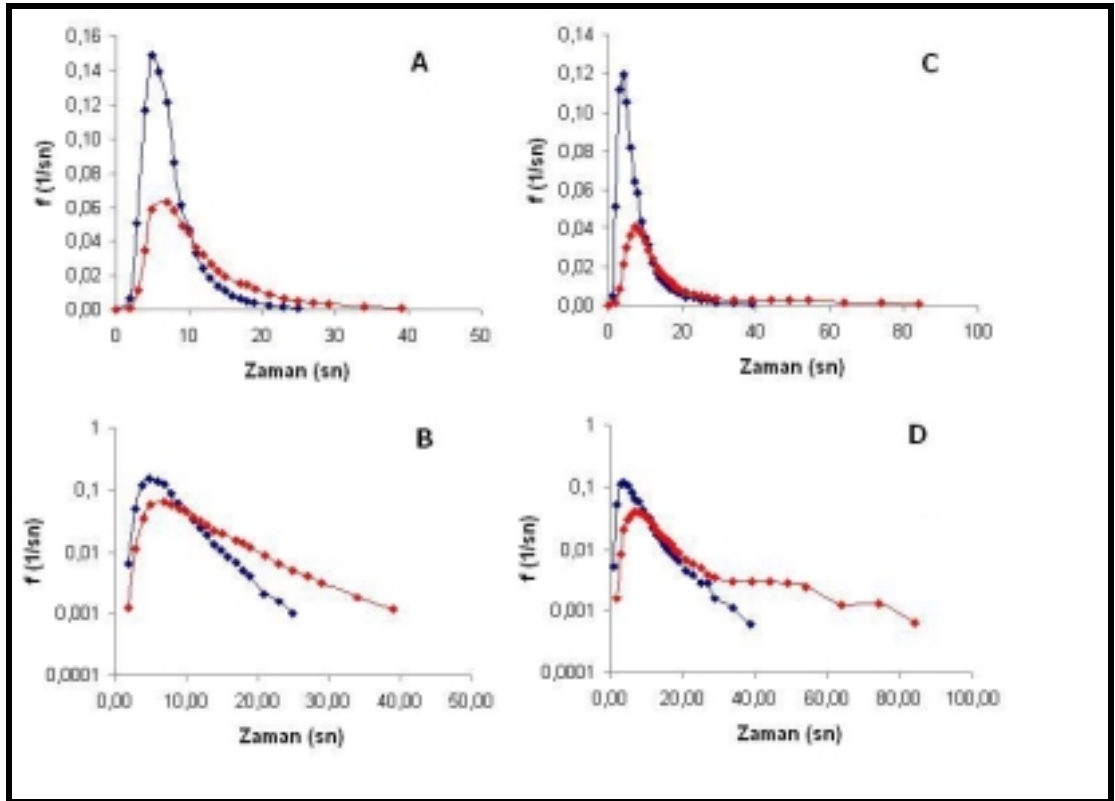
Tablo 4.23. Kontrol ve sirozlu gruplarda naproksen sodyumun, portal ven ve hepatic artere bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen farmakokinetik parametreleri (Ort \pm SS, n= 7).

	Kontrol		Siroz	
	PV	HA	PV	HA
MTT (sn)	150.807 \pm 47.792 ²	217.086 \pm 57.958 ²	122.690 \pm 66.492 ¹	183.248 \pm 57.781 ¹
F	0.666 \pm 0.217	0.546 \pm 0.263	0.780 \pm 0.254	0.684 \pm 0.185
E	0.334 \pm 0.217	0.454 \pm 0.263	0.220 \pm 0.254	0.316 \pm 0.185
CL (mL/sn)	0.082 \pm 0.054	0.101 \pm 0.071	0.055 \pm 0.062	0.078 \pm 0.045
f_{maks} (1/sn)	0.007 \pm 0.007 ³	0.003 \pm 0.002 ³	0.011 \pm 0.014	0.005 \pm 0.002
T_{maks} (sn)	53.701 \pm 46.422	55.373 \pm 24.610	38.931 \pm 23.044	43.351 \pm 29.302

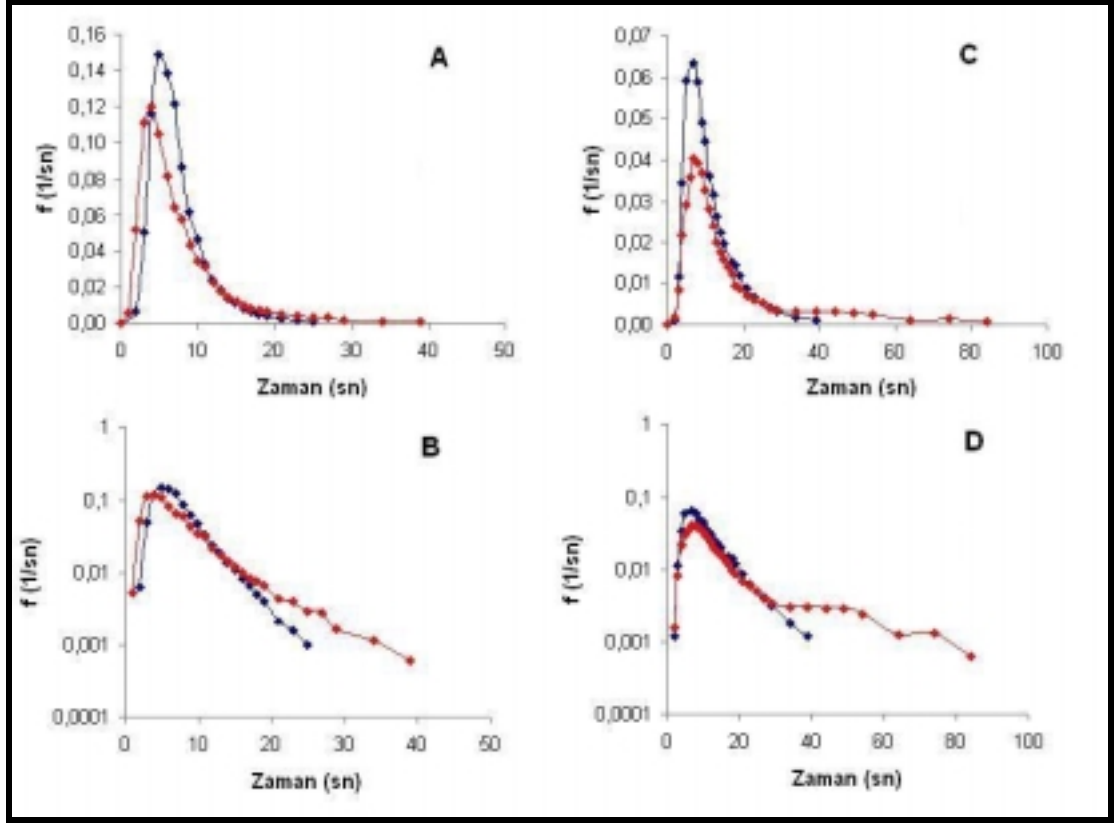
¹p=0.039, ²p=0.028, ³p=0.002

4.4.2.3.2. Furosemid

Furosemidin kontrol ve sirozlu sıçanlardaki dağılımı ve eliminasyonu verilmiş yolunun fonksiyonu olarak Bölüm 3.10.3.2’de belirtildiği şekilde incelenerek elde edilen dilüsyon profilleri Şekil 4.40-4.41’de farmakokinetik parametreleri ise Tablo 4.24’de verilmiştir.



Şekil 4.40. Furosemidin kontrol (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve sirozlu (C: Lineer, S: Semilogaritmik) sıçanların portal ven (mavi) ve hepatic arterine (kırmızı) bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen dilüsyon profilleri.



Şekil 4.41. Furosemidin kontrol (mavi) ve sirozlu (kırmızı) karaciğerlerin portal ven (A: Lineer, B: Semilogaritmik) ve hepatic arterine (C: Lineer, S: Semilogaritmik) bolus dozda enjeksiyonuyla elde edilen dilüsyon profilleri.

Tablo 4.24. Kontrol ve sirozlu gruplarda furosemidin bolus dozda portal ven ve hepatic artere enjeksiyonuyla elde edilen farmakokinetik parametreler (Ort \pm SS, n=7).

	Kontrol		Siroz	
	PV	HA	PV	HA
MTT (sn)	13.023 \pm 5.462	16.735 \pm 4.172	10.881 \pm 4.824	17.196 \pm 3.368
F	0.800 \pm 0.175 ¹	0.649 \pm 0.092 ¹	0.681 \pm 0.126	0.503 \pm 0.123
E	0.200 \pm 0.175 ¹	0.351 \pm 0.092 ¹	0.319 \pm 0.126	0.497 \pm 0.123
CL (mL/sn)	0.050 \pm 0.044	0.088 \pm 0.023	0.078 \pm 0.031	0.121 \pm 0.029
f_{maks} (1/sn)	0.095 \pm 0.053 ²	0.050 \pm 0.014 ²	0.086 \pm 0.036 ³	0.036 \pm 0.014 ³
T_{maks} (sn)	9.664 \pm 5.189	10.970 \pm 4.957	5.066 \pm 1.772	9.490 \pm 4.446

¹ p=0.032, ² p=0.034, ³ p=0.020

5. TARTIŞMA

5. 1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

5.1. 1. Analitik Yöntem ve Validasyonu

Analizi yapılacak olan bir maddenin biyolojik bir matriks içinde veya sentetik bir çözücü içinde bulunmasına bağlı olarak kullanılan analiz yöntemi; biyoanalitik veya analitik yöntemi olarak sınıflandırılır ve elde edilen bulgular bu sınıflandırmaya göre değerlendirilir. Biyoanalitik yöntem FDA tarafından (177) kan, serum, idrar gibi biyolojik bir matriks içinde çözülmüş analitin miktar tayini olarak tanımlanmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan etkin maddelerin (naproksen sodyum ve furosemid) miktar tayini amacıyla üç farklı HPLC yöntemi geliştirilmiştir (Tablo 5.1). Bunlardan etkin maddelerin çözünürlüklerinin tayini amacıyla yapılan deneyler sentetik olarak hazırlanan tampon çözeltiler (pH 1-7.5) kullanılarak gerçekleştirildiği için geliştirilen HPLC yönteminin uygunluğunun değerlendirilmesinde analitik yöntem validasyonu kriterleri (varyasyon katsayısının %2'den küçük olması) esas alınmıştır. Özgünlük, kesinlik (gün içi ve günler arası kesinlik), doğrusalık, doğruluk gibi validasyon çalışmalarından elde edilen bulgular bu yöntemin güvenle kullanılabileceğini göstermiştir. Barsak ve karaciğer perfüzyonu çalışmalarından elde edilen örnekler ise biyolojik bileşenler içeren bir matriks içerisinden tayin edildiği için validasyon bulguları biyoanalitik yöntem kabul kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir (varyasyon katsayısının %15'den küçük olması). Bu çalışmalardan elde edilen örneklerdeki etkin (naproksen sodyum, furosemid) ve referans (barsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan antipirin) maddelerin miktarlarının tayini amacıyla kullanılan yöntemlerin uygunluğu, özgünlük, kesinlik (gün içi ve günler arası kesinlik), doğrusalık, doğruluk ve duyarlılık (LOD ve LOQ) çalışmalarından elde edilen bulgularla gösterilmiştir (176-181).

Karaciğer dağılma hacimleri ve hepatik artere özgü spesifik alanın tayini amacıyla kullanılan referans maddeler (RBC ve Evans mavisi) karaciğerde metabolize olmadıkları için miktar tayinlerinde kolay uygulanabilir bir yöntem olan UV spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır (Tablo 5.1). Her bir referans indikatörün

enjeksiyonunu takiben toplanan perfüzyon örnekleri distile suda seyreltilerek analiz edildikleri için yöntemin uygunluğunun değerlendirilmesine analitik yöntem validasyonu kriterleri esas alınmıştır. Validasyon bulguları spektrofotometrik yöntemlerin güvenle kullanabileceğini göstermiştir.

Tablo 5.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan analitik yöntemler.

Deney Grubu		Çalışılacak Materyal	Yöntem	Dedeksiyon	Matriks
Çözünürlük Sınıfı Tayini		Furosemid	HPLC	UV	Sentetik
		Naproksen Sodyum	HPLC	UV	Sentetik
Barsak Perfüzyonu		Antipirin	HPLC	UV	Biyolojik
		Naproksen Sodyum			
		Furosemid			
Karaciğer Perfüzyonu	Referans Maddeler	EB	Spektrofotometre	UV	Biyolojik
		RBC	Spektrofotometre	UV	Biyolojik
	Etkin Maddeler	Naproksen Sodyum	HPLC	Floresans	Biyolojik
		Furosemid	HPLC	Floresans	Biyolojik

5.1.2. Deneysel Siroz Geliştirilmesi

Deneysel siroz geliştirmek amacıyla safra kanalı blokajı ve hepatotoksin (karbontetraklorür, tiyoasetamid, etiyonin, dimetilnitrozamid gibi) uygulanması sıklıkla kullanılmaktadır . Bu çalışmada cerrahi bir uygulama gerektirmesi nedeniyle safra kanalı blokajı yöntemi tercih edilmemiştir (99-102,117). Ayrıca uygulama

zorluğu (oral gavaj veya intraperitoneal enjeksiyon) ve indüksiyona bağlı ölüm oranının yüksek olmasından dolayı karbon tetraklorür de deney hayvanlarında siroz oluşturmak amacıyla kullanılmamıştır. Çalışmalarımızda, siroz indüksiyonu için tiyoasetamid (%0.03) içme suyuna eklenerek 12-20 hafta süreyle sıçanlarda verilmiştir (117). İndüksiyona bağlı ölüm oranı oldukça düşük (<%10) olup patolojik olarak incelenen karaciğerlerde kronik toksik zedelenme ve devamında safra proliferasyonu, mikronodüler siroz ve kolanjiyelüler karsinom odaklarının olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.16). Makroskopik incelemede ise safra kanalı ve hepatik arterde büyümeye ilave olarak dalakta ve testislerde küçülme ve bazı sıçanlarda ise akciğerlerde nodül benzeri oluşumların varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca hayvanların kullanılan anestezi ajanına hassasiyeti artmış olduğundan anestezi oluşturmak amacıyla verilen doz kontrol grubuna göre en az %50 oranında azaltılmıştır.

5.1.3. Barsak Perfüzyonu Tekniği

Bu çalışmada etkin (naproksen sodyum, furosemid) maddelerin permeabilitelerinin tayini amacıyla lümeninden kayıp (*loss from the lumen*) esasına dayanan bir barsak perfüzyonu tekniği kullanılmıştır. Doluisio ve diğ. (182) tarafından geliştirilen bu teknik cerrahi yöntemin kolay olması, perfüze edilen barsak segmentinin kan, lenf ve sinir sistemlerinin bütünlüğünün korunması, *in vivo* koşullara en yakın tekniklerden biri olması ve sıklıkla kullanılan bir yöntem olması nedeniyle seçilmiştir. Yöntemin en büyük dezavantajı, zamanın fonksiyonu olarak perfüzyon çözeltisinden eksilen kısım ölçüldüğü için absorpsiyonu düşük olan maddelerle çalışıldığında hatalı sonuçlara yol açabilmesidir (183). Bu yöntemin daha geliştirilmiş tiplerinde sistemik dolaşıma geçen ilaç miktarı da toplanan kan örneklerinden tayin edilmektedir (184). Ancak cerrahi tekniğin ve gereksinim duyulan malzemelerin daha komplike olması, ayrıca uzun süren perfüzyon deneylerinde çok sayıda kan örneği alınmasının yaratabileceği olumsuz etkiler nedeniyle bu yöntem bizim çalışmamızda kullanılmamıştır.

Perfüzyon deneylerinde büyüklüğünün uygun olması, üretim ve bakımının kolay olması nedeniyle deney hayvanı olarak sıçan seçilmiştir. Perfüzyon deneyleri tek geçişli “*single pass*”, (185,186) veya sirkülasyonlu “*recirculation*” (187) olarak yapılabilmektedir. Bu çalışmada deneyler, çok daha az perfüzyon çözeltisi

kullanılarak gerçekleştirilebilmesi ve bir örnek toplayıcıya gereksinim duyulmadan örneklerin doğrudan rezervuardan alınabilmesi nedenleriyle perfüzyon çözeltisi sirküle edilerek gerçekleştirilmiştir.

5.1.4. Karaciğer Perfüzyonu Tekniği

In situ perfüze sıçan karaciğeri, organın anatomik pozisyonu değiştirilmeksizin izole edilmesine ve normal fizyolojik koşullar korunarak çalışılmasına olanak veren, fizyolojik ve farmakolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (188,189). Karaciğer diğer organlardan farklı olarak iki kaynaktan (portal ven ve hepatik arter) kan almasına rağmen perfüzyon çalışmalarında cerrahi işlemlerin kolay olması nedeniyle portal ven ana ilgi kaynağı olmuştur. Ancak hepatik arterden gelebilecek muhtemel katkıları ihmal ettiği için bu yöntem fizyolojik değildir. Bu nedenle, bu çalışmada seçilen model ilaçların (naproksen sodyum ve furosemid) kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlardaki hepatik dağılım ve eliminasyonlarını verilmiş yolunun fonksiyonu olarak incelemek amacıyla karaciğerin portal ven ve hepatik arterden perfüzyonuna olanak veren ikili perfüzyon (*dual perfusion*) yöntemi seçilmiştir.

Bölümümüzde ilk kez uygulanmaya başlanan bu yöntemin deneysel çalışmalarımızda kullanılabilmesi için aşağıda verilen kriterlere uyması beklenmiştir.

- Perfüzyon işlemine başladıktan hemen sonra karaciğer kandan hızla temizlenerek sarımsı kahverengi bir renge dönüşmelidir. Kanın pıhtılaşmasına ve hava kabarcıklarına bağlı renk değişimi gösteren bölgeler olmamalıdır.
- Kanülasyon işleminden deney tamamlanıncaya kadar geçen süre boyunca perfüzyon akış debisi %5'ten fazla değişmemelidir.
- Deney süresince safra üretimi devam etmeli ve safra akış debisi 5 µL/dk'nın altına düşmemelidir.
- Portal ven hepatik arterin izolasyonu ve kanülasyonundan hemen sonra kateterler içerisine enjekte edilen Evans mavisi sadece karaciğerde dağılmalı, diğer organlarda (barsak, mide, böbrekler gibi) renklenme olmamalıdır.

Bu kriterlere uyan başarılı preparat oranı hepatic arter çölyak (celiac) arterden kateterize edildiğinde % 60-70 iken aorttan kateterizasyon yöntemi kullanıldığında bu oran % 90-100 olarak bulunmuştur. Bu nedenle tüm karaciğer perfüzyonu çalışmalarında HA'nın aort'tan kanülasyonu yöntemi tercih edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kanülasyon problemleri, karaciğerin kandan tamamen temizlenmemesi (veya çok geç temizlenmesi) ve perfüzyon çözeltisinin sızıntısı en sık karşılaşılan başarısızlık nedenleri olmuştur.

Perfüzyon çözeltisi olarak hazırlanması kolay olan, karbojenle kolaylıkla dengeye ulaşan ve stabil bir pH sağlayan Krebs bikarbonat çözeltisi kullanılmıştır. Çözeltinin hazırlanmasında karşılaşılan en önemli sorun kalsiyum karbonatın çökmesine bağlı olarak bulanıklık oluşmasıdır. İyice oksijenlendirilmiş çözeltiye CaCl_2 'ün en son eklenmesiyle bu sorun ortadan kaldırılmıştır.

5.2. Etkin ve Referans Maddelerle Yapılan Çalışmalar

5.2.1. Etkin Maddelerin Çözünürlüklerinin Tayini

Bir etkin maddenin çözünürlüğünün yüksek olması demek en yüksek terapötik dozunun 37°C 'de pH 1-7.5 aralığındaki beş farklı pH'daki tamponun her birindeki çözünürlüğünün 250 mL'den az olması demektir. Bu çalışmada naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlükleri her bir etkin maddenin pKa değerleri esas alınarak seçilen beş farklı tamponda (Bölüm 3.7) yapılmış ve elde edilen bulgulardan hareketle en yüksek dozlarının çözünmesi için gerekli çözücü miktarları ve doz sayıları hesaplanmıştır.

Elde edilen bulgular etkin maddelerin çözünürlüklerinin ortam pH'sına bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Her iki etkin madde de pH'ya bağlı bir çözünürlük profili (Şekil 4.9) sergilemekte olup pH arttıkça maddelerin çözünürlükleri de artmaktadır. Furosemidin çözünürlüğü pH 1'de 0.028 mg/mL iken pH 7.5'de bu değer 6.41 mg/mL olarak bulunmuştur. Aynı pH değerlerinde naproksen sodyumun çözünürlüğü ise 68.9 mg/mL (pH 1) ve 255 mg/mL (pH 7.5) olarak tayin edilmiştir. pH 1-5 aralığında, naproksen sodyumun çözünürlüğünün furosemid'den 1400-3000 kat daha fazla olduğu, pH 7.5'da ise bu oranın sadece 40 kat daha fazla olduğu

gözlenmiştir (Bölüm 4.2.3, Tablo 4.3). Etkin maddelerin çözünürlüklerindeki farklılıklar, çalışılan pH koşullarındaki iyonizasyon derecelerinin değişmesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Biyofarmasötik sınıflandırma sisteminde yer alan ilaçların karakterizasyonu için fizikokimyasal ve fizyolojik parametrelerin fonksiyonu olarak tayin edilen birimsiz üç sayı (doz sayısı, çözünme sayısı, absorpsiyon sayısı) tanımlanmıştır (15). Bunlardan doz sayısı (Do) doz konsantrasyonunun ilaç çözünürlüğüne oranı olarak tayin edilmekte olup (Bölüm 3.7.2, Eşitlik 3.1) etkin maddenin çözünürlüğünün değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Doz sayısı 1'den küçükse ($Do < 1$) çözünürlüğün yüksek, doz sayısı 1'den büyükse ($Do > 1$) çözünürlüğün düşük olduğu kabul edilmektedir. Kasim ve diğ'nin.(174) yaptıkları çalışmada, en yüksek doz 40 mg ve çözünürlük 0.01 mg/mL olarak alındığında furosemidin doz sayısı 16 olarak tayin edilmiş ve çözünürlüğünün düşük olduğuna karar verilmiştir. Naproksen sodyum için hesaplanan bu değer (en yüksek doz 500 mg ve çözünürlük 33 mg/mL) 1'den küçük olması ($Do = 0.06$) nedeniyle çözünürlüğünün yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (174). Her iki etkin madde için çalışmamızda hesaplanan Do değerleri literatür ile uyum içerisindedir. Furosemidin Do değeri sadece pH 7.5'da 1 den küçük ($Do = 0.051$) bulunurken naproksen sodyumun Do değerleri ($Do = 0.009-0.032$) çalışılan tüm koşullarda 1'den küçük bulunmuştur.

Lindenberg ve ark. (190) etkin maddenin pH 1-7.5 aralığındaki doz/çözünürlük oranının (D/S, Bölüm 3.7.2 Eşitlik 3.2) 250 ml'den küçük olmasını yüksek çözünürlük olarak kabul etmişlerdir. Furosemidin en yüksek dozunu çözmek için gerekli çözücü hacmi sadece pH 7.5'de 250 mL'den düşük bulunurken, naproksen sodyumun en yüksek dozunu çözmek için gerekli çözücü ortamı hacmi tüm pH değerlerinde 250 mL'den düşük bulunmuştur (Bölüm 4.2.3, Tablo 4.5). Tüm bu bulgularda furosemidin çözünürlüğünün düşük, naproksen sodyumun ise yüksek olduğunu desteklemektedir.

5.2.2. Etkin Maddelerin Permeabilitelerinin Tayini

Bir ilacın dahil olduğu permeabilite sınıfının tayin edilmesi amacıyla kütle-denge çalışmaları, mutlak biyoyararlanım çalışmaları veya barsak perfüzyonu

çalışmaları yapılmaktadır. Barsaklardan permeabilitenin tayini için barsak perfüzyonu (insan veya hayvanlarda), dokulardan permeasyon ve tek tabakalı epitel hücre kültüründe (ör. Caco-2) permeasyon çalışmalarının yapılması önerilmektedir (29).

Perfüzyon çözeltisine ilave edilecek olan etkin madde miktarının belirlenmesinde çözünürlükten kaynaklanabilecek sorunları ortadan kaldırmak amacıyla çalışmada kullanılacak maddenin çözünürlüğünün gözönünde bulundurulması gerektiği belirtilmiştir. Eğer madde yüksek çözünürlüğe sahipse perfüzyon çözeltisine 1 mg/mL konsantrasyonda eklenmesi gerektiği belirtilmiştir (182). Naproksen sodyumun çözünürlüğü yüksek olduğu için perfüzyon çözeltisine 0.5 mg/mL dozda eklenmiştir. Furosemidin çözünürlüğü düşük olduğundan perfüzyon çözeltisine eklenecek miktarının belirlenmesinde literatürdeki mevcut çözünürlük değeri (0.01 mg/mL) esas alınmıştır (174).

Barsak perfüzyonu çalışmalarında amaca göre farklı referans maddeler de perfüzyon ortamına eklenebilmektedir. Örneğin transselüler pasif transportun incelenmesinde propranolol (28), antipirin, ketoprofen, metoprolol, piroksikam kullanılırken, paraselüler transportun değerlendirilmesinde PEG 400, atenolol, furosemid, mannitol, terbutalin (191) referans madde olarak tercih edilmektedir. Taşıyıcılar aracılığıyla gerçekleşen aktif transport için Gly-Pro ve L-fenilalanin, P-glikoproteinler aracılığıyla gerçekleşen sekresyonda ise talinolol, simetidin, asebutolol, ranitidin, klorotiazin (191) kullanılmaktadır. Bu çalışmada GI kanal duvarını pasif difüzyonla geçen ve permeabilitenin değerlendirilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan antipirin (187) referans madde seçilmiştir. Antipirinin çözünürlüğü yüksek olduğu için perfüzyon çözeltisine 0.5 mg/ml konsantrasyonda olacak miktarda eklenmiştir.

Bir maddenin permeabilitesinin değerlendirilmesi amacıyla farklı yaklaşımlar mevcuttur. Kasim ve diğ. (174)'nin $\log P$ (n-oktanol/su partiyon katsayısı), $\text{Clog} P$ (hesaplanan $\log P$) ve $\log D$ (dağılma katsayısı) değerlerini esas alarak yaptıkları değerlendirmede, $\log P \geq 1.72$, $\text{Clog} P \geq 1.35$ ve $\log D \geq -1.48$ olduğunda permeabilitenin yüksek, $\log P$, $\text{Clog} P$ ve $\log D$ değerleri belirtilen bu değerlerden daha

küçükse permeabilitenin düşük olduğuna karar verilmiştir. LogP (=2.86); (192) ve ClogP (=3.42) değerlerine göre naproksen sodyumun permeabilitesinin yüksek olduğu ortaya çıkmaktadır. Furosemidin ise LogP (=0.74) değerine göre permeabilitesinin düşük ClogP (=1.90)'ye göre ise yüksek olduğu ortaya çıkmaktadır (174). Diğer taraftan, oldukça yüksek permeabiliteye sahip olan antipirin bu değerlendirme sistemine göre düşük permeabilite özelliği göstermektedir (LogP= 1.01 ve ClogP= 0.20) (174). Bu durum bu değerlendirme sisteminin hatalı olabileceğini göstermektedir.

Lipinski ve diğ. (193) tarafından önerilen "beş kuralı"na (*rule of five*) göre, istisnaları olmakla birlikte, maddenin molekül ağırlığı ≥ 500 , $\log P \geq 5$, H-bağı donör sayısı (OH + NH sayısı) ≥ 5 ve H-bağı akseptör sayısı (O + N sayısı) ≥ 10 ise permeabilitesinin ve absorpsiyonunun düşük olabileceği belirtilmektedir. Bir ilacın absorpsiyon ve permeabilitesinin Lipinski skoruna (en yüksek 4) göre zayıf (skor=0) orta (skor=1-3) ve iyi (skor=4) olduğu belirtilmektedir (193). Beş kuralı etkin maddelerimize uygulandığında (Tablo 5.2) Lipinski skoru 4 olan naproksen sodyumun ve furosemidin permeabilitesinin ve biyoyararlanımının iyi (yüksek) olabileceğini göstermektedir

Tablo 5.2. Naproksen ve furosemid için beş kuralında yer alan parametreler.

Parametre	Naproksen Sodyum	Furosemid
Molekül ağırlığı	252.23	331
logP*	2.86	0.74
H-bağı donörü sayısı*	1	4
H-bağı akseptör sayısı*	3	7
Lipinski skoru	4	4

* Zakeri-Milani ve diğ. (194)'nden alınmıştır.

Naproksenin biyoyararlanımı oldukça yüksek ($\approx\%100$) (170) iken furosemid için bu değer furosemid için % 71 (170) olarak verilmektedir. Bir etkin maddenin %90'nından fazlası absorbe olduğunda permeabilitesinin yüksek olduğu kabul edildiğine göre (29,195) biyoyararlanım bulguları da naproksenin yüksek permeabiliteye furosemidin ise düşük permeabiliteye sahip olduğunu desteklemektedir.

İnsanlardan elde edilen permeabilite verilerini değerlendirmek amacıyla metoprolol'ün permeabilite değeri (1.34×10^{-4} cm/sn) sınır değer olarak kabul edilmektedir. Maddenin permeabilitesi bu değerden küçükse ($P < 1.34 \times 10^{-4}$ cm/sn) permeabilitesinin düşük, büyükse ($P > 1.34 \times 10^{-4}$ cm/sn) permeabilitesinin yüksek olduğu kabul edilir. Bu durumda naproksen sodyumun ve antipirinin permeabilitelerinin ($P_{\text{naproksen sodyum}} = 8.50 \times 10^{-4}$ cm/sn ve $P_{\text{antipirin}} = 5.60 \times 10^{-4}$ cm/sn) yüksek furosemidin ise permeabilitesinin ($= 0.05 \times 10^{-4}$ cm/sn) düşük olduğu görülmektedir (174).

Bizim çalışmamızda ise naproksen sodyum ve furosemidin permeabilitelerinin değerlendirilmesinde antipirinin permeabilitesine benzerlik veya farklılıkları esas alınmıştır. Antipirin için tayin edilen permeabilite değeri ($P_{\text{kontrol}} = 5.02 \times 10^{-4}$ cm/sn) literatürde farklı yöntemler kullanılarak tayin edilen permeabilite değerleri ($1.25 \times 10^{-6} - 5.6 \times 10^{-4}$ cm/sn; (174,186,187,196-199) arasında yer almaktadır. Naproksen sodyumun permeabilite değeri ($P_{\text{kontrol}} = 5.55 \times 10^{-4}$ cm/sn) ile referans madde olarak kullanılan antipirinin permeabilite değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması bu maddenin permeabilitesinin yüksek olduğu ve membranlardan pasif difüzyonla geçtiği şeklinde yorumlanabilir. Literatürde her iki maddeninde barsak membranlarından pasif difüzyonla taşındığını destekleyen bulgular mevcuttur (200). Ancak furosemid için tayin edilen permeabilite değerinin referans maddeninkinden anlamlı derecede farklı ($P_{\text{kontrol}} = 1.39 \times 10^{-4}$ cm/sn) olması bu maddenin permeabilitesinin düşük olduğunu vurgulamaktadır. Tüm bu bulgular furosemidin permeabilitesinin düşük, naproksen sodyumun ise yüksek olduğunu göstermektedir.

Literatürde etkin ve referans maddelerin barsak permeabilitelerinin sirozdandan derecede etkilendiğiyle ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada,

sirozlu sıçanlarda gerçekleştirilen barsak perfüzyonu deneylerinden elde edilen permeabilite bulgularının kontrol grubundan elde edilen değerlerle çok benzer olması, membranlardan pasif difüzyonla geçen antipirin ($P_{\text{siroz}} = 4.76 \times 10^{-4}$ cm/sn vs. $P_{\text{kontrol}} = 5.02 \times 10^{-4}$ cm/sn) ve naproksen sodyumun ($P_{\text{siroz}} = 5.56 \times 10^{-4}$ cm/sn vs. $P_{\text{kontrol}} = 5.55 \times 10^{-4}$ cm/sn) permeabilitelerinin sirozdan etkilenmediğini göstermektedir. Ancak sirozda furosemidin permeabilitesinde ($P_{\text{siroz}} = 0.584 \times 10^{-4}$ cm/sn) kontrol grubuna ($P_{\text{kontrol}} = 1.39 \times 10^{-4}$ cm/sn) göre yaklaşık %60'lık bir azalma bulunmuştur. Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi (BSS)'ne göre Sınıf 4 (düşük çözünürlük - düşük permeabilite)'de yer alan ilaçların (ör. furosemid; Bölüm 5.2.3) absorpsiyonuna hem efflux hemde absorptif taşıyıcılar etki etmektedir. Furosemid'in permeabilitesinde siroza bağlı olarak gözlenen azalma bu taşıyıcı sistemlerin fonksiyonlarında azalma olabileceği olasılığını akla getirmektedir.

5.2.3. Etkin Maddelerin Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemindeki Yeri

Biyoyararlanım/biyoeşdeğerlik çalışmalarından vazgeçmede esas olarak alınan biyofarmasötik sınıflandırma sistemi (BSS) etkin maddeleri çözünürlük ve permeabilite özelliklerine göre 4 sınıfa (Sınıf 1: yüksek çözünürlük - yüksek permeabilite; Sınıf 2: düşük çözünürlük - yüksek permeabilite; Sınıf 3: yüksek çözünürlük - düşük permeabilite; Sınıf 4: düşük çözünürlük - düşük permeabilite) ayırmaktadır (15). Bir etkin maddenin BSS'deki yerinin tayin edilebilmesi için çözünürlük ve permeabilite değerlerinin bilinmesi gereklidir. Çalışmalarımızda model ilaçlar olarak seçilen naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlük ve permeabilite çalışmalarından elde edilen sonuçlar her iki ilacında dahil olduğu BSS'de sınıfının tayin edilebilmesine olanak vermiştir. Bu çalışma kullanılan naproksen sodyum ile furosemidin dahil olduğu BSS sınıfı ile literatür bilgileri ile birlikte Tablo 5.3'de sunulmuştur.

Tablo 5.3. Naproksen sodyum ve furosemidin biyofarmasötik sınıflandırma sistemindeki (BSS) yeri.

Kaynak	BSS SINIFI	
	Naproksen Sodyum	Furosemid
Kasim ve diğ. (174)	1	4
Lindenberg ve diğ.(190)	-	4
Wu ve Benet (201)	2*	4
Bu çalışma	1	4

*Naproksen

Kasim ve diğ, (174) tarafından etkin maddelerin BSS'ye göre sınıflandırılmasında çözünürlük için doz sayısı, permeabilite için logP ve ClogP değerleri esas alınmıştır. Buna göre naproksenin Do değeri 1'den küçük olduğu için çözünürlüğü yüksek, logP ve ClogP değerleri sırasıyla 1.72 (logP: 2.86) ve 1.35 (ClogP: 3.42)'den büyük olduğu için permeabilitesi yüksektir ve BSS'ne göre Sınıf 1 ilacıdır. Furosemidin hem Do değeri hem de logP ve ClogP değerleri belirtilen sınır değerlerinden küçük olduğu için Sınıf 4 ilacıdır.

Lindenberg ve diğ. (190) tarafından yapılan sınıflandırmada ise etkin maddenin pH 1-7.5 aralığında doz/çözünürlük oranının 250 mL'den küçük olması yüksek çözünürlük, absorplanan fraksiyonunun % 90'dan yüksek olması yüksek permeabilite olarak kabul edilmiş ve bu değerlendirmeye göre furosemid düşük çözünürlük ve düşük permeabilite özelliğinden dolayı Sınıf 4 ilacı olarak kabul edilmiştir.

Wu ve Benet (201) ise permeabilite yerine ana eliminasyon yollarının kullanılmasıyla sınıflandırma yapmıştır. Buna göre Sınıf 1 ve 2'de yer alan ilaçlar yüksek oranda metabolize olurken, Sınıf 3 ve 4 grubundaki ilaçlar değişmeden safra ve böbrekler yoluyla atılmaktadır. Biyofarmasötik İlaç Dispozisyon Sınıflandırma

Sistemi olarak adlandırılan bu sisteme göre, naproksen düşük çözünürlük ve yüksek oranda metabolize olma özelliği ile Sınıf 2'ye, furosemid ise düşük çözünürlük ve düşük oranda metabolize olma özelliği ile Sınıf 4'e dahil edilmiştir.

Çalışmamızda naproksen sodyum ve furosemidin BSS'ye göre sınıflandırılması çözünürlük ve permeabilite çalışmalarından elde edilen deneysel sonuçlara göre yapılmıştır. Tayin edilen çözünürlük (Bölüm 5.2.1) ve permeabilite (Bölüm 5.2.2) bulgularına göre naproksen sodyumun yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite (Sınıf 1) özelliklerine sahip olduğu, furosemidin ise düşük çözünürlük ve düşük permeabilite (Sınıf 4) özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur. Bulgularımız Kasım ve diğ. (174) tarafından yapılmış sınıflama sistemiyle uyumlu olup BSS'e göre naproksen sodyumun Sınıf 1, furosemidin ise Sınıf 4 ilacı olduğunu göstermektedir.

5.2.4. Karaciğer Perfüzyonu Deneyleri

5.2.4.1. Karaciğerde Dağılma Hacimlerinin Tayini

Vasküler ve Ekstraselüler Hacimler

Karaciğer perfüzyonu deneylerinde vasküler hacmin tayini amacıyla radyoaktif işaretli eritrositler (^{14}C -; ^{51}Cr -; veya ^{99}Te) oldukça yaygın olarak kullanılırken intersitisyel hacmin tayini amacıyla ise çok farklı indikatörler (ör. NaCl, albümin, inülin, EDTA, Evans mavisi, sakkaroz) kullanılmaktadır (59,202-204). Bu çalışmada bölümümüzdeki olanaklar göz önüne alınarak vasküler hacmin tayini amacıyla normal RBC, intersitisyel hacmin tayini için ise Evans mavisi referans madde olarak seçilmiş, ve toplanan perfüzyon örneklerindeki miktarları spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak tayin edilmiştir.

Karaciğerden elimine edilmeyen bir madde için, ortalama geçiş zamanı (MTT), içinde dağıldığı hacim (V) ve kan akış hızının (Q) fonksiyonu olarak değişmektedir ($\text{MTT}=\text{V}/\text{Q}$). Sabit perfüzyon hızında, dağılma hacminin artmasıyla birlikte MTT'ninde artması beklenir. Eritrositler büyüklükleri itibarıyla (7-9 μm) sadece vasküler boşlukta dağılırken, albümine bağlanan Evans mavisi 0.1 μm

çapındaki fenestrelere geçerek intersitisyel boşlukta dağılır. Dolayısıyla dağılıma hacminin eritrositlerden daha fazla olması beklenir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular veriliş yolundan (PV veya HA) bağımsız olarak hem kontrol hem de sirozlu sıçanlarda ekstraselüler hacmin ($V_{PV,kontrol}: 0.215 \pm 0.041$ mL/g; $V_{PV,siroz}: 0.156 \pm 0.055$ mL/g; $V_{HA,kontrol}: 0.402 \pm 0.157$ mL/g; $V_{HA,siroz}: 0.380 \pm 0.117$ mL/g) vasküler hacimden ($V_{PV,kontrol}: 0.172 \pm 0.036$ mL/g; $V_{PV,siroz}: 0.170 \pm 0.060$ mL/g; $V_{HA,kontrol}: 0.257 \pm 0.039$ mL/g; $V_{HA,siroz}: 0.247 \pm 0.079$ mL/g; Tablo 4.17) daha büyük olduğunu göstermektedir. Ayrıca veriliş yolunun (PV veya HA) fonksiyonu olarak tayin edilen vasküler hacim sirozdan etkilenmezken sirozlu grupların ekstraselüler hacminde kontrol grubuna göre % 5 (HA) ve %25 (PV)'lik bir azalma bulunmuştur (Tablo 4.17). Bu azalma sirozda gözlenen sinüslerin kapillarizasyonuna ve ekstraselüler boşluktaki kollajen miktarındaki artmaya bağlanabilir.

Akış hızlarının (Q_t : 15, 16.5, 18 mL/dk) fonksiyonu olarak vasküler hacimler incelendiğinde, her iki grupta da (kontrol ve siroz) HA'nın vasküler hacimi ($V_{kontrol,15}: 0.257 \pm 0.039$ mL/g; $V_{kontrol,16.5}: 0.224 \pm 0.034$ mL/g; $V_{kontrol,18}: 0.259 \pm 0.064$ mL/g; $V_{siroz,15}: 0.247 \pm 0.079$ mL/g; $V_{siroz,16.5}: 0.253 \pm 0.087$ mL/g; $V_{siroz,18}: 0.250 \pm 0.084$ mL/g) akış hızından etkilenmezken PV'nin vasküler hacminde az da olsa bir artış bulunmuştur ($V_{kontrol,15}: 0.172 \pm 0.036$ mL/g; $V_{kontrol,16.5}: 0.184 \pm 0.037$ mL/g; $V_{kontrol,18}: 0.196 \pm 0.030$ mL/g; $V_{siroz,15}: 0.170 \pm 0.060$ mL/g; $V_{siroz,16.5}: 0.217 \pm 0.082$ mL/g; $V_{siroz,18}: 0.235 \pm 0.066$ mL/g). Ancak aynı akış hızında aynı veriliş yolunda (PV veya HA) kontrol ve sirozlu gruplar için tayin edilen vasküler hacimler oldukça benzerdir (ör. $Q=15$ mL/dk için $V_{PV,kontrol}: 0.172 \pm 0.036$ mL/g; $V_{PV,siroz}: 0.170 \pm 0.060$ mL/g; $V_{HA,kontrol}: 0.257 \pm 0.039$ mL/g; $V_{HA,siroz}: 0.247 \pm 0.079$ mL/g; Tablo 4.19).

Hem PV hemde HA için elde edilen vasküler hacimlerde bir değişim gözlenmezken, intraselüler hacimler her iki uygulama yolu için sirozlu gruplar da daha yüksek bulunmuştur ($p>0.05$) (Tablo 4.18). Bunlara ek olarak intersitisyel hacim HA ve PV için sirozlu gruplarda daha düşük olarak bulunmuştur. İntersitisyel hacimde oluşan fark istatistiksel olarak değerlendirildiğinde HA için $p>0.05$ olarak bulunurken PV için $p=0.012$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.31).

Karaciğerde dağılma hacimlerini veriliş yolunun fonksiyonu olarak inceleyen çalışmalardan elde edilen bulgular farklılıklar göstermektedir. Bazı araştırmacılar (75) veriliş yoluna bağlı olarak herhangi bir fark bulamazken diğerleri (77,92,205) referans maddelerin HA'ya enjeksiyonu sonucu tayin edilen dağılma hacimlerinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmalarımızdan elde edilen bulgular ikinci grubun (77,92,205) sonuçlarıyla uyumludur.

Total hacim

İlaçların doku dağılım verilerinin yorumlanmasında ve fizyolojik farmakokinetik model geliştirilmesinde organların su içeriğinin bilinmesi gereklidir (206). Bu amaçla desikasyon ve indikatör dilüsyon yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (206-212) Organın sabit ağırlığa kadar kurutulması esasına dayanan desikasyon yöntemi kolay bir yöntem olmakla birlikte kurutma sıcaklığına oldukça duyarlı bir yöntemdir. Yüksek sıcaklıklarda (>50°C) suyla birlikte uçucu organik bileşikler de kaybedilebileceği için organın düşük sıcaklıkta (40-50°C) kurutulması önerilmiştir (213). Düşük sıcaklıkta çalışmanın dezavantajı organın sabit ağırlığa ulaşması için gerekli olan sürenin oldukça uzun olması ve organın tam olarak kurutulmaması riskidir. Radyoaktif işaretli su kullanılarak yapılan indikatör dilüsyon çalışmalarında tayin edilen total su içeriğinin desikasyon yöntemine göre % 1-8 arasında daha fazla olduğu (207,208,214), bunun suyun buharlaşmasına, hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonlara girmesine ve ³H- atomunun dokularda bulunan organik maddelerin H atomuyla yer değiştirmesine bağlı olabileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar (59,79) karaciğerde iki yöntem arasında uyumun iyi olduğunu göstermiştir.

Yüksek basınç altında buzun süblimleşmesi esasına dayanan liyofilizasyon yöntemi, desikasyon ve indikatör dilüsyon yöntemlerinden kaynaklanan problemleri ortadan kaldırmak amacıyla alternatif bir yöntem olarak önerilmiş, ve elde edilen değerlerin literatürle oldukça iyi bir uyum içinde olduğu gösterilmiştir (215). Bu çalışmada da kontrol ve siroz geliştirilmiş sıçanlardaki karaciğer preparatının total su içeriğini tayin etmek amacıyla liyofilizasyon yöntemi tercih edilmiştir. Karaciğerin total su hacminin kontrol grubunda 0.70 g/mL, sirozlu grupta ise 0.62 g/mL olduğu,

ve diğer yöntemler kullanılarak tayin edilen total hacim (%64-74) verileriyle (206,208) uyum içerisinde olduğu bulunmuştur.

5.2.4.2. Hepatik Artere Özgü Spesifik Alanın Tayini

Karaciğer içerisinde birbirine paralel olarak ilerleyen portal ven ve hepatik arterin terminal dalları (portal venül ve hepatik arteriyol) sinüslere gerekli olan kanı sağlar. Sıçanda portal venüller sinüslerde sonlanırken arteriyoller bir kaç farklı yoldan sinüslere bağlanır. Bazıları doğrudan sinüsle birleşirken bazı arterioller venüllere bağlanır (72,73). Bir kısım arteriol ise safra kanalını çevreleyen kompleks kapiler ağ olan *peribiliary capillary plexus* aracılığı ile sinüsle birleşir (35). Genel olarak hepatik arter ve portal venden gelen kanın sinüslerde karıştığı kabul edilse de karaciğerin ikili perfüzyonu çalışmalarından elde edilen bulgular küçük bir alanın (total alanın %10) sadece hepatik arter tarafından perfüze edildiğini göstermektedir (74-78,212). Sirozda ise bu alanın total alana katkısı %8 civarındadır (77). Spesifik arter alanı (*specific arterial space*) olarak adlandırılan bu alan hepatik arterden gelen kanın sadece %17'sini almaktadır (79). Bu spesifik alanın bir kısmının (yaklaşık %5) karaciğerin anatomik özelliklerine (*peribiliary capillary plexus*) geri kalan kısmının ise karaciğer mikrodolaşımındaki anlık değişikliklere bağlı olabileceği belirtilmiştir (79).

Çalışmamızda kontrol grubu için tayin edilen spesifik alan (% 9.5) literatür verileriyle oldukça uyumlu olmakla birlikte siroz grubu için tayin edilen değer (%16) literatürde verilen değer (%8) (77) yaklaşık iki katı kadardır. Aradaki farkın spesifik alanı hesaplamada kullanılan yöntem ve karaciğerde gelişen siroz derecesinin farklı olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

5.2.4.3. Etkin Maddelerin Karaciğerde Dağılımı ve Eliminasyonu

Çalışmamızda kan bileşenlerinin ve diğer organların etkisi olmaksızın, naproksen sodyum ve furosemidin sadece hepatik dağılımını ve metabolizasyonunu verilmiş yolunun fonksiyonu olarak (PV ve HA) perfüze sıçan karaciğerinde incelemek mümkün olmuştur. Yapılan ön denemelerde naproksen sodyum için 4 (0.05, 0.1, 0.5 ve 1.0 mg/50µL) furosemid için 3 (0.05, 0.1 ve 0.5 mg/50µL) farklı konsantrasyon

incelenmiş elde edilen bulguların ışığında en uygun konsantrasyonun her iki madde için de 0.5 mg/50µL olduğu bulunmuştur.

İlaçlar hepatik ekstraksiyon (E) derecelerine göre düşük ($E < 0.3$), orta ($E = 0.3-0.7$) ve yüksek ($E > 0.7$) oranda metabolize edilenler olarak sınıflandırılmaktadır (17). Naproksen sodyumun veriliş yolunun fonksiyonu olarak tayin edilen E değerleri (E_{PV} : 0.334, E_{HA} : 0.454; Tablo 4.23) kontrol grubunda ilacın orta derecede ekstraksiyona uğradığını işaret etmektedir. Sirozlu grupta ise maddenin ekstraksiyon (E_{HA} : 0.316 ve E_{PV} : 0.220) ve hepatik klerens değerinde (CL_{HA} : 0.078 ± 0.045 mL/sn ve CL_{PV} : 0.055 ± 0.062 mL/sn) bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu azalmanın sirozda görülen hepatosit hasarı ve ilacın metabolizasyonundan sorumlu enzim aktivitesindeki (CYP1A2 ve CYP2C9) azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda ileri derece sirozda, naproksenin metabolizasyonundan sorumlu olan CYP1A2 ve CYP2C9 aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (170). Ayrıca naproksen sodyum HA'e enjekte edildiğinde elde edilen E ve CL değerleri PV enjeksiyonuna göre biraz daha yüksek bulunmuştur. Aradaki fark hepatik arter tarafından perfüze edilen spesifik alana ve bu alandaki enzimatik aktiviteye bağlı olabilir.

Furosemidin hepatik ekstraksiyon dereceleri veriliş yolunun fonksiyonu olarak kontrol gruplarında E_{PV} : 0.200 ve E_{HA} : 0.351 olarak tayin edilmiştir. Bu sonuçlara bakarak furosemid PV yoluyla karaciğere ulaştığında düşük oranda metabolize edilirken HA yoluyla karaciğere gelen furosemidin orta derecede metabolizasyonu gerçekleşmektedir. Bu bulguların ışığında furosemidin metabolizasyonunun veriliş yoluna bağlı olarak değiştiği söylenebilir. Sirozda ise bu değerler E_{PV} : 0.319, E_{HA} : 0.497 olarak hesaplanmıştır. PV yoluyla karaciğere gelen furosemidin metabolizasyonu sirozda yaklaşık olarak %60'lık bir artış göstermektedir. Diğer yandan HA da ise bu artış yaklaşık %30 olarak hesaplanmış ve her iki yolun (PV, HA) metabolizasyon oranı orta derece olarak gerçekleşmiştir. Furosemidin kontrol grubundaki hepatik klerensi (CL_{PV} : 0.050 mL/dk CL_{HA} : 0.088 mL/dk) siroz grubuna (CL_{PV} : 0.078 mL/dk CL_{HA} : 0.121 mL/dk) oranla daha düşük bulunmuştur. Sirozlu grupta hepatik ekstraksiyonda gözlenen bu artış furosemidin glukuronidasyonundan sorumlu enzimlerin aktivitesindeki değişime bağlı olabilir.

Yapılan araştırmalarda ilaçların glukuronidasyonundan sorumlu enzimlerin aktivitesinde sirozda bir artış olduğu gösterilmiştir (216).

Naproksen sodyum ve furosemidin hepatik dispozisyonunu veriliş yolunun fonksiyonu olarak hem kontrol hem de siroz geliştirilmiş deney hayvanlarında inceleyen bir çalışma mevcut değildir. Dolayısıyla deneysel bulgularımızı literatürdeki veriyle karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Ancak furosemidin yarılanma ömründe sirozlu hastalarda iki kata varan bir artış olmakla birlikte ilacın farmakokinetiğinin sirozda değişmediği belirtilmiştir (217-220).

Sirozlu hastalarda ilaçların farmakokinetiğini inceleyen çalışmalar orta derecede hepatik ekstraksiyona uğrayan ilaçların idame dozunda düzenleme yapılması gerektiğini önermektedir. Bu bulguların ışığı altında hepatik ekstraksiyonu orta derecede olan naproksen sodyum ve furosemidin sirozda kullanılması gerektiği durumlarda idame dozlarında bir ayarlama yapılması önerilebilir.

5.3. SONUÇLAR

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

Çözünürlük ve permeabilite deneyleri sonucunda

- Naproksen sodyum ve furosemidin çözünürlüklerinin pH'ya bağlı olarak gerçekleştiği, çözünürlüğünün en yüksek olduğu pH iki madde içinde pH 7.5 olarak bulunmuştur.
- Do değerleri ve etkin maddelerin en yüksek dozlarını çözmek için gerekli çözücü hacimleri naproksen sodyumun çözünürlüğünün yüksek, furosemidin çözünürlüğünün ise düşük olduğunu göstermiştir.
- *In situ* barsak perfüzyon tekniği kullanılarak tayin edilen permeabilite çalışmaları sonunda naproksen sodyumun yüksek, furosemidin ise düşük permeabiliteye sahip olduğu bulunmuştur.
- Yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite özelliği gösteren naproksen sodyumun biyofarmasötik sınıflandırma sisteminde Sınıf 1'de yer aldığı, furosemidin ise düşük çözünürlük ve düşük permeabilite özelliği nedeniyle Sınıf 4'de yer aldığı gösterilmiştir.
- Naproksen sodyumun permeabilitesi sirozdan etkilenmezken furosemidin permeabilitesinde kontrol grubuna göre yaklaşık %60'lık bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

Karaciğer perfüzyonu deneyleri sonucunda

- Karaciğerin portal ven ve hepatik arterden perfüze edildiği ikili perfüzyon (*dual perfusion*) tekniği geliştirilerek bölümümüzde ilk kez uygulanmaya başlanmıştır. Karaciğer preparatının kabul edilebilirlik kriterleri başarı oranının oldukça yüksek olduğunu göstermiştir.
- Tiyoasetamid (%0.03)'in 12-20 hafta süreyle içme suyunda uygulanması sonucu siroz başarıyla geliştirilmiştir.

- Hem kontrol hem de siroz geliştirilmiş sıçanlarda referans maddelerin HA'e enjeksiyonu sonucu tayin edilen vasküler ve ekstraselüler hacimler PV için tayin edilen aynı hacimlerden daha büyük bulunmuştur.
- Siroz geliştirilmiş sıçanlarda PV'e enjeksiyon sonrası tayin edilen intersitisyel hacimde kontrol grubuna göre önemli derecede ($p<0.05$) azalma olmuştur.
- Siroz geliştirilmiş sıçanlardan tayin edilen total hacimde kontrol grubuna göre %11'lik bir azalma gözlenmiştir.
- Siroz geliştirilmiş sıçanlarda hepatik arter tarafından perfüze edilen spesifik alan (%16) kontrol grubuna (%9.5) göre daha fazladır.
- Naproksen sodyumun kontrol grubundaki hepatik ekstraksiyonu orta derecede olmaktadır. Sirozda ise PV'deki hepatik ekstraksiyon oranı düşük derecede ($E_{PV}=0.220$) gerçekleşmiştir. Ayrıca HA'deki ekstraksiyonunda da azaldığı bulunmuştur.
- Furosemidin PV'e enjeksiyonu sonucu hepatik ekstraksiyonu düşük (<0.3) iken sirozda ekstraksiyonu orta (0.3-0.7) derecede gerçekleşmiştir. HA'e verilisi sonrası hepatik ekstraksiyonu hem kontrol hem de sirozlu gruplarda orta derecede bulunmuştur.

Sonuç olarak orta derecede hepatik ekstraksiyonu olan ilaçların sirozlu hastalara uygulanması gerektiği durumlarda idame dozlarında ayarlama yapılmasının gerekebileceği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Darling, D. (2008). The Internet Encyclopedia of Science 30.08, 2008, Ağ Sitesi: http://www.daviddarling.info/encyclopedia/D/digestive_system.html
2. Washington, N., Washington, C., Wilson, C., G. (2001). Physiological Pharmaceutics, Barriers to drug absorption (2 bs.). New York: Taylor and Francis, Cornwall.
3. Selen, A. (1991). Factors influencing bioavailability and bioequivalence, Bioequivalence and therapeutic equivalence. J. Swarbrick (Ed.). Pharmaceutical Bioequivalence (s. 117-148). New York,: Marcel Dekker.
4. Shargel, L., Yu, A., B.,C. (1993). Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics (3 bs.). London: Prentice-Hall International Inc.
5. Petri, N. (2005). Involvement of Membrane Transport Proteins in Intestinal Absorption and Hepatic Disposition of Drugs Using Fexofenadine as a Model Drug.Ph.D. Thesis, Uppsala University, Uppsala.
6. Tritz, G., J. (1999). Infectious Diseases 10.05, 2008, Ağ Sitesi: <http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/tritzid/gastro.htm>
7. Lucas, M. (1983) Determination of acid surface pH in vivo in rat proximal jejunum. *Gut*, 24 (8), 734-739.
8. Lucas, M.L. (1976) The association between acidification and electrogenic events in the rat proximal jejunum. *J Physiol*, 257 (3), 645-662.
9. Houston, J., B., Wood, S., G. (1980). In: Progress in Drug Metabolism. J. Bridges, W. & L. Chasseaud, F.) (Ed.). Gastrointestinal absorption of drugs and other xenobiotics (c. 4, s. 57-129). New York: John Wiley&Sons Ltd.
10. Cerda, J.J., Robbins, F.L., Burgin, C.W., Gerencser, G.A. (1987) Unstirred water layers in rabbit intestine: effects of guar gum. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 11 (1), 63-66.
11. Levitt, M.D., Fetzer, C.A., Kneip, J.M., Bond, J.H., Levitt, D.G. (1987) Quantitative assessment of luminal stirring in the perfused small intestine of the rat. *Am J Physiol*, 252 (3 Pt 1), G325-332.
12. Gerencser, G.A., Cerda, J., Burgin, C., Baig, M.M., Guild, R. (1984) Unstirred water layers in rabbit intestine: effects of pectin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 176 (2), 183-186.
13. Ho, N.F., Higuchi, W.I., Turi, J. (1972) Theoretical model studies of drug absorption and transport in the GI tract. 3. *J Pharm Sci*, 61 (2), 192-197.
14. Collett, A., Walker, D., Sims, E., He, Y.L., Speers, P., Ayrton, J., Rowland, M., Warhurst, G. (1997) Influence of morphometric factors on quantitation of paracellular permeability of intestinal epithelia in vitro. *Pharm Res*, 14 (6), 767-773.

15. Lobenberg, R., Amidon, G.L. (2000) Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm*, 50 (1), 3-12.
16. Abdou, H.M. (1989). Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence. Pennsylvania: Mack Publishing Company.
17. Rowland, M., Tozer, T., N. . (1995). Clinical pharmacokinetics. Concepts and applications (3 bs.). Philadelphia: Williams & Wilkins.
18. Stavchansky, S., A., McGinity, J., W. (1990). Bioavailability in Tablet Technology. H. Lieberman, A, L. Lachman & J. Schwartz, B. (Ed.). Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Volume 2 (2 bs., s. 349-553). New York: Marcel Dekker.
19. Lane, M.E., O'Driscoll, C.M., Corrigan, O.I. (1996) The relationship between rat intestinal permeability and hydrophilic probe size. *Pharm Res*, 13 (10), 1554-1558.
20. Ritschel, W.A. (1986). Handbook of Basic Pharmacokinetics (3 bs.). Hamilton: Drug Intelligence Publications.
21. Norris, D.A., Puri, N., Sinko, P.J. (1998) The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv Drug Deliv Rev*, 34 (2-3), 135-154.
22. Lennernas, H., Ahrenstedt, O., Ungell, A.L. (1994) Intestinal drug absorption during induced net water absorption in man; a mechanistic study using antipyrine, atenolol and enalaprilat. *Br J Clin Pharmacol*, 37 (6), 589-596.
23. Chiou, W.L., Chen, T.M., Choo, Y.S., Abdel-Hameed, M.H. (1992) Alternative derivation for the gastrointestinal absorption residence time. *J Pharm Sci*, 81 (5), 486-487.
24. Collett, A., Sims, E., Walker, D., He, Y.L., Ayrton, J., Rowland, M., Warhurst, G. (1996) Comparison of HT29-18-C1 and Caco-2 cell lines as models for studying intestinal paracellular drug absorption. *Pharm Res*, 13 (2), 216-221.
25. Suttle, A.B., Brouwer, K.L. (1994) Bile flow but not enterohepatic recirculation influences the pharmacokinetics of ranitidine in the rat. *Drug Metab Dispos*, 22 (2), 224-232.
26. Bijlsma, P.B., Peeters, R.A., Groot, J.A., Dekker, P.R., Taminiou, J.A., Van Der Meer, R. (1995) Differential in vivo and in vitro intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: a hypothesis. *Gastroenterology*, 108 (3), 687-696.
27. Jani, P.U., McCarthy, D.E., Florence, A.T. (1992) Nanosphere and microsphere uptake via peyer patches - observation of the rate of uptake in the rat after a single oral dose. *Int J Pharm*, 86 (2-3), 239-246.
28. Takamatsu, N., Welage, L.S., Idkaidek, N.M., Liu, D.Y., Lee, P.I.D., Hayashi, Y., Rhie, J.K., Lennernas, H., Barnett, J.L., Shah, V.P., Lesko, L., Amidon, G.L. (1997) Human intestinal permeability of piroxicam, propranolol, phenylalanine, and PEG 400 determined by jejunal perfusion. *Pharm Res*, 14 (9), 1127-1132.

- 29.FDA. (2000 August). Waiver of In Vivo Bioavailability Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Retrieved 15.06.2008. from <http://www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.pdf>.
- 30.Guyton, A., C., Hall, J., E. (2000). Textbook of Medical Physiology (10. bs.). Pennsylvania: W.B. Saunders Company.
- 31.Scherlock, S., Dooley, J. (2002). Diseases of the Liver and Biliary System (11. bs.). Milan: Blackwell Sciences.
- 32.Vekemans, K., Braet, F. (2005) Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World J Gastroenterol*, 11 (33), 5095-5102.
- 33.Lautt, W.W., Greenway, C.V. (1987) Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology*, 7 (5), 952-963.
- 34.Piscaglia, F., Donati, G., Gaiani, S., Gramantieri, L., Leoni, S., Mancini, M., Bolondi, L. (2004) Different haemodynamic effects of a single dose of long-acting isosorbide-5-mononitrate in healthy subjects and patients with cirrhotic portal hypertension. *Digest Liver Dis*, 36 (9), 594-602.
- 35.Campra, J., L., Reynolds, T., B. . (1988). The Hepatic Circulation. I. Arias, M., W. Jakoby, B., H. Popper, D. Schachter & D. Shafritz, A. (Ed.). The Liver Biology and Pathobiology (s. 911-930). New York: Raven Press.
- 36.Ballet, F. (1990) Hepatic circulation: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther*, 47 (2), 281-328.
- 37.Conley, P. (1980). The Blood. V. Mountcastle, B. (Ed.). Medical Physiology (s. 1126-1136). Missouri: C.V. Mobsy Company.
- 38.Bernuau, D., Poliard, A., Tournier, I., Salatrepat, J., Feldmann, G. (1985) All hepatocytes are involved in the expression of the albumin gene in the normal adult-rat - a demonstration by in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Cell Biol Int Rep*, 9 (1), 31-42.
- 39.Gumucio, J., J., Chianale, J. (1988). Liver cell heterogeneity and liver function. M. Arias I., W. Jakoby, B., H. Popper, D. Schachter & D. Shafritz, A. (Ed.). The Liver Biology and Pathology (2 bs., s. 931-947). New York: Raven Press.
- 40.Taub, R. (1996) Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *Faseb Journal*, 10 (4), 413-427.
- 41.Jurczyk, K., Wawrzynowicz-Syczewska, M., Boron-Kaczmarek, A., Sych, Z. (2001) Serum iron parameters in patients with alcoholic and chronic cirrhosis and hepatitis. *Med Sci Monit*, 7 (5), 962-965.
- 42.Plaats, A., V., D. (2005). The Groningen Hypothermic Liver Perfusion System for Improved Preservation in Organ Transplantation.Ph.D Thesis, University of Groningen, Groningen.
- 43.Bhunchet, E., Wake, K. (1998) The portal lobule in rat liver fibrosis: a re-evaluation of the liver unit. *Hepatology*, 27 (2), 481-487.

44. Kiernan, F. (1833) The anatomy and physiology of the liver. *Philos T R Soc B*, 123, 711-770.
45. Wikimedia Commons. 01.09, 2008, Ağ Sitesi:
http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Hepatic_lobule.jpg
46. Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Loughheed, W.M., Lotto, W.N. (1954) Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec*, 119 (1), 11-33.
47. Gumucio, J.J. (1983) Functional and anatomic heterogeneity in the liver acinus: impact on transport. *Am J Physiol*, 244 (6), G578-582.
48. Quistorff, B. (1990) Metabolic heterogeneity of liver parenchymal cells. *Essays Biochem*, 25, 83-136.
49. Gebhardt, R. (1992) Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther*, 53 (3), 275-354.
50. Katz, N.R. (1992) Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr*, 122 (3 Suppl), 843-849.
51. Slomianka, L. (2006). Blue Histology - Accessory Digestive Glands 01,06, 2008, Ağ Sitesi:
<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Liver/Liver.htm>
52. McCuskey, R.S. (2000) Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver*, 20 (1), 3-7.
53. Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P., McCuskey, R.S. (1985) The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology*, 5 (4), 683-692.
54. Sasse, D., Spornitz, U.M., Maly, I.P. (1992) Liver architecture. *Enzyme*, 46 (1-3), 8-32.
55. Knook, D.L., Sleyster, E.C. (1980) Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content. *Biochem Biophys Res Commun*, 96 (1), 250-257.
56. Blouin, A., Bolender, R.P., Weibel, E.R. (1977) Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol*, 72 (2), 441-455.
57. Wisse, E. (1970) An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res*, 31 (1), 125-150.
58. Smedsrod, B., De Bleser, P.J., Braet, F., Lovisetti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E., Geerts, A. (1994) Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut*, 35 (11), 1509-1516.
59. Goresky, C.A. (1963) A linear method for determining liver sinusoidal and extravascular volumes. *Am J Physiol*, 204, 626-640.

60. Bouwens, L., Baekeland, M., De Zanger, R., Wisse, E. (1986) Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology*, 6 (4), 718-722.
61. Wisse, E., Luo, D., Vermijlen, D., Kanellopoulou, C., De Zanger, R., Braet, F. (1997) On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin Liver Dis*, 17 (4), 265-286.
62. Wisse, E., van't Noordende, J.M., van der Meulen, J., Daems, W.T. (1976) The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell Tissue Res*, 173 (4), 423-435.
63. Martinezhernandez, A., Amenta, P.S. (1993) The hepatic extracellular-matrix 1: Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 423 (1), 1-11.
64. Martinez, J.R., Cassity, N. (1984) Effect of extracellular K⁺ on saliva secretion by isolated, perfused rat submandibular glands. *Arch Oral Biol*, 29 (9), 729-734.
65. Gulubova, M., Popov, A. (1996) Electron microscopic investigation on Ito cells and Disse's space in patients with extrahepatic cholestasis. Immunohistochemistry of collagen type IV and fibronectin in hepatic sinusoids. *Gen Diagn Pathol*, 141 (3-4), 187-192.
66. Minato, Y., Hasumura, Y., Takeuchi, J. (1983) The role of fat-storing cells in Disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Hepatology*, 3 (4), 559-566.
67. Hautekeete, M.L., Geerts, A. (1997) The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch*, 430 (3), 195-207.
68. Weibel, E.R., Staubli, W., Gnagi, H.R., Hess, F.A. (1969) Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol*, 42 (1), 68-91.
69. Grisham, J.W., Nopanitaya, W., Compagno, J., Nagel, A.E. (1975) Scanning electron microscopy of normal rat liver: the surface structure of its cells and tissue components. *Am J Anat*, 144 (3), 295-321.
70. Arias, I., M., Jakoby, W., B., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D., A. (1988). *The Liver Biology and Pathobiology* (2 bs.). New York: Raven Press.
71. Jorge, A.D., Gutierrez, L.S., Jorge, O., Burgos, M.H. (2002) Ultrastructural and cytochemical changes in the liver of primary biliary cirrhosis patients. *Biocell*, 26 (2), 253-262.
72. McCuskey, R.S. (1966) A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *Am J Anat*, 119 (3), 455-477.
73. Yamamoto, K., Sherman, I., Phillips, M.J., Fisher, M.M. (1985) 3-Dimensional observations of the hepatic arterial terminations in rat, hamster and human-liver by scanning electron-microscopy of microvascular casts. *Hepatology*, 5 (3), 452-456.

74. Field, C.D., Andrews, W.H. (1968) Investigation of the hepatic arterial "space" under various conditions of flow in the isolated perfused dog liver. *Circ Res*, 23 (5), 611-622.
75. Ahmad, A.B., Bennett, P.N., Rowland, M. (1984) Influence of route of hepatic administration on drug availability. *J Pharmacol Exp Ther*, 230 (3), 718-725.
76. Reichen, J. (1988) Role of the hepatic artery in canalicular bile formation by the perfused rat liver. A multiple indicator dilution study. *J Clin Invest*, 81 (5), 1462-1469.
77. Kassissia, I., Brault, A., Huet, P.M. (1994) Hepatic artery and portal vein vascularization of normal and cirrhotic rat liver. *Hepatology*, 19 (5), 1189-1197.
78. Pang, K.S., Sherman, I.A., Schwab, A.J., Geng, W., Barker, F., 3rd, Dlugosz, J.A., Cuerrier, G., Goresky, C.A. (1994) Role of the hepatic artery in the metabolism of phenacetin and acetaminophen: intravital microscopic and multiple-indicator dilution study in perfused rat liver. *Hepatology*, 20 (3), 672-683.
79. Sahin, S., Rowland, M. (1998) Estimation of specific hepatic arterial water space. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 38 (2), G228-G236.
80. Sherman, I.A., Dlugosz, J.A., Barker, F., Sadeghi, F.M., Pang, K.S. (1996) Dynamics of arterial and portal venous flow interactions in perfused rat liver: An intravital microscopic study. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 34 (1), G201-G210.
81. Brauer, R.W., Leong, G.F., Mcelroy, R.F., Holloway, R.J. (1956) Hemodynamics of the vascular tree of the isolated rat liver preparation. *Am J Physiol*, 186 (3), 537-542.
82. Hollenberg, M., Doughert, J. (1966) Liver blood flow measured by portal venous and hepatic arterial routes with Kr85. *Am J Physiol*, 210 (5), 926-&.
83. Lutt, W.W., Daniels, T.R. (1983) Differential effect of taurocholic acid on hepatic arterial resistance vessels and bile-flow. *Am J Physiol*, 244 (4), G366-G369.
84. Lutt, W.W., Legare, D.J., Daniels, T.R. (1984) The comparative effect of administration of substances via the hepatic-artery or portal-vein on hepatic arterial resistance, liver blood-volume and hepatic extraction in cats. *Hepatology*, 4 (5), 927-932.
85. Gasconbarre, M., Huet, P.M., Stongebrault, G., Brault, A., Kassissia, I. (1988) Liver extraction of vitamin-D3 is independent of its hepatic venous or arterial route of delivery - studies in isolated-perfused rat-liver preparations. *J Pharmacol Exp Ther*, 245 (3), 975-981.
86. Ikeda, T., Terasawa, H., Ishimura, M., Ochi, H., Fujiyama, K., Hoshino, T., Tanaka, Y., Mashiba, H. (1993) Hepatic extraction and hepatic action of insulin, glucagon, and epinephrine in bivascularly perfused-rat-liver. *Jpn J Physiol*, 43 (3), 371-378.

87. Kuan, H.Y., Smith, D.E., Ensminger, W.D., Knol, J.A., DeRemer, S.J., Yang, Z.M., Stetson, P.L. (1996) Regional pharmacokinetics of 5-bromo-2'-deoxyuridine and 5-fluorouracil in dogs: Hepatic arterial versus portal venous infusions. *Cancer Res*, 56 (20), 4724-4727.
88. Meyerholz, H.H., Gardemann, A., Jungermann, K. (1991) Control of glycogenolysis and blood-flow by arterial and portal adrenaline in perfused liver. *Biochem J*, 275, 609-616.
89. Gardemann, A., Jahns, U., Jungermann, K. (1991) Control of glycogenolysis and blood-flow by arterial and portal norepinephrine in perfused liver. *Am J Physiol*, 260 (5), E762-E771.
90. Shiotani, M., Ku, Y., Kusunoki, N., Kitagawa, T., Maeda, I., Tominaga, M., Tanigawara, Y., Kuroda, Y., Saitoh, Y. (1995) Pharmacokinetic comparison of intraarterial and intraportal infusion of adriamycin in regional chemotherapy of the liver. *Gan To Kagaku Ryoho*, 22 (11), 1560-1562.
91. Iwasaki, T., Ku, Y.S., Kusunoki, N., Tominaga, M., Fukumoto, T., Muramatsu, S., Kuroda, Y. (1998) Regional pharmacokinetics of doxorubicin following hepatic arterial and portal venous administration: Evaluation with hepatic venous isolation and charcoal hemoperfusion. *Cancer Res*, 58 (15), 3339-3343.
92. Sahin, S., Rowland, M. (2000) Evaluation of route of input on the hepatic disposition of diazepam. *J Pharmacol Exp Ther*, 295 (2), 836-843.
93. Sahin, S. (2003) Perfused liver preparations and its applications. *FABAD J Pharm. Sci.*, 28 (1), 39-49.
94. Kuntz, E., Kuntz, H., D. (2001). *Hepatology Principles and Practice* (1 bs.). Hiedelberg: Springer-Verlag.
95. Ellidokuz, B., E. (2003). Siroz. O. Dilek, N. (Ed.). Karaciğer (1 bs., c. 2, s. 631-638). Afyon: T.C. Afyon Kocatepe Üniversitesi.
96. Child, C.G., Turcotte, J.G. (1964) Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg*, 1, 1-85.
97. Pugh, R.N., Murray-Lyon, I.M., Dawson, J.L., Pietroni, M.C., Williams, R. (1973) Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*, 60 (8), 646-649.
98. Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., Denk, H., Desmet, V., Korb, G., MacSween, R.N., et al. (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*, 22 (6), 696-699.
99. Lee, S.S., Girod, C., Braillon, A., Hadengue, A., Lebrec, D. (1986) Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol*, 251 (2 Pt 1), G176-180.
100. Li, X.N., Huang, C.T., Wang, X.H., Leng, X.S., Du, R.Y., Chen, Y.F., Hou, X. (1990) Changes of blood humoral substances in experimental cirrhosis and their effects on portal hemodynamics. *Chin Med J (Engl)*, 103 (12), 970-977.

101. Natarajan, S.K., Thomas, S., Ramamoorthy, P., Basivireddy, J., Pulimood, A.B., Ramachandran, A., Balasubramanian, K.A. (2006) Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 (6), 947-957.
102. Kountouras, J., Billing, B.H., Scheuer, P.J. (1984) Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*, 65 (3), 305-311.
103. Biecker, E., Neef, M., Sagesser, H., Shaw, S., Koshy, A., Reichen, J. (2004) Nitric oxide synthase 1 is partly compensating for nitric oxide synthase 3 deficiency in nitric oxide synthase 3 knock-out mice and is elevated in murine and human cirrhosis. *Liver Int*, 24 (4), 345-353.
104. Burns, R.C., Wu, Y., Sitzmann, J.V. (1995) Role of cirrhosis in the hemodynamic response to hemorrhage in portal hypertension. *Surgery*, 117 (5), 488-493.
105. Kamath, P.S., Tyce, G.M., Miller, V.M., Edwards, B.S., Rorie, D.K. (1999) Endothelin-1 modulates intrahepatic resistance in a rat model of noncirrhotic portal hypertension. *Hepatology*, 30 (2), 401-407.
106. Fernández-Martínez, E., Morales-Ríos, M., S., Pérez-Álvarez, V., Muriel, P. (2001) Effects of thalidomide and 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanamide on bile duct obstruction-induced cirrhosis in the rat. *Drug Develop Res*, 54, 209-218.
107. Rivera-Espinosa, L., Muriel, P., Ordaz Gallo, M., Perez-Urizar, J., Palma-Aguirre, A., Castaneda-Hernandez, G. (2003) Ketorolac pharmacokinetics in experimental cirrhosis by bile duct ligation in the rat. *Ann Hepatol*, 2 (4), 175-181.
108. Laleman, W., Vander Elst, I., Zeegers, M., Servaes, R., Libbrecht, L., Roskams, T., Fevery, J., Nevens, F. (2006) A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest*, 36 (4), 242-249.
109. Abraldes, J.G., Pasarin, M., Garcia-Pagan, J.C. (2006) Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol*, 12 (41), 6577-6584.
110. Jimenez, W., Claria, J., Arroyo, V., Rodes, J. (1992) Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 7 (1), 90-97.
111. Graupera, M., Garcia-Pagan, J.C., Titos, E., Claria, J., Massaguer, A., Bosch, J., Rodes, J. (2002) 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology*, 122 (2), 387-393.
112. Kamada, Y., Tamura, S., Kiso, S., Matsumoto, H., Saji, Y., Yoshida, Y., Fukui, K., Maeda, N., Nishizawa, H., Nagaretani, H., Okamoto, Y., Kihara, S., Miyagawa, J., Shinomura, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (2003) Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology*, 125 (6), 1796-1807.

113. Corbin, I.R., Buist, R., Peeling, J., Zhang, M., Uhanova, J., Minuk, G.Y. (2003) Hepatic 31P MRS in rat models of chronic liver disease: assessing the extent and progression of disease. *Gut*, 52 (7), 1046-1053.
114. Nagano, K., Sasaki, T., Umeda, Y., Nishizawa, T., Ikawa, N., Ohbayashi, H., Arito, H., Yamamoto, S., Fukushima, S. (2007) Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *Inhal Toxicol*, 19 (13), 1089-1103.
115. Nagano, K., Umeda, Y., Saito, M., Nishizawa, T., Ikawa, N., Arito, H., Yamamoto, S., Fukushima, S. (2007) Thirteen-week inhalation toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J Occup Health*, 49 (4), 249-259.
116. Popov, Y., Patsenker, E., Bauer, M., Niedobitek, E., Schulze-Krebs, A., Schuppan, D. (2006) Halofuginone induces matrix metalloproteinases in rat hepatic stellate cells via activation of p38 and NFkappaB. *J Biol Chem*, 281 (22), 15090-15098.
117. Li, X., Benjamin, I.S., Alexander, B. (2002) Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol*, 36 (4), 488-493.
118. Okuyama, H., Nakamura, H., Shimahara, Y., Uyama, N., Kwon, Y.W., Kawada, N., Yamaoka, Y., Yodoi, J. (2005) Overexpression of thioredoxin prevents thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *J Hepatol*, 42 (1), 117-123.
119. Luo, B., Liu, L., Tang, L., Zhang, J., Ling, Y., Fallon, M.B. (2004) ET-1 and TNF-alpha in HPS: analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286 (2), G294-303.
120. Yeh, C.N., Maitra, A., Lee, K.F., Jan, Y.Y., Chen, M.F. (2004) Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma. *Carcinogenesis*, 25 (4), 631-636.
121. Perez Tamayo, R. (1983) Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, 3 (1), 112-120.
122. Verbeeck, R.K., Horsmans, Y. (1998) Effect of hepatic insufficiency on pharmacokinetics and drug dosing. *Pharm World Sci*, 20 (5), 183-192.
123. Tegeder, I., Lotsch, J., Geisslinger, G. (1999) Pharmacokinetics of opioids in liver disease. *Clin Pharmacokinet*, 37 (1), 17-40.
124. Klotz, U., Avant, G.R., Hoyumpa, A., Schenker, S., Wilkinson, G.R. (1975) The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. *J Clin Invest*, 55 (2), 347-359.
125. Scripture, C.D., Pieper, J.A. (2001) Clinical pharmacokinetics of fluvastatin. *Clin Pharmacokinet*, 40 (4), 263-281.
126. Fenyves, D., Gariépy, L., Villeneuve, J.P. (1993) Clearance by the liver in cirrhosis. I. Relationship between propranolol metabolism in vitro and its extraction by the perfused liver in the rat. *Hepatology*, 17 (2), 301-306.

127. Zylber-Katz, E., Caraco, Y., Granit, L., Levy, M. (1995) Dipyrone metabolism in liver disease. *Clin Pharmacol Ther*, 58 (2), 198-209.
128. Li, G., Treiber, G., Maier, K., Walker, S., Klotz, U. (1993) Disposition of ibuprofen in patients with liver cirrhosis. Stereochemical considerations. *Clin Pharmacokinet*, 25 (2), 154-163.
129. Westphal, J.F., Brogard, J.M. (1993) Clinical pharmacokinetics of newer antibacterial agents in liver disease. *Clin Pharmacokinet*, 24 (1), 46-58.
130. Ekpe, A., Tong, J.H., Rodriguez, L. (2001) High-performance liquid chromatographic method development and validation for the simultaneous quantitation of naproxen sodium and pseudoephedrine hydrochloride impurities. *J Chromatogr Sci*, 39 (3), 81-86.
131. Dinc, E., Ozdemir, A., Aksoy, H., Ustundag, O., Baleanu, D. (2006) Chemometric determination of naproxen sodium and pseudoephedrine hydrochloride in tablets by HPLC. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 54 (4), 415-421.
132. Monser, L., Darghouth, F. (2003) Simultaneous determination of naproxen and related compounds by HPLC using porous graphitic carbon column. *J Pharm Biomed Anal*, 32 (4-5), 1087-1092.
133. Mitakos, A., Panderi, I. (2002) A validated LC method for the determination of clopidogrel in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal*, 28 (3-4), 431-438.
134. Carrasco-Portugal Mdel, C., Herrera, J.E., Reyes-Garcia, G., Medina-Santillan, R., Flores-Murrieta, F.J. (2006) Comparative bioavailability of two oral suspensions of naproxen sodium. *Arzneimittelforschung*, 56 (8), 589-592.
135. Bansal, V., Dex, T., Proskin, H., Garreffa, S. (2001) A look at the safety profile of over-the-counter naproxen sodium: a meta-analysis. *J Clin Pharmacol*, 41 (2), 127-138.
136. Tashitush, B.M., Al-Taani, B.M. (2003) HPLC determination of naproxen in plasma. *Pharmazie*, 58 (9), 614-615.
137. Nielsen-Kudsk, F. (1980) HPLC-determination of some antiinflammatory, weak analgesic and uricosuric drugs in human blood plasma and its application to pharmacokinetics. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 47 (4), 267-273.
138. Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Matsumoto, H., Nishida, M. (2000) Simultaneous analysis of naproxen, nabumetone and its major metabolite 6-methoxy-2-naphthylacetic acid in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 23 (5), 917-925.
139. Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Valizadeh, H. (2005) Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *J Pharm Biomed Anal*, 39 (3-4), 624-630.
140. Segre, E.J. (1980) Naproxen sodium (Anaprox): pharmacology, pharmacokinetics and drug interactions. *J Reprod Med*, 25 (4 Suppl), 222-225.

141. Di Martino, P., Barthelemy, C., Joiris, E., Capsoni, D., Masic, A., Massarotti, V., Gobetto, R., Bini, M., Martelli, S. (2007) A new tetrahydrated form of sodium naproxen. *J Pharm Sci*, 96 (1), 156-167.
142. Moyer, S. (1986) Pharmacokinetics of naproxen sodium. *Cephalalgia*, 6 Suppl 4, 77-80.
143. Li, J.J., Norton, M.B., Reinhard, E.J., Anderson, G.D., Gregory, S.A., Isakson, P.C., Koboldt, C.M., Masferrer, J.L., Perkins, W.E., Seibert, K., Zhang, Y., Zweifel, B.S., Reitz, D.B. (1996) Novel terphenyls as selective cyclooxygenase-2 inhibitors and orally active anti-inflammatory agents. *J Med Chem*, 39 (9), 1846-1856.
144. Toothaker, R.D., Barker, S.H., Gillen, M.V., Helsinger, S.A., Kindberg, C.G., Hunt, T.L., Powell, J.H. (2000) Absence of pharmacokinetic interaction between orally co-administered naproxen sodium and diphenhydramine hydrochloride. *Biopharm Drug Dispos*, 21 (6), 229-233.
145. Todd, P.A., Clissold, S.P. (1990) Naproxen. A reappraisal of its pharmacology, and therapeutic use in rheumatic diseases and pain states. *Drugs*, 40 (1), 91-137.
146. Lo, A., Addison, R.S., Hooper, W.D., Dickinson, R.G. (2001) Disposition of naproxen, naproxen acyl glucuronide and its rearrangement isomers in the isolated perfused rat liver. *Xenobiotica*, 31 (6), 309-319.
147. Hughes, J.A., Sudell, W. (1983) Hemolytic anemia associated with naproxen. *Arthritis Rheum*, 26 (8), 1054.
148. Nygard, N., Starkebaum, G. (1987) Naproxen and agranulocytosis. *JAMA*, 257 (13), 1732.
149. Ravi, S., Keat, A.C., Keat, E.C. (1986) Colitis caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Postgrad Med J*, 62 (730), 773-776.
150. Kahn, L.H., Chen, M., Eaton, R. (1997) Over-the-counter naproxen sodium and esophageal injury. *Ann Intern Med*, 126 (12), 1006.
151. Farshi, F., S., Çapan, Y., Hincal, A., A. (1996) Biyoavailability File: Furosemide. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 21 (2), 87-95.
152. Sekikawa, H., Yagi, N., Oda, K., Kenmotsu, H., Takada, M., Chen, H.F., Lin, E.T., Benet, L.Z. (1995) Biliary excretion of furosemide glucuronide in rabbits. *Biol Pharm Bull*, 18 (3), 447-453.
153. Matsuura, A., Nagayama, T., Kitagawa, T. (1993) Automated high-performance liquid chromatographic method for determination of furosemide in dog plasma. *J Chromatogr*, 617 (2), 339-343.
154. Sidhu, J.S., Charles, B.G. (1993) Simple microscale high-performance liquid chromatographic method for determination of furosemide in neonatal plasma. *J Chromatogr*, 612 (1), 161-165.
155. Farthing, D., Karnes, T., Gehr, T.W., March, C., Fakhry, I., Sica, D.A. (1992) External-standard high-performance liquid chromatographic method for

- quantitative determination of furosemide in plasma by using solid-phase extraction and on-line elution. *J Pharm Sci*, 81 (6), 569-571.
156. Reeuwijk, H.J., Tjaden, U.R., van der Greef, J. (1992) Simultaneous determination of furosemide and amiloride in plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr*, 575 (2), 269-274.
157. Singh, A.K., McArdle, C., Gordon, B., Ashraf, M., Granley, K. (1989) Simultaneous analysis of furosemide and bumetanide in horse plasma using high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 3 (6), 262-265.
158. Seifart, H.I., Kruger, P.B., Parkin, D.P., van Jaarsveld, P.P., Donald, P.R. (1993) Therapeutic monitoring of antituberculosis drugs by direct in-line extraction on a high-performance liquid chromatography system. *J Chromatogr*, 619 (2), 285-290.
159. Ohta, T., Takamiya, I., Takitani, S. (1994) Carbonic anhydrase-immobilized precolumn for selective on-line sample pretreatment in high-performance liquid chromatographic determination of certain sulphonamide drugs. *Biomed Chromatogr*, 8 (4), 184-188.
160. Vree, T.B., van den Biggelaar-Marteau, M., Verwey-van Wissen, C.P. (1994) Determination of furosemide with its acyl glucuronide in human plasma and urine by means of direct gradient high-performance liquid chromatographic analysis with fluorescence detection. Preliminary pharmacokinetics and effect of probenecid. *J Chromatogr B*, 655 (1), 53-62.
161. Barroso, M.B., Jimenez, R.M., Alonso, R.M., Ortiz, E. (1996) Determination of piretanide and furosemide in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J Chromatogr B*, 675 (2), 303-312.
162. Koves, E.M. (1995) Use of high-performance liquid chromatography-diode array detection in forensic toxicology. *J Chromatogr A*, 692 (1-2), 103-119.
163. Burg, M.B. (1976) Tubular chloride transport and the mode of action of some diuretics. *Kidney Int*, 9 (2), 189-197.
164. Hammarlund, M.M., Paalzow, L.K., Odland, B. (1984) Pharmacokinetics of furosemide in man after intravenous and oral administration. Application of moment analysis. *Eur J Clin Pharmacol*, 26 (2), 197-207.
165. Naranjo, C.A., Busto, U., Cassis, L. (1978) Furosemide-induced adverse reactions during hospitalization. *Am J Hosp Pharm*, 35 (7), 794-798.
166. Ahmad, S. (1974) Renal insensitivity to furosemide caused by chronic anticonvulsant therapy. *Br Med J*, 3 (5932), 657-659.
167. Fine, A., Henderson, I.S., Morgan, D.R., Tilstone, W.J. (1977) Malabsorption of furosemide caused by phenytoin. *Br Med J*, 2 (6094), 1061-1062.
168. Yassa, R., Nastase, C., Camille, Y., Henderson, M., Belzile, L., Beland, F. (1987) Carbamazepine, diuretics, and hyponatremia: a possible interaction. *J Clin Psychiatry*, 48 (7), 281-283.

169. Webster, J. (1985) Interactions of NSAIDs with diuretics and beta-blockers mechanisms and clinical implications. *Drugs*, 30 (1), 32-41.
170. Thummel, K., E., Shen, E., D., D., Isoherranen, N., Smith, H., E. (2008). Appendix II. Design and Optimization of Dosage Regimens: Pharmacokinetic Data 15.06, 2008, Ağ Sitesi: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=956421>
171. EP. (2002). European Pharmacopoeia (4 bs.). Strasbourg: Druckerei C.H. Beck.
172. Moffat, A., C. (1986). Clarke' Isolation and Identification of Drugs (2 bs.). London: The Pharmaceutical Press.
173. USP. (2000). The United States Pharmacopeia XXIV. Retrieved. from.
174. Kasim, N.A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernas, H., Hussain, A.S., Junginger, H.E., Stavchansky, S.A., Midha, K.K., Shah, V.P., Amidon, G.L. (2004) Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm*, 1 (1), 85-96.
175. Stretch, G., L. (1997). Models of Intestinal Absorption: Studies Using Paracellular Probe Molecules. Ph.D. Thesis, University of Manchester, Manchester.
176. Bressolle, F., BrometPetit, M., Audran, M. (1996) Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods - Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B*, 686 (1), 3-10.
177. FDA. (2001 May). Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation. Retrieved 15.06.2008. from <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fn1.pdf>.
178. Shabir, G.A. (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A*, 987 (1-2), 57-66.
179. Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., McDowall, R.D., Pittman, K.A., Spector, S. (1992) Analytical methods validation - bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci*, 81 (3), 309-312.
180. Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., McKay, G., Miller, K.J., Patnaik, R.N., Powell, M.L., Tonelli, A., Viswanathan, C.T., Yacobi, A. (2000) Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharm Res*, 17 (12), 1551-1557.
181. Swartz, M., Krull, I. (2003) Validation of bioanalytical methods; highlights of FDA's guidance. *LCGC North America*, 21 (2), 136-142.
182. Doluisio, J.T., Billups, N.F., Dittert, L.W., Sugita, E.T., Swintosk, J.V. (1969) Drug absorption I: An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci*, 58 (10), 1196-&.

183. Barr, W.H. (1991). The role of intestinal metabolism on bioavailability. J. Swarbrick (Ed.). *Pharmaceutical Bioequivalence* (s. 149-168). New York.: Marcel Dekker.
184. Dackson, K., Stone, J.A., Palin, K.J., Charman, W.N. (1992) Evaluation of the mass balance assumption with respect to the 2-resistance model of intestinal-absorption by using *n* situ single-pass intestinal perfusion of theophylline in rats. *J Pharm Sci*, 81 (4), 321-325.
185. Berggren, S., Hoogstraate, J., Fagerholm, U., Lennernas, H. (2004) Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using *n* situ and *n* vitro absorption models. *Eur J Pharm Sci*, 21 (4), 553-560.
186. Lindahl, A., Frid, S., Ungell, A.L., Lennern, H. (2000) No evidence for the involvement of the multidrug resistance-associated protein and/or the monocarboxylic acid transporter in the intestinal transport of fluvastatin in rats. *AAPS Pharmsci*, 2 (3), art. no.-26.
187. Grassi, M., Cadelli, G. (2001) Theoretical considerations on the *n* vivo intestinal permeability determination by means of the single pass and recirculating techniques. *Int J Pharm*, 229 (1-2), 95-105.
188. Meijer, G.W., Geelen, M.J.H., Vanherck, H., Mullink, J.W.M.A., Vanzutphen, L.F.M., Beynen, A.C. (1990) A Method for perfusion of the isolated rabbit liver through the portal-vein and the hepatic-artery in a recirculating system. *Lab Anim-UK*, 24 (1), 14-24.
189. Meijer, D.K., Keulemans, K., Mulder, G.J. (1981) Isolated perfused rat liver technique. *Methods Enzymol*, 77, 81-94.
190. Lindenberg, M., Kopp, S., Dressman, J.B. (2004) Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm*, 58 (2), 265-278.
191. Ponce, Y.M., Perez, M.A.C., Zaldivar, V.R., Diaz, H.G., Torrens, F. (2004) A new topological descriptors based model for predicting intestinal epithelial transport of drugs in caco-2 cell culture. *J Pharm Pharm Sci*, 7 (2), 186-199.
192. Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Azarmi, Y., Barzegar-Jalali, M., Tajerzadeh, H. (2006) Simultaneous determination of metoprolol, propranolol and phenol red in samples from rat *n* situ intestinal perfusion studies. *DARU*, 14 (2), 102-108.
193. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46 (1-3), 3-26.
194. Zakeri-Milani, P., Tajerzadeh, H., Islambolchilar, Z., Barzegar, S., Valizadeh, H. (2006) The relation between molecular properties of drugs and their transport across the intestinal membrane. *DARU*, 14 (4), 164-171.

195. Lipka, E., Amidon, G.L. (1999) Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J Control Release*, 62 (1-2), 41-49.
196. Alsenz, J., Haenel, E. (2003) Development of a 7-day, 96-well Caco-2 permeability assay with high-throughput direct UV compound analysis. *Pharm Res*, 20 (12), 1961-1969.
197. Aoki, Y., Morishita, M., Asai, K., Akikusa, B., Hosoda, S., Takayama, K. (2005) Region-dependent role of the mucous/glycocalyx layers in insulin permeation across rat small intestinal membrane. *Pharm Res*, 22 (11), 1854-1862.
198. Koga, K., Ishitobi, Y., Kawashima, S., Taniguchi, M., Murakami, M. (2004) Membrane permeability and antipyrine absorption in a rat model of ischemic colitis. *Int J Pharm*, 286 (1-2), 41-52.
199. Lennernas, H., Knutson, L., Knutson, T., Hussain, A., Lesko, L., Salmonson, T., Amidon, G.L. (2002) The effect of amiloride on the in vivo effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *Eur J Pharm Sci*, 15 (3), 271-277.
200. Lennernas, H., Palm, K., Fagerholm, U., Artursson, P. (1996) Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int J Pharm*, 127 (1), 103-107.
201. 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. *Pharm Res*, 22 (1), 11-23.
202. Goresky, C.A., Silverman, M. (1964) Effect of correction of catheter distortion on calculated liver sinusoidal volumes. *Am J Physiol*, 207 (4), 883-892.
203. Goresky, C.A., Bach, G.G., Gordon, E.R. (1981) Uptake of straight-chain monohydric alcohols by the liver. *Microvasc Res*, 21 (2), 243-243.
204. Barrowman, J.A., Perry, M.A., Kvietys, P.R., Granger, D.N. (1982) Exclusion phenomenon in the liver interstitium. *Am J Physiol*, 243 (5), G410-G414.
205. Garipey, L., Fenyves, D., Kassissia, I., Villeneuve, J.P. (1993) Clearance by the liver in cirrhosis. II. Characterization of propranolol uptake with the multiple-indicator dilution technique. *Hepatology*, 18 (4), 823-831.
206. Reinoso, R.F., Telfer, B.A., Rowland, M. (1997) Tissue water content in rats measured by desiccation. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 38 (2), 87-92.
207. Tisavipat, A., Vibulsreth, S., Sheng, H.P., Huggins, R.A. (1974) Total body water measured by desiccation and by tritiated water in adult rats. *J Appl Physiol*, 37 (5), 699-701.
208. Culebras, J.M., Fitzpatrick, G.F., Brennan, M.F., Boyden, C.M., Moore, F.D. (1977) Total body water and the exchangeable hydrogen. II. A review of comparative data from animals based on isotope dilution and desiccation, with a report of new data from the rat. *Am J Physiol*, 232 (1), R60-65.

- 209.Pang, K.S., Lee, W.F., Cherry, W.F., Yuen, V., Accaputo, J., Fayz, S., Schwab, A.J., Goresky, C.A. (1988) Effects of perfusate flow rate on measured blood volume, disse space, intracellular water space, and drug extraction in the perfused rat liver preparation: characterization by the multiple indicator dilution technique. *J Pharmacokinet Biopharm*, 16 (6), 595-632.
- 210.Pang, K.S., Xu, N., Goresky, C.A. (1991) D₂O as a substitute for ³H₂O, as a reference indicator in liver multiple-indicator dilution studies. *Am J Physiol*, 261 (6 Pt 1), G929-936.
- 211.Roberts, M.S., Fraser, S., Wagner, A., McLeod, L. (1990) Residence time distributions of solutes in the perfused rat liver using a dispersion model of hepatic elimination: 2. Effect of pharmacological agents, retrograde perfusions, and enzyme inhibition on evans blue, sucrose, water, and taurocholate. *J Pharmacokinet Biopharm*, 18 (3), 235-258.
- 212.Sahin, S., Rowland, M. (1998) Development of an optimal method for the dual perfusion of the isolated rat liver. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 39 (1), 35-43.
- 213.Robinson, R.A. (1975) Physicochemical structure of bone. *Clin Orthop Relat R* (112), 263-315.
- 214.Kaul, S., Ritschel, W.A. (1986) Total-body water as an index for predicting body-fat in rats. *Arzneimittel -Forschung*, 36-1 (1), 112-116.
- 215.Sahin, S., Karabey, Y., Kaynak, M.S., Hincal, A.A. (2006) Potential use of freeze-drying technique for estimation of tissue water content. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 28 (4), 211-215.
- 216.Debinski, H.S., Lee, C.S., Danks, J.A., Mackenzie, P.I., Desmond, P.V. (1995) Localization of uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase in human liver-injury. *Gastroenterology*, 108 (5), 1464-1469.
- 217.Fuller, R., Hoppel, C., Ingalls, S.T. (1981) Furosemide kinetics in patients with hepatic cirrhosis with ascites. *Clin Pharmacol Ther*, 30 (4), 461-467.
- 218.Sawhney, V.K., Gregory, P.B., Swezey, S.E., Blaschke, T.F. (1981) Furosemide disposition in cirrhotic patients. *Gastroenterology*, 81 (6), 1012-1016.
- 219.Gonzalez, G., Arancibia, A., Rivas, M.I., Caro, P., Antezana, C. (1982) Pharmacokinetics of furosemide in patients with hepatic cirrhosis. *Eur J Clin Pharmacol*, 22 (4), 315-320.
- 220.Villeneuve, J.P., Verbeeck, R.K., Wilkinson, G.R., Branch, R.A. (1986) Furosemide kinetics and dynamics in patients with cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther*, 40 (1), 14-20.

ÖZGEÇMİŞ

18 Ocak 1974 tarihinde Mersin’de doğdum. İlk orta ve lise eğitimimi sırasıyla İleri İlkokulu ve Mersin Tefvik Sırrı Gür Lisesi’nde tamamladım. 1991 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde lisans eğitimime başladım. 1996 yılında mezun oldum, aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Yüksek Lisans Programda yüksek lisansa başladım ve aynı zamanda Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalın’a araştırma görevlisi olarak atandım. 16 Şubat 2000 tarihinde yüksek lisans eğitimimi tamamladım Mart 2000 – Temmuz 2001 arasında askerlik görevimi Ankara’da 600 Yataklı Mevki Asker Hastanesinde tamamladım. Hemen arkasından Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Programında Doktora Programında doktora tez çalışmalarına ve Hacettepe Üniversitesi eczacılık fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’ndaki araştırma görevlisi görevime başladım. Halen bu göreve devam etmekteyim. Çalışma konularım: Kontrollü salım sağlayan katı dozaj şekilleri (tablet, pellet ve granül), biyofarmasötik, biyofarmasötik sınıflandırma sistemi, farmakokinetik, sıçan barsak perfüzyonu çalışmaları, karaciğer perfüzyonu, siroz geliştirilmiş sıçanlarda ilaç dağılımı ve eliminasyonudur.

EKLER



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Hacettepe 06100, ANKARA

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/

10.11.2005

DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 10.11.2005 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI : 2005/9
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2005/63
KARAR NUMARASI : 2005/63 - 1
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Ecz. Mustafa Sinan Kaynak, Ecz. Esin Sayar
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Sprague-Dawley sıçanları (60 adet).

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Selma Şahin'in araştırma yürütücüsü olduğu, 2005/63 kayıt numaralı ve "Normal ve Siroz Geliştirilmiş Sıçanlarda İlaçların İntestinal Permeabilitesinin Araştırılması" konulu araştırma deney protokolü Hayvan Etik Kurulu'nda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak onaylanmasına karar verilmiştir.


 Prof. Dr. Sevim Dalkara (Üye)


 Prof. Dr. Arifna Dağdeviren (Başkan)


 Prof. Dr. Hakan Orer (Üye)


 Prof. Dr. Sema Çalış (Üye)


KATILMADI
 Prof.Dr. Erdem Aydın (Üye)

KATILMADI
 Prof.Dr. Ömer Görduysus (Üye)

KATILMADI
 Doç.Dr. Nuray Er (Üye)

KATILMADI
 Doç.Dr. Ahmet Alanay (Üye)


 Doç.Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)


 Dr. V. H. Hyas Onbaşılar (Üye)


 Avukat Oya Soyuer (Üye)



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Hacettepe 06100, ANKARA

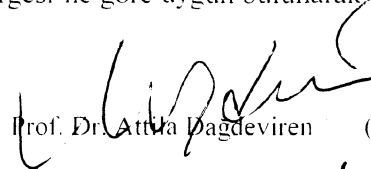
Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/

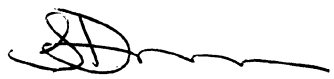
11.11.2004


DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 11.11.2004 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI : 2004/9
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2004/58
KARAR NUMARASI : 2004/58-4
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Ecz. Mustafa Sinan Kaynak (B.U.)
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Sıçan (192 adet).

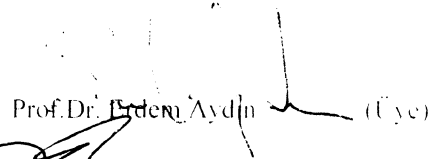
Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Selma Şahin' in araştırma yürütücüsü olduğu 2004/58 kayıt numaralı ve "*Siroz Geliştirilmiş Sıçanlarda İlaç Dağılımı ve Eliminasyonu Üzerine Veriliş Yolunun Etkisi*" konulu araştırma deney protokolü Hayvan Etik Kurulu'nda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma: Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi' ne göre uygun bulunarak onaylanmasına karar verilmiştir.

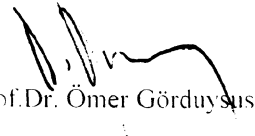

 Prof. Dr. Atilla Dağdeviren (Başkan)

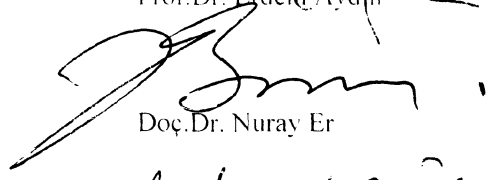

 Prof. Dr. Sevim Dalkara (Üye)



 Prof. Dr. Haşan Ozer (Üye)


 Prof. Dr. Sema Çalış (Üye)

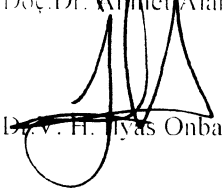

 Prof. Dr. Erdem Aydın (Üye)



 Prof. Dr. Ömer Görduşus (Üye)


 Doç. Dr. Nuray Er (Üye)


 Doç. Dr. Ahmet Alanay (Üye)


 Doç. Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)


 Dr. v. H. İlyas Onbaşıl (Üye)


 Avukat Oya Soyuer (Üye)