

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

**KARACİĞERDEKİ İLAÇ DISPOZİSYONU ÜZERİNE
RİFAMPİSİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ VE
FARMAKOKİNETİK MODELLEME**

Ecz. Nihan İZAT

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2020**

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

**KARACİĞERDEKİ İLAÇ DISPOZİSYONU ÜZERİNE
RİFAMPİSİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ VE
FARMAKOKİNETİK MODELLEME**

Ecz. Nihan İZAT

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Selma Şahin

ANKARA

2020

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KARACİĞERDEKİ İLAÇ DİSPOZİSYONU ÜZERİNE RİFAMPİSİNİN ETKİSİNİN
İNCELENMESİ VE FARMAKOKİNETİK MODELLEME

Nihan İzat

Danışman: Prof. Dr. Selma Şahin

Bu tez çalışması 19.11.2020 tarihinde jürimiz tarafından “Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Levent Öner*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Zeynep Şafak Teksin*
Gazi Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Turgut Emrah Bozkurt*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Tuba İnceçayır*
Gazi Üniversitesi

Üye: *Dr. Öğr. Ü. Tuğba Gülsün İnal*
Hacettepe Üniversitesi

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

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

19 /11/2020

Nihan İZAT

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

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

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

ETİK BEYAN

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

Nihan İzat

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince bilgisi ve deneyimi ile yol göstericim, özverisi ve anlayışıyla en büyük desteğim olan danışman hocam Prof. Dr. Selma Şahin'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Farmakokinetik modelleme konusunda bilgi ve tecrübelerini paylaşan Prof. Dr. Aleksandra Galetin'e, çalışmalarımda değerli yardımlarını aldığım Dr. Daniel Scotcher ve Dr. Nicola Melillo'ya ve Manchester Üniversitesi Uygulamalı Farmakokinetik Araştırma Merkezi'ndeki tüm araştırmacılara bilimsel katkı ve arkadaşlıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmalarındaki bilimsel katkı ve destekleri için Doç. Dr. Mustafa Çelebier'e ve kurtarıcı kuvvetiyle Uzm. Kim. Ozan Kaplan'a teşekkür ederim.

Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sema Çalış ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Levent Öner'e tez çalışmalarımı gerçekleştirmem için sağladıkları olanaklar ve destekleri için teşekkürlerimi sunarım. Bölümümüzdeki tüm değerli hocalarıma bilimsel ve manevi katkılarından dolayı çok teşekkür ederim. Tez izleme komitesinde yer alan hocalarım Prof. Dr. Levent Öner ve Prof. Dr. Zeynep Şafak Teksin'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecim boyunca desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Hakan Eroğlu, Dr. Tuğba Gülsün İnal, Dr. Yağmur Akdağ Çaylı, Dr. Selin Seda Timur, Dr. Naile Öztürk, Dr. Sedenay Akbaş ve tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ecz. Fatma Kır'a verdiği eşsiz motivasyonu ve yardımları için çok teşekkür ederim. Anabilim dalı teknisyenimiz Orhan Çelik'e ve malzeme temininde sağladıkları hızlı destek için Deniz Ağlamaz ve Ant Teknik A.Ş.'e teşekkür ederim.

Doktora sürecimde yanımda olan ve desteklerini her daim hatırlayacağım arkadaşlarım Esra Küçük, Şafak Doğukan Yıldızlar, Buket Tüzün, Pınar İkiz, Selen Güllü, Mine Kandemir, Burcu Kelleci Çakır, Evren Türkyılmaz, Seda Önder, Feriştah Bilgin ve Konstantinos Stogias'a çok teşekkür ederim.

Başta annem Cemile İzat, babam İsmail Akın İzat ve ablalarım Ebru ve Melike olmak üzere sevgiyle ve sabırla tüm doktora sürecimde yanımda olan, destek ve cesaret veren aileme çok teşekkür ederim.

Tez kapsamındaki LC-MS analiz çalışmalarımı yürütmem için olanak sağlayan Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürütmem için proje desteği sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne (Proje Kodu: TSA-2019-17756) teşekkürlerimi sunarım.

2211-A programı ile yurtiçi doktora tez çalışmalarımı, 2214-A programı ile yurtdışı doktora tez çalışmalarımı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

ÖZET

İzât N., Karaciğerdeki İlaç Dispozisyonu Üzerine Rifampisin Etkisinin İncelenmesi ve Farmakokinetik Modelleme. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2020. Taşıyıcı aracılı farmakokinetik hepatik ilaç dispozisyonu ve ilaç-ilaç etkileşimleri için önemli belirleyici mekanizmalardan biridir. Hepatosit membranlarında yer alan çeşitli *influx* taşıyıcılar arasında hepatik organik anyon taşıyıcı polipeptidler (OATP'ler) ilaç geliştirme sürecinde değerlendirilmesi gereken ve klinik olarak önemli ana taşıyıcılardır. Bu tezin amacı *in situ* sıçan karaciğer perfüzyonu yöntemi kullanarak OATP/Oatp inhibitörü rifampisin varlığında ve yokluğunda pitavastatinin hepatik dispozisyonunun incelenmesi ve endojen biyobelirteçler olan koproporfirin I ve koproporfirin III'ün izlenmesidir. Perfüzyon, karaciğer dokusu ve safradan toplanan örnekler valide edilmiş biyoanalitik yöntemler ile analiz edilmiştir. Pitavastatinin hepatik ve safra klerensleri ile hepatik biyoyararlanımı modelden bağımsız yöntem kullanarak tayin edilmiştir. Karaciğer ve safrada pitavastatin ve endojen biyobelirteçler arasında kabul edilebilir bir korelasyon bulunmuştur. Pitavastatinin hepatobiliyer dağılımını simüle etmek ve iki koşulda (rifampisin varlığında ve yokluğunda) elde edilmiş verilerin eş zamanlı analizi ile pitavastatinin hepatik alım ve safra klerenslerini tayin etmek için perfüzyon, karaciğer ekstraselüler, karaciğer intraselüler ve safra kompartmanlarından oluşan bir mekanistik kompartman modeli geliştirilmiştir. Karaciğer dışı değişkenlerin dahil edilmediği mevcut dinamik model, pitavastatinin sıçan karaciğerindeki dispozisyonunun karakterize edilmesinde iyileştirilmiş klerens kestirimleri sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Farmakokinetik modelleme, karaciğer perfüzyonu, OATP, pitavastatin, rifampisin, SLC taşıyıcılar.

Destekleyen Kurumlar: Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: TSA-2019-17756). Nihan İzât 2211-A ve 2214-A bursları ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Izat N., Investigation of the Effect of Rifampicin on Drug Disposition in the Liver and Pharmacokinetic Modelling. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD. Thesis in Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Ankara, 2020. Transporter-mediated pharmacokinetics is one of the determinants in hepatic drug disposition and drug-drug interactions. Among several *influx* (uptake) transporters expressed in the membranes of hepatocytes, hepatic organic anion-transporting polypeptides (OATPs) are clinically important major transporters to be evaluated during drug development. The aim of this thesis was to investigate the hepatic disposition of pitavastatin in the absence and presence of an OATP/Oatp inhibitor rifampicin using *in situ* isolated perfused rat liver method with monitoring coproporphyrin I and coproporphyrin III as endogenous biomarkers. The samples were collected from perfusate, liver tissue and bile, and analysed by validated bioanalytical methods. Hepatic and biliary clearances plus hepatic bioavailability of pitavastatin were estimated using model independent analysis. Reasonable correlations between pitavastatin and endogenous biomarkers in the liver and bile were obtained. A mechanistic compartment model composed of perfusate, liver extracellular and intracellular, and bile compartments was developed to simulate hepatobiliary distribution and estimate hepatic uptake and biliary clearances of pitavastatin by simultaneous fitting of the data obtained in two conditions (with and without rifampicin). The current dynamic model, which excludes any extrahepatic variable, delivers a refined clearance estimation to characterize the disposition of pitavastatin in the rat liver.

Keywords: Liver perfusion, OATP, pharmacokinetic modelling, pitavastatin, rifampicin, SLC transporters.

Supporting organizations: This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: TSA-2019-17756). Nihan Izat was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) 2211-A and 2214-A grants.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iii
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Karaciğer ve Karaciğerin Yapısı	4
2.1.1. Karaciğerin Fonksiyonel Birimi: Hepatik Asinus	5
2.1.2. Sinüsler	7
2.1.3. Disse Boşluğu	9
2.1.4. Hepatositler	10
2.1.5. Safra Kanallarında Bulunan Hepatik Hücreler	11
2.1.6. Karaciğerde Mikrodolaşım	12
2.2. Karaciğerde İlaç Dispozisyonu	13
2.2.1. Pasif Difüzyon	13
2.2.2. Taşıyıcı Aracılı Taşıma	14
2.2.3. Sinüzoidal Membranda Bulunan İlaç Taşıyıcı Proteinler	16
2.2.4. Kanaliküler Membranda Bulunan İlaç Taşıyıcı Proteinler	18
2.2.5. Albumin Aracılı Taşıma	19
2.2.6. Hepatik Metabolizasyon	20
2.3. Hepatik İlaç-İlaç Etkileşimleri	22
2.3.1. Klinik Önem Taşıyan İlaç Taşıyıcı Proteinler	22
2.3.2. Yasal Düzenlemeler	24
2.3.3. OATP-Aracılı İlaç-İlaç Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi	26
2.3.4. <i>In vivo</i> Preklinik Çalışmalar	30

2.4. Hepatik Taşıyıcı Aracılı Farmakokinetik ve İlaç İlaç Etkileşimlerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	31
2.4.1. <i>In vitro</i> Yöntemler	31
2.4.2. <i>In situ</i> ve <i>Ex vivo</i> Preklinik Çalışmalar	33
2.4.3. Klinik Çalışmalar	34
2.5. İn Vivo Hepatik Klerens Kestirimi ve Taşıyıcı Aracılı İlaç-İlaç Etkileşiminin Değerlendirilmesi	36
2.5.1. Hepatik Klerens Kavramı	36
2.5.2. <i>In vitro-In vivo</i> Ekstrapolasyon	38
2.5.3. Mekanistik Farmakokinetik Modelleme	39
2.5.4. Fizyolojik Farmakokinetik Modelleme	42
2.6. OATP-aracılı İlaç-İlaç Etkileşiminin Değerlendirilmesinde Model Substratlar, Endojen Biyobelirteçler ve İnhibitörler	44
2.6.1. Pitavastatin	47
2.6.2. Koproporfirin I ve Koproporfirin III	51
2.6.3. Rifampisin	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	56
3.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler	56
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	57
3.3. Deney Hayvanı	58
3.4. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	58
3.4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu	59
3.4.2. Analitik Yöntem Validasyonu	62
3.5. <i>In situ</i> Karaciğer Perfüzyonu	68
3.5.1. Perfüzyon Çözeltisi	68
3.5.2. Perfüzyon Sistemi	69
3.5.3. Cerrahi Yöntem	70
3.5.4. Perfüzyon Deneyleri	72
3.6. Veri Analizi	73
3.7. İstatistiksel Analiz	74
3.8. Mekanistik Modelleme	75
3.8.1. Mekanistik Model Tasarımı	75

3.8.2. Ön Modelleme ve Simülasyon Çalışmaları	81
3.8.3. Belirsizlik (Uncertainty) ve Duyarlılık (Sensitivity) Analizleri	84
3.8.4. Model İyileştirme (Model Refinement)	87
4. BULGULAR	89
4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu	89
4.1.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII Tayini İçin LC-MS Yönteminin Optimizasyonu	89
4.1.2. Rifampisin Tayini İçin HPLC Yönteminin Optimizasyonu	92
4.2. Analitik Yöntem Validasyonu	92
4.2.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII Tayini İçin LC-MS Yönteminin Validasyonu	92
4.2.2. Rifampisin Tayini İçin HPLC Yönteminin Validasyonu	105
4.3. <i>In situ</i> Sıçan Karaciğer Perfüzyonu	110
4.3.1. Pitavastatin	111
4.3.2. Koproporfirin I/III	115
4.3.3. Rifampisin	120
4.4. Mekanistik Model Geliştirme ve Simülasyon Çalışmaları	121
4.4.1. Ön Modelleme Çalışmaları	121
4.4.2. Belirsizlik ve Duyarlılık Analizleri	136
4.5. Model İyileştirme ve Farmakokinetik Parametre Kestirimi	155
5. TARTIŞMA	161
5.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	161
5.1.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII Tayini İçin LC-MS Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	162
5.1.2. Rifampisin Tayini İçin HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	164
5.2. <i>In situ</i> Sıçan Karaciğer Perfüzyonu	165
5.2.1. Pitavastatinin Karaciğer Dispozisyonu ve Rifampisinin Etkisi	166
5.2.2. Oatp Fonksiyonunun İzlenmesinde KPI ve KPIII Endojen Biyobelirteçlerinin Kullanımı	171
5.3. Mekanistik Model Geliştirme ve Simülasyon	173
5.3.1. Ön Modelleme Çalışmaları	173

5.3.2. Belirsizlik ve Duyarlılık Analizleri	176
5.3.3. Model İyileştirme ve Farmakokinetik Parametre Kestirimi	179
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	187
7. KAYNAKLAR	189
8. EKLER	
EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi	
EK-2: MATLAB® (R2019b) Programı ile Uygulanan Kodlar ve Komutlar	
EK-3: Turnitin Dijital Makbuz	
EK-4: Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	(ATP)-bağlayıcı kaset taşıyıcıları
ADME	Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon
ATP	Adenozin trifosfat
BCRP	Meme kanseri direnç proteini
BCS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
BDDCS	Biyofarmasötik İlaç Dispozisyonu Sınıflandırma Sistemi
BSEP	Safra tuzu atım pompası
CL	Klerens
CL_{aktif}	Aktif taşıma klerensi
CL_{pasif}	Pasif difüzyon klerensi
CL_{safra}	Safra yoluyla itrah klerensi
C_{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonu
DMSO	Dimetil sülfoksit
EAA	Eğri altında kalan alan
ECCS	Genişletilmiş Klerens Sınıflandırma Sistemi
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
ENT	Denge nükleozid taşıyıcı
ES	Ekstraselüler
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
f_u	Serbest ilaç fraksiyonu
IC50	Maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
IS	İntraselüler
ISEF-T	Sistemler arası ekstrapolasyon faktörü
ITC	Uluslararası Taşıyıcı Konsorsiyumu
IVIVE	<i>İn vitro-in vivo</i> Ekstrapolasyon
K_i	İnhibisyon sabiti
KP	Koproporfirin
MATE	Çoklu ilaç ve toksin ekstrüzyon proteini
MRP	Çoklu ilaç direnci ilişkili protein

MTBE	Metil tersiyer butil eter
NTCP	Sodyum/taurokolat taşıyıcı polipeptid
OATP	Organik anyon taşıyıcı polipeptid
OBH	Ortalama bağıl hata
OCT	Organik katyon taşıyıcı
OST	Organik çözünen taşıyıcı
PBPK	Fizyolojik esaslı farmakokinetik modelleme
P-gp	P-glikoprotein
PMDA	Japonya İlaç ve Tıbbi Cihaz Ajansı
PRCC	Kısmi sıra korelasyon katsayısı
Q	Akış hızı
SCH	Sandviç kültür hepatosit
SLC	Katı lipit taşıyıcılar
SSR	Rezidüel karelerinin toplamı
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İnsan karaciğerinin şematik gösterimi.	4
2.2. Karaciğerde yer alan yapılar ile parenkimal (hepatosit) ve parenkimal olmayan hücrelerin gösterimi.	5
2.3. Hepatik asinusun şematik gösterimi.	6
2.4. Hepatik asinus modelinde hepatik zonlar.	7
2.5. Sinüslerin şematik gösterimi.	8
2.6. İnsan hepatositlerinde tanımlanmış olan önemli ilaç taşıyıcı proteinler.	15
2.7. Mekanistik farmakokinetik model geliştirme süreci.	41
2.8. PBPK model bileşenleri ve ilaç yanıtı üzerinde etkili olan faktörler.	43
2.9. Koproporfirin-I (A), koproporfirin III (B) endojen maddelerinin molekül yapısı.	52
2.10. Rifampisin molekül yapısı.	54
3.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII'ün LC-MS analizi için standart ve numunelerin hazırlama yönteminin şematik olarak gösterimi.	61
3.2. Kuyruklanma faktörü (T) hesabı.	68
3.3. Karaciğer perfüzyonu ve perfüzyon sisteminin şematik olarak gösterimi.	70
3.4. Deneysel verilerin analizine olanak sağlayacak model şeması.	76
3.5. Mekanistik A) tek alt kompartman ve B) çoklu alt kompartman karaciğer modellerinin şematik gösterimi.	77
4.1. Pitavastatin (1 µM) (A), KPI (1 µM) ve KP III (1 µM) (B) maddelerinin mobil faz içindeki çözeltisinin eş zamanlı analizine ait LC-MS kromatogramları.	91
4.2. Pitavastatin (1 µM) (A), KPI (1 µM) ve KP III (1 µM) (B) maddelerinin mobil faz içindeki çözeltisinin eş zamanlı analizine ait MS spektrumları.	91
4.3. Boş perfüze (A), boş karaciğer (B) ve boş safra (C) ve pitavastatin (0,025 µM) varlığında elde edilen LC-MS kromatogramları.	93
4.4. Boş perfüze ortamından hazırlanan çözeltinin (A), KPIII (0,1 µM) (B), ve KPI (0,1 µM) (C) içeren standartların enjeksiyonu ile elde edilen LC-MS kromatogramları.	93
4.5. Boş perfüzyon ortamında rifampisin (10 µM) (A), KPI (0,1 µM) (B), KPIII (0,1 µM) (C) ve pitavastatin (0,025 µM) (D) varlığında elde edilen LC-MS kromatogramları.	94
4.6. Rifampisin (10 µM) (A), pitavastatin (1 µM) (B), ve KPI ve KPIII (0,25 µM) (C) varlığında elde edilen LC-MS kromatogramları.	94

- 4.7. Pitavastatinin perfüzyon ortamı kullanarak hazırlanan standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri. 95
- 4.8. Pitavastatinin karaciğer dokusu kullanarak hazırlanan standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri. 96
- 4.9. Pitavastatinin safra kullanarak hazırlanan standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri. 96
- 4.10. Karaciğer dokusundan KPI analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri. 97
- 4.11. Safradan KPI analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri. 98
- 4.12. Karaciğer dokusundan KPIII analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri. 98
- 4.13. Safradan KPIII analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri. 99
- 4.14. A) Rifampisin matriks içindeki çözeltisi (18,23 μM), B) pitavastatin (22,70 μM), KPI (13,74 μM) ve KPIII (13,74 μM)'ün matriks içindeki çözeltisi, C) boş matriks enjeksiyonları ile elde edilen HPLC kromatogramları. 106
- 4.15. Rifampisin matriks içindeki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi . 107
- 4.16. Rifampisin matriks içindeki çözeltisinin (72,91 μM) analizi sonrası (A) boş matrikse ait (B) ve analit tayini öncesi enjekte edilmiş boş matrikse ait (C) HPLC kromatogramları. 108
- 4.17. Perfüzyon örneklerinde 15 dk (A, B) ve 60 dk (C, D) perfüzyon sonrası pitavastatine ait konsantrasyon-zaman profilleri ve EAA değerleri. 112
- 4.18. Pitavastatinin karaciğer örneklerinde 15 dk (A) ve 60 dk (B) perfüzyon sonrası tayin edilen miktarının, safra örneklerinde 15 dk (C) ve 60 dk (D) perfüzyon sonrası tayin edilen miktarına oranları (E:15 dk ve F: 60 dk için karaciğer/safra oranlarını göstermektedir). 114
- 4.19. 15 dk ve 60 dk perfüzyon sonrasında KPI'in karaciğer (A, D), ve safra örneklerindeki (B, E) miktarları ile karaciğer/safra oranları (C, F). 117
- 4.20. 15 dk ve 60 dk perfüzyon sonrasında KPIII'ün karaciğer (A, D), ve safra örneklerindeki (B, E) miktarları ile karaciğer/safra oranları (C, F). 118
- 4.21. 60 dk'lık perfüzyon sonrasında inhibitör (50 μM rifampisin) varlığında ve yokluğunda KPI ile pitavastatin arasındaki (A, C, D) ve KPIII ile pitavastatin arasındaki (B, D, F) karaciğerdeki miktar, safradaki miktar ve karaciğer/safra oranı yönünden korelasyonların gösterimi. 119
- 4.22. Sadece rifampisin uygulanan (A) ve pitavastatin ile birlikte rifampisin uygulanan (B) sıçanların karaciğerinde tayin edilen rifampisin konsantrasyonu. 121

- 4.23. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile perfüzat simülasyonları ve diagnostik profiller (1. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk). 124
- 4.24. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile perfüzat simülasyonları ve diagnostik profiller (2. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk). 125
- 4.25. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile perfüzat simülasyonları ve diagnostik profiller (3. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk). 126
- 4.26. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile perfüzat simülasyonları ve diagnostik profiller (4. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk). 127
- 4.27. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile karaciğer simülasyonları ve diagnostik profiller (1. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk). 128
- 4.28. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile karaciğer simülasyonları ve diagnostik profiller (2. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk). 129
- 4.29. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile karaciğer simülasyonları ve diagnostik profiller (3. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk). 130
- 4.30. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile karaciğer simülasyonları ve diagnostik profiller (4. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk). 131
- 4.31. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile safra simülasyonları ve diagnostik profiller (1. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk). 132
- 4.32. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile safra simülasyonları ve diagnostik profiller (2. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk). 133
- 4.33. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile safra simülasyonları ve diagnostik profiller (3. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk). 134
- 4.34. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile safra simülasyonları ve diagnostik profiller (4. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk). 135
- 4.35. Belirsizlik varlığında girdi parametrelerinin tekdüze dağılımı (n=1000). 136
- 4.36. Belirsizlik varlığında çıktı parametreleri (A: EAA0-15 ve EAA0-60; B: A15, karaciğer ve A60, karaciğer; C: A15, safra ve A60, safra) kestirimlerinin dağılımı (n=1000). 138
- 4.37. Çıktı parametrelerine ait gözlem değerlerinin (n=2-6) ve belirsizlik varlığında kestirim değerlerinin (n=1000) dağılımı. 139

- 4.38.** Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: EAA0-15 ve B: EAA0-60) arasındaki korelasyon (n=1000). 140
- 4.39.** Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: A15, karaciğer ve B: A60, karaciğer) arasındaki korelasyon (n=1000). 141
- 4.40.** Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: A15, safra ve B: A60, safra) arasındaki korelasyon (n=1000). 142
- 4.41.** Belirsizliğin çıktı parametrelerinin (A: EAA0-15; B: EAA0-60; C: A15, karaciğer; D: A60, karaciğer; E: A15, safra ve F: A60, safra) varyasyonuna etkisinin sayısal ifadesi olarak PRCC değerlerinin grafiksel olarak gösterimi. 144
- 4.42.** Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: EAA0-15 ve B: EAA0-60) arasındaki sıra korelasyonu (n=1000). 145
- 4.43.** Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: A15, karaciğer ve B: A60, karaciğer) arasındaki sıra korelasyonu (n=1000). 146
- 4.44.** Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: A15, safra ve B: A60, safra) arasındaki sıra korelasyonu (n=1000). 147
- 4.45.** Monte Carlo duyarlılık testi ile elde edilen simülasyon profilleri (n=1000). 148
- 4.46.** Perfüzat kompartmanı için filtreleme sonrası elde edilen Monte Carlo simülasyon profilleri (n=422). 149
- 4.47.** Perfüzat kompartmanı için filtreleme yaklaşımı uygulamasında isabet eden (n=422) ve isabet etmeyen (n=578) parametre dağılımlarının karşılaştırılması. 150
- 4.48.** Safra kompartmanı için filtreleme ile sonrası elde edilen Monte Carlo simülasyon profilleri (n=246). 151
- 4.49.** Safra kompartmanı için filtreleme yaklaşımı uygulamasında isabet eden (n=246) ve isabet etmeyen (n=754) parametre dağılımlarının karşılaştırılması. 152
- 4.50.** Perfüzat ve safra kompartmanları için filtreleme ile sonrası elde edilen Monte Carlo simülasyon profilleri (n=144). 153
- 4.51.** Perfüzat ve safra kompartmanları için filtreleme yaklaşımı uygulamasında isabet eden (n=144) ve isabet etmeyen (n=856) parametre dağılımlarının karşılaştırılması. 154
- 4.52.** CL_{aktif} (A), % inhibisyon (B) ve CL_{safra} (C) parametrelerinin optimizasyonunda f_{uP} , f_{uS} ve CL_{pasif} parametrelerindeki belirsizliğin etkisi. 156
- 4.53.** Perfüzat simülasyonu ve kontrol grafikleri. 158
- 4.54.** Karaciğer simülasyonu ve kontrol grafikleri. 159
- 4.55.** Safra simülasyonu ve kontrol grafikleri. 160

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Hepatik taşıyıcıların <i>in vitro</i> değerlendirilmesinde yasal otoritelerin önerilerinin karşılaştırılması (3, 4, 6).	25
2.2. Substrat ve inhibitör çalışma sonuçlarının yorumlanması (3, 4, 6).	29
2.3. OATP1B1-OATP1B3 substrat ve inhibitör örnekleri (6, 32).	46
2.4. Pitavastatin kalsiyumun fizikokimyasal özellikleri.	48
2.5. Pitavastatinin insanlardaki farmakokinetik özellikleri.	49
3.1. LC-MS analitik yöntem optimizasyonu çalışmasında analiz koşulları.	60
3.2. LC-MS analitik yöntem validasyonu çalışmalarında kullanılan kalibrasyon standartları.	64
3.3. <i>In situ</i> karaciğer perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltilisinin bileşimi.	69
3.4. <i>In situ</i> karaciğer perfüzyonu deney planı.	73
3.5. Kullanılan istatistiksel analiz yöntemleri	75
3.6. Modellemede kullanılan girdi parametreleri için referans değerler.	81
3.7. Ön modelleme ve simülasyon çalışmalarında uygulanacak sabit parametreler.	83
3.8. Girdi parametrelerindeki belirsizlik.	85
4.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII'ün eş zamanlı analizinde kullanılan optimum LC-MS çalışma koşulları.	90
4.2. Rifampisin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.	92
4.3. Pitavastatinin LC-MS analizinde analit taşınması etkisinin gösterimi (ortalama \pm SS; n=3).	99
4.4. Farklı kaynaklardan hazırlanan matriks içinde hazırlanan standart çözeltilere ait analiz sonuçları ile pitavastatinin LC-MS analizinde matriks etkisinin gösterimi (ortalama \pm SS; n=3).	100
4.5. Farklı kaynaklardan hazırlanan matriks içinde hazırlanan standart çözeltilere ait analiz sonuçları ile KPI ve KPIII'ün LC-MS analizinde matriks etkisinin gösterimi (ortalama \pm SS; n=3).	100
4.6. Pitavastatinin LC-MS analizinde kullanılan yönteminin perfüzyon, karaciğer ve safra ortamlarında doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik değerlendirmesi (ortalama \pm SS; n=6).	101
4.7. KPI'in LC-MS analizinde kullanılan yönteminin karaciğer ve safra ortamlarında doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik değerlendirmesi (ortalama \pm SS; n=6).	103

- 4.8.** KPIII'ün LC-MS analizinde kullanılan yönteminin karaciğer ve safra ortamlarında doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik değerlendirmesi (ortalama \pm SS; n=6). 104
- 4.9.** LC-MS yönteminin sistem uygunluk testleri sonuçları. 105
- 4.10.** Farklı kaynaklardan hazırlanan matriks içinde hazırlanan standart çözeltilere ait analiz sonuçları ile matriks etkisinin gösterimi (ortalama \pm SS; n=3). 108
- 4.11.** Rifampisin HPLC analizinde yönteminin doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik değerlendirmesi. (ortalama \pm SS; n=6). 109
- 4.12.** Rifampisin tayininde % geri kazanım (ortalama \pm SS; n=6). 110
- 4.13.** Rifampisin analizinde kullanılan HPLC yönteminin sistem uygunluk testleri sonuçları. 110
- 4.14.** Pitavastatin karaciğerdeki dispozisyonuna ilişkin modelden bağımsız yöntemle hesaplanan farmakokinetik parametreler (ortalama \pm SS, n*). 115
- 4.15.** Sıçan karaciğer dokusundan tayin edilen rifampisin konsantrasyonu (ortalama \pm SS; n=2-6). 120
- 4.17.** Belirsizlik varlığında çıktı parametre kestirimlerinin dağılımına ait istatistikler (n=1000). 137
- 4.18.** Mekanistik kompartman modeli ile veri analizi sonucu klerens parametrelerinin kestirimleri. 155
- 4.19.** Geliştirilen model ile elde edilen SSR değerleri. 157

1. GİRİŞ

Bir ilacın keşfinden başlayarak piyasaya sunulmasına kadar yaklaşık 12-15 yıllık bir süre ve 3-5 milyar dolarlık bir maliyet gerekmektedir (1, 2). Bu sürecin en belirleyici dönemi olan klinik öncesi dönemde (preklinik faz), ilaç olmaya aday bileşikler *in vitro* testler ve *in vivo* hayvan deneyleri ile araştırılmakta, fizikokimyasal ve farmakokinetik özellikleri (absorpsiyon, dağılım, metabolizma, itrah, ADME) belirlenmektedir. Yeni etkin maddelerin (araştırma ilacı) ilaç-ilaç etkileşimi potansiyeli açısından mutlaka değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu değerlendirme ilacın ana eliminasyon yolağının belirlenmesiyle başlamaktadır. Ardından, enzimlerin ve ilaç taşıyıcılarının ilacın dispozisyonu üzerindeki katkısı değerlendirilmekte ve son olarak ilacın enzimler ve taşıyıcılar üzerindeki etkisi ortaya konulmaktadır (3).

İlaç taşıyıcı proteinler absorpsiyon, dağılım ve itrah üzerinde rol oynayarak lokal ve sistemik maruziyeti etkileyebilmektedir. Bu nedenle özellikle son on yılda taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşimlerine verilen önem artmıştır. İlaç endüstrisi yeni etkin maddelere uygulanması gereken taşıyıcı aracılı etkileşim çalışmalarını yasal otoritelerin yayınladığı kılavuzların önerileri doğrultusunda yapmaktadır (3-6). Ayrıca Uluslararası Taşıyıcı Konsorsiyumu (*International Transporter Consortium*, ITC) tarafından bu alanda çalışan bilim insanlarının ortak girişimiyle taşıyıcı aracılı farmakokinetik ve translasyonel modelleme gibi konularda öneriler sunulmakta, bu alandaki sorunlar ortaya konularak akademi, endüstri ve yasal otoriteler için bilimsel güncellemeler yapılmaktadır (7-9).

Karaciğer taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşimleri için en önemli hedef organlardan biridir. Karaciğer parenkimal hücrelerinin (hepatositler) membranlarında bulunan çeşitli ilaç taşıyıcı proteinler ilaçların dispozisyonunu etkileyerek sistemik maruziyetlerini etkileyebilmektedir. Hepatositlerin sinüzoidal (apikal) membranında bulunan organik anyon taşıyıcı polipeptitler (*organic anion transporting polypeptides*, OATP1B1, OATP1B3) klinik olarak anlamlı etkilere yol açarak yasal otoritelerce prospektif ve retrospektif olarak incelenmesi gereken en önemli hepatik taşıyıcılar olarak kabul edilmektedir (3-6).

Karaciğerde taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşimlerinin araştırılmasında çeşitli *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* yöntemler ve farmakokinetik modelleme yaklaşımları birlikte uygulanmaktadır (8, 10, 11). Böylece görünür hepatik klerens yanında aktif taşıma klerensi, (CL_{aktif}), pasif taşıma klerensi (CL_{pasif}) ve safrayla itrah klerensi (CL_{safra}) gibi taşıyıcı aracılı kinetik parametreler hesaplanabilmektedir (12, 13). Son on yıl içerisindeki çalışmalara bakıldığında, CL değerlerinin araştırılmasında *in vitro* hücre kültürü çalışmalarının öne çıktığı görülmektedir (13). Bu çalışmalardan elde edilen *in vitro* CL değerlerinin *in vivo*'ya ekstrapolasyonunda genellikle fizyolojik ölçeklendirme faktörleri (ör. hücre sayısı, karaciğer ağırlığı) kullanılmaktadır (14, 15). Ancak taşıyıcı kinetiklerinin *in vitro-in vivo* ekstrapolasyonunda (*in vitro-in vivo extrapolation*, IVIVE) *in vitro* çalışmalarda hücre izolasyonu ve kültür koşullarına bağlı olarak taşıyıcı proteinlerin ekspresyon ve/veya aktivitesindeki potansiyel kayıp nedeniyle genel olarak kestirim değerleri gerçek değerlerin altında seyretmektedir (13, 15, 16). Ayrıca iki boyutlu hücre kültürü çalışmaları safra ile itrah mekanizmasının incelenmesinde uygulanabilir değildir. Bu mekanizma için sıklıkla kullanılan sandviç kültür hepatosit (*sandwich cultured hepatocytes*, SCH) sistemlerinde (17-20) ise izolasyon ve kültür koşullarına bağlı olarak *in vitro* sistemler ve karaciğer dokusuna göre taşıyıcı ekspresyonu ve aktivitesi farklılık gösterebilmektedir (21, 22).

Sıçan karaciğer perfüzyonu yöntemi iyi tanımlanmış bir *in situ* dinamik sistem olup doku ve safra örnekleme ile birlikte karaciğerdeki çoklu taşıma ve metabolizma mekanizmalarının incelenmesine olanak sunmaktadır (11, 23-26). Ayrıca *in silico* mekanistik farmakokinetik modellerin dinamik yapısı karaciğer perfüzyonu tekniğinin yapısı ile uyum göstermektedir. Mekanistik modeller ile ilaçların etkileşim bölgesindeki serbest konsantrasyonlarının zamana bağımlı değişiklikleri bir seri eşitlik ile tanımlanmaktadır. Karaciğer perfüzyonunun *in silico* olarak ifade edilmesi ile hepatositler içerisine aktif taşıma, metabolizma ve safra yolu ile itrah mekanizmaları eş zamanlı olarak araştırılabilmektedir (27, 28).

Rifampisin bilinen bir OATP/Oatp inhibitörü olup substrata özgü inhibisyon göstermektedir (29-31). Tez çalışması kapsamında rifampisin model ilacın karaciğer dispozyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Model ilaç olarak klinik olarak anlamlı ilaç-ilaç etkileşimlerine giren ve etkileşim araştırmalarında duyarlılığı yüksek bir

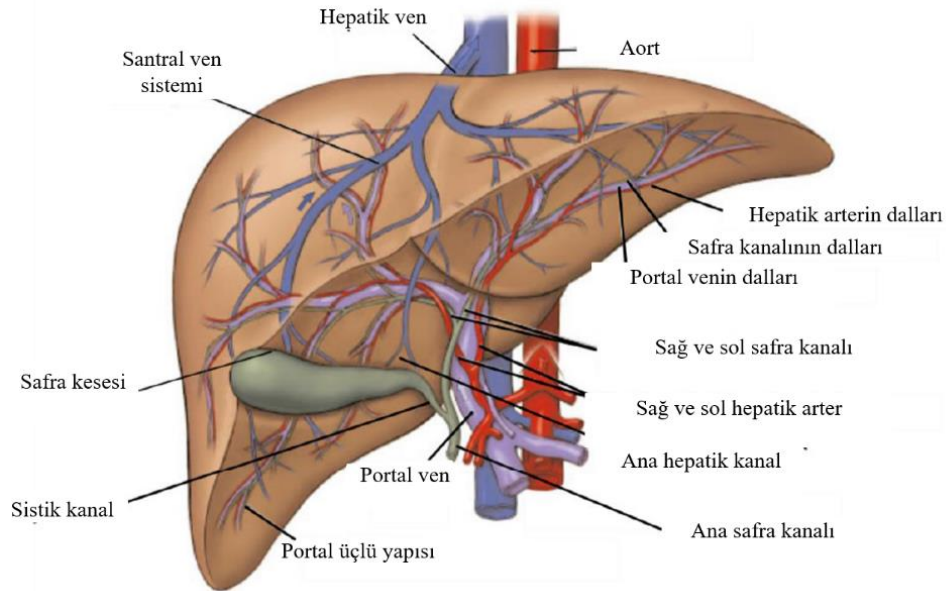
OATP/Oatp substratı olan pitavastatin (32-34) seçilmiştir. Ayrıca rifampisin koproporfirin I (KPI) ve koproporfirin III (KPIII) endojen maddelerinin karaciğer dispozisyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. KPI ve KPIII kan dolaşımında bulunan, safra ve renal itraha uğrayan hem biyosentezisinin anyonik yan ürünleridir. Hepatik OATP1B1/3 ve Oatp1a/1b taşıyıcıları için umut verici endojen biyobelirteçlerdir (33, 35-37). Bu nedenle model ilaç yanında eş zamanlı incelenecek endojen maddeler olarak KPI ve KPIII seçilmiştir. Tez çalışmasında *in situ* karaciğer perfüzyonu sisteminde görülen tüm taşıma mekanizmalarını açıklayan bir mekanistik farmakokinetik model geliştirilerek rifampisin pitavastatinin karaciğer dispozisyonundaki etkisinin değerlendirileceği ve IVIVE ile elde edilen düşük kestirimin önüne geçilebileceği hipotezi öne sürülmüştür. Ayrıca KPI ve KPIII düzeylerinin Oatp fonksiyonunun izlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılabilceği hipotezi araştırılmıştır. Bu hipotezlerin test edilmesi amacıyla;

- Pitavastatinin Oatp inhibitörü rifampisin yokluğunda ve varlığında hepatic dispozisyonu resirküle *in situ* sıçan karaciğer perfüzyonu yöntemi kullanılarak incelenmiştir.
- Sıçanlarda KPI ve KPIII'ün karaciğer ve safra düzeyleri belirlenerek pitavastatin dispozisyonu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.
- Rifampisin karaciğer dokusundaki düzeyinin belirlenmesi için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) yöntemi geliştirilerek ve biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmıştır.
- Pitavastatin, KPI ve KPIII'ün eş zamanlı nicel analizine olanak verecek bir Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) yöntemi geliştirilerek perfüzet, karaciğer dokusu ve safra ortamları için biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmıştır.
- Mekanistik farmakokinetik model geliştirme çalışmaları, ön modelleme çalışmalarının ardından belirsizlik ve duyarlılık analizleri ile değerlendirilecektir. Geliştirilen model ile *in situ* karaciğer perfüzyonu çalışma verileri analiz edilerek model iyileştirmesi ve pitavastatin için farmakokinetik parametre kestirimi yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer ve Karaciğerin Yapısı

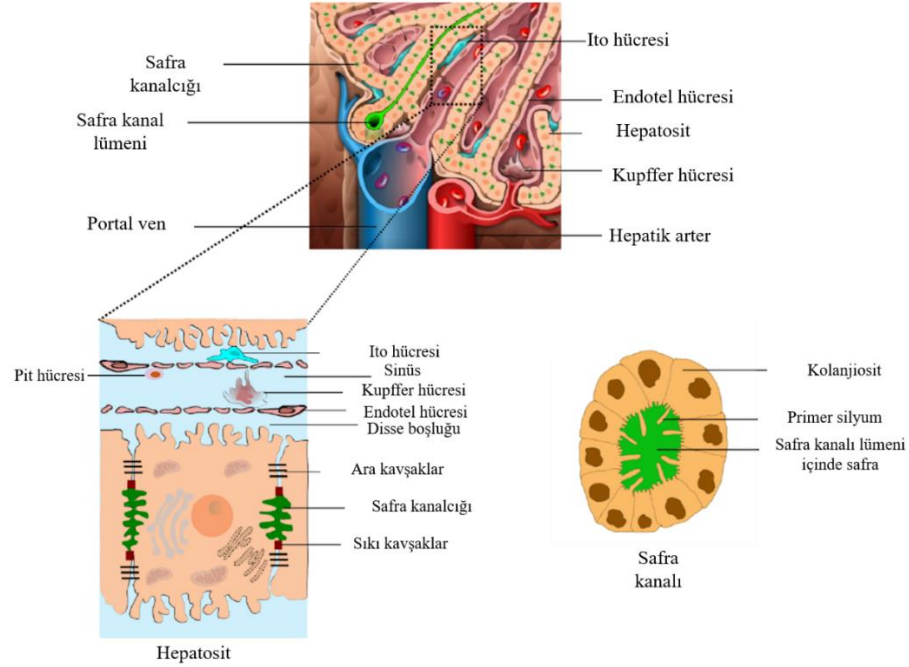
Karaciğer vücut ağırlığının %2,5'ini oluşturan en büyük iç organdır. Kalpten pompalanan kanın %25'i portal ven ve hepatik arter aracılığıyla karaciğere taşınmaktadır. Portal venin karaciğer kan akışına katkısı %75-80 iken hepatik arterin katkısı %20-25'tir. Karaciğer içerisinde paralel olarak ilerleyen arter ve venlere safra kanalı, lenfler ve sinirler eşlik etmektedir (38) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. İnsan karaciğerinin şematik gösterimi ((39) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir).

Karaciğerde bulunan hücrelerin sayıca %60-70'ini parenkimal hücreler (hepatositler); %30-40'ını ise parenkimal olmayan hücreler (sinüzoidal endotelial hücreler, Kupfer hücreleri, Pit hücreleri, Ito hücreleri, kolanjiositler) oluşturmaktadır (40) (Şekil 2.2.). Karaciğer hücrelerine ilerleyen başlıklar altında ayrıntılı olarak yer verilmiştir. Karaciğerin kompleks yapısının düzenlenmesinde ve immün cevap oluşumunda parenkimal olmayan hücreler önem taşımaktadır. Hepatik fonksiyonların büyük bir kısmı hepatositler tarafından yürütülmektedir (11, 23). Bu fonksiyonlar arasında safra üretimi, endojen ve eksojen maddelerin biyotransformasyonu, bilirubin

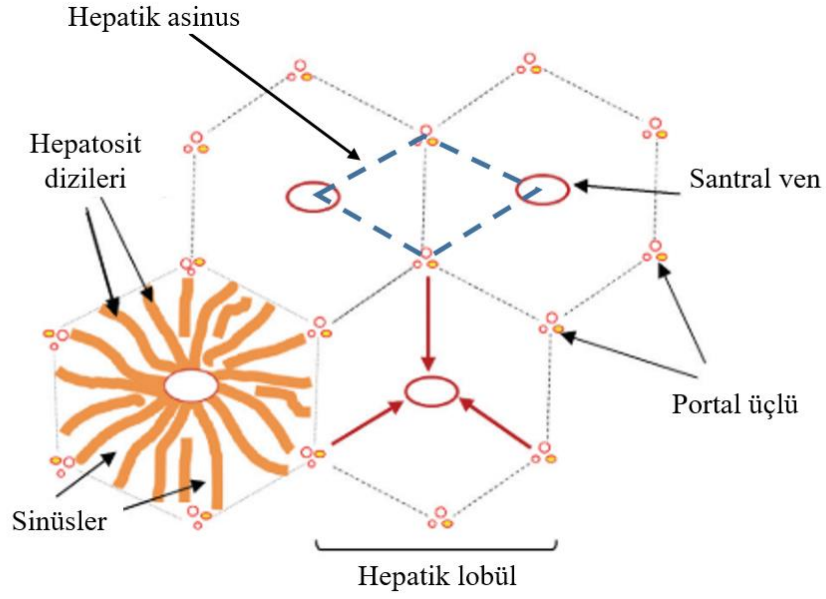
metabolizması, albümin, globülinler gibi plazma proteinlerinin ve pıhtılaşma faktörlerinin sentezi ve cinsiyet hormonları metabolizması bulunmaktadır (41).



Şekil 2.2. Karaciğerde yer alan yapılar ile parenkimal (hepatosit) ve parenkimal olmayan hücrelerin gösterimi ((39) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir).

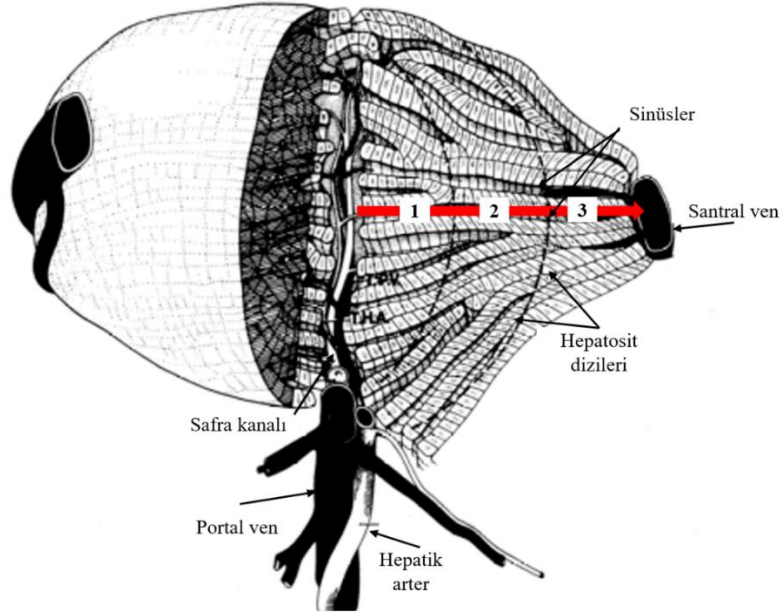
2.1.1. Karaciğerin Fonksiyonel Birimi: Hepatik Asinus

Karaciğerin en küçük fonksiyonel birimi olan hepatik asinus, karaciğerde altıgen şekilde konumlanmış olan hücrelerden oluşan lobüllerin hepatik ünitelere ayrılması olarak ifade edilmektedir (42, 43). Hepatik asinus, portal ven, hepatik arter ve safra kanalının terminal dallarından (portal üçlü) santral vene doğru dik olarak uzanan bir eksen etrafındaki hücresel kitle olup komşu heksagonal alanların bitişik kısımlarını kaplamakta ve bir heksagonun merkezinde bulunan santral venden diğerinin merkezindeki santral vene kadar uzanmaktadır (Şekil 2.3.) (42).



Şekil 2.3. Hepatik asinusun şematik gösterimi ((44) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir).

Kan karaciğere portal üçlüde bulunan portal venül ve hepatic arterioller aracılığı ile girerek parenkimal hücre dizileri ile çevrili sinüzoidal mikrovasküler sistem boyunca yol alarak santral venden çıkmaktadır. Hepatik asinusun portal üçlüye yakın olan bölümü Zon 1 (periportal zon) olarak adlandırılırken, bu bölümü santral vene doğru olmak üzere sırayla Zon 2 (ara zon) ve Zon 3 (perivenöz zon) takip etmektedir (Şekil 2.4.). Hepatik asinusta kan akımı Zon 1'den Zon 3'e doğru gerçekleştiği için oksijen ve kandaki diğer bileşenler açısından bir konsantrasyon gradyanı mevcuttur. Periportal zondaki hücreler oksijen ve besince en zengin kan ile karşılaşırken perivenöz zondaki hücreler daha az besin ve oksijen almaktadır (43-45). Bu nedenle farklı zonlarda bulunan hepatositlerin metabolik kapasiteleri farklıdır (46).



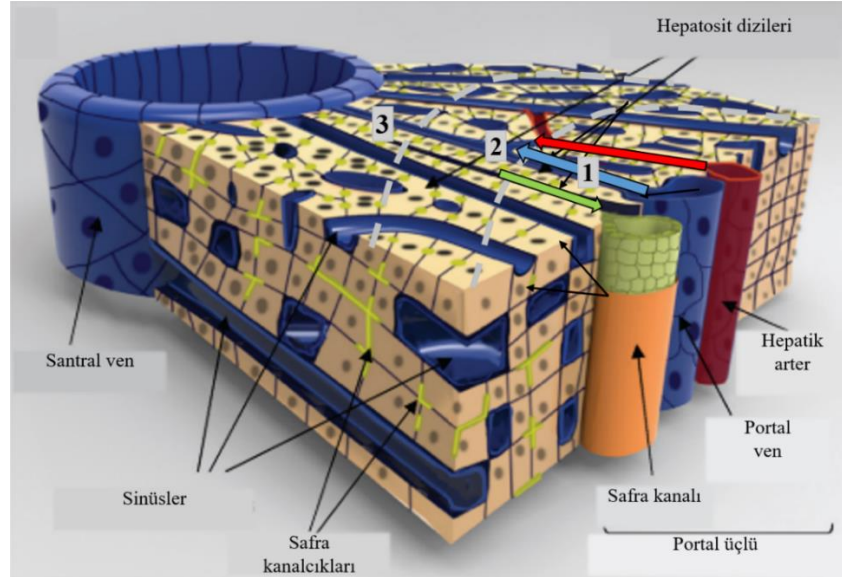
Şekil 2.4. Hepatik asinus modelinde hepatic zonlar (1 periportal zon, 2 ara zon, 3 perivenöz zon) göstermektedir. Kırmızı ok zonlar arasında kan akış yönünü ifade etmektedir. (43) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir).

2.1.2. Sinüsler

Sinüsler, genellikle tek sıra hepatosit dizilerini birbirinden ayıran ve kanın karaciğer hücrelerine taşınmasını sağlayan özel kapilerlerdir (44, 47) (Şekil 2.5.). Sinüzoidal endotel hücreleri, Kupffer hücreleri ve Pit hücreleri sinüste yer alan hücre tipleridir.

Sinüslerin duvarları 50-200 nm çapında fenestrelere içeren endotelial hücrelerden oluşmaktadır. Karaciğerdeki hücre popülasyonunun sayıca %10-20'sini oluşturan sinüzoidal endotel hücreler (40) fenestrelili yapısı ile kanda taşınan makromoleküllerin hepatosit membranına serbestçe ulaşmasına izin verirken, hücrel bileşenlerin sinusoidal lümende kalmasını sağlamaktadır (43-45). Endoteliumun bazal membranının bulunmaması ve fenestrelili yapısı sayesinde endotel hücreleri ve parenkim hücreleri arasında yüksek permeabilite sağlanmakta ve hepatositlerin kan dolaşımında bulunan çözünen maddelerle maruziyeti artırılmakta, endojen ve eksojen maddeler için artmış bir pasif difüzyon sağlanmaktadır. Bu durum parenkimal

hücrelerin yüksek oranda oksijene ulaşımına, ilaç ve diğer maddelerin eliminasyonunda etkinliğin artmasına neden olmaktadır (44).



Şekil 2.5. Sinüslerin şematik gösterimi (1 periportal zon, 2 ara zon, 3 perivenöz zon) göstermektedir. Kırmızı ve mavi ok sırasıyla portal ven ve hepatik arterden gelen kanın akış yönünü, yeşil ok safra akış yönünü ifade etmektedir. (44) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir).

Karaciğerdeki sinüzoidal endotel hücreleri retikuloendotelial sistemin bir parçası olarak hepatik homeostazın sağlanmasında üç önemli rol oynamaktadır. Bu rollerden ilki, kan ve hepatositler arasında çift yönlü madde geçişini düzenleyerek bir seçici elek görevi görmesidir. İkinci rolü çeşitli dokulardaki biyokimyasal süreçlerde açığa çıkan makromoleküler atık ürünlerden kanı temizlemesidir. Üçüncü rolü ise yabancı patojenlere ve ekzojen maddelerin metabolizasyonu sonucu oluşan yeni antijenlere karşı hepatik bağışıklığın sağlanmasında, ve ayrıca antijen-sunan hücreler gibi fonksiyon göstererek antijen spesifik T hücre cevabının oluşmasında görev almaktadır (48).

Sinüsler içerisinde kalıcı karaciğer makrofajları adı verilen yüksek endositoz ve fagositoz kapasitesine sahip Kupffer hücreleri yer almaktadır (49). Kupffer hücreleri karaciğerde bulunan hücrelerin sayıca %15-25'ini oluşturmaktadır (40). Kan dolaşımındaki monositlerin karaciğere göç etmesi ve yerleşik Kupffer hücrelerinin sınırlı yenilenmesi ile yenilenmektedir (40). Sinüs duvarında endotel hücrelerin

luminal yüzeyinde konumlanmış olan Kupffer hücrelerinin uzun sitoplazmik uzantıları nedeniyle hepatositlerle temas yüzeyi bulunabilmektedir. Kupffer hücrelerinin %43'ü Zon 1, %32'si Zon 2, %25'i Zon 3'te bulunmaktadır. Kupffer hücreleri hepatositlere göre lizozom organeli bakımından daha zengindir. Zon 1'den Zon 3'e doğru Kupffer hücrelerinin lizozom sayısı azalmaktadır (40). Kupffer hücreleri, karaciğere gastrointestinal kanaldan taşınan hücre kalıntıları ve endotoksinler gibi maddelerin ve diğer makromoleküler komplekslerin kandan uzaklaştırılmasında ve hepatik hücrelerin apoptozu ile hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Retiküloendotelial sistemin bir parçası olarak sistemik immün yanıtın düzenlenmesi ve sitokin yanıtının oluşmasında önemli bağışıklık sistemi elemanlarıdır (44).

Sinüs endotelinin luminal yüzeyinde konumlanan bir diğer parenkimal olmayan hücre tipi pit hücreleridir. Pit hücreleri karaciğere spesifik lenfositler olup sayıca Kupffer hücrelerinin %10'u kadardır. Büyük granüler lenfositler arasında kabul edilen pit hücreleri bazı tümör hücrelerine karşı spontan sitotoksikite geliştirmektedir. Periportal zonda perivenöz zona göre pit hücre yoğunluğu daha yüksek olduğu için belirli tümörlerin eliminasyonu başlıca bu bölgede görülmektedir. Normal koşullarda Disse boşluğunda bulunmazlar, ancak sinüs duvarı boyunca hareket etme yetisine sahiptirler ve viral ve neoplastik hastalıklarda Disse boşluğuna göç edebilirler (40).

2.1.3. Disse Boşluğu

Karaciğer sinusoidal endotel hücreleri ve hepatositlerin sinusoidal membranı arasındaki subendotelial boşluğa Disse boşluğu (*Space of Disse*) adı verilmektedir. Disse boşluğu 0,2-0,5 mm genişliğinde ve karaciğer parenkimal kütlelerinin %2-4'ü kadardır (40). Disse boşluğu kollajen ve proteoglikanlar gibi ekstrasellüler matriks bileşenlerini içermektedir (41). Üç boyutlu fiber ağ yapısı sayesinde sinüs açıklığının korunmasına yardımcı olurken, hepatosit çoğalması ve yenilenmesinde destek görevi görmektedir (40). Bu boşlukta Kupffer hücrelerinin uzantıları ve perisinüzoidal hücreler bulunmaktadır (45).

Perisinüzoidal hücreler, hepatik stellat hücreleridir. Bu hücreler aynı zamanda Ito hücreleri, yağ depolayan hücreler, lipositler veya perisitler olarak da

isimlendirilmektedir. Disse boşluğunda bulunan bu hücreler uzun dendritik yapıda olup hepatositler arası alana kadar uzanabilirler. Karaciğerdeki hücre popülasyonu içerisinde sayıları %5'in altındadır. Periportal zondaki yoğunlukları diğer zonlara göre yüksek olup hücre boyutları yine bu zonda daha küçüktür. Ito hücreleri vitamin-A taşıyan geniş yağ damlacıklarını içerir ve vitamin A ve lipid metabolizmasında rol oynar. Ayrıca sinusoidal kan akışının düzenlenmesinde, ekstrasellüler matriksin yapımı ve yıkımında ve karaciğer fibrözünün gelişmesinde etkilidir. Ayrıca Ito hücreleri hepatositlerin büyümesi ve çoğalmasında, karaciğerin bağışıklık fonksiyonunda ve inflamasyon reaksiyonlarında rol oynamaktadır (40).

2.1.4. Hepatositler

Karaciğerin parenkimal hücreleri olan hepatositler, poligonal şekilli, polarize ve boyutları 20-40 mm olan hücrelerdir. Parenkimal hacmin %80'i ve karaciğerdeki toplam hücre sayısının %60-70'ini hepatositler oluşturmaktadır (40). Hücrelerin etrafı plazma membranı ile çevrili olup hepatositler bazolateral yüzeyleri sinüslere bakacak şekilde konumlanırken (sinusoidal membran) apikal membranları (kanaliküler membran) ile safra kanalcıklarını (*bile canaliculi*) oluşturmaktadır (40, 45). Kanaliküler membrandan sinüzoidal membranın sınırına kadar olan hücreler arası membran ise lateral membran olarak adlandırılmaktadır (40).

Sinüzoidal membranda Disse boşluğuna kadar uzanan çok sayıda mikrovilliler (0,5 mm) bulunur. Bu sayede hepatosit ile sinüzoidal kan arasında doğrudan bir temas sağlanır. Hepatosit membranının %15'ini ise apikal yüzeydeki kanaliküler membran oluşturmaktadır. İki veya üç komşu hepatositin apikal kutbundaki hücre zarının katlanması ile safra kanalikülü oluşmaktadır. Kanaliküler membran hepatositler arasındaki lateral membrandan sıkı kavşaklar, desmozomlar ve ara kavşaklar ile ayrılmaktadır (40).

Endoplazmik retikulum ve hücre çekirdeği dışında, organeller ve hücre iskeleti, glikojen inklüzyon kompleksleri, fosfolipidler, proteinler ve yağ damlacıkları da hepatositler içinde bulunabilmektedir (40).

Hepatositler, karaciğerin fizyolojik fonksiyonları olan protein, steroid ve lipid metabolizasyonunun, vitamin, demir ve şekerin depolanmasının, ayrıca endojen ve eksojen maddelerin metabolizasyonu ve itrahının gerçekleştiği hücrelerdir (44). Sinüs boyunca lokal kan bileşimindeki ve oksijen düzeyindeki değişim nedeniyle zonlar arasında hepatosit yapısında ve metabolik fonksiyonlarda farklılıklar görülmektedir. Hepatositler bir veya daha fazla hücre çekirdeği içerebilmektedir. Zonlar arasında hepatositlerin boyutunun Zon 1'den Zon 3'e doğru büyüdüğü (50) ve birden fazla çekirdek içeren hücre sayısında Zon 1'den Zon 3'e doğru artış olduğu gözlenmiştir (44). Zon 3'te metabolizasyon enzimlerinin ekspresyonu daha yüksek olup ilaç biyotransformasyonunda en önemli zon olarak değerlendirilmektedir (46).

Hepatositler genellikle safra kanaliküllerine bitişik şekilde konumlanmış Golgi kompleksleri ile bol miktarda mitokondriye sahiptir. Sitoplazma granüllü (*rough*) ve granülsüz (*smooth*) endoplazmik retikulumca zengindir. Granüllü endoplazmik retikulum hepatositlerin sekresyon fonksiyonlarında etkin iken, düz endoplazmik retikulum enzimatik biyotransformasyon reaksiyonlarında yer almaktadır. Sitoplazma boyunca dağılım gösteren lizozomlar ise ekstraselüler ve intraselüler makromoleküllerin degradasyonunu yürütmektedir (44).

Hepatositlerin sinusoidal ve kanaliküler membranları, hücre içine alım, metabolizasyon ve safra ile itrah mekanizmalarının (51) işleyişi için gerekli yapı, bileşim ve fonksiyon farklılıkları göstermektedir (52, 53). Safra taşıma gastrointestinal kanalda lipid absorpsiyonu için gerekli safra bileşenlerinin üretimi ve sekresyonunun (54) yanında endojen ve eksojen maddelerin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (51). Ayrıca safra üretiminin hepatositlerin sinüzoidal ve kanaliküler membranlarındaki taşıma mekanizmalarının koordinasyonunun çeşitli etkenlerle veya ilaçlarla bozulması kolestazise ve dolayısıyla toksik maddelerin karaciğer ve plazmada birikimine neden olabilmektedir (49).

2.1.5. Safra Kanallarında Bulunan Hepatik Hücreler

Safra kanaliküler sistemi (safra ağacı) çapı giderek artan ve birbirine bağlanan birçok kanaldan oluşmaktadır. Bu sistem intrahepatik safra kanalları ve ekstrahepatik

safr kanalları olarak ikiye ayrılmaktadır. Safr kanalları kolanjiosit adı verilen epitel hücrelerden oluşmaktadır ve etrafı doku matrisi ve peribilier pleksus ile çevrilidir (55). Karaciğer hücre popülasyonunun %5'ini oluşturan kolanjiositler (44) lobüller arası safr kanallarında kübik şekilli epitelyumu oluştururken, karaciğer dışına doğru safr kanalı büyümekte ve kolanjiositler, kolon biçimli ve mukus salgılayan hücreler olarak görülmektedir. Kolanjiosit popülasyonu morfoloji, sekresyon ve ekspresyon düzenleri ile hormonlara, peptidlere, büyüme faktörlerine, sitokinlere, safr asitlerine, yaralanmaya ve toksinlere olan tepkileri yönünden heterojenlik göstermektedir (56, 57). Sitokin sekresyonunda ve inflamasyon cevabının oluşmasında önemli rol oynayan kolanjiositler (58), safr kanalında su, organik iyonlar, lipidler ve elektrolitlerin absopsiyon ve sekresyonunda görev almaktadırlar (59).

Safr kanaliküler sistemini lobüller arası kanallara bağlayan ve safr dolaşımının en küçük ve periferik dallarını temsil eden Hering kanallarında hepatik progenitör hücreler bulunmaktadır. Hepatik kök hücreler olarak bilinen bu hücreler hepatositlere veya kolanjiositlere farklılaşabilmektedir (55).

2.1.6. Karaciğerde Mikrodolaşım

Portal ven valf içermeyen bir damar olup bağırsak, dalak, pankreas ve safr kesesi kapilerlerinden gelen besince zengin kanı karaciğere taşımaktadır. Normal fizyolojik koşullarda karaciğer kan akışının %75-80'i portal ven tarafından, %20-25'i ise oksijence zengin hepatik arter tarafından sağlanmaktadır. Hepatik kan akış hızı yaklaşık 1 mL/dk/g karaciğer olup vücudun oksijen tüketiminin %20'si karaciğer tarafından gerçekleştirilmektedir. Oksijence zengin arter kanına göre venöz kanın oksijen içeriği düşük olsa da yüksek kan akış hızına bağlı olarak karaciğerin oksijen ihtiyacının %50'si portal ven tarafından karşılanmaktadır. Sıçanlarda portal venüllerden gelen kan doğruca sinüsler içine taşınırken hepatik arteriollerden gelen kan sinüse doğrudan taşınmanın yanı sıra peribilier pleksus aracılığıyla sinüslere taşınabilir veya doğrudan hepatik ven ile birleşebilir (38). Sinüslerin büyük bir kısmı karışmış kan ile perfüze olmakla birlikte vasküler yatağın yaklaşık %10'luk kısmı sadece hepatik arter tarafından perfüze edilmektedir (60, 61).

Karaciğerde kan akışı periportal zondan perivenöz zona doğru tek yönlü olup hepatik ven aracılığıyla karaciğerden uzaklaştırılmaktadır. Bireysel sinüslerde kan akışı arteriyollerin sinüslerle birleşme açısı, sinüslerin giriş ve çıkışında yer alan kapakçıklar ve Kupffer hücrelerinin yer değiştirmesi nedeniyle ters yönlü olabilmektedir (62-64).

2.2. Karaciğerde İlaç Dispozisyonu

2.2.1. Pasif Difüzyon

İlaçların hepatositler içerisine girebilmesi için hücre membranını aşmaları gerekmektedir. Bu geçiş mekanizmalardan ilki ilaçların hepatosit membranından hücre içine veya hücre dışına olmak üzere konsantrasyon gradyanı yönünde bir taşıyıcıya ihtiyaç duymaksızın geçişini ifade eden pasif difüzyondur. Pasif difüzyonun temel prensibi Fick'in 1. Kanunu'na dayanmaktadır. Buna göre, bir maddenin yüksek konsantrasyonda olduğu bölgeden düşük konsantrasyonda olduğu bölgeye doğru konsantrasyon gradyanının büyüklüğüyle orantılı bir hızda difüzyonu söz konusudur. Pasif difüzyon konsantrasyon dengesi sağlanıncaya dek spontan olarak gerçekleşen ve enerji gerektirmeyen bir mekanizmadır. Maddenin bir membrandan difüzyon hızı (v ; miktar/zaman), maddenin difüzyon sabiti (D ; alan/zaman), membranın yüzey alanı (A ; alan), partiyon katsayısı (P), membran kalınlığı (uzunluk) ve konsantrasyon gradyanı ile orantılıdır (Eşitlik 2.1.) (65).

$$v = \frac{D \times A \times P \times (C_s - C)}{h} \quad (2.1.)$$

Difüzyon sabiti, sıcaklık, membran yapısı (66) ve ilacın fizikokimyasal özellikleri (ör. iyonizasyon derecesi, molekül ağırlığı, lipofilisite) ile ilişkilidir. Molekülün iyonize halde bulunmaması, düşük molekül ağırlığı ve yüksek yağda çözünürlük pasif difüzyon için avantaj sağlamaktadır (67-69). Ancak ortamın sıcaklığı azaldıkça hücre membranının esnekliğinin azalması ve moleküllerin hareketliliğinin düşmesi pasif difüzyonun azalmasına neden olmaktadır (70).

2.2.2. Taşıyıcı Aracılı Taşıma

Pasif difüzyon ile lipid membranı geçemeyen endojen ve eksojen maddeler hepatosit membranlardan hücre içine, hücre dışına veya çift yönlü olarak çeşitli ilaç taşıyıcı proteinler aracılığıyla taşınabilmektedir. Bu taşıyıcılar integral transmembran proteinleri olup moleküller için seçici bir taşıma sağlamaktadır. İlaç taşıyıcı proteinler taşımamın yönüne doğru *influx* (hücre içine doğru) ve *efflux* (hücre dışına doğru) taşıyıcılar olarak sınıflandırılmaktadır. Taşıyıcı proteinleri kodlayan gen ailesini esas alarak katı lipit taşıyıcılar (*solute lipid carriers*, SLC) ve adenosin trifosfat (ATP)-bağlayıcı kaset taşıyıcıları (*adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette transporters*, ABC) taşıyıcılar olarak sınıflandırılmaktadır.

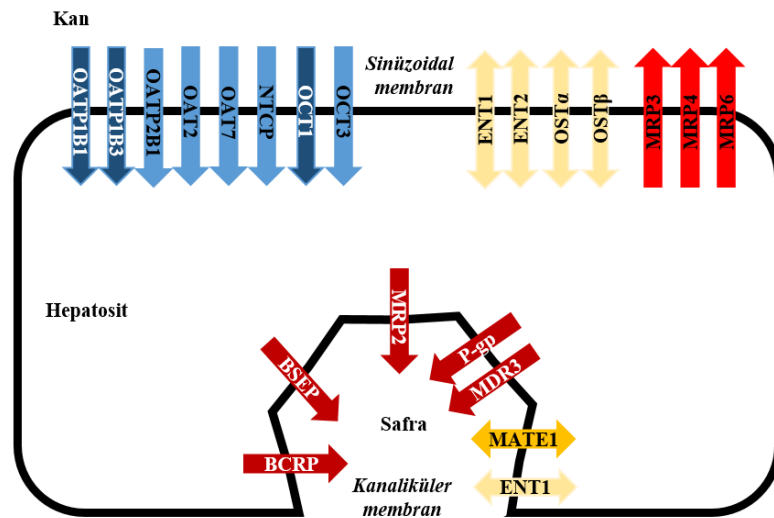
Taşıyıcı aracılı taşıma, enerji bağımlı aktif taşıma ve kolaylaştırılmış difüzyon olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Enerji kaynağına göre primer ve sekonder aktif taşıma olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer aktif taşımada ATP hidrolizinden açığa çıkan enerji kullanılırken sekonder aktif taşımada farklı bir enerji kaynağı kullanılmaktadır. Örneğin ATP bağımlı primer taşıyıcılar tarafından oluşturulan iyon gradyanını kullanan taşıyıcılar sekonder aktif taşıma yapmaktadır (71).

Primer aktif taşıma yapan ABC taşıyıcılarının insanda bilinen 50 üyesi tanımlanmış olup, yapılarında genellikle iki adet nükleotit bağlanma bölgesi ve iki adet transmembran bölgesi bulunmaktadır. ABC taşıyıcıları çok odaklı integral membran proteinleri olup ABC süper ailesi, iki ATP bağlanma motifi (Walker A ve Walker B), ve ABC imza C motifine bağlı olarak yedi farklı gen ailesine ayrılmıştır (ABCA-ABCG) (72). ABC taşıyıcıları vücutta karaciğer, bağırsak, böbrekler, plasenta, santral sinir sistemi bariyerleri ve kan-testis bariyerinde yer almaktadır. Bu taşıyıcılar membranlarda birer koruyucu gibi davranmakta ve substratları olan ilaçların farmakokinetik profillerini etkilemektedirler. Bu taşıyıcılar çoğunlukla ilaç metabolize edici enzimlerle birlikte faaliyet göstermektedirler (73-77).

ABC taşıyıcılar substratlarını membrandan taşırken doğrudan ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanmaktadır. SLC taşıyıcılarının yapısında ATP

bağlanma bölgesi bulunmadığı için bazı SLC taşıyıcılar elektrokimyasal potansiyel farkını kullanırken, diğerleri iyon gradyanını kullanarak sekonder aktif taşıma yapmaktadır (71). SLC taşıyıcı süper ailesi protein sekansına, membranı kestikleri nokta sayısı (genellikle 10-14 nokta) ve biyolojik fonksiyonlarına göre farklı ailelere ayrılmaktadır (78). Bilinen SLC taşıyıcı sayısı 400'ün üzerinde olup bu taşıyıcılar 65 SLC ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır (79).

ABC ve SLC taşıyıcı proteinleri hepatositlerin sinusoidal ve kanaliküler membranında eksprese edilmektedir. İlaç araştırmaları açısından öne çıkan hepatik taşıyıcı proteinler Şekil 2.6.'da verilmiştir. Hepatik taşıyıcıların ekspresyon ve fonksiyonları genetik polimorfizm gibi intrinsik faktörler, hastalık durumu, ontojeni (80) ve inhibitör/indükleyici ilaç varlığı gibi etkenlere bağlı olarak değişikliğe uğrayabilmektedir (81, 82).



Şekil 2.6. İnsan hepatositlerinde tanımlanmış olan önemli ilaç taşıyıcı proteinler (BSEP: safra tuzu atım pompası; BCRP: meme kanseri direnç proteini; ENT: denge nükleozid taşıyıcı; MATE: çoklu ilaç ve toksin ekstrüzyon proteini; MRP: çoklu ilaç direnci ilişkili protein; OAT: organik anyon taşıyıcı; OATP: organik anyon taşıyıcı polipeptid; OCT: organik katyon taşıyıcı; OST: organik çözünen taşıyıcı; P-gp: P-glikoprotein; NTCP: sodyum/taurokolat taşıyıcı polipeptid). Ok işaretleri taşımının yönünü göstermektedir. Mavi renkli oklar *influx*, kırmızı renkli oklar *efflux*, sarı renkli oklar çift yönlü taşımayı gösterirken, her renkte daha koyu olarak belirtilmiş olan taşıyıcılar, yasal otoritelerin listelerinde belirtilmiş olan taşıyıcıları göstermektedir. (7, 9, 83) numaralı kaynaklardan hareketle yeniden düzenlenmiştir).

2.2.3. Sinüzoidal Membranda Bulunan İlaç Taşıyıcı Proteinler

Hepatositlerin sinusoidal membranında (bazolateral) hem SLC (*influx*) hem de ABC (*efflux*) taşıyıcıları eksprese edilmektedir (Şekil 2.6.).

En önemli hepatik SLC taşıyıcıları *SLCO*, *SLC22*, *SLC10* gen ailesinin üyeleridir. OATP'ler *SLCO1* (*SLC21*) gen ailesi tarafından kodlanmakta, insanda karaciğer, böbrek, bağırsaklar, beyin ve plasenta dahil birçok organ ve dokuda eksprese edilmektedir. 11 üyesi bulunan OATP taşıyıcıları çoğunlukla anyonik yapıdaki birçok endojen (ör. safra tuzları, steroid konjugatları, tiroid hormonu) ve ekzojen maddenin (ör. digoksin, pravastatin, metotreksat) hücre içine alımında rol oynayan sodyum bağımsız taşıyıcılardır. Hepatositlerin sinusoidal membranında yüksek oranda eksprese edilen OATP üyeleri OATP1B1 (OATP2, OATPC, *SLCO1B1*) ve OATP1B3 (*SLCO1B3*) (84-88)'tür. Bu taşıyıcıların kemirgenlerde (rodent) doğrudan ortolog proteinleri yoktur ancak rodent Oatp1b2 taşıyıcısı insan OATP1B1/B3 taşıyıcılarına benzer fonksiyon göstermektedir (85). OATP1B1 ve OATP1B3 için substrat (ör. valsartan ve pitavastatin) ve inhibitör (ör. rifampin ve siklosporin A) ilaçlar çakışma göstermektedir. Ancak telmisartan baskın olarak OATP1B3 ile taşınmaktadır (89). OATP1B1 polimorfizmi ilaç dispoziyonu üzerindeki etkileri sebebiyle önemli derecede dikkat çekmiştir. *SLCO1B1* c.521T>C ve c.388A>G varyantları birçok substrat ilacın sistemik konsantrasyonunu etkileyebilmektedir (90).

Bir diğer önemli hepatik OATP taşıyıcısı OATP2B1 (*SLCO2B1*)'dir. OATP1B1 ile benzer protein ekspresyonuna sahip olsa da hücre içine alımda yüksek katkısı gösterilmemiştir, bağırsaklarda daha önemli rol oynayan bir taşıyıcıdır (90).

Organik anyon taşıyıcıları (*organic anion transporter*, OAT) ve organik katyon taşıyıcıları (*organic cation transporter*, OCT) *SLC22* gen ailesinin üyeleridir. Hepatositlerin sinusoidal membranında yer alan üyeleri arasında OAT 2/7 (OAT2/OAT7, *SLC22A7/SLC22A9*; (91)), ve OCT 1/3 (OCT1/OCT3, *SLC22A1/SLC22A3*; (91)) bulunmaktadır. OAT taşıyıcıları birincil olarak böbreklerde eksprese olurken (92), OAT2 yüksek oranda karaciğer ekspresyonu göstermektedir

(9). OAT2 substratları arasında furosemid ve kaptopril gibi ilaçlar örnek verilebilirken OAT2-aracılı taşıma statinlerce inhibe olmaktadır (85).

Hepatik sinusoidal membranda yüksek oranda eksprese edilen OCT1 pozitif yüklü molekülleri (ör. tetrametilamonyum, metformin, oksaliplatin) negatif yüklü hücrel bölgeye taşımakta ve OCT1 inhibitörleri (ör. verapamil) ile bu taşıma inhibe edilebilmektedir (7, 90).

Sodyum/taurokolat taşıyıcı polipeptid (Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP, *SLC10A1*; (93)) konjuge ve konjuge olmayan safra asitlerinin sodyum bağımlı taşınmasındaki ana taşıyıcıdır. Ayrıca rosuvastatin ve mikafungin gibi ilaçların NTCP'ye karşı afinite gösterdikleri bilinmektedir (94).

Hepatositlerin sinusoidal membranında substratlarını her iki yönde de taşıyabilen denge nükleozid taşıyıcıları (*equilibrative nucleoside transporters*, hENT1/hENT2 (*SLC29A1/ SLC29A2*; (95)) ve organik çözünen taşıyıcıları (*organic solute transporter alpha/beta* (OST α /OST β , *SLC51A/SLC51B*; (96)) yer almaktadır (7). hENT'ler vücutta çeşitli tipte hücrelerde eksprese edilir, nükleozid (ör. adenzin, uridin) ve nükleozid analogu ilaçların (ör. ribavirin ve gempitabin) taşınmasında rol oynamaktadır (97). OST α ve OST β bağırsaklardan safra asitlerinin geri emiliminde önemli bir role sahiptir. Ayrıca safra asitleri, prostaglandin E2, digoksin ve steroid konjugatları gibi maddelerin hepatik dispozisyonunda rol oynamaktadır. Ancak hepatik OST α /OST β 'in *in vivo* katkı derecelerinin ihmal edilebilecek düzeyde olduğu düşünülmektedir (90).

Sinusoidal membranda *efflux* taşıyıcılar da bulunmaktadır. Bu taşıyıcıların başlıcaları çoklu ilaç direnci ilişkili protein (*multidrug resistance-associated protein*, MRP/Mrp) ailesinin üyeleri olan MRP3, MRP4 ve MRP6 (*ABCC3, ABCC4, ABCC*; (98-100))'dır. Substratları olan endojen ve eksojen maddeler ile polar metabolitleri hepatositlerden kana doğru taşımaktadırlar (9, 90). MRP3 birincil olarak kolestaziste safra asitlerinin kana pompalanmasında rol oynamaktadır. Safra asitlerinin safra ile itrahının gerçekleşemediği durumlarda karaciğeri toksik safra asidi seviyesinden korumak için MRP3 indüklenmektedir. Hepatik sinuoidal MRP'ler ilaçların yanında

onların glukuronid ve sülfat konjugatlarının kana taşınmasında da rol oynamaktadır. MRP3 feksofenadinin MRP4 ise rosuvastatin enaprilat ve nükleozid analoglarının bazolateral *efflux*'ında görev almaktadır (90). MRP6'nın ekstraselüler matriks bileşenlerinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak fizyolojik etkisi ve substratları tam olarak aydınlatılamamıştır (100).

2.2.4. Kanaliküler Membranda Bulunan İlaç Taşıyıcı Proteinler

Kanaliküler membranda (apikal) eksprese edilen ABC taşıyıcıları arasında P-glikoprotein (*P-glycoprotein* (P-gp)/*multidrug resistance protein* (MDR1), *ABCB1*)), meme kanseri direnç proteini (*breast cancer resistance protein*, BCRP, *ABCG2*), BSEP, (*ABCB11*) ve MRP2 (*ABCC2*) öne çıkan *efflux* taşıyıcılarıdır (85).

P-gp substratları olan ilaçların özellikle gastrointestinal sistem ve beyin olmak üzere dokulara penetrasyonunu kısıtlayan bir *efflux* taşıyıcıdır. Aynı zamanda karaciğer ve böbreklerde de eksprese edilmektedir. Karaciğerde kanaliküler membranda substratlarını safra içine taşıyarak safraya itirah mekanizmasında rol oynamaktadır. Substrat spektrumu geniş olup yüksek molekül ağırlığına sahip, lipofilik ve çoğunlukla katyonik bileşiklerin (ör. dosetaksel, siklosporin A, atorvastatin, karvedilol) hücre dışına taşınmasında rol oynamaktadır (85). P-gp inhibitörleri arasında ise verapamil, itrakonazol ve ritonavir gibi ilaçlar bulunmaktadır (32). Bağırsak ve beyinden farklı olarak karaciğer P-gp taşıyıcısı belirgin bir klinik durum ile ilişkilendirilmemiştir (90). *ABCB1* polimorfizminin P-gp substratlarının taşınması üzerindeki etkisinin tekrarlanabilirliği gösterilemediğinden klinik çalışmalarda *ABCB1* polimorfizm analizinin rutin uygulaması önerilmemiştir (7).

Yarı ABC taşıyıcısı olarak bilinen BCRP bağırsak, karaciğer, böbrekler, beyin, plasenta ve testis gibi farklı dokularda eksprese olmaktadır. Karaciğerde kanaliküler membranda bulunan BCRP taşıyıcısı substratlarını safra içine taşımaktadır. Substratları arasında rosuvastatin, topotekan, siprofloksasin, diklofenak gibi çeşitli farmakolojik gruptan ilacın yanı sıra estron-3-sülfat ve ürik asit gibi endojen maddeler bulunmaktadır (85). BCRP aktivitesini inhibe eden ilaçların arasında ise siklosporin, omeprazol ve takrolimus örnek olarak verilebilmektedir (85).

BCRP'yi kodlayan gende görülebilen polimorfizm (c.421C>A) çeşitli ilaçların (rosuvastatin, atorvastatin, gefinitib gibi) farmakokinetiğini etkilemektedir (90).

BSEP safra tuzu bağımlı safra akışından sorumludur. Bu önemli fonksiyonu gereğince BSEP'in inhibisyonu sonucunda safra akışında bozukluk ve kolestazis oluşabilmektedir. BSEP aynı zamanda safra asidi dışındaki maddelerin (ör. pravastatin) taşınmasında da rol oynamaktadır. Siklosporin A, rifampin ve vinblastin gibi ilaçlar BSEP inhibisyonuna sebep olabilmektedir (85).

MRP2, karaciğer, böbrekler, ince bağırsak, safra kesesi ve plasentada yüksek oranda eksprese edilen MRP üyesidir. Hepatositlerde apikal konumlanması ile çeşitli ilaçların (ör. metotreksat, melfalan, pravastatin), metabolitlerin ve endojen bileşiklerini safraya taşımaktadır (85).

Kanaliküler membranda eksprese edilen SLC taşıyıcıları arasında yer alan çoklu ilaç ve toksin ekstrüzyon proteini (*multidrug and toxin extrusion protein*, MATE1 (*SLC47A1*)) ve hENT1 çift yönlü taşıma yapmaktadır (101). MATE1'in endojen (ör. guanidin, kreatinin) ve eksojen (ör. simetidin, asiklovir, prokainamid) birçok maddeye karşı afinitesi bulunmaktadır (85). Ancak birçok MATE1 substratının ana eliminasyon organı böbrekler olduğu için günümüzde hepatik MATE1'in katkısı tam olarak ortaya konulmamıştır (90). hENT1 timidin, guanozin ve ribavirin gibi nükleozidler ve nükleozid analoglarının hepatositler içine taşınmasında ve belirli metabolize nükleozidlerin (ör. ribavirin ve formisin B) safraya atılımında rol oynamaktadır (101).

2.2.5. Albumin Aracılı Taşıma

Karaciğerde albumin aracılı taşıma ilk olarak 1966 yılında Baker ve Bradley tarafından ortaya atılmıştır (102). Albumin aracılı taşımanın mekanizması günümüzde tam olarak aydınlatılamamış olup, yıllar içerisinde çeşitli mekanizma ve modeller ile açıklanmaya çalışılmıştır (103). Hepatosit hücre membranında albumin reseptörünün varlığı, hız kısıtlayıcı basamak olarak albumin-ligand kompleksinden ligandın ayrılması (104), hız kısıtlayıcı basamak olarak ligandın karışmamış sıvı tabakadan (*unstirred water layer*) difüzyonu (105), kolaylaştırılmış disosiyasyon modeli

(*facilitated-dissociation model*) (106), membran yüzeyi ve albumin-ligand kompleksi arasındaki iyonik etkileşim (107) ve taşıyıcı ile indüklenmiş protein bağlanma yer değişimi (*transporter induced protein binding shift*) (108) albumin aracılı kolaylaştırılmış taşımanın açıklanması için önerilmiş olan mekanizmalardır.

Bu yaklaşımlar arasında kolaylaştırılmış disosiyasyon modeli ve taşıyıcı ile indüklenmiş protein bağlanma yer değişimi yaklaşımı öne çıkmaktadır. Kolaylaştırılmış disosiyasyon modeli ilaç-albumin kompleksinin hücre yüzeyi ile etkileşime geçmesi sonucu ilacın disosiyasyonunun arttığı ve hücre içine alınabilecek serbest ilaç fraksiyonunun arttığı yaklaşımına dayanmaktadır (106, 109, 110). Taşıyıcı ile indüklenmiş protein bağlanma dönüşümü modeli ise yüksek oranda proteine bağlanan ilaçların, ilaç taşıyıcı proteinlere albumine göre daha yüksek afinite gösterdikleri ve taşıyıcıların bu ilaçları serbest hale geçmelerini beklemeden albumin-ligand kompleksinden ayırdığı ve hücre içine taşıdığı prensibine dayanmaktadır (103).

Bilinen OATP/Oatp substratlarının hepatik hücre içine alımı üzerinde albuminin etkisi çeşitli *in vitro* yöntemler (ör. süspande insan hepatositleri, süspande primer sıçan hepatositleri, OATP-eksprese eden insan embriyonik böbrek hücreleri (*human embryonic kidney cells*, HEK293) ile incelenmiştir. Plazma veya albumin içeren ortam koşullarında serbest ilacın hücre içine alımının arttığı gösterilmiştir (103, 109-113). Ayrıca Bowman ve ark. protein içermeyen ortama göre, protein varlığında pasif difüzyonun da arttığını kaydetmiştir (103, 111).

2.2.6. Hepatik Metabolizasyon

Karaciğer, ilaç metabolize edici enzimlerin yüksek ekspresyonu nedeniyle ilaç eliminasyonunda merkezi bir rol üstlenmektedir. Karaciğer enzimatik biyotransformasyonun ana organıdır. Ancak gastrointestinal kanal ve böbreklerde bulunan metabolize edici enzimler de ilaç dispozisyonu üzerinde etkin rol oynamaktadır. Oral olarak uygulanan ilaçlarda görülen ilk-geçiş etkisinde gastrointestinal kanal ve karaciğer önemli rol oynamaktadır (114).

Klasik sınıflandırmada ilaç metabolizasyonu faz 1 ve faz 2 olarak ikiye ayrılmaktadır. Birinci fazda redüksiyon, oksidasyon ve hidroliz gibi reaksiyonlarla moleküllere reaktif veya polar gruplar eklenmektedir. Bu reaksiyonların çoğu sitokrom P450 (*Cytochrome P450*, CYP450) enzimleri tarafından katalizlenmektedir. Toplam ilaç metabolizasyonunun yaklaşık %75'i CYP metabolizasyonları aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu enzimlerden CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ve CYP3A4 bilinen ilaçların birçoğunun metabolizasyonundan sorumlu enzimlerdir (115).

CYP450 enzimlerinin ekspresyonu ve aktivitesi çeşitli etkenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Endojen veya eksojen maddeler (ör. ritonavir ve ketokonazol) CYP450 enzimlerinin aktivitesini inhibe edebilmektedir. Bu durumda CYP450 substratlarının karaciğer ve plazma konsantrasyonlarında artış ve buna bağlı olarak toksisite görülebilmektedir. CYP450 enzimlerinin indüksiyonu ise substratları olan ilaçların klerensini artırmakta ve ilaç etkinliğinde düşüşe neden olabilmektedir. CYP450 indüktörleri (ör. rifampisin ve fenobarbital) ilaçlara bağlı hepatotoksisite riskini de azaltabilmektedir (114).

Faz 2 reaksiyonları ise maddelerin veya faz 1 reaksiyonları ile oluşan metabolitlerinin konjugasyon reaksiyonlarıdır. Glukuronidasyon, asetilasyon, sülfasyon, metilasyon ve glutatyon ile konjugasyon bilinen faz 2 reaksiyonlarındandır. Glutatyon konjugatları itrah öncesi tekrar metabolize edilir (40).

Faz 2 reaksiyonları her zaman faz 1'i takiben gerçekleşmez. Bu nedenle enzimler ve reaksiyonları CYP ve CYP olmayan (non-CYP) olarak da isimlendirilebilmektedir.

CYP-olmayan enzimler arasında UDP glukuronosiltransferazlar (*UDP-glucuronosyltransferases*, UGTs), sülfotransferazlar (*sulfotransferases*, SULTs), N-asetiltransferazlar (*N-acetyltransferases*, NATs), glutatyon S-transferazlar (*glutathione S-transferases*, GSTs), tiyopürin S-metiltransferazlar (*thiopurine S-methyltransferases*, TPMTs) ve katekol O-metiltransferazlar (*catechol O-methyltransferases*, COMTs) bulunmaktadır (114).

Yaş, genetik faktörler, cinsiyet, hastalık durumu, hamilelik ve ilaç-ilaç etkileşimleri ilaç metabolizasyonu üzerinde etkili olan unsurlardır (114). Ayrıca ilaç taşıyıcı proteinler ve enzim etkileşimi de ilaç dispozisyonunda sıklıkla görülen bir durumdur. İlaçların metabolize edici enzimlerin bulunduğu hepatosit içine taşınmasında ve hepatositlerden ana ilacın ve/veya metabolitinin uzaklaştırılmasında ilaç taşıyıcı proteinler rol oynamaktadır. (114).

2.3. Hepatik İlaç-İlaç Etkileşimleri

Bir ilacın diğer bir ilacın farmakokinetik özelliklerini değiştirme ihtimaline farmakokinetik ilaç-ilaç etkileşimleri denir. Bu değişikliklerin büyüklüğüne bağlı olarak, farmakokinetik ilaç-ilaç etkileşimleri kliniğe ilaçların güvenlik ve etkinliklerinde farklılık olarak yansıyabilmektedir (3, 116).

Farmakokinetik ilaç-ilaç etkileşimleri altta yatan mekanizmaya bağlı olarak metabolizasyon-aracılı, taşıyıcı-aracılı ve taşıyıcı-enzim etkileşimi-aracılı olarak sınıflandırılmaktadır. CYP enzimleri aracılı ilaç-ilaç etkileşimi yıllarca ana mekanizma olarak görülse de son yıllarda UGT ve SULT enzimleri aracılı etkileşimler de dikkat çekmektedir. Sadece enzimler ile açıklanamamış bazı etkileşimler ise ilaç taşıyıcı proteinler ile ilişkilendirilmiştir. Taşıyıcı-aracılı ilaç-ilaç etkileşimlerine örnek olarak digoksin-kinidin, feksofenadin-ketokonazol ve rosuvastatin-siklosporin verilebilir. Ayrıca ilaç metabolitlerinin de karaciğerden kana veya safraya taşınmasında da taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşimi görülebilmektedir (90). İlaç taşıyıcı proteinler absorpsiyon, dağılım ve itrah üzerinde rol oynadıkları için ilaçlara lokal ve sistemik maruziyet ve buna bağlı ilaç-ilaç etkileşimleri için önemli belirleyicilerdir.

2.3.1. Klinik Önem Taşıyan İlaç Taşıyıcı Proteinler

2007 yılında akademi, endüstri ve Amerika Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (*The US Food and Drug Administration*, FDA)'nden bilim insanlarının katılımıyla ITC kurulmuştur. ITC'nin 2008 yılındaki ilk çalıştayının ardından ilaç-ilaç etkileşimi yönünden klinik önem taşıyan ilaç taşıyıcı proteinler, ilişkili substratları,

inhibitörleri ve taşıyıcı araştırmalarında dikkat edilecek bilimsel öneriler yayınlanmıştır (7, 117).

2010 yılında yayınlanan ITC raporunda klinik önem taşıyan ve karaciğerde eksprese edilen sinuzoidal (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OCT1) ve kanaliküler (P-gp, BCRP, BSEP, MRP2, MRP3, MRP4, MDR3 (*ABCB4*), MATE1) taşıyıcı proteinler bulunmaktadır (7). Bu taşıyıcılardan OATP1B1, OATP1B3, P-gp ve BCRP klinik ilaç-ilaç etkileşimlerinde yer aldıklarına dair kanıt bulunan ve ilaç başvurularında takip edilmesi gereken taşıyıcılar olarak verilmiştir (7).

ITC 2013 yılında, MATE1, BSEP ve MRP2'nin ilaç-ilaç etkileşimleri, etkinlik ve ilaçla indüklenmiş toksisite üzerindeki etkileri yönünden incelenmeleri için öneride bulunmuştur (118).

Hepatositlerin kanaliküler membranında eksprese edilen MATE1, katyonik maddelerin (ör. metformin, simetidin ve asiklovir) safraya itrahına aracılık etmesine rağmen renal ilaç-ilaç etkileşimleri için ana taşıyıcılar arasında gösterilmiştir. Total klerensin %25 ve daha fazlası renal sekresyonla gerçekteşen ilaçlar için MATE1 aracılı etkileşimin incelenmesi önerilmiştir. BSEP ve MRP2'nin inhibisyonu kolestazis ile ilişkili olduğundan ilaçla indüklenen toksisite mekanizmasının belirlenmesinde bu taşıyıcıların inhibisyonuna dair retrospektif analiz yapılması önerilmiştir. Ancak hepatotoksisiteyi işaret eden inhibisyon potansiyelinin sınır değerleri bilinmediğinden rutin bir çalışma önerilmemiştir (118).

Son yıllarda hepatik OCT1, farmakogenetik varyasyon kaynağı ve ilaç-ilaç etkileşimlerinin belirleyici mekanizmalarından biri olarak önerilmektedir. Fenoterol, sumatriptan, ondansetron ve morfin gibi birçok ilaç için OCT1 genetik polimorfizmi görülen kişilerde ilaç-ilaç etkileşimleri yönünden farmakokinetik ve farmakodinamik duyarlılık gözlenmektedir (119). Bu husus göz önüne alınarak ITC 2018 yılında OCT1 için hem substrat hem de inhibitör özelliklerinin değerlendirilmesi için öneride bulunmuştur. Ayrıca OATP2B1'in ilaçların hepatik klerensine etkisi tartışılmış ve OATP1B1 ve OATP1B3 gibi bilinen mekanizmalarla aydınlatılamayan OATP-aracılı ilaç-ilaç etkileşimleri için retrospektif çalışma önerilmiştir (9).

2.3.2. Yasal Düzenlemeler

Son yıllarda giderek artan ilaç taşıyıcı protein araştırmaları ve ITC'nin çalışmalarına paralel olarak yasal otoriteler ilaç-ilaç etkileşimleri ile ilgili kılavuzları yayınlamış ve güncellemişlerdir. 2006 yılındaki kılavuzda sadece P-gp'ye yer veren FDA, 2012 yılında genişletilmiş bir taşıyıcı bölümü içeren kılavuzu yayınlamıştır. Avrupa İlaç Ajansı (*European Medicines Agency, EMA*)'nın “İlaç Etkileşimlerinin Araştırılması Hakkında Kılavuz” (*Guideline on the investigation of drug interactions*) 2013 yılında yürürlüğe girmiştir (4). Yürürlükte olan EMA kılavuzu revizyondadır. Japonya İlaç ve Tıbbi Cihaz Ajansı (*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan, PMDA*) ilaç taşıyıcı proteinlerin yer aldığı kılavuzu 2014'te yayınlanmış ve 2018'de güncellenmiştir. PMDA kılavuzu “İlaç Geliştirme ve Uygun Bilgi Sağlama için İlaç Etkileşimleri Hakkında Kılavuz” (*Guideline on Drug Interaction for Drug Development and Appropriate Provision of Information*) başlığı ile 2019 yılında İngilizce olarak yayınlanmıştır (6).

FDA, ilaç etkileşimleri ile ilgili Ocak 2020'de iki kılavuz yayınlamıştır. Bu kılavuzların başlıkları “*In vitro* Etkileşim Çalışmaları- Sitokrom P450 Enzimleri ve Taşıyıcı Aracılı İlaç Etkileşimleri” (*In vitro Drug Interaction Studies, Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions*) ve “Klinik İlaç Etkileşim Çalışmaları-Sitokrom P450 Enzimleri ve Taşıyıcı Aracılı İlaç Etkileşimleri” (*Clinical Drug Interaction Studies, Cytochrome P450 Enzyme and Transporter-Mediated Drug Interactions*)'dir (3, 5).

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından yayınlanan Ortak Teknik Doküman (CTD) Kılavuzu Modül 5 Klinik Çalışma Raporları kapsamında “İnsan Biyomateryallerinin Kullanıldığı Farmakokinetik Çalışma Raporları” altında başvuru sahiplerinden “Hepatik Metabolizma ve İlaç Etkileşimi Çalışmaları Raporları” beklenmektedir. Ancak taşıyıcı aracılı ilaç etkileşimleri ilgili kılavuzda yer almamaktadır (120).

Sinüzoidal *influx* taşıyıcıları (OATP1B1, OATP1B3 ve OCT1) ile kanaliküler taşıyıcılar (MATE1, BSEP ve MRP2) yasal otoritelerin kapsamı içerisinde yer

almıştır. Bu taşıyıcılar klinik farmakokinetik, ilaç-ilaç etkileşimleri ve ilaçla indüklenen toksisite yönünden özelliklerine ve ana etkileşim organına göre *in vitro* ve *in vivo* değerlendirmeye tabidir. Hepatik taşıyıcılar açısından yasal otoritelerin önerileri Tablo 2.1.'de verilmiştir. FDA kılavuzunda BSEP ile ilgili bir öneri yoktur. Ancak PMDA'da BSEP inhibisyonunun endojen maddelerin safra ile itrahının azalmasına yol açabileceği bilgisine yer verilmiştir (6). EMA'da BSEP inhibisyonunun hepatik güvenlik çalışmaları kapsamında öncelikli olarak araştırılması önerilmektedir. FDA'in aksine EMA OCT1 polimorfizminin etkisini göz önünde bulundurarak OCT1'i de kapsamına almıştır (4). PMDA'da hepatik OCT1'i tanımlanmaktadır ancak araştırma ve değerlendirme kriterine yer verilmemiştir (6).

Tablo 2.1. Hepatik taşıyıcıların *in vitro* değerlendirilmesinde yasal otoritelerin önerilerinin karşılaştırılması (3, 4, 6).

Gen	Hepatik taşıyıcı	Ana etkileşim mekanizması	Yasal otorite	Substrat çalışması	İnhibitör çalışması
<i>SLCO1B1</i> , <i>SLCO1B3</i>	OATP1B1 , OATP1B3	Hepatik hücre içine alım	FDA ^a	+ (hepatik eliminasyon \geq %25 total klerens)	+
			PMDA		
			EMA		
<i>SLC22A1</i>	OCT1	Hepatik hücre içine alım	FDA	-	-
			PMDA	+/-	+/-
			EMA	+/- ^b	+/-
<i>SLC47A1</i>	MATE1	Böbrek hücre içine alım/çift yönlü taşıma	FDA	+	+
			PMDA	+	+
			EMA	+/- ^b	+/-
<i>ABCB1</i>	P-gp	İntestinal <i>efflux</i>	FDA	+	+
			PMDA	+	
			EMA	+/- ^b	
<i>ABCG2</i>	BCRP	İntestinal <i>efflux</i>	FDA	+ ^c	+
			PMDA	+	
			EMA	+/- ^b	
<i>ABCC2</i>	MRP2	Hepatik <i>efflux</i> ve ilaçla indüklenen toksisite	FDA	-	-
			PMDA	+/-	+/-
			EMA	+/- ^b	-
<i>ABCB11</i>	BSEP	Hepatik <i>efflux</i> ve ilaçla indüklenen toksisite	FDA	-	-
			PMDA	+/-	+/-
			EMA	+/- ^b	+/-

(+) Önerilen çalışmaları, (-) İlgili kılavuzda yer verilmemiş çalışmaları (+/-) ise değerlendirilebilir çalışmaları belirtmektedir.

^aFDA *in vitro* substrat çalışmalarının dikkate alınması için ilacın fizyolojik özelliklerinin belirlenmesini önermektedir. ^bEMA renal/safra /intestinal sekresyonun ilaç eliminasyonunun %25'inden fazla olması durumunda bu taşıyıcıların rollerinin aydınlatılmasını önermektedir. ^cDokulardaki dağılım bir güvenilirlik endişesi doğurmadığı sürece BCS Sınıf-1 ilaçlar için önerilmemektedir.

İlaç geliştirme çalışmalarında, *in vitro* etkileşim çalışmalarının zamanlaması oldukça önemlidir. EMA ilaç etkileşimleri kapsamındaki bilginin faz 2 ve faz 3 klinik çalışmalarda ve ruhsat sonrasında ilacın güvenliliğinin temin edilmesi için pratik olarak elde edilebilecek en erken dönemde elde edilmesi gerektiğini belirtmektedir (4). PMDA ilaç etkileşimleri değerlendirmesinin erken ilaç geliştirme evresinde elde edilmesi ile ilaç geliştirme sürecinin etkinliğinin artırılacağını, ilaç-ilaç etkileşimleri aracılı advers etkilerin önlenerek risk-yarar dengesinin optimize edilemesini sağlayacağını belirtmektedir (6). FDA, araştırma ilacının terapötik endikasyonuna göre *in vitro* çalışmaların yapılma zamanının değişkenlik gösterebileceğini belirtmiştir. Örnek olarak ilacın kronik statin (OATP1B1/1B3 substratı) kullanımını olan popülasyonda uygulanacağı öngörülüyorsa OATP-aracılı etkileşim çalışmalarının klinik çalışmalarda gereksiz gönüllü/hasta dışlamasının önüne geçmek için klinik çalışmalardan önce yapılmasını önermektedir (3).

In vitro ve klinik ilaç etkileşim çalışmalarında önerilen substrat, inhibitör ve indükleyici ilaçlar FDA'nın sürekli olarak güncellenen bir internet sitesinde yayınlanmaktadır (32). PMDA'da ilgili listeler kılavuz içinde verilirken (6), EMA prob ilaçların ve *in vitro* sistemlerin seçiminde güncel literatürün esas alınması gerektiğini belirtmiştir (4).

2.3.3. OATP-Aracılı İlaç-İlaç Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi

İlaçların hepatosit içerisine alımında baskın olan yolak taşıyıcı-aracılı taşımadır. OATP-aracılı *influx* birçok ilacın eliminasyonu içinde hız kısıtlayıcı basamak olup ilaç-ilaç etkileşimleri yönünden önemli bir mekanizmadır (90).

Sinüzoidal *influx* taşıyıcılar arasında yer alan OATP1B1 ve OATP1B3 klinikte görülen ilaç-ilaç etkileşimleri ile ilişkilendirildikleri için farmakokinetik çalışmalarda yüksek bir öneme sahiptir (121, 122). Yasal otoriteler hepatik klerensi total klerensin en az %25'i olan ilaçlar için OATP substrat özelliklerinin belirlenmesini önermektedir. Substrat çalışmasının yanısıra OATP inhibitörü veya indükleyicisi olup olmadıkları da öncelikle *in vitro* çalışmalar ile değerlendirilmelidir. OATP aracılı taşımanın *in vitro*

değerlendirmesinde, transfekte hücre hatları, insan hepatositleri veya hepatik hücre hatları gibi çeşitli hücre temelli sistemler önerilmektedir.

In vitro çalışmaların geliştirilmesi ve validasyonu kapsamında kullanılan *in vitro* sistemlerde deney süresince taşıyıcı fonksiyonunun korunduğunun gösterilmesi gerekmektedir. İnsan hepatositlerinin kullanıldığı çalışmalarda taşıyıcı fonksiyonunun gösterilmesi için pozitif kontrol grubu olarak bilinen OATP substratları veya inhibitörleri uygulanmaktadır. Transfekte hücre hatlarının kullanıldığı çalışmalarda ise negatif kontrol olarak transfekte edilmemiş kontrol hücreleri kullanılmaktadır. Ayrıca hücresel sistemin (ör. hücre kaynağı, pasaj numarası, hücre yoğunluğu) ve deneysel koşulların (ör. inkübasyon süresi, pH, örnek alma aralığı) karakterizasyonunun tamamlanmış olması gerekmektedir. Organik solvan kullanım limiti %1 (tercihen %0,5)'in altında olmalı ve solvan kontrol grubu çalışmaya eklenmelidir. Sisteme spesifik olmayan bağlanma, ilaçların çözünürlük sınırı ve ortama serum veya protein eklenmesinin etkisinin değerlendirilmesini takiben ilacın total geri kazanım derecesi gösterilmelidir. Taşıma çalışmaları taşıma hızının doğrusal olduğu koşullarda yapılmalıdır. Çalışmada kullanılacak matriksin ilaç ile etkileşim göstermemesi gerekmektedir. Laboratuvar kabul kriterleri literatürle uyumlu olmalı, çalışma öncesi prob substrat ve inhibitörler ile yapılan çalışmalar doğrultusunda belirlenmiş olmalıdır (3).

Çeşitli inhibitörlerin OATP1B1 ve OATP1B3 fonksiyonunu pre-inkübasyon zamanına bağlı olarak uzun süreli inhibe ettiği gösterilmiştir (123). Örneğin, pre-inkübasyon sonucu siklosporin A (124-126), rifampisin ve dasatinibin (127) OATP1B1 (124-127) ve OATP1B3 (124, 127) üzerindeki inhibisyon potansi artmış, inhibisyon sabiti değerleri ise küçülmüştür. Ayrıca pre-inkübasyon yaklaşımı ile inhibitör ve substratın birlikte uygulamasına göre inhibisyon derecesinin *in vivo* kestiriminde başarı artmıştır. (124, 127). Bu bilgiler doğrultusunda FDA ve PMDA OATP1B inhibisyon çalışmalarında en az 30 dk süreyle pre-inkübasyon yapılmasını önermektedir (3, 6).

In vitro çalışmalar sonucunda bir ilacın OATP1B1/B3 substratı veya inhibitörü olarak değerlendirilmesi için yasal kılavuzlarda önerilen koşullar Tablo 2.2.'de yer

almaktadır. Tablo 2.2.'de belirtildiği gibi bir ilacın inhibitör olarak belirlenmesinde inhibitör potensini yansıtan maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı (*the half maximal inhibitory concentration*, IC50), inhibisyon sabiti (*inhibitory constant*, K_i) veya R değeri için belirlenmiş sınır değerler kullanılmaktadır. R değeri, inhibitör olup olmadığı araştırılan ilacın varlığında ve yokluğunda substrat ilacın eğri altında kalan alan (EAA) değerlerinin kestirim oranı olup (128) hesaplama Eşitlikleri Tablo 2.2.'de yer almaktadır.

Tablo 2.2. Substrat ve inhibitör çalışma sonuçlarının yorumlanması (3, 4, 6).

Yasal otorite	Substrat çalışmaları		İnhibitör Çalışmaları		Pozitif sonuç değerlendirme
	In vitro çalışmalar- Pozitif sonuç kriteri	Pozitif sonuç değerlendirme	In vitro çalışmalar- Pozitif sonuç kriteri		
			Eşitlik	Sınır değer	
FDA (3)	Transfekte hücrede kontrol grubuna göre hücre içine alım: ≥ 2 -kat veya İnhibitörle hücre içine alım $\leq \%50$ (K_i veya IC_{50} 'nin ≥ 10 kat konsantrasyonunda) *	Güvenlilik koşulları, terapötik indeks ve birlikte kullanılması olası inhibitör ilaçlar değerlendirilerek bilinen klinik çalışma yapılması dikkate alınır. <i>In vivo</i> prob inhibitör kullanılmalıdır	$I_{in,maks} = \frac{I_{maks} + (f_a \times F_g \times k_a \times Dose)}{Q_h}$	≥ 1.1	Birlikte kullanılması olası substrat ilaçlar değerlendirilerek klinik çalışma yapılması dikkate alınır. <i>In vivo</i> prob substrat kullanılmalıdır
PMDA (6)	Transfekte hücrede kontrol grubuna göre hücre içine alım: ≥ 2 -kat veya İnsan hepatositlerinde hücre için alımının ve bu mekanizmanın bilinen inhibitörlerle inhibisyonunun gösterimi *	İnhibitör olarak rifampisin (tek doz) veya siklosporin ile klinik çalışma dikkate alınır	$I_{inlet,max} = C_{maks} + \frac{(f_a \times F_g \times k_a \times Doz)}{Q_h}$ $R = 1 + \frac{f_{u,p} \times I_{inlet,maks}}{K_i \text{ or } IC_{50}}$	≥ 1.1	Klinik çalışma dikkate alınır. <i>In vivo</i> prob substratlar kullanılır
EMA (4)	Sınır değer belirtilmemiştir İnhibitör varlığında ve yokluğunda değerlendirme yapılır Taşıyıcı doygunluğu göz önüne alınır	Potent inhibitörle veya taşıyıcı aktivitesi göstermeyen gen taşıyan farmakogenetik grupla klinik çalışma uygulanır	$[I]_{u,inlet,maks} = f_{u,b} \times (I_{maks,b} + f_a \times F_g \times k_a \times Doz / Q_h)$ $\frac{25 \times [I]_{u,inlet,maks}}{K_i \text{ or } IC_{50}}$	≥ 1 Eşdeğer R 1.04 (=1 + 1/25)	Valide edilmiş prob ilaçlarla klinik çalışma önerilir

*alternatif sınır değerler kanıtlanabilir.

Kısaltmalar: Maksimum plazma konsantrasyonu (C_{maks}), total ilacın maksimum hepatik inlet konsantrasyonu ($I_{in, max}$, $I_{inlet maks}$), serbest ilacın maksimum hepatik inlet konsantrasyonu ($[I]_{u,inlet maks}$), kanda serbest ilaç fraksiyonu ($f_{u,b}$), plazmada serbest ilaç fraksiyon ($f_{u,p}$), absorbe olan ilaç fraksiyonu (f_a), intestinal biyoyararlanım (F_g), absorpsiyon hız sabiti (k_a), kan-plazma konsantrasyon oranı (R_b), hepatik kan akış hızı (Q_h), inhibisyon sabiti (K_i), yarı-maksimal inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}), araştırma ilacı varlığında ve yokluğunda substratın plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan (EAA) değerlerinin oranı (R).

2.3.4. *In vivo* Preklinik Çalışmalar

Taşıyıcı aracılı farmakokinetik ve ilaç-ilaç etkileşimlerinin incelenmesinde *in vivo* doğal tip (*wild-type*) fare, sıçan ve sinomolgus maymunu modellerinin yanı sıra şimerik fare ve sıçan modellerinde insanlaştırılmış karaciğer, gen silinmiş (*knock-out*) fare modelleri (ör. Slco1a/1b^(-/-) ve *humanized* OATP1B1 transporter model gibi insanlaştırılmış taşıyıcı ekspres eden fare modelleri) kullanılmaktadır (129).

Sıçanlarda OATP-aracılı ilaç-ilaç etkileşimleri gözlenmektedir. Ancak sıçan Oatp1b2 ile insan OATP1B1 %64 aminoasit benzerliğine sahipken (130), sinomolgus maymunlarda OATP1B1 ve OATP1B3 taşıyıcıları insan OATP1B1 ve OATP1B3 taşıyıcılara sırasıyla %92 ve %94 benzerlik (131) gösterdiğinden son yıllarda OATP-aracılı etkileşim çalışmaları için yararlı bir preklinik model olarak önerilmiştir (132, 133).

Taşıyıcı geni dışlanmış/silinmiş hayvanlar ile doğal tip hayvanların karşılaştırılması ilaçların ilgili taşıyıcı aracılı farmakokinetik parametrelerinin belirlenmesi ve ilaç-ilaç etkileşimi için önemli bir öngörü sağlamaktadır. Ancak insan ve hayvanlar arasında taşıyıcı ekspresyonu ve aktivite düzeyi yanında ilaçların farmakokinetiği ve taşıyıcılara karşı afinitelerinin farklı olması hayvan modellerinin kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca, ilgili genin silindiği hayvanlarda diğer taşıyıcıların ve enzimlerin inhibisyonu veya indüklenmesi söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle ITC preklinik hayvan modellerinden kliniğe translasyonun sadece vaka özelinde olması, *in vitro* ve insan farmakokinetik verisi ile desteklenmesi gerektiğini önermektedir (8).

2.4. Hepatik Taşıyıcı Aracılı Farmakokinetik ve İlaç İlaç Etkileşimlerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

2.4.1. *In vitro* Yöntemler

Hepatik taşıyıcı aracılı farmakokinetik ve ilaç-ilaç etkileşimlerinin değerlendirmesinde ekspresyon sistemleri, tam hücre sistemleri ve bu tekniklerin kombinasyonu kullanılmaktadır.

- **Ekspresyon Sistemleri**

Ekspresyon sistemleri, membran veziküllerine, ölümsüz bir hücre hattına veya oositlere araştırılacak ilaç taşıyıcı proteinin transfekte edildiği sistemlerdir. Bu sistemler kinetik ve inhibisyon parametrelerinin tayini için kullanılmaktadır. (8). Membran vezikülleri ve hücre temelli çift yönlü taşıma sistemleri P-gp ve BCRP-aracılı taşımanın araştırılmasında kullanılmaktadır. *Efflux* taşımanın incelenmesinde kullanılan bir diğer sistem araştırılan taşıyıcıyı eksprese eden ters çevrilmiş (*inverted*) plazma membran vezikülleridir. Bu yöntemde ilaç molekülleri membrana sitoplazmik taraftan ulaştığı için doğrudan *efflux* taşıyıcılarla etkileşime girmektedir (134). Transfekte hücre hatları olarak ise P-gp-eksprese eden Madin-Darby köpek böbrek hücreleri-II (*Madin-Darby Canine Kidney cells*, MDCKII) hücre hattı en sık kullanılan sistemlerdendir (135).

OATP-aracılı taşımanın incelenmesinde en sık kullanılan sistemler ise OATP-eksprese eden HEK293 hücre hattıdır (136, 137). Ayrıca insan OATP transfekte edilmiş Çin hamster over (*Chinese hamster ovary*) hücreleri ve OATP-transfekte edilmiş MDCKII/FRT (*flippase recognition target*) hücreleri de hepatik alım kinetiklerinin incelenmesinde kullanılan sistemlerdir (137, 138).

- **Tam Hücre Sistemleri**

Tam hücre sistemleri (*whole-cell systems*) ise primer hepatositler, hepatik mono/ko-kültürler (ör. hepatosit yanında Kupffer hücreleri içeren ko-kültür) veya

diğer hepatik hücre hatları (ör. HepG2) gibi hücre temelli sistemler olup hücre içine alım, metabolizma ve/veya *efflux* kinetik parametreleri gibi çoklu parametre tayininde kullanılabilir (8).

Hepatositler süspende, tutunan veya sandviç kültür formunda taşıyıcı kinetiklerinin araştırılması amacıyla yaygın bir kullanıma sahiptir. Süspende hepatositlerde inkübasyon sırasında kanaliküler taşıyıcıların hücre içine doğru hareket edebilmesi (*internalization*) yöntemin kısıtlayıcı unsurlarındandır (139). Tutunan formdaki hepatositler süspende hepatosit kültürüne göre daha uzun süreli inkübasyona izin vermektedir. Ancak hücre kültürü koşulları taşıyıcıların fonksiyonunu etkileyebileceği için dikkatle belirlenmeli ve sistem valide edilmelidir (3).

SCH sistemi taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşimleri hakkında bilgi veren önemli bir yöntemdir. SCH sisteminde hepatositler arasındaki sıkı kavşak oluşumunun rejenarasyonu ile safra kanalı benzeri yapılar gelişmektedir. Bu sıkı kavşakların oluşumu ortamda kalsiyum ve magnezyum katyonlarının varlığı ile kontrol edilebilmektedir. Böylece safraya itrah mekanizması oluşturularak hepatik *efflux* taşıyıcılar üzerinde çalışmalar yapılabilmektedir. Primer insan hepatosit kültürleri farklı matriks koşullarında yapılarını altı gün (140) boyunca korurken, kollajen sandviç kültür konfigürasyonuna bu süre altı haftaya kadar uzamaktadır (141). SCH sisteminde kültür koşullarına göre *influx* taşıyıcıların ekspresyonu azalma *efflux* taşıyıcıların ekspresyon seviyeleri ise çoğunlukla artma eğilimindedir (18). Ancak 96 saatlik kültür süresince insan SCH sisteminde *influx* taşıyıcıların ekspresyon ve fonksiyonunun (142) sıçan SCH sistemine göre daha iyi korunduğu gösterilmiştir (142).

Kumar ve ark. tarafından hepatosit modelleri (süspende, tutunan ve SCH formda) ve karaciğer dokusunda taşıyıcıların total ve plazma membranındaki bolluğu (*abundance*) incelenmiştir. OATP1B1/2B1/1B3, OCT1 ve OAT1 gibi hepatik *influx* taşıyıcıların total ve plazma membran miktarı bakımından hepatositler ve karaciğer dokusu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, sinüsoidal *efflux* taşıyıcı MRP3 ve kanaliküler *efflux* taşıyıcıları MRP2 ve P-gp'nin total miktarı insan SCH sisteminde karaciğer dokusuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$) (143).

Bu yöntemlerde hücre içi ilaç konsantrasyonu ölçülmediği için *in vitro* sistemlerin birden fazla taşıma mekanizmasını birbirinden ayırt etmesi güçtür. Ayrıca seçilen *in vitro* sisteme göre pasif difüzyon, taşıyıcı aracılı taşıma ve/veya metabolizmanın tayin edilen katkı derecesi de değişebilmektedir. Özellikle pasif difüzyonun önemli ölçüde katkısı bulunan ilaçlar için bu fark daha önemli olmaktadır (13). Örneğin, repaglinid için aktif hücre içine taşıma ve pasif difüzyon klerensi arasındaki fark tutunan hücrelerde SCH sistemine göre daha belirgindir (14, 144).

Günümüzde birçok yeni alternatif *in vitro* hepatik sistem geliştirilmektedir. İlaç dispozisyonunda kullanılmak üzere geliştirilmiş ve kullanıma hazır sistemlere, dondurulmuş ve geçirgen (*cryopermeabilized*) Metmax hepatositleri, daha uzun inkübasyon süresine dayanıklı ko-kültür sistemleri, 3D karaciğer sferoidleri ve mikroakışkan (*microfluidic*) dinamik sistemler örnek olarak verilebilir (145). Ancak, özellikle dondurulmuş hepatositler için izolasyon, dondurma ve hücre kültürü aşamalarında taşıyıcı aktivitesi veya ekspresyonunda görülebilecek kayıp (16, 21) tüm sistemler için göz önünde bulundurulmalıdır

2.4.2. *In situ* ve *Ex vivo* Preklinik Çalışmalar

Karaciğer perfüzyonu tekniği, karaciğerin anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün korunduğu ve taşıyıcı aracılı farmakokinetik ve ilişkili ilaç-ilaç etkileşimlerinin araştırılmasında kullanılan bir preklinik yöntemdir.

Perfüzyonun amacına göre, karaciğer kanüle edildikten sonra deney hayvanlarından çıkartılarak kapalı özel bir sistem içinde (izole karaciğer) veya gövdede tutularak (*in situ* karaciğer) çalışılabilmektedir (23). İzole karaciğerde organ kapalı bir sisteme alındığından perfüzyon sırasında karaciğerin farklı loblarının incelenmesi ve örnek toplama işlemleri daha kolay olarak gerçekleştirilmektedir. Ancak karaciğerin orijinal pozisyonunun korunmasındaki zorluk ve mekanik hasara maruz kalabilmesi bu yöntemin dezavantajları arasında yer almaktadır. *In situ* perfüzonda ise karaciğerin çıkarılması işlemi olmadığından teknik geliştirme daha kolay ve hata olasılığı daha düşüktür (23). Miller ve ark. tarafından 1951 yılında geliştirilen *in situ* izole sıçan karaciğer perfüzyon tekniği, hepatik absorpsiyon,

metabolizasyon, hücre içi/hücreler arası iletişim ve organ nakli gibi bir çok araştırma konusu için tercih edilen ve iyi tanımlanmış dinamik bir modeldir (11, 23-25, 146-148).

Karaciğer perfüzyonu hepatik sistem dışı bileşenlerin etkisinin ortadan kaldırıldığı bir yöntem olup hepatik farmakokinetik parametrelerinin tayininde altın standart olarak kabul edilmektedir (26). İlacın karaciğer dokusu ve safra içerisindeki dağılımı analiz edildiği için hepatik taşıyıcıların kısmi rollerinin ve taşıyıcı girişiminin araştırılması için önemli bir yöntemdir (27). Karaciğer perfüzyonu verileri *in vivo* klerens kestirimlerinin iyileştirilmesi için de kullanılmaktadır (28). Ancak sıçan ve insan OATP/Oatp taşıyıcıları arasındaki sınırlı bir benzerlik (7) ve NTCP taşıyıcısının sıçanlarda bulunmaması nedeniyle karaciğer perfüzyonu modeli sadece ilaç-ilaç etkileşimleri kestiriminin çapraz kontrolünde kullanılmaktadır (27).

2.4.3. Klinik Çalışmalar

Preklinik çalışmalarda belirlenmiş olan ilaç-ilaç etkileşimlerinin klinikte önemli olup olmadığı klinik çalışmalarla gösterilmesi gerekmektedir (5). 2017 yılında FDA tarafından onaylanmış ilaçlar için raporlanmış ilaç-ilaç etkileşimlerinin yarısından fazlası OATP-ilişkilidir. Bu ilaçların 34'ünde OATP-aracılı etkileşim EAA düzeyinde 5 kat ve üzerinde bir artış yaratarak klinik olarak anlamlı kabul edilmiştir (149).

Klinik ilaç-ilaç etkileşimi çalışmaları prospektif çalışmalar ve retrospektif değerlendirmeler ile yapılabilmektedir. Retrospektif yöntemde yararlanılan önceki klinik çalışmalarının amacı etkileşimlerin tespiti olmadığından doğru bir değerlendirme imkanı sınırlıdır. Prospektif çalışma protokolleri ise farmakokinetik örnekleme planı ve ilaçların uygulanma zamanı gibi faktörlerin belirlendiği ve etkileşimlerin tespitine uygun olarak tasarlanmaktadır. Araştırma ilacı taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşiminde substrat olarak test ediliyorsa, seçilecek olan ilacın incelenen taşıyıcının bilinen bir inhibitörü olması gerekmektedir. Bir taşıyıcı için substrat veya inhibitör olarak bilinen ilaçlar diğer bir taşıyıcı ve/veya enzim ile de etkileşime girebilmektedir. Günümüzde halen sadece bir taşıyıcıya yönelik indeks substrat veya

indeks inhibitör olarak tanımlanmış bir ilaç bulunmamaktadır. Bu nedenle taşıyıcı aracılı etkileşimlerin incelendiği klinik çalışmalarda kullanılacak substrat veya inhibitör ilaç çoğunlukla popülasyonda araştırma ilacı ile birlikte kullanımı muhtemel ilaçlar arasından seçilmektedir. Ancak bu çalışma sonuçlarının diğer ilaçlara ekstrapolasyonu sınırlıdır. Ayrıca ilacın OATP1B1 veya BCRP gibi genetik polimorfizm gösteren bir taşıyıcının substratı olduğu durumlarda çalışmalar farklı taşıyıcı genotipine sahip gönüllülerde de yapılabilmektedir (5).

Klinik ilaç-ilaç etkileşimi çalışmalarına, etkileşimin büyüklüğünün ve değişkenliğinin gözlenebileceği ve güvenilir bir kestirim sağlayacak sayıda sağlıklı gönüllü veya hastanın (ilacın güvenlik sebebiyle sağlıklı gönüllülere uygulamadığı durumlarda) dahil edilmesi gerekmektedir. Çalışmalarda genellikle en yüksek ilaç dozu seçilerek en kısa dozlama aralığında uygulanır. İnhibitörün potansiyel bir indükleyici olmadığı veya zaman bağımlı inhibisyon göstermediği durumlarda tek doz uygulanabilir. Ancak yarılanma ömrü uzun olan substratlar için inhibitörün çoklu dozda uygulanması gerekmektedir. Birden fazla etkileşim mekanizmasının görülebileceği durumlarda ise tek doz inhibitör uygulama seçeneği değerlendirilmelidir. Substratın zamana bağlı farmakokinetik göstermediği durumlarda substrat tek doz uygulanabilir, aksi halde çoklu dozda uygulanarak hem substrat hem de inhibitör için kararlı durum koşulları sağlanmalıdır. İlaçların birden fazla uygulama yolu olması durumunda genellikle beklenen etkileşim mekanizmasına göre tercih yapılmaktadır. Klinik çalışmalarda, paralel, randomize çapraz tasarım ve tek-sekans çapraz tasarım kullanılabilir. Çoğunlukla substrat ve inhibitör eş zamanlı uygulanırken, OATP1B taşıyıcılarına yönelik çalışmalarda substrat gecikmeli olarak uygulanır. Örnek alma zaman noktaları, farmakokinetik parametreleri en iyi tanımlayacak şekilde belirlenmelidir (5).

Klinik ilaç-ilaç etkileşimleri çalışmalarında sadece sistemik ilaç maruziyetinin ölçülmesi halinde bu tip bir etkileşim belirgin olmayabilir. Ancak bir ilacın bir taşıyıcının substratı, inhibitörü veya indükleyicisi olması halinde, ilacın toksisitesinde ve/veya etkinliğinde artış, dokulardaki dağılımının değişmesi ve endojen maddelerin dispozisyonunda farklılık ortaya çıkabilir. Özellikle etkileşim çalışmalarının zamanlamasının ilacın terapötik endikasyonuna göre belirlenmesi önerilmektedir.

Örneğin araştırma ilacını kullanan hastalarda eş zamanlı statin kullanımı öngörülüyorsa bu ilacın öncelikle OATP1B1/B3 taşıyıcı ile etkileşiminin değerlendirilmesi gerekmektedir. Etkileşimin düşük bulunması halinde, klinik araştırmalara statin kullanan gönüllülerin dahil edilmesiyle hasta popülasyonunu daha iyi yansıtan bir klinik çalışma tasarımına gidilebilmektedir (3).

Klinik çalışmalarda bir diğer yaklaşım prob ilaç kokteyli uygulanmasıdır. Bu yaklaşımın temel prensibi birden fazla taşıyıcı substratının aynı anda uygulanması ile araştırma ilacının farklı enzim ve taşıyıcılar üzerindeki etkisinin aynı anda incelenmesidir (150). Bu yaklaşım klinikte daha çok CYP-aracılı etkileşimler için kullanılsa da (151-153), son yıllarda araştırmalar çoklu taşıyıcı substrat kokteyllerinin kullanılmasını önermektedir (154-156). Ancak, seçilen prob substratlar arasında etkileşim olmamasına ve ilacın güvenliliği açısından uygulanacak dozlara dikkat edilmelidir. Bu yaklaşım özellikle çalışma sonucunda hiçbir etkileşimin gösterilmediği durumlarda klinik ilaç-ilaç etkileşimleri çalışmalarının sayısının azaltılması yönünden üstünlük sağlamaktadır. Ancak özellikle birden fazla taşıyıcı ve/veya enzime bağlanan bir prob substrat ile araştırma ilacı arasında etkileşim bulunması halinde ana etkileşim mekanizması ilave çalışmalar ile aydınlatılmalıdır (157).

2.5. İn Vivo Hepatik Klerens Kestirimi ve Taşıyıcı Aracılı İlaç-İlaç Etkileşiminin Değerlendirilmesi

2.5.1. Hepatik Klerens Kavramı

CL birim zamanda ilaçtan temizlenen kan hacmidir. İlacın sistemik dolaşımdan eliminasyon hızını ifade eden klerens Eşitlik 2.2.'ye göre hesaplanmaktadır.

$$\frac{dC}{dt} = CL \times [C] \quad (2.2.)$$

dC/dt: Eliminasyon hızı, [C]: Plazma konsantrasyonu

İlaçların karaciğerden eliminasyon hızının tanımlanmasında hepatic klerens kavramı kullanılmaktadır (158). Hepatik ilaç dispozisyonunun doğru bir şekilde tayin

edilmesi için hepatik eliminasyon hız ve derecesinin belirlenmesinin yanında eliminasyonda rol oynayan enzim ve taşıyıcılar hakkında da bilgi edinmek gerekmektedir. Hepatik dispozisyon için ana mekanizmaların belirlenmesi ile ilaç-ilaç etkileşimi ve polimorfizm potansiyeli konusunda ön değerlendirme yapılabilmektedir.

Hepatik klerensi etkileyen faktörler ilaçların hepatik ekstraksiyon oranına göre farklı oranda belirleyici olmaktadır. Hepatik ekstraksiyon oranı, ilaçların karaciğere gelen ve karaciğerden uzaklaşan kan konsantrasyonları arasındaki farkın gelen ilaç konsantrasyonunu oranlanması ile elde edilen bir değerdir. Yüksek hepatik ekstraksiyon oranına ($>0,7$) sahip olan ilaçların (ör. Morfin, lidokain, verapamil, propranolol) hepatik klerensi kan (perfüzyon) akış hızına bağlıdır ve hepatik klerensleri yüksektir (>800 mL/dk; $<30-40$ biyoyararlanım). Bu grupta yer alan ilaçlar oral yolla uygulandıklarında genellikle karaciğerden ilk geçiş etkisine uğramaktadırlar. Hepatik klerensleri karaciğer kan akışındaki değişikliklere karşı oldukça duyarlı iken, plazma proteinlerine bağlanma derecesi veya intrinsik klerens değişikliklerinden (hepatik metabolizma ve safrayla atılımdaki farklılıklar) etkilenmemektedir. Hipotansiyon, kalp yetmezliği, portal/hepatik ven trombozu gibi hepatik kan akışının düştüğü durumlarda bu tip ilaçların hepatik klerensinde azalma ve buna bağlı olarak toksisitede artış gözlenebilmektedir (40, 158, 159).

Düşük hepatik ekstraksiyon oranına ($<0,3$) sahip ilaçlar ise 'kapasite bağımlı' klerense (<300 mL/dk; $>70-80$ biyoyararlanım) sahiptirler. Düşük hepatik klerense sahip olan ilaçlar (ör. parasetamol, aminopirin, varfarin, fenitoin, diazepam) oral yolla kullanıldıklarında genellikle ilk geçiş etkisine uğramamaktadırlar. Bu ilaçların klerensleri, plazma proteinlerine bağlanma veya ilaç dispozisyonundaki değişikliklerden etkilenirken karaciğer kan akışından bağımsızdır. Akut karaciğer yetmezliği ve ileri siroz vakalarında karaciğer hücre kütlelerinde azalma olması durumunda bu ilaçların sistemik klerensleri azalmakta ve kronik maruziyetleri halinde ilaçlar karaciğerde birikebilmektedir. Yüksek klerense sahip ilaçların aksine tek dozda toksik yanıt oluşturma ihtimalleri azdır (40, 158, 159).

Hepatik ekstraksiyon seviyesi orta (0,3-0,7) olan ilaçlar (ör. aspirin, kinidin, kodein, nortriptilin) ise hem hepatik kan akışına bağlı olarak hem de kapasite bağımlı değişikliklere duyarlı olan hepatik klerens değerlerine sahiptir (40, 158, 159).

Ayrıca logD değeri 0'dan büyük maddeler için (ör. logD_{diklofenak}: 1,50) perfüzyon içerisinde protein olmaması durumunda veya proteine bağlanmanın ihmal edilebilir düzeyde olduğu durumlarda hız kısıtlayıcı mekanizma kan akışı iken, yüksek oranda proteine bağlanma söz konusu olduğunda hız kısıtlayıcı mekanizma hücresel permeabilitedir (25).

Genişletilmiş klerens modeline göre son yıllarda pasif difüzyon ve safraya itrah gibi karaciğer dispozisyon mekanizmalarının tanımlanmasında CL terimi kullanılmaktadır (12). Metabolizma ile hepatik klerens (CL_{met}), aktif hücre içine alım (CL_{aktif}), pasif difüzyon (CL_{pasif}) ve safraya itrah klerensi (CL_{safraya}) olarak ifade edilmektedir. Taşıyıcı aracılı taşıma mekanizmasında doygunluk söz konusu olduğundan substrat konsantrasyonu ve taşıma hızı arasındaki ilişki Michaelis-Menten eşitliği ile (Eşitlik 2.3.) tanımlanmakta olup taşıyıcı aracılı mekanizmalar için CL hesabı (CL_{taşıyıcı}) Eşitlik 2.4.'te belirtilmektedir.

$$v = \frac{v_{maks} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (2.3.)$$

$$CL_{taşıyıcı} = \frac{v_{maks}}{K_m + [S]} \quad (2.4.)$$

v: Taşıma hızı (mol/hacim/zaman), v_{maks}: Maksimum Taşıma hızı (mol/hacim/zaman), K_m: Maksimum Taşıma hızının yarısında taşınan substrat konsantrasyonu (mol/hacim), [S]: Substrat konsantrasyonu (mol/hacim)

2.5.2. *In vitro-In vivo* Ekstrapolasyon

In vitro çalışmalardan elde edilen CL değerlerinin farmakokinetik modellerde kullanılmak üzere *in vivo* CL değerlerine ekstrapole edilmesi gerekmektedir. Hepatik CL değerlerinin IVIVE ile tayin edilmesinde genellikle fizyolojik ölçeklendirme yaklaşımı kullanılmaktadır (70, 144, 160, 161). Örneğin tutunan hepatositler üzerinde

yapılan bir çalışmadan elde edilen *In vitro* CL değerinin ölçeklendirilmesinde karaciğerin her gramındaki hepatosit sayısı (*number of hepatocytes per gram liver*, HPGL/ *hepatocellularity*) ve karaciğer ağırlığı kullanılan fizyolojik ölçeklendirme faktörleridir.

İnsanlar için HPGL değerlerinin geometrik ortalaması 99×10^6 cells/g (%95 güven aralığı: 74 - 131 x 10^6 cells/g) (162) olarak yayınlanmış olup en yaygın kullanılan değer 120×10^6 hücre/g (14, 163-166) ve insan karaciğer ağırlığı olarak 21,4 g karaciğer/kg vücut ağırlığı alınmaktadır (14, 164, 166). Sıçanlarda referans ölçeklendirme değerleri olarak HPGL 120×10^6 hücre/g karaciğer ve sıçan karaciğer ağırlığı olarak 40 g/kg vücut ağırlığı değerleri kullanılmaktadır (167).

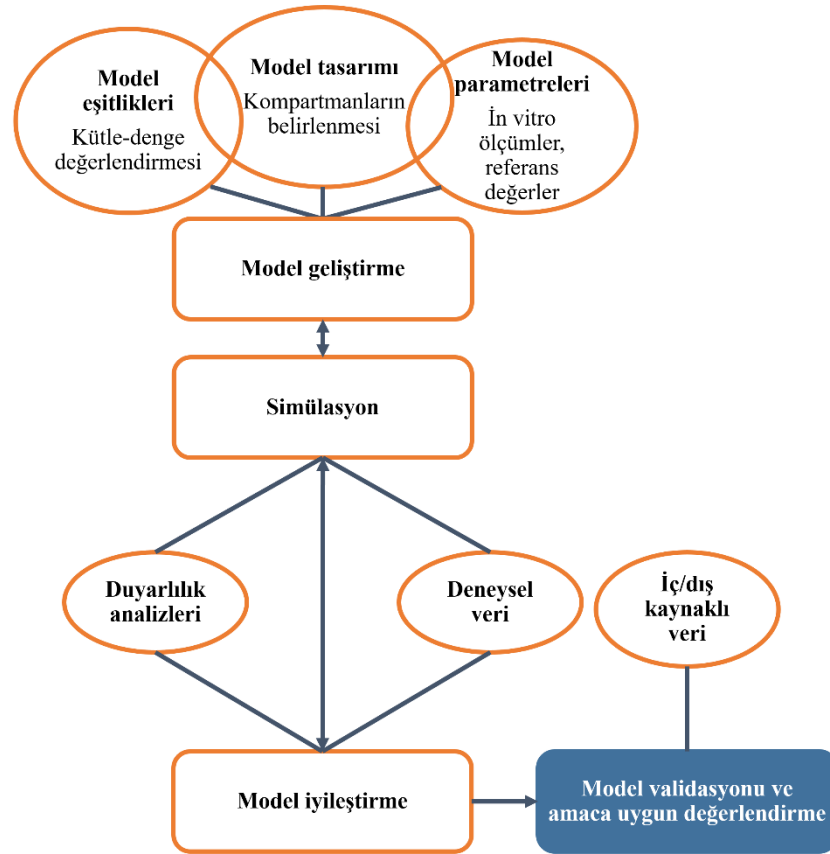
Özellikle transfekte hücre hatları ve membrane veziküllerinin kullanıldığı durumlarda taşıyıcıların ekspresyonu ve aktivitesine yönelik düzeltme faktörlerinin uygulanması gerekir. *In vitro* hepatosit ve transfekte hücre hatlarında ilgili taşıyıcının spesifik prob substratı için hesaplanan CL değerlerinin oranı olan bağıl aktivite faktörü (*relative activity factor*, RAF) (168) veya bağıl mRNA veya protein kantitasyonu yapılarak *in vitro in vivo* sistemler arasındaki ekspresyon farkını ifade eden bağıl ekspresyon faktörü (*relative expression factor*, REF) ile *in vitro* CL değerlerine düzeltme uygulanabilmektedir. Birçok taşıyıcı için spesifik prob substratları henüz bilinmediğinden RAF metodunun uygulanması sınırlıdır. Ancak spesifik inhibitörlerin varlığında ve yokluğunda veya aktiviteleri için kofaktör gereksinimi duyan taşıyıcılarda kofaktör varlığı ve yokluğunda karşılaştırmalı çalışmalar yapılarak her bir taşıyıcının katkısı değerlendirilebilmektedir (169). Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* sistemler arasında aktivite/miktar oranında fark olabileceği gözetilerek ölçeklendirmeye taşıyıcılar için sistemler arası ekstrapolasyon faktörü (*intersystem extrapolation factor for transporters*, ISEF-T) eklenebilmektedir (168, 170).

2.5.3. Mekanistik Farmakokinetik Modelleme

Prelinik çalışmalardan elde edilen veriler ile *in vivo* hücre içerisine alım kinetiklerinin kestirimi için çeşitli modelleme yaklaşımları kullanılmaktadır. Ekspresyon sistemleri aşırı eksprese edilmiş taşıyıcı için kinetik ve inhibisyon

parametrelerinin kestiriminde doğrudan kullanılabilirken, hücresel sistemler ile hücre içine alım, metabolizma, eksorptif taşıma ve bu mekanizmaların birlikte değerlendirilmesiyle kinetik parametre kestirimi yapılabilmektedir. Hücre içine alım araştırmalarında kullanılan başlıca modelleme yaklaşımları arasında mekanistik kompartman modeli ile hücre içine alım, mekanistik kompartman modeli ile hücre içine alım ve metabolizma ile mekanistik kompartman modeli ile hücre içine alım, metabolizma ve eksorptif taşıma modelleri bulunmaktadır (8).

Mekanistik kompartman modelleri bir dizi matematiksel denklem aracılığıyla ilaçların organ temelli kinetiklerinin aydınlatılması amacıyla taşımaktadır. İlaçların karaciğer dispozisyonlarının incelenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan araçlardır. Modellerin kestirim performansı, girdi parametrelerinin kesinliğine bağlıdır. Mekanistik modelin karmaşıklığı ve simülasyon sürelerinin optimizasyonu dikkate alınmalıdır. Bu kapsamda mekanistik model geliştirilmesi sırasında yapılan çeşitli varsayımlar yapılması gerekebilmektedir. Mekanistik modellemede izlenen yol haritası Şekil 2.7.'de verilmektedir. Bu yaklaşım fizyolojik farmakokinetik modeller gibi çok değişkenli daha karmaşık modellerde de kullanılmaktadır (171, 172).



Şekil 2.7. Mekanistik farmakokinetik model geliştirme süreci ((171, 172) numaralı kaynaklardan hareketle yeniden düzenlenmiştir).

Mekanistik modeller aşağıdan yukarıya (*bottom-up*) yaklaşım izlenerek *in vitro* deneylerden elde edilmiş parametrelerin girilmesiyle *in vivo* profillerin simülasyonu veya yukarıdan-aşağıya (*top-down*) yaklaşım izlenerek *in vivo* deneysel verinin model ile analizi ile çeşitli parametrelerin kestiriminin yapılması veya bu yaklaşımların kombinasyonu olan ortadan-dışarı (*middle-out*) yaklaşımı ile kullanılabilir. Mekanistik modellerin dinamik özellikleri hepatik hücre içine alım, metabolizma ve safraya itrah mekanizmalarının eş zamanlı olarak tanımlanmasına izin verdiği için ilaç-etkileşim bölgesinde substrat ve inhibitöre karşı zamana bağlı serbest konsantrasyon değişiklikleri izlenebilmekte ve bir veya birden fazla mekanizma aracılı gerçekleşen ilaç-ilaç etkileşimleri mekanistik olarak aydınlatılabilmektedir (173-175).

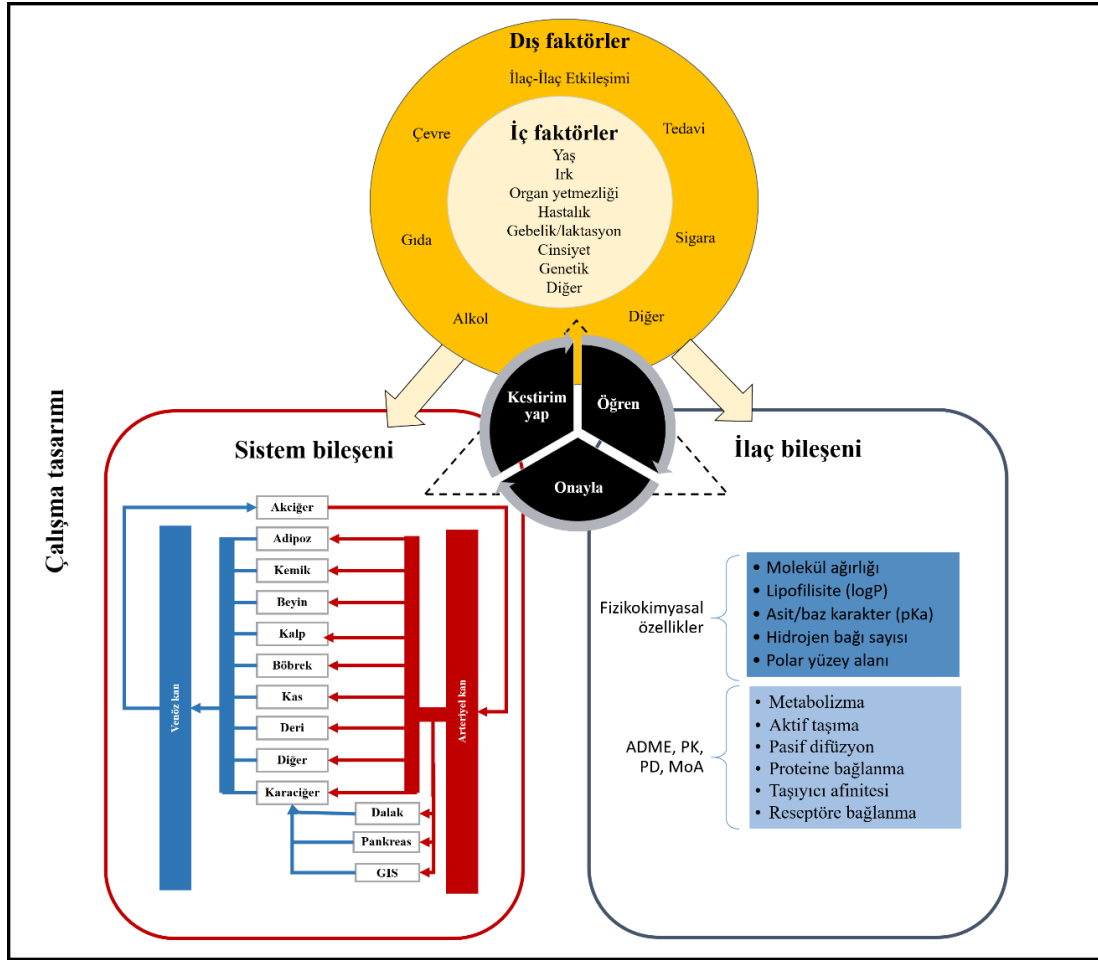
Mekanistik karaciğer modellemelerinde karaciğer, bir ekstraselüler ve bir intraselüler kompartmana (176) veya kan akışıyla seri bağlı bir dizi karaciğer

ekstraselüler ve karaciğer intraselüler alt kompartmana ayrılmaktadır (144, 177). Karaciğer çoklu alt kompartman modelleri, tek kompartman modeline kıyasla hepatik klerens kestirimini iyileştirmek amacıyla çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Ancak bu yaklaşımın etkinliğinin gösterilmesi ve alt kompartman sayısının belirlenmesi için geniş bir madde seti ile ileri bir değerlendirme yapılması gerekmektedir (13).

2.5.4. Fizyolojik Farmakokinetik Modelleme

Fizyolojik farmakokinetik modelleme (*physiologically based pharmacokinetic modeling*, PBPK), ilaçların farmakokinetik (*pharmacokinetic*, PK) ve/veya farmakodinamik (*pharmacodynamics*, PD) (PBPK-PD modeller) davranışlarını mekanik olarak tanımlayan güçlü bir araçtır. PBPK modellerde fizyoloji, popülasyon ve ilaç özellikleri eş zamanlı olarak değerlendirilebilmektedir (178). PBPK parametrelerini kullanan mekanik modeller 1937'de Teorell tarafından başlatılmış olsa da (179), PBPK'nin ilaç dağılımının araştırılmasında kullanılmasına ilişkin ilk çalışmalar Bischoff ve arkadaşları tarafından 60'ların sonlarında ve 1970'lerin başında yayımlanmıştır (180, 181). PBPK modeller etikete doz önerisi gibi bilgilerin eklenmesinde ve belirli klinik çalışmaların gerekliliği ve uygulanmasına ilişkin karar alınmasında destekleyici bir araç olarak kullanılmakta olup ilacın yaşam döngüsü boyunca ilaca dair temel bilgileri sağlamaktadır (178, 182).

Temel olarak sistem bileşeni ve ilaç bileşeninden oluşan PBPK modelleri ile farklı çalışma tasarımı seçenekleri kullanılarak (ör. dozaj rejimi, gönüllü sayısı, örnek toplama zamanı) *in vivo* simülasyon ve/veya parametre kestirimi yapılabilmektedir (Şekil 2.8.). Sistem bileşeni içinde tanımlanan parametreler fizyolojide değişikliklere sebep olan iç ve/veya dış faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Bu koşulların sistem bileşeni içinde tanımlanmasıyla pediatrik grupta, karaciğer yetmezliği veya genetik olarak farklı enzim aktivitesi gösteren popülasyonlar gibi özel koşullar üzerinde çalışılabilmekte ve ilaç-ilaç etkileşimi değerlendirmesi yapılabilmektedir (183).



Şekil 2.8. PBPK model bileşenleri ve ilaç yanıtı üzerinde etkili olan faktörler (Bir veya birden fazla iç ve dış faktörün etkisi PBPK modelin hem sistem hem de ilaç bileşeni aracılığıyla yansıtılabilmektedir. ADME: Absorpsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon; PK: farmakokinetik; PD: farmakodinamik; MoA: etki mekanizması. (183-185) numaralı kaynaklardan hareketle yeniden düzenlenmiştir).

Aynı zamanda PBPK modeller ile klinik çalışma tasarımları iyileştirilebilmektedir veya klinik veriler PBPK modelin iyileştirilmesi için kullanılabilir. İlaç-ilaç etkileşimi çalışmalarında sadece substrat ilacın profilinin izlenmesinin yanında zamana bağlı olarak inhibitör/indükleyici ilacın konsantrasyonu simüle edilebilmektedir (8, 186). PBPK modeller içerisinde duyarlılık analizlerinin kullanılmasıyla sistem parametrelerinin farmakokinetik kestirimler üzerindeki etkisi incelenebilmektedir (19, 124, 144).

PBPK modellerin taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşimlerinin değerlendirilmesinde taşıyıcı ekspresyonu ve aktivite profili üzerinde belirsizlik bulunması, doku

konsantrasyon verisinin bulunmaması veya yetersizliği ve model iyileştirmesinde kullanılacak *in vivo* verinin seçiciliğinin düşük olması gibi güçlükler bulunmaktadır. Ancak artan klinik ilaç-ilaç etkileşimi verisi, taşıyıcıların biyokimyasal ve fizyolojik davranışları hakkındaki bilginin gelişimi, enzim ve taşıyıcıların analizi için farmakogenetik çalışmaların artması ile veri tabanının güçlendirilmesi ile taşıyıcı aracılı ve taşıyıcı-enzim girişimi aracılı ilaç-ilaç etkileşimlerinin kestirimi daha yüksek bir güvenle yapılabilecektir (187-189).

Tüm vücut (*whole body/full body*) PBPK modelleri içerisinde karaciğer mekanistik modelleri kullanılarak karaciğer dokusu ve kan kompartmanı olarak veya kan akışı ile bağlı çoklu ekstraselüler ve intraselüler kompartmanlar şeklinde ifade edilmektedir. (144, 176, 177). Karaciğer kompartmanı “*well-stirred*” model, hız kısıtlayıcı basamağın perfüzyon olarak tanımlandığı “*perfusion-limited*” model ve hız kısıtlayıcı basamağın permeabilite olduğu ve aktif taşımının tanımlandığı “*permeability-limited tissue model with active transport*” gibi farklı yaklaşımlar kullanılarak tanımlanabilmekte ve ilaç-ilaç etkileşimi kinetikleri için başarılı kestirimler sağlanmaktadır. Bu çalışmalarda taşıma mekanizmaları için genellikle farklı *in vitro* sistemler kullanılarak elde edilmiş veriler uygun ölçeklendirme faktörleri kullanılarak, PBPK model içerisinde girdi parametresi olarak tanımlanmaktadır (13).

2.6. OATP-aracılı İlaç-İlaç Etkileşiminin Değerlendirilmesinde Model Substratlar, Endojen Biyobelirteçler ve İnhibitörler

Taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşimlerinde öne çıkan hepatik taşıyıcılar OATP1B1 ve OATP1B3'tür. Statin grubu ilaçlar başta olmak üzere çok sayıda OATP1B substratının bilinen OATP1B inhibitörü varlığında plazma seviyelerinde 5 kat ve üzerinde artış görüldüğünden bu OATP aracılı etkileşimler klinik olarak anlamlı ilaç etkileşimleri arasında yer almıştır (34).

Yeni geliştirilen ilaçların OATP1B aracılı etkileşimleri incelenirken, *in vitro* çalışmalarda bilinen inhibitörler ve substratlar kullanılırken, klinik çalışmalarda bilinen inhibitörler ve klinik olarak duyarlı substratlar kullanılmaktadır (Tablo 2.3.). Tablo 2.3.'te verilen örnekler FDA ve PMDA tarafından yayınlanmış ve ilgili

araştırmalarda kullanılması önerilmiş olan prob maddelerdir. Ancak Washington Üniversitesi Metabolizma ve Taşıyıcı İlaç Etkileşimler veritabanında (*University of Washington Metabolism and Transport Drug Interaction Database*) farklı maddelerin kullanıldığı çalışma örnekleri de yer almaktadır. Substratlar arasından rosuvastatin ve pitavastatin OATP1B inhibitörlerinin etkileşim potansiyelinin hem *in vitro* hem de klinik değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan prob substratlardır (34). Prob inhibitörler arasında hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda sıklıkla kullanılan inhibitörler arasında rifampisin ve siklosporin A yer almaktadır (150, 160, 165, 190).

Rifampisin bilinen bir OATP1B inhibitörüdür ve klinikte intravenöz (iv) ve oral uygulamayı takiben OATP1B substratlarının plazma sevilerinde artışa neden olmaktadır. Rifampisin oral yolla uygulandığında BCRP ve MRP2 gibi intestinal *efflux* taşıyıcıları da inhibe edebilmektedir. Bu nedenle iv ve oral uygulama sonuçları karşılaştırılarak hangi taşıyıcının klinikte anlamlı etkileşime neden olduğu araştırılabilmektedir (34).

Prueksaritanont ve ark. rosuvastatin ve pitavastatin prob substratlarından hangisinin klinikte OATP1B aracılı etkileşimin değerlendirilmesinde daha duyarlı olduğunu bir klinik çalışma ile araştırmıştır. Rifampisinin tek doz iv uygulaması sonucunda pitavastatinin plazma konsantrasyon-zaman profilinin EAA değerinin 7,6 katlık artışı karşısında rosuvastatinin EAA değeri 3,3 kat artmıştır. Oral rifampisin uygulamasının ardından ise pitavastatinin EAA değerini 5,7 kat artarken, rosuvastatin EAA değerini 4,4 katlık bir artış göstermiştir. Pitavastatinin OATP1B-etkileşimleri için daha duyarlı bir prob substrat olduğu değerlendirilirken, oral uygulamaya göre tek doz iv uygulanan rifampisinin OATP1B için daha seçici olduğu tespit edilmiştir (34).

Tablo 2.3. OATP1B1-OATP1B3 substrat ve inhibitör örnekleri (6, 32).

<i>In vitro</i> substrat*	<i>In vivo</i> substrat**		<i>In vitro</i> inhibitör*	<i>In vivo</i> inhibitör**
Kolesistokin oktapeptid-8 ^a Estradiol-17β- glukuronid ^b Estron-3-sülfat ^c Pitavastatin ^{d,e,f,g} Pravastatin ^{d,f,h} Rosuvastatin ^{d,f,g,h} Telmisartan ⁱ	Asunaprevir Atorvastatin Bosentan Danoprevir Dosetaksel ^j Feksofenadin ^k Gliburid Nateglinid	Paklitaksel Pitavastatin ^l Pravastatin Repaglinid Rosuvastatin ^l Serivastatin Simvastatin asit	Siklosporin ^{m,n,o,p} Estradiol-17β- glukuronid ^{n,r} Estron-3- sülfat ^{m,r} Rifampisin Rifamisin SV	Atazanavir ve ritonavir Eritromisin Gemfibrozil Lopinavir ve ritonavir Klaritromisin Rifampisin (tek doz) Siklosporin ^s Simeprevir

**In vitro* çalışmalar için model substrat ve inhibitörler

**Klinik ilaç ilaç etkileşim çalışmalarında ve/veya ilaç etiketinde kullanılmak üzere model substrat ve inhibitörler

(a) OATP1B3 selektif substrat (OATP1B1'e göre)

(b) K_i değeri inhibisyon çalışmalarında daha düşük tayin edilir. Uygun model ilaç özelliklerine sahiptir

(c) OATP1B1 selektif substrat (OATP1B3'e göre). İnhibisyon çalışmalarında K_i değeri daha düşük tayin edilme eğilimindedir

(d) Aynı zamanda MRP2 substratı

(e) Aynı zamanda P-gp substratı

(f) Aynı zamanda NTCP substratı

(g) Aynı zamanda BCRP substratı

(h) Aynı zamanda OAT3 substratı

(i) OATP1B3 selektif substrat (OATP1B1'e göre), nonspesifik absorpsiyonun azaltılması için sisteme albumin ilavesi önerilmektedir.

(j) OATP1B3'ün daha yüksek katkısı için *in vitro* veri önerilmektedir

(k) Aynı zamanda P-gp substratı

(l) OATP1B1'in daha yüksek katkısı için *in vitro* ve farmakogenetik veri önerilmektedir

(m) Aynı zamanda NTCP inhibitörü

(n) Aynı zamanda MRP2 inhibitörü

(o) Aynı zamanda P-gp inhibitörü

(p) İnhibitörle ön inkübasyon K_i değerinde düşmeye neden olur

(r) Aynı zamanda BCRP inhibitörü

(s) Klinik konsantrasyonda intestinal P-gp inhibitörü

Son yıllarda yeni bir yaklaşım olarak taşıyıcıların fonksiyonlarının değerlendirilmesinde ve taşıyıcı aracılı ilaç etkileşimleri araştırmalarında prob substrat kullanımının yanı sıra endojen biyomarker (biyoişaretleyici) tayini gündeme gelmiştir. OATP1B aracılı etkileşimlere yönelik olarak önerilen endojen biyobelirteç (*biomarker*) maddeler arasında bilirubin, koproporfirinler, safra asitleri/sülfat konjugatları bulunmaktadır. Bu çalışmaların birçoğu sinomolgus maymunu üzerinde yapılmış olup, sınırlı insan verisi bulunmaktadır ve OATP1B aracılı etkileşim çalışmalarında kullanımları tam olarak standardize edilmemiştir (191). Taşıyıcı aracılı ilaç etkileşim çalışmalarında endojen biyomarker verilerinin simülasyon ve

modelleme ile birlikte klinik ilaç-ilaç etkileşim çalışma tasarımına ışık tutacağı düşünülmektedir (191).

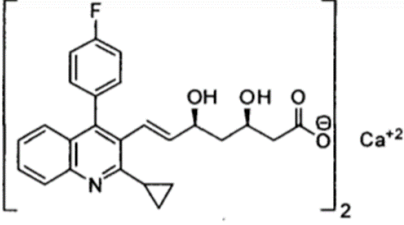
Bir diğer yeni yaklaşım ise pozitron emisyon tomografi (*positron emission tomography*, PET) yöntemi ile radyoaktif işaretli taşıyıcı substratlarının (ör. safra asidi izleyicisi [¹¹C]kolilsarkozin) görüntüleme verisinin kullanılmasıyla eliminasyonda hız kısıtlayıcı basamağın belirlenmesi ve PBPK modellerin sadece plazma ve/veya idrardaki ilaç konsantrasyonu verisi değil dokulardaki ilaç dispozisyonuna dair daha ayrıntılı bilgi içerecek şekilde geliştirilmesidir (82, 192).

2.6.1. Pitavastatin

Pitavastatin karaciğerdeki kolesterol biyosentezinde görev alan 3-hidroksimetilglutaril koenzim A redüktaz enzimini inhibe ederek etki gösteren hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan statin grubu bir ilaçtır (193, 194). Pitavastatin 2003 yılında Japonya'da geliştirilerek piyasaya sunulmuştur. Ruhsat sonrası 20,000 hasta ile her hasta için 2 yıllık periyodlarla 6 yıl boyunca geniş ölçekli bir prospektif çalışma yapılarak uzun dönem güvenilirlik ve etkinliği gösterilmiştir. Bulgular pitavastatinin düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düşürücü etkisinin yanında uzun dönemde yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) seviyesini artırdığı gözlenmiştir (194). Genellikle hiperkolesterolemi, kardiyovasküler hastalıklar gibi başka hastalıklarla birlikte seyrettiği için pitavastatin sıklıkla diğer ilaçlarla birlikte reçete edilmektedir (160).

Pitavastatin sodyum, kalsiyum veya magnezyum tuzu türevleri bulunmaktadır. Pitavastatinin polimorfik formları (A, B, C, D, E, F, K kristalleri ve amorf türevler) arasında K formu diğer kristallere göre daha iyi fiziksel ve kimyasal stabilite göstermektedir (195). Pitavastatin kalsiyumun fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.4.'te yer almaktadır. Tedavide en yaygın olarak kullanılan pitavastatin kalsiyum tuzu olup 1 mg, 2 mg ve 4 mg pitavastatine eşdeğer pitavastatin kalsiyum içeren oral tablet dozaj şeklinde kullanılmaktadır (196).

Tablo 2.4. Pitavastatin kalsiyumun fizikokimyasal özellikleri.

	Pitavastatin kalsiyum	Kaynak
Sinonimler	(3R,5S,6E)-7-[2-Siklopropil-4-(4-fluorofenil)-3-inolil]-3,5-dihidroksi-6-heptenoik asit kalsiyum tuzu	(197)
Kimyasal yapısı		(197)
Molekül formülü*	C ₂₅ H ₂₃ FNO ₄ · 0.5Ca	CAS Numarası 147526-32-7
Görünüm	Beyaz, beyazımsı toz	(198)
Molekül ağırlığı*	440,5 g/mol	CAS Numarası 147526-32-7
pH (%1 sulu çözeltisi)	7,1	(198)
pKa	5,31	(198)
Partisyon katsayısı	0,08	(198)
Çözünürlük (mg/mL)	2 (Dimetil sülfoksit, DMSO) 0,67 (Su) 0,60 (0,1 N Hidroklorik asit, HCl) 0,56 (pH 4,5 asetat tamponu) 3,2 (pH 6,8 fosfat tamponu)	CAS Numarası 147526-32-7, (198)
Hidrojen bağı akseptör*	6	(199)
Hidrojen bağı donör*	3	(199)
Polar yüzey alanı*	90.6 Å ²	(199)

* İn siliko olarak hesaplanmış değerler

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (*Biopharmaceutics Classification System*, BCS)'ne göre düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite gösteren pitavastatin BCS Sınıf 2'de yer almaktadır (195). Biyofarmasötik İlaç Dispozisyonu Sınıflandırma Sistemi (*Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System*, BDDCS) sınıflandırmasına Sınıf 2'de bulunmaktadır. BDDCS'e göre düşük çözünürlük yüksek permeabilite/metabolizma gösteren sınıf 2 ilaçlar intestinal *efflux* taşıyıcıların aktivitesinden etkilenirken, karaciğerde hem hepatik *influx* hem de hepatik *efflux* taşıyıcılarının aktivitesinden etkilenmektedir (200). Tablo 2.5.'te pitavastatinin insanlardaki farmakokinetik özellikleri özetlenmektedir.

Tablo 2.5. Pitavastatinin insanlardaki farmakokinetik özellikleri.

Farmakokinetik özellikler (201)	Pitavastatin
Lakton ön ilaç	Hayır
Biyoyarlanım (%)	60-80
Proteine bağlanma (%)	>99 Albumin ve α 1-asit glikoprotein
Dağılma hacmi (L)	148
Total klerens (L/sa) (202)	5-9
t_{maks} (sa)	0,5-0,8
$t_{1/2}$ (sa)	10-13
Hepatik ekstraksiyon (%)	80
Renal itrah (%)	15
Feçes ile itrah (%)	80
CYP	CYP2C9, CYP2C8 (Düşük düzeyde)
İlaç taşıyıcı proteinler (198)	OATP1B1/1B3, BCRP

İlaçları permeabilite, iyonizasyon, molekül ağırlığı ile metabolizma ve taşıma mekanizmalarındaki hız kısıtlayıcı basamaklarına göre değerlendiren bir diğer sınıflama sistemi “Genişletilmiş Klerens Sınıflandırma Sistemi” (*Extended Clearance Classification System, ECCS*)’dir. ECCS’ye göre ilaçlar Sınıf 1A (düşük molekül ağırlığı, yüksek permeabilite, asit ve zwitterionlar, ana klerens mekanizması metabolizasyon), Sınıf 1B (yüksek molekül ağırlığı, yüksek permeabilite, asit ve zwitterionlar, hepatik ana klerens mekanizması hücre içine alım), Sınıf 2 (yüksek permeabilite, baz ve nötr bileşikler, ana klerens mekanizması metabolizma), Sınıf 3A (düşük molekül ağırlığı, düşük permeabilite, asit ve zwitterion, ana klerens mekanizması renal klerens), Sınıf 3B (yüksek molekül ağırlığı, düşük permeabilite, asit ve zwitterion, ana klerens mekanizması hepatik hücre içine alım veya renal klerens), Sınıf 4 (düşük permeabilite, baz ve nötr bileşikler, ana klerens mekanizması renal klerens) olmak üzere 6 sınıfta incelenmektedir. Pitavastatin Sınıf 1B’de yer almaktadır (203).

Pitavastatin etkinlikteki üstünlüğünün yanı sıra farmakokinetik ve güvenlik profilleri açısından daha çok tercih edilen statinlerden birisidir. Bunun nedeni özellikle diğer statinlerle karşılaştırıldığında CYP enzimleriyle metabolizasyon derecesinin çok düşük olmasıdır. Böylece enzim aracılı ilaç-ilaç etkileşmeleri ve statinle indüklenen

rabdomiyaliz riski daha düşüktür (194). Buna karşın taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşmelerine konu olabilmektedir. Pitavastatin bilinen bir OATP1B1 ve OATP1B3 substratıdır. Bu taşıyıcılara afinite gösteren, inhibisyon veya indüksiyona neden olan başka bir madde ile etkileşme halinde enzim etkisinden bağımsız olarak hepatik dispozisyonu değişim göstermektedir. Bu nedenle özellikle OATP1B aracılı etkileşim çalışmalarında sıklıkla prob/model ilaç olarak tercih edilmektedir (201).

Tüm statinler OATP1B1 substratıdır ancak bu taşıyıcıyı kodlayan SLCO1B1 genindeki polimorfizme bağlı olarak farmakokinetik parametreleri farklı derecede etkilenmektedir. Örneğin, c.521CC genotipi olan bireylerde c.521TT genotipi olanlara göre simvastatinin EAA değeri %221 artmaktayken, bu oran atorvastatin için %144 ve rosuvastatin için %62-117 ve pitavastatin için %162-191'dir. Bu farkın statin taşınmasında etkili diğer OATP taşıyıcılarının katkısına bağlı olduğu düşünülmektedir. Fluvastatin ve rosuvastatin aynı zamanda OATP1B3 ve OATP2B1 substratı iken, pravastatin ve atorvastatin OATP2B1 ve pitavastatin OATP1B3'ün substratıdır (204).

Pitavastatin karaciğerde dağılım ve düşük CYP metabolizasyonu göstermekte, büyük oranda değişmemiş ilaç halinde safra yoluyla atılmaktadır (88, 205). OATP1B1, OATP1B3 ve NTCP taşıyıcıları ile hepatosit içerisine taşınmaktadır (32). Ancak dondurulmuş insan hepatositleri kullanılarak pitavastatin geçisini inceleyen bir çalışmada sodyum varlığının etkisiz olduğu bu nedenle NTCP'nin pitavastatin taşınmasındaki katkısının düşük olduğu gösterilmiştir (88). Pitavastatin *in vitro* (OATP1B1 için $K_m = 1.3-6.7 \mu M$, OATP1B3 için $K_m = 3.25 \mu M$) ve *in vivo* taşıyıcı aracılı ilaç-ilaç etkileşimlerinin değerlendirilmesinde önerilen prob substratlardandır (6).

Pitavastatinin safraya itrahında MRP2, P-gp ve BCRP taşıyıcılarının rol oynadığı belirtilmiştir (32). Ancak başka bir çalışmada pitavastatinin P-gp ve MRP2 substratı olmadığı sadece *in vitro* BCRP substratı olduğu gösterilmiştir. Pitavastatin aynı zamanda P-gp inhibisyonu veya P-gp indüksiyonuna neden olmamıştır. Pitavastatin lakton metabolitinin ise MRP2 ve BCRP substratı olmayıp P-gp substratı olduğu bulunmuştur (198).

UGT enzimlerinin (ör. UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7) statinlerin ester tip glukuronidasyonunda kritik rol oynadığını ve statin glukuronidlerinin lakton formuna dönüştüğü gösterilmiştir. İnsan hepatosit mikrozomları kullanılarak yapılan bir çalışmada, pitavastatin için pitavastatinin asit formunun metabolizasyonunda CYP2C9 ve CYP2C8 sorumlu iken, lakton formun metabolizasyonunda CYP2D6 ve CYP3A4 sorumlu bulunmuştur. Ancak hem asit hem de lakton form için düşük metabolizasyon (3 µl/dk/mg) gösterilmiştir (206).

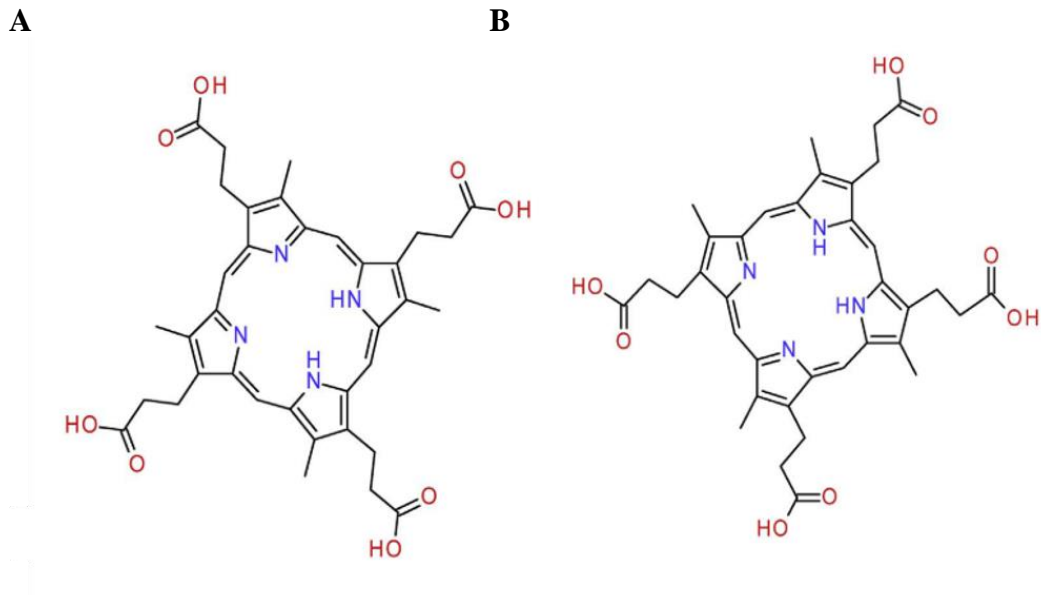
Pitavastatin metabolizasyonunda türler arasındaki (sıçan, köpek, tavşan, maymun, insan) farklılıkların incelendiği bir çalışmada UDP-glukuronik asit eklenmiş hepatik mikrozomlar kullanılmıştır. Pitavastatin, pitavastatin-lakton ve tanımlanmamış metabolit oranları insan hepatosit mikrozomlarında yaklaşık %88, %10 ve %2 iken; sıçanlarda bu oranlar yaklaşık %94, %2 ve %4 olarak bulunmuştur (207). Bu sonuçlar sıçanlarda pitavastatinin lakton dışında bir metaboliti olabileceğini ancak metabolizasyon oranının ihmal edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir.

Pitavastatin sıçanlarda yüksek ve seçici bir karaciğer dağılımı göstermektedir. [¹⁴C]pitavastatinin sıçanlarda karaciğer plazma konsantrasyon oranı 50'nin üzerinde bulunmuştur (208). Pitavastatin sıçan Oatp1b2 substratıdır. *Efflux* taşıyıcılar arasında, pitavastatin sıçan Mrp2 substratı olsa da bu taşıyıcı aracılı *efflux* klerensi oldukça düşüktür (209). Sandviç kültür sıçan hepatositleri üzerinde yapılan bir çalışmada Bcrp'nin pitavastatinin safraya itrahında rol oynadığı gösterilmiştir (210). Ancak Bcrp-geni silinmiş sıçanlarda pitavastatinin *in vivo* sistemik klerensi etkilenmemiştir. Bu nedenle sıçanlarda Bcrp'nin pitavastatinin absorpsiyonu, dağılımı ve itrahi üzerinde minimal bir rol oynadığı düşünülmektedir (211).

2.6.2. Koproporfirin I ve Koproporfirin III

KPI ve KPIII hem biyosentezinin anyonik yan ürünleridir. Koproporfirinlerin molekül yapısı Şekil 2.9.'da verilmektedir. Hem KPI hem de KPIII için logP değeri 5 olup, pKa değeri 3,56 (asit) ve 5,18 (baz)'dır (212).

KPI ve KPIII sistemik dolaşıma geçmekte, karaciğerden safra yoluyla ve renal yolla vücuttan uzaklaştırılmaktadırlar. Kunze ve ark. vektör transfekte hücre hatları ve kontrol sistemleri kullanarak, ayrıca üç farklı klinik çalışmadan kuvvetli, orta ve zayıf OATP1B inhibitörleri (rifampisin, simeprevir, ve JNJ-A kodlu molekül) verilen gönüllülerin KPI ve KPIII plazma konsantrasyonlarını tayin etmişlerdir. Sonuç olarak bu endojen biyomarker'lar OATP1B1 ve OATP1B3 substratı olup, OAT1,3, OCT1,2 veya NTCP taşıyıcılarına ise afinite göstermedikleri gösterilmiştir. KPIII, KPI'den farklı olarak OATP2B1 substratı özelliği de göstermiştir. KPI ve KPIII'ün MRP2 ve MRP3 substratı olduğu bulunurken, her ikisinin de MRP4, MATE1,2, BSEP, BCRP veya P-gp için substrat olmadığı gösterilmiştir (35).



Şekil 2.9. Koproporfirin-I (A), koproporfirin III (B) endojen maddelerinin molekül yapısı (Monoizotopik kütle: 654,269 g/mol) (212).

Sıçanlarda Koproporfirin I ve III (KPI ve KPIII)'ün itrahının incelendiği *in vitro* çalışmalarda her iki izomerin de hem sıçan plazması hem de karaciğer sitozollerine eşit olarak bağlandığı gösterilirken *in vivo* çalışmalarda tez doz uygulamanın ardından plazmadan eşit hızda uzaklaştırıldıkları gösterilmiştir (213). Membran vezikülleri üzerinde yapılan bir çalışmada KPI'in sıçan Mrp2 taşıyıcısı aracılığıyla taşındığı gösterilmiştir (214). *Oatp1a/1b*^{-/-} ile doğal tip farelerde KPI ve KPIII taşınması karşılaştırıldığında bu endojen maddelerin *Oatp1a/1b* substratı oldukları gösterilmiştir (215). Bezençon ve ark. (216) tarafından *Oatp* eksprese eden

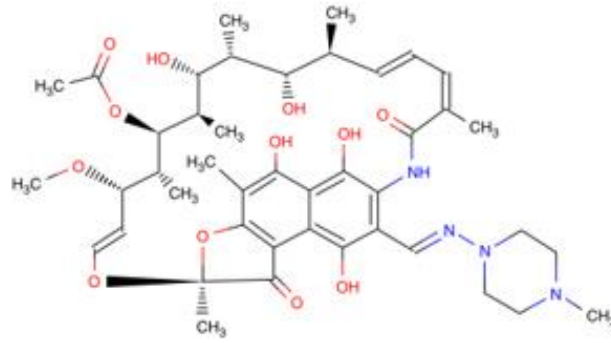
HeLa hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmayla KPI ve KPIII'ün rodent Oatp1b2 taşıyıcısının ve KPIII'ün aynı zamanda rodent Oatp2b1 taşıyıcısının substratı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca TR⁻ sıçanlarda KP'lerin Mrp2 ve Mrp3 fonksiyonundaki değişikliklere duyarlı olduğu ve karaciğer dispoziyonunun değiştiği gözlenmiştir.

Barnett ve ark. tarafından popülasyon farmakokinetiği ve simülasyon kullanılarak güç analizi yapılmış ve KPI'in OATP1B'nin zayıf ve kuvvetli inhibitörlerin tanımlanmasında duyarlı olduğu bulunmuştur (191). Farklı bir klinik araştırmada rosuvastatin ve rifampisin model substrat ve inhibitör olarak kullanılmış, aynı zamanda kan ve idrar örneklerinden KPI ve KPIII analizi yapılmıştır. Rifampisin varlığında rosuvastatin ve endojen biyomarker'ların C_{maks} ve EAA değerleri uyumlu bir şekilde artış göstermiştir. Ayrıca rosuvastatin KPI ve KPIII plazma ve idrar profillerini etkilememiştir. Sonuç olarak KPI ve KPIII'ün OATP1B1 inhibisyonunu yansıtan endojen biyomarker'lar olduğu düşünülmekte ve klinikte erken dönem doz belirleme çalışmalarında izlenmesi önerilmektedir (36).

2.6.3. Rifampisin

Rifampisin, makrosiklik yapıda bir antibiyotik olup tüberküloz, *brucella*, *Staphylococcus aureus* gibi enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır.

Rifampisin (sinonim: rifampin) turuncu renkli kokusuz bir toz görünümündedir. Şekil 2.10.'da molekül yapısı verilen rifampisin molekül ağırlığı 822,9 g/mol'dür. Suda (pH 6'nın altında 1 g rifampisin 762 mL suda), aseton, karbon tetraklorür, etanol ve eterde çok güç çözünür. Kloroform ve DMSO'da serbestçe çözünür, etil asetat, metanol ve tetrahidrofuranda çözünür (217). 25°C'de pH 1,5, 2, 5,3 ve 7,5'ta 1 kısmı sırasıyla 5, 10, 250 ve 360 kısımda çözünen rifampisin pH bağımlı çözünürlük göstermektedir (218). Erime derecesi 138–188 °C ve pKa değeri 1,7 (asit), ve 7,9 (baz)'dır. Sudaki %1'lik süspansiyonunun pH değeri 4,5-6,5'tur (217).



Şekil 2.10. Rifampisin molekül yapısı (C₄₃H₅₈N₄O₁₂) (217).

Rifampisin en yüksek dozu (600 mg) pH 3-7 arasında 250 mL sulu ortamda çözünmemektedir. Ayrıca intestinal permeabilitesi (sıçan duodenum, jejunum ve ileumda sırasıyla $4,856 \times 10^{-6}$, $2,117 \times 10^{-6}$, ve $2,149 \times 10^{-6}$ cm/sn) düşük bulunarak bu bulgunun literatürdeki kütle denge ve mutlak biyoyararlanım değerleri ile desteklenmesi ile ilk olarak BCS Sınıf 2 olarak sınıflandırılmış olan rifampisin, yeniden sınıflandırma ile BCS Sınıf 4 olarak belirlenmiştir (219).

Rifampisinin gastarintestinal kanaldan absorpsiyonu yiyecek etkisi ile yaklaşık %36 oranında azalmaktadır. Pulmoner tüberküloz hastalarında tek oral dozun ardından biyoyararlanımı %93 olup, 3 hafta oral ve iv rifampisin tedavisinin ardından biyoyararlanım %68'e düşmektedir. Bu düşüşün sebebi arasında artan hepatik metabolizasyon yanında, çoklu rifampisin dozuna bağlı olarak karaciğere gelmeden ilk geçiş etkisindeki indüksiyon yer almaktadır (220). Rifampisin birçok organ ve vücut sıvısında etkin konsantrasyona ulaşmaktadır (221). Proteine bağlanma oranı %75-90'dır. Yarılanma ömrü 1,5-5 saat arasında değişkenlik göstermekte (218) olup maksimum konsantrasyona 2-4 saatte ulaşmaktadır (217). Karaciğerde metabolik asetilasyona uğramakta ve enterohepatik sirkülasyona girmektedir. Desasetil rifampisin metaboliti mikrobiyolojik olarak aktif ve ana bileşikten daha polar yapıdadır. Rifampisin ve metaboliti safra ve idrarla vücuttan atılır (221).

Rifampisin, OATP/Oatp-aracılı ilaç etkileşimi çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir prob inhibitördür (34, 191, 222). Rifampisin *in vitro* (OATP1B1 için $K_i/IC_{50} = 0,48-17 \mu M$, OATP1B3 için $K_i/IC_{50} = 0,8-5 \mu M$) ve *in vivo* taşıyıcı aracılı

ilaç-ilaç etkileşimlerinin değerlendirilmesinde önerilen prob substratlardandır (6). Araştırmalar *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında hepatositlerin inhibitör çözültisi ile ön uygulama sonrası inkübasyon tamponunun uzaklaştırılmasından sonra bile inhibisyon özelliğinin devam ettiğini göstermiştir (122). Bu nedenle prelinik OATP-aracılı etkileşim çalışmalarında rifampisin için ön inkübasyon/perfüzyon uygulanmaktadır. Rifampisinin OATP1B dışında diğer taşıyıcılar üzerindeki eş zamanlı inhibisyon etkisine ilişkin sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu durum OATP1B substratları için (ör. statinler) ilaç dispozisyonunun mekanistik değerlendirmesini zorlaştırmaktadır (34).

Rifampisin birçok CYP ve UGT enziminin ve P-gp'nin potent bir indükleyicisi olarak bilinmektedir (223, 224). Klinik çalışmalarda rifampisinin tekrarlı uygulamasına bağlı olarak taşıyıcı indüksiyonunun elimine edilmesi için tek doz uygulanması gerekmektedir (6).

Rifampisin sıçanlarda diğer *influx* taşıyıcılar yanında bağıl olarak daha yüksek bir seçicilik ile Oatp1 ve Oatp2- aracılı organik anyon taşımalarını inhibe etmektedir (225) (226). Rifampisininin sıçan Oatp taşıyıcıları üzerindeki IC50 değerleri farklı substrat maddeler kullanılmasına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği için rifampisin için substrat-bağımlı inhibisyon özelliği gösterdiği düşünülmektedir. Örneğin, sıçan hepatositleri üzerinde substrat olarak E217βG kullanılan bir çalışmada rifampisinin Oatp için IC50 değeri 32,7 μM bulunurken bu değer pravastatin inhibisyonu için 1 μM bulunmuştur (31). Ayrıca *in vivo* koşullarda serbest haldeki rifampisin konsantrasyonu *in vitro* IC50 değerine ulaşmasa dahi inhibisyon oluşturabilmektedir (29).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler

Madde Adı	Marka, Kaynak
Asetonitril (HPLC sınıfı)	Sigma-Aldrich, ABD
Asetonitril (LC-MS sınıfı)	Isolab Chemicals, Almanya
D-(+)-Glikoz monohidrat	Isolab Chemicals, Almanya
Dimetil sülfoksit	Isolab Chemicals, Almanya
Formik asit çözeltisi (98%)	J.T. Baker, Hollanda
Formik asit çözeltisi (1.0 M)	Sigma-Aldrich, ABD
Kalsiyum klorür dihidrat	Isolab Chemicals, Almanya
Kopropofirin I dihidroklorür	Sigma-Aldrich, ABD
Kopropofirin III dihidroklorür	Chemische Fabrik Berg, Almanya
Magnezyum sülfat heptahidrat	Isolab Chemicals, Almanya
Pitavastatin kalsiyum	Abcam, İngiltere
Potasyum dihidrojen fosfat	Isolab Chemicals, Almanya
Sığır serum albumini	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum hidrojen karbonat	Isolab Chemicals, Almanya
Sodyum klorür	Isolab Chemicals, Almanya
Taurokolik asit sodyum tuzu	Sigma-Aldrich, ABD
Tersiyer butil metil eter	Sigma-Aldrich, ABD

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Cihaz/Alet Adı	Marka, Kaynak
Cerrahi iplik	SMI, Belçika
Derin dondurucu (- 20 °C)	Beko, Türkiye
Doku homojenizatörü (Isolab homogenizer, light duty)	Isolab, Almanya
Mikrosantrifüj tüpü çalkalayıcı (Eppendorf Thermomixer, USA).	Eppendorf, ABD
HPLC (LC-20 A/Prominence Alliance, Diot Array Dedektör (DAD)	Shimadzu, Japonya
HPLC kolonu (C18, 5 µm, 250 × 4.6 mm)	GL Sciences, Japonya
Isı kontrollü kabin	Comat, Türkiye
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Eppendorf, ABD
İntavenöz kanül (14GA, 16GA)	Kendall Argyle Medicut, İngiltere
LC-MS High Resolution Quadrupole Mass Time-of-Flight (QTOF)	Agilent, ABD
LC-MS kolonu (C18, 2,7 µm, 150 × 4,6 mm) ve önkolon	Restek, ABD
LC-MS kolonu (C18, 1,7 µm, 100× 2.1 mm)	Waters, ABD
Manyetik balık	Isolab, Almanya
Manyetik balık tutucusu	Isolab, Almanya
Maskito düz klemp	Steriway, Türkiye
Membran filtre (Politetrafloroetilen (PTFE), 0,45 µm)	Lubitech, Çin
Membran filter (Karışık selüloz, 0,45 µm)	Lubitech, Çin
Mikropenset	Steriway, Türkiye
Mikropipet (0,5-10, 10-100, 100-1000 µL)	Brand, Almanya
Mikrosantrifüj tüpü (renkli)	LP Italiana Spa, İtalya
Nitril eldiven	Isolab, Almanya
Parafilm	Isolab, Almanya

Perfüzyon tüpleri	Gilson, Fransa
Peristaltik pompa	Gilson, Fransa
pH metre	Hanna Instruments, ABD
Pipet ucu (10, 200, 1000 µL)	Greiner Bio-One, Almanya
Santifüj tüpü (renkli)	Isolab, Almanya
Steril emici kompres	Octacare, Türkiye
Şırınga ucu filter (Karışık selüloz, 0,45µm)	Lubitech, Çin
Şırınga ucu filter (PTFE, 0,45µm)	Lubitech, Çin
Standart cerrahi makas	Steriway, Türkiye
Standart cerrahi penset	Steriway, Türkiye
Su banyosu	Jeitech, Güney Kore
Ultra saf su cihazı (Mili-Q İntegral 5)	Millipore, ABD
Ultrasonik banyo	AdvantageLab, Almanya
Vakum konsantratör (CentriVap Benchtop)	Labconco, ABD
Vannas makas	Steriway, Türkiye
Vial (amber renkli cam), insert ve kapak	Allpro, Çin
Vorteks	Biosan, Litvanya

3.3. Deney Hayvanı

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

3.4. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Deneyel çalışmalarda kullanılacak substrat ilaç (pitavastatin) ve endojen biyobelirteçlerin (KPI ve KPIII) perfüzyon ortamı, karaciğer dokusu ve safra içindeki konsantrasyonlarının ve inhibitör ilacın (rifampisin) karaciğer dokusu içindeki konsantrasyonunun nicel olarak tayinine yönelik olarak iki farklı analitik yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Pitavastatin karaciğer perfüzyonu çalışmasında 1µM konsantrasyonda uygulanmakta ve ilacın perfüzyon ortamı, karaciğer dokusu ve safra sıvısına dağılması

beklenmektedir. Bu nedenle tüm ortamlarda nicel analize olanak sağlayacak hassasiyette bir analitik yöntem geliştirilmesi gerekmektedir. Eş zamanlı olarak tayin edilecek endojen maddeler olan KPI ve KPIII'ün ise sıçanlardaki düşük seviyedeki endojen konsantrasyonları tayin edileceğinden ekstraksiyon ile numune zenginleştirilmesi ve ardından LC-MS analiz yöntemi olarak seçilmiştir. KPI ve KPIII'ün amber renkli polipropilen tüplerde toplanması ve analize kadar ışıktan korunması gerekmektedir. Örnek hazırlama işlemi 2 saatten kısa bir süre içinde gün ışığında yapılmalı, örnekler doğrudan güneşin ultraviyole (UV) ışınlarına maruz bırakılmamalıdır (212).

Biyolojik örnekler analiz edilmeden önce sıvı sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Bu işlemin esası örneklere organik çözücü metil tersiyer butil eter (MTBE) eklenerek santrifüje tabi tutulması, ardından organik fazın ayrılması ve uçurulmasıdır. Kuruyan örnekler mobil faz içinde çözündürüldükten sonra analiz edilmiştir. Bu aşamada standartlar ve numuneler taze hazırlanarak analiz edilmiştir. Stabilitate çalışması yürütülmemiştir. Rifampisin'in karaciğer dokusundan analizi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Literatürden derlenen bilgiler doğrultusunda analitik yöntem optimizasyonu ve validasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu

• Pitavastatin, KPI ve KPIII Tayini İçin LC-MS Yönteminin Optimizasyonu

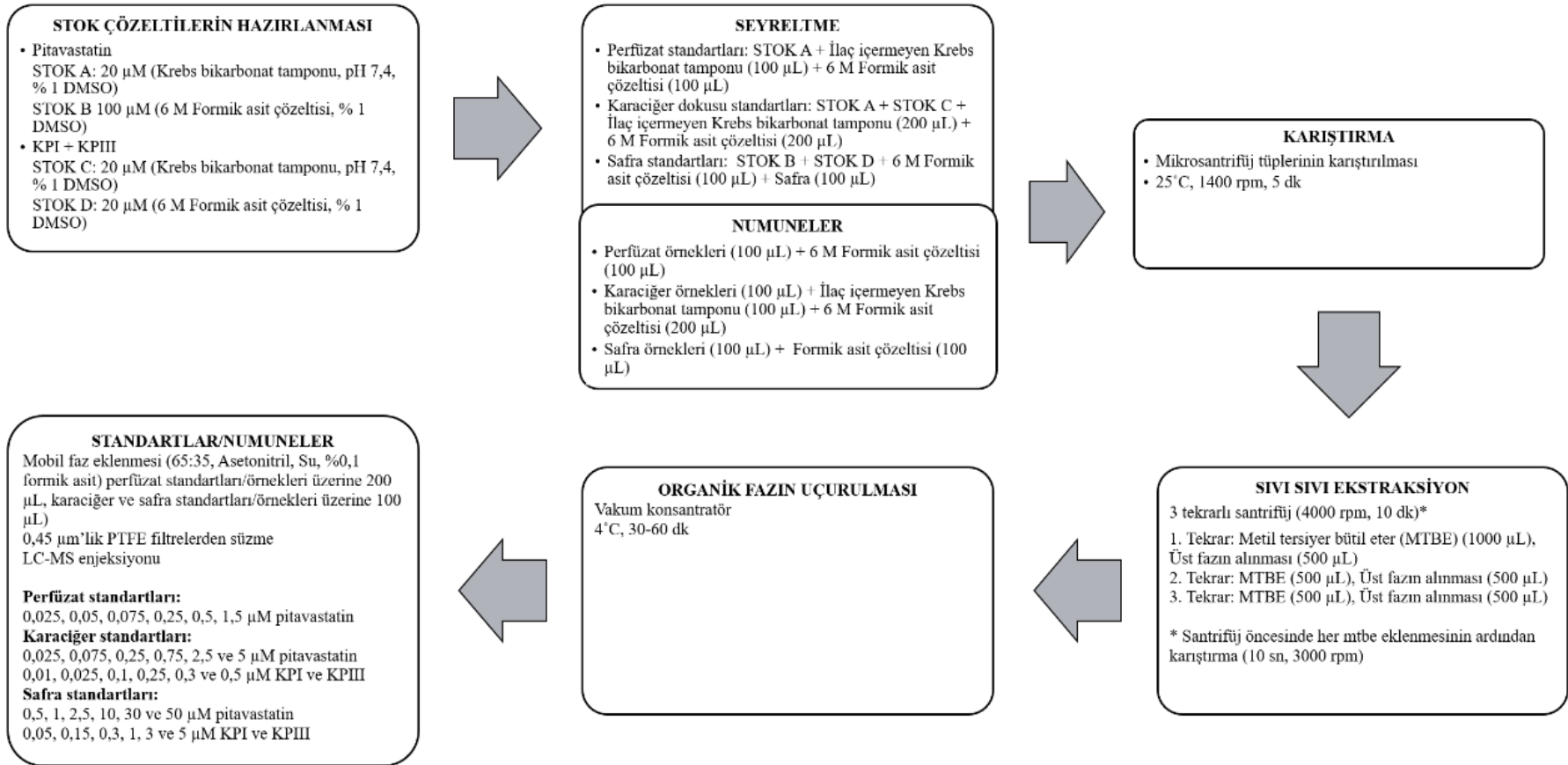
Pitavastatin, KPI ve KPIII maddelerinin eş zamanlı olarak analiz edilmesi gerekmektedir. Ancak KPI ve KPIII maddelerinin molekül ağırlıkları ve kütle/yük değerleri eşit olduğundan kütle spektroskopisi yönteminde ayırım görülemeyeceğinden kromatografik olarak farklı zaman noktalarında pik vermelerini sağlamak gerekmektedir. Bu nedenle analitik yöntem optimizasyonu kapsamında Tablo 3.1.'de belirtilen farklı LC koşulları ile çalışılmıştır.

Tablo 3.1. LC-MS analitik yöntem optimizasyonu çalışmasında analiz koşulları.

LC-MS	Koşullar
Kolon	Waters Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μ m 2,1 x 1 x 100 mm)
	Restek Raptor [®] C18 (2,7 μ m, 4,6 mm ID, 150 mm)
Mobil faz A	Su (%0,1 formik asit)
	Amonyum format çözeltisi (%0,1 formik asit)
Mobil faz B	Asetonitril (%0,1 formik asit)
Gradyan elüsyon	(0-5. dk), (0-6. dk), (0-7 dk): %55-65 A- %35-45 B → %10 A- %90 B (5-10. dk), (6-10 dk), (7-10 dk): %10 A- %90 B → %55-65 A- %35-45 B (10-13.dk), (10-15.dk): %55-65 A- %35-45 B
Akış hızı	0,15- 0,6 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	10-50 μ L

Pitavastatinin DMSO içindeki 1000 μ M'lık stok çözeltisinden hareketle mobil faz (%55 A: %45 B; Tablo 3.1.) ile seyreltme yapılarak 10 μ M konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlanmıştır. KPI ve KPIII'ün mobil faz içerisindeki 10 μ M'lık stok çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Ardından her üç maddeyi 1 μ M konsantrasyonda içeren, KPI ya da KPIII'ü tek başına içeren (0,1 μ M) çözeltiler analiz edilmiştir. Farklı koşullar kullanılarak elde edilen kromatogramlar incelenerek KPI ve KPIII ayrımının sağlandığı ve üç maddenin eş zamanlı nicel analizi için en uygun koşullar belirlenmiştir (Bkz. 4.1.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu).

Numune hazırlama yöntemi optimizasyonu kapsamında sıvı-sıvı ekstraksiyon (tek santrifüj basamağı), sıvı-sıvı ekstraksiyon (üç santrifüj basamağı), sıvı-sıvı ekstraksiyon (kartuş kullanımı) ve katı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırılarak elde edilen madde pikleri, seçicilik ve geri kazanım parametreleri üzerinden değerlendirilmiştir. En yüksek geri kazanım ve matriks girişiminin en düşük düzeyde izlendiği yöntem olan üç santrifüj basamağı uygulanan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.1.). LC-MS yönteminin validasyonu çalışmalarında kullanılacak olan tüm standart çözeltilere numunelere uygulanacak aynı işlemler uygulanmıştır. Standartların ve numunelerin hazırlanmasında perfüzat, karaciğer ve safra örneklerine uygulanan işlemlere ilişkin akış şeması Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII'ün LC-MS analizi için standart ve numunelerin hazırlama yönteminin şematik olarak gösterimi.

- **Rifampisin Tayini İçin HPLC Yönteminin Optimizasyonu**

Rifampisin karaciğer dokusundan tayininde literatürde (227, 228) bulunan yöntemlerden hareketle optimize edilen bir ters faz HPLC yöntemi kullanılmıştır. Metanol (0,1% DMSO) içerisinde rifampisin stok çözeltisinden (1215 µM) hareketle metanol ile seyreltme yapılarak hazırlanan standart çözeltiler analiz edilmiştir. DAD dedektörü ile rifampisin için en yüksek absorbanın görüldüğü dalga boyu belirlenmiştir. Fosfat tamponu ve asetonitrilin değişken kombinasyonlarında çalışılarak matriks bileşenleri ile girişimin görülmediği ve en iyi rifampisin pik şeklinin elde edildiği kombinasyon seçilmiştir.

Rifampisin biyolojik materyalden tayin edileceğinden analiz çözeltileri ilgili matriks içerisinde hazırlanmalıdır. Matriks hazırlanırken sırasıyla öncelikle ilaç uygulanmamış karaciğer homojenatlarına MTBE eklenmiştir (her 1,5 mL homojenat için 3 mL). 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra organik faz ayrılarak azot gazı altında uçurulmuştur. Metanol eklenerek dokudan ekstreya geçmiş maddeler yeniden çözündürülmüştür (her 1,5 mL homojenat için 1 mL metanol). Rifampisin stok çözeltisi (145,82 µM) %0,1 DMSO içeren matriks içerisinde hazırlanmış ve matriksle uygun seyreltmeler yapılarak kalibrasyon standartları ve kalite kontrol örnekleri (0,61, 1,82, 3,65, 6,08, 18,23, 36,46, 54,68, 72,91 µM) hazırlanmıştır.

3.4.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyon çalışmalarında Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) M10 Biyoanalitik Yöntem Validasyonu Taslak Kılavuzu (2019) (229) esas alınmıştır.

Biyoanalitik yöntem validasyonu seçicilik, özgüllük, kalibrasyon doğrusu ve sınırları, matriks etkisi, analit taşınması (*carry-over*), doğruluk, kesinlik ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik üzerinden değerlendirilmiştir.

- **Seçicilik (*Selectivity*)**

Seçicilik analitik yöntemin boş biyolojik matriks içindeki girişim yapabilecek maddeler varlığında analiti tayin edebilme yeteneğidir. Boş matriks ile girişim yapan bir pik görülmesi halinde, pik alanının, en düşük kalibrasyon sınırında tayin edilen alanın %20'sinin altında olması gerekmektedir.

Pitavastatin: İlaç içermeyen perfüzyon ortamının uygulandığı sıçanlardan toplanan perfüzet, karaciğer dokusu ve safra örnekleri numune hazırlama aşamalarından (Bkz. 3.4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu) sonra LC-MS ile analiz edilmiştir.

KPI, KPIII: Endojen maddeleri içermeyen boş perfüzet perfüzyon ortamı içinde standart hazırlama aşamalarından (Bkz. 3.4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu) sonra LC-MS ile analiz edilmiştir.

Rifampisin: İlaç içermeyen perfüzyon ortamının uygulandığı sıçanlardan toplanan karaciğer dokularından (Bkz. 3.4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu) hazırlanan matriks HPLC ile analiz edilmiştir.

- **Özgüllük (*specificity*)**

Özgüllük bir analitik yöntemin analit dışındaki diğer maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektedir. Bu maddelerin varlığında bir cevap elde edilmesi halinde, görülen pik alanının en düşük kalibrasyon sınırında tayin edilen analite dair pik alanının %20'sinin altında olması gerekmektedir.

LC-MS yönteminde özgüllük değerlendirilmesinde analit ile girişim yapabilecek diğer maddelerin molekül ağırlıkları karşılaştırılmaktadır, var ise ilgili maddenin analitten kromatografik olarak ayrımı sağlanmalıdır.

Pitavastatin: LC-MS kullanılarak, KPI (0,1 μM), KPIII (0,1 μM) ve rifampisin (10 μM) varlığında pitavastatine ait m/z değerinde bir pik olup olmadığı incelenmiştir.

KPI, KPIII: LC-MS kullanılarak, pitavastatin (1 μM) ve rifampisin (10 μM) varlığında KPI ve KPII'e ait m/z değerinde bir pik olup olmadığı incelenmiştir. KPI ve KPIII'ün kromatografik ayrımı sağlanmıştır.

Rifampisin: Numune içerisinde bulunabilecek diğer maddeler olan pitavastatin (22,70 μM), KPI (13,74 μM), KPIII (13,74 μM)'ün matriks içindeki çözeltisi hazırlanmış ve HPLC kullanılarak elde edilen kromatogramlar incelenmiştir. İlgili maddelere ait pik gözlenip gözlenmediği değerlendirilmiştir.

- **Kalibrasyon doğrusu ve sınırları (Calibration curve and range)**

Kalibrasyon doğrusu en az 6 konsantrasyon noktasında kalibrasyon standartlarının analizi ile elde edilmiştir. Kalite kontrol örnekleri en düşük kalibrasyon sınırı, düşük (en düşük kalibrasyon sınırının 3 katı içerisinde), orta (kalibrasyon aralığının %30-50'sinde) ve yüksek (en yüksek kalibrasyon sınırının en az %75'i) konsantrasyonda 4 farklı noktada olacak şekilde belirlenmiştir (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. LC-MS analitik yöntem validasyonu çalışmalarında kullanılan kalibrasyon standartları.

	Kalite kontrol örnekleri	Pitavastatin			KPI ve KPIII	
		Perfüzat	Karaciğer	Safra	Karaciğer	Safra
Kalibrasyon standartları Konsantrasyon (μM)	En düşük kalibrasyon sınırı	0,025	0,025	0,500	0,010	0,050
	Düşük	0,050	0,075	1,000	0,025	0,150
	Orta	0,075	0,250	2,500	0,100	0,300
		0,250	0,750	10,00	0,250	1,000
	Yüksek	0,500	2,500	30,00	0,300	3,000
		1,500	5,000	50,00	0,500	5,000

Rifampisin sadece karaciğer dokusu içinde ölçülmüştür. Kalibrasyon doğruları 8 konsantrasyon noktasında (0,61, 1,82, 3,65, 6,08, 18,23, 36,46, 54,68, 72,91 μM) 6 tekrarlı olarak hazırlanmıştır. Kalite kontrol örnekleri 0,61, 1,82, 18,23 ve 54,68 μM olarak belirlenmiştir. Her bir kalibrasyon standardı için hesaplanan konsantrasyonların teorik değerlerin %15'i içinde olması gerekmektedir. Bu koşul en düşük kalibrasyon sınırı için %20'dir. En az 6 kalibrasyon noktasında kalibrasyon standartlarının en az % 75'inin belirtilen koşulu sağlaması gerekmektedir.

Konsantrasyon-cevap (pik alanı) ilişkisi doğrusal regresyon modeline göre değerlendirilmiştir. Elde edilen standart doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (R^2) tayin edilmiştir. Doğrusallığın gösterilmesi için determinasyon katsayısının 1'e yakın bulunması gerekmektedir.

KPI ve KPIII endojen maddeler oldukları için kalibrasyon standartlarına karşı alınan yanıtta ilaç içermeyen standart (ilaç uygulanmamış sıçanlardan alınan karaciğer ve safra) yanıtının çıkartılması (*background subtraction approach*) (229) işlemi uygulanmıştır.

- **Matriks etkisi (Matrix effect)**

En düşük ve en yüksek kalite kontrol örnekleri ($n=3$), ilaç içermeyen perfüzyon çözeltisi uygulanmış 3 farklı hayvandan elde edilen perfüzet, karaciğer ve safra için standart hazırlama yöntemi uygulanarak elde edilen standartlar analiz edilmiştir. Sonuçlar doğruluk ve kesinlik koşulları ile değerlendirilmiştir.

- **Analit taşınması (Carry-over)**

En yüksek kalibrasyon standardının (Bkz. Tablo 3.2.) ardından ilaç içermeyen perfüzyon ortamının uygulandığı sıçanlardan toplanan perfüzet, karaciğer dokusu ve safra örneklerinden hazırlanan boş örneklerin analizi ile analit taşınması etkisi değerlendirilmiştir. Bu maddelerin varlığında bir cevap elde edilmesi halinde, görülen pik alanının en düşük kalibrasyon sınırında tayin edilen analite dair pik alanının %20'sinin altında olması gerekmektedir.

- **Doğruluk ve kesinlik (Accuracy and precision)**

Doğruluk, deneysel verilerin gerçek verilere olan yakınlığının, kesinlik ise ölçümler arasındaki yakınlığın ifadesidir. Her kalite kontrol örneğinin (Bkz. Tablo 3.2.) 6 tekrarlı olacak şekilde hazırlanarak aynı günde aralıksız analiz edilmesiyle gün içi doğruluk ve kesinlik çalışması yapılmıştır. Bu çalışmanın 3 ayrı günde tekrarlanmasıyla günler arası doğruluk ve kesinlik çalışması yapılmıştır. Doğruluk % ortalama bağıl hata (OBH) (Eşitlik 3.1.), kesinlik ise % varyasyon katsayısının (VK) hesaplanması ile değerlendirilmiştir. Doğruluğun gösterilmesi için OBH'nin %15'den düşük olması, kesinliğin gösterilmesi için VK'nin %15'ten düşük olması gerekmektedir. Ayrıca numune hazırlama ile ilgili protokolün kesinliğinin incelenmesi için geri kazanım çalışmalarında (n=6) bilinen miktarda rifampisin numuneye eklenerek geri kazanılan rifampisin miktarları kalibrasyon eğrisinde yerine konularak bulunmuştur ve kesinlik değerlendirmesi yapılmıştır.

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

- **Enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik (Reinjection reproducibility)**

Kalite kontrol örneklerinin (Bkz. Tablo 3.2.) aynı analizde tekrarlı ölçümleri alınarak, sonuçlar doğruluk ve kesinlik değerlendirmesine tabi tutulmuştur.

- **Geri kazanım (Recovery)**

Analiz öncesinde numunelere ekstraksiyon gibi işlemlerin uygulandığı yöntemlerde % geri kazanımın gösterilmesi gerekmektedir. Geri kazanım analiti içeren biyolojik örneğin işlemlere tabi tutulması ve yanıtın, matrikse sonradan eklenmiş analit yanıtı ile karşılaştırılması ile hesaplanmaktadır. Geri kazanımın %100 olması gerekmektedir. Ancak değerler tekrarlanabilir olmalıdır. Geri kazanım çalışmalarının genellikle düşük, orta ve yüksek olmak üzere kalibrasyon aralığındaki üç noktayı kapsamı önerilmektedir.

Pitavastatin, KPI, KPIII: LC-MS analitik yöntem validasyonu çalışmasında kullanılan tüm standart çözeltilere numune hazırlama basamakları uygulanmıştır. Bu nedenle geri kazanım çalışması yapılmamıştır.

Rifampisin: HPLC analitik yöntem validasyonu çalışmasında tüm kalibrasyon standartlarına numune hazırlama basamakları uygulanarak (n=3) geri kazanım çalışması yapılmıştır.

- **Sistem uygunluk testleri (System suitability tests)**

Analitik yöntemlerin sistem uygunluk testleri kapasite faktörü, kolon etkinliği (teorik tabaka sayısı) ve simetri (kuyruklanma) faktörü parametrelerinin incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir (230). Her iki analiz yönteminde her madde için ilgili tüm ortamlarda orta kalibrasyon standardına ait pikler kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

Eşitlik 3.2.'ye göre hesaplanan kapasite faktörü (k') maddenin kolondan elüe olma hızını göstermektedir ve uygun kromatografik şartlarda genellikle 2'nin üzerinde olması istenmektedir (230).

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

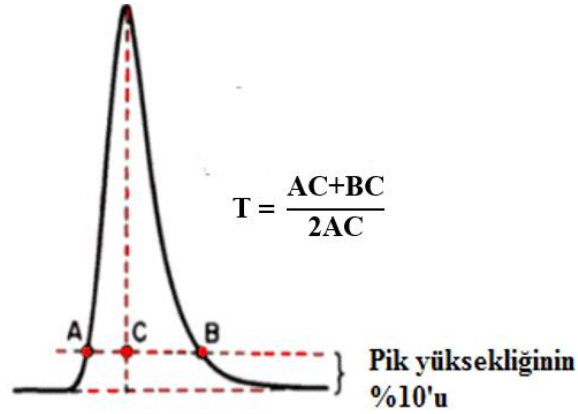
t_R : Maddenin alıkonma zamanı, t_0 : Ölü zaman (kolonda tutunamayan maddenin alıkonma zamanı)

Kolon etkinliği teorik tabaka sayısı (N) ile ifade edilmektedir. Eşitlik 3.3. kullanılarak hesaplanmıştır. Bu değer elüsyon zamanına bağlı olup genellikle 2000'in üzerinde olması gerekmektedir (230).

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

N : Teorik tabaka sayısı, t_R : Maddenin alıkonma zamanı, w : Pikin taban genişliği

Elde edilen piklerin asimetrisi kuyruklanma faktörü (tailing factor, T) ile ifade edilmiştir. Kuyruklanma faktörünün 1 olması pikin simetrik olduğunu gösterirken, bu değerdeki artış analizin doğruluğunu azaltacağı için kuyruklanma faktörünün 2'den küçük olması istenmektedir. Simetri faktörünün hesaplanması Şekil 3.2.'de gösterilmektedir (230).



Şekil 3.2. Kuyruklanma faktörü (T) hesabı.

3.5. *In situ* Karaciğer Perfüzyonu

3.5.1. Perfüzyon Çözeltisi

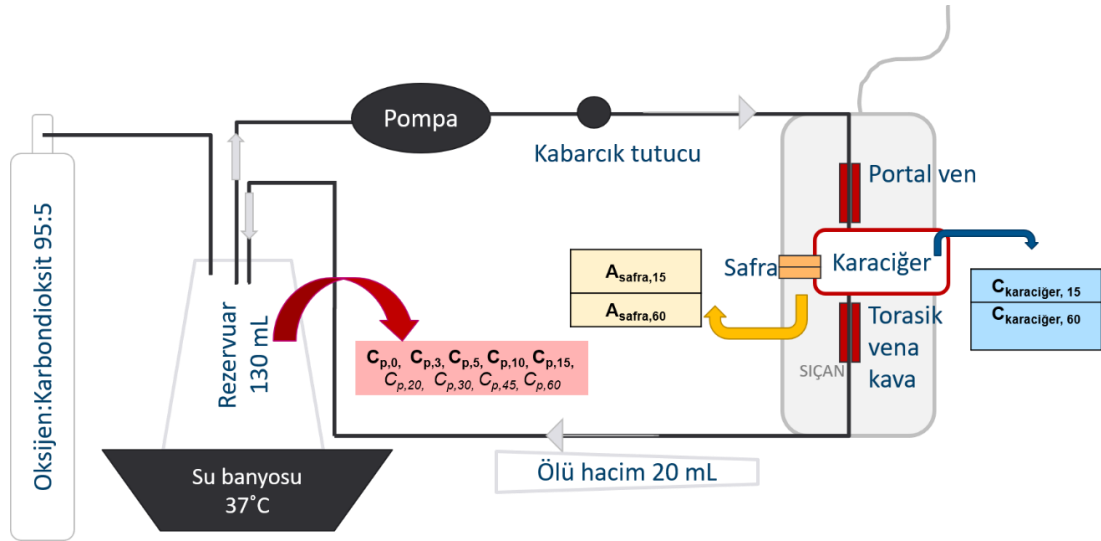
Perfüzyon çözeltisi olarak glikoz (3 g/L) ve sodyum taurokolat (6 mg/L) içeren Krebs-bikarbonat çözeltisi kullanılmıştır. Taze olarak hazırlanan perfüzyon çözeltisi 0,45 µm por genişliğine sahip membran filtreden süzildükten sonra 30 dk süresince karbojen gazı (%95 oksijen, %5 karbondioksit) ile oksijenlendirilmiştir. İçerisine %1 sığır serum albumini eklendikten sonra pH'sı 7.4'e ayarlanmıştır. Karaciğer perfüzyonu çalışmasında kullanılan çözeltinin bileşimi Tablo 3.3.'te yer almaktadır.

Tablo 3.3. *In situ* karaciğer perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi.

Madde	Konsantrasyon (g/L)
Sodyum klorür	6,92
Sodyum bikarbonat	2,09
Kalsiyum klorür dihidrat	0,37
Potasyum klorür	0,35
Magnezyum sülfat heptahidrat	0,29
Potasyum dihidrojen fosfat	0,16
Glikoz	3,00
Sodyum taurokolat	0,006
Sığır serum albumini	10,00

3.5.2. Perfüzyon Sistemi

Perfüzyon işlemi resirküle yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, uygun tüp (*tubing*) tipleri seçilerek perfüzyon çözeltisinin rezervuardan portal vene ve hepatik venden rezervuara akışı sağlanmıştır. Üç boyunlu balon joje kullanılarak rezervuarı oksijenlendirme, rezervuara ekleme ve örnek toplama bölümleri belirlenmiştir (Şekil 3.3.). Oksijen kaynağı olarak karbojen gazı kullanılmıştır. Rezervuarda bulunan perfüzyon çözeltisi (130 mL) tüpler ile peristaltik pompaya bağlanarak, yine tüpler aracılığıyla kabarcık tutucudan geçmesi sağlanmış ve tübün ucu portal vene yerleştirmek üzere bekletilmiştir. Perfüzyon çözeltisinin akış hızı peristaltik pompa ile 15 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 3.3. Karaciğer perfüzyonu ve perfüzyon sisteminin şematik olarak gösterimi (C_p : perfüzyat konsantrasyonu, $C_{\text{karaciğer}}$: karaciğer doku konsantrasyonu, M_{safra} : safra içindeki kümülatif miktar, 15: 15 dakika, 60: 60 dakika).

Çalışmada kullanılan maddelerin plastik tüp materyallerine bağlanma gösterip göstermediğini, kendi aralarında bir etkileşim olup olmadığını ve deney süresince bir bozulmanın meydana gelip gelmediğini tayin etmek amacıyla pitavastatin ($1,4 \mu\text{M}$), rifampisin ($12,15 \mu\text{M}$), KPI ($1,37 \mu\text{M}$) ve KPIII ($1,37 \mu\text{M}$) içeren perfüzyon çözeltisi hazırlanarak sisteme deney hayvanı olmadan uygulanmıştır. 60 dakika boyunca toplanan örnekler numune hazırlama işlemlerini takiben (Bkz. 3.4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu) analiz edilmiştir. Sonuçlar % geri kazanım olarak belirtilmiştir.

3.5.3. Cerrahi Yöntem

Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlarda yapılan *in situ* karaciğer perfüzyonu deneyleri için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 18.09.2018 tarihinde 2018/53 kayıt numarası ile onay alınmıştır. Etik kurul onayı EK-1'de yer almaktadır.

Cerrahi işlemler anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Anestezi için ketamin (90 mg/kg) - ksilazin (5 mg/kg) kombinasyonu intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır. Perfüzyon işlemi sırasında karaciğerin kandan temizlenmesini kolaylaştırmak amacı ile 1000 IU sodyum heparin ketamin-ksilazinden hemen sonra i.p. olarak enjekte edilmiştir.

Karın duvarı kuyruk bölgesinden başlayarak göğüs kafesi hizasına kadar anestezi altında kesilmiş ve karın bölgesinin içeriği hayvanın soluna alınarak karaciğer, portal ven, ve safra kanalı açığa çıkarılmıştır. Safra kanalı bir PE10 tüp ile kanüle edilmiş ve ucu bir ependorf tüp içerisine yerleştirilmiştir. Portal ven etrafına iki adet, abdominal vena cava etrafına ise bir adet cerrahi iplik (2/0) yerleştirildikten sonra portal ven bir 16GA (1,7 mm dış çap x 45 mm) kateterle kanüle edilmiştir. Peristaltik pompaya bağlı olan tübün ucu katetere takılarak perfüzyon çözeltisinin karaciğere girişi sağlanmış ve kateter sıkıca bağlanmıştır.

Göğüs kafesi kesilerek ve kalbin sağ atriumundan sokulan bir 14GA kateter (2,1 mm dış çap x 45 mm) ile torasik vena kava aracılığı ile hepatik venden gelen perfüzyon toplanmıştır. Bu kanülasyon aşamasında hayvanlar ölmektedir. Hepatik vene yerleştirilen bu kanülün ucuna takılan tüpler yardımıyla perfüzyon çözeltisinin karaciğerden çıkışı sağlanmıştır ve çözelti sirküle olmak üzere rezervuara döndürülecek şekilde düzenekte tutulmuştur.

Gevşek haldeki tüm cerrahi iplikler sıkıca bağlandıktan sonra karaciğer perfüzyon çözeltisi ile ıslatılarak kurumayı önlemek amacıyla bir parça parafilm ile kaplanmıştır. Organın canlılığı görsel olarak ve safra akışı ile tayin edilmiştir. Karaciğerin temizlenmesi için 20 dk beklenilmiştir bu sırada çözelti rezervuara döndürülmemiştir (*single pass*) ardından rezervuar ilaç çözeltisi ile sirküle perfüzyon aşamasına geçilmiştir.

Tablo 3.4.'te belirtilen boş perfüzyon ortamı/ilâç uygulamasının bitimini takiben perfüzyon sonlandırılmıştır. Karaciğer organ bütünlüğü korunacak şekilde kesilerek vücuttan çıkarılmış, bir peçete yardımıyla kurulandıktan sonra tartılmıştır. Soğuk perfüzyon çözeltisi içerisinde 1:2 oranında seyreltme uygulanarak tüm organ doku homojenizatörü kullanılarak karaciğer homojenatları elde edilmiştir. Karaciğer homojenatlarının son hacmi kaydedilmiştir. Toplanan safra örnekleri tartılmıştır ve toplam safra hacmi safra yoğunluğu 1 g/mL alınarak hesaplanmıştır.

3.5.4. Perfüzyon Deneyleri

Farmakokinetik modellemede kullanılmak üzere iki farklı zaman noktasında karaciğer dokusu ve safradaki kümülatif substrat ilaç miktarının tayin edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle perfüzyon işlemi iki farklı zaman noktasında (15, 60 dk) tamamlanacak şekilde deney grupları belirlenmiştir. 1. grupta örnek toplama işlemi ilk 15 dk boyunca, 2. grupta ise örnek toplama işlemi 60 dk boyunca sürdürülmüştür.

Deney planı Tablo 3.4.'te özetlenmektedir. Koproporfirinlerin bazal düzeylerini belirlemek amacıyla 1. ve 2. gruptaki sıçanlara boş perfüzyon ortamı, 3.-6. gruptaki sıçanlara ise sadece inhibitör uygulanmıştır. 7 ve 8 nolu gruplara sadece pitavastatin ilk konsantrasyonu 1 μM olacak şekilde (300 μM stok, 500 μL) uygulanmıştır. Substrat ilaçla birlikte inhibitör eklenen gruplarda inhibitör (rifampisin), model ilaç uygulamasından 5 dk önce rezervuara eklenmiştir. Rifampisinin son konsantrasyonu toplam hacim dikkate alınarak 3, 4, 9 ve 10 nolu gruplarda 10 μM , ve 5, 6, 11 ve 12 nolu gruplarda 50 μM olarak ayarlanmıştır. Model ilaçların uygulanmasının hemen ardından ve çeşitli zaman noktalarında (3, 5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60 dk) perfüzyon örnekleri (0,5 mL) rezervuardan alınmıştır. 1, 3, 5, 7, 9 ve 11 nolu gruplarda ise perfüzyon işlemi 15. dk'dan sonra kesilerek ara zaman noktasında doku ve safra konsantrasyonları tayin edilmiştir. Diğer gruplarda ise perfüzyon 60 dk boyunca uygulanmıştır.

Tablo 3.4. *In situ* karaciğer perfüzyonu deney planı.

Grup	Sıçan sayısı	Perfüzyon süresi (dk)	Uygulama
1	3	15	Boş perfüzyon ortamı
2	3	60	Boş perfüzyon ortamı
3	3	15	10 µM Rifampisin
4	3	60	10 µM Rifampisin
5	3	15	50 µM Rifampisin
6	3	60	50 µM Rifampisin
7	6	15	1 µM Pitavastatin
8	6	60	1 µM Pitavastatin
9	6	15	10 µM Rifampisin + 1 µM Pitavastatin
10	6	60	10 µM Rifampisin + 1 µM Pitavastatin
11	6	15	50 µM Rifampisin + 1 µM Pitavastatin
12	6	60	50 µM Rifampisin + 1 µM Pitavastatin

Toplanan tüm örnekler analiz öncesi -20°C'de saklanmıştır. Bölüm 3.4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu'nda detaylı olarak verilen numune hazırlama basamaklarının ardından pitavastatin, KPI ve KPIII LC-MS ile analiz edilmiştir. Karaciğer dokusu örneklerindeki rifampisin miktarı ise HPLC ile analiz edilmiştir.

3.6. Veri Analizi

In situ karaciğer perfüzyonu çalışmalarından elde edilen perfüzyat örneklerindeki zamana karşı pitavastatin konsantrasyon-zaman profili elde edilmiş ve bu eğrilerin EAA değerleri kontrol ve inhibisyon grupları için trapezoidal yöntem (Eşitlik 3.4.) kullanılarak tayin edilmiştir.

$$EAA_{0-t_n} = \sum \left\{ \frac{c_0+c_1}{2} \times (t_1 - t_0) \right\} + \left\{ \frac{c_1+c_2}{2} \times (t_2 - t_1) \right\} \dots + \left\{ \frac{c_{n-1}+c_n}{2} \times (t_n - t_{n-1}) \right\} \quad (3.4.)$$

Karaciğer ve safra örneklerindeki pitavastatin, KPI ve KPIII miktarları ve karaciğerdeki rifampisin konsantrasyonu her madde ile ilgili kalibrasyon doğrusu kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ($X \pm SS$) olarak

verilmiştir. Veriler GraphPad Prism (ABD, 6. Sürüm) programı kullanılarak grafiklendirilmiş ve istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Pitavastatin, KPI ve KPIII için karaciğer/safra oranları Eşitlik 3.5. kullanılarak hesaplanmıştır. Pitavastatin ve koproporfirinI/III arasındaki ilişki çoklu regresyon analizi ile incelenmiştir.

$$\text{Karaciğer/Safra} = \frac{\text{Karaciğerdeki toplam madde miktarı}}{\text{Safradaki toplam madde miktarı}} \quad (3.5.)$$

Modelden bağımsız yöntem kullanılarak kompartmanlardaki pitavastatin geri kazanımı, hepatik klerens (CL_H), hepatik biyoyararlanım (F_H) ve safrayla itrah (*biliary excretion*, CL_{safra}) klerensi aşağıda verilen eşitlikler (Eşitlik 3.6.-3.9.) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri kazanım (kompartman)} = \frac{\text{Perfüzyon sonunda kompartmandaki pitavastatin miktarı}}{\text{Doz}} \times 100 \quad (3.6.)$$

$$CL_H = \frac{\text{Doz}}{EAA_{0-t}} \quad (mL/dk) \quad (3.7.)$$

$$F_H = \frac{Q_P - CL_H}{Q_P} \quad (3.8.)$$

$$CL_{\text{safra}} = \frac{\text{Safradaki toplam madde miktarı}}{EAA_{0-t}} \quad (\text{Modelden bağımsız yöntem}) \quad (3.9.)$$

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde GraphPad Prism (sürüm 6 ve sürüm 8.1.2) kullanılmıştır. Kullanılan istatistiksel analiz yöntemleri Tablo 3.5.'te verilmiştir. Shapiro-Wilk testi ile değerlerin dağılımı incelenerek $p > 0,05$ düzeyinde normal dağılıma uydukları kabul edilmiştir. Tüm sonuçlar normal dağılıma uygunluk göstermiştir ve iki grup değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark olup olmadığını test etmek amacıyla parametrik bir test olan Student's t-test kullanılmıştır. Veri analizi kapsamında rifampisin karaciğer düzeyleri için ise verilere logaritmik dönüşüm uygulanarak parametrik test uygulanmıştır.

Tablo 3.5. Kullanılan istatistiksel analiz yöntemleri

Çalışma	İstatistiksel Analiz	İstatistiksel anlamlılık
Analitik yöntem validasyonu	Doğrusal regresyon analizi Tek yönlü varyans analizi	p < 0,05
Veri analizi	Doğrusal regresyon analizi Student's t-test	
Monte Carlo duyarlılık analizleri	Kolmogorov-Smirnov testi (K-S)	

3.8. Mekanistik Modelleme

Mekanistik modelleme ve simülasyon çalışmaları Manchester Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Eczacılık ve Optometri Bölümü Uygulamalı Farmakokinetik Araştırmalar Merkezi'nde Prof. Dr. Aleksandra Galetin'in gözetiminde gerçekleştirilmiştir.

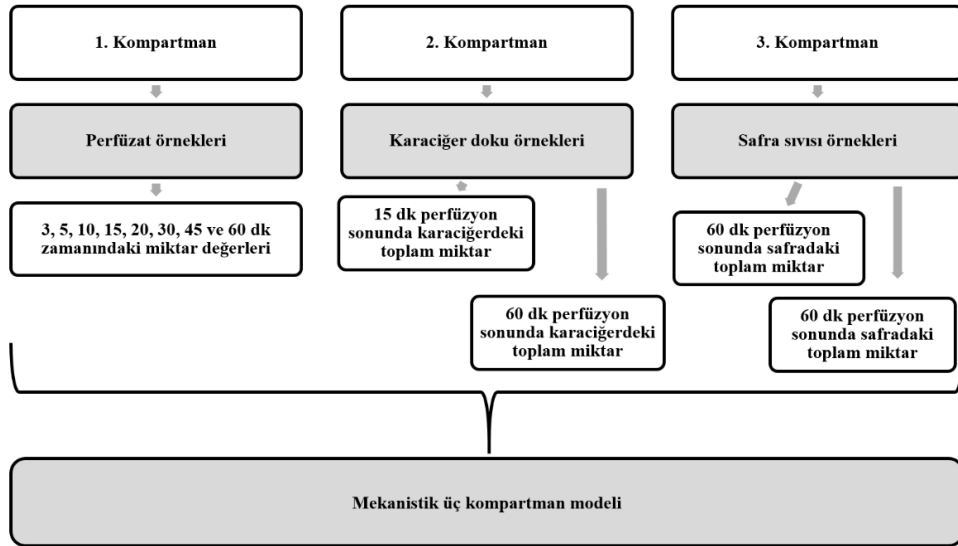
Farmakokinetik modellemelerde NONMEM ve NM-TRAN alt programı (Icon Development Solutions, Ellicott City, MD, ABD), acsIX (Aegis Technologies, Huntsville, AL, ABD), SimCYP (SimCYP Ltd, Sheffield, Birleşik Krallık), R (R Foundation for Statistical Computing, Avusturya) ve MATLAB (The MathWorks, Inc., Natick, MA, ABD) gibi çeşitli bilgisayar yazılımları kullanılmaktadır.

Tez kapsamında model geliştirme ve simülasyon çalışmaları ile belirsizlik ve duyarlılık analizleri için MATLAB® yazılımı sürüm R2019b kullanılmıştır. Bu yazılım, farmakokinetik modelleme çalışmalarında parametrelerin belirlenmesi, farmakokinetik model içerisinde yer alan diferansiyel denklemlerin tanımlanması ve üzerinde değişiklik yapılabilmesi adımlarında esnek bir platform sunmaktadır. Ayrıca özelleşmiş problem çözme komutları ve optimizasyon araçlarının kullanımı ile simülasyon profillerinin elde edilmesi ve farmakokinetik parametre kestirimi gerçekleştirilebilmekte ve çeşitli grafikler elde edilebilmektedir.

3.8.1. Mekanistik Model Tasarımı

Mekanistik model, pitavastatinin karaciğer dispozisyonunu açıklayacak ve elde edilen verilerin analizine olanak sağlayacak şekilde, deneysel koşullar dikkate alınarak tasarlanmıştır. Karaciğer perfüzyonu çalışmasında perfüzyon örnekleri sistemik

dolaşımında bulunan ilaç miktarını, karaciğer dokusu örnekleri karaciğerde hücre dışı alana (ekstraselüler alan) veya hücre içine (intraselüler alan) girmiş olan ilaç miktarını, safra örnekleri ise safra ile itrahi gerçekleşen ilaç miktarını göstermektedir. Bu nedenle perfüzyon, karaciğer ve safra kompartmanından oluşan mekanistik üç kompartman modeli tasarlanmasına karar verilmiştir (Şekil 3.4.).

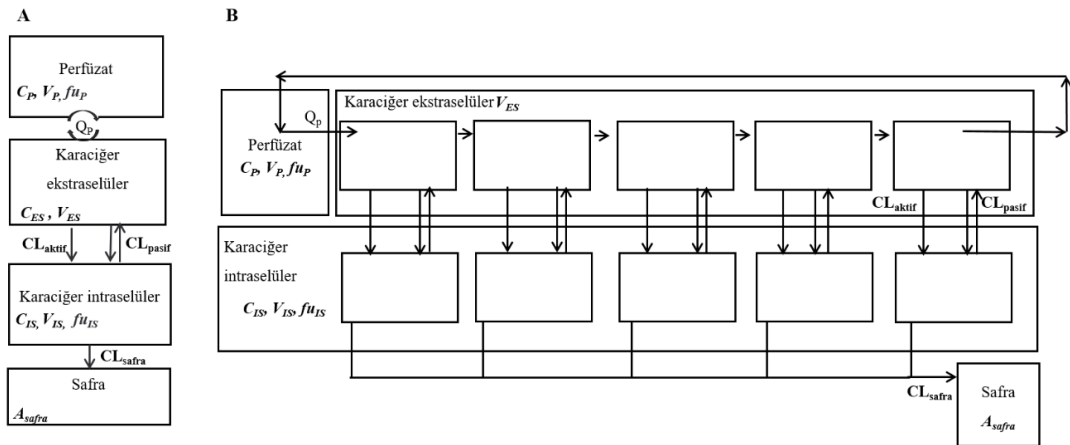


Şekil 3.4. Deneysel verilerin analizine olanak sağlayacak model şeması.

Pitavastatinin deneysel koşullardaki hepatik dispozisyonunu değerlendirmek amacıyla mekanistik model geliştirme kapsamında öncelikle literatür taraması yapılmıştır. Kullanılan deneysel modeller ve ilaçların klerens yolları dikkate alınarak çalışmalar arasından kaynak olarak alınabilecek olan üç model belirlenmiştir. Bu modellerden ilki Pfeifer ve ark. tarafından *in situ* tek geçiş karaciğer perfüzyonu çalışması sonrası rosuvastatinin karaciğer dispozisyonunu değerlendirmek üzere geliştirilen 5 alt kompartmanlı çoklu karaciğer modelidir. Rosuvastatin için ilgili klerens yolları ise hücre içine alım, bazolateral *efflux*, safra ile itrah ve metabolizasyon olarak belirlenmiştir (28). İkinci olarak kaynak alınan modelde, Hobbs ve ark., *in situ* resirküle karaciğer perfüzyonu ile rosuvastatin dispozisyonunu çeşitli inhibitörler varlığında ve yokluğunda değerlendirmek üzere 5 alt kompartmanlı çoklu karaciğer modeli kullanmışlardır. Ancak rosuvastatin için bazolateral *efflux* ve özellikle metabolizma klerensi modelde tanımlanmamıştır (27). Üçüncü olarak kaynak alınan modelde ise Gertz ve ark. repaglinid için minimal PBPK modelde

karaciğeri karaciğer dokusu (*liver tissue*) ve kanı (*liver blood*) olarak tek alt kompartman modeli ile tanımlamışlardır. Repaglinid için pasif difüzyon ve metabolizma klerens değerleri girdi parametreleri olarak belirlenirken karaciğer hücre içine alım klerens kestirimi yapılmıştır. Ayrıca minimal PBPK modeli ile plazma konsantrasyonu zaman profili kestirimi yapılarak *in vivo* bulgular ile karşılaştırma sunulmuştur (165).

Model tasarımı çalışmaları kapsamında tek alt kompartman ve çoklu alt kompartman modelleri ilgili kaynaklardan hareketle değişiklikler yapılarak geliştirilmiştir. Her iki modelde de bir perfüzyon ve bir safra kompartmanı tanımlanmıştır. Tekli modelde bir karaciğer ekstraselüler ve bir karaciğer intraselüler kompartman tanımlanırken çoklu alt kompartman modelinde her biri 5 ayrı alt kompartmana ayrılmıştır. Model parametreleri olarak perfüzyon akış hızı, pitavastatinin perfüzyon ve karaciğer dokusundaki serbest fraksiyonu, kompartman hacimleri ve klerens değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.5.). Çoklu alt kompartman modelinde karaciğer intraselüler kompartmanlar arasında geçiş olmadığı varsayımı yapılmıştır.



Şekil 3.5. Mekanistik A) tek alt kompartman ve B) çoklu alt kompartman karaciğer modellerinin şematik gösterimi (t, A, C, V sırasıyla zaman (dk), miktar (μg), konsantrasyon (μM), ve hacim (mL); Q (mL/dk), CL (mL/dk), ve f_u sırasıyla perfüzyon hızı, kompartmanlar arası klerens ve serbest ilaç fraksiyonu, P, ES, ve IS alt karakterleri ise sırasıyla perfüzyon, karaciğer ekstraselüler, karaciğer intraselüler kompartmanları ifade etmektedir).

Pitavastatinin karaciğerdeki tüm taşınma yolları mekanistik olarak pasif taşınma klerensi (*passive diffusion*, CL_{pasif}), aktif taşıma (*active uptake*, CL_{aktif}), ve safraya itrah (*biliary excretion*, CL_{safra}) şeklinde tanımlanmıştır. Tek alt kompartman modelinde kompartmanlar arasında pitavastatin dağılımı aşağıdaki denklemler dizisi aracılığıyla ifade edilmiştir (Eşitlik 3.10-3.13).

- **Perfüzat**

$$\frac{dA_P}{dt} = Q_P \times (C_{ES} - C_P) \quad (3.10.)$$

$$C_P = A_P / V_P, \text{ Başlangıç } A_P = 63.075 \mu g \text{ (} C_P = 1 \mu M \text{), teorik}$$

- **Karaciğer ekstraselüler**

$$\begin{aligned} \frac{dA_{ES}}{dt} = Q_P \times (C_P - C_{ES}) + (CL_{pasif} \times (f u_{IS} \times C_{IS} - f u_P \times C_{ES})) - \\ (CL_{aktif} \times f u_P \times C_{ES}) \end{aligned} \quad (3.11.)$$

$$C_{ES} = A_{ES} / V_{ES}, \text{ Başlangıç } A_{ES} = 0 \mu g$$

- **Karaciğer intraselüler**

$$\begin{aligned} \frac{dA_{IS}}{dt} = CL_{pasif} \times (f u_P \times C_{ES} - f u_{IS} \times C_{IS}) + (CL_{aktif} \times f u_P \times C_{ES}) - \\ (CL_{safra} \times f u_{IS} \times C_{IS}) \end{aligned} \quad (3.12.)$$

$$C_{IS} = A_{IS} / V_{IS}, \text{ Başlangıç } A_{IS} = 0 \mu g$$

- **Safra**

$$\frac{dA_{safra}}{dt} = CL_{safra} \times f u_{IS} \times C_{IS} \quad (3.13.)$$

$$\text{Başlangıç } A_{safra} = 0 \mu g$$

Çoklu alt kompartman modelinde karaciğer ekstraselüler ve intraselüler kompartmanları 1-5 arasında numaralandırılmıştır ve kompartmanlar arasında pitavastatin dağılımı aşağıdaki denklemler dizisi aracılığıyla ifade edilmiştir (Eşitlik 3.14-3.18.).

- **Perfüzasyon**

$$\frac{dA_P}{dt} = Q_P \times (C_{ES,5} - C_P) \quad (3.14.)$$

$$C_P = A_P/V_P, \text{Başlangıç } A_P = 63.075 \mu g \quad (C_P = 1 \mu M), \text{ teorik}$$

- **Karaciğer ekstraselüler-1**

$$\begin{aligned} \frac{dA_{ES}}{dt} = & Q_P \times (C_P - C_{ES,1}) + (CL_{pasif}/5 \times (f_{u_{IS}} \times C_{IS,1} - f_{u_P} \times C_{ES,1})) - \\ & (CL_{aktif}/5 \times f_{u_P} \times C_{ES,1}) \end{aligned} \quad (3.15.)$$

$$C_{ES,1} = A_{ES,1}/V_{ES,n}, \text{Başlangıç } A_{ES,1} = 0 \mu g$$

- **Karaciğer ekstraselüler-2-5**

$$\begin{aligned} \frac{dA_{ESn}}{dt} = & Q_P \times C_{ES,n-1} + (CL_{pasif}/5 \times (f_{u_{IS}} \times C_{ISn} - f_{u_P} \times C_{ES,n})) - \\ & (CL_{aktif}/5 \times f_{u_P} \times C_{ES,n}) \end{aligned} \quad (3.16.)$$

$$C_{ES,n} = A_{ES,n}/V_{ES,n} \quad \text{ve } n=(2, 3, 4, 5), \text{Başlangıç } A_{ES,1} = 0 \mu g$$

- **Karaciğer intraselüler-1-5**

$$\frac{dA_{IS}}{dt} = CL_{pasif}/5 \times (fu_P \times C_{ES,n} - fu_{IS} \times C_{IS,n}) + (CL_{aktif}/5 \times fu_P \times C_{ES,n}) - (CL_{safra}/5 \times fu_{IS} \times C_{IS,n}) \quad (3.17.)$$

$$C_{IS,n} = A_{IS,n}/V_{IS,n}, \text{Başlangıç } A_{IS,n} = 0 \mu g$$

- **Safra**

$$\frac{dA_{safra}}{dt} = CL_{safra} \times fu_{IS} \times C_{IS} \quad (3.18.)$$

$$C_{IS} = A_{IS}/V_{IS}, A_{IS} = \sum_1^n A_{IS,n}, \text{Başlangıç } A_{safra} = 0 \mu g \quad \text{ve } n=(1, 2, 3, 4, 5)$$

Karaciğer perfüzyonu çalışmasında perfüzyon akış hızı 15 mL/dk ve perfüzyon çözeltisi hacmi 150 mL olarak belirlenmiştir. Diğer girdi parametreleri için literatürde rapor edilmiş değerler dikkate alınmıştır (Tablo 3.6.) ve fizyolojik ölçeklendirme faktörleri ile IVIVE uygulanmıştır. Bu faktörler sıçanlarda gram karaciğer başına hepatosit sayısı (hepatosellülerite) (120×10^6 hücre/g karaciğer) (231), sıçan karaciğer ağırlığı (40 g/kg vücut ağırlığı) (167) ve deneyde kullanılan sıçanların ortalama vücut ağırlığı (0,3 kg)'dır. Literatürde yer alan *in vitro* klerens değerlerinin *in vivo*'ya ekstrapolasyonunda Eşitlik 3.19. kullanılmıştır.

$$CL_{in\ vivo} \left(\frac{mL}{dk} \right) = CL_{in\ vitro} \left(\frac{mL}{dk \times 10^6 \text{ hücre}} \right) \times \text{Hepatosellülerite} \left(\frac{\text{hücre}}{g \text{ karaciğer}} \right) \times \text{Sıçan karaciğer ağırlığı} \left(\frac{g \text{ karaciğer}}{kg \text{ vücut ağırlığı}} \right) \times \text{Sıçan vücut ağırlığı} (kg) \quad (3.19.)$$

Tablo 3.6. Modellemede kullanılan girdi parametreleri için referans değerler.

Parametre	Ölçeklendirme faktörü	Değer	Yöntem	Kaynak
V_{ES}	Sıçan karaciğer ve vücut ağırlığı	2,412 mL	<i>In situ</i> karaciğer perfüzyonu	(61)
V_{IS}	Sıçan karaciğer ve vücut ağırlığı	5,784 mL	<i>In situ</i> karaciğer perfüzyonu	(61)
f_{up}^*	-	0,1	<i>In vivo</i> sıçan çalışması	(166)
f_{uIS}	-	0,053	<i>In vivo</i> sıçan hepatositleri	(15)
CL_{pasif}	Hepatosellüerite, sıçan karaciğer ve vücut ağırlığı	15,696 mL/dk	<i>In vivo</i> sıçan hepatositleri	(15)
CL_{aktif}	Hepatosellüerite, sıçan karaciğer ve vücut ağırlığı	171,36 mL/dk	<i>In vivo</i> sıçan hepatositleri	(15)
	Sıçan karaciğer ve vücut ağırlığı	1098 mL/dk	Karaciğer perfüzyonu (çoklu indikatör yöntemi)	(166)
CL_{safra}	Sıçan vücut ağırlığı	0,074 mL/dk	<i>In vivo</i> sıçan çalışması**	(209)
		1,365 mL/dk	<i>In vivo</i> sıçan çalışması***	

*1% Sıçan serum albumini için hesaplanmıştır, **Karaciğer konsantrasyonuna göre normalize edilmiştir, ***Plazma konsantrasyonuna göre normalize edilmiştir.

Kısaltmalar: V_{ES} : karaciğer ekstraselüler alan hacmi; V_{IS} : karaciğer intraselüler alan hacmi; f_{up} : perfüzyon içerisindeki serbest ilaç fraksiyonu; f_{uIS} : intraselüler alandaki serbest ilaç fraksiyonu; CL_{pasif} : pasif difüzyon klerensi; CL_{aktif} : aktif hücre içine alım klerensi; CL_{safra} : safra klerensi.

3.8.2. Ön Modelleme ve Simülasyon Çalışmaları

Modellerin karaciğer perfüzyon çalışmalarından elde edilecek verileri tanımlamadaki uygunluklarının incelenmesi için ön mekanistik modelleme ve simülasyon çalışmaları yürütülmüştür. MATLAB® (R2019b) yazılımı kullanılarak yazılan tüm kodlar EK-2'de verilmektedir. Öncelikle bir dizi diferansiyel denklemi içeren (Bkz. 3.8.1 Mekanistik Model Tasarımı) model fonksiyon dosyaları oluşturulmuştur. Birden fazla adi diferansiyel denklemlerin (*ordinary differential equation*, ODE) çözümünde “ode” komutları kullanılmaktadır. Çeşitli ODE çözümleyicileri (Örneğin, ode45, ode23, ode113, ode15s) bulunmakta olup bunların içinden problem tipi ve amaçlanan doğruluk derecesine göre uygun olan komutu

kullanmak gerekmektedir. ODE komutları problemin çözümünde tutukluk (stiffness) gösterip göstermemesine göre ikiye ayrılmaktadır. Genel olarak, tutukluk görülmemesi durumunda ode45 gibi çözümleyiciler (Örneğin, ode45) seçilmektedir. Ancak çözümün sağlanamaması durumunda ya da çözümün hızlandırılması amacıyla tutukluk gösteren çözümler için ode15s gibi çözümleyiciler ile çalışılmaktadır (232). Mekanistik yöntem optimizasyonu sırasında farmakokinetik modelin çözümünde tutukluk göstermeyen çözümleyici olan ode45 komutu ile hızlı bir çözüm elde edilmiştir.

İlk olarak literatürdeki referans girdi parametrelerinden hareketle perfüzyon, karaciğer ve safra kompartmanları için simülasyon grafikleri her iki model (tek ve çoklu alt kompartman) için elde edilmiştir. Bu amaçla ana komut dosyasına aşağıda belirtilen girdi parametreleri tanımlanmıştır:

- **Sistem parametreleri:**

$$Q_P = 15 \text{ mL/dk}$$

$$V_P = 150 \text{ mL}$$

$$V_{ES} = 2,412 \text{ mL}$$

$$V_{IS} = 5,784 \text{ mL}$$

$$f_{uP} = 0,1$$

$$f_{uIS} = 0,053$$

- **Sabit parametreler:**

$$CL_{pasif} = 15,696 \text{ mL/dk}$$

$$CL_{aktif} = 171,36 \text{ veya } 1098 \text{ mL/dk}$$

$$CL_{safra} = 0,074 \text{ veya } 1,365 \text{ mL/dk}$$

Pasif difüzyon klerensi için bir referans değer kullanılırken, aktif taşıma ve safra yolu ile itrah klerens için literatürde yer alan her iki kaynak değeri de kullanılarak simülasyon grafikleri elde edilmiştir. Bu durumda uygulanmış olan 4 tip senaryo Tablo 3.7'de belirtilmektedir.

Tablo 3.7. Ön modelleme ve simülasyon çalışmalarında uygulanacak sabit parametreler.

Senaryo numarası	CL _{pasif}	CL _{aktif}	CL _{safra}
	(mL/dk)		
1	15,696	171,36	0,074
2	15,696	171,36	1,365
3	15,696	1098	0,074
4	15,696	1098	1,365

Simülasyonun elde edileceği zaman noktaları 0-60 dk arasında 0,1 dk aralıklı olarak belirlenmiştir. Pitavastatinin perfüzat kompartmanındaki 0.dk'daki başlangıç koşuluna deneysel verilerdeki deney sonu kütle denge dikkate alınarak düzeltme uygulanmıştır (43,263 μ M). Modellerdeki denklemlerin kütle-denge kontrolü gerçekleştirilmiştir.

Simülasyon fonksiyon komutu oluşturularak, belirlenmiş olan simülasyon zamanında, sistem parametreleri, sabit parametreler ve başlangıç koşullarından hareketle perfüzat, karaciğer ve safra kompartmanları için pitavastatin miktarı-zaman simülasyon profilleri elde edilmiştir. Deneysel (gözlem) ve simülasyon ile elde edilen (kestirim) değerleri zamana karşı bir grafikte gösterilmiştir. Ayrıca gözlem değerlerine karşı kestirim değerleri grafiği de elde edilmiştir. Ağırlıklı rezidüel (*weighted residual*) Eşitlik 3.20. yardımı ile hesaplanarak zamana karşı ağırlıklı rezidüel ve gözlem değerlerine karşı ağırlıklı rezidüel grafikleri elde edilmiştir.

$$\text{Ağırlıklı rezidüel} = \frac{\text{Gözlem değeri} - \text{Kestirim değeri}}{\text{Kestirim değeri}} \quad (3.20.)$$

Bu çalışma sonucunda tek alt kompartman ve çoklu alt kompartman modelleri ile elde edilecek grafiklerin görsel olarak incelenmesi ve rezidüel karelerinin toplamı (*Sum of Squares of Residuals*, SSR) değerinin göz önünde bulundurulması ile

modellerin (tek alt kompartman ve çoklu alt kompartman) elde edilecek verileri tanımlamadaki uygunluğu karşılaştırılarak ileri çalışmalarda kullanılacak olan modele karar verilmiştir.

3.8.3. Belirsizlik (Uncertainty) ve Duyarlılık (Sensitivity) Analizleri

Mekanistik model için tanımlanmış olan girdi parametreleri, varyasyon, ölçüm hataları veya mevcut tekniklerin ölçümdeki yetersizliği gibi sebeplerden dolayı ancak belirli bir derecede kesinlik göstermektedir. Belirsizlik analizlerinin amacı, girdi parametrelerindeki belirsizliğin çıktı parametreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi ve böylece mevcut deneysel veri ve kestirimlerdeki güven derecesini ifade etmektir (233).

Girdi parametrelerindeki belirsizlik (deneysel varyasyon ve parametre belirsizliği) Tablo 3.8.'de gerekçelendirilerek belirlenmiştir. Belirsizlik analizlerinde eğer literatürde bilinen bir veri veya bilgi yok ise girdi parametrelerinin tanımlanan en düşük ve en yüksek değerler arasında tekdüze dağılıma uyduğu kabul edilmektedir. Eğer belirli bir parametre için literatürde daha sık veya beklenen bir değer var ise girdi parametresinin belirlenen sınır içerisinde bu değer etrafında normal dağılım gösterdiği kabul edilmektedir (233). Tez çalışmasında girdi parametrelerinin belirlenmiş olan belirsizlik sınırları içerisinde tekdüze dağılım gösterdiği varsayılarak 1000 adet parametre seti oluşturulmuştur.

Parametre setleri arasından örnekleme yöntemi olarak Monte Carlo yöntemi kullanılmıştır. Monte Carlo simülasyonları girdi parametrelerinin belirsizlik derecesi içerisindeki olasılık dağılımından rastgele örneklem seçilmesi ile model ile çoklu simülasyonlar elde edilmesi prensibine dayanmaktadır. Monte Carlo yöntemi hem model çıktılarındaki belirsizliğin ifade edilmesinde hem de duyarlılık analizi olarak kullanılmaktadır (233).

Tablo 3.8. Girdi parametrelerindeki belirsizlik.

Parametre	Başlangıç değeri	Belirsizlik	Not	Kaynak
Q_P	15 mL/dk	$\pm \% 5$	Deneysel varyasyon	
V_P	150 mL	$\pm \% 5$	Deneysel varyasyon	
V_{ES}	2,412 mL	$\pm \% 10$	Rapor edilmiş deneysel varyasyon	(61)
V_{IS}	5,784 mL	$\pm \% 10$	Rapor edilmiş deneysel varyasyon	(61)
f_{uP}	0,1	$\pm \% 30$	Hesapla elde edilen bir parametre olduğu için daha yüksek varyasyon belirlenmiştir	(166)
f_{uIS}	0,053	$\pm \% 30$	Rapor edilen değerler farklı koşullar için 0,03 ile 0,07 arasındadır	(15, 234)
CL_{pasif}	15,696 mL/min	$\pm \% 30$	<i>In vivo</i> CL_{pasif} değeri bulunmadığı için daha yüksek varyasyon belirlenmiştir	(15, 234)
CL_{aktif}	171,36 mL/min	171,36-1098	Rapor edilen değerler ile belirsizlik aralık olarak tanımlanmıştır	(15, 166)
CL_{safra}	0,074/1,365 mL/min	0,074-1,365	Rapor edilen değerler ile belirsizlik aralık olarak tanımlanmıştır	(209)

Kısaltmalar: Q_P : perfüzyon akış hızı; V_P : perfüzat hacmi; V_{ES} : karaciğer ekstraselüler alan hacmi; V_{IS} : karaciğer intraselüler alan hacmi; f_{uP} : perfüzat içerisindeki serbest ilaç fraksiyonu; f_{uIS} : intraselüler alandaki serbest ilaç fraksiyonu; CL_{pasif} : pasif difüzyon klerensi; CL_{aktif} : aktif hücre içine alım klerensi; CL_{safra} : safra klerensi.

Girdi parametrelerindeki belirsizliğin model çıktıları üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere incelenecek olan çıktı parametreleri, pitavastatinin 0-15 dk ve 0-60 dk arasında perfüzattaki konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan (EAA_{0-15} ve EAA_{0-60}), pitavastatinin karaciğerde 15 ve 60.dk'daki miktarı (*amount*, $A_{15, karaciğer}$, $A_{60, karaciğer}$), ve pitavastatinin safradaki 15 ve 60.dk'daki miktarı (*amount*, $A_{15, safra}$, $A_{60, safra}$) olarak belirlenmiştir. EAA değerleri doğrusal trapezoidal yöntem ile hesaplanmıştır.

Belirsizlik analizleri tüm girdi parametre setlerinin sonucunda elde edilen çıktı parametrelerinin dağılımı ampirik kümülatif dağılım yoğunluk fonksiyonu ve kutu grafiği ile görsel olarak değerlendirilmiştir.

Duyarlılık analizleri modeldeki belirsizliğin nicel olarak ifade edilmesi için kullanılan yöntemlerdir. Duyarlılık analizlerinin amacı kritik girdi parametrelerinin belirlenmesi ve girdi parametrelerindeki belirsizliğin model çıktılarına nasıl etkilediğini nicel olarak tayin etmektir. Genellikle girdi parametresindeki belirsizlik düşük olduğunda lokal duyarlılık analizi kullanılarak girdi parametresinin bir değer etrafındaki dağılımı tanımlanarak tek başına çıktı parametresi üzerinde etkisi hesaplanan duyarlılık katsayısı ile ifade edilmektedir. Ancak, özellikle girdi parametrelerinin çoğunlukla yüksek varyasyon gösterdiği biyoloji gibi alanlarda bu yaklaşım nicel analiz olarak uygun değildir. Bunun yerine birçok parametrenin etkisini aynı anda değerlendiren global duyarlılık analizleri kullanılmaktadır. Bu teknikler içerisinde Monte Carlo simülasyonu kullanılmakta olup örnekleme temelli yöntemlerdir.

Model girdi ve çıktı değerleri arasındaki ilişkinin saçılım grafiği ile incelenmesi ile global duyarlılık analizi yöntemi belirlenir. Eğer ilişki doğrusal ise “Pearson Korelasyon Katsayısı”, “Kısmi Korelasyon Katsayısı” ve “Standart Regresyon Katsayısı” hesaplama yöntemleri kullanılmaktadır. Doğrusal olmayan ancak tekdüze bir ilişki olması durumunda ise verinin sıralamaya dönüşümü uygulanması ile “Spearman’ın Sıra Korelasyon Katsayısı”, “Kısmi Sıra Korelasyon Katsayısı” ve Standardize Sıra Regresyon Katsayısı” hesaplama yöntemleri kullanılmaktadır. Doğrusal ve tekdüze olmayan ilişkiler için ise çıktı parametrelerinin varyans ayrışımına dayanan yöntemler (Örneğin Sobol yöntemi) kullanılmaktadır (233). Tez kapsamında girdi ve çıktı parametreleri arasındaki doğrusal olmayan tekdüze ilişkiye (Bkz. 4.3.2. Belirsizlik ve Duyarlılık Analizleri) dayanarak global duyarlılık analizi olarak “Kısmi Sıra Korelasyon” testi kullanılmıştır. Bu test sonucunda kısmi sıra korelasyon katsayısı (*partial rank correlation coefficients*, PRCC) değerleri ve ilgili p değerleri elde edilmektedir.

Ayrıca, Monte Carlo simülasyonu ile her bir girdi parametre seti için (n=1000) perfüzat, karaciğer ve safra kompartmanlarının simülasyon profilleri elde edilmiştir. Deneysel veriler bu profiller üzerinde gösterilmiştir. Ardından, filtreleme yaklaşımı uygulanarak profillerin hedef bölgesine odaklanılarak hangi girdi parametrelerinin kritik olduğu değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede istatistiksel olarak Kolmogorov-Smirnov testi kullanılmıştır.

Son olarak model iyileştirme çalışmaları kapsamındaki (Bkz. 3.8.4. Model İyileştirme) CL_{aktif} ve CL_{safra} kestirimlerinin veri analizi sırasında sabit tutulan ve %30 belirsizlik tanımlanmış parametrelere (f_{uIS} , CL_{pasif}) olan duyarlılığı incelenmiştir. Bu çalışmada Monte Carlo yöntemi kullanılarak sabit parametreler için \pm %0, %10 ve %30 varyasyon gösterecek şekilde 25 set oluşturulmuştur. Ardından aynı veri 25 farklı parametre seti kullanılarak analiz edilmiş ve 25 adet CL_{aktif} , $CL_{aktif, inh}$ ve CL_{safra} kestirimi elde edilmiştir. CL_{aktif} ve $CL_{aktif, inh}$ kestirimleri ile Eşitlik 3.21. kullanılarak hesaplanan % inhibisyon kestiriminin girdi parametrelerindeki belirsizlikten etkilenip etkilenmediği incelenmiştir. Kestirimlerin f_{uIS} yanında f_{uP} parametresine olan duyarlılığı da aynı prensiple değerlendirilmiştir.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \left(\frac{CL_{aktif, inh}}{CL_{aktif}} \times 100 \right) \quad (3.21.)$$

Belirsizlik ve duyarlılık analizleri MATLAB® (R2019b) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup kodlar EK-2’de yer almaktadır.

3.8.4. Model İyileştirme (Model Refinement)

Model içerisine deneysel veri-uyumunun (data-fitting) gerçekleştirilmesindeki amaç duyarlılık analizleri ile belirlenmiş olan en kritik girdi parametrelerinin kestiriminin yapılması ve bu parametrelerin model içerisinde optimize edilmesiyle elde edilen simülasyon profillerinin iyileştirilmesidir.

Elde edilmiş olan deneysel verinin inhibisyon varlığında ve yokluğunda olmak üzere iki durumlu olarak eş zamanlı analizini gerçekleştirebilmek üzere modele

inhibisyon durumundaki aktif taşıma klerensi ($CL_{\text{aktif, inh}}$) dahil edilmiştir ve deneysel veriler ilgili koşula uygun olarak eş zamanlı olarak analiz edilmiştir. Model kodları EK-2’de verilmektedir.

MATLAB® (R2019b) yazılımında parametre kestiriminde doğrusal olmayan veri uyum (*data-fitting*) problemlerinin çözümünde doğrusal olmayan en küçük kareler (*nonlinear least-squares*, lsqnonlin) komutu kullanılmıştır. CL_{safra} ’nın kontrol ve inhibisyon koşullarında değişmediği varsayımı altında, CL_{aktif} , $CL_{\text{aktif, inh}}$ ve CL_{safra} parametrelerinin model ile kestirimi yapılmıştır. Literatürde yer alan değerler ile karşılaştırma yapılarak yapılan çalışma ve modelin katkısı irdelenmiştir.

Girdi parametrelerinin optimize edilmesinin ardından simülasyon profilleri elde edilmiştir. Her kompartman için gözlem değerleri aynı grafik üzerinde gösterilmiştir. Gözlem değerlerine karşı kestirim değerleri, zamana karşı ağırlıklı rezidüel ve gözlem değerlerine karşı ağırlıklı rezidüel grafikleri elde edilmiştir. Model grafiklerin görsel incelemesi ve SSR değeri esas alınarak değerlendirilmiştir. Farmakokinetik parametrelerin gözlem değerleri ile kestirim değerleri arasında en fazla 2 katlık fark olması kabul kriteri olarak belirlenmiştir.

Modelde sabit tutulan f_{up} , f_{IS} ve CL_{pasif} parametrelerindeki belirsizliğin kestirim ile elde edilen değerler üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere modelde sabitlenen f_{up} , f_{IS} ve CL_{pasif} değerlerinin %70, %90, %100, %110 ve %130’u (%0, %10 ve %30 varyasyon) alınarak Monte Carlo örnekleme ile her bir parametre eşleştirmesi için 25 parametre kombinasyonu elde edilmiştir. Her bir ikili parametre seti ($n=25$) için modelle veri analizi tekrarlanarak kestirim değerlerinin dağılımı incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu

4.1.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII Tayini İçin LC-MS Yönteminin Optimizasyonu

Pitavastatin, KPI ve KPIII'ü eş zamanlı olarak tayin edebilecek KPI ve KPIII piklerinin birbirinden ayrıldığı optimum bir LC-MS yöntemi geliştirmek amacıyla farklı koşullarda (farklı kolon, farklı gradyan elüsyonda koşulları, akış hızı ve farklı enjeksiyon hacmi) analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Bkz. 3.4.1. Analitik Yöntem Optimizasyonu).

Öncelikle 100 mm'lik C18 kolon ile çalışmalara başlanmıştır. Mobil faz olarak su (%0,1 formik asit):asetonitril (%0,1 formik asit) karışımı farklı oran ve gradyan elüsyon koşullarında kullanılmıştır. Gradyan analizde zamanla asetonitril oranı önce yükselmekte sonra azalarak başlangıç düzeyine inmektedir. Düşük akış hızında (0,15 mL/dk) gradyan elüsyon zaman aralıkları geniş tutulmuş ve toplam analiz süresi 15 dk'ya kadar artırılmış ancak KPI ve KPIII ayrımı analiz süresi içinde gerçekleştirilememiştir. Cihazın geri basıncı dikkate alınarak akış hızı artırıldığında (0,6 mL/dk), KPI ve KPIII için m/z oranında sadece bir pike rastlanması maddelerin kolonda ayrılamadan birlikte uzaklaştıklarını göstermiştir. Aynı çalışmada su yerine amonyum format tamponu kullanımı ile yapılan analizlerde de KPI ve KPIII pikleri elde edilememiştir.

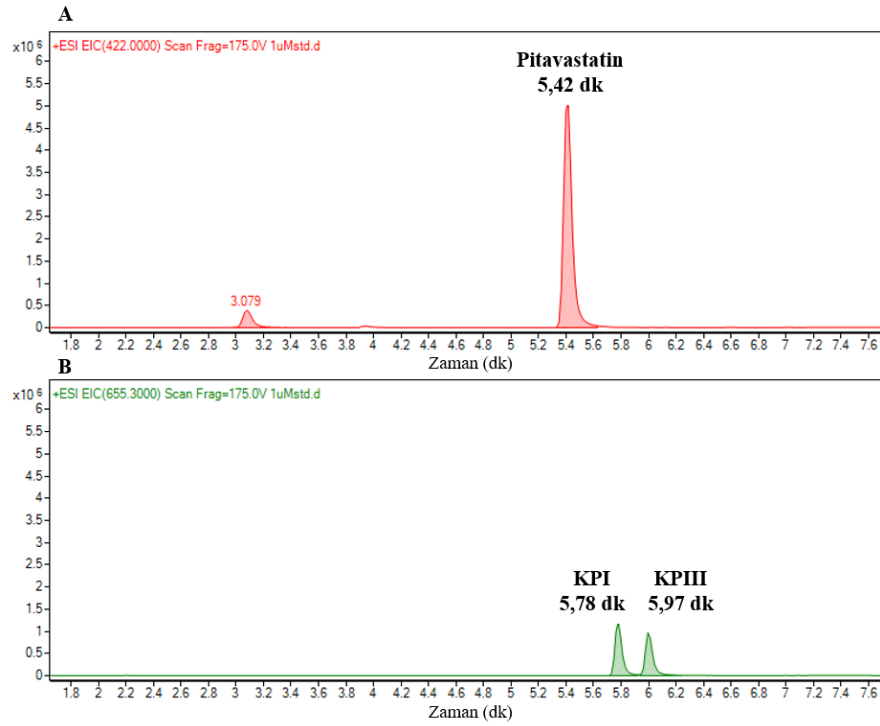
150 mm'lik ve etkinliği yüksek bir C18 kolon ile çalışmalar tekrarlanmıştır. Mobil faz olarak su (%0,1 formik asit):asetonitril (%0,1 formik asit) (h/h) kullanılmıştır. Başlangıç gradyan elüsyon koşulunda (55:45 → 10:90 5 dk; 10:90 → 55:45, 5 dk), 0,5 mL/dk akış hızına çıkıldığında üç maddenin piki ayrılmıştır. Ancak KPI ve KPIII pikleri birbirine yakın bulunmuş ve pitavastatinin alıkonma zamanı da KPI ve KPIII ile çakışmıştır. Başlangıç mobil faz bileşimi 65:35 olarak değiştirildiğinde pitavastatin için alıkonma zamanı azalmıştır ancak çakışmanın önüne geçilememiştir. Akış hızı 0,6 mL/dk'ya çıkarıldığında ayırımı bir iyileştirme

sağlanamamıştır. Akış hızı 0,5 mL/dk'da sabit tutularak 65:35 h/h başlangıç mobil faz bileşiminden 10:90 h/h bileşimine çıkış süresinin 5 dk'dan 7 dk'ya çıkarılması ile üç madde piki için istenen ayırım sağlanmıştır (Şekil 4.1.). Enjeksiyon hacmini artırdıkça pik alanı artmaktadır. Ancak numune hacmi dikkate alındığında 50 µL enjeksiyon hacmi yüksek bulunduğu için ve 10 µL enjeksiyon hacmi ile düşük konsantrasyonlarda pik alanı küçüleceğinden enjeksiyon hacminin 20 µL olarak belirlenmesine karar verilmiştir.

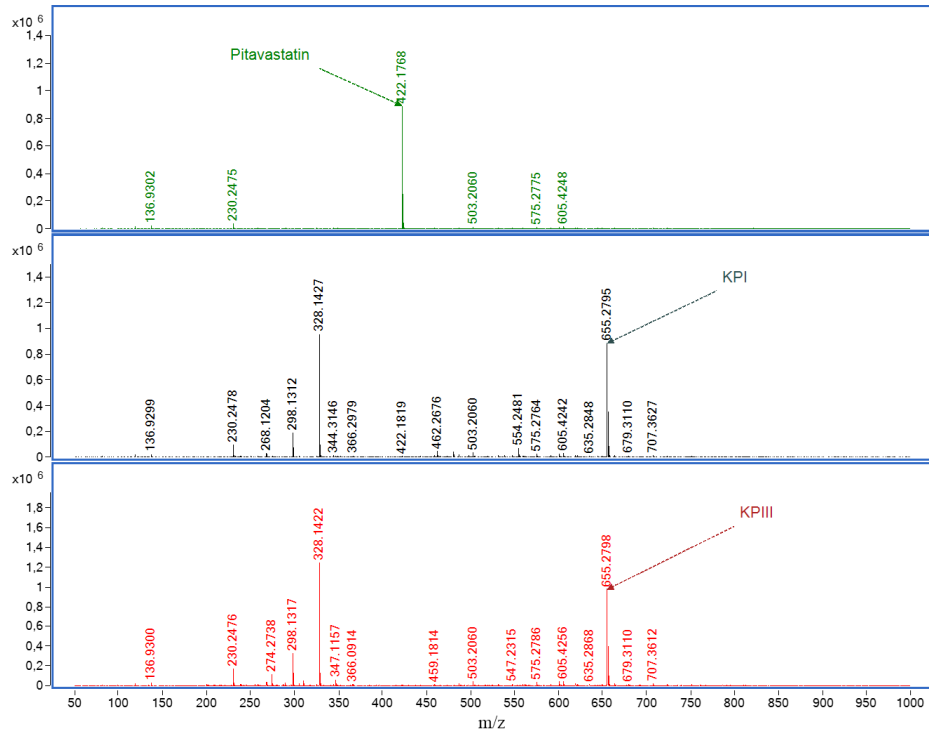
MS ünitesi koşulları olarak sinyal polaritesinin pozitif olduğu belirlenmiş ve Tablo 4.1'de verilen koşullarda her üç madde için kütle spekturumları (Şekil 4.2.) elde edilmiştir.

Tablo 4.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII'ün eş zamanlı analizinde kullanılan optimum LC-MS çalışma koşulları.

	LC	Koşullar	MS
Sabit faz	Restek Raptor© C18 (2,7 µm, 4,6 mm ID, 150 mm) kolon ve önkolon	Cihaz ünitesi	MS Q-TOF
Kolon sıcaklığı	60°C	İyon kaynağı	Dual Elektrosprey iyonizasyon (ESI)
Mobil faz A	% 0,1 HCOOH içeren su	Sınırlar (m/z)	50-1000
Mobil faz B	% 0,1 HCOOH içeren asetonitril	Gaz sıcaklığı	350°C
Gradyan elüsyon	(0-7. dk) % 65 A - % 35 B → % 10 A - % 90 B (7-10. dk) % 10 A - % 90 B → % 65 A - % 35 B (10-13.dk) % 65 A- %35 B	Gaz akışı	10 L/dk
Akış hızı	0,5 mL/dk	Püskürtme basıncı	45 psi
Otomatik örnek alma ünitesi	10°C	Sinyal polaritesi	Pozitif
Enjeksiyon hacmi	20 µL	m/z	422,2 (pitavastatin) 655,3 (KPI, KPIII)



Şekil 4.1. Pitavastatin (1 μ M) (A), KPI (1 μ M) ve KP III (1 μ M) (B) maddelerinin mobil faz içindeki çözeltisinin eş zamanlı analizine ait LC-MS kromatogramları.



Şekil 4.2. Pitavastatin (1 μ M) (A), KPI (1 μ M) ve KP III (1 μ M) (B) maddelerinin mobil faz içindeki çözeltisinin eş zamanlı analizine ait MS spektrumları.

4.1.2. Rifampisin Tayini İçin HPLC Yönteminin Optimizasyonu

Rifampisin HPLC analizinde DAD dedektörde en yüksek absorbansın görüldüğü dalga boyu 335 nm olarak bulunmuştur. Rifampisin için belirlenmiş optimum HPLC analiz koşulları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Rifampisin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.

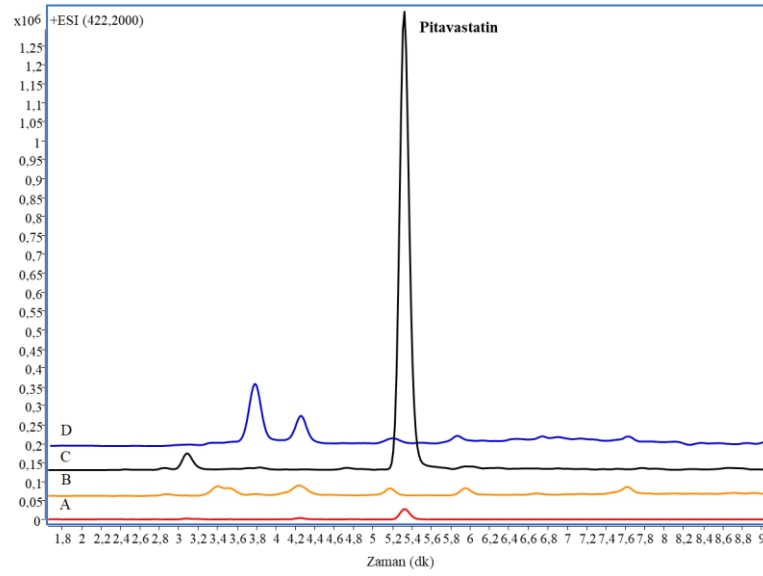
HPLC	Koşullar
Kolon	C18 (5 µm; 4,6 mm x 250 mm)
Mobil faz	55:45 (h/h) 0,05 M potasyum dihidrojen fosfat (pH:4,58):asetonitril
Akış hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Analiz süresi	7,5 dk
Alıkonma zamanı	5,5 dk
Dedektör	DAD
Dalga boyu	335nm

4.2. Analitik Yöntem Validasyonu

4.2.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII Tayini İçin LC-MS Yönteminin Validasyonu

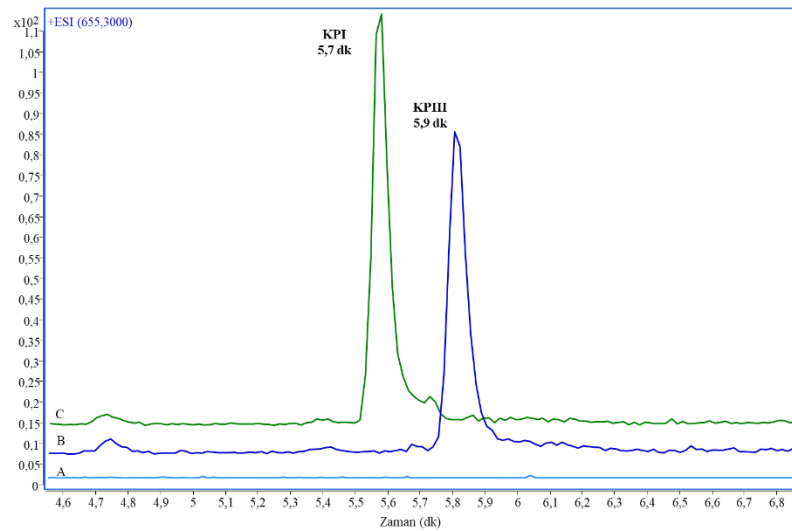
- Seçicilik (*Selectivity*)

Pitavastatin: İlaç içermeyen perfüzyon ortamının uygulandığı sıçanlardan toplanan perfüzet, karaciğer dokusu ve safra örneklerinden hareketle hazırlanan çözeltilerde pitavastatine ait m/z değerinde (422,2) gözlenen pikler en düşük kalibrasyon sınırında tayin edilen alanın %20’sinin altında olduğundan seçicilik sağlanmıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Boş perfüzet (A), boş karaciğer (B) ve boş safra (C) ve pitavastatin (0,025 μ M) varlığında elde edilen LC-MS kromatogramları.

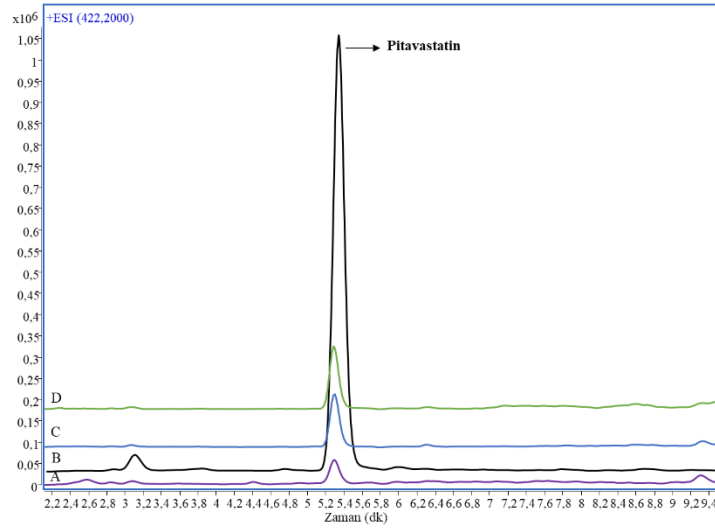
KPI, KPIII: Endojen maddeleri içermeyen boş perfüzyon ortamından hareketle hazırlanan çözeltide KPI ve KPIII'e ait m/z değerinde (655,3) pik gözlenmemesiyle seçicilik sağlanmıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Boş perfüzet ortamından hazırlanan çözeltinin (A), KPIII (0,1 μ M) (B), ve KPI (0,1 μ M) (C) içeren standartların enjeksiyonu ile elde edilen LC-MS kromatogramları.

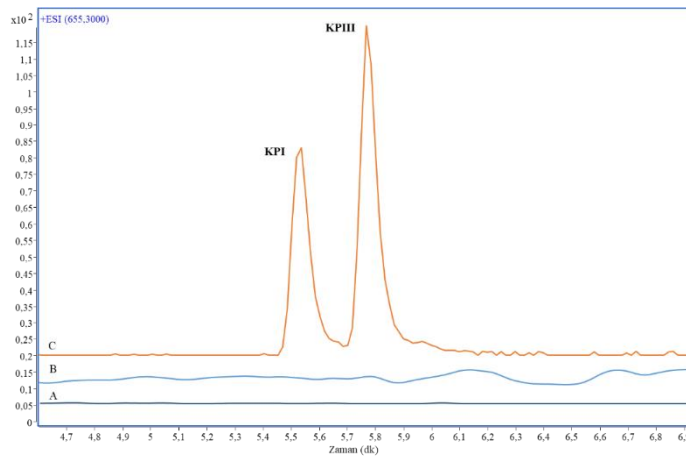
- **Özgüllük (Specificity)**

Pitavastatin: KPI (0,1 μ M), KPIII (0,1 μ M) ve rifampisin (10 μ M)'in pitavastatine ait m/z değerinde (422,2) bir pik vermemesi yöntemin özgül olduğunu göstermiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Boş perfüzyon ortamında rifampisin (10 μ M) (A), KPI (0,1 μ M) (B), KPIII (0,1 μ M) (C) ve pitavastatin (0,025 μ M) (D) varlığında elde edilen LC-MS kromatogramları.

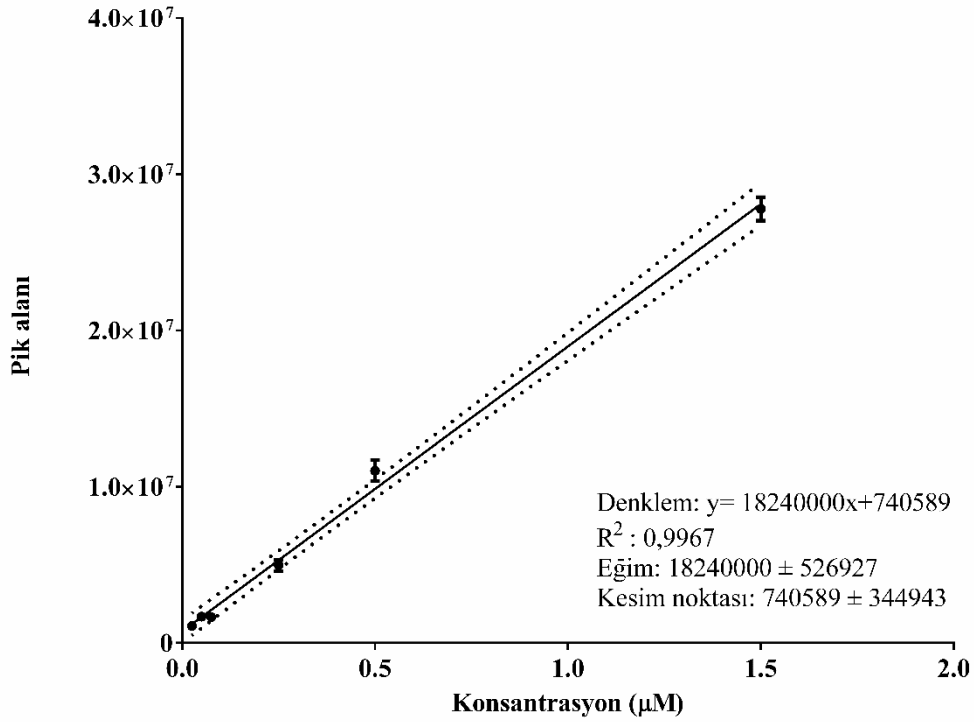
KPI, KPIII: Pitavastatin (1 μ M) ve rifampisin (10 μ M)'in KPI ve KPIII'e ait m/z değerinde (655,3) bir pik vermemesi yöntemin özgül olduğunu göstermiştir (Şekil 4.6.).



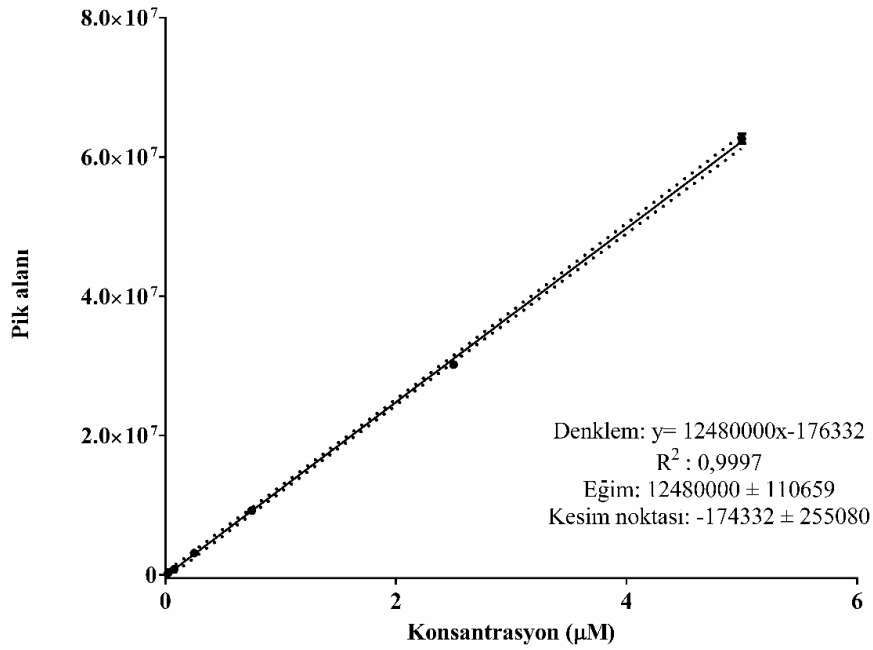
Şekil 4.6. Rifampisin (10 μ M) (A), pitavastatin (1 μ M) (B), ve KPI ve KPIII (0,25 μ M) (C) varlığında elde edilen LC-MS kromatogramları.

- **Kalibrasyon doğrusu ve sınırları (*Calibration curve and range*)**

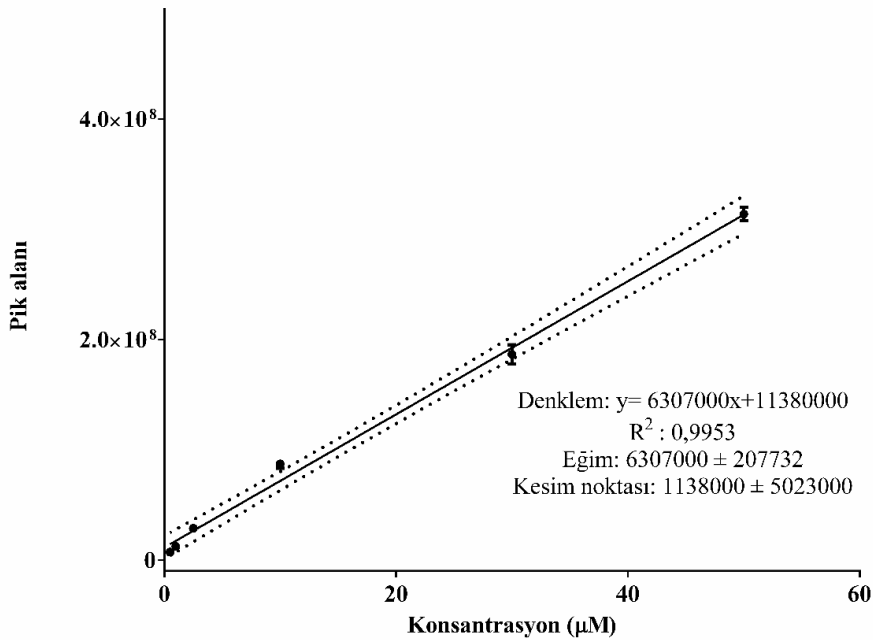
Pitavastatin: Pitavastatin'in perfüzyat (0,025-1,5 μM), karaciğer (0,025-5 μM) ve safra (0,5-50 μM) örneklerinden tayini için hazırlanan standart çözeltilerden hareketle kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri elde edilmiştir. Her üç ortam için pitavastatinin teorik konsantrasyonlarına karşı LC-MS analizinde gözlenen pik alanları değerlerinin doğrusal regresyon analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı doğrusal bir ilişki elde edilmiştir (Şekil 4.7.-Şekil 4.9.).



Şekil 4.7. Pitavastatinin perfüzyon ortamı kullanılarak hazırlanan standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri (Hata çubukları ortalama pik alanının standart hatasını, küçük noktalar ise kalibrasyon doğrusunun % 95 güven aralığını ifade etmektedir; ortalama \pm SS; n=6).

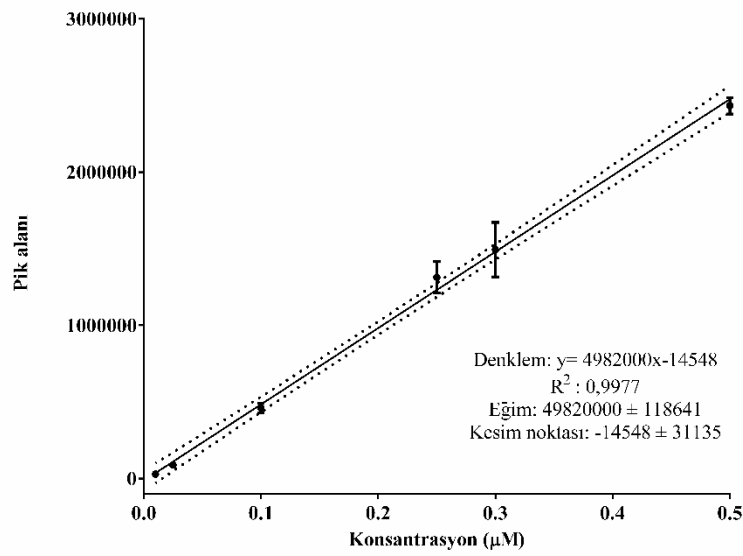


Şekil 4.8. Pitavastatinin karaciğer dokusu kullanarak hazırlanan standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri (Hata çubukları ortalama pik alanının standart hatasını, küçük noktalar ise kalibrasyon doğrusunun % 95 güven aralığını ifade etmektedir; ortalama \pm SS; n=6).

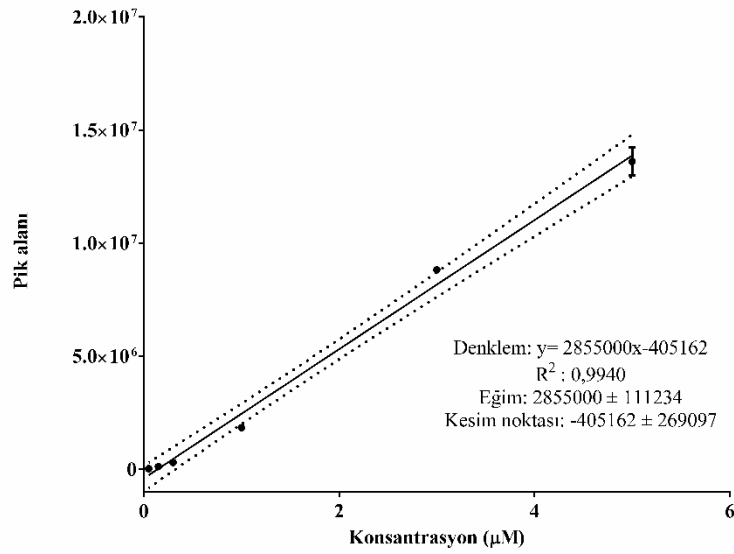


Şekil 4.9. Pitavastatinin safra kullanarak hazırlanan standart çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri (Hata çubukları ortalama pik alanının standart hatasını, küçük noktalar ise kalibrasyon doğrusunun % 95 güven aralığını ifade etmektedir; ortalama \pm SS; n=6).

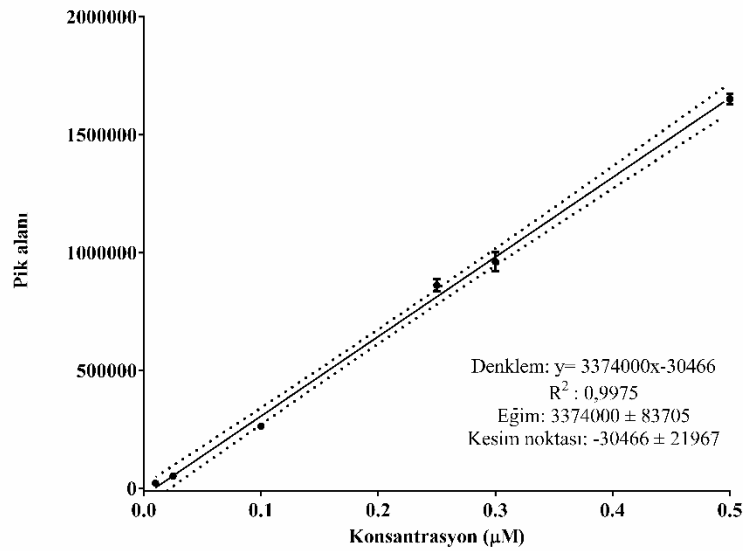
KPI, KPIII: KPI için karaciğer (0,01-0,5 μM) ve safra (0,05-5 μM) örneklerinden tayini için hazırlanan standart çözeltilerden bazal düzeyin çıkarılması ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri Şekil 4.10. ve Şekil 4.11’de verilmektedir. KPIII için de karaciğer (0,01-0,5 μM) ve safra (0,05-5 μM) örneklerinden tayini için aynı yöntem ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri Şekil 4.12. ve Şekil 4.13’te verilmektedir. Her iki madde için her iki ortamda istatistiksel olarak anlamlı doğrusal konsantrasyon-cevap ilişkisi elde edilmiştir.



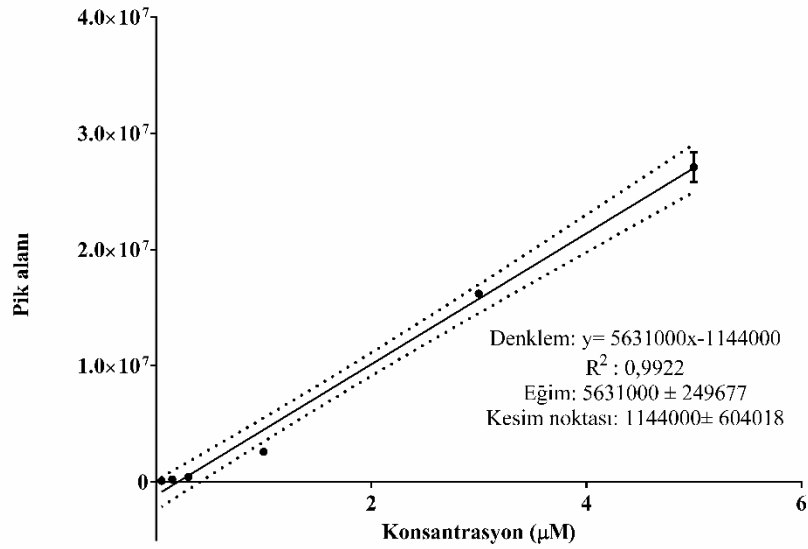
Şekil 4.10. Karaciğer dokusundan KPI analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri (Hata çubukları ortalama pik alanının standart hatasını, küçük noktalar ise kalibrasyon doğrusunun % 95 güven aralığını ifade etmektedir; ortalama \pm SS; n=6).



Şekil 4.11. Safradan KPI analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri (Hata çubukları ortalama pik alanının standart hatasını, küçük noktalar ise kalibrasyon doğrusunun % 95 güven aralığını ifade etmektedir; ortalama \pm SS; n=6).



Şekil 4.12. Karaciğer dokusundan KPIII analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri (Hata çubukları ortalama pik alanının standart hatasını, küçük noktalar ise **kalibrasyon** doğrusunun % 95 güven aralığını ifade etmektedir; ortalama \pm SS; n=6).



Şekil 4.13. Safradan KPIII analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri (Hata çubukları ortalama pik alanının standart hatasını, küçük noktalar ise kalibrasyon doğrusunun % 95 güven aralığını ifade etmektedir; ortalama \pm SS; n=6).

- **Analit taşınması (Carry-over)**

Pitavastatin: Boş perfüzet, karaciğer ve safranın pitavastatinin her bir ortamdaki yüksek kalibrasyon standardının analizinden sonra enjekte edilmesiyle elde edilen pik alanlarının her bir ortamdaki en düşük kalibrasyon standardının ($0,025 \mu\text{M}$) pik alanının %20'si altında kalması ile analit taşınması etkisi dışlanmıştır (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Pitavastatinin LC-MS analizinde analit taşınması etkisinin gösterimi (ortalama \pm SS; n=3).

Koşul: 10°C (6 sa)	Boş standart	Pik alanı oranı*(%)
Pitavastatin	Perfüzet	$5,30 \pm 2,70$
	Karaciğer	$2,84 \pm 0,82$
	Safra	$1,23 \pm 0,48$

* En düşük kalibrasyon standardının pik alanına göre oran

KPI ve KPIII: Endojen maddeleri içermeyen boş perfüzyon ortamının KPI ve KPIII'ün karaciğer ve safra ortamlarındaki yüksek kalibrasyon standartlarının analizi sonrası enjekte edilmesiyle herhangi bir pik dedekte edilememiştir. Bu durum analit taşınması oluşmadığını göstermektedir.

- **Matriks etkisi (*Matrix effect*)**

Pitavastatin: Farklı sıçanlardan (n=3) toplanan perfüzet, karaciğer ve safradan hareketle hazırlanan standartlar kullanılarak her bir ortamda düşük ve yüksek kalite kontrol örnekleri analiz edildiğinde ortalama bağıl hatanın ve varyasyon katsayısının %15'in altında bulunmasıyla doğruluk ve kesinlik koşulları sağlanmıştır (Tablo 4.4.). Biyolojik matriksler arasında bir varyasyon olmadığı gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Farklı kaynaklardan hazırlanan matriks içinde hazırlanan standart çözeltilere ait analiz sonuçları ile pitavastatinin LC-MS analizinde matriks etkisinin gösterimi (ortalama \pm SS; n=3).

	Teorik konsantrasyon (μM)	Tayin edilen konsantrasyon (μM)	OBH (%)	VK (%)
Perfüzet	0,050	0,050 \pm 0,006	0,15	12,81
	0,500	0,525 \pm 0,023	5,00	4,29
Karaciğer	0,075	0,066 \pm 0,009	11,43	12,99
	2,500	2,426 \pm 0,047	2,97	1,94
Safra	1,000	0,983 \pm 0,063	1,73	6,41
	30,000	29,469 \pm 0,980	1,77	3,32

KPI ve KPIII: Farklı sıçanlardan (n=3) toplanan karaciğer ve safradan hareketle hazırlanan standartlar kullanılarak her bir ortamda düşük ve yüksek kalite kontrol örnekleri analiz edildiğinde ortalama bağıl hatanın ve varyasyon katsayısının %15'in altında bulunmasıyla doğruluk ve kesinlik koşulları sağlanmıştır (Tablo 4.5.). Biyolojik matriksler arasında bir varyasyon olmadığı gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Farklı kaynaklardan hazırlanan matriks içinde hazırlanan standart çözeltilere ait analiz sonuçları ile KPI ve KPIII'ün LC-MS analizinde matriks etkisinin gösterimi (ortalama \pm SS; n=3).

		Teorik konsantrasyon (μM)	Tayin edilen konsantrasyon (μM)	OBH (%)	VK (%)
Karaciğer	KPI	0,025	0,024 \pm 0,002	5,83	9,57
		0,300	0,298 \pm 0,020	0,83	6,61
	KPIII	0,025	0,026 \pm 0,003	5,22	11,94
		0,300	0,296 \pm 0,013	1,42	4,56
Safra	KPI	0,150	0,139 \pm 0,021	7,66	14,96
		3,000	3,213 \pm 0,176	7,10	5,48
	KPIII	0,150	0,150 \pm 0,018	0,09	11,75
		3,000	3,060 \pm 0,150	2,01	4,91

- **Doğruluk, kesinlik ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik (*Accuracy, precision and reinjection reproducibility*)**

Pitavastatin: Kalite kontrol standartlarının gün içi, günler arası ve enjeksiyonlar arası analizleri sonuçları ile doğruluk ve kesinlik değerlendirmesi Tablo 4.6.'da verilmiştir. Ortalama bağıl hata ve varyasyon katsayısının en düşük kalite kontrol standartı için %20'nin altında, diğer noktalar için %15'in altında bulunmasıyla analitik yöntemin doğruluk ve kesinliği gösterilmiştir.

KPI ve KPIII: Kalite kontrol standartlarının gün içi, günler arası ve enjeksiyonlar arası analizleri sonuçları ile doğruluk ve kesinlik değerlendirmesi Tablo 4.7. ve Tablo 4.8.'de verilmiştir. Ortalama bağıl hata ve varyasyon katsayısının en düşük kalite kontrol standartları için %20'nin altında, diğer noktalar için %15'in altında bulunmasıyla yöntemin doğruluk ve kesinliği gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Pitavastatinin LC-MS analizinde kullanılan yönteminin perfüzat, karaciğer ve safra ortamlarında doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik değerlendirmesi (ortalama \pm SS; n=6).

		Teorik konsantrasyon (μM)	Tayin edilen konsantrasyon (μM)	OBH (%)	VK (%)
Perfüzat	Gün içi	0,025	0,022 \pm 0,001	13,03	6,56
		0,050	0,053 \pm 0,007	5,58	13,10
		0,250	0,238 \pm 0,017	4,85	6,96
		0,500	0,546 \pm 0,017	9,25	3,05
	Günler arası	0,025	0,021 \pm 0,002	15,93	7,34
		0,050	0,050 \pm 0,003	0,48	5,95
		0,250	0,230 \pm 0,004	8,16	1,88
		0,500	0,541 \pm 0,022	8,29	4,13
	Enjeksiyonlar arası	0,025	0,024 \pm 0,003	3,67	14,05
		0,050	0,044 \pm 0,006	12,78	13,55
		0,250	0,227 \pm 0,021	9,29	9,34
		0,500	0,531 \pm 0,015	6,21	2,85

Tablo 4.6. (Devam) Pitavastatinin LC-MS analizinde kullanılan yönteminin perfüzyon, karaciğer ve safra ortamlarında doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik değerlendirmesi (ortalama \pm SS; n=6).

		Teorik konsantrasyon (μM)	Tayin edilen konsantrasyon (μM)	OBH (%)	VK (%)
Karaciğer	Gün içi	0,025	0,024 \pm 0,001	3,39	3,50
		0,075	0,078 \pm 0,002	4,58	2,33
		0,75	0,732 \pm 0,016	2,46	2,17
		2,5	2,660 \pm 0,152	6,39	5,73
	Günler arası	0,025	0,024 \pm 0,001	2,19	2,52
		0,075	0,066 \pm 0,009	11,97	13,63
		0,75	0,694 \pm 0,050	7,52	7,20
		2,5	2,525 \pm 0,227	0,99	8,98
	Enjeksiyonlar arası	0,025	0,027 \pm 0,004	7,40	14,64
		0,075	0,067 \pm 0,009	11,30	12,84
		0,75	0,753 \pm 0,002	0,35	0,32
		2,5	2,378 \pm 0,028	4,88	1,19
Safra	Gün içi	0,500	0,530 \pm 0,015	5,95	2,88
		1,000	1,035 \pm 0,015	3,46	1,50
		10,000	10,662 \pm 0,786	6,62	7,37
		30,000	31,400 \pm 1,794	4,67	5,71
	Günler arası	0,500	0,527 \pm 0,016	5,33	2,95
		1,000	1,033 \pm 0,014	3,34	1,35
		10,000	10,865 \pm 0,613	8,66	5,64
		30,000	31,556 \pm 2,062	5,187	6,53
	Enjeksiyonlar arası	0,500	0,560 \pm 0,033	11,91	5,88
		1,000	1,001 \pm 0,039	0,11	3,89
		10,000	10,855 \pm 0,191	8,55	1,76
		30,000	31,423 \pm 0,988	4,74	3,14

Tablo 4.7. KPI'in LC-MS analizinde kullanılan yönteminin karaciğer ve safra ortamlarında doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik değerlendirmesi (ortalama \pm SS; n=6).

		Teorik konsantrasyon (μM)	Tayin edilen konsantrasyon (μM)	OBH (%)	VK (%)
Karaciğer	Gün içi	0,010	0,009 \pm 0,001	7,44	9,22
		0,025	0,024 \pm 0,004	4,18	15,55
		0,100	0,108 \pm 0,014	8,37	12,91
		0,300	0,330 \pm 0,037	10,01	11,24
	Günler arası	0,010	0,009 \pm 0,001	7,08	9,52
		0,025	0,025 \pm 0,001	1,57	4,62
		0,100	0,107 \pm 0,003	6,69	2,77
		0,300	0,337 \pm 0,020	12,49	5,91
	Enjeksiyonlar arası	0,010	0,009 \pm 0,001	7,08	9,52
		0,025	0,025 \pm 0,001	1,57	4,62
		0,100	0,107 \pm 0,003	6,69	2,77
		0,300	0,337 \pm 0,020	12,49	5,91
Safra	Gün içi	0,050	0,060 \pm 0,002	19,26	3,64
		0,150	0,134 \pm 0,007	10,70	4,97
		1,000	0,915 \pm 0,067	8,55	7,38
		3,000	3,249 \pm 0,034	8,30	1,03
	Günler arası	0,050	0,058 \pm 0,003	15,31	4,59
		0,150	0,144 \pm 0,019	4,23	13,05
		1,000	0,916 \pm 0,068	8,41	7,40
		3,000	3,127 \pm 0,188	4,23	6,01
	Enjeksiyonlar arası	0,050	0,056 \pm 0,003	11,560	5,57
		0,150	0,164 \pm 0,002	9,26	1,45
		1,000	0,988 \pm 0,007	1,20	0,69
		3,000	3,069 \pm 0,187	2,31	6,08

Tablo 4.8. KPIII'ün LC-MS analizinde kullanılan yönteminin karaciğer ve safra ortamlarında doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik değerlendirmesi (ortalama \pm SS; n=6).

		Teorik konsantrasyon (μM)	Tayin edilen konsantrasyon (μM)	OBH (%)	VK (%)
Karaciğer	Gün içi	0,010	0,010 \pm 0,000	0,17	4,81
		0,025	0,028 \pm 0,002	10,73	6,88
		0,100	0,096 \pm 0,005	4,05	5,43
		0,300	0,306 \pm 0,021	2,13	6,95
	Günler arası	0,010	0,009 \pm 0,002	11,41	19,90
		0,025	0,028 \pm 0,002	10,20	8,67
		0,100	0,097 \pm 0,005	3,22	4,94
		0,300	0,303 \pm 0,010	0,96	3,38
	Enjeksiyonlar arası	0,010	0,009 \pm 0,002	7,55	17,66
		0,025	0,026 \pm 0,002	2,52	6,52
		0,100	0,104 \pm 0,004	4,16	3,74
		0,300	0,345 \pm 0,019	15,05	5,64
Safra	Gün içi	0,050	0,053 \pm 0,004	5,90	8,02
		0,150	0,145 \pm 0,019	3,28	12,82
		1,000	0,924 \pm 0,023	7,64	2,52
		3,000	3,153 \pm 0,018	5,09	0,59
	Günler arası	0,050	0,050 \pm 0,010	0,08	19,13
		0,150	0,148 \pm 0,018	1,24	12,34
		1,000	0,937 \pm 0,048	6,30	5,15
		3,000	3,114 \pm 0,083	3,81	2,66
	Enjeksiyonlar arası	0,050	0,047 \pm 0,006	6,41	13,81
		0,150	0,152 \pm 0,014	1,44	9,51
		1,000	0,957 \pm 0,034	4,33	3,56
		3,000	3,084 \pm 0,175	2,79	5,68

- **Sistem uygunluk testleri (*System suitability tests*)**

Pitavastatin, KPI ve KPIII tayini için kullanılan LC-MS yönteminin sistem uygunluk testleri sonuçları Tablo 4.9.'da verilmiştir. Tüm maddeler için her ortamda N değerinin 2000'in üzerinde ve T değerinin 2'nin altında bulunmasıyla sistem uygunluk test kriterleri karşılanmıştır.

Tablo 4.9. LC-MS yönteminin sistem uygunluk testleri sonuçları.

Sistem uygunluk test parametresi	Ortam	Teorik tabaka sayısı (N)	Kuyruklanma faktörü (T)
Pitavastatin	Perfüzaz	34074	1,1
	Karaciğer	6119	1,3
	Safra	14727	1,4
KPI	Karaciğer	21134	1,4
	Safra	34661	1,3
KPIII	Karaciğer	3522	1,1
	Safra	50121	1,5

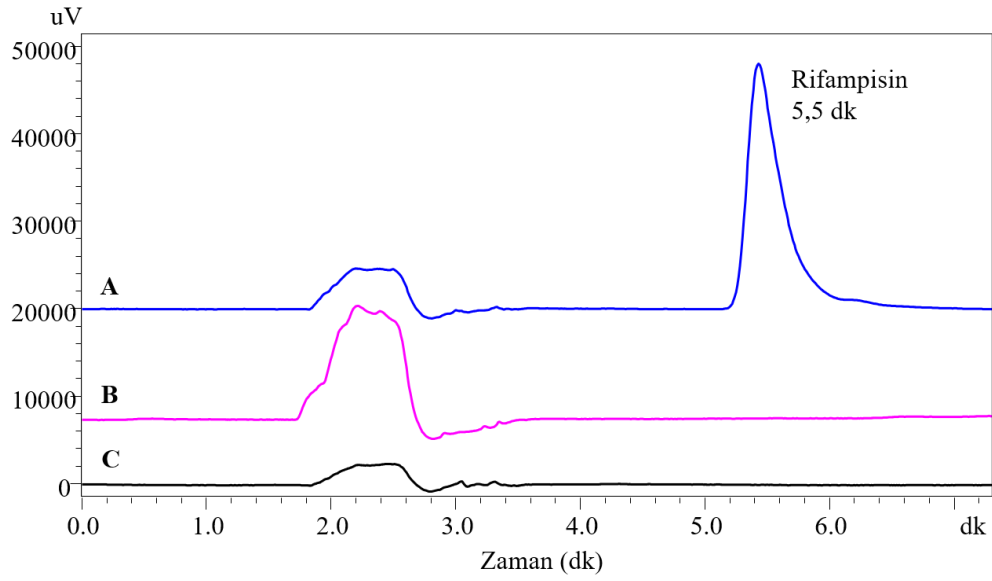
4.2.2. Rifampisin Tayini İçin HPLC Yönteminin Validasyonu

- Seçicilik (*Selectivity*)

İlaç içermeyen matrisin HPLC kolonuna enjeksiyonunu takiben, rifampisin alınkonma zamanında girişim yapan hiçbir pik gözlenmemesi yöntemin seçici olduğunu göstermiştir (Şekil 4.14.).

- Özgüllük (*Specificity*)

Pitavastatin (22,70 μM), KPI (13,74 μM) ve KPIII (13,74 μM) içeren çözeltinin analizi sonucunda rifampisin ile girişim yapan bir pik olmadığını tespit edilmesiyle tez çalışmaları kapsamında kullanılacak olan HPLC analiz yönteminin rifampisine özgül olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.14.).

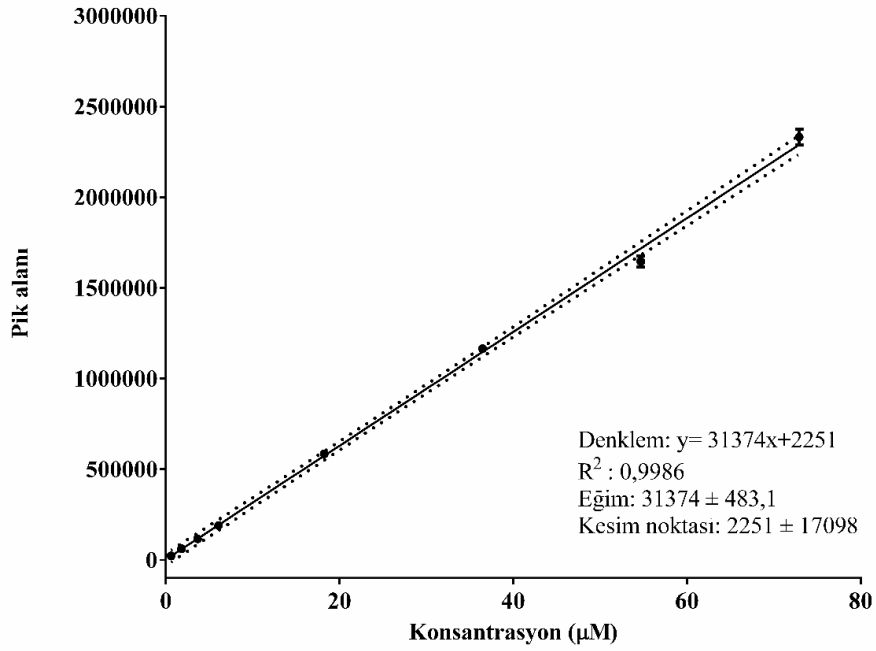


Şekil 4.14. A) Rifampisinin matris içindeki çözeltisi (18,23 μM), B) pitavastatin (22,70 μM), KPI (13,74 μM) ve KPIII (13,74 μM)'ün matris içindeki çözeltisi, C) boş matris enjeksiyonları ile elde edilen HPLC kromatogramları.

- **Kalibrasyon doğrusu ve sınırları (*Calibration curve and range*)**

Rifampisinin teorik konsantrasyonlarına karşı HPLC analizinde gözlenen pik alanları değerlerinin doğrusal regresyon analizi sonucu anlamlı, ve 0,61-72,91 μM aralığında doğrusal bir konsantrasyon-cevap ilişkisi elde edilmiştir.

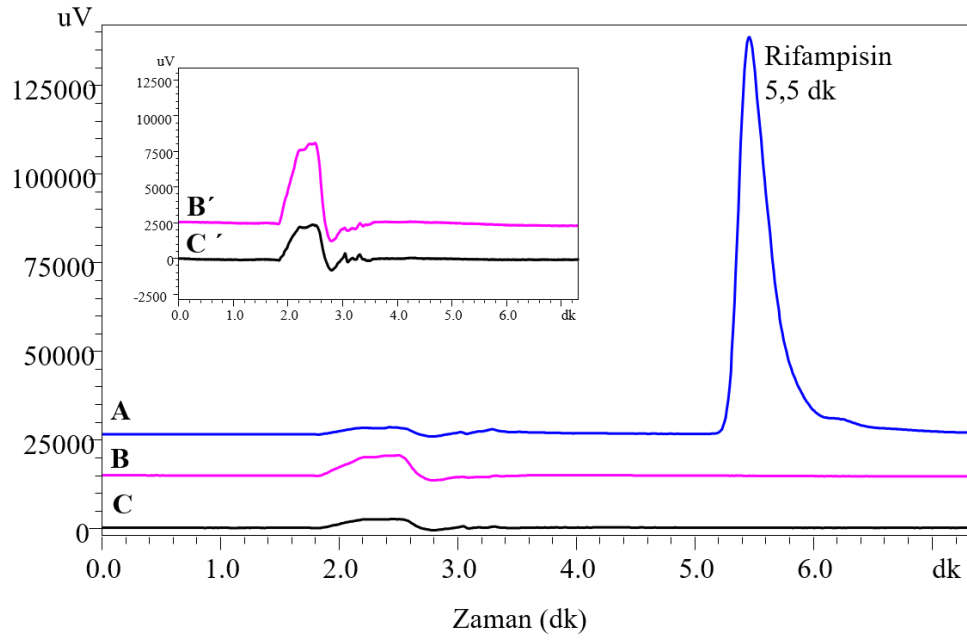
Elde edilen kalibrasyon doğrusundan hareketle her bir kalibrasyon standardı için geri kazanım hesaplanarak en düşük kalibrasyon noktasında teorik değerlerin %20'si içerisinde (%11,96) ve diğer noktalarda %15 içinde (%1,82-8,37) bulunmuştur. Kalibrasyon standartlarının %98'inin bu kriteri sağladığı gösterilerek kalibrasyon doğrusunun ICH M10 taslak kılavuzunda belirtilen kriteri (değerlerin en az %75'i) sağladığı gösterilmiştir. Kılavuz önerisi doğrultusunda uymayan tek nokta çıkarılarak regresyon analizi tekrarlanmış ve elde edilen kalibrasyon doğrusu, doğru denklemi, eğim, y-eksenini kesme noktası ve determinasyon katsayısı (R^2) ile ifade edilmiştir (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Rifampisin matriks içindeki kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemleri (Hata çubukları ortalama pik alanının standart hatasını, küçük noktalar ise kalibrasyon doğrusunun % 95 güven aralığını ifade etmektedir; ortalama \pm SS; n=6).

- **Analit taşınması (Carry-over)**

Boş matriksin rifampisin en yüksek kalibrasyon standardının ($72,91 \mu\text{M}$) analizi sonrası enjekte edilmesiyle elde edilen pik en düşük kalibrasyon standardının ($0,61 \mu\text{M}$) pik alanının %20'si altında olduğu için analit taşınması etkisi dışlanmıştır (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Rifampisinin matriks içindeki çözeltisinin ($72,91 \mu\text{M}$) analizi sonrası (A) boş matrikse ait (B) ve analit tayini öncesi enjekte edilmiş boş matrikse ait (C) HPLC kromatogramları (B' ve C' sırasıyla B ve C kromatogramlarının yakınlaştırılmış şekildedir).

- **Matriks etkisi (*Matrix effect*)**

Farklı sıçanların ($n=3$) karaciğerlerinden hazırlanan matriksler kullanılarak hazırlanan düşük ($1,82 \mu\text{M}$) ve yüksek ($54,68 \mu\text{M}$) kalite kontrol örnekleri analiz edildiğinde ortalama bağıl hatanın ve varyasyon katsayısının %15'in altında bulunmasıyla doğruluk ve kesinlik koşulları sağlanmıştır (Tablo 4.10.). Böylece matriks etkisi dışlanmıştır.

Tablo 4.10. Farklı kaynaklardan hazırlanan matriks içinde hazırlanan standart çözeltilere ait analiz sonuçları ile matriks etkisinin gösterimi (ortalama \pm SS; $n=3$).

Teorik konsantrasyon (μM)	Tayin edilen konsantrasyon (μM)	Ortalama bağıl hata	% Varyasyon Katsayısı
1,82	$1,81 \pm 0,11$	0,42	5,89
54,68	$54,72 \pm 0,75$	0,08	1,37

- **Doğruluk, kesinlik ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik (*Accuracy, precision and reinjection reproducibility*)**

Her bir kalite kontrol standardı için gün içi, günler arası ve enjeksiyonlar arası analizleri sonuçları ile doğruluk ve kesinlik değerlendirmesi Tablo 4.11’de verilmiştir. Ortalama bağıl hata ve varyasyon katsayısının en düşük kalite kontrol standardı (0,61 μM) için %20’nin altında, diğer noktalar için %15’in altında bulunmasıyla analitik yöntemin doğruluk ve kesinliği gösterilmiştir. Numune hazırlama protokolü ile ilgili kesinliğe ait veri geri kazanım başlığı altında ayrıca sunulmuştur.

Tablo 4.11. Rifampisin HPLC analizinde yöntemin doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası) ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik değerlendirmesi. (ortalama \pm SS; n=6).

	Teorik konsantrasyon (μM)	Tayin edilen konsantrasyon (μM)	% Ortalama bağıl hata	% Varyasyon katsayısı
Gün içi	0,61	0,64 \pm 0,06	4,37	9,19
	1,82	1,79 \pm 0,11	1,61	5,91
	18,23	19,10 \pm 0,22	4,76	1,16
	54,68	55,64 \pm 1,11	1,76	2,00
Günler arası	0,61	0,61 \pm 0,04	0,51	7,41
	1,82	1,83 \pm 0,04	0,60	2,32
	18,23	18,84 \pm 0,27	3,37	1,41
	54,68	54,24 \pm 1,67	0,81	3,08
Enjeksiyonlar arası	0,61	0,61 \pm 0,01	0,44	2,01
	1,82	1,70 \pm 0,02	6,81	1,22
	18,23	18,43 \pm 0,01	1,12	0,06
	54,68	54,68 \pm 0,08	0,00	0,15

- **Geri kazanım (*Recovery*)**

Farklı konsantrasyonlarda rifampisin geliştirilen numune hazırlama protokolü ile geri kazanımının belirlenmesi amacıyla numune hazırlama protokolünden önce bilinen miktarda karaciğer dokusuna eklenen rifampisine ait pik alanları kalibrasyon eğrisinde yerine konulmuştur. Eklenen ve bulunan rifampisin değerinden, numune protokolüne ait % geri kazanım hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.12.’de sunulmuştur.

Tablo 4.12. Rifampisin tayininde % geri kazanım (ortalama \pm SS; n=6).

Teorik konsantrasyon (μ M)	% Geri kazanım	% Varyasyon katsayısı
1,82	19,15 \pm 2,00	10,41
18,23	18,09 \pm 1,34	7,43
54,68	17,26 \pm 1,49	8,65

Geri kazanım değerlerinin tekrarlanabilir olması numune hazırlama protokolünün tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir ($p>0,05$). Geri kazanım değerlerinin düşük bulunması sonucu gerçek numune analizlerinde sistematik hatanın önlenmesi amacıyla numunelere eklenen standart çözeltilerden elde edilen kalibrasyon doğrusu kullanılarak analizlerin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

- **Sistem uygunluk testleri (*System suitability tests*)**

Rifampisin tayini için kullanılan HPLC yöntemi için sistem uygunluk testleri sonuçları Tablo 4.13.'te verilmiştir. k' değerinin 1,5-10 arasında, N değerinin 2000'in üzerinde ve T değerinin 2'nin altında bulunmasıyla sistem uygunluk test kriterleri karşılanmıştır.

Tablo 4.13. Rifampisinin analizinde kullanılan HPLC yönteminin sistem uygunluk testleri sonuçları.

Sistem uygunluk test parametresi	
Kapasite faktörü (k')	2,10
Teorik tabaka sayısı (N)	2234,00
Kuyruklanma faktörü (T)	1,74

4.3. *In situ* Sıçan Karaciğer Perfüzyonu

In situ karaciğer perfüzyonu çalışmaları toplam 54 sıçan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Perfüzyon sırasında sızıntı görülen sıçanlar çalışmadan çıkarılmıştır. Ayrıca yeterli safranın toplanamadığı sıçanlarda karaciğer ve safra analizlerinin sonuçları veri setine dahil edilmemiştir.

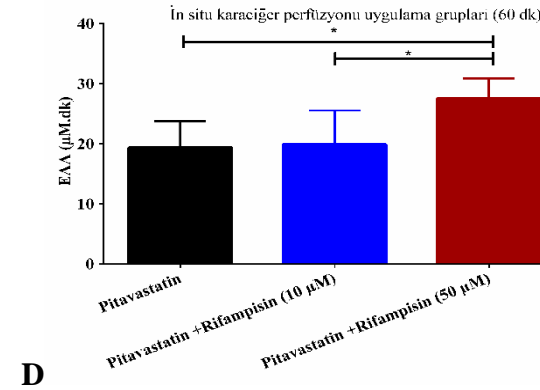
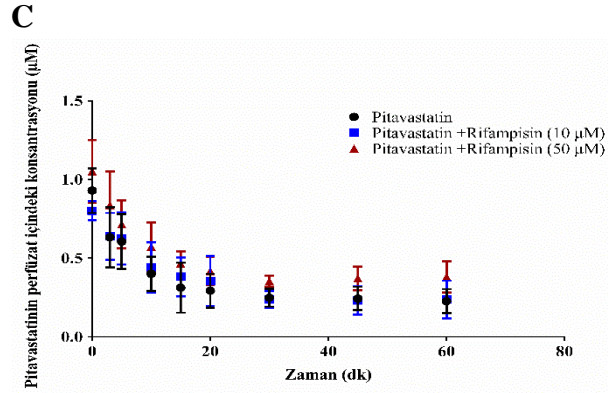
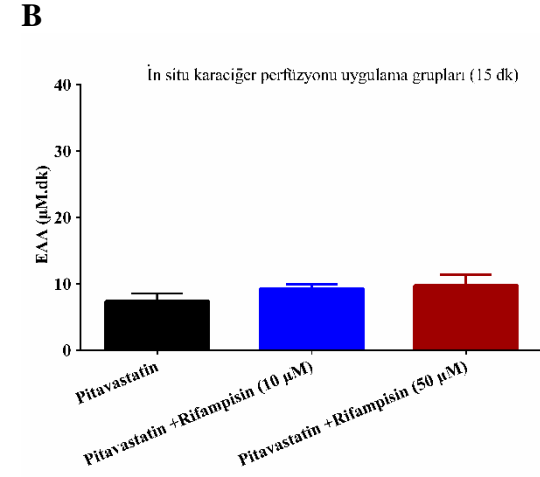
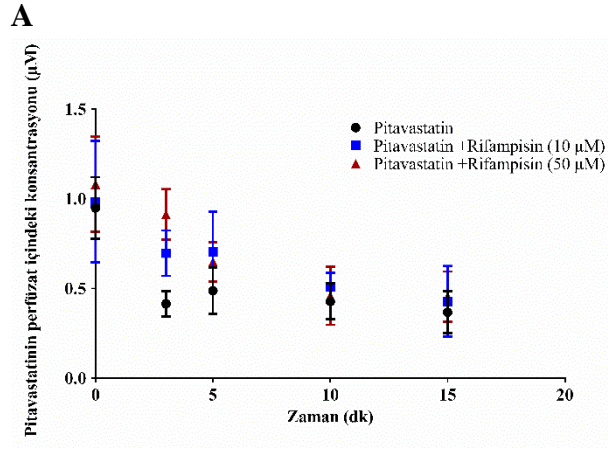
Sistemde perfüzyon düzeneğine spesifik olmayan bağlanma değerlendirildiğinde sıçan olmadan gerçekleştirilen 60 dk akış sonrası pitavastatin için

geri kazanım %109,22±2,55, rifampisin için %94,12±1,16 KPI ve KPII için sırasıyla %100,52±3,37 ve %93,96±8,34 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar çalışmada kullanılan maddelerin perfüzyon sistemine bağlanmadığının bir göstergesi olarak alınmıştır.

4.3.1. Pitavastatin

Pitavastatinin perfüzyat içindeki konsantrasyonunun zamana karşı değişimini gösteren profiller ve herbir profil için hesaplanan EAA_{0-60} değerleri Şekil 4.17.'de verilmiştir. Profiller incelendiğinde pitavastatinin perfüzyat içindeki konsantrasyonunun hem kontrol grubunda hem de inhibitör varlığında (10 ve 50 μ M rifampisin) ilk 15 dk'da hızlı bir düşüş gösterdiği ve 60.dk'ya kadar ise eliminasyon hızının daha düşük seyrettiği görülmüştür.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 50 μ M rifampisin varlığında EAA değerinde 1.4 katlık yükselme ile pitavastatinin perfüzyat düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış elde edilmiştir ($p<0,05$). 10 μ M rifampisinin pitavastatinin perfüzyat düzeyi üzerinde herhangi bir anlamlı etkisi bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.17.).

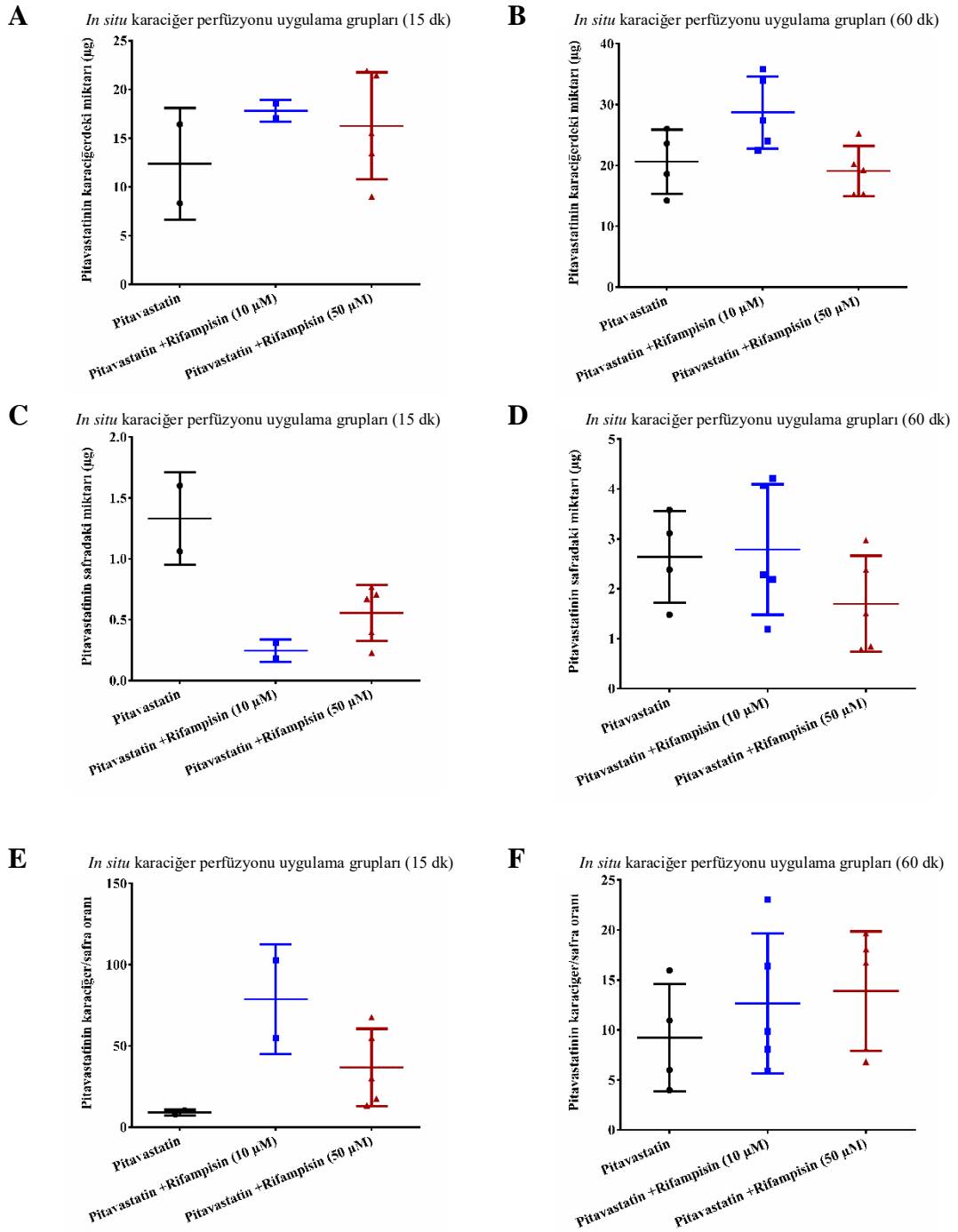


Şekil 4.17. Perfüizat örneklerinde 15 dk (A, B) ve 60 dk (C, D) perfüzyon sonrası pitavastatine ait konsantrasyon-zaman profilleri ve EAA değerleri (ortalama \pm SS; n=2-6; * p<0,05).

Perfüzyon sonunda (15 veya 60 dk) karaciğer dokusunda kalan ve safraya atılan kümülatif pitavastatin miktarı ve karaciğer/safra oranları hesaplanmıştır (Şekil 4.18.). Tüm değerler ayrı ayrı dikkate alındığında her iki perfüzyon zamanında ve her iki inhibitör konsantrasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

10 μ M rifampisinin perfüzyon, karaciğer ve safra kompartmanlarındaki pitavastatin miktarı üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmaması nedeniyle modelden bağımsız yöntem ve mekanistik modelleme yöntemleri ile farmakokinetik parametrelerin hesabında özellikle karaciğer ve safra kompartmanları için veri zenginleştirilmesi amacıyla 10 μ M rifampisin uygulanan grup kontrol grubu içerisine dahil edilmiştir.

Modelden bağımsız yöntemle hesaplanan farmakokinetik parametreler Tablo 4.14.'te verilmiştir. 15 dk perfüzyon sonunda kontrol ve inhibisyon grubu arasında hiçbir parametre için anlamlı fark bulunmazken, 60 dk perfüzyon sonunda kontrol grubuna göre EAA_{0-t} , $F_{\text{perfüzyon}}$ parametrelerinde anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). 60 dk perfüzyon sonucu hesaplanan CL_H ve CL_{safra} parametreleri için kontrol grubu ile inhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. Pitavastatinin karaciğer örneklerinde 15 dk (A) ve 60 dk (B) perfüzyon sonrası tayin edilen miktarının, safra örneklerinde 15 dk (C) ve 60 dk (D) perfüzyon sonrası tayin edilen miktarına oranları E:15 dk ve F: 60 dk için karaciğer/safra oranlarını göstermektedir (ortalama \pm SS; n=2-6; tüm veri noktaları gösterilmektedir).

Tablo 4.14. Pitavastatin karaciğerdeki dispozisyonuna ilişkin modelden bağımsız yöntemle hesaplanan farmakokinetik parametreler (ortalama \pm SS, n*).

	Kontrol grubu		İnhibisyon grubu**	
	15 dk	60 dk	15 dk	60 dk
EAA _{0-t} (μ M.dk)	8,58 \pm 1,28	19,60 \pm 4,74	9,73 \pm 1,65	27,57 \pm 3,28***
F _{perfüzet} (%)	54,21 \pm 34,81	32,68 \pm 15,60	49,76 \pm 14,58	36,71 \pm 12,27
F _{karaciğer} (%)	29,73 \pm 12,04	56,20 \pm 22,90	32,48 \pm 21,69	31,78 \pm 2,94***
F _{safra} (%)	1,38 \pm 1,06	6,59 \pm 2,85	1,02 \pm 0,41	2,78 \pm 1,46***
Karaciğer/Safra	43,93 \pm 44,77	11,12 \pm 6,22	36,80 \pm 23,73	13,88 \pm 5,98
CL _H (mL/dk)	6,04 \pm 1,37		6,00 \pm 1,77	
F _H	0,60 \pm 0,09		0,60 \pm 0,12	
CL _{safra} (mL/dk)	0,34 \pm 0,16		0,15 \pm 0,08***	

*15 dk perfüzyon gruplarında kontrol grubu (perfüzet n=8, karaciğer ve safra n=4), inhibisyon grubu (perfüzet n=6, karaciğer ve safra n=5); 60 dk perfüzyon gruplarında kontrol grubu (perfüzet n=11, karaciğer ve safra n=9), inhibisyon grubu (perfüzet n=6, karaciğer ve safra n=5)., **50 μ M rifampisin ile inhibisyon varlığında, ***Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$).

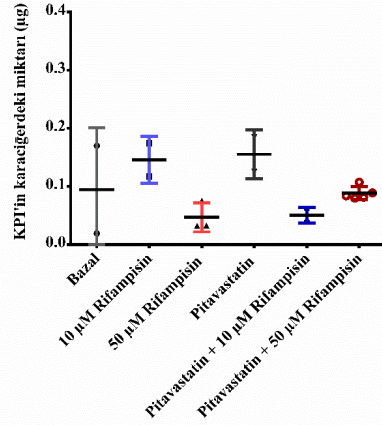
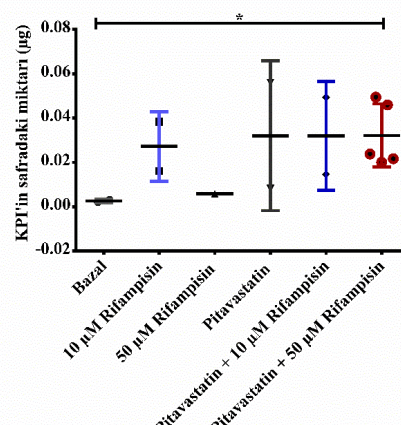
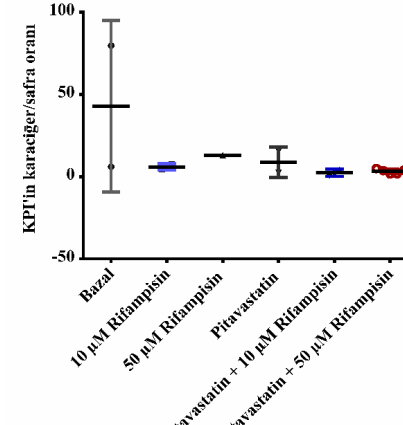
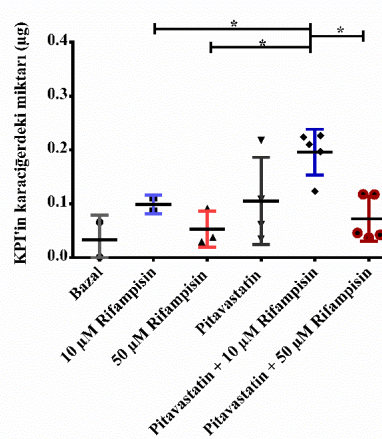
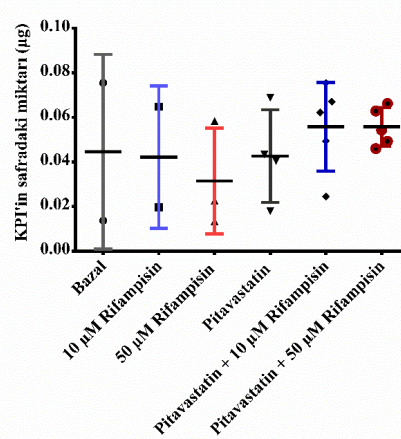
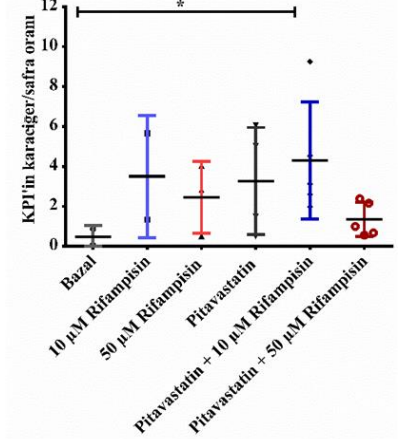
4.3.2. Koproporfirin I/III

KPI ve KPIII sadece karaciğer ve safra kompartmanlarından tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar sıçan karaciğer ve safra örneklerindeki KPIII miktarının KPI miktarından daha yüksek olduğunu göstermiştir.

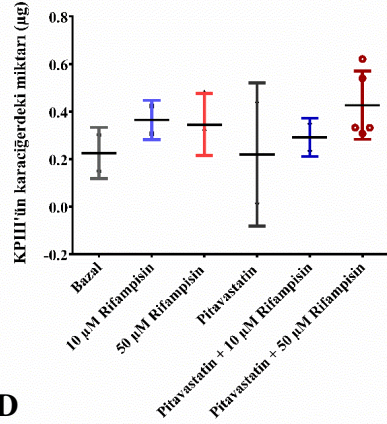
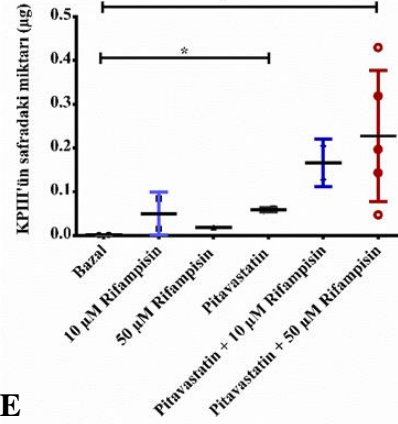
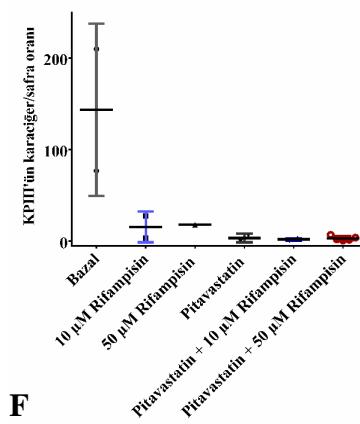
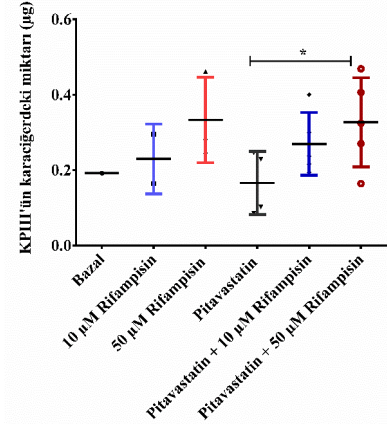
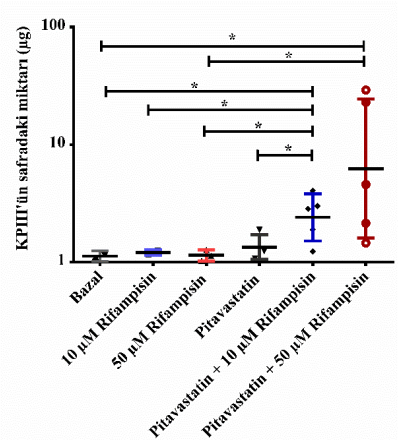
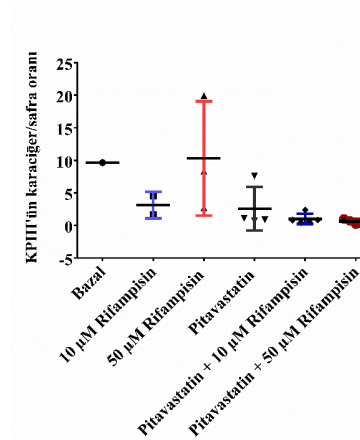
KPI'in karaciğerdeki miktarında (Şekil 4.19.) 15 dk perfüzyon sonunda gruplar arasında anlamlı bir değişme olmazken, 60 dk perfüzyon sonunda en yüksek KPI miktarı pitavastatin+10 μ M rifampisin uygulama grubunda kaydedilmiştir. Bu grupla sadece inhibisyon uygulanan gruplar ve pitavastatin+50 μ M rifampisin uygulama gruplarına göre anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). Safra ile atılan KPI miktarı için yalnızca 15 dk sonunda pitavastatin+50 μ M rifampisin uygulama grubu bazal KPI seviyesinde anlamlı artışa sebep olmuştur ($p<0,05$). Ancak her bir sıçan için karaciğer miktarı ve safra miktarı oranlandığında sadece pitavastatin+10 μ M rifampisin uygulamasının 60 dk perfüzyon sonunda bazal değere göre anlamlı fark oluşturduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

KPIII dağılımı değerlendirildiğinde (Şekil 4.20.) 15 dk perfüzyon sonunda karaciğer miktarı yönünden gruplar arasında anlamlı bir değişme olmazken, 60 dk

perfüzyon sonunda pitavastatin ile pitavastatin+50 µM rifampisin uygulama grubu arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 50 µM rifampisin uygulaması ile artan KPIII karaciğer miktarlarının yanında safra miktarında da artış olması karaciğer/safra oranında değişiklik oluşmamasına sebep olmuştur ($p>0,05$).

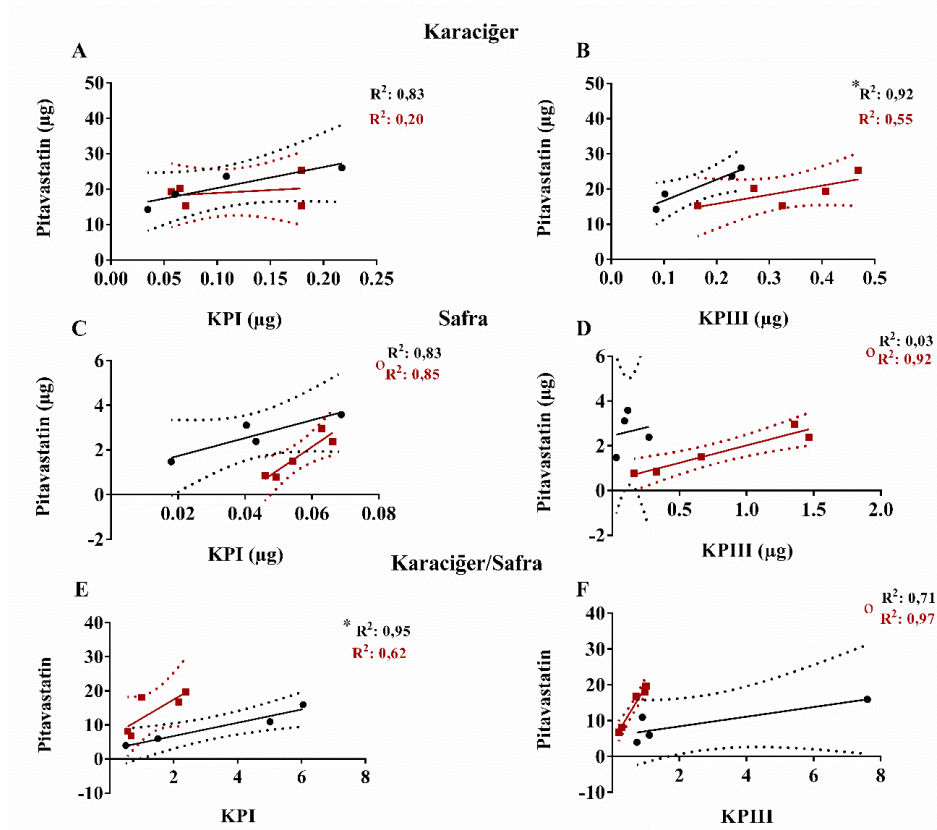
A*In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (15 dk)**B***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (15 dk)**C***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (15 dk)**D***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (60 dk)**E***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (60 dk)**F***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (60 dk)

Şekil 4.19. 15 dk ve 60 dk perfüzyon sonrasında KPI'in karaciğer (A, D), ve safra örneklerindeki (B, E) miktarları ile karaciğer/safra oranları (C, F) (ortalama ± SS; n=2-6; tüm veri noktaları gösterilmektedir; * p<0,05).

A*In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (15 dk)**B***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (15 dk)**C***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (15 dk)**D***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (60 dk)**E***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (60 dk)**F***In situ* karaciğer perfüzyon uygulama grupları (60 dk)

Şekil 4.20. 15 dk ve 60 dk perfüzyon sonrasında KPIII'ün karaciğer (A, D), ve safra örneklerindeki (B, E) miktarları ile karaciğer/safra oranları (C, F) (ortalama ± SS; n=1-6; tüm veri noktaları gösterilmektedir; * p<0,05).

Çoklu doğrusal regresyon analizleri ile pitavastatin ile KPI veya KPIII'ün karaciğer ve safra düzeyleri arasındaki ilişki incelenmiştir (Şekil 4.21.). 15 dk örneklerinde KPI ve KPIII düzeylerinin varyasyonu oldukça yüksek olduğu için sonuçlar yanıltıcı olabilmektedir. Bu nedenle karaciğer ve safra düzeyleri arasındaki ilişki sadece 60 dk perfüzyon sonucu elde edilen bulgular üzerinden değerlendirilmiştir. Kontrol koşulunda pitavastatin ve KPIII'ün karaciğer miktarları arasında ve pitavastatin ile KPI'in karaciğer/safra oranları arasında anlamlı doğrusal bir ilişki bulunurken, inhibisyon koşullarında KPI için safra miktarı, KPIII için ise safra ve karaciğer/safra oranı değerleri açısından pitavastatin ile anlamlı korelasyon bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.21. 60 dk'lık perfüzyon sonrasında inhibitor ($50 \mu\text{M}$ rifampisin) varlığında ve yokluğunda KPI ile pitavastatin arasındaki (A, C, D) ve KPIII ile pitavastatin arasındaki (B, D, F) karaciğerdeki miktar, safradaki miktar ve karaciğer/safra oranı yönünden korelasyonların gösterimi (Düz çizgi, doğrusal regresyon doğrusunu, kesikli çizgi 95% güven aralığını, * ve ° sırasıyla kontrol ve inhibisyon koşullarında doğru eğiminin istatistiksel olarak sıfırdan farklı olduğunu ifade etmektedir ($n=4-5$; $p < 0,05$)).

4.3.3. Rifampisin

Rifampisinin karaciğer dokusundaki konsantrasyonu inhibisyon derecesinin değerlendirilmesi yönünden önem taşımaktadır. Pitavastatin varlığında ve yokluğunda her iki uygulama konsantrasyonunda (10 ve 50 μM) ve perfüzyon süresinde (15 ve 60 dk) rifampisin konsantrasyonu tayin edilerek Tablo 4.15.'te verilmiştir.

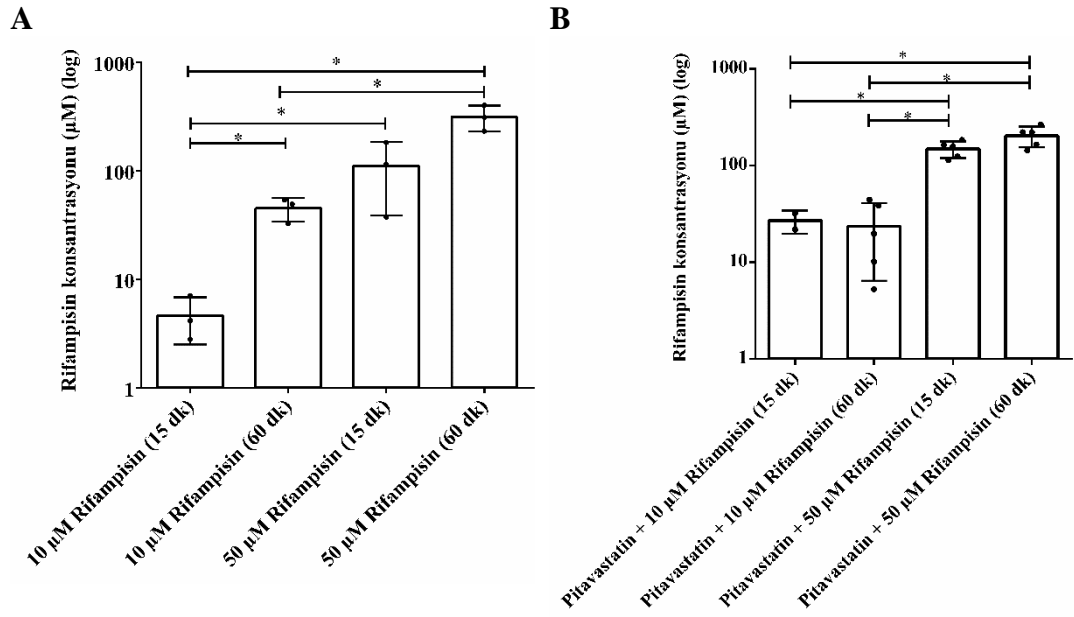
Tablo 4.15. Sıçan karaciğer dokusundan tayin edilen rifampisin konsantrasyonu (ortalama \pm SS; n=2-6).

Perfüzyon Uygulama Grupları	Rifampisin konsantrasyonu (μM)	
	15 dk	60 dk
10 μM Rifampisin	4,66 \pm 2,15	45,10 \pm 11,15
50 μM Rifampisin	111,2 \pm 72,36	313,4 \pm 84,43
Pitavastatin + 10 μM Rifampisin	26,89 \pm 7,26	23,57 \pm 17,17
Pitavastatin + 50 μM Rifampisin	148,3 \pm 28,82	202,6 \pm 48,55

Konsantrasyon değerlerine logaritmik dönüşümden sonra Shapiro-Wilk normalite testi uygulanmıştır ve verilerin normal dağılıma uyduğu gösterilmiştir ($p > 0,05$).

Sadece 15 dk perfüzyon sonrasında 10 μM rifampisin ve pitavastatin + 10 μM rifampisin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Diğer hiçbir koşulda pitavastatin varlığı rifampisinin karaciğer konsantrasyonu üzerinde etkili olmamıştır ($p > 0,05$).

Sonuçlar daha sonra kendi içinde karşılaştırılmıştır (Şekil 4.22.). Rifampisin yüksek konsantrasyonda (50 μM) uygulandığında her iki perfüzyon süresi için düşük konsantrasyon uygulamasına göre karaciğerdeki rifampisin konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Pitavastatin varlığında ve yokluğunda, yüksek konsantrasyonda rifampisin uygulandığında 15 dk ve 60 dk arasında anlamlı bir fark bulunmazken, pitavastatin varlığında düşük konsantrasyonda rifampisin uygulandığında sadece rifampisin uygulanan gruplara (15 dk ve 60 dk) göre anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.22. Sadece rifampisin uygulanan (A) ve pitavastatin ile birlikte rifampisin uygulanan (B) sıçanların karaciğerinde tayin edilen rifampisin konsantrasyonu (ortalama \pm SS; n=2-5; tüm veri noktaları gösterilmektedir, y ekseninde logaritmik skala kullanılmıştır, * p<0,05).

4.4. Mekanistik Model Geliştirme ve Simülasyon Çalışmaları

4.4.1. Ön Modelleme Çalışmaları

Literatürde yer alan farklı CL_{aktif} ve CL_{safra} değerlerine dayanarak 4 farklı senaryoda tek alt kompartman ve çoklu alt kompartman modelleri için (Bkz. 3.8.1. Mekanistik Model Tasarımı) simülasyon çalışmaları yapılmıştır.

Perfüzat kompartmanındaki pitavastatin miktarına ilişkin kestirim 1 ve 2 numaralı senaryolar (CL_{aktif} : 171,36 mL/dk) izlendiğinde gözlem değerlerinden daha yüksek (Şekil 4.23.-4.24.), 3 ve 4 numaralı senaryolar (CL_{aktif} : 1098 mL/dk) izlendiğinde ise gözlem değerlerinden daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.25.-4.26.). Bu durum literatürden alınan her iki CL_{aktif} referans değerleri kullanıldığında modelin verilere uymadığına ve pitavastatin için CL_{aktif} değerinin literatürde verilen değerler arasında olduğuna işaret etmektedir. Tek alt kompartman ve çoklu alt kompartman modellerinin perfüzat kestirimleri yakın bulunurken en düşük SSR değeri 2 numaralı senaryonun tek kompartman modelinde uygulanması ile elde edilmiştir (Tablo 4.16.).

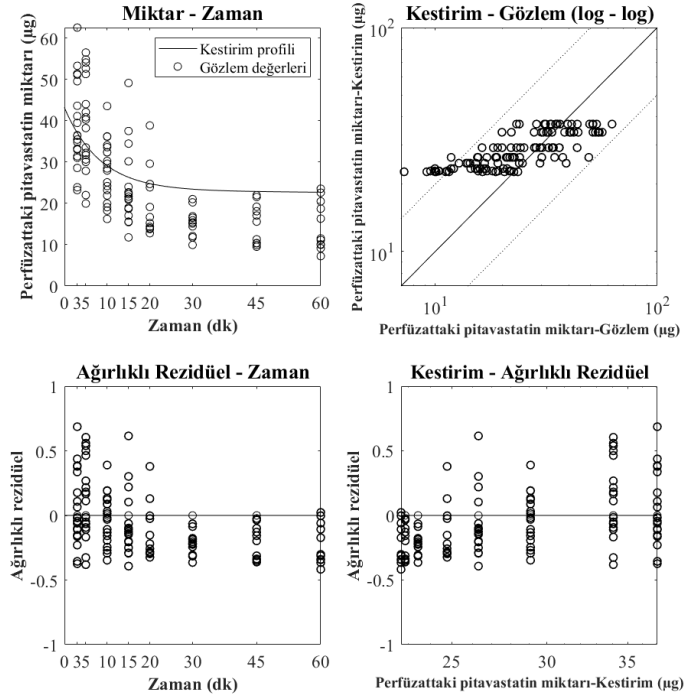
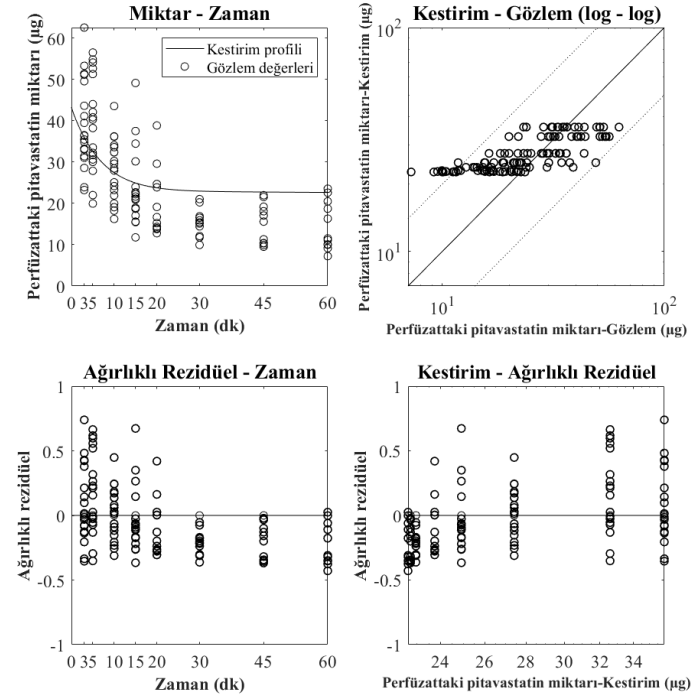
Karaciğer simülasyon eğrileri ve kontrol grafikleri değerlendirildiğinde (Şekil 4.27.- 4.30.) 1 ve 2 numaralı senaryoda 15.dk'da karaciğerdeki pitavastatin miktarı kestirimleri gözlem verilerini karşılamaktadır (Şekil 4.27.-4.28.). Ancak 60. dk için 1 ve 4 nolu senaryo ile en düşük rezidüel değerler elde edilmiştir (Şekil 4.30.). Bu durumun sebebi karaciğer kompartmanında pitavastatin dispozisyonunda hem CL_{aktif} hem de CL_{safra} parametrelerinin rol almasıdır. Tablo 4.16.'da görüldüğü üzere çoklu alt kompartman modeli tek alt kompartman modeline göre karaciğer kestirimleri için bir üstünlük sağlamamıştır. Karaciğer kompartmanı için en düşük SSR değeri ile en iyi kestirim 1. senaryoda tek kompartman modeli ile elde edilmiştir (Şekil 4.27., Tablo 4.16.).

Safra kompartmanındaki pitavastatin miktarı 1 ve 3 numaralı senaryolar (CL_{safra} : 0,074 mL/dk) izlendiğinde gözlem değerlerinden daha düşük (Şekil 4.31., Şekil 4.33.), 2 ve 4 numaralı senaryolar (CL_{safra} : 1,365 mL/dk) izlendiğinde ise gözlem değerlerinden daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.32., Şekil 4.34.). Ancak SSR değerleri 1 ve 3 numaralı senaryolarda diğer senaryolardan daha düşüktür. Bu durum modeli tanımlayacak CL_{safra} değerinin literatürden alınan değerler arasında ve daha düşük olan değere yakın olduğunu göstermektedir. 1. Senaryoda tek ve çoklu alt kompartman modelleri en düşük SSR ile en iyi kestirim sonuçlarını vermiştir (Tablo 4.16.). Çoklu alt kompartman modeli tek alt kompartman modeline bir üstünlük sağlamamıştır (Tablo 4.16.).

Modelin tüm kompartmanlar için eş zamanlı simülasyonunu takiben hesaplanan toplam SSR değerleri (Tablo 4.16.) tek kompartman modeli için tüm senaryolarda çoklu kompartman modeline göre daha düşük bulunmuştur. Böylece tek alt kompartman modelinin verilere daha iyi uyduğu gösterilmiştir. Karaciğer kompartmanının beş alt kompartmanda ifadesi pitavastatinin karaciğer dispozisyonunun mekanistik olarak incelenmesine bir katkı sağlamamıştır. Ön modelleme çalışmaları sonucunda mekanistik 3 kompartman modelinde karaciğer tek alt kompartman modelinin uygulanmasına, beş alt kompartman modelinin elenmesine, modelin girdi parametrelerine karşı duyarlılık düzeylerinin tespit edilmesine ve duyarlılığı en yüksek parametreler için veri analizi ile model iyileştirme çalışmalarının uygulanmasına karar verilmiştir.

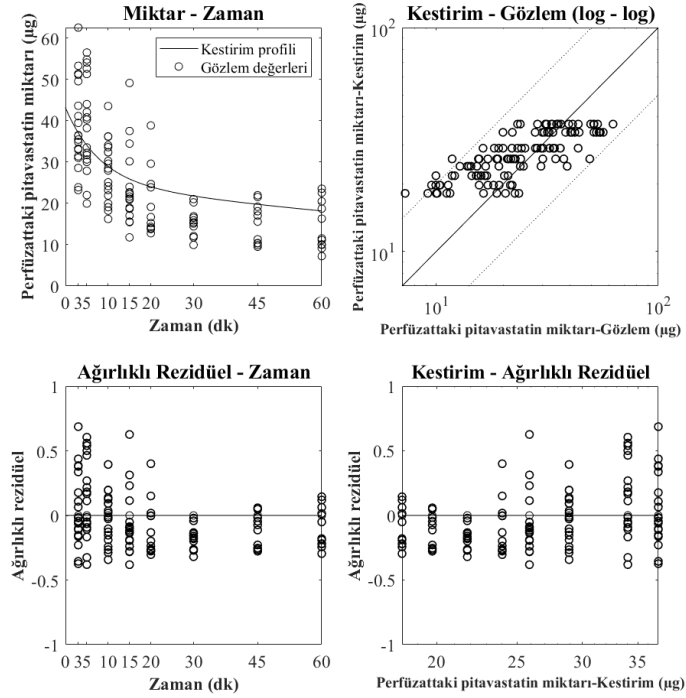
Tablo 4.16. Modellerin rezidüel kareler toplamı (SSR) ile değerlendirilmesi.

	1. Senaryo		2. Senaryo		3. Senaryo		4. Senaryo	
$CL_{pasif}(mL/dk)$	15,696							
$CL_{aktif}(mL/dk)$	171,36				1098			
$CL_{safra}(mL/dk)$	0,074		1,365		0,074		1,365	
Alt kompartman sayısı	1	5	1	5	1	5	1	5
SSR (x 10⁴)								
<i>Perfüzate</i>	1,0906	1,1008	0,9532	0,9603	1,6008	2,0810	1,7017	2,1898
<i>Karaciğer</i>	0,0691	0,0715	0,1454	0,1464	0,2068	0,2527	0,1033	0,1328
<i>Safra</i>	0,0049	0,0049	0,0579	0,0643	0,0325	0,0304	0,1969	0,2236
Toplam SSR	1,1646	1,1772	1,1565	1,1710	1,8108	2,3367	2,0019	2,5462

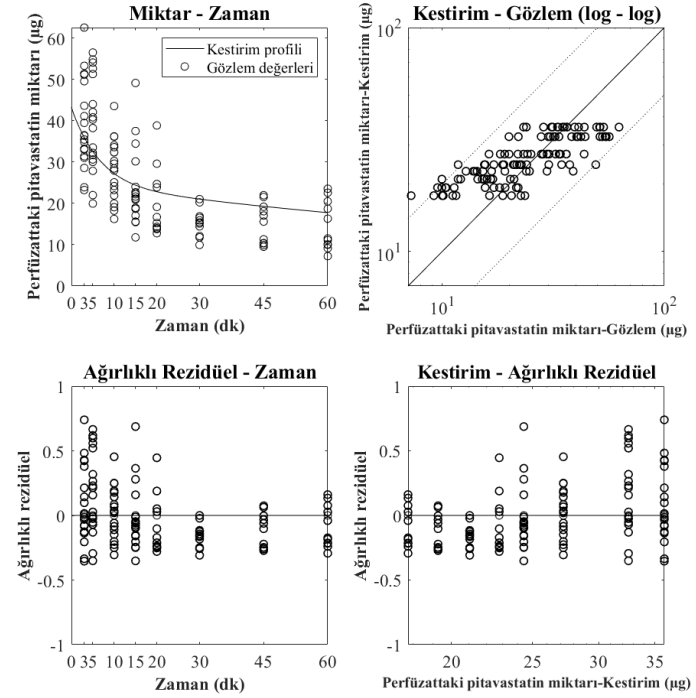
A**B**

Şekil 4.23. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile perfüzat simülasyonları ve diagnostik profiller (1. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk).

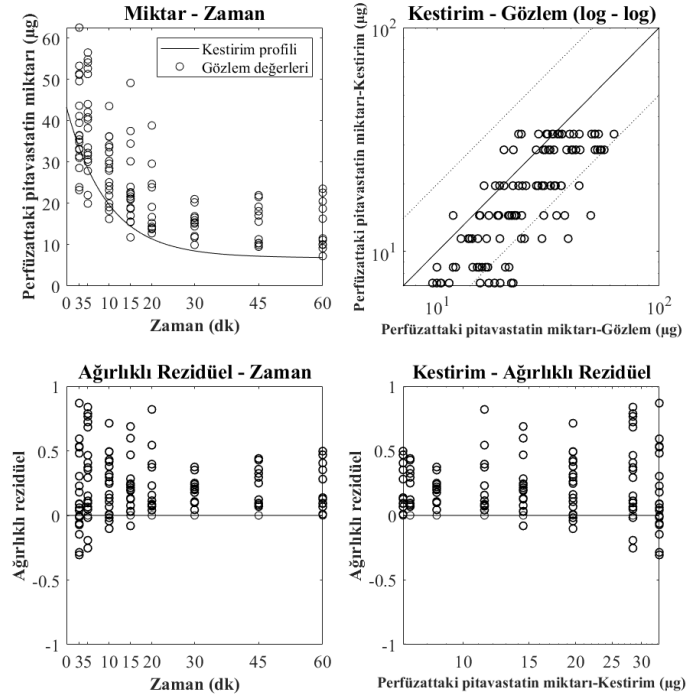
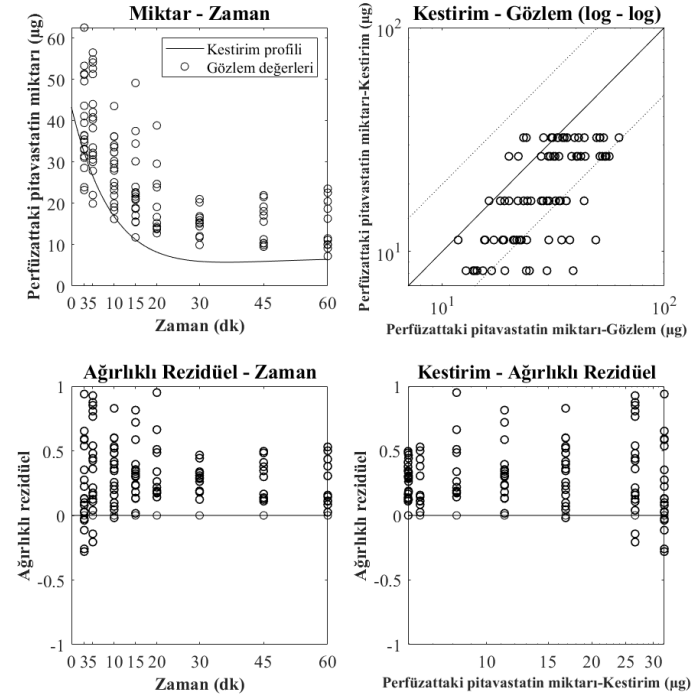
A



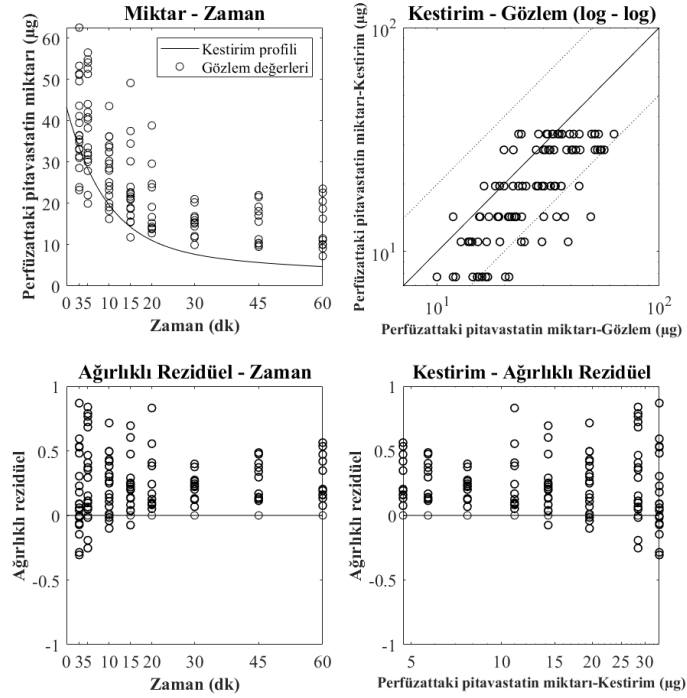
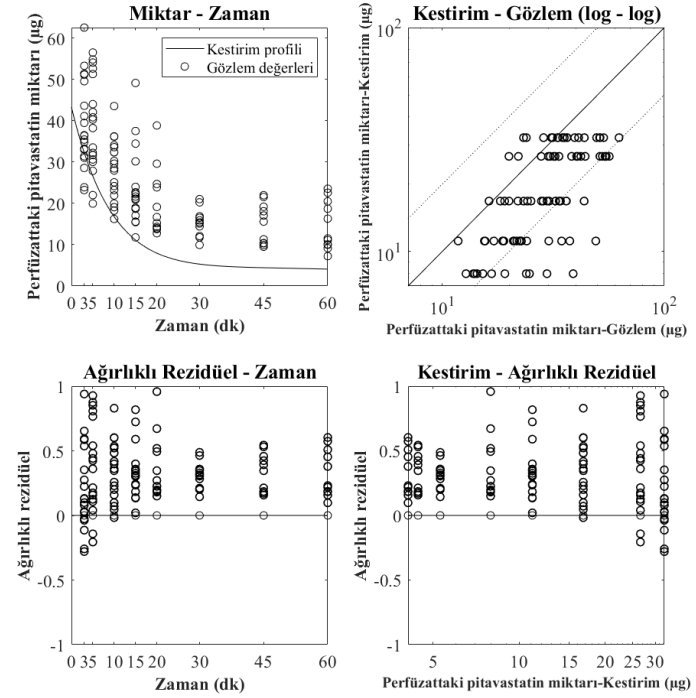
B



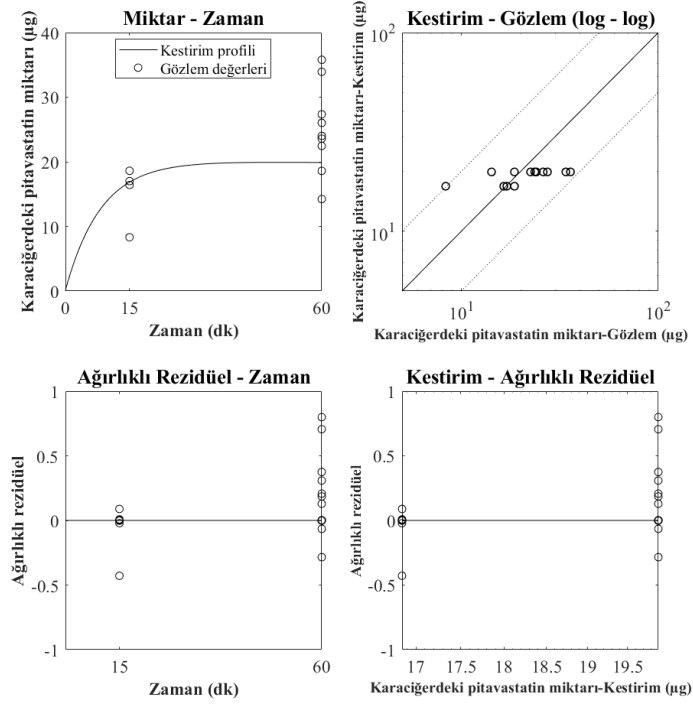
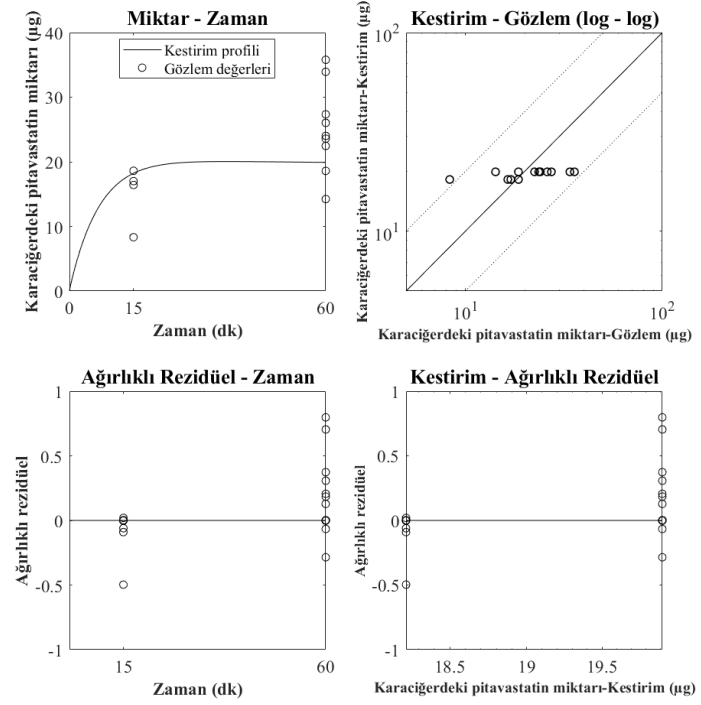
Şekil 4.24. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile perfüzet simülasyonları ve diagnostik profiller (2. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk).

A**B**

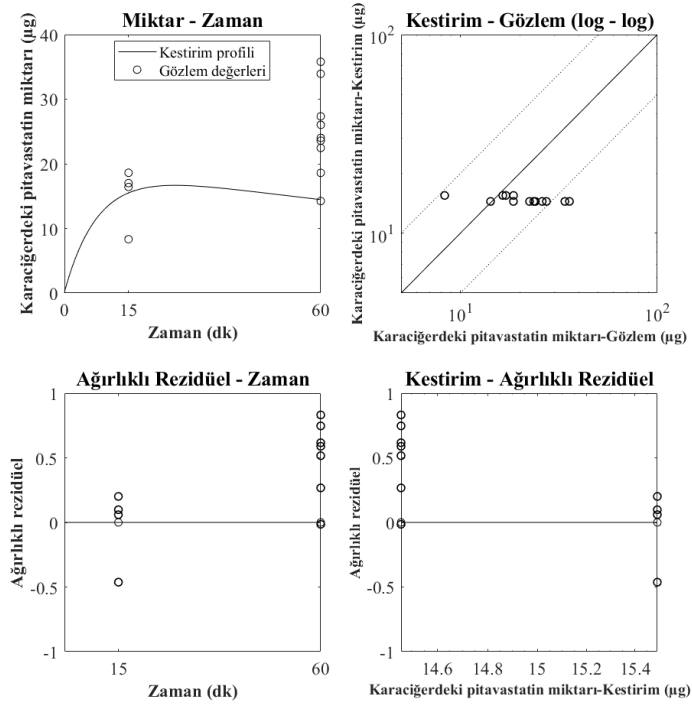
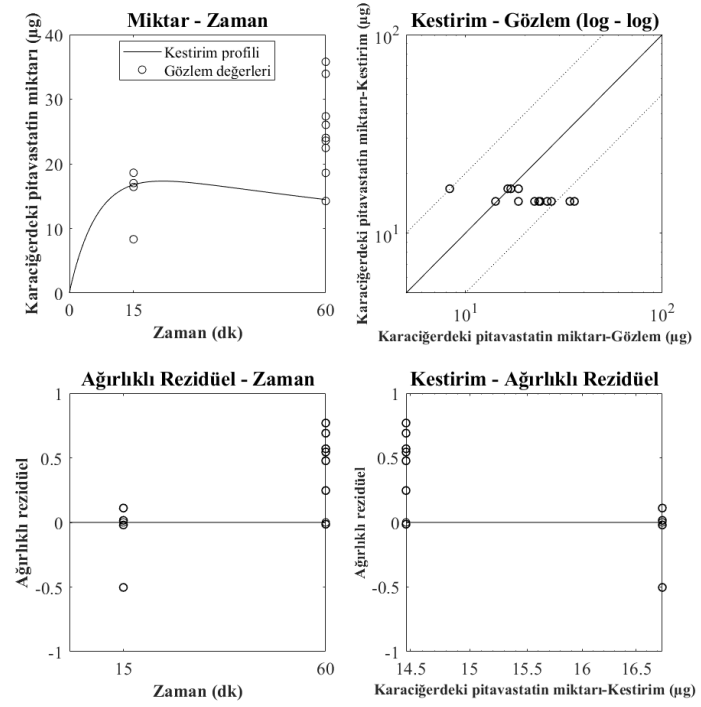
Şekil 4.25. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile perfüzet simülasyonları ve diagnostik profiller (3. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk).

A**B**

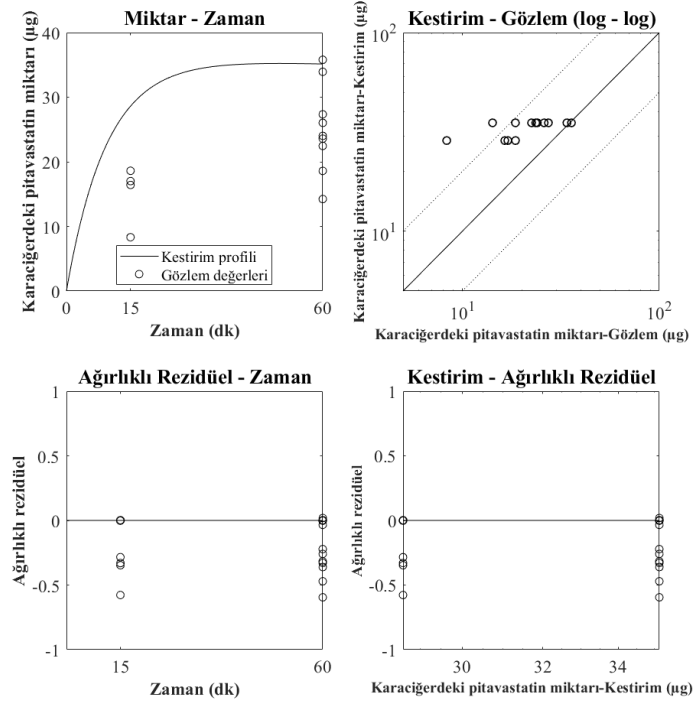
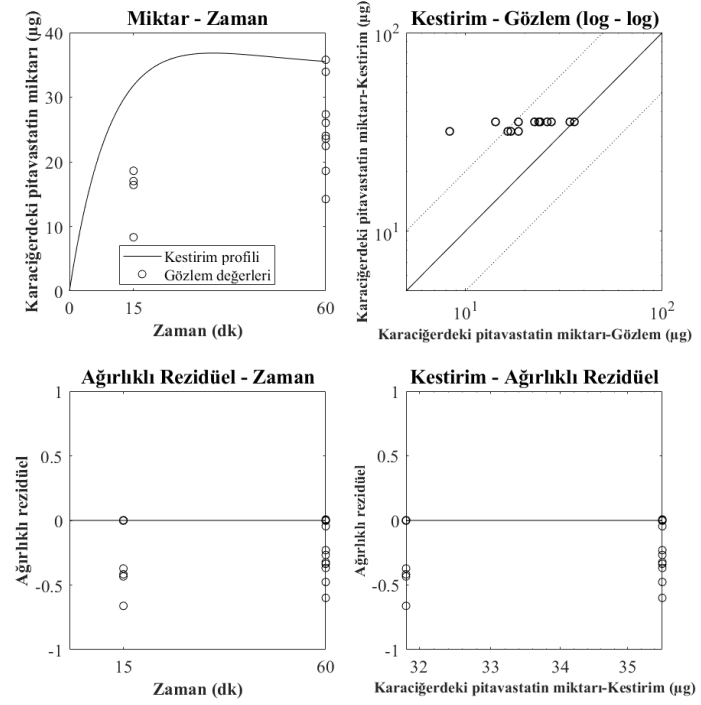
Şekil 4.26. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile perfüzet simülasyonları ve diagnostik profiller (4. Senaryo, CL_{aktif}: 1098 mL/dk, CL_{safra}: 1,365 mL/dk).

A**B**

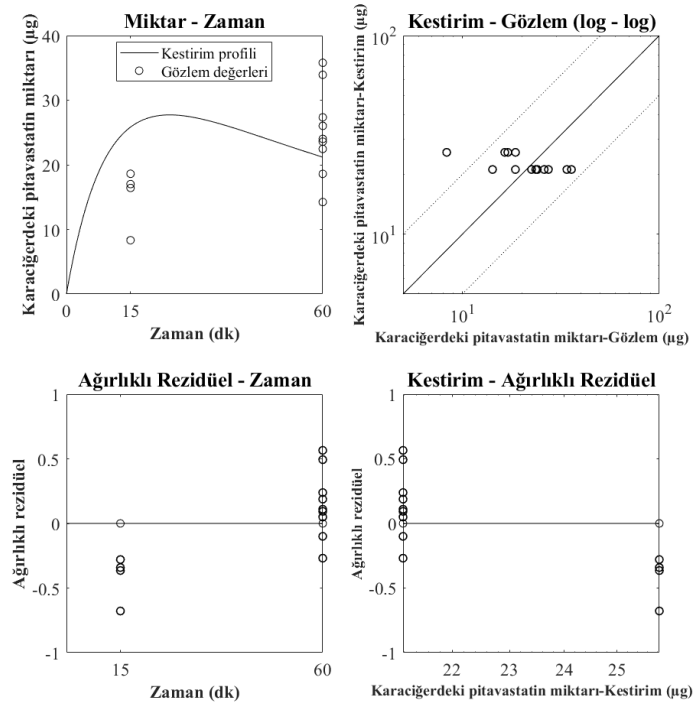
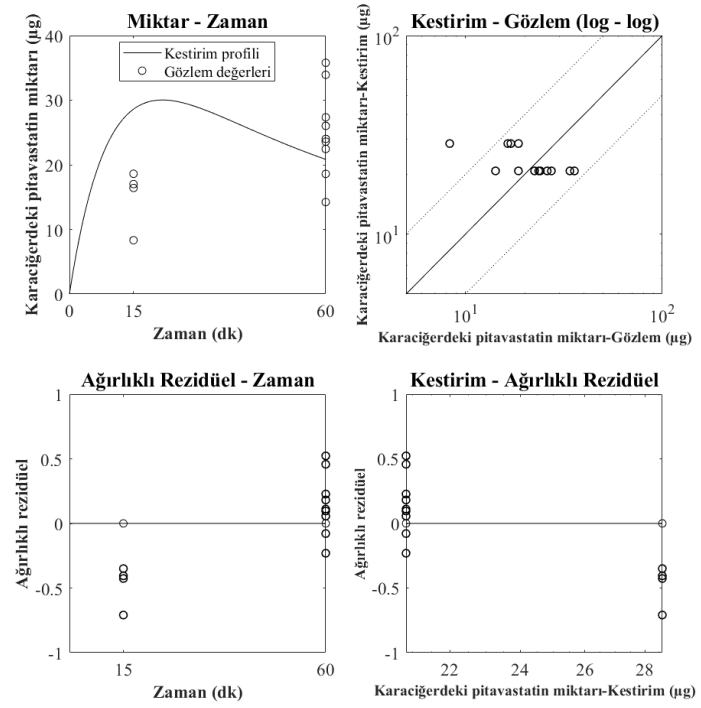
Şekil 4.27. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile karaciğer simülasyonları ve diagnostik profiller (1. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk).

A**B**

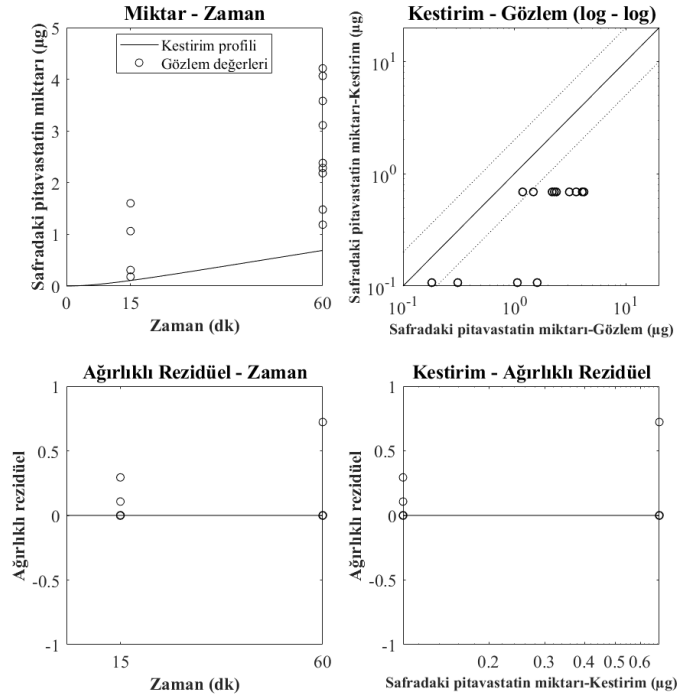
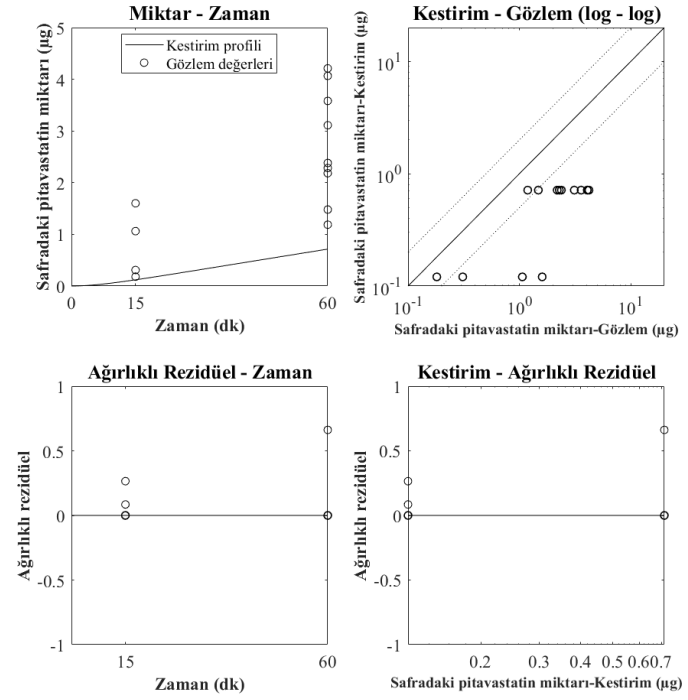
Şekil 4.28. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile karaciğer simülasyonları ve diagnostik profiller (2. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk).

A**B**

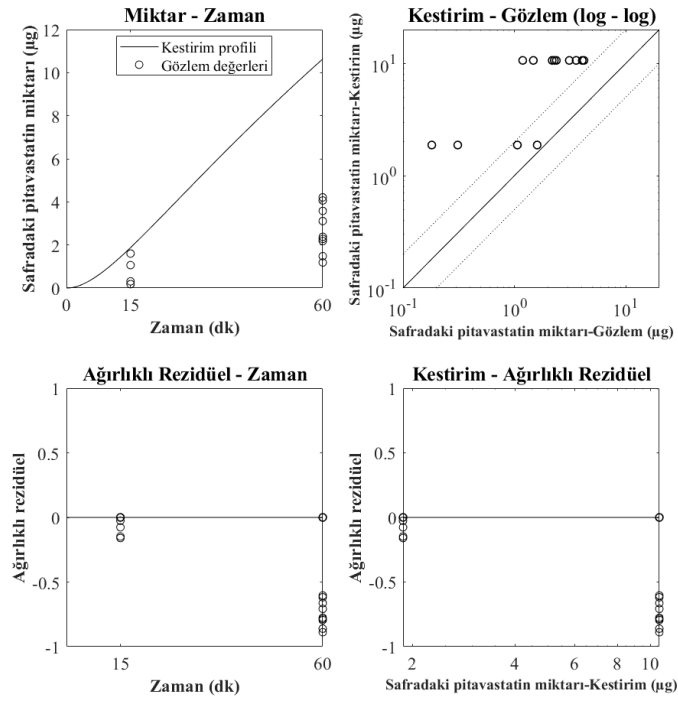
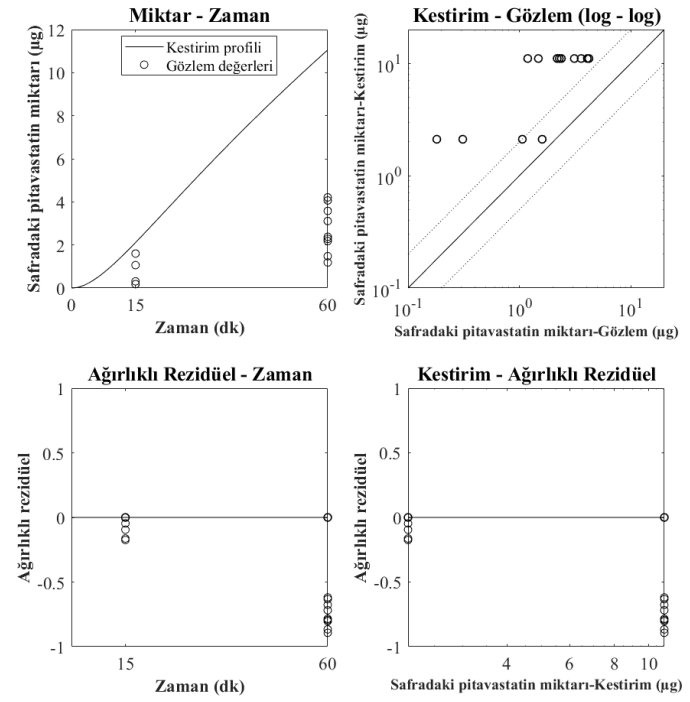
Şekil 4.29. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile karaciğer simülasyonları ve diagnostik profiller (3. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk).

A**B**

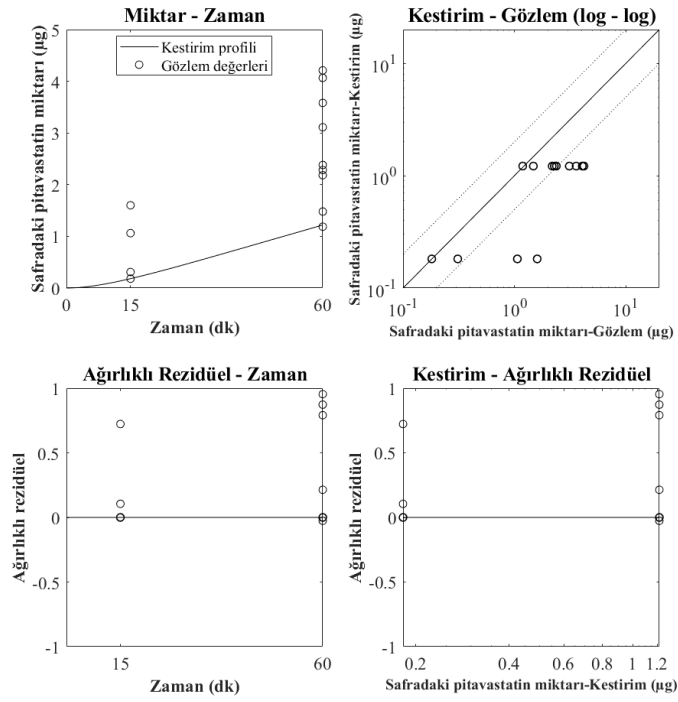
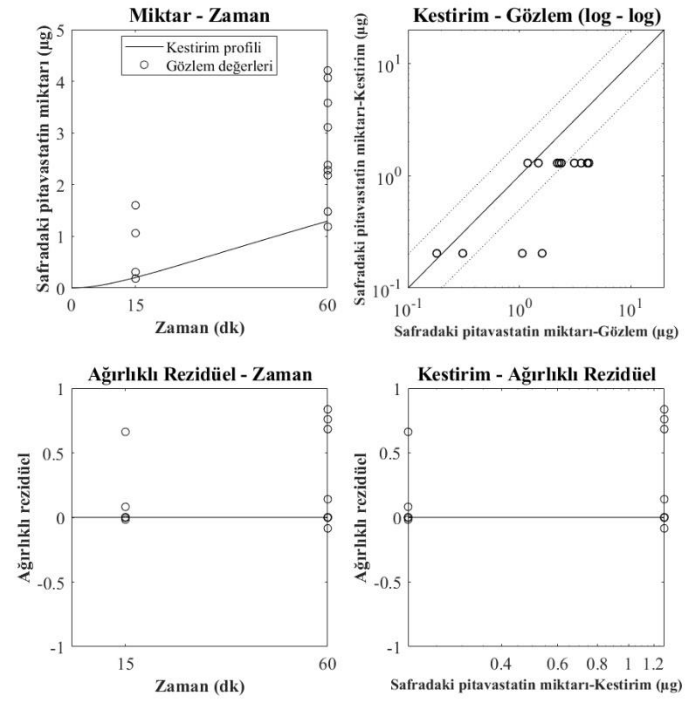
Şekil 4.30. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile karaciğer simülasyonları ve diagnostik profiller (4. Senaryo, CL_{aktif}: 1098 mL/dk, CL_{safra}: 1,365 mL/dk).

A**B**

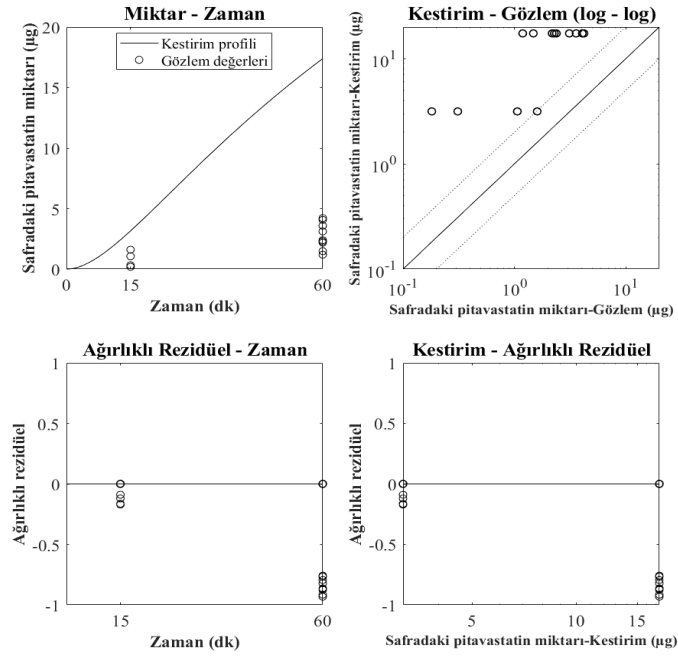
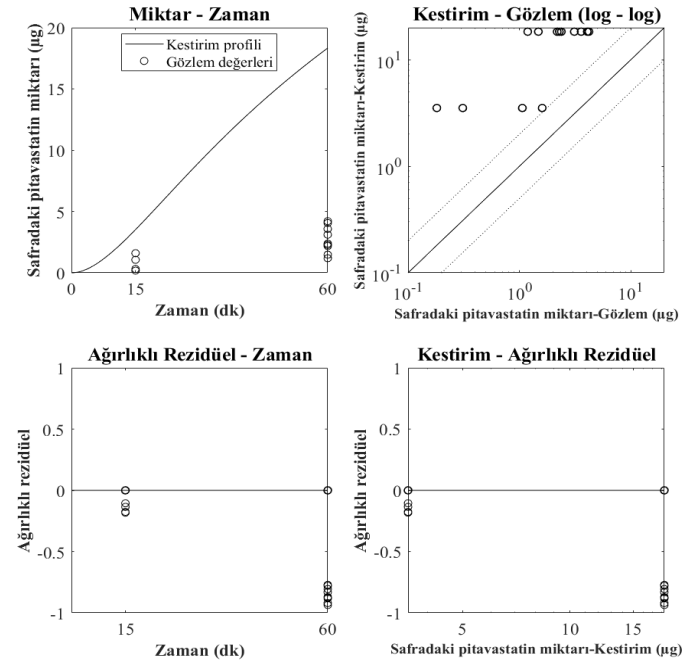
Şekil 4.31. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile safra simülasyonları ve diagnostik profiller (1. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk).

A**B**

Şekil 4.32. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile safra simülasyonları ve diagnostik profiller (2. Senaryo, CL_{aktif} : 171,36 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk).

A**B**

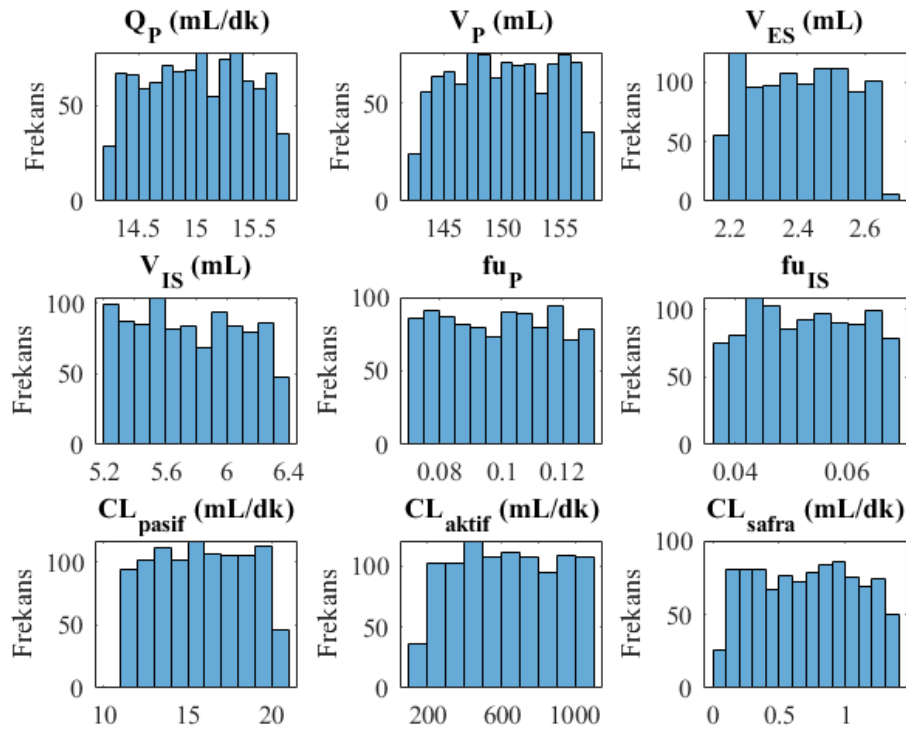
Şekil 4.33. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile safra simülasyonları ve diagnostik profiller (3. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 0,074 mL/dk).

A**B**

Şekil 4.34. A) Tek kompartman ve B) Çoklu alt kompartman modelleri ile safra simülasyonları ve diagnostik profiller (4. Senaryo, CL_{aktif} : 1098 mL/dk, CL_{safra} : 1,365 mL/dk).

4.4.2. Belirsizlik ve Duyarlılık Analizleri

Öncelikle model içerisinde tanımlanan girdi parametrelerindeki belirsizlik (Bkz. 3.8.3. Belirsizlik (Uncertainty) ve Duyarlılık (Sensitivity) Analizleri) sınırları dahilinde ve tekdüze dağılıma uyacak şekilde rastgele değerler atanarak ve modelin işlem süresi göz önünde bulundurularak 1000 farklı girdi parametre seti elde edilmiştir (Şekil 4.35.).



Şekil 4.35. Belirsizlik varlığında girdi parametrelerinin tekdüze dağılımı (n=1000).

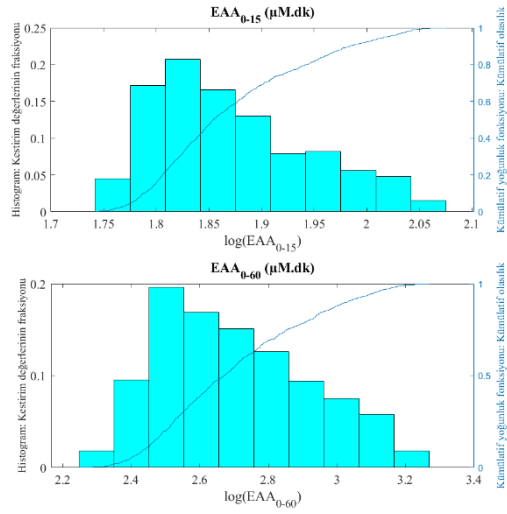
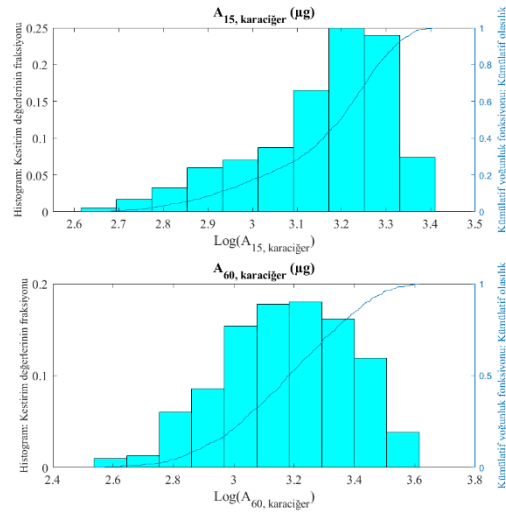
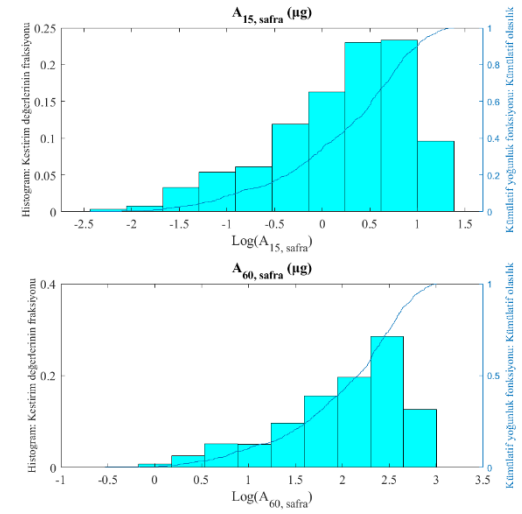
Bu parametre setleri kullanılarak yapılan 1000 adet simülasyonun sonucunda zamana karşı perfüzattaki, karaciğerdeki ve safradaki pítavastatin düzeyleri elde edilmiştir. Girdi parametrelerindeki belirsizliğin etkilerini değerlendirmek üzere her bir kompartman için belirlenmiş olan çıktı parametreleri (Bkz. 3.8.3. Belirsizlik (Uncertainty) ve Duyarlılık (Sensitivity) Analizleri) hesaplanmıştır (Tablo 4.17.).

Tablo 4.17. Belirsizlik varlığında çıktı parametre kestirimlerinin dağılımına ait istatistikler (n=1000).

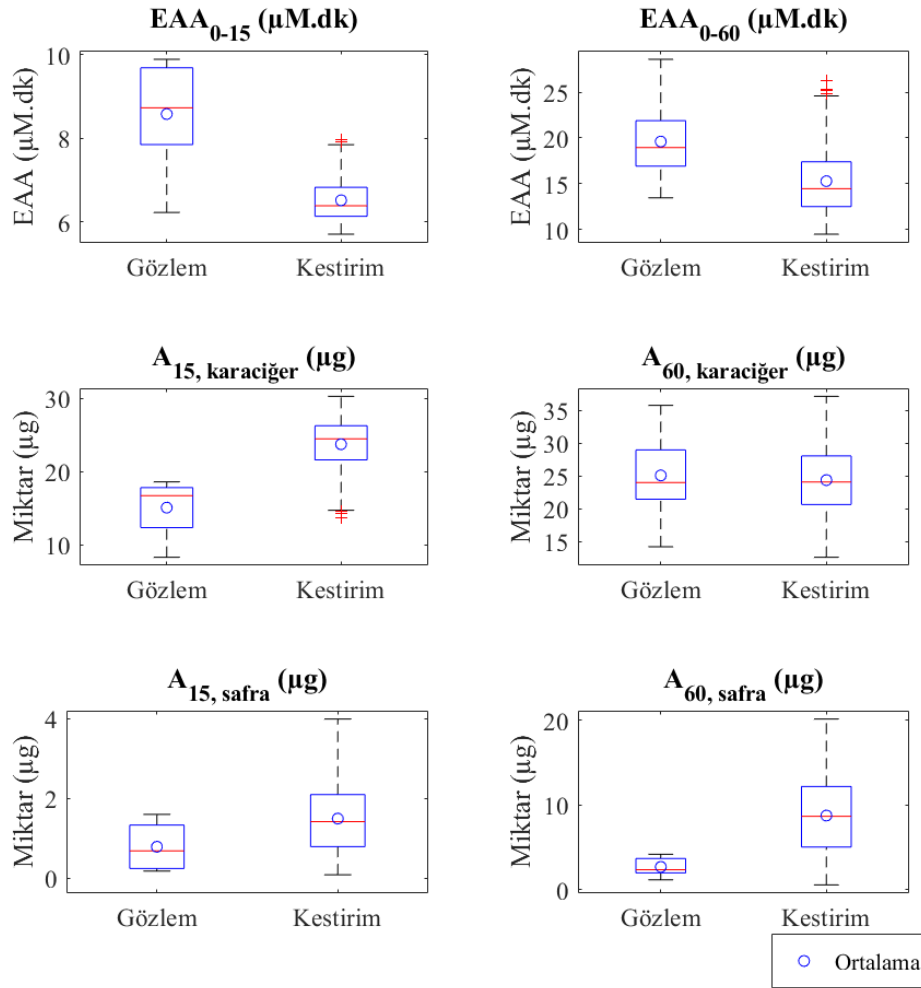
İstatistik	Perfüzат		Karaciğer		Safra	
	EAA ₀₋₁₅	EAA ₀₋₆₀	A ₁₅ , karaciğer	A ₆₀ , karaciğer	A ₁₅ , safra	A ₆₀ , safra
	µM.dk		µg		µg	
Aritmetik ortalama	6,52	15,27	23,73	24,40	1,49	8,78
Geometrik ortalama	6,50	14,90	23,47	23,87	1,21	7,35
Ortanca	6,39	14,44	24,47	24,11	1,42	8,70
VK (%)	7,56	23,02	14,32	20,50	56,66	51,59
%5 yüzdilik	5,91	10,99	17,11	16,65	0,29	1,89
%95 yüzdilik	7,51	22,38	28,37	32,92	3,00	16,57

Kısaltmalar: EAA₀₋₁₅ ve EAA₀₋₆₀: sırasıyla pitavastatinin 0-15 dk ve 0-60 dk arasında perfüzattaki konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan; A₁₅, karaciğer, A₆₀, karaciğer: sırasıyla pitavastatinin karaciğerde 15. ve 60. dk'daki miktarı; A₁₅, safra, A₆₀, safra: sırasıyla pitavastatinin safrada 15. ve 60. dk'daki miktarı; VK: varyasyon katsayısı

Belirsizliğin çıktı parametrelerinin dağılımı üzerindeki etkisi kutu grafikleri ve kümülatif dağılım yoğunluk fonksiyonu kullanılarak Şekil 4.36. ve Şekil 4.37.'de gösterilmiştir. Çıktı parametreleri için gözlem ve kestirim değerlerine ait dağılımı gösteren kutu grafiği üzerinde belirtilmiştir.

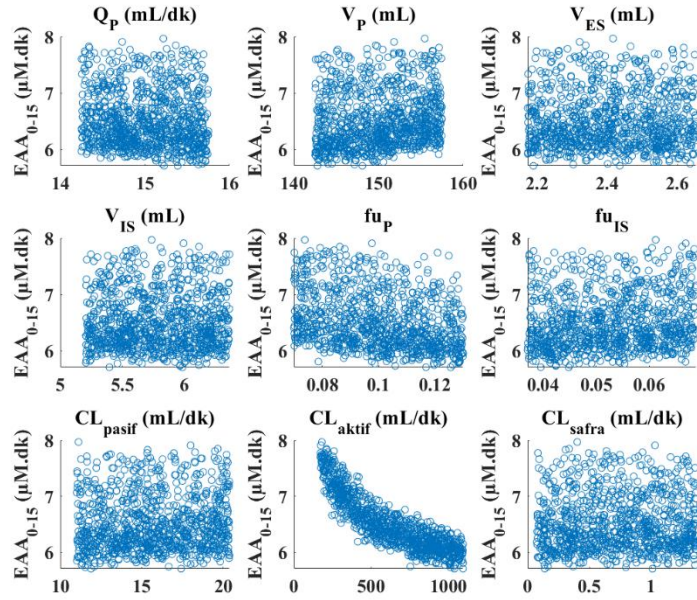
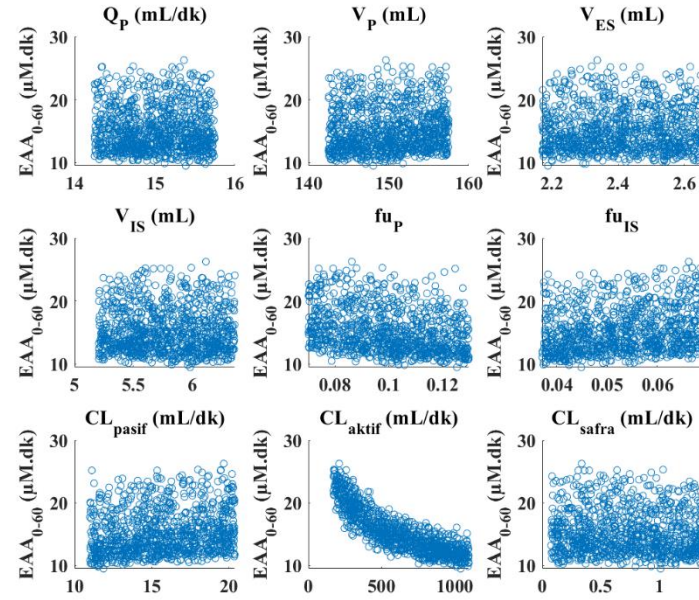
A**B****C**

Şekil 4.36. Belirsizlik varlığında çıktı parametreleri (A: EAA0-15 ve EAA0-60; B: A15, karaciğer ve A60, karaciğer; C: A15, safra ve A60, safra) kestirimlerinin dağılımı (n=1000).

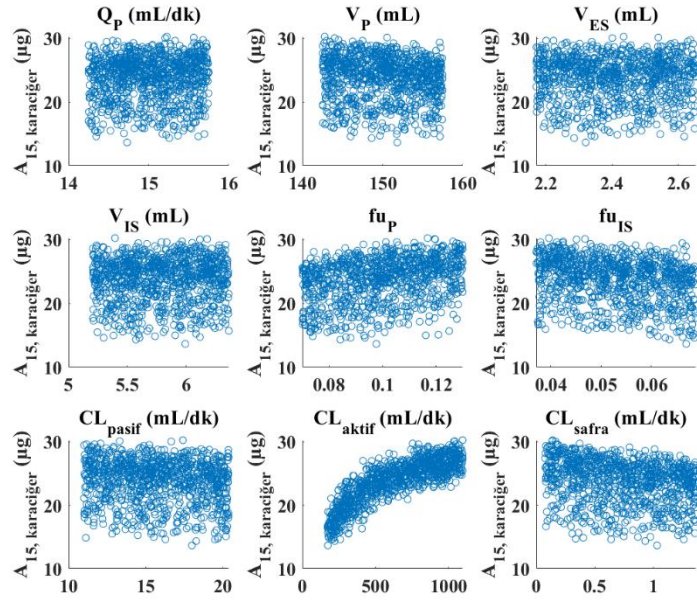
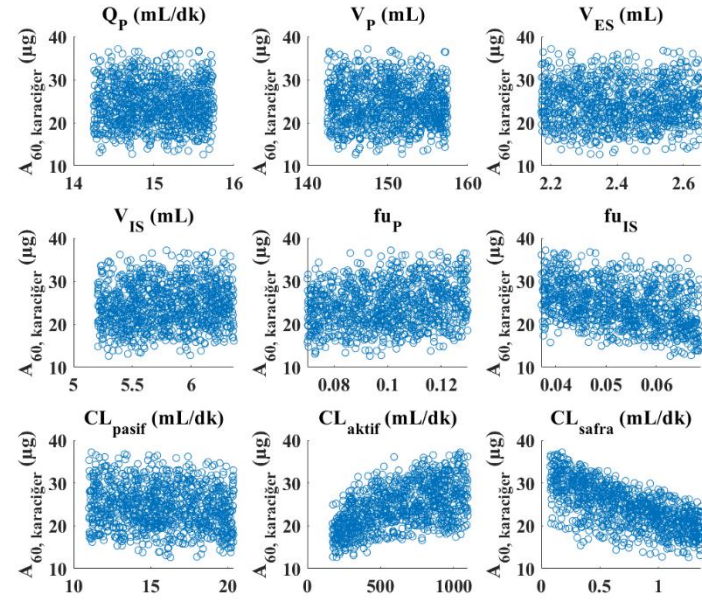


Şekil 4.37. Çıktı parametrelerine ait gözlem değerlerinin (n=2-6) ve belirsizlik varlığında kestirim değerlerinin (n=1000) dağılımı.

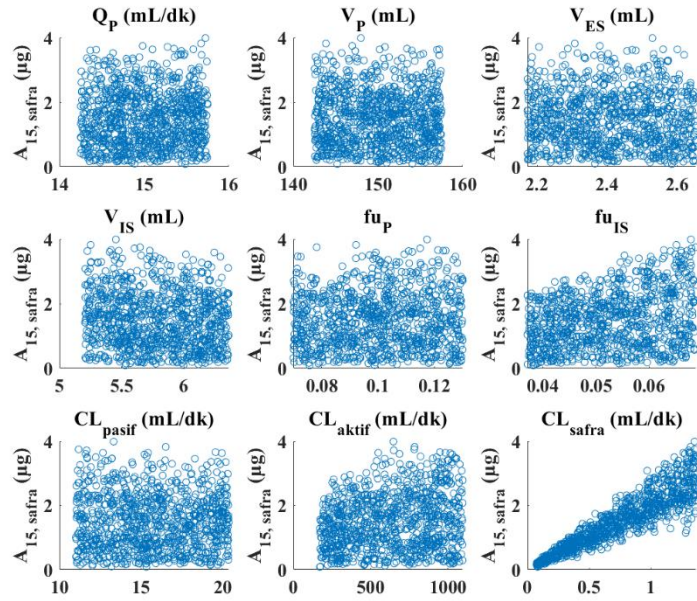
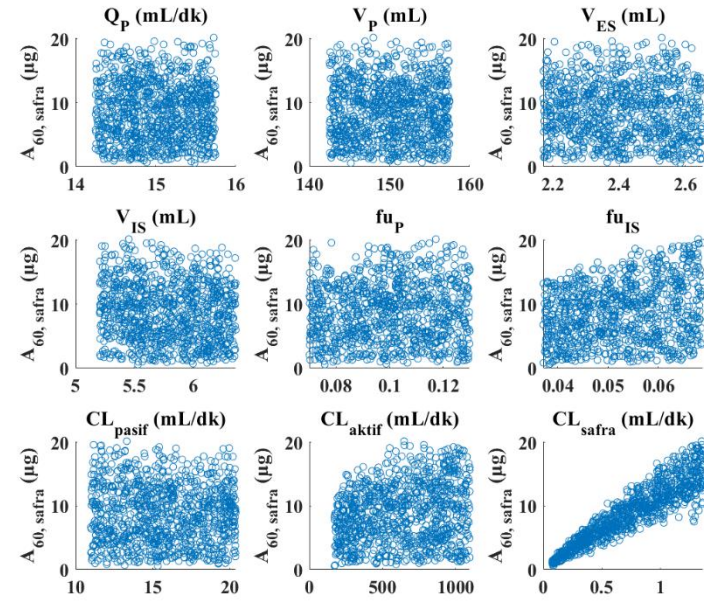
Her bir girdi parametresi ile her bir çıktı parametresi arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon grafikleri oluşturulmuştur. EAA₀₋₁₅ ve EAA₀₋₆₀ ile CL_{aktif}, (Şekil 4.38.) A_{15, karaciğer} ile CL_{aktif} (Şekil 4.39.), A_{15, safra} ve A_{60, safra} ile CL_{safra} arasında (Şekil 4.40.) daha belirgin olmak üzere tüm ilişkilerde doğrusal olmayan monotonik bir ilişki gözlenmiştir. Bu nedenle duyarlılık analizi olarak PRCC testi seçilmiştir.

A**B**

Şekil 4.38. Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: EAA0-15 ve B: EAA0-60) arasındaki korelasyon (n=1000).

A**B**

Şekil 4.39. Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: A15, karaciğer ve B: A60, karaciğer) arasındaki korelasyon (n=1000).

A**B**

Şekil 4.40. Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: A15, safra ve B: A60, safra) arasındaki korelasyon (n=1000).

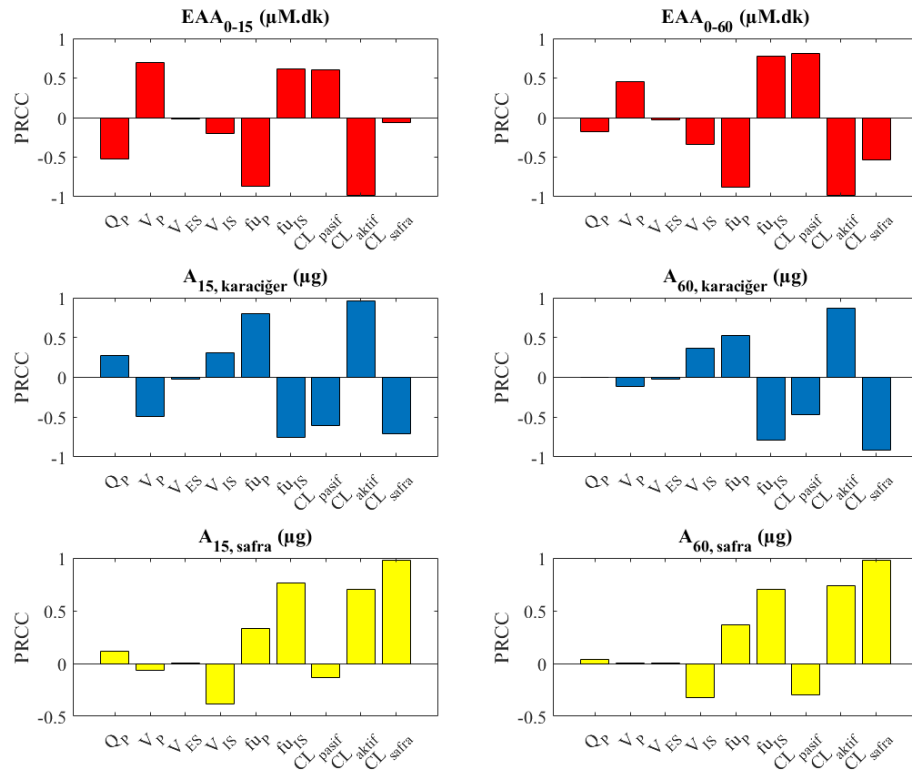
- **Kısmi Sıra Korelasyon Testi**

Kısmi sıra korelasyon testi sonucu elde edilen korelasyon katsayısı olan PRCC değeri ile her bir girdi parametresindeki belirsizliğin çıktı parametresi kestirimindeki varyasyona katkısı ifade edilmektedir. PRCC değeri büyük ($> 0,5$ veya $< -0,5$) ve p değeri küçük olan ($< 0,05$) parametreler model çıktıları üzerinde en büyük etkiye sahip parametrelerdir (235).

PRCC testi sonucunda EAA₀₋₁₅ ve EAA₀₋₆₀'nın en duyarlı olduğu girdi parametresinin negatif korelasyon ile CL_{aktif} (PRCC: 0,98) olarak bulunmuştur. EAA₀₋₁₅ ayrıca fu_p (0,85), fu_{IS} (0,59) ve CL_{pasif} (0,55) parametrelerine duyarlılık göstermiştir. CL_{safra}'ya ise duyarlılık göstermemektedir (0,1). 60 dk perfüzyon sonunda EAA₀₋₆₀, fu_{IS} (0,77) ve CL_{pasif} (0,79) parametrelerine artmış duyarlılıkla birlikte CL_{safra}'ya duyarlılık (0,52) göstermiştir. Q_P ve V_P perfüzyon kompartmanını tanımlayan denklemlerde yer alan parametreler olup EAA₀₋₁₅'in bu parametrelere duyarlılığı (0,54 ve 0,65) EAA₀₋₆₀ için azalmıştır (0,21 ve 0,39) (Şekil 4.41.).

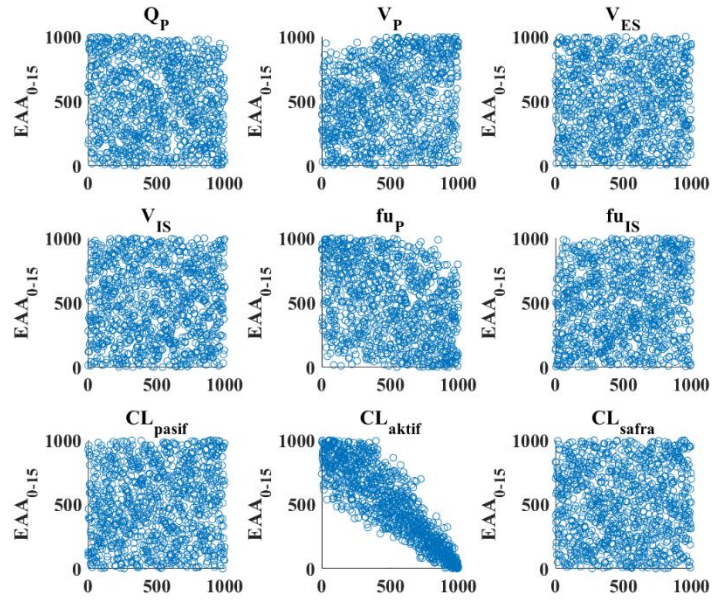
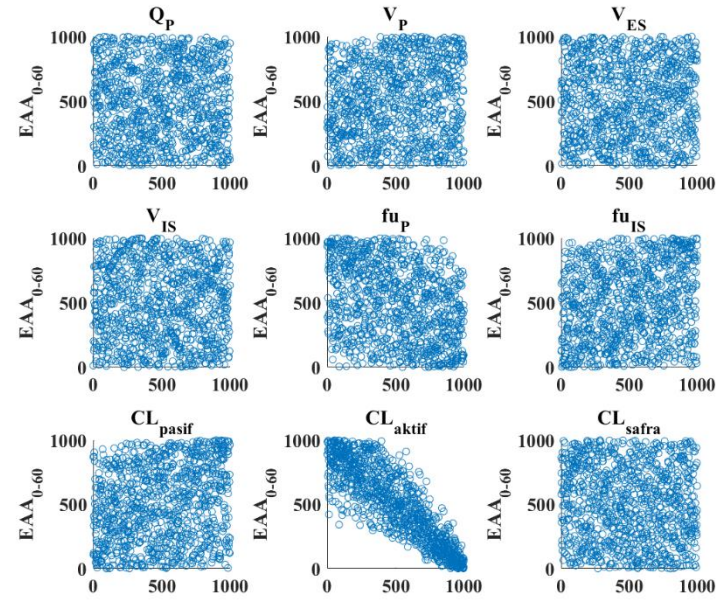
Pitavastatinin karaciğerde 15. dk'daki miktarı en yüksek duyarlılığı pozitif korelasyon ile CL_{aktif}'e (0,97) göstermiştir. CL_{safra}'nın rolü 60. dk pitavastatin miktarı üzerinde (0,91) CL_{aktif}'e göre (0,87) daha baskın bulunmuştur. (Şekil 4.41.)

Safradaki pitavastatin miktarının her iki terminal zaman noktasında en yüksek duyarlılık gösterdiği girdi parametreleri fu_{IS}, CL_{aktif} ve CL_{safra} olarak bulunmuştur (sırasıyla A_{15, safra} için 0,79, 0,70, 0,98 ve A_{60, safra} için 0,74, 0,73, 0,98).

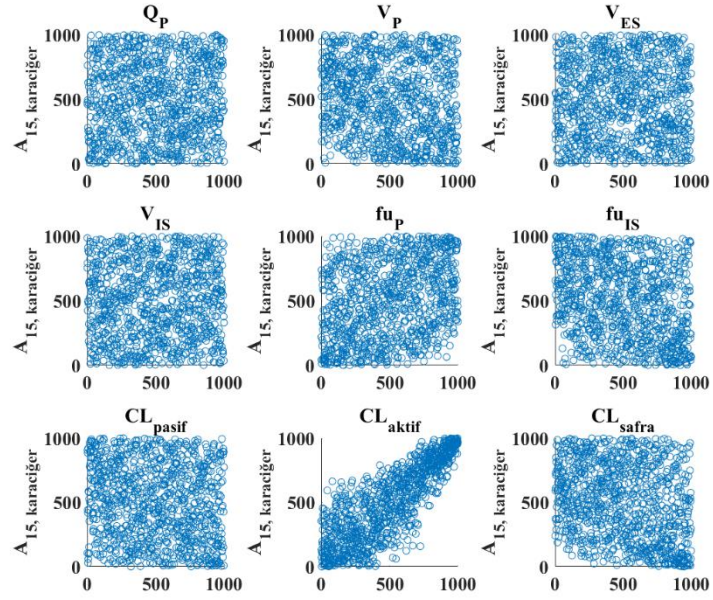
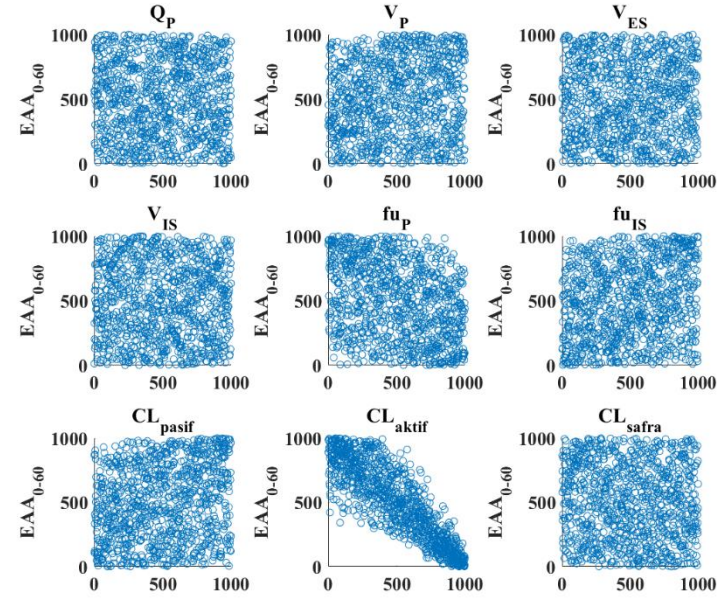


Şekil 4.41. Belirsizliğin çıktı parametrelerinin (A: EAA0-15; B: EAA0-60; C: A15, karaciğer; D: A60, karaciğer; E: A15, safra ve F: A60, safra) varyasyonuna etkisinin sayısal ifadesi olarak PRCC değerlerinin grafiksel olarak gösterimi.

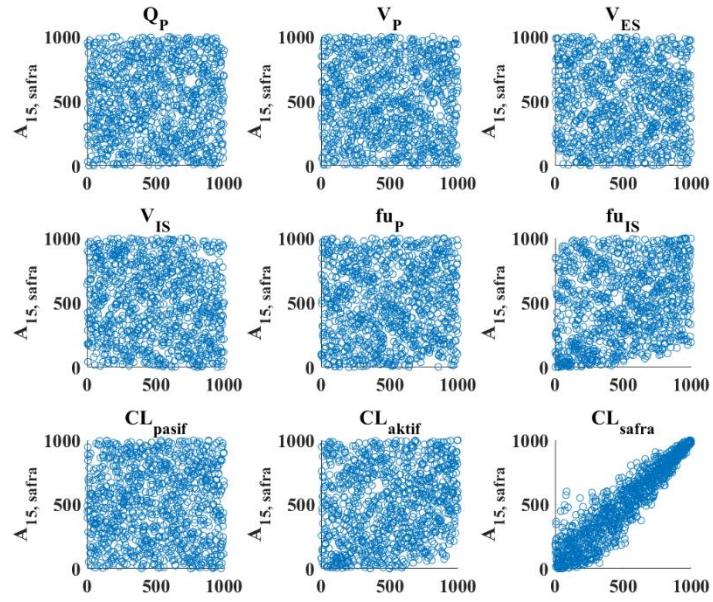
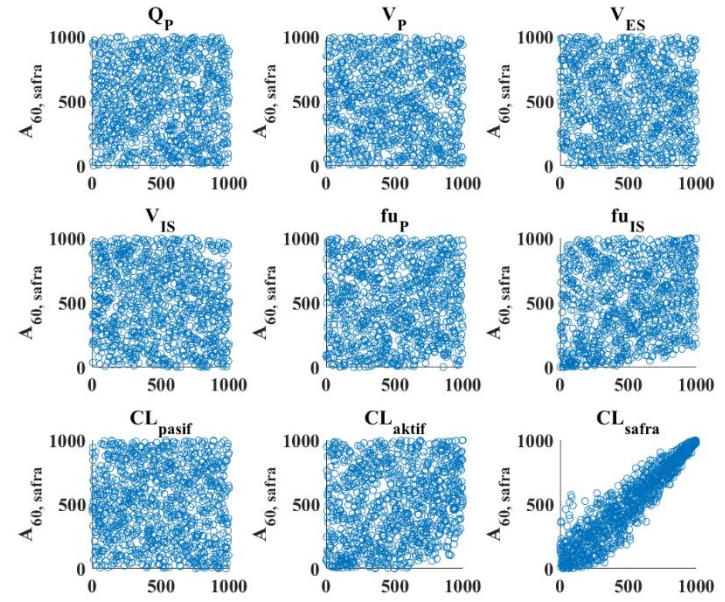
Ayrıca, girdi ve çıktı parametrelerinin sıralanmasının ardından aralarındaki ilişkiyi gösteren sıra korelasyon grafikleri elde edilmiştir. Şekil 4.42.-4.44.'da gösterildiği gibi perfüzyon ve karaciğer kestirimleri için CL_{aktif} ve safra kestirimleri için CL_{safra} diğer parametrelere göre daha belirgin bir korelasyon göstermektedir.

A**B**

Şekil 4.42. Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: EAA0-15 ve B: EAA0-60) arasındaki sıra korelasyonu ($n=1000$).

A**B**

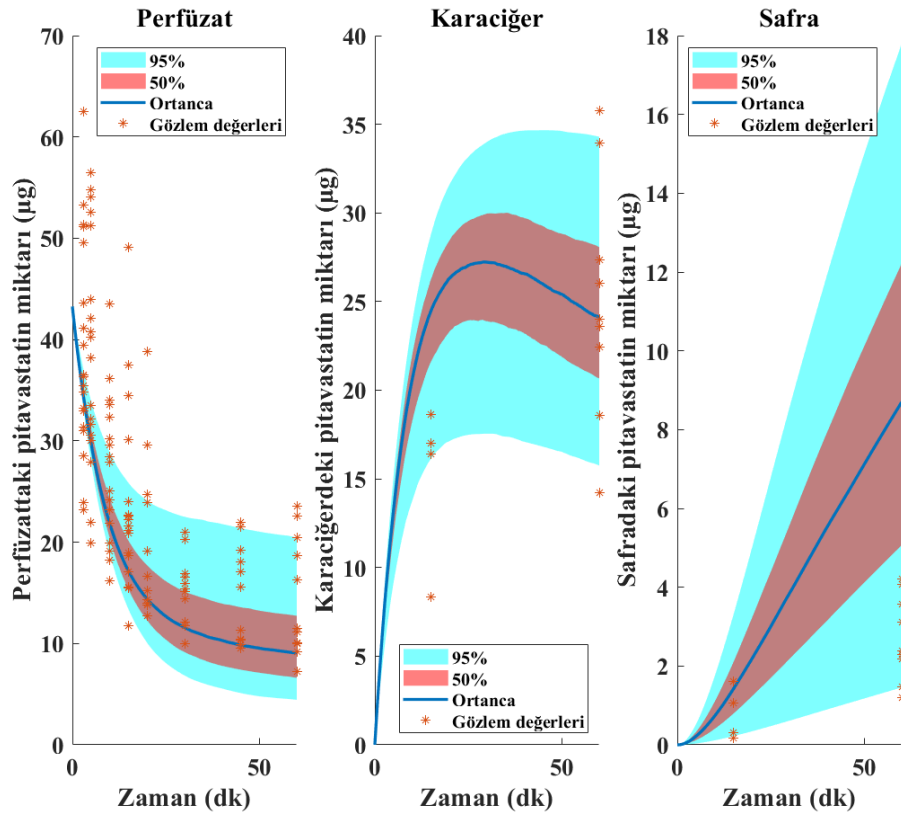
Şekil 4.43. Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: A15, karaciğer ve B: A60, karaciğer) arasındaki sıra korelasyonu (n=1000).

A**B**

Şekil 4.44. Belirsizlik varlığında girdi ve çıktı parametreleri (A: A₁₅, safra ve B: A₆₀, safra) arasındaki sıra korelasyonu (n=1000).

• Monte Carlo Duyarlılık Analizleri

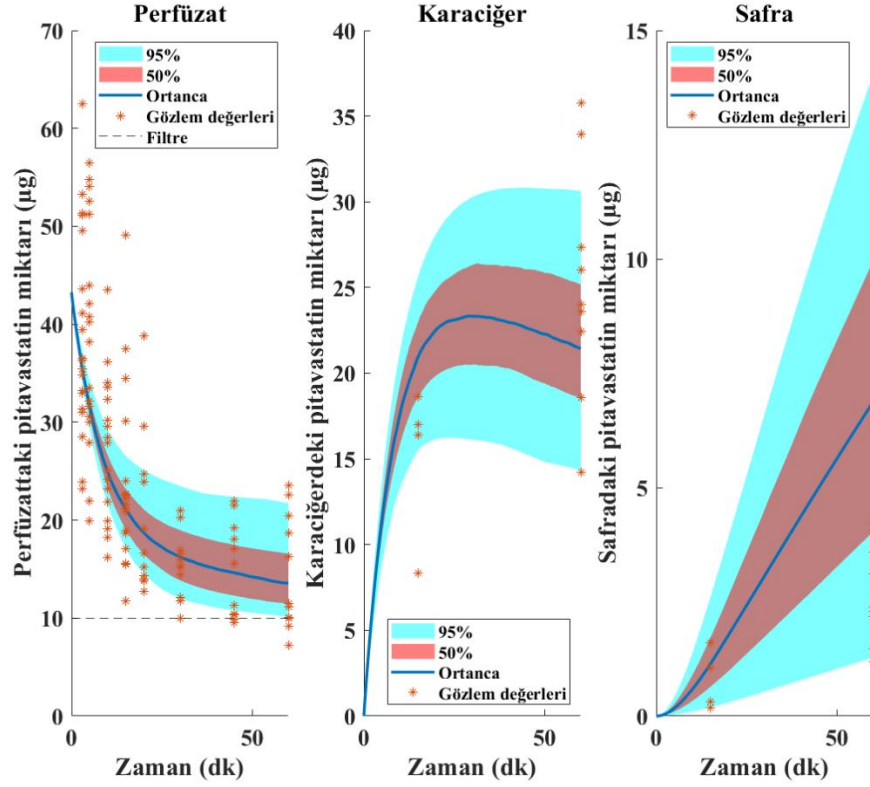
Belirsizliğin geliştirilmiş mekanistik model ile elde edilen profiller üzerindeki etkisi statik Monte Carlo simülasyonu ile değerlendirilmiştir. Girdi parametreleri (n=1000, (Şekil 4.35.) kullanılarak 1000 farklı simülasyon senaryosu elde edilmiştir ve profiller üzerinde gözlem değerleri gösterilmiştir. Şekil 4.45'te görüldüğü üzere, tüm kompartmanlar için simülasyon profilleri %95 güven aralığında gözlem değerlerini kapsamaktadır. Ancak kestirim değerlerinin ortanca eğrileri incelendiğinde, perfüzet kompartmanı için gözlem değerlerinin altında, safra kompartmanı için ise gözlem değerlerinin üzerinde bir pitavastatin miktarı tahmini yapıldığı görülmektedir. Karaciğer kompartmanında ise simülasyonların gözlem değerlerini diğer kompartmanlara göre daha iyi ifade ettiği görülmektedir.



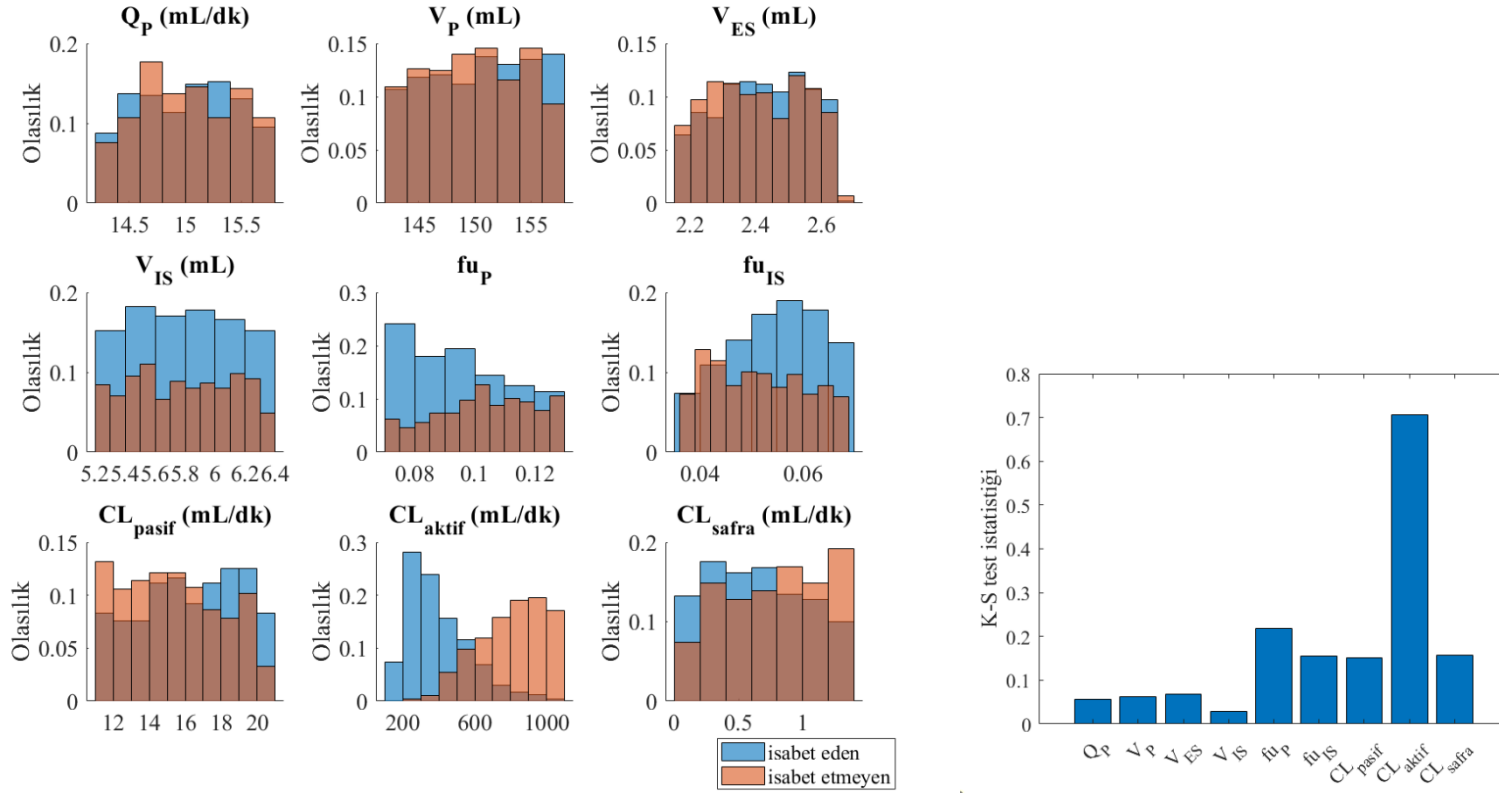
Şekil 4.45. Monte Carlo duyarlılık testi ile elde edilen simülasyon profilleri (n=1000).

Bu nedenle bir filtreleme yaklaşımı uygulanarak perfüzet ve safra için simülasyonların gözlem değerleri ile çakıştığı bölüme ulaşılması hedeflenmiştir. Bu

amaçla perfüzet ve safra kompartmanları için filtre koşulları belirlenmiştir. Perfüzet ve safra simülasyonlarının filtrelemesi hem ayrı ayrı hem de eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.

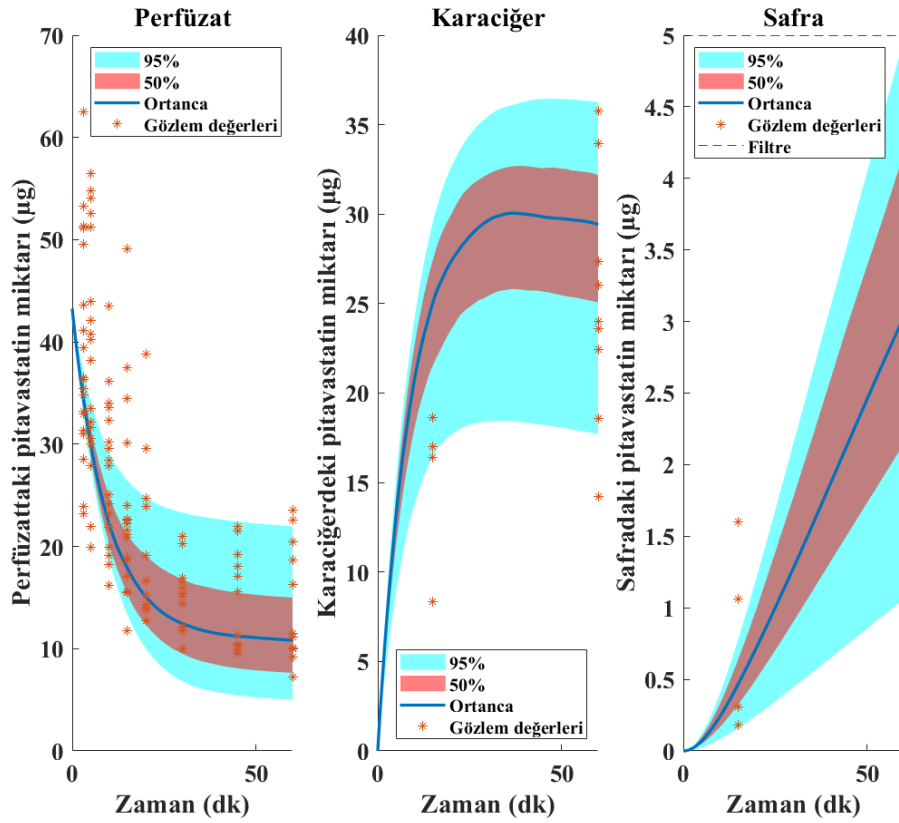


Şekil 4.46. Perfüzet kompartmanı için filtreleme sonrası elde edilen Monte Carlo simülasyon profilleri (n=422).

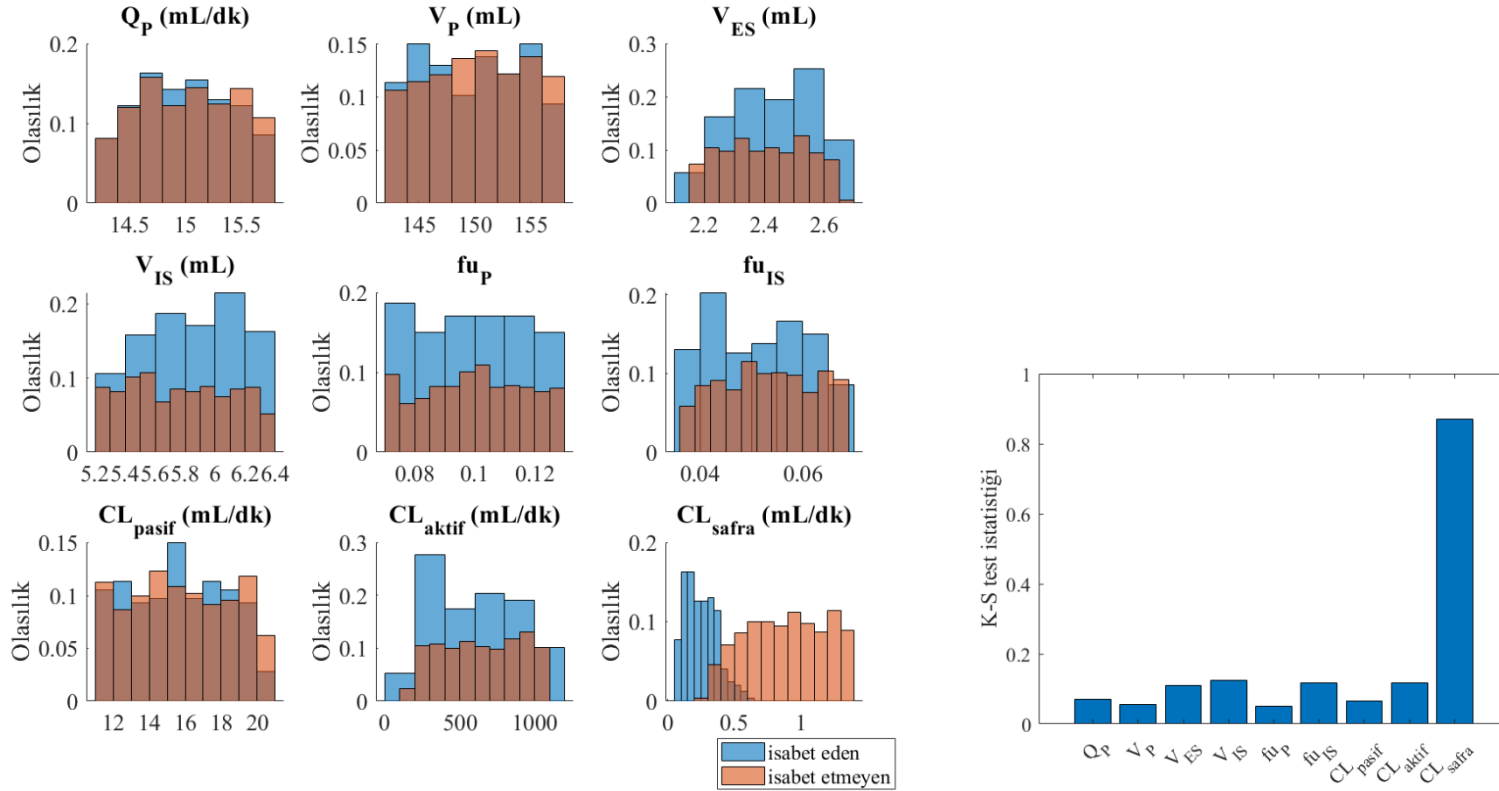


Şekil 4.47. Perfüizat kompartmanı için filtreleme yaklaşımı uygulamasında isabet eden (n=422) ve isabet etmeyen (n=578) parametre dağılımlarının karşılaştırılması.

Safra kompartmanında 60. dk'da pitavastatin miktarını $5 \mu\text{g}$ 'ın altında tahmin eden simülasyonlar filtrelendiğinde (Şekil 4.48.) 1000 parametre setinden 246'sı belirlenen koşulu sağlamıştır. Bu filtreyi sağlayan parametreler ile sağlamayan parametrelerin dağılımı karşılaştırıldığında (Şekil 4.49.), CL_{pasif} , CL_{aktif} ve CL_{safra} parametreleri için anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$).

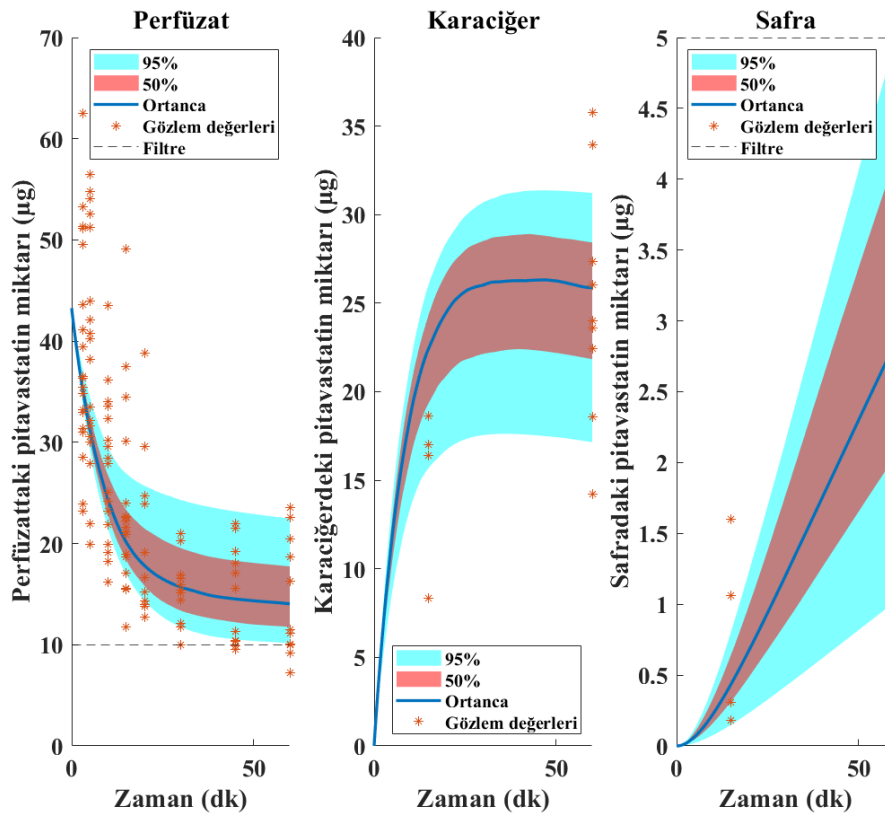


Şekil 4.48. Safra kompartmanı için filtreleme ile sonrası elde edilen Monte Carlo simülasyon profilleri (n=246).

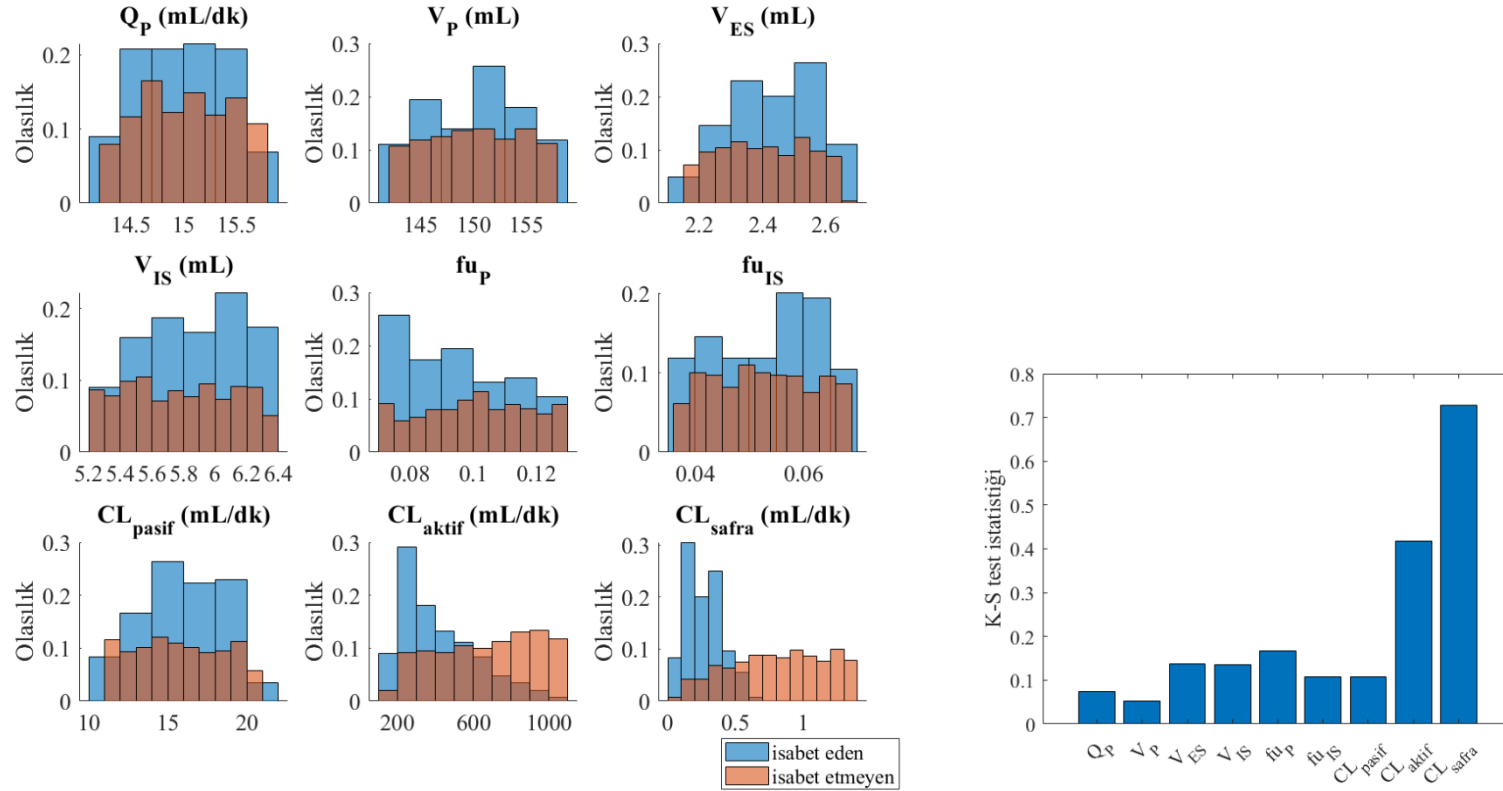


Şekil 4.49. Safra kompartmanı için filtreleme yaklaşımı uygulamasında isabet eden (n=246) ve isabet etmeyen (n=754) parametre dağılımlarının karşılaştırılması.

Hem perfüzet hem de safra kompartmanı için eş zamanlı olarak belirtilen filtre koşulları uygulandığında (Şekil 4.50.) 1000 parametre setinden 144'ünün isabetli olduğu bulunmuştur. Uygulanan filtreler için isabet eden ve isabet etmeyen parametrelerin dağılımı incelendiğinde (Şekil 4.51.), isabet eden ve isabet etmeyen parametre setleri içerisinde f_{up} , CL_{pasif} , CL_{aktif} ve CL_{safra} parametrelerinin dağılımları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.50. Perfüzet ve safra kompartmanları için filtreleme ile sonrası elde edilen Monte Carlo simülasyon profilleri (n=144).



Şekil 4.51. Perfüzat ve safra kompartmanları için filtreleme yaklaşımı uygulamasında isabet eden (n=144) ve isabet etmeyen (n=856) parametre dağılımlarının karşılaştırılması.

4.5. Model İyileştirme ve Farmakokinetik Parametre Kestirimi

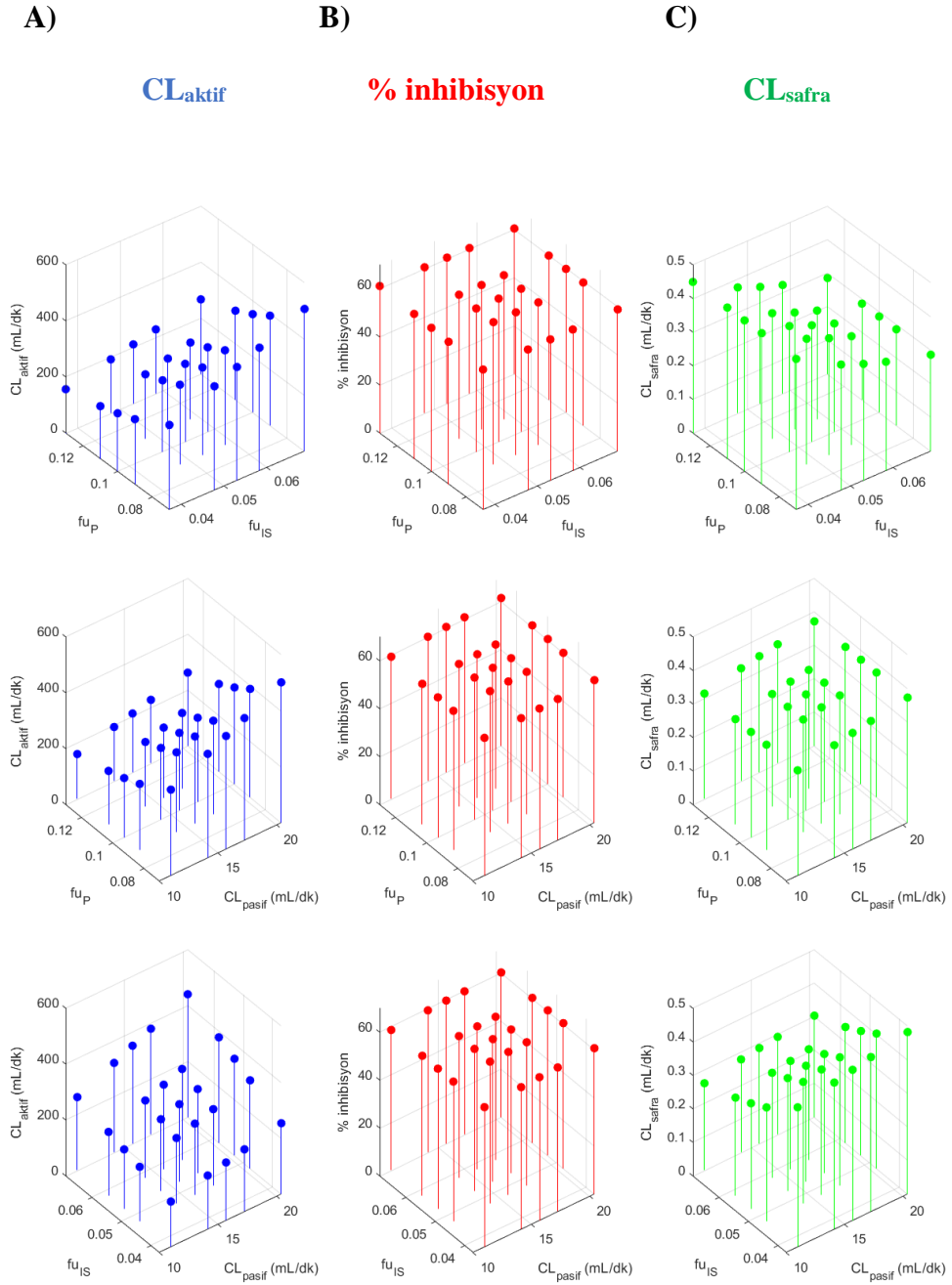
Belirsizlik derecelerinin yüksek olmasının yüksek duyarlılıkla ilişkili olması nedeniyle CL_{aktif} ve CL_{safra} girdi parametrelerinin model ile kestiriminin yapılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla gözlem verisi model ile analiz edilmiştir.

İnhibisyon varlığında ve yokluğunda olmak üzere iki durumlu olarak eş zamanlı analizi gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.18.'de verilen kestirim değerlerinde %VK CL_{aktif} ve CL_{safra} için sırasıyla %10,93 ve %56,32 olarak bulunmuştur. 50 μM rifampisin varlığında karaciğer perfüzyonu çalışması koşullarında CL_{aktif} inhibisyon derecesi %60 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.18. Mekanistik kompartman modeli ile veri analizi sonucu klerens parametrelerinin kestirimleri.

Parametre (mL/dk)	Model kestirimi
CL_{aktif}	$278,57 \pm 30,44$
$CL_{\text{aktif, inh}}$	$112,27 \pm 16,97$
CL_{safra}	$0,35 \pm 0,20$

Parametre kestirimlerinin f_{up} , f_{uIS} ve CL_{pasif} parametrelerine olan duyarlılığı değerlendirilmiştir (Şekil 4.52).



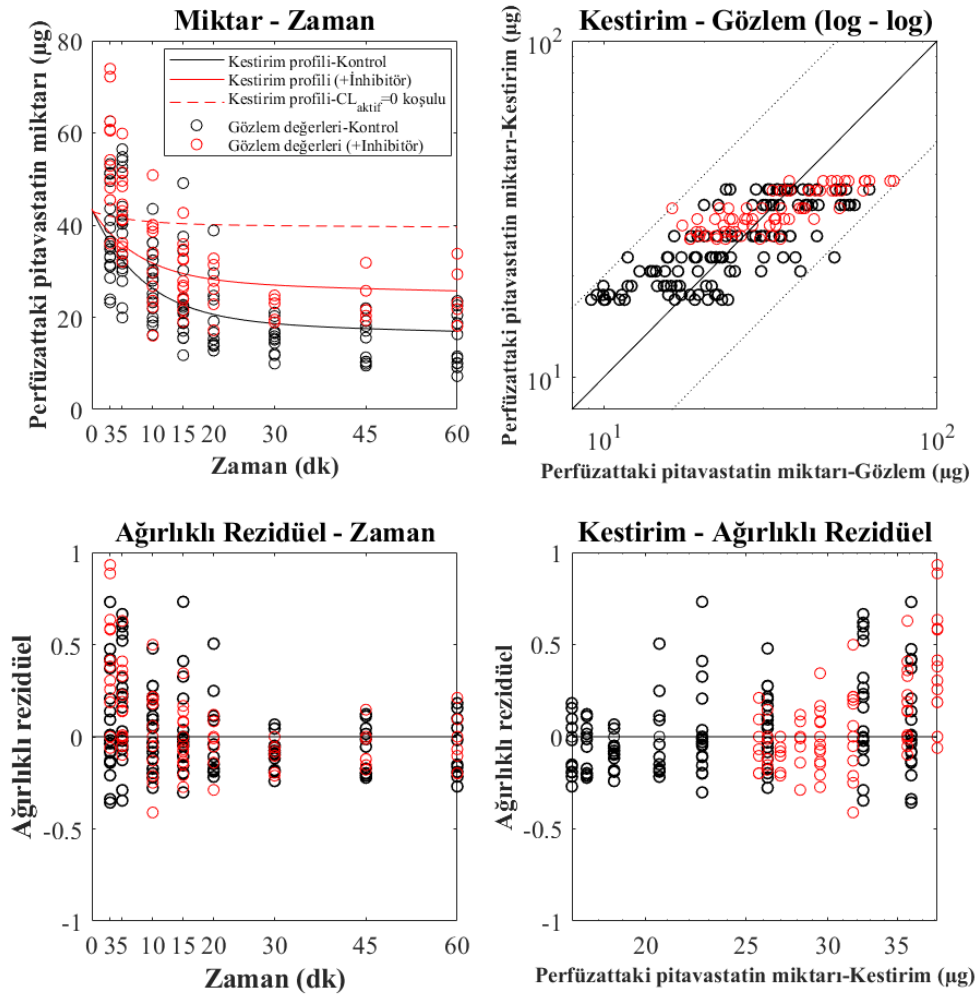
Şekil 4.52. CL_{aktif} (A), % inhibisyon (B) ve CL_{safra} (C) parametrelerinin optimizasyonunda fu_P , fu_{IS} ve CL_{pasif} parametrelerindeki belirsizliğin etkisi.

Nihai simülasyon, kestirim ile elde edilen CL değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.19.'da hem kontrol hem de inhibisyon koşullarında her kompartman için SSR değerleri belirtilmiştir.

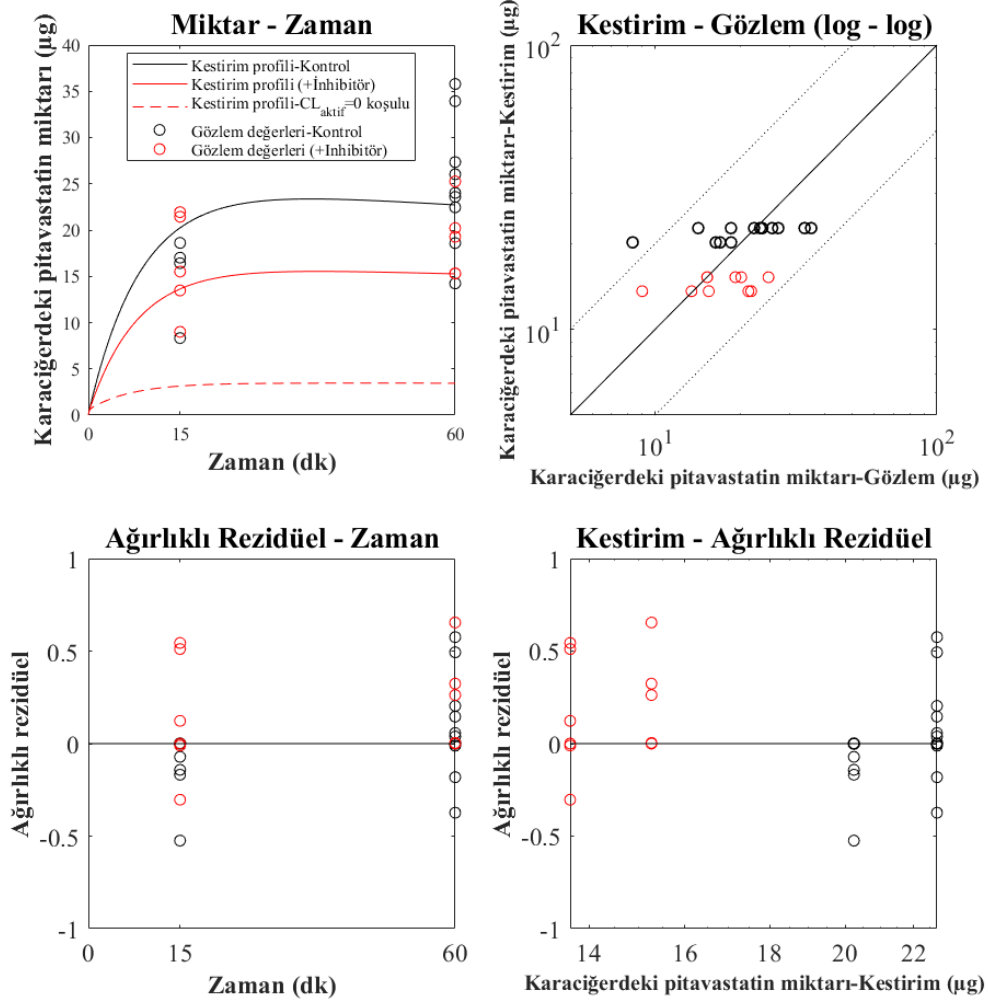
Tablo 4.19. Geliştirilen model ile elde edilen SSR değerleri.

		SSR (x10⁴)
Perfüzat kompartmanı	Kontrol	0,918
	İnhibisyon	0,847
	Toplam	1,766
Karaciğer kompartmanı	Kontrol	0,059
	İnhibisyon	0,030
	Toplam	0,089
Safra kompartmanı	Kontrol	0,002
	İnhibisyon	0,001
	Toplam	0,003
MODEL	TOPLAM	1,857

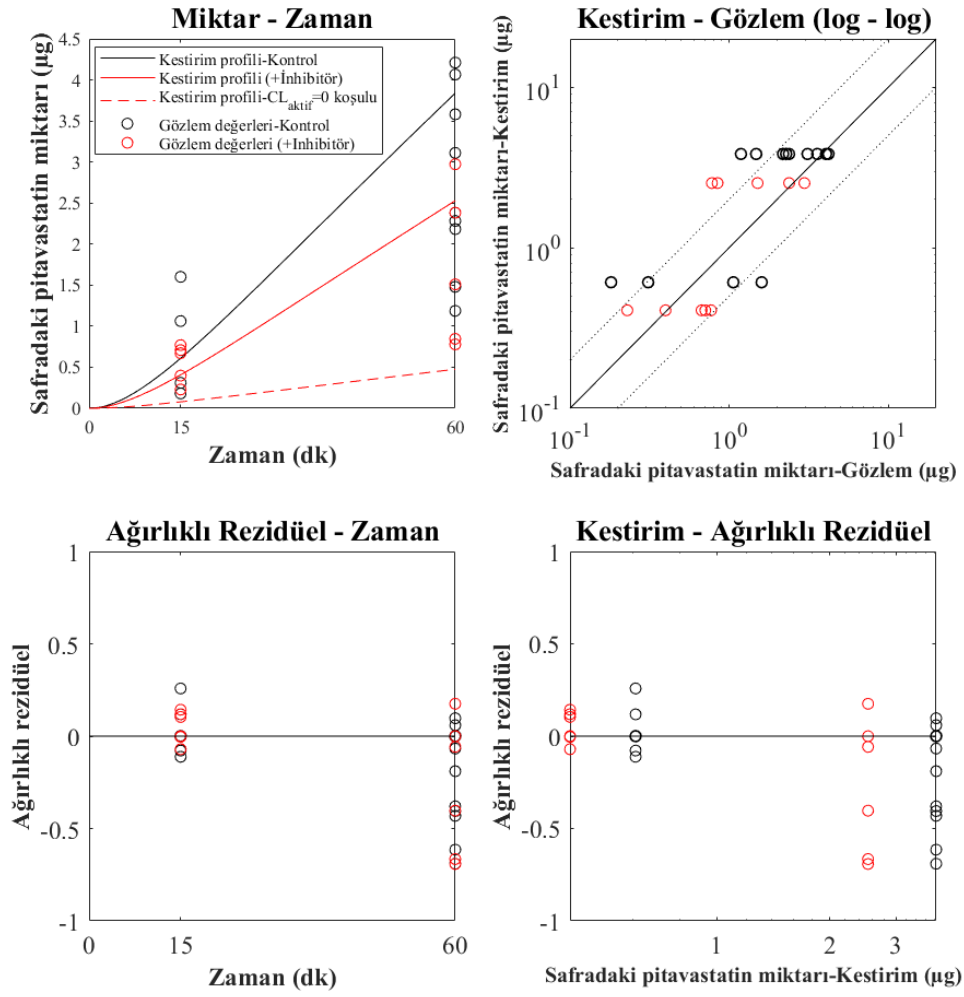
Perfüzat (Şekil 4.53.), karaciğer (Şekil 4.54.) ve safra (Şekil 4.55.) kompartmanları için simülasyon profilleri elde edilerek ön modelleme çalışmalarında aşağıdan yukarıya yaklaşımı ile elde edilen grafiklere göre gözlem verilerini daha iyi tanımlayan bir modele ulaşılarak model iyileştirme çalışmaları tamamlanmıştır.



Şekil 4.53. Perfüzasyon simülasyonu ve kontrol grafikleri (Kırmızı ve siyah renkli “o” simgeleri sırasıyla inhibisyon varlığında ve yokluğundaki gözlem değerlerini belirtmektedir).



Şekil 4.54. Karaciğer simülasyonu ve kontrol grafikleri (Kırmızı ve siyah renkli “o” simgeleri sırasıyla inhibisyon varlığında ve yokluğundaki gözlem değerlerini belirtmektedir).



Şekil 4.55. Safra simülasyonu ve kontrol grafikleri (Kırmızı ve siyah renkli “o” simgeleri sırasıyla inhibisyon varlığında ve yokluğundaki gözlem değerlerini belirtmektedir).

5. TARTIŞMA

5.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Maddelerin biyolojik örneklerdeki (ör. kan, idrar, feçes, tükürük, doku) analiz yöntemleri biyoanalitik yöntemler olarak adlandırılmaktadır (236). Tez çalışması kapsamında *in situ* sıçan karaciğer perfüzyonu çalışmasında toplanan perfüzet, karaciğer dokusu ve safra gibi biyolojik örneklerden madde analizi yapıldığından, biyoanalitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları yapılmıştır.

İlaç araştırma ve geliştirmede önemli role sahip biyoanalitik yöntemler, örneklerin toplanması, analiz yöntemi ve veri raporlanması süreçlerini kapsayan bir dizi çalışmayı kapsamaktadır. Örneklerin toplanma ve saklanma koşullarının belirlenmesi, numune hazırlama aşamalarının optimize edilerek biyolojik matriksten gelebilecek girişimlerin önlenmesi biyoanalitik yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanmasında önemli hususlardır. Yöntemlerin doğruluğunun ve geçerliliğinin ve böylece güvenilir sonuçlar elde edildiğinin gösterilmesi için analitik yöntemlerin valide edilmesi gerekmektedir. Yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip LC-MS teknikleri en çok tercih edilen biyoanalitik yöntemdir (236). Ayrıca, ligand bağlanma yöntemleri (*ligand binding assays*, LBA) farmakokinetik analizler, immünojenite ve biyobelirteç araştırmaları gibi birçok alanda kullanılabilen ve son yıllarda öne çıkan bir diğer önemli analitik yöntemdir (237).

Biyoanalitik yöntem validasyonu hususundaki güncel EMA (238) ve FDA (239) kılavuzları sırasıyla 2011 ve 2018 yılında yayınlanmıştır. EMA kılavuzu çalışma basamakları konusunda daha kesin detaylar verirken, FDA veri raporlanması bölümünü daha kapsamlı olarak vermektedir. İki yasal otoritenin güncel kılavuzları arasında farklılıklar azaltılmış olmakla birlikte terminoloji ve önerilen validasyon parametreleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin kalibrasyon standartlarındaki tekrar sayısı ve kabul kriteri sadece EMA kılavuzunda verilmektedir. Kalibrasyon standardının dışlanması FDA modelin değiştirilmemesini savunurken EMA verinin dışlanarak yeni bir kalibrasyon doğrusu oluşturulmasını önermektedir. Matriks etkisinin incelenmesi hem FDA hem EMA tarafından önerilse de sadece

EMA’da ayrıntılı olarak izlenmesi gereken protokol verilmiştir. Ayrıca sadece EMA, matriks etkisinin dışlanması için izotop işaretli iç standart kullanılabileceğini belirtmiştir. Her iki kılavuzda belirtilen koşullar LC-MS veya LBA yöntemleri ile endojen analitlerin veya biyobelirteçlerin analizi için uygulanabilir değildir (240). ICH tarafından biyoanalitik verilerin kalitesi ve tutarlılığının iyileştirilmesi amacıyla 2016 yılında harmonize bir kılavuz hazırlama çalışmalarına başlanmıştır. Kılavuzun güncel taslağı Şubat 2019’da yayınlanmış ve üye otoriteler tarafından görüş ve önerilerin alınması aşaması devam etmektedir (229). Tez kapsamında yasal otoriteler arasındaki farklılıklardan kaçınmak amacıyla ve endojen biyobelirteçlerin analiz yönteminin validasyonunda önerilere yer vermesi nedeniyle ICH M10 taslak kılavuzu esas alınmıştır.

5.1.1. Pitavastatin, KPI ve KPIII Tayini İçin LC-MS Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Pitavastatinin insan plazma örnekleri içerisindeki analizi için Kojima ve ark. tarafından normal faz HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Kantitasyon sınırı 0,5 ng/mL olan bu yöntemin analiz süresinin uzun olması (25 dk) nedeniyle farklı araştırma grupları tarafından 8 (241) ve 2,1 dk (242) analiz süresinde duyarlılığı daha yüksek (0,2 ng/mL) LC-MS/MS yöntemleri geliştirilmiştir. Pitavastatin *in vivo* çalışmalar yanında *in vitro* ilaç-ilâç etkileşimi çalışmaları için tercih edilen bir OATP substratıdır. Bu nedenle hücre kültürü ortamında ve hücre içindeki konsantrasyonun uygun yöntemlerle tayin edilmesi gerekmektedir. Menochet ve ark. pitavastatin dahil 7 Oatp substratının *in vitro* sıçan hücre kültürü örnekleri içerisinde tayininde duyarlılığı 5 nM olan bir LC-MS/MS analiz yöntemi geliştirmişlerdir (15) ancak yöntemin tam validasyonuna dair veriler sunulmamıştır.

Takehera ve ark. (243) OATP aktivitesinin araştırılmasında substrat ve endojen biyobelirteç uygulaması yaklaşımını incelemişlerdir. Bu çalışmada atorvastatin, pitavastatin, rosuvastatin ve fluvastatinin plazmadan analizi için bir LC-MS/MS yöntemi kullanılırken; bilirubin, glikokenodeoksikolat-3-sülfat ve KPI maddelerinin plazmadan analizi için ise farklı bir LC-MS/MS yöntemi kullanmıştır. Kullanılan sabit

faz ve mobil faz bileşimleri benzer olmakla birlikte eş zamanlı analiz söz konusu değildir.

Literatürde, KPI ve KPIII'ün plazma ve idrar örnekleri içerisindeki miktar tayini için geliştirilmiş HPLC (244, 245) ve LC-MS/MS (36, 212, 243, 246, 247) yöntemleri bulunmaktadır. Sabit faz olarak genellikle C18 ve C18 pentafluorofenil tipte kolonlar kullanılmıştır. Aynı molekül ağırlığına sahip KPI ve KPIII izomerlerinin ayrımında gradyan elüsyon yöntemi uygulanmış ve kolonun tipine göre farklı oranlarda 10 mM amonyum format veya su (%0,1 formik asit) ile asetonitril kullanılmıştır (212, 243, 247). Bu yöntemler arasında duyarlılık yönünden fark bulunmamıştır.

KPI ve KPIII'ün biyolojik materyalden ekstraksiyonu aşaması oldukça önemlidir. Takehera ve ark. (243) plazmaya 2:1 oranında 12 M formik asit ekleyerek etil asetat ile santrifüj işlemi uygulamıştır. Njumbe ve ark. (212) ise asetonitrille protein çöktürme, katı-sıvı ekstraksiyon ve asitlendirilmiş etil asetat ve MTBE ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri üzerinde çalışmış ve katı faz ekstraksiyon yöntemini optimize etmiştir.

Biyobelirteçlerin ilaç araştırma geliştirme süresince çok çeşitli kullanım alanları vardır ve analiz yönteminin geliştirilmesinde amaca yönelik yaklaşım takip edilmektedir (247). Tez kapsamında KPI ve KPIII'ün karaciğer dokusu ve safra örnekleri içerisinde analizi yapılmıştır. Bu biyobelirteçler biyolojik örneklerden asitlendirilmiş MTBE ile ekstrakte edilerek santrifüj işleminin üç aşamalı uygulanmasıyla geri kazanım artırılmıştır. Takehera ve ark. (243) analizlerde KPIII pikini KPI pikinin kuyruk bölümünde elde etmiş ancak insan plazmasında KPIII'ün endojen konsantrasyonunun KPI'den 6 kat daha düşük olması nedeniyle KPIII pikinin ihmal edilebileceğini belirtmiştir. Ancak tez çalışmaları kapsamında elde edilen analiz sonuçları sıçanlarda KPIII'ün daha baskın olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla KPI ve KPIII piklerinin birbirinden ayrılmasına önem verilmiştir.

Tez kapsamında LC-MS yöntemi geliştirilirken literatürde pitavastatinin tayininde kullanılan yöntemler ile KPI ve KPIII için kullanılmış yöntemler bütünsel

olarak değerlendirilmiştir. Farklı numune hazırlama yöntemleri ve farklı analiz koşulları ile çalışılarak analitik yöntem optimize edilmiş ve literatürde ilk olarak pitavastatin, KPI ve KPIII'ün eş zamanlı analizine olanak veren bir yöntem geliştirilmiştir. Perfüzyon, karaciğer dokusu ve safra için tekrarlı validasyon çalışması yürütülmüştür.

Seçicilik, özgüllük, kalibrasyon doğrusu ve sınırları, matris etkisi, analit taşınması, doğruluk, kesinlik ve enjeksiyonlar arası tekrar edilebilirlik parametreleri için ICH M10 taslak kılavuzu kabul kriterleri sağlanarak analitik yöntem valide edilmiştir.

5.1.2. Rifampisin Tayini İçin HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Resirküle *in situ* karaciğer perfüzyonu çalışmalarında rifampisin 10 ve 50 µM konsantrasyonda uygulanmıştır ve sadece karaciğer dokusundan tayin edilmiştir. Rifampisin model inhibitör olarak sıklıkla tercih edilen bir madde olduğu için benzer çalışmalarda analiz yöntemleri araştırılmıştır. Lau ve ark. tarafından rifampisin (5, 10 ve 50 µM) resirküle olarak uygulandığı *ex vivo* karaciğer perfüzyonu çalışmasında rifampisin karaciğer dokusundaki konsantrasyonu bir HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Ancak bu analiz yönteminin validasyonuna ilişkin herhangi bir çalışma yapılmamıştır (227, 228).

Tez çalışması kapsamında Lau ve ark. (227)'in çalışmalarında kullandığı iki farklı rifampisin konsantrasyonu (10 ve 50 µM) uygulanacağından ve benzer bir biyolojik örnekten (karaciğer dokusu) analiz yapılacağından ilgili HPLC yöntemi esas alınarak modifiye edilmiştir. DAD dedektör dalga boyu 340 nm'den maksimum pik şiddetinin elde edildiği 335 nm'ye değiştirilmiştir. Kaynak alınan çalışmada mobil faz olarak kullanılan fosfat tamponu: asetonitril oranı 55:45 (h/h) kullanılmıştır. Literatürde rifampisin plazmadan tayini için kullanılan ve benzer koşullara sahip bir diğer HPLC yönteminde bu oran 62:38 (h/h) olarak uygulanmış ve 7,8 dk'da rifampisin pikleri elde edilmiştir (248). Tez kapsamında ise fosfat tamponu: asetonitril

oranı 55:45 (h/h) olarak daha düşük retensiyon zamanına (5,5 dk) sahip düzgün pikler elde edilmiştir.

ICH M10 taslak kılavuzu kabul kriterleri sağlanarak, matriks etkisi ve analit taşınması etkisi dışlanmış, yöntemin seçici, özgül ve stabil olduğu gösterilmiştir. 0,61-72,91 µM konsantrasyon aralığında kalibrasyon doğrusu (R^2 : 0.9983) elde edilmiş, doğruluk, kesinlik ve geri kazanım kılavuz limitleri içerisinde bulunmuştur. Böylece rifampisin'in tayininde kullanılan biyoanalitik yöntemin validasyonu tamamlanarak karaciğer dokusundan tayin edilen rifampisin konsantrasyon değerlerinin geçerliliği ve güvenilirliği sağlanmıştır.

5.2. *In situ* Sıçan Karaciğer Perfüzyonu

Karaciğer perfüzyonu organ bütünlüğü korunduğu için çoklu dispozisyon mekanizmaları arasındaki ilişkinin incelenmesi için oldukça yararlı bir yöntemdir (227). Yöntem sadece prelinik hayvan modelleri üzerinde uygulanabilir olup çoğunlukla kemigenlerde (rodent, ör. fare, sıçan) uygulanmaktadır (23). İzole karaciğer hücrelerine kıyasla organ bütünlüğü ve safra kanalları korunduğundan daha kompleks bir yöntem olmakla birlikte gastrointestinal kanaldan absorpsiyonun ve renal eliminasyonun dışlanması nedeniyle *in vivo* koşullara göre daha basit bir sistem sağlamaktadır. Ayrıca fizyolojik parametreler deneysel koşulların düzenlenmesine (ör. perfüzyon akış hızı, protein konsantrasyonu, sıcaklık) olanak sağlamaktadır (27).

Karaciğer perfüzyonu çalışmaları hepatobilyer mekanizmaların incelenmesinde altın standart olarak tanımlanmıştır (26). Ayrıca pitavastatin için karaciğer hem farmakolojik hedef organ hem de eliminasyon organı olduğundan farklı hepatic mekanizmaların değerlendirilmesi için uygun bir yöntem olarak seçilmiştir. Yöntemin kısıtlayıcı faktörleri arasında perfüzyon işlemin zaman ve iş yükü açısından yoğunluğu, kemirgen ve tavşanlar dışı türlere uygulanamaması ve deneysel sürenin sınırlı olması (2 sa) yer almaktadır (249). Uygun koşullar sağlandığında karaciğer canlılığının 2 saat kadar idame edilebilmesi nedeniyle tez çalışması kapsamında uygulanan 20 dk kandan temizlenme süresini takiben en uzun resirküle perfüzyon süresi 60 dk olarak belirlenmiştir. Bu süre sonunda ilacın tam olarak karaciğerden

temizlendiği varsayılsa dahi yeniden inhibitör uygulanarak aynı sıçanda ikinci bir 60 dk'lık çalışma uygulanması mümkün olamamaktadır. Bu durum kontrol ve inhibisyon grupları arasındaki birebir karşılaştırmayı sınırlamaktadır ve değerlendirme yapılırken hayvanlar arasındaki varyasyon göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Deney sırasında sabit bir perfüzyon akış hızı ve basıncının belirlenmesi fizyolojik koşulların ve deneyler arasında tekdüzeliğin sağlanması için önem taşımaktadır. Perfüzyon basıncının düşük olması perfüzyonun karaciğer içerisinde homojen bir dağılım gösterememesine neden olabilir, ayrıca düşük akış hızında oksijen taşıma kapasitesi düşmektedir. Ancak yüksek akış hızı sinüzoidal endotelial hücreler arasındaki fenestrelere genişlemesine ve karaciğer dokusunda hasara neden olabilmektedir (23). Bu nedenle akış hızı en fazla 5 mL/dk/g karaciğer olarak ayarlanmaktadır (147). Karaciğer perfüzyonu çalışmaları (27, 28, 146, 147, 227) incelendiğinde genellikle 15-40 mL/dk akış hızları kullanıldığı görülmektedir. Tez kapsamında endotelial hasar riski göz önünde bulundurularak gerekli oksijen taşıma kapasitesini sağladığı bilinen 15 mL/dk hızında perfüzyon uygulanmıştır (147). Karaciğerin kandan temizlenmesi ve perfüzyon ortamı ile şartlanması için 20 dk'lık bir perfüzyondan sonra ilaç uygulaması yapılmıştır. İnhibitör ilaçla ön perfüzyon işlemi literatürle uyumlu olarak 5 dk ve substrat uygulamasını takiben toplam perfüzyon süresi 60 dk olarak belirlenmiştir (227). Mekanistik modelin güçlendirilmesi için ara zaman noktasında elde edilecek verilere ihtiyaç olduğu için çalışma substrat uygulamasını takiben toplam perfüzyon süresi 15 dk olacak şekilde deneyler tekrarlanmıştır.

5.2.1. Pitavastatinin Karaciğer Dispozisyonu ve Rifampisin Etkisi

İn situ karaciğer perfüzyonu çalışmaları iki farklı perfüzyon süresinde (15 dk ve 60 dk) pitavastatin (kontrol grubu) ve iki farklı konsantrasyonda rifampisin (10 ve 50 µM; inhibitör grubu) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki perfüzyon süresinde de 10 µM rifampisin varlığında pitavastatin uygulamaları sonucunda hiçbir kompartmanda pitavastatin düzeyleri arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır ($p > 0,05$). Ancak 50 µM rifampisin varlığında EAA₀₋₆₀ değerleri arasında 1,4 katlık anlamlı bir fark ($p < 0,05$) elde edilmiştir.

ECCS'ye göre 1B ve 3B sınıfında bulunan ilaçlar için hız kısıtlayıcı basamak hepatik *influx* olduğundan OATP1B aktivitesi için umut verici prob substratlar olarak düşünülmektedir. McFeely ve ark. (250) OATP1B inhibisyonuna duyarlılıkları açısından substratları 0'dan 6'ya kadar derecelendirmiştir. Bu sıralamada klinik çalışmalarda rifampisin varlığında (rifampisin ile çalışma yok ise siklosporin, gemfibrozil veya farmakogenomik polimorfizm varlığında) ve yokluğunda EAA düzeyleri arasındaki orana ($EAA_{\text{inhibisyon}}/EAA_{\text{kontrol}}$) göre substratlar zayıf duyarlı ($1: 1.25 \leq EAA_{\text{inhibisyon}}/EAA_{\text{kontrol}} < 2$), orta duyarlı (2-3: $2 \leq EAA_{\text{inhibisyon}}/EAA_{\text{kontrol}} < 5$), duyarlı (4-5: $5 \leq EAA_{\text{inhibisyon}}/EAA_{\text{kontrol}} < 10$) ve güçlü duyarlı (6: $10 \leq EAA_{\text{inhibisyon}}/EAA_{\text{kontrol}}$) olarak sınıflandırılmıştır. En yüksek EAA oranları ECCS 1B (5.0-10.5) ve 3B sınıfındaki ilaçlar için (5.0-12.0) kaydedilmiştir. ECCS'ye göre Sınıf 1B'de yer alan pitavastatin için klinik çalışmalarda rapor edilmiş en yüksek oran 6,67'dir. Gözlenen en yüksek farmakogenomik etki ise pitavastatinin EAA düzeyinde inhibitör etkisi olmaksızın sadece OATP1B polimorfizmi varlığında 3,85 katlık bir artış ile ifade edilmiştir (250).

ECCS'ye göre Sınıf 1B'de yer alan bir diğer Oatp substratı atorvastatin için klinik çalışmalarda rapor edilmiş en yüksek oran ise 12,0'dır. Ancak Lau ve ark. (227) 50 μM rifampisin ile birlikte perfüzyon sonucu atorvastatin için $EAA_{\text{inhibisyon}}/EAA_{\text{kontrol}}$ oranını 2,5 olarak kaydetmiştir.

Pitavastatin için tez kapsamında kaydedilen $EAA_{\text{inhibisyon}}/EAA_{\text{kontrol}}$ oranına (1,4) göre pitavastatinin duyarlılığı karaciğer perfüzyonu modelinde zayıf duyarlı olarak değerlendirilebilir. Ancak atorvastatinin de klinik çalışmalara göre duyarlılığı azalmıştır. Bu nedenle pitavastatinin duyarlılığı yanında deney koşullarında rifampisin'in inhibisyon etkinliğinin de değerlendirilmesi gerekmektedir.

Rifampisin sıçan hepatositlerinin sinüzoidal (bazolateral) membranında bulunan Oatp1 ve Oatp2- aracılı organik anyon taşımalarını inhibe etmekte (225) ve diğer *influx* taşıyıcılarına göre Oatp1/2 taşıyıcılarına karşı daha yüksek bir özgüllük göstermektedir (226).

OATP/Oatp aracılı taşıma mekanizması sodyum, klorür ve potasyum gradyanlarından, membran potansiyeli ve ATP seviyelerinden bağımsızdır. OATP/Oatp'lerin çift yönlü bir taşıma yaparak organik anyonları hücre içine alırken bikarbonat, glutatyon ve/veya glutatyon-S-konjugatları gibi molekülleri hücre dışına taşıdığı düşünülmektedir (251).

OATP/Oatp aracılı taşıma mekanizmasının tam olarak aydınlatılabilmesi için yapılan çalışmalarda hem insan hem de rodentlerde hücre dışına taşınan karışık iyon olarak bikarbonat taşınmasının veya glutatyon taşınmasının öne çıktığı görülmektedir (122). Farklı çalışmaların sonuçlarının tekrar edilememesi nedeniyle günümüzde taşıma mekanizmasına giren moleküller kesin olarak belirlenememiş olsa da her iki tür için aynı/benzer hipotezlerin desteklenmesi taşıma mekanizmasının türler arasında aynı/benzer olduğunu göstermektedir.

Karaciğer perfüzyonu çalışmalarında rifampisin karaciğer dokusunda birikimi pitavastatin varlığından bağımsız olarak yüksek konsantrasyonda (50 μM) uygulandığında her iki perfüzyon süresi (15 dk ve 60 dk) için düşük konsantrasyona (10 μM) göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Lau ve ark. (227) tarafından izole sıçan perfüzyon sisteminde atorvastatin varlığında 10 μM ve 50 μM rifampisin ile 1 saatlik resirküle perfüzyon sonunda rifampisin karaciğer konsantrasyonu sırasıyla $18,4 \pm 3,6 \mu\text{M}$ ve $121 \pm 19 \mu\text{M}$ ($X \pm SS$) olarak tespit edilmiştir. Tez çalışması kapsamında pitavastatin varlığında tespit edilen rifampisin konsantrasyonu değerlerinin (10 μM ve 50 μM için sırasıyla $23,57 \pm 17,17$ ve $202,6 \pm 48,55 \mu\text{M}$) Lau ve ark. tarafından (227) tayin edilen değerlerden sırasıyla 1,3 ve 1,7 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu farklılığın her iki çalışmada kullanılan deneysel koşullardaki farklılıklara (*ex vivo/in situ*, perfüzyon hızı) ve sıçanlar arasındaki varyasyon gibi faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Estradiol 17 β -D-glukuronid maddesinin substrat olarak kullanıldığı ve *in vitro* sıçan hepatositleri kullanılarak yapılan bir *in vitro* çalışmada, rifampisin sıçan Oatp taşıyıcıları için IC₅₀ değeri 32,7 μM olarak bulunmuştur. Ayrıca 1,22, 12,2 ve 122 μM (1, 10, 100 ppm) rifampisin konsantrasyonları için sıçan karaciğer homojenatı içerisinde serbest fraksiyonu sırasıyla $0,0626 \pm 0,0039$, $0,0496 \pm 0,0009$ ve $0,0538 \pm$

0,0007 ($X \pm SS$) olarak bulunmuştur (29). Rifampisin en yüksek dozunda (80 mg/kg) bile serbest plazma konsantrasyonunun *in vitro* IC50 değerine ulaşmadığı ancak *in vivo* inhibisyon çalışmasında sıçan Oatp taşıyıcılarının 20 ve 80 mg/kg rifampisin iv uygulamasını takiben valsartanın hepatik alımının inhibe edildiği gösterilmiştir (29). Bu değerler Imaoka ve ark. (30)'ın bulduğu değerler ile tutarlıdır. Sıçan hepatositleri kullanılarak yapılan bir çalışmada rifampisin 1 μ M konsantrasyonda pravastatinin hepatositler içine alımını %50 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. (31). Rifampisin için farklı inhibisyon sabiti değerlerinin bulunması nedeniyle rifampisinin substrata özgü inhibisyon özelliği gösterdiği kabul edilmektedir. Tez çalışması kapsamında pitavastatinin Oatp aracılı taşınmasının rifampisin tarafından inhibisyonu *in situ* sıçan karaciğer perfüzyonunda literatürde ilk olarak incelenmiştir. Rifampisinin pitavastatinin hücre içine alımını tam olarak inhibe edememesinin sebepleri arasında substrata özgü inhibisyon özelliğinin başta geldiği düşünülmektedir.

OATP1B taşıyıcılarının fonksiyonu ilaca bağlı inhibisyon dışında genetik varyasyon, gen transkripsiyonu, post-translasyonel modifikasyonlar (ör. glikozilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon) ve protein yıkımı gibi aşamalardaki değişikliklerden etkilenmektedir (122).

Hepatositlerin OATP1B inhibitörleri ile ön inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra inhibitörlerin ortamdaki uzaklaştırılmasından sonra da inhibisyon etkisinin devam ettiği gösterilmiştir (123). Ön inkübasyon uygulanması ile siklosporin A (124-126), rifampisin ve dasatinib (127)'in OATP1B1 ve OATP1B3 üzerindeki inhibisyon potansi artırılmıştır (124, 127). Ayrıca ön inkübasyon yaklaşımı uygulandığında substrat ve inhibitörün eş zamanlı uygulanmasına kıyasla etkileşimin *in vivo* kestirimdeki başarısı artırılmıştır (124, 127). Ön inkübasyonun OATP1B taşıyıcı proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonları üzerinde bir etkisi olduğu düşünülmektedir (122). Sandviç kültür insan hepatositlerinde yapılan bir çalışmada protein kinaz C aktivatörü kullanılarak OATP1B3 fosforilasyonunun indüklenmesiyle OATP1B3'ün aktivitesinin azaldığı bulunmuştur (252). Ön inkübasyon bağımlı OATP1B inhibisyonu ile post-translasyonel modifikasyonlar arasındaki ilişkinin aydınlatılabilmesi için bu taşıyıcı proteinlerin fonksiyonel fosforilasyon ve

ubikitinasyon bölgelerinin MS temelli yöntemlerle belirlenmesi gibi ileri çalışmalar gerekmektedir (122).

Henüz mekanizması tam olarak aydınlatılamasa da mevcut bilimsel bilgiler ışığında OATP1B için K_i/IC_{50} tespitinde ön inkübasyon uygulamasının yararlı olduğu görülmektedir. Bu yaklaşım FDA ve PMDA tarafından kabul görerek hücre kültürü çalışmalarında 30 dakika ve üzerinde inhibitör ile ön inkübasyon işleminin uygulanması ilgili kılavuzlarda önerilere alınmıştır (3, 6).

Ön inkübasyon işlemi sıçan karaciğer perfüzyonu çalışmalarında substrat ilacın eklenmesinden önce 5 dk ön-perfüzyon aşaması olarak aktarılmıştır (27, 227). Lau ve ark. (227) *ex vivo* sıçan karaciğer perfüzyonu sistemi kullandığından yüksek perfüzyon akış hızı kullanmıştır (40 mL/dk) ve atorvastatinin karaciğer dispozisyonunda Oatp inhibisyonunun sağlandığını göstermiştir. Hobbs ve ark. (27) ise *in situ* karaciğer perfüzyonunda perfüzyon akış hızı 20-25 mL/dk olarak kullanmış ve 100 μ M konsantrasyonda rosuvastatinin *influx* mekanizması inhibe edilememiştir. Tez çalışması kapsamında da ön perfüzyon yaklaşımı takip edilerek rifampisin ile 5 dk ön perfüzyon işlemi uygulanmıştır. Ancak perfüzyon akış hızının 15 mL/dk olması nedeniyle ön perfüzyon etkisiyle rifampisin inhibisyon potansi artırılmasındaki etkinliğin düşük olabileceği değerlendirilmiştir.

Pitavastatin için modelden bağımsız yöntemle tayin edilen farmakokinetik parametreler incelendiğinde (Bkz. Tablo 4.14.) kontrol grubunda 15 ve 60 dk perfüzyon sonunda pitavastatinin sırasıyla %54 ve %33'ü perfüzyon ortamı içinde kalmaktadır. Bu değerler inhibisyon grubunda ise sırasıyla %50 ve %37'dir. Bu durum inhibitör aktivitesinin 15 dk'lık perfüzyon grupları için belirgin olmadığını göstermektedir. Karaciğer ve safra kompartmanlarındaki pitavastatin oranı ise 60 dk perfüzyonu sonunda inhibitör varlığında anlamlı düşüş göstermiştir ($p < 0,05$). Karaciğer/safra oranları 60 dk perfüzyon sonunda hem kontrol hem de inhibisyon grupları için azalmaktadır. Bu durum pitavastatinin zamanla safra ile atılması ile açıklanabilir. Ayrıca inhibisyon grubunda kontrol grubuna göre karaciğer/safra oranının daha düşük olması karaciğere giren pitavastatin miktarındaki azalmaya bağlı

olmaktadır. Pitavastatinin kontrol ve inhibisyon varlığında CL_H ve F_H değerleri (6 mL/dk ve 0,6) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

5.2.2. Oatp Fonksiyonunun İzlenmesinde KPI ve KPIII Endojen Biyobelirteçlerinin Kullanımı

İlaç-ilaç etkileşimlerinin değerlendirilmesinde taşıyıcı substratlarına olan ihtiyacı azaltmak amacıyla endojen biyobelirteç moleküllerin kullanımını son yıllarda öne çıkan araştırma konularından biri olmuştur (191, 243, 253). KPI ve KPIII'ün endojen biyobelirteç olarak kullanımında çeşitli üstünlükleri arasında bazal seviyeleri arasında ırk veya etnik farklılıkların görülmemesi, bazal düzeylerinin sirkadyen ritimden etkilenmemesi ve metabolik olarak stabil moleküller olmaları yer almaktadır (216).

KPI ve KPIII'ün insan OATP1B1 ve OATP1B3 sinüzoidal *influx* taşıyıcıları ile MRP2 ve MRP3 taşıyıcıları tarafından taşındığı bilinirken hayvan modellerinde önemli rol oynayan taşıyıcı proteinler üzerinde az sayıda çalışma (Bkz. 2.6.2. Koproporfirin I ve Koproporfirin III) bulunmaktadır. KP'lerin renal ve safra yoluyla itrah mekanizmalarının türler arasında değişiklik göstermesi ve bunun yanında taşıyıcı kinetikleri arasındaki farklılıklar prelinik hayvan verilerinin insan KP'leri için translasyonunu sınırlamaktadır (216).

İnsanlarda KPI'in plazma düzeyi KPIII'e baskındır (243). Sıçanlarda ise KPIII'ün serum, idrar, karaciğer, safra ve feçes düzeyleri KPI'den daha yüksektir. Safrada KPIII'ün toplam KPI ve KPIII miktarına oranı %88,4 düzeyinde bulunmuştur (216). Tez bulgularında da görüldüğü gibi (Bkz. 4.3.2. Koproporfirin I/III) KPIII karaciğer ve safradaki miktarı literatürle uyumlu olarak KPI'ten daha yüksek seyretmektedir.

Safradaki KPIII oranı kontrol grubunda %64,7 (15 dk perfüzyon sonunda) ve %76,2 (60 dk perfüzyon sonunda)'dir. Bu oranlar 10 μ M rifampisin varlığında sırasıyla %83,9 ve %87,3'e 50 μ M rifampisin varlığında ise %87,6 ve %93,4'e çıkmaktadır.

Karaciğerdeki KPIII oranı da KPI'e göre daha yüksektir. Kontrol grubunda KPIII oranı %58,5 (15 dk perfüzyon sonunda) ve %61,1 (60 dk perfüzyon sonunda)'dir. Bu değerler 10 µM rifampisin varlığında sırasıyla %85,3 ve %57,9 ve 50 µM rifampisin varlığında ise %82,9 ve %81,9 olarak bulunmaktadır.

Bu durum rifampisin ile Oatp inhibisyonunun KPI taşınması üzerinde daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak perfüzyat kompartmanındaki düzeylerinin bilinmemesi nedeniyle bu yorum desteklenememektedir. İnhibisyon durumunda safrada KPI düzeyinin daha düşük bulunmasının karaciğerdeki KPI düzeyinin düşük olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Takehera ve ark. (243) OATP1B substratları ile OATP1B endojen biyobelirteçleri için rifampisin varlığında doz bağımlı EAA artışlarını incelemiştir. EAA değerleri yönünden maddeler arasında bir korelasyon bulunup bulunmadığı değerlendirildiğinde atorvastatin ile pitavastatin arasında bir korelasyon (R^2 : 0,74) elde edilmiştir. Ayrıca atorvastatin ile endojen biyobelirteçler KPI, glikokenodeoksikolat-3-sülfat ve konjuge bilirubin arasında bir ilişki olduğu (R^2 : 0,54-0,70) gösterilmiştir.

Bu doğrultuda tez çalışmasında karaciğer ve safra kompartmanlarındaki miktar bulguları ve karaciğer/safra oranları yönünden pitavastatin ve KP'ler arasındaki ilişki incelenmiştir. Şekil 4.21.'de görüldüğü gibi KPI için kontrol koşulunda karaciğer ve safra miktarları yönünden R^2 : 0,83 düzeyinde bir ilişki gösterilirken her bir sıçan için karaciğer/safra oranı yönünden güçlü korelasyon (R^2 : 0,95) olduğu bulunmuştur. İnhibisyon varlığında ise her bir karşılaştırma için korelasyonun değişmesi 50 µM rifampisinin pitavastatin ve KPI üzerinde aynı etkiyi oluşturmadığını göstermektedir.

KPIII için ise kontrol koşulunda sadece karaciğer düzeyleri arasında pitavastatin ile anlamlı bir doğrusal ilişki gösterilmiştir (R^2 : 0,92). Safrada ise R^2 değerinin 0,03 bulunması verilerin doğrusal ilişkiye uymadığını göstermektedir. Karaciğer/safra oranı yönünden ise R^2 : 0,71'lik bir ilişki olması, safra düzeyleri arasındaki farkın sıçanlar arasındaki varyasyondan kaynaklandığına işaret etmektedir. İnhibisyon koşulunda ise KPI'den farklı olarak KPIII için safra miktarları (R^2 : 0,92)

ve karaciğer/safra oranı (R^2 : 0,97) yönünden pitavastatin ile güçlü bir korelasyon gösterilmiştir.

Kontrol ve inhibisyon koşullarında bilinen OATP substratları ile endojen biyobelirteçlerin düzeylerinin karşılaştırılması ile bu maddelerin OATP inhibisyon çalışmalarındaki kullanım potansiyeli gösterilmektedir. Ancak insanlarda karaciğer ve safra düzeylerinin belirlenmesi kısıtlı olup bu karşılaştırma ancak plazma seviyeleri için yapılmaktadır. Tez kapsamında ise literatürde ilk olarak doku ve safra konsantrasyonları açısından bir Oatp substratı ile Oatp endojen biyobelirteçleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu bulgular gelecek çalışmalar için umut verici olup sonuçların daha geniş örneklem üzerinde zenginleştirilmesi gerekmektedir. Ancak endojen biyobelirteç düzeylerinin izlenmesi yaklaşımının prelinik hayvan modellerinde de uygulanabileceği önerilmektedir.

5.3. Mekanistik Model Geliştirme ve Simülasyon

5.3.1. Ön Modelleme Çalışmaları

Taşıyıcı aracılı farmakokinetik ve ilaç-ilaç etkileşimleri çalışmalarında karaciğer kompartmanı için çeşitli model yaklaşımları (ör. *well-stirred* model, perfüzyon bağımlı, permeabilite bağımlı modeller) kullanılarak başarılı kestirimler sağlanmaktadır.

Tez kapsamında mekanistik model tasarımında üzerinde durulan önemli noktalar yöntemin anatomik ve fizyolojik olarak karaciğeri yansıtması, karaciğer perfüzyonundan elde edilen verilerinin model ile analiz edilebilir olması, pitavastatinin karaciğer dispozisyonunda rol oynayan mekanizmaları içermesi ve kompartmanlar arasındaki madde geçiş hızı dikkate alınarak alt kompartman sayısının belirlenmesidir.

Geliştirilen modelde karaciğer intrasellüler kompartmanı hepatositlerin hücre içi bölgesini, ekstrasellüler kompartman ise sinüsler ve Disse boşluğunu (Bkz. 2.1. Karaciğer ve Karaciğerin Yapısı) ifade etmektedir. Perfüzyon kompartmanı plazmayı

yansıtmaktadır. Burada dozlama perfüzet kompartmanı içerisine yapılmakta ve portal ven aracılığıyla karaciğere ulaşmaktadır. Perfüzet ve karaciğer ekstraselüler kompartmanı arasındaki madde taşınması tanımlanırken sinüzoidal endotelial hücrelerin fenestrelili yapısı göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca hepatositlerin kanaliküler membranında oluşan safra kanalcıkları yapısı dikkate alınarak safra kompartmanı tanımlanmıştır.

Karaciğerden çıkan perfüzyon ortamı yeniden sirküle edilerek yeniden karaciğere döndürülmektedir. Mekanistik modellerin diferansiyel denklemlerinde (Bkz. 3.8.1. Mekanistik Model Tasarımı) bu dolaşım dikkate alınmıştır. Pitavastatinin kompartmanlardaki serbest fraksiyonunun yanı sıra pitavastatinin karaciğer dispozyonunda rol oynayan farmakokinetik parametreler belirlenmiştir. Bu parametreler hepatositlerin sinüzoidal membranında yer alan Oatp taşıyıcıları aracılı pitavastatin taşınması (CL_{aktif}) ve pitavastatinin pasif difüzyonuna ilişkin CL parametreleri (CL_{pasif}) ile hepatositlerin kanaliküler membranında tanımlanan CL_{safra} 'dır. Pitavastatinin sıçanlardaki CL_{aktif} 'i için literatürde bulunan değerler 171,36 mL/dk (15) ile 1098 mL/dk (166) olup birbirinden 6 kat farklılık arz etmektedir. *In vitro* sıçan hepatositlerinde (15) çoklu indikatör seyreltme yöntemi esaslı karaciğer perfüzyonu çalışmasına göre *in vitro* sistemlerde daha düşük CL_{aktif} kestirimi bu sistemlerde taşıyıcı aktivitesinin daha düşük olduğunu doğrular niteliktedir. Ancak çalışmalarda kullanılan sistemler ve kullanılan hücre/organ kaynakları arasında fark olduğu da göz ardı edilmemelidir. CL_{safra} için ise aynı çalışmada iki farklı değer rapor edilmiştir. Sıçanlarda *in vivo* çalışma sonucunda CL_{safra} hesaplanırken değerlerin plazma pitavastatin düzeylerine oranlanmasıyla $4,55 \pm 0,13$ mL/dk/kg (ölçeklendirme: 1,365 mL/dk), karaciğer dokusu düzeylerine göre normalize edilmesiyle $0,248 \pm 0,042$ (ölçeklendirme: 0,074 mL/dk) değeri elde edilmiştir. Safra kompartmanı karaciğer kompartmanı ile sadece kanaliküler membranla ayrılmaktadır. Fizyolojik olarak kompartmanların yakınlığı düşünüldüğünde ikinci değerin pitavastatinin *in vivo* safra klerensi değerine daha yakın olabileceği düşünülmüştür. Ancak her iki parametre için her iki değer de ön modelleme çalışmaları kapsamında değerlendirilmiştir.

Ön modelleme çalışmaları kapsamında, karaciğer kompartmanının 1 ekstraselüler ve 1 intraselüler kompartman olarak belirtildiği tek alt kompartman

modeli ile 5 ekstraselüler ve 5 intraselüler kompartman olarak ayrıldığı çoklu alt kompartman modeli karşılaştırılmıştır (Şekil 4.23.-4.34.). Literatürde her iki yaklaşıma ait uygulama örnekleri bulunmaktadır. Çoklu alt kompartman modelinde bazı çalışma grupları alt kompartman sayısını 5 bazı çalışma grupları ise 7 olarak almaktadır. Bu değer ampirik bir değerdir. Uygulanan işlem yalnızca kinetik parametrelerin basit olarak ilgili alt kompartman sayısına bölünmesi ve böylece model içerisinde madde geçiş hızının düşürülmesidir. Ayrıca çoklu alt kompartman modellerinde ekstraselüler kompartmanlar kendi aralarında seri olarak bağlanırken intraselüler kompartmanlar arasındaki madde geçişi ihmal edilmektedir.

Çoklu alt kompartman modeli ilk olarak Watanabe ve ark. tarafından pravastatinin hepatik dispozisyonunu incelemek üzere geliştirilmiştir. Çoklu alt kompartman modeli ile hepatik dispozisyonun karaciğer dispersiyon modeline yaklaştırılması amaçlanmıştır. Pravastatin hepatik klerensi yüksek olup hızı kan akış hızına bağlıdır. Bu nedenle dispersiyon modeli pravastatinin sıçanlardaki hepatik dispozisyonu tanımlamak için uygun bulunmuştur. Çoklu alt kompartman modelindeki kompartman sayısı ise hepatik biyoyararlanımın dispersiyon modeli ile hesaplanan hepatik biyoyararlanım ile karşılaştırılmasıyla hesaplanmıştır (177). Bir başka ifade ile alt kompartman sayısına değerler atanarak model ile hesaplanan hepatik klerensin dispersiyon modeli ile hesaplanan hepatik klerense en yakın bulunduğu sayı alt kompartman sayısı (5) olarak belirlenmiştir. Ancak bu değer farklı hepatik klerense sahip ilaçlar için farklı olabilmektedir. Ayrıca hepatik klerensi daha düşük ilaçlar için kan akış hızı yanında permeabilite de hız kısıtlayıcı basamak olmaktadır (40, 158, 159).

Birçok araştırma grubu bu çalışmaya (27, 28, 144) atıfta bulunarak 5 alt kompartman yaklaşımını benimsemiştir. Çoklu alt kompartman modeli birçok hepatik klerens kestiriminin iyileştirildiği çalışma örnekleri (144) olmakla birlikte bu yaklaşımın farklı özellikteki ilaçlara uygulanarak etkinliğinin netleştirilmesi ve karaciğer alt kompartman sayısının belirlenmesi gerekmektedir (13).

Pitavastatin hepatik eliminasyonundaki hız kısıtlayıcı basamak aktif taşımadır (166). Tez çalışması kapsamında her iki kompartman (tek alt kompartman ve 5 alt

kompartman) modelinin veri simülasyonundaki başarısı karşılaştırılarak 5 alt kompartman modelinin pitavastatinin karaciğer dispozisyonu tanımlamada bir üstünlük sağlamadığı gösterilmiştir. Bu sonuç literatürde yer alan farklı kinetik değerlerden hareketle 4 farklı senaryo için aşağıdan yukarıya yaklaşım ile elde edilen simülasyonların tamamında görülmüştür. Bu nedenle daha basit bir model olan tek alt kompartman modeli ile çalışmalara devam edilmiştir.

Tek alt kompartman modelinde aşağıdan yukarıya yaklaşım ile en iyi simülasyon en küçük toplam SSR değeri ile ($1,1565 \times 10^4$) 2 numaralı senaryoda (CL_{aktif} : 171,36, CL_{pasif} : 15,696, CL_{safra} : 1,365 mL/dk) elde edilmiştir. Ancak 1 numaralı senaryoda karaciğer ve safra kompartmanları için SSR değerlerinin daha düşük olması nedeniyle toplam SSR değeri $1,1646 \times 10^4$ olan 1 numaralı senaryo en başarılı simülasyon olarak değerlendirilmiştir. Ancak perfüzyon ve safra kompartmanlarındaki simülasyon profillerinin deneysel profillerin sırasıyla üzerinde ve altında seyrettiği görülmüştür. Bu durum pitavastatinin aktif klerensinin 171,36 mL/dk'dan, safra klerensinin ise 0,074 mL/dk'dan daha yüksek olduğuna işaret etmektedir.

Ön modelleme çalışmalarında farklı senaryolar kullanıldığında pitavastatinin karaciğer dispozisyonu için birbirinden farklı simülasyon profilleri elde edildiği görülmüştür. Bu durum model içerisinde sabit tutulan girdi parametrelerinin model kestirimleri üzerindeki belirgin rolüne işaret etmektedir.

5.3.2. Belirsizlik ve Duyarlılık Analizleri

Ön modelleme çalışmalarında girdi parametrelerinin model sonuçları üzerine etkisinin önemli olduğu gösterilmiştir. Ancak her bir kompartman için model ile elde edilen profillerin hangi girdi parametrelerindeki belirsizlikten baskın olarak etkilendiğinin tespit edilmesi için belirsizlik ve duyarlılık analizleri yapılmıştır.

İlaça ait parametreler için farklı *in vivo/in vitro/in situ* çalışmalar referans alınmıştır. Ancak model ilacın karaciğer dispozisyonunun daha net bir şekilde anlaşılabilmesi için sabit bir parametre seti yerine bu parametrelerin belirsizlikleri göz

önünde bulundurulurken belirli sınırlar dahilinde bir dizi simülasyonun yapılarak değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Girdi parametrelerindeki belirsizlik dereceleri (Bkz. Tablo 3.7.) incelendiğinde deneysel olarak kontrol edilmiş olan Q_P ve V_P parametreleri için en düşük belirsizlik (%5), V_{ES} ve V_{IS} değerleri için kaynak alınan çalışmada rapor edilmiş deneysel varyasyondan hareketle orta seviye belirsizlik (%10) ve serbest fraksiyon değerleri (f_{UP} , f_{US}) ile CL_{pasif} için yüksek belirsizlik (%30) belirlenmiştir. CL_{aktif} ve CL_{safra} için ise kaynaklardaki değerler geniş bir aralıkta olduğundan bu değerler sınır değerler olarak alınmıştır. Ayrıca ön modelleme çalışmalarında elde edilen simülasyon profilleri gerçek değerlerin bu referans değerler arasında olduğunu göstermiştir.

Belirsizlik varlığında çıktı parametrelerinin (EAA_{0-15} , EAA_{0-60} , $A_{15, karaciğer}$, $A_{60, karaciğer}$, $A_{15, safra}$ ve $A_{60, safra}$) kestirim değerlerinin ($n=1000$) normal dağılıma uymadığı gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.36.). $A_{15, karaciğer}$ değerleri negatif çarpık dağılım gösterirken $A_{60, karaciğer}$ değerleri dağılımının daha simetrik bir profile yaklaşması model kestirimlerinin zamana bağımlı olduğunu göstermiştir. Bu durum karaciğer kompartmanında zamana bağlı olarak aktif ve pasif taşıma yanında safraya itrah mekanizmasının katkısının artmış olmasına bağlı olabilir. Gözlem değerlerinin ortalaması çıktı parametrelerinin dağılımı içerisinde değerlendirilmiştir. EAA_{0-15} haricinde tüm parametreler simülasyon dağılımı sınırları içerisinde bulunmuştur. Ancak $A_{60, karaciğer}$ haricinde kestirimlerin ortalamasının gözlem değerlerinin ortalaması ile uyumlu olmadığı görülmektedir (Bkz. Şekil 4.37.).

Girdi ve çıktı parametreleri arasındaki doğrusal olmayan monotonik ilişki (Bkz. Şekil 4.38.-4.40.) ve değerlerin normal olmayan dağılıma uyması nedeniyle global duyarlılık analizi olarak kısmi sıra korelasyon testi uygulanmıştır. Bu testin hedefi kestirimlerdeki belirsizliğine katkıda bulunan anahtar parametreleri belirlemektir (235).

Kısmi sıra korelasyon testinde verilere sıra dönüşümü uygulanarak bir sıra korelasyon katsayısı değeri (PRCC) elde edilir. Verilere bu dönüşüm uygulanmadığında girdi ve çıktı parametrelerinin nominal değerleri arasındaki

regresyondan Pearson korelasyonu elde edilir. Ancak Pearson korelasyonu doğrusal olmayan ilişkilerin değerlendirilmesi için uygun değildir. Sıra dönüşümü uygulanmasındaki amaç doğrusal olmayan verilerin etkisinin azaltılmasıdır. Özellikle parametreler arasında tekdüze bir ilişki olduğunda PRCC değerlendirmesi en iyi sonucu vermektedir. PRCC değerinin pozitif (+) olması parametrelerin doğru orantılı, negatif (-) olması ise ters orantılı olduğunu ifade etmektedir. PRCC değerinin +1 veya -1'e yaklaşması girdi parametrelerinin çıktı parametreleri üzerindeki etkisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (235).

Model çıktılarının girdi parametrelerine duyarlılığının zamana bağımlı ilişkisi değerlendirildiğinde tüm kompartmanlarda Q_P , V_P ve V_{IS} parametrelerine duyarlılığın zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.41.). Pitavastatin miktarının CL_{safra} parametresine olan duyarlılığı perfüzat ve karaciğer kompartmanı kestirimleri için zamanla artarken, safra kompartmanında her iki zaman noktasında pitavastatin miktarı kestirimi CL_{safra} 'ya aynı düzeyde ve yüksek bir duyarlılık (PRCC: 0,98) göstermektedir. Aynı şekilde perfüzat kompartmanındaki pitavastatin düzeyleri CL_{aktif} 'e yüksek (PRCC: 0,98) ve zamandan bağımsız bir şekilde duyarlıdır. Karaciğerdeki pitavastatin miktarının birden fazla mekanizmanın etkileşimi ile kontrol edildiği görülmektedir.

Girdi ve çıktı parametrelerinin arasındaki sıra korelasyon grafiklerinde (Bkz. Şekil 4.42.-4.44.) pitavastatinin perfüzat ve karaciğer kompartmanlarındaki dağılımının baskın olarak CL_{aktif} parametresi ile kontrol edildiği, safra kompartmanındaki dağılımının ise CL_{safra} parametresi ile kontrol edildiği görülebilmektedir. Diğer girdi parametreleri ile çıktı parametreleri arasındaki ilişki zayıf olarak değerlendirilmiştir.

Farklı parametre setleri kullanıldığında Monte Carlo simülasyon profillerinin (Şekil 4.45.) gözlem sonuçlarından uzaklaşabildiği gösterilmiştir. Filtre yaklaşımı uygulanarak gözlem değerlerini en iyi tanımlayan simülasyonlara ulaşılmış ve simülasyonu sağlayan parametre setleri incelenmiştir.

Şekil 4.46.'da görüldüğü üzere perfüzat kompartmanı için filtre uygulandığında elde edilen Monte Carlo simülasyon profilleri gözlem değerlerine yaklaşacak şekilde yukarı çekilmiştir. Ancak safra kestirimleri hala gözlem değerlerine uzaktır. İlgili filtre için isabet eden ve isabet etmeyen parametrelerin dağılımı incelendiğinde, K-S test istatistiği değerine göre en büyük farkın CL_{aktif} parametresi kaynaklı olduğu görülmektedir (Şekil 4.47., ($p < 0,05$)).

Safra kompartmanı için filtre uygulandığında (Şekil 4.48.) safra kompartmanındaki gözlem değerlerini daha iyi yansıtan simülasyon profillerine ulaşılırken, perfüzat profili gözlem değerlerinin altında seyretmektedir. K-S test istatistikleri irdelendiğinde en büyük farkın CL_{safra} parametresi kaynaklı olduğu görülmektedir. (Şekil 4.49., ($p < 0,05$)).

Her iki kompartman için aynı filtreler birlikte uygulandığında tüm kompartmanlarda gözlem değerlerine en yakın simülasyonlar elde edilebilmiştir (Şekil 4.50.). Bu sonucu veren parametre setleri ile diğer parametre setleri arasındaki dağılımlar karşılaştırıldığında f_{up} , CL_{pasif} , CL_{aktif} ve CL_{safra} parametrelerinin dağılımları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). K-S test istatistikleri irdelendiğinde en büyük farkın CL_{aktif} ve CL_{safra} parametrelerine bağlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.51.). Nitekim örnek sayısı azaldığında birbirlerine benzer dağılımlarda sonuç istatistiksel olarak anlamlı farka $p < 0,05$ işaret ederek yanıltıcı olabilmektedir. Bu nedenle test istatistiğinin sayısal değeri dikkate alınmalıdır.

CL_{aktif} ve CL_{safra} parametrelerinin yüksek belirsizliğe sahip olması ve sonuçların bu parametrelere yüksek duyarlılık göstermesi nedenleriyle bu parametrelerin model içerisinde veri analizi ile kestirilmesine karar verilmiştir.

5.3.3. Model İyileştirme ve Farmakokinetik Parametre Kestirimi

Pitavastatinin hepatositlerin sinüzoidal membranında Oatp aracılı *influx* taşıma hızının göstergesi olan CL_{aktif} ve safraya itrah hızının göstergesi olan CL_{safra} parametresi için IVIVE yaklaşımıyla literatür değerleri kullanılarak oluşturulmuş *in silico* model sıçan karaciğerinde pitavastatin dispozisyonunu açıklayamamıştır.

In vitro hepatosit hücre kültürü çalışmalarında sinüzoidal membrandaki *influx* ve *efflux* taşıma ve metabolizasyon mekanizmaları birlikte incelenmektedir. Bu çalışmalarda genellikle literatürde “*media loss assay*” olarak yer alan bir yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemde uygulanan ilaç miktarı ve inkübasyon ortamında zamana bağlı ilaç konsantrasyonu verisinden hareketle *in vitro* intrinsik hepatik klerens değeri hesaplanmaktadır. Ancak Soars ve ark. bu yöntem ile *in vitro* insan hepatositleri kullanılarak ilaçların *in vivo* intrinsik klerensinin ortalama 16 katlık bir hata ile daha düşük bulunduğunu rapor etmiştir. Bu duruma inkübasyon süresince taşıyıcı ve enzimlerin azalmış aktivitesinin neden olduğu belirtilmiştir (254).

In vitro insan hepatositlerinin maliyetinin yüksek olması özellikle yeni deney modelleri oluşturulmasında yaygın kullanımlarını kısıtlamaktadır. Menochet ve ark. (15) intrinsik klerens kestirimi için en uygun deney tasarımının geliştirilmesi amacıyla *in vitro* sıçan hepatositlerini kullanmış, inkübasyon ortamı verileri yanında hücre içi madde konsantrasyonlarını da kullanılarak konvansiyonel iki basamak yaklaşımı ve mekanistik farmakokinetik model ile birden fazla parametrenin eş zamanlı kestirimini yapmıştır. Ayrıca uzun inkübasyon süresi uygulanması ile inkübasyon ortamı ve hücre arasında kararlı durum sağlanarak hücre içi serbest fraksiyon kestirimleri iyileştirilmiştir. Bu çalışmada pitavastatin için iki basamak yönteminde aktif klerensin katkısı %94 olarak bulunmuştur ve serbest ilacın aktif klerensi $70 \mu\text{g}/\text{mL}/10^6$ hepatosit olarak rapor edilmiştir. 90 dk’lık uzun inkübasyon uygulaması sonunda elde edilen verilerin mekanistik iki kompartman modelinde tanımlanmasıyla bu bulgular sırasıyla %92 ve $119 \mu\text{g}/\text{mL}/10^6$ hepatosit olarak elde edilmiştir. Ancak tez kapsamında bu değer IVIVE yaklaşımı ile $171,36 \text{ mL}/\text{dk}$ olarak hesaplanarak model içerisinde kullanıldığında simülasyon profilleri deneysel verileri tam olarak tanımlayamamıştır.

İntirinsik hepatik klerens kestiriminin iyileştirilmesi için önerilen bir diğer yaklaşım da aktif taşıma klerensinin ve metabolik klerensin bu mekanizmaları en iyi yansıtabilecek deney yöntemleri kullanılarak ayrı ayrı tayin edilmesidir (166).

Pitavastatinin insanlardaki *in vivo* intrinsik hepatik klerens değeri 14-35 mL/dk/g karaciğerdir (166). Watanabe ve ark. (166) pitavastatinin insanlarda *in vivo* CL_{aktif} değerini, dondurulmuş insan hepatositleri kullanılarak tayin edilen *in vitro*

CL_{aktif} değerine sıçan ölçeklendirme faktörlerini uygulayarak hesaplamış ve değeri 30,6 mL/dk/g karaciğer olarak raporlamıştır (166). Buradaki sıçan ölçeklendirme faktörü ise *in vitro* sıçan hepatositleri çalışmasından elde edilen değer (53 mL/dk/g karaciğer) sıçan karaciğer perfüzyonu (çoklu indikatör dilüsyon yöntemi esaslı) ile elde edilen değere (92 mL/dk/g karaciğer) oranlanmasıyla elde edilmiştir. Ölçek faktörleri uygulandığında 1098 mL/dk olarak hesaplanan bu değer tez kapsamında geliştirilen model içerisinde kullanıldığında simülasyon profilleri deneysel verileri tam olarak tanımlayamamıştır.

Çoklu indikatör dilüsyon yönteminde 10 sn gibi kısa bir örnek toplama süresi uygulanmaktadır ve araştırma ilacının *influx* hız sabiti bir ekstraselüler referans maddeye oranla hesaplanmaktadır. Bu çalışmalarda birden fazla substrat aynı anda uygulandığından maddeler *influx* taşıyıcı proteinlerle yarışmaya girebilir, taşıyıcı proteinler doygunluğa ulaşabilir ve diğer taşıma yolları indüklenebilir.

Model iyileştirme çalışmaları kapsamında elde edilen gözlem verileri modelde veri uyumuna tabi tutularak CL_{aktif} ve CL_{safra} değerleri kestirimi yapılmıştır. CL_{aktif} 278,57 mL/dk olarak tayin edilmiştir. Bu değer IVIVE ile hesaplanmış olan değer (171,36 mL/dk) 1,6 katı olup Watanabe ve ark. elde ettiği sıçan ölçeklendirme faktörü ile (1,7) uyum göstermiştir. Ayrıca 50 μ M rifampisin varlığında pitavastatinin aktif taşınmasının %60 oranında inhibe olduğu bulunmuştur. Model kontrol ve inhibisyon gruplarının eş zamanlı analizine olanak vermiş ve inhibisyon derecesini yansıtmıştır. Böylece ilaç-ilaç etkileşimlerinin değerlendirilmesi için uygulanabilir bir model olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca *in situ* resirküle sıçan karaciğer perfüzyonu çalışması ile CL_{safra} da model ile kestirilmiştir (0,35 mL/dk). CL_{safra} kestiriminde varyasyon katsayısının yüksek olması (%56) perfüzyon kompartmanındaki örnek sayısının karaciğer ve safra kompartmanlarındaki örnek sayısına göre daha fazla olması ile ilişkili olup model hesaplamaları yaparken perfüzyon kompartmanındaki verilere ağırlık vermektedir.

CL_{safra} için kestirim değeri (0,35 mL/dk) modelden bağımsız yöntem ile kontrol grubu için hesaplanan 0,34 mL/dk değerine benzer bulunmuştur. Modelden bağımsız

yöntemde CL_{safra} hesaplanırken (Bkz. 3.6. Veri Analizi) pitavastatinin safra ve perfüzat kompartmanındaki düzeyleri kullanılmaktadır. Bu nedenle inhibisyon varlığında CL_{safra} 0,15 mL/dk olarak hesaplanmıştır. Oysa rifampisinin sadece Oatp inhibisyonu yaptığı varsayıldığında bu gruplar arasında safraya itrah klerensinin değişmesi beklenmemektedir. Nitekim kontrol grubu için hesaplanan değer ile uyumlu olarak modelde hem kontrol hem inhibisyon grubu bu varsayıma göre birlikte analiz edildiğinde CL_{safra} değeri 0,35 mL/dk olarak elde edilmiştir. Bu değer Hirano ve ark. tarafından (209) sıçanlarda in vivo çalışma sonrası pitavastatin safra düzeylerinin plazma ve karaciğer düzeylerine göre normalize edilerek hesaplanan CL_{safra} değerlerinden (1,365 ve 0,074 mL/dk) sırayla 3,9 kat ve 4,7 kat farklı bulunmuştur.

In vivo çalışmada CL_{safra} hesaplanırken plazma düzeyine göre normalize edildiğinde CL_{safra} 3,9 kat daha yüksek bulunmaktadır. Ancak in situ karaciğer perfüzyonu çalışmasında plazma yerine perfüzat düzeyleri kullanılmıştır. Karaciğer dışı klerens yollarının klerense katkısı görülmediği için geliştirilen modelde CL_{safra} daha düşük bulunmuş olabilir. Bu değer in vivo çalışmada pitavastatinin karaciğer düzeylerine göre normalize edilen değere daha yakındır. Sonuç olarak kestirim ile elde edilen CL_{safra} değeri in vivo çalışma sonucu plazma ve karaciğer pitavastatin düzeyine göre normalize edilen değerlerin her ikisine de benzer fark göstermiştir. Bu husus in situ karaciğer perfüzyonu tekniği ve tez kapsamında geliştirilen mekanistik üç kompartman modelinin hem perfüzat hem de karaciğer düzeylerini eş zamanlı dikkate alarak safra klerensi tayinindeki etkinliğini ortaya koymaktadır.

Sager ve ark. (255) 2008-Mayıs 2015 tarihleri arasında yayınlanmış ve 106'sı ilaç-ilaç etkileşimine konu olan 366 molekül için geliştirilmiş PBPK modelleri derlemiştir. Bu çalışmaların bir kısmında kabul kriteri belirtilmezken, yaygınlıkla uygulanan kabul kriteri model ile elde edilen farmakokinetik parametrelerinin gözlem değerinin %30'u veya 2 katı içerisinde olması zorunluluğudur. Tez çalışması kapsamında literatürde mekanistik modellerin değerlendirilmesinde kullanılan "farmakokinetik parametrelerde en fazla 2 katlık fark" kabul kriterine göre değerlendirme yapılmıştır.

CL_{aktif} ve CL_{safra} değerlerinin optimize edilmesiyle pitavastatinin karaciğer dispozyonunu açıklayan bir mekanistik model elde edilmiştir. Perfüzat kompartmanında perfüzyon işleminin 20. dk'sından sonra gözlem ve kestirim değerleri arasındaki farkın başlangıç zaman noktalarına göre azaldığı görülmektedir. Bu durum perfüzatın karaciğerde zamana bağlı olarak homojen dağılımının sağlanmasıyla açıklanabilir. Ayrıca modelin zamanın fonksiyonu olarak perfüzat içindeki pitavastatin düzeyi değişimini yansıtabildiğini göstermektedir. Kestirim ve gözlem değerleri arasındaki ilişki incelendiğinde hem inhibisyon hem de kontrol koşullarında bir aykırı değer hariç değerlerin tamamı 2 katlık fark penceresi içerisinde kalarak model kabul kriterini karşılamıştır (Şekil 4.53.).

Geliştirilen modelin pitavastatinin karaciğer dokusundaki dağılımını nasıl simüle ettiği incelemek amacıyla hem kontrol hem de inhibisyon koşullarında rezidüel dağılımları incelemiş ve dağılımların benzer olduğu görülmüştür. Kestirim ve gözlem değerleri arasında doğrusal bir ilişki elde edilemese de verilerin %97'si 2 katlık fark penceresi içerisinde (Şekil 4.54.).

Safra kompartmanında hem kontrol hem de inhibisyon koşulları için değerlerin %74'ü için gözlem ve kestirim değerleri arasındaki fark 2 katın altındadır. Tez kapsamında geliştirilen model ile 15. dk'da safradaki pitavastatin miktarının kestirimi 60. dk'ya göre daha düşük rezidüel değerleri ile daha iyi bir kestirim sağlamıştır (Şekil 4.55.). Bu durum safraya itrah mekanizmasının doyumluğa ulaşmış olabileceğini ama modelin bu değişimi ifade edemediğini gösterebilir. Safra için örneklem sayısı genişletilerek bu hipotez araştırılabilir.

Model ile CL_{aktif} ve CL_{safra} değerlerinin kestirimi yapılmış, 50 μ M rifampisin varlığında inhibisyon derecesi elde edilmiştir. Ancak bu parametrelerin kestirimi yapılırken f_{up} , f_{u1S} ve CL_{pasif} parametreleri sabit tutulmuştur. Bu parametrelerin tayin yöntemlerindeki koşullara bağlı olarak (protein bağlanma deneyleri, in vitro hücre kültürü çalışmaları) varyasyonu yüksek olabilmektedir. Bu nedenle bu parametrelerde tanımlanmış olan belirsizliğin parametre optimizasyonu üzerindeki etkisi incelenmelidir.

f_{up} , f_{uIS} ve CL_{pasif} parametrelerinin modelde sabitlenen değerlerinin %70, %90, %100, %110 ve %130'u (iki yönlü %0, %10 ve %30 varyasyon) alınarak her bir parametre eşleştirmesi için 25 kombinasyonda olmak üzere CL_{aktif} , $CL_{aktif, inh}$, ve CL_{safra} kestirimleri tekrarlanmıştır.

Şekil 4.52. incelendiğinde CL_{aktif} 'in f_{up} ile ters f_{uIS} ve CL_{pasif} 'ile ise doğru orantılı olduğu görülmektedir. CL_{safra} kestirimleri üzerinde f_{up} 'nin etkisi görülmezken CL_{safra} 'nın f_{uIS} ile ters CL_{pasif} 'ile ise doğru orantılı olarak değiştiği görülmektedir.

Modelde sabit tutulan f_{up} , f_{uIS} ve CL_{pasif} parametrelerine %10 oranında varyasyon uygulandığında CL_{aktif} kestirimleri optimize edilen değerden 0,8-1,2 katlık bir fark göstermektedir. Ancak f_{up} 'nin gerçek değeri modelde sabitlenen değerlerin %130'u oranında ise ve eş zamanlı olarak f_{uIS} veya CL_{pasif} 'in ise gerçek değerlerinin %70'inde olduğunda CL_{aktif} kestiriminde 0,6 katlık bir azalma; tam tersi durumda ise 1,8 katlık bir artma söz konusudur (Şekil 4.52.). f_{uIS} ve CL_{pasif} parametrelerine aynı anda %30 varyasyon uygulanması halinde ise ulaşılan CL_{aktif} kestirimi 0,6-1,6 katlık bir değişme göstermektedir. Ancak bu parametrelerin her iki koşulda da CL_{aktif} kestirimi (CL_{aktif} ve $CL_{aktif, inh}$) üzerinde eşit derecede etkili olarak % inhibisyon kestirimlerinin parametre belirsizliklerinden etkilenmediği gösterilmiştir (Şekil 4.52.).

CL_{safra} parametresi, f_{up} ve CL_{pasif} parametrelerinin %70-130 sınırlarında dahi sadece %90-110 aralığında bir değişkenlik göstermiştir. Bu durum CL_{safra} 'nın bu parametrelere olan duyarlılığının düşük olduğunu göstermektedir. Ancak CL_{safra} f_{up} 'deki belirsizlikten etkilenmezken f_{uIS} 'ye karşı duyarlı bulunmuştur. f_{uIS} 'nin modelde sabitlenen değerinin %70'i olması halinde CL_{safra} 1,3 kat; %110'u olması halinde ise CL_{safra} kestirim değerinin 0,8 katı olarak bulunmaktadır (Şekil 4.52.). Bu koşula CL_{pasif} 'in sırasıyla %70 ve %130 sınır değeri eşlik ettiğinde bulunacak CL_{safra} kestirim değerinin sırasıyla 1,4 ve 0,7 katı olmaktadır.

Geliştirilen model ile f_{up} , f_{uIS} ve CL_{pasif} parametrelerindeki varyasyon varlığında dahi inhibisyon oranı kestirimleri aynı kalmaktadır. Bu durum modelin ilaç-ilaç etkileşimleri değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Günümüzde farmakokinetik ve farmakodinamik verilerin sıçandan insana doğrudan translasyonu yapılamamaktadır. Bunun başlıca sebebi türler arasında taşıyıcı ve/veya enzim ekspresyonu ve aktivitesi arasında fark olmasıdır. Fare ve sıçanlarda insanlardakine benzer olarak Oatp2b1 taşıyıcısı bulunurken OATP1B1 ve OATP1B3'ün ortolog proteinleri bulunmamaktadır. İnsan OATP1B1 ve OATP1B3 taşıyıcılarına sırasıyla %63 ve %66 homolog olan sıçan Oatp taşıyıcısı Oatp1b2'dir (256, 257). Fare ve sıçan hepatositlerinde eksprese edilen Oatp1b2, Oatp1a1 ve Oatp1a4 taşıyıcılarının substrat seçicilikleri değerlendirildiğinde insan OATP1B taşıyıcıları ile en azından nitel olarak aynı fonksiyona sahip olduğu öne sürülmüştür.

Soars ve ark. 36 yeni molekül için insan hepatositlerindeki aktif taşımanın sıçan hepatositlerine göre ortalama 3 kat daha yavaş olduğunu göstermiştir (254). Türler arasındaki farklılığın incelenmesi amacıyla kullanılan bir yaklaşım hepatositlerde *in vitro* aktif taşıma klerensi, safra ile itrah klerensi (SCH metodu ile) ve metabolik klerens verilerinin mekanistik veya PBPK modellere uygulanmasıdır (258). Menochet ve ark. (14) tarafından yedi OATP/Oatp substratının *in vitro* sıçan ve insan hepatositlerine uygulanmasının ardından sıçan hepatositlerinde tayin edilen K_m ve $CL_{aktif, serbest}$ değerleri insan hepatositleri kullanılarak elde edilen değerlerden sırasıyla 4,3 ve 7,1 kat daha yüksek bulunmuştur.

Türler arasında taşıyıcı protein ekspresyonu, substrat ve inhibitörlerin seçicilikleri farklılık gösterse de (259), sıçanlarda geliştirilmiş farmakokinetik modeller insan hepatic dispozisyonunun ön görülmesi için bir temel oluşturmaktadır (15, 70, 177). *In vitro* CL_{aktif} parametresinin CL_{safra} ve $CL_{metabolizma}$ ile birlikte IVIVE yaklaşımıyla PBPK modellere mekanistik girdi parametresi olarak eklenmesi ile OATP/Oatp substratlarının farmakokinetik profillerinin kestirimi yapılabilmektedir (144, 177).

In vitro ve *in vivo* veriler ile hayvanlardaki fizyolojik parametreler yanında taşıyıcı proteinlere ait proteomik verilerin (ör. proteinlerin mutlak miktarı) PBPK modellerde tanımlanması prelinik hayvan modellerinin insana translasyonu için önem taşımaktadır. Böylece insanlarda klinik dozda dokulardaki dağılımı ve genel olarak ilaç dispozisyonu daha iyi anlaşılacaktır (258). Geliştirilen modelin yeni

ilaçlara uygulanmasıyla ilaçların karaciğer dispoziyonu tayin edilebilir. Taşıma mekanizmalarının katkısı belirlenerek ilaç-ilaç etkileşimleri potansiyelleri aydınlatılabilir.

BDDCS ve ECCS ilaçların sınıflandırılmasında ana eliminasyon yollarına ve ilaç taşıyıcı proteinlerle olan etkileşimlere dikkat çekmektedir. Eliminasyonlarında hız kısıtlayıcı basamak hepatik hücre içine alım ve hepatik metabolizasyon olan ilaçlar için hepatik taşıyıcı ve/veya enzim aracılıklı etkileşimler önem kazanmaktadır. Hepatik OATP1B taşıyıcıları klinik olarak önemli ve etkileşim riski yüksek birçok ilacın (ör. antihiperlipidemik, antidiyabetik ve antineoplastik) ve safra asitleri gibi endojen maddelerin karaciğer hücreleri içerisinde taşınmasında önemli rol oynamaktadır (260). Bu nedenle yasal otoriteler tarafından yeni geliştirilen moleküllerin OATP substratı (hepatik klerens total klerensin en az %25'i ise) ve inhibitörü olup olmadıklarının belirlenmesini önermektedir. Bu kapsamda *in vitro* çalışmalarda OATP-aracılı etkileşim potansiyelinin gösterilmesi durumunda ise *in vivo* klinik çalışmalar yürütülmektedir. Bu kapsamda farmakokinetik modeller *in vivo* yanıt kestiriminde önemli rol oynayarak klinik çalışma tasarımına ışık tutabilmektedir. Ayrıca klinik çalışma bulguları ile model iyileştirmesi ve validasyonu yapılarak klinik çalışmadaki parametrelerin değiştirilmesi (farklı inhibitör ilaç, farklı doz rejimi, farklı popülasyon) ile *in silico* bulgular elde edilebilmektedir. Böylece ilaç-ilaç etkileşimlerine bağlı etkinlik kaybı veya statinle indüklenen rabdomiyaliz (261) gibi ciddi istenmeyen etkiler öngörülerek önlenabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- Rifampisin karaciğer dokusundaki düzeyinin belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir ve literatürde ilk olarak ICH M10 Biyoanalitik Yöntem Validasyonu taslak kılavuzuna uygun olarak valide edilmiştir.
- Literatürde ilk olarak pitavastatin, KPI ve KPIII'ün eş zamanlı nicel analizine olanak verecek bir LC-MS yöntemi geliştirilerek perfüzet, karaciğer dokusu ve safra ortamları için ICH M10 Biyoanalitik Yöntem Validasyonu taslak kılavuzuna uygun olarak valide edilmiştir.
- Pitavastatinin Oatp inhibitörü rifampisin yokluğunda ve varlığında hepatik dispozisyonu literatürde ilk olarak *in situ* sıçan karaciğer perfüzyonu yöntemi kullanılarak incelenmiştir. 15 ve 60 dk perfüzyonun ardından 10 µM rifampisin varlığında pitavastatinin karaciğer kompartmanlarındaki düzeyleri değişmezken 50 µM rifampisin varlığından Oatp inhibisyonuna bağlı olarak pitavastatinin EAA düzeyinde anlamlı artış olmuştur ($p < 0,05$).
- Sıçanlarda KPI ve KPIII'ün karaciğer ve safra düzeyleri belirlenmiştir. Veri sayısının sınırlı olması nedeniyle dispozisyonları üzerindeki rifampisin etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Sıçanlarda KPIII düzeyi KPI'e göre daha baskın bulunmuştur. Pitavastatin ile karaciğer ve safra düzeyleri açısından belirli koşullarda (KPI için inhibisyon koşulunda safrada, KPIII için kontrol koşulunda karaciğerde, inhibisyon koşulunda safrada) ve karaciğer/safra oranları açısından KPI için kontrol, KPIII için inhibisyon koşulunda korelasyon elde edilmesi Oatp aktivitesinde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ancak ileri çalışmalarla ve geniş bir örneklemede bu hipotezin desteklenmesi gerektiği değerlendirilmiştir.
- Modelden bağımsız yöntem ile EAA_{0-t} , $F_{\text{perfüzet}}$, $F_{\text{karaciğer}}$, F_{safra} , karaciğer/safra oranı, CL_H , F_H ve CL_{safra} parametreleri hesaplanmıştır.

- Pitavastatinin karaciğer dispozisyonunun tanımlanmasında mekanistik karaciğer modelinde tek alt kompartman modelinin çoklu alt kompartman modeline göre daha uygun olduğu bulunmuştur.

- Belirsizlik ve duyarlılık analizleri ile perfüzat kompartmanındaki pitavastatin düzeyinin en çok CL_{aktif} parametresindeki belirsizlikten etkilenerek bu parametreye karşı yüksek duyarlılık gösterdiği, safra kompartmanındaki pitavastatinin düzeyinin ise en çok CL_{safra} parametresindeki belirsizlikten etkilenerek bu parametreye karşı en yüksek duyarlılık gösterdiği bulunmuştur.

- Mekanistik model ile veri analizi gerçekleştirilerek model iyileştirmesi yapılmış ve simülasyon profilleri pitavastatinin karaciğer dispozisyonunu yansıtmıştır.

- Pitavastatin için CL_{aktif} ve CL_{safra} farmakokinetik parametrelerinin kestirimi yapılmıştır. CL_{aktif} kestirimi ile IVIVE iyileştirilirken, ilk olarak *in situ* karaciğer perfüzyonu çalışmasından hareketle pitavastatinin safraya itrahını tanımlayan CL_{safra} değeri elde edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında *in situ* sıçan karaciğer perfüzyonu yönteminin taşıyıcı-aracılı ilaç ilaç etkileşimi çalışmalarındaki rolü gösterilmiştir. Ayrıca bu alanda yeni bir yaklaşım olan endojen biyobelirteç takibi literatürde ilk olarak ilgili deney modelinde literatürde ilk olarak uygulanmıştır. İleriye yönelik çalışmalarda KPI ve KPIII maddelerinin sıçanlarda biyobelirteç olarak kullanımlarına yönelik işaretleme teknikleri kullanılarak ileri çalışmalar yapılabilir. Preklinik çalışmaların tasarımı sırasında ilaçların karaciğer dispozisyonunda rifampisin etkisi değerlendirilirken daha geniş bir konsantrasyon aralığında ön çalışmalar ile uygulanacak rifampisin konsantrasyonu belirlenerek OATP/Oatp üzerinde tam inhibisyon sağlanabilir. Tez kapsamında geliştirilen mekanistik model ile gelecek çalışmalarda farklı ilaçların karaciğer dispozisyonu incelenebilir. Karaciğer yetmezliği ya da farklı hastalık modellerindeki dispozisyon simülasyonu için model geliştirilebilir. Mekanistik karaciğer modeli PBPK modeller içerisine alınarak *in vivo* plazma konsantrasyon zaman profili kestiriminin yanında ilaçların diğer dokulardaki dağılımı incelenebilir. Ayrıca farklı albümin konsantrasyonları kullanılarak albümin aracılı taşıma ve OATP ilişkisi irdelenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Rawlins MD. Cutting the cost of drug development? *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(4):360-4A.
2. Kaitin KI. Deconstructing the drug development process: the new face of innovation. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(3):356-61.
3. Food and Drug Administration. Guidance for industry, in vitro drug interaction studies, cytochrome p450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions guidance for industry [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 9 Kasım 2020] Erişim adresi: <https://www.fda.gov/media/134582/download>
4. European Medicine Agency. Guideline on the investigation of drug interactions. [Internet]. 2013 [Erişim Tarihi 9 Kasım 2020] Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf
5. FDA. Guidance for industry, clinical drug interaction studies, cytochrome P450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions [Internet]. 2020
6. PMDA. Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information. 2018.
7. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, ve ark. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):215-36.
8. Zamek-Gliszczyński MJ, Lee CA, Poirier A, Bentz J, Chu X, Ellens H, ve ark. ITC recommendations for transporter kinetic parameter estimation and translational modeling of transport-mediated PK and DDIs in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(1):64-79.
9. Zamek-Gliszczyński MJ, Taub ME, Chothe PP, Chu X, Giacomini KM, Kim RB, ve ark. Transporters in drug development: 2018 ITC recommendations for transporters of emerging clinical importance. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;104(5):890-9.
10. Giacomini KM, Huang SM. Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(1):3-9.
11. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, ve ark. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013;87(8):1315-530.
12. Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther.* 2006;112(1):71-105.
13. Galetin A. Rationalizing underprediction of drug clearance from enzyme and transporter kinetic data: from in vitro tools to mechanistic modeling. *Methods Mol Biol.* 2014;1113:255-88.

14. Menochet K, Kenworthy KE, Houston JB, Galetin A. Use of mechanistic modeling to assess interindividual variability and interspecies differences in active uptake in human and rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(9):1744-56.
15. Menochet K, Kenworthy KE, Houston JB, Galetin A. Simultaneous assessment of uptake and metabolism in rat hepatocytes: a comprehensive mechanistic model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341(1):2-15.
16. Badolo L, Rasmussen LM, Hansen HR, Sveigaard C. Screening of OATP1B1/3 and OCT1 inhibitors in cryopreserved hepatocytes in suspension. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40(4):282-8.
17. Vildhede A. In vitro and in silico predictions of hepatic transporter-mediated drug clearance and drug-drug interactions in vivo [Doktora]. Sweden: Uppsala University; 2015.
18. Pfeifer ND, Yang K, Brouwer KL. Hepatic basolateral efflux contributes significantly to rosuvastatin disposition I: Characterization of basolateral versus biliary clearance using a novel protocol in sandwich-cultured hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;347(3):727-36.
19. Vildhede A, Mateus A, Khan EK, Lai Y, Karlgren M, Artursson P, et al. Mechanistic modeling of pitavastatin disposition in sandwich-cultured human hepatocytes: a proteomics-informed bottom-up approach. *Drug Metab Dispos*. 2016;44(4):505-16.
20. Kanda K, Takahashi R, Yoshikado T, Sugiyama Y. Total hepatocellular disposition profiling of rosuvastatin and pitavastatin in sandwich-cultured human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2018;33(3):164-72.
21. Ulvestad M, Björquist P, Molden E, Åsberg A, Andersson TB. OATP1B1/1B3 activity in plated primary human hepatocytes over time in culture. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(9):1219-26.
22. Li N, Bi YA, Duignan DB, Lai Y. Quantitative expression profile of hepatobiliary transporters in sandwich cultured rat and human hepatocytes. *Mol Pharm*. 2009;6(4):1180-9.
23. Sahin S. Perfused liver preparation and its applications. *FABAD J Pharm Sci*. 2003;28:39-49.
24. Sahin S, Rowland M. Effect of erythrocytes on the hepatic distribution kinetics of antipyrine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2004;29(1):37-41.
25. Sahin S, Rowland M. Disposition kinetics of diclofenac in the dual perfused rat liver. *J Pharm Sci*. 2013;102(9):3220-7.
26. Brouwer KL, Thurman RG. Isolated perfused liver. *Pharm Biotechnol*. 1996;8:161-92.
27. Hobbs M, Parker C, Birch H, Kenworthy K. Understanding the interplay of drug transporters involved in the disposition of rosuvastatin in the isolated perfused rat liver using a physiologically-based pharmacokinetic model. *Xenobiotica*. 2012;42(4):327-38.

28. Pfeifer ND, Bridges AS, Ferslew BC, Hardwick RN, Brouwer KL. Hepatic basolateral efflux contributes significantly to rosuvastatin disposition II: Characterization of hepatic elimination by basolateral, biliary, and metabolic clearance pathways in rat isolated perfused liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;347(3):737-45.
29. Watanabe T, Miyake M, Shimizu T, Kamezawa M, Masutomi N, Shimura T, ve ark. Utility of bilirubins and bile acids as endogenous biomarkers for the inhibition of hepatic transporters. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(4):459-66.
30. Imaoka T, Mikkaichi T, Abe K, Hirouchi M, Okudaira N, Izumi T. Integrated approach of in vivo and in vitro evaluation of the involvement of hepatic uptake organic anion transporters in the drug disposition in rats using rifampicin as an inhibitor. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(7):1442-9.
31. Shingaki T, Takashima T, Ijuin R, Zhang X, Onoue T, Katayama Y, ve ark. Evaluation of OATP and MRP2 activities in hepatobiliary excretion using newly developed positron emission tomography tracer [¹¹C]dehydropravastatin in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;347(1):193-202.
32. Food and Drug Administration. Drug development and drug interactions: table of substrates, inhibitors and inducers [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 3 Ekim 2020] Erişim adresi:
<https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#transporter>,
33. Chu X, Liao M, Shen H, Yoshida K, Zur AA, Arya V, ve ark. Clinical probes and endogenous biomarkers as substrates for transporter drug-drug interaction evaluation: perspectives from the international transporter consortium. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;104(5):836-64.
34. Prueksaritanont T, Chu X, Evers R, Klopfer SO, Caro L, Kothare PA, ve ark. Pitavastatin is a more sensitive and selective organic anion-transporting polypeptide 1B clinical probe than rosuvastatin. *Br J Clin Pharmacol.* 2014;78(3):587-98.
35. Kunze A, Ediage EN, Dillen L, Monshouwer M, Snoeys J. Clinical investigation of coproporphyrins as sensitive biomarkers to predict mild to strong OATP1B-mediated drug-drug interactions. *Clin Pharmacokinet.* 2018;57:1559–70.
36. Lai Y, Mandlekar S, Shen H, Holenarsipur VK, Langish R, Rajanna P, ve ark. Coproporphyrins in plasma and urine can be appropriate clinical biomarkers to recapitulate drug-drug interactions mediated by organic anion transporting polypeptide inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;358(3):397-404.
37. Giacomini KM, Galetin A, Huang SM. The international transporter consortium: summarizing advances in the role of transporters in drug development. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;104(5):766-71.
38. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1269-339.

39. Damle-Vartak A. Morphological and intracellular response of the liver to bile acid-mediated toxicity in cholestasis [Doktora]. Dortmund: Technischen Universität Dortmund; 2018.
40. Dancygier H. Part 1 Structure and function of liver. *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases*: Springer Berlin Heidelberg; 2010. s. 3-157.
41. Kalra A, Tuma F. *Physiology, Liver*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
42. Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec*. 1954;119(1):11-33.
43. Gumucio JJ. Functional and anatomic heterogeneity in the liver acinus: impact on transport. *Am J Physiol*. 1983;244(6):G578-82.
44. LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, Powers MJ. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol*. 2012;42(6):501-48.
45. Püschel G, Jungermann K. Integration of function in the hepatic acinus: intercellular communication in neural and humoral control of liver metabolism. *Progr Liver Dis*. 1994;12:19-46.
46. Jungermann K, Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev*. 1989;69(3):708-64.
47. Wisse E, de Zanger RB, Charels K, van der Smissen P, McCuskey RS. The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of disse. *Hepatology*. 1985;5(4):683-92.
48. DeLeve LD. Hepatic microvasculature in liver injury. *Semin Liver Dis*. 2007;27(4):390-400.
49. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci*. 2002;65(2):166-76.
50. Schmucker DL, Mooney JS, Jones AL. Stereological analysis of hepatic fine structure in the Fischer 344 rat. Influence of sublobular location and animal age. *J Cell Biol*. 1978;78(2):319-37.
51. Klaassen CD, Watkins JB, 3rd. Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. *Pharmacol Rev*. 1984;36(1):1-67.
52. Meijer DKF. Current concepts on hepatic transport of drugs. *J Hepatol*. 1987;4:259-68.
53. Simons K, Fuller SD. Cell surface polarity in epithelia. *Annu Rev Cell Biol*. 1985;1:243-88.
54. Rodes J, Benhamou JP, Blei A, Reichen J, Rizzetto M. *Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice*: Wiley-Blackwell Publishing; 2007.

55. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Mendel G, Alpini G, Gaudio E, et al. The biliary tree--a reservoir of multipotent stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(4):231-40.
56. Marzioni M, Glaser SS, Francis H, Phinzy JL, LeSage G, Alpini G. Functional heterogeneity of cholangiocytes. *Semin Liver Dis*. 2002;22(3):227-40.
57. Bogert PT, LaRusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(3):299-305.
58. Adams DH, Afford SC. The role of cholangiocytes in the development of chronic inflammatory liver disease. *Front Biosci*. 2002;7:e276-85.
59. Tietz PS, Larusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006;22(3):279-87.
60. Sahin S, Rowland M. Estimation of specific hepatic arterial water space. *Am J Physiol*. 1998;275(2 Pt 1):G228-36.
61. Sahin S, Rowland M. Estimation of aqueous distributional spaces in the dual perfused rat liver. *J Physiol (London)* 2000;528(1):199-207.
62. McCuskey RS. A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *J Anat*. 1966;119(3):455-77.
63. MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol*. 1995;269(5 Pt 1):G692-8.
64. Ballet F. Hepatic circulation: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther*. 1990;47(2):281-328.
65. Belpaire F, Bogaert M. The fate of xenobiotics in living organisms. In: Wermuth CG, editor. *The practice of medicinal chemistry*. London, UK: Academic Press; 2003. s. 593 - 614.
66. Thompson T, Huang C. Composition and dynamics of lipids in biomembranes, in membrane physiology. In: Andreoli TE, Hoffman JF, Fanestil DD, Schultz SG, editors. *Physiology of Membrane Disorders*. Boston: Springer; 1986.
67. Xiang TX, Anderson BD. The relationship between permeant size and permeability in lipid bilayer membranes. *J Membr Biol*. 1994;140:111-22.
68. Gutknecht J, Walter A. Histamine, theophylline and tryptamine transport through lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 1981;649(2):149-54.
69. Liu X, Testa B, Fahr A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. *Pharm Res*. 2011;28(5):962-77.
70. Poirier A, Lave T, Portmann R, Brun ME, Senner F, Kansy M, et al. Design, data analysis, and simulation of in vitro drug transport kinetic experiments using a mechanistic in vitro model. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(12):2434-44.
71. You G, Morris ME. Overview of drug transporter families. In: You G, Morris ME, editors. *Drug Transporters*. 2014. s. 1-6.

72. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*. 2009;3(3):281-90.
73. Mairinger S, Erker T, Muller M, Langer O. PET and SPECT radiotracers to assess function and expression of ABC transporters in vivo. *Curr Drug Metab*. 2011;12(8):774-92.
74. Ashraf T, Kao A, Bendayan R. Functional expression of drug transporters in glial cells: potential role on drug delivery to the CNS. *Adv Pharmacol*. 2014;71:45-111.
75. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204(3):216-37.
76. Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci*. 2006;27(5):425-46.
77. Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv*. 2004;1(1):27-42.
78. Schlessinger A, Khuri N, Giacomini KM, Sali A. Molecular modeling and ligand docking for solute carrier (SLC) transporters. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(7):843-56.
79. Bai X, Moraes TF, Reithmeier RAF. Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins. *Mol Membr Biol*. 2017;34(1-2):1-32.
80. Elmorsi Y, Barber J, Rostami-Hodjegan A. Ontogeny of hepatic drug transporters and relevance to drugs used in pediatrics. *Drug Metab Dispos*. 2016;44(7):992-8.
81. Fahrmayr C, Fromm MF, Konig J. Hepatic OATP and OCT uptake transporters: their role for drug-drug interactions and pharmacogenetic aspects. *Drug Metab Rev*. 2010;42(3):380-401.
82. Taskar KS, Pilla Reddy V, Burt H, Posada MM, Varma M, Zheng M, et al. Physiologically-based pharmacokinetic models for evaluating membrane transporter mediated drug-drug interactions: current capabilities, case studies, future opportunities, and recommendations. *Clin Pharmacol Ther*. 2020;107(5):1082-115.
83. Terada T, Hira D. Intestinal and hepatic drug transporters: pharmacokinetic, pathophysiological, and pharmacogenetic roles. *J Gastroenterol*. 2015;50(5):508-19.
84. Konig J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006;372(6):432-43.
85. Konig J, Muller F, Fromm MF. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol Rev*. 2013;65(3):944-66.

86. Lau YY, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ. Effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(2):194-204.
87. Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, Unadkat JD. The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci.* 2006;27(5):501-17.
88. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(1):139-46.
89. Ishiguro N, Maeda K, Kishimoto W, Saito A, Harada A, Ebner T, ve ark. Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2006;34:1109 - 15.
90. Patel M, Taskar KS, Zamek-Gliszczyński MJ. Importance of hepatic transporters in clinical disposition of drugs and their metabolites. *J Clin Pharmacol.* 2016;56(Suppl 7):S23-39.
91. Nigam SK. The SLC22 transporter family: A paradigm for the impact of drug transporters on metabolic pathways, signaling, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018;58:663-87.
92. Cropp CD, Komori T, Shima JE, Urban TJ, Yee SW, More SS, ve ark. Organic anion transporter 2 (SLC22A7) is a facilitative transporter of cGMP. *Mol Pharmacol.* 2008;73(4):1151-8.
93. Anwer MS, Stieger B. Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch.* 2014;466(1):77-89.
94. De Bruyn T, Ye Z-W, Peeters A, Sahi J, Baes M, Augustijns PF, ve ark. Determination of OATP-, NTCP- and OCT-mediated substrate uptake activities in individual and pooled batches of cryopreserved human hepatocytes. *Eur J Pharm Sci.* 2011;43(4):297-307.
95. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* 2004;447(5):735-43.
96. Ballatori N, Christian WV, Wheeler SG, Hammond CL. The heteromeric organic solute transporter, OST α -OST β /SLC51: a transporter for steroid-derived molecules. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):683-92.
97. Kong W, Engel K, Wang J. Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab.* 2004;5(1):63-84.
98. Rost D, König J, Weiss G, Klar E, Stremmel W, Keppler D. Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology.* 2001;121(5):1203-8.
99. Lai L, Tan TMC. Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem J.* 2002;361:497-503.

100. Gu X, Manautou JE. Regulation of hepatic ABCC transporters by xenobiotics and in disease states. *Drug Metab Rev.* 2010;42(3):482-538.
101. Govindarajan R, Endres CJ, Whittington D, LeCluyse E, Pastor-Anglada M, Tse C-M, ve ark. Expression and hepatobiliary transport characteristics of the concentrative and equilibrative nucleoside transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(3):G570-G80.
102. Baker KJ, Bradley SE. Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium by plasma albumin. Its role in hepatic BSP extraction. *J Clin Invest.* 1966;45(2):281-7.
103. Bowman CM, Benet LZ. An examination of protein binding and protein-facilitated uptake relating to in vitro-in vivo extrapolation. *Eur J Pharm Sci.* 2018;123:502-14.
104. Weisiger RA, Zacks CM, Smith ND, Boyer JL. Effect of albumin binding on extraction of sulfobromophthalein by perfused elasmobranch liver: evidence for dissociation-limited uptake. *Hepatology.* 1984;4(3):492-501.
105. Ichikawa M, Tsao SC, Lin TH, Miyauchi S, Sawada Y, Iga T, ve ark. 'Albumin-mediated transport phenomenon' observed for ligands with high membrane permeability: Effect of the unstirred water layer in the Disse's space of rat liver. *J Hepatol.* 1992;16(1-2):38-49.
106. Tsao SC, Sugiyama Y, Sawada Y, Iga T, Hanano M. Kinetic analysis of albumin-mediated uptake of warfarin by perfused rat liver. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1988;16(2):165-81.
107. Poulin P, Kenny JR, Hop CE, Haddad S. In vitro-in vivo extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods. *J Pharm Sci.* 2012;101(2):838-51.
108. Bowman CM, Okochi H, Benet LZ. The effect of protein binding on the interaction between transporters and highly protein bound drugs. The International Pharmaceutical Federation Pharmaceutical Sciences World Congress; 5 2017; Stockholm, Sweden 2017.
109. Kim SJ, Lee KR, Miyauchi S, Sugiyama Y. Extrapolation of in vivo hepatic clearance from in vitro uptake clearance by suspended human hepatocytes for anionic drugs with high binding to human albumin: improvement of in vitro-to-in vivo extrapolation by considering the "albumin-mediated" hepatic uptake mechanism on the basis of the "facilitated-dissociation model". *Drug Metab Dispos.* 2019;47(2):94-103.
110. Miyauchi S, Masuda M, Kim SJ, Tanaka Y, Lee KR, Iwakado S, ve ark. The phenomenon of albumin-mediated hepatic uptake of organic anion transport polypeptide substrates: prediction of the in vivo uptake clearance from the in vitro uptake by isolated hepatocytes using a facilitated-dissociation model. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(3):259-67.
111. Bowman CM, Chen E, Chen L, Chen Y-C, Liang X, Wright M, ve ark. Changes in organic anion transporting polypeptide (OATP) uptake in HEK293

- overexpressing cells in the presence and absence of human plasma. *Drug Metab Dispos.* 2020(48):18-24.
112. Bowman CM, Okochi H, Benet LZ. The presence of a transporter-induced protein binding shift: a new explanation for protein-facilitated uptake and improvement for in vitro-in vivo extrapolation. *Drug Metab Dispos.* 2019;47(4):358-63.
 113. Poulin P, Haddad S. Extrapolation of the hepatic clearance of drugs in the absence of albumin in vitro to that in the presence of albumin in vivo: comparative assessment of 2 extrapolation models based on the albumin-mediated hepatic uptake theory and limitations and mechanistic insights. *J Pharm Sci.* 2018;107(7):1791-7.
 114. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug metabolism in the liver. *Clin Liver Dis.* 2017;21(1):1-20.
 115. Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(10):825-33.
 116. Palleria C, Paolo AD, Giofrè C, Caglioti C, Leuzzi G, Siniscalchi A, ve ark. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *Res J Med Sci.* 2013;18:601 - 10.
 117. Huang SM, Zhang L, Giacomini KM. The international transporter consortium: a collaborative group of scientists from academia, industry, and the FDA. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(1):32-6.
 118. Hillgren KM, Keppler D, Zur AA, Giacomini KM, Stieger B, Cass CE, ve ark. Emerging transporters of clinical importance: an update from the international transporter consortium. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(1):52-63.
 119. Zamek-Gliszczynski MJ, Giacomini KM, Zhang L. Emerging clinical importance of hepatic organic cation transporter 1 (OCT1) in drug pharmacokinetics, dynamics, pharmacogenetic variability, and drug interactions. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;103(5):758-60.
 120. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. Beşeri tıbbi ürünler ruhsatlandırma yönetmeliği CTD modül 5 [Internet]. 2013
 121. Tweedie D, Polli JW, Berglund EG, Huang SM, Zhang L, Poirier A, ve ark. Transporter studies in drug development: experience to date and follow-up on decision trees from the international transporter consortium. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(1):113-25.
 122. Alam K, Crowe A, Wang X, Zhang P, Ding K, Li L, ve ark. Regulation of organic anion transporting polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated transport: an updated review in the context of OATP-mediated drug-drug interactions. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):855.
 123. Shitara Y, Sugiyama Y. Preincubation-dependent and long-lasting inhibition of organic anion transporting polypeptide (OATP) and its impact on drug-drug interactions. *Pharmacol Ther.* 2017;177:67-80.
 124. Gertz M, Cartwright CM, Hobbs MJ, Kenworthy KE, Rowland M, Houston JB, ve ark. Cyclosporine inhibition of hepatic and intestinal CYP3A4, uptake and

- efflux transporters: application of PBPK modeling in the assessment of drug-drug interaction potential. *Pharm Res.* 2013;30(3):761-80.
125. Izumi S, Nozaki Y, Maeda K, Komori T, Takenaka O, Kusuhara H, ve ark. Investigation of the impact of substrate selection on in vitro organic anion transporting polypeptide 1B1 inhibition profiles for the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(2):235-47.
 126. Amundsen R, Christensen H, Zabihyan B, Asberg A. Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(9):1499-504.
 127. Pahwa S, Alam K, Crowe A, Farasyn T, Neuhoff S, Hatley O, ve ark. Pretreatment with rifampicin and tyrosine kinase inhibitor dasatinib potentiates the inhibitory effects toward OATP1B1- and OATP1B3-mediated transport. *J Pharm Sci.* 2017;106(8):2123-35.
 128. Parkinson A. Regulatory recommendations for calculating the unbound maximum hepatic inlet concentration: a complicated story with a surprising and happy ending. *Drug Metab Dispos.* 2019;47(7):779-84.
 129. Jaiswal S, Sharma A, Shukla M, Vaghasiya K, Rangaraj N, Lal J. Novel pre-clinical methodologies for pharmacokinetic drug-drug interaction studies: spotlight on "humanized" animal models. *Drug Metab Rev.* 2014;46(4):475-93.
 130. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* 2004;447(5):653-65.
 131. Shen H, Yang Z, Mintier G, Han YH, Chen C, Balimane P, ve ark. Cynomolgus monkey as a potential model to assess drug interactions involving hepatic organic anion transporting polypeptides: in vitro, in vivo, and in vitro-to-in vivo extrapolation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;344(3):673-85.
 132. Takahashi T, Ohtsuka T, Yoshikawa T, Tatekawa I, Uno Y, Utoh M, ve ark. Pitavastatin as an in vivo probe for studying hepatic organic anion transporting polypeptide-mediated drug-drug interactions in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(10):1875-82.
 133. Takahashi T, Ohtsuka T, Uno Y, Utoh M, Yamazaki H, Kume T. Pre-incubation with cyclosporine A potentiates its inhibitory effects on pitavastatin uptake mediated by recombinantly expressed cynomolgus monkey hepatic organic anion transporting polypeptide. *Biopharm Drug Dispos.* 2016;37(8):479-90.
 134. Glavinas H, Méhn D, Jani M, Oosterhuis B, Herédi-Szabó K, Krajcsi P. Utilization of membrane vesicle preparations to study drug-ABC transporter interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(6):721-32.
 135. Gupta A, Harris JJ, Lin J, Bulgarelli JP, Birmingham BK, Grimm SW. Fusidic acid inhibits hepatic transporters and metabolic enzymes: potential cause of clinical drug-drug interaction observed with statin coadministration. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(10):5986-94.

136. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):187-200.
137. Yim CS, Jeong YS, Lee SY, Pyeon W, Ryu HM, Lee JH, ve ark. Specific inhibition of the distribution of lobeglitazone to the liver by atorvastatin in rats: Evidence for a rat organic anion transporting polypeptide 1B2-mediated interaction in hepatic transport. *Drug Metab Dispos*. 2017;45(3):246-59.
138. Khurana V, Minocha M, Pal D, Mitra AK. Inhibition of OATP-1B1 and OATP-1B3 by tyrosine kinase inhibitors. *Drug Metabol Drug Interact*. 2014;29(4):249-59.
139. Riley RJ, Foley SA, Barton P, Soars MG, Williamson B. Hepatic drug transporters: the journey so far. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016;12(2):201-16.
140. Hamilton GA, Jolley SL, Gilbert D, Coon DJ, Barros S, LeCluyse EL. Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell Tissue Res*. 2001;306(1):85-99.
141. Dunn JCY, Tompkins RG, Yarmush ML. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog*. 1991;7(3):237-45.
142. Kotani N, Maeda K, Watanabe T, Hiramatsu M, Gong LK, Bi YA, ve ark. Culture period-dependent changes in the uptake of transporter substrates in sandwich-cultured rat and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(9):1503-10.
143. Kumar V, Salphati L, Hop C, Xiao G, Lai Y, Mathias A, ve ark. A comparison of total and plasma membrane abundance of transporters in suspended, plated, sandwich-cultured human hepatocytes versus human liver tissue using quantitative targeted proteomics and cell surface biotinylation. *Drug Metab Dispos*. 2019;47(4):350-7.
144. Jones HM, Barton HA, Lai Y, Bi YA, Kimoto E, Kempshall S, ve ark. Mechanistic pharmacokinetic modeling for the prediction of transporter-mediated disposition in humans from sandwich culture human hepatocyte data. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(5):1007-17.
145. Sawant-Basak A, Obach RS. Emerging models of drug metabolism, transporters, and toxicity. *Drug Metab Dispos*. 2018;46(11):1556-61.
146. Sahin S, Karabey Y. Investigation of distribution and elimination of terbutaline sulfate in the perfused rat liver preparation. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2010;35(1-2):9-14.
147. Sahin S, Rowland M. Development of an optimal method for the dual perfusion of the isolated rat liver. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1998;39(1):35-43.
148. Sahin S, Rowland M. Influence of erythrocytes on the hepatic distribution kinetics of urea and thiourea. *Eur J Pharm Sci*. 2007;31(3-4):180-9.
149. Yu J, Petrie ID, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I. Mechanisms and clinical significance of pharmacokinetic-based drug-drug interactions with drugs

- approved by the U.S. Food and drug administration in 2017. *Drug Metab Dispos.* 2019;47(2):135-44.
150. Ebner T, Ishiguro N, Taub ME. The use of transporter probe drug cocktails for the assessment of transporter-based drug-drug interactions in a clinical setting-proposal of a four component transporter cocktail. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):3220-8.
 151. Frye RF, Matzke GR, Adedoyin A, Porter JA, Branch RA. Validation of the five-drug 'Pittsburgh cocktail' approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62(4):365-76.
 152. Goh BC, Reddy NJ, Dandamudi UB, Laubscher KH, Peckham T, Hodge JP, ve ark. An evaluation of the drug interaction potential of pazopanib, an oral vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, using a modified Cooperstown 5+1 cocktail in patients with advanced solid tumors. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88(5):652-9.
 153. Streetman DS, Bleakley JF, Kim JS, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, ve ark. Combined phenotypic assessment of CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase with the "Cooperstown cocktail". *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(4):375-83.
 154. Prueksaritanont T, Tatosian DA, Chu X, Railkar R, Evers R, Chavez-Eng C, ve ark. Validation of a microdose probe drug cocktail for clinical drug interaction assessments for drug transporters and CYP3A. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101(4):519-30.
 155. Stopfer P, Giessmann T, Hohl K, Hutzl S, Schmidt S, Gansser D, ve ark. Optimization of a drug transporter probe cocktail: potential screening tool for transporter-mediated drug-drug interactions. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(9):1941-9.
 156. Stopfer P, Giessmann T, Hohl K, Sharma A, Ishiguro N, Taub ME, ve ark. Effects of metformin and furosemide on rosuvastatin pharmacokinetics in healthy volunteers: implications for their use as probe drugs in a transporter cocktail. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2018;43(1):69-80.
 157. Zhang L, Sparreboom A. Predicting transporter-mediated drug interactions: Commentary on: "Pharmacokinetic evaluation of a drug transporter cocktail consisting of digoxin, furosemide, metformin and rosuvastatin" and "Validation of a microdose probe drug cocktail for clinical drug interaction assessments for drug transporters and CYP3A". *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101(4):447-9.
 158. Rowland M, Tozer TN. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications.* 4th Edition ed: Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins; 2011.
 159. Houston JB. Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem Pharmacol.* 1994;47(9):1469-79.
 160. Jamei M, Bajot F, Neuhoff S, Barter Z, Yang J, Rostami-Hodjegan A, ve ark. A mechanistic framework for in vitro-in vivo extrapolation of liver membrane

- transporters: prediction of drug-drug interaction between rosuvastatin and cyclosporine. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(1):73-87.
161. Neuhoff S, Yeo KR, Barter Z, Jamei M, Turner DB, Rostami-Hodjegan A. Application of permeability-limited physiologically-based pharmacokinetic models: part II - prediction of p-glycoprotein mediated drug-drug interactions with digoxin. *J Pharm Sci.* 2013;102(9):3161-73.
 162. Barter ZE, Bayliss MK, Beaune PH, Boobis AR, Carlile DJ, Edwards RJ, ve ark. Scaling factors for the extrapolation of in vivo metabolic drug clearance from in vitro data: reaching a consensus on values of human micro-somal srotein and hepatocellularity per gram of liver. *Curr Drug Metab.* 2007;8:33-45.
 163. Bayliss MK, Bell JA, Jenner WN, Park GR, Wilson K. Utility of hepatocytes to model species differences in the metabolism of loxtidine and to predict pharmacokinetic parameters in rat, dog and man. *Xenobiotica.* 1999;29(3):253-68.
 164. Brown HS, Griffin M, Houston JB. Evaluation of cryopreserved human hepatocytes as an alternative in vitro system to microsomes for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(2):293-301.
 165. Gertz M, Tsamandouras N, Sall C, Houston JB, Galetin A. Reduced physiologically-based pharmacokinetic model of repaglinide: impact of OATP1B1 and CYP2C8 genotype and source of in vitro data on the prediction of drug-drug interaction risk. *Pharm Res.* 2014;31(9):2367-82.
 166. Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Kanamaru H, Saito Y, Hu Z, ve ark. Investigation of the rate-determining process in the hepatic elimination of HMG-CoA reductase inhibitors in rats and humans. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(2):215-22.
 167. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993;10(7):1093-5.
 168. Harwood MD, Neuhoff S, Carlson GL, Warhurst G, Rostami-Hodjegan A. Absolute abundance and function of intestinal drug transporters: a prerequisite for fully mechanistic in vitro-in vivo extrapolation of oral drug absorption. *Biopharm Drug Dispos.* 2013;34(1):2-28.
 169. Bi YA, Qiu X, Rotter CJ, Kimoto E, Piotrowski M, Varma MV, ve ark. Quantitative assessment of the contribution of sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) to the hepatic uptake of rosuvastatin, pitavastatin and fluvastatin. *Biopharm Drug Dispos.* 2013;34(8):452-61.
 170. Burt HJ, Riedmaier AE, Harwood MD, Crewe HK, Gill KL, Neuhoff S. Abundance of hepatic transporters in caucasians: a meta-analysis. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(10):1550-61.
 171. Li M, Zou P, Tyner K, Lee S. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of pharmaceutical nanoparticles. *AAPS J.* 2017;19(1):26-42.
 172. Yuan D, He H, Wu Y, Fan J, Cao Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2019;108(1):58-72.

173. Tsamandouras N, Rostami-Hodjegan A, Aarons L. Combining the 'bottom up' and 'top down' approaches in pharmacokinetic modelling: fitting PBPK models to observed clinical data. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(1):48-55.
174. Sjogren E, Bredberg U, Lennernas H. The pharmacokinetics and hepatic disposition of repaglinide in pigs: mechanistic modeling of metabolism and transport. *Mol Pharm*. 2012;9(4):823-41.
175. Varma MV, Lai Y, Kimoto E, Goosen TC, El-Kattan AF, Kumar V. Mechanistic modeling to predict the transporter- and enzyme-mediated drug-drug interactions of repaglinide. *Pharm Res*. 2013;30(4):1188-99.
176. Poirier A, Funk C, Scherrmann JM, Lave T. Mechanistic modeling of hepatic transport from cells to whole body: application to napsagatran and fexofenadine. *Mol Pharm*. 2009;6(6):1716-33.
177. Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(2):652-62.
178. Food and Drug Administration Center. Physiologically based pharmacokinetic analyses - format and content guidance for industry [Internet]. August 2018 <https://www.fda.gov/media/101469/download>
179. Teorell T. Kinetics of distribution of substances administered to the body, I: The extravascular modes of administration. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1937;57:205-25.
180. Bischoff KB, Dedrick RL, Zaharko DS. Preliminary model for methotrexate pharmacokinetics. *J Pharm Sci*. 1970;59(2):149-54.
181. Bischoff KB, Dedrick RL. Thiopental pharmacokinetics. *J Pharm Sci*. 1968;57(8):1346-51.
182. Amidon GE, Anderson BD, Balthasar JP, Bergstrom CAS, Huang SM, Kasting G, ve ark. Fifty-eight years and counting: high-impact publishing in computational pharmaceutical sciences and mechanism-based modeling. *J Pharm Sci*. 2019;108(1):2-7.
183. Zhao P, Zhang L, Grillo JA, Liu Q, Bullock JM, Moon YJ, ve ark. Applications of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation during regulatory review. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(2):259-67.
184. Li R, Barton HA, Yates PD, Ghosh A, Wolford AC, Riccardi KA, ve ark. A "middle-out" approach to human pharmacokinetic predictions for OATP substrates using physiologically-based pharmacokinetic modeling. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2014;41(3):197-209.
185. Rioux N, Waters NJ. Physiologically based pharmacokinetic modeling in pediatric oncology drug development. *Drug Metab Dispos*. 2016;44(7):934-43.
186. Rostami-Hodjegan A. Physiologically based pharmacokinetics joined with in vitro-in vivo extrapolation of ADME: a marriage under the arch of systems pharmacology. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(1):50-61.

187. Wagner C, Zhao P, Pan Y, Hsu V, Grillo J, Huang SM, ve ark. Application of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling to support dose selection: report of an FDA public workshop on PBPK. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2015;4(4):226-30.
188. Tornio A, Filppula AM, Niemi M, Backman JT. Clinical studies on drug–drug interactions involving metabolism and transport: methodology, pitfalls, and interpretation. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105(6):1345-61.
189. Pan Y, Hsu V, Grimstein M, Zhang L, Arya V, Sinha V, ve ark. The application of physiologically based pharmacokinetic modeling to predict the role of drug transporters: scientific and regulatory perspectives. *J Clin Pharmacol*. 2016;56(Suppl 7):S122-31.
190. Barnett S, Ogungbenro K, Ménochet K, Shen H, Humphreys WG, Galetin A. Comprehensive evaluation of the utility of 20 endogenous molecules as biomarkers of OATP1B inhibition compared with rosuvastatin and coproporphyrin I. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;368(1):125-35.
191. Barnett S, Ogungbenro K, Menochet K, Shen H, Lai Y, Humphreys WG, ve ark. Gaining mechanistic insight into coproporphyrin I as endogenous biomarker for OATP1B-mediated drug-drug interactions using population pharmacokinetic modeling and simulation. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;104(3):564–74.
192. Testa A, Zanda M, Elmore CS, Sharma P. PET tracers to study clinically relevant hepatic transporters. *Mol Pharm*. 2015;12(7):2203-16.
193. Watanabe M, Koike H, Ishiba T, Okada T, Seo S, Hirai K. Synthesis and biological activity of methanesulfonamide pyrimidine- and N-methanesulfonyl pyrrole-substituted 3,5-dihydroxy-6-heptenoates, a novel series of HMG-CoA reductase inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 1997;5(2):437-44.
194. Sasaki J. Pitavastatin approved for treatment of primary hypercholesterolemia and combined dyslipidemia. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6:997-1005.
195. Karazniewicz-Lada M, Baba K, Dolatowski F, Dobrowolska A, Rakicka M. The polymorphism of statins and its effect on their physicochemical properties. *Polim Med*. 2018;48(2):77-82.
196. National Center for Biotechnology Information. PubChem compound summary for CID 11251522, pitavastatin calcium [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 20 Eylül 2020] Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pitavastatin-calcium>
197. Cadila Healthcare Limited. Pravastatin calcium and process for its preparation. WO 2012/025939 A1,2006.
198. Food and Drug Administration. 208379Orig1s000 Clinical pharmacology and biopharmaceutics reviews(s) [Internet]. 2015 [Erişim Tarihi 3 Ekim 2020] Erişim adresi: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2017/208379Orig1s000ClinPharmR.pdf
199. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound

- Summary for CID 5282452, Pitavastatin; [cited 2020 Sept. 20]. [Internet]. 2004. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pitavastatin>.
200. Benet LZ, Broccatelli F, Oprea TI. BDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS J*. 2011;13(4):519-47.
 201. Hu M, Tomlinson B. Evaluation of the pharmacokinetics and drug interactions of the two recently developed statins, rosuvastatin and pitavastatin. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(1):51-65.
 202. Luo Z, Zhang Y, Gu J, Feng P, Wang Y. Pharmacokinetic properties of single- and multiple-dose pitavastatin calcium tablets in healthy Chinese volunteers. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2015;77:52-7.
 203. Varma MV, Steyn SJ, Allerton C, El-Kattan AF. Predicting clearance mechanism in drug discovery: extended clearance classification system (ECCS). *Pharm Res*. 2015;32(12):3785-802.
 204. Niemi M. Transporter pharmacogenetics and statin toxicity. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(1):130-3.
 205. Yamazaki H, Fujino H, Kanazawa M, Tamaki T, Sato F, Suzuki M, ve ark. [Pharmacological and pharmacokinetic features and clinical effects of pitavastatin (Livalo Tablet)]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2004;123(5):349-62.
 206. Fujino H, Saito T, Tsunenari Y, Kojima J, Sakaeda T. Metabolic properties of the acid and lactone forms of HMG-CoA reductase inhibitors. *Xenobiotica*. 2004;34(11-12):961-71.
 207. Yamada I, Fujino H, Shimada S, Kojima J. Metabolic fate of pitavastatin, a new inhibitor of HMG-CoA reductase: similarities and difference in the metabolism of pitavastatin in monkeys and humans. *Xenobiotica*. 2003;33(7):789-803.
 208. Kimata H, Fujino H, Koide T, Yamada Y, Tsunenari Y, Yanagawa Y. Studies on the metabolic fate of NK-104, a new inhibitor of HMG-CoA reductase (1) : absorption, distribution, metabolism and excretion in rats. *Drug Metab Dispos*. 1998;13(5):484-99.
 209. Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusuhara H, Sugiyama Y. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol*. 2005;68(3):800-7.
 210. Yue W, Lee JK, Abe K, Sugiyama Y, Brouwer KLR. Decreased hepatic breast cancer resistance protein expression and function in multidrug resistance-associated protein 2-deficient (TR^{−/−}) rats. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(3):441-7.
 211. Abe K, Bridges AS, Yue W, Brouwer KL. In vitro biliary clearance of angiotensin II receptor blockers and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors in sandwich-cultured rat hepatocytes: comparison with in vivo biliary clearance. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;326(3):983-90.
 212. Njumbe Ediage E, Dillen L, Vroman A, Diels L, Kunze A, Snoeys J, ve ark. Development of an LC-MS method to quantify coproporphyrin I and III as endogenous biomarkers for drug transporter-mediated drug-drug interactions. *J Chromatogr B*. 2018;1073:80-9.

213. Kaplowitz N, Javitt N, Kappas A. Coproporphyrin I and III excretion in bile and urine. *J Clin Investig.* 1972;51(11):2895-9.
214. Gilibili RR, Kurawattimath V, Murali BV, Lai Y, Mariappan TT, Shen H, ve ark. In vitro stimulation of multidrug resistance-associated protein 2 function is not reproduced in vivo in rats. *Pharmaceutics.* 2018;10(3):125.
215. Shen H, Dai J, Liu T, Cheng Y, Chen W, Freedden C, ve ark. Coproporphyrins I and III as functional markers of OATP1B activity: in vitro and in vivo evaluation in preclinical species. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;357(2):382-93.
216. Bezençon J, Saran C, Hussner J, Beaudoin JJ, Zhang Y, Shen H, ve ark. Endogenous coproporphyrin I and III are altered in multidrug resistance-associated protein 2-deficient (TR-) Rats. *J Pharm Sci.* (in press). 2020. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.10.017>
217. Holstege CP. Rifampin. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology* (Third edition). Oxford: Academic Press; 2014. s. 134-6.
218. Banerjee S, Pillai J. 11-Lipid nanoparticle formulations for enhanced antituberculosis therapy. In: Holban AM, Grumezescu AM, editors. *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*: William Andrew Publishing; 2016. s. 285-314.
219. Mariappan TT, Singh S. Positioning of rifampicin in the biopharmaceutics classification system (BCS). *Clin Res Regul Aff.* 2006;23(1):1-10.
220. Loos U, Musch E, Jensen JC, Mikus G, Schwabe HK, Eichelbaum M. Pharmacokinetics of oral and intravenous rifampicin during chronic administration. *Klin Wochenschr.* 1985;63(23):1205-11.
221. Chik Z, Basu RC, Pendek R, Lee TC, Mohamed Z. A bioequivalence comparison of two formulations of rifampicin (300- vs 150-mg capsules): An open-label, randomized, two-treatment, two-way crossover study in healthy volunteers. *Clin Ther.* 2010;32(10):1822-31.
222. Kimura H, Yagi Y, Mikamo M, Maeda K, Kagawa S, Arimitsu K, ve ark. Evaluation of transporter-mediated hepatobiliary transport of newly developed (18)F-labeled pitavastatin derivative, PTV-F1, in rats by PET imaging. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2019;34(5):317-24.
223. Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(9):819-50.
224. Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV, Schuetz JD. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(9):4001-5.
225. Fattinger K, Cattori V, Hagenbuch B, Meier PJ, Stieger B. Rifamycin SV and rifampicin exhibit differential inhibition of the hepatic rat organic anion transporting polypeptides, Oatp1 and Oatp2. *Hepatology.* 2000;32(1):82-6.
226. Amor D, Goutal S, Marie S, Caille F, Bauer M, Langer O, ve ark. Impact of rifampicin-inhibitable transport on the liver distribution and tissue kinetics of erlotinib assessed with PET imaging in rats. *EJNMMI Res.* 2018;8(1):81.

227. Lau YY, Okochi H, Huang Y, Benet LZ. Multiple transporters affect the disposition of atorvastatin and its two active hydroxy metabolites: application of in vitro and ex situ systems. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316(2):762-71.
228. Lau YY, Wu CY, Okochi H, Benet LZ. Ex situ inhibition of hepatic uptake and efflux significantly changes metabolism: hepatic enzyme-transporter interplay. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(3):1040-5.
229. European Medicine Agency. ICH harmonised guideline bioanalytical method validation M10 [Internet]. 2019 Draft version. [Erişim Tarihi 09 Kasım 2020] Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf
230. Food and Drug Administration. Validation of chromatographic methods [Internet]. 1994 Reviewer Guidance. [Erişim Tarihi 10 Ağustos 2020] Erişim adresi: <https://www.fda.gov/media/75643/download>
231. Zahlten RN, Stratman FW. The isolation of hormone-sensitive rat hepatocytes by a modified enzymatic technique. *Arch Biochem Biophys*. 1974;163(2):600-8.
232. MathWorks. R2019b Documentation [Internet]. [Erişim Tarihi 26 Ağustos 2020] Erişim adresi: https://www.mathworks.com/help/releases/R2019b/matlab/math/choose-an-ode-solver.html?searchHighlight=ode&s_tid=doc_srchtile
233. Marino S, Hogue IB, Ray CJ, Kirschner DE. A methodology for performing global uncertainty and sensitivity analysis in systems biology. *J Theor Biol*. 2008;254(1):178-96.
234. Harrison J, De Bruyn T, Darwich AS, Houston JB. Simultaneous assessment in vitro of transporter and metabolic processes in hepatic drug clearance: use of a media loss approach. *Drug Metab Dispos*. 2018;46(4):405-14.
235. Gomero B. Latin hypercube sampling and partial rank correlation coefficient analysis applied to an optimal control problem [Yüksek Lisans]. USA: University of Tennessee; 2012.
236. Moein MM, El Beqqali A, Abdel-Rehim M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J Chromatogr B*. 2017;1043:3-11.
237. O'Hara DM, Theobald V, Egan AC, Usansky J, Krishna M, TerWee J, ve ark. Ligand binding assays in the 21st century laboratory: recommendations for characterization and supply of critical reagents. *AAPS J*. 2012;14(2):316-28.
238. European Medicine Agency. Guideline on bioanalytical method validation [Internet]. 2011 [Erişim Tarihi 9 Kasım 2020] Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
239. Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation-guidance for industry [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 9 Kasım 2020] Erişim adresi:

<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

240. Kaza M, Karazniewicz-Lada M, Kosicka K, Siemiatkowska A, Rudzki PJ. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *J Pharm Biomed Anal.* 2019;165:381-5.
241. Lv H, Sun J-G, Wang G-J, Zhu X-Y, Zhang Y, Gu S-H, ve ark. Determination of pitavastatin in human plasma via HPLC-ESI-MS/MS and subsequent application to a clinical study in healthy Chinese volunteers. *Clin Chim Acta.* 2007;386(1):25-30.
242. Yin T, Liu Q, Zhao H, Zhao L, Liu H, Li M, ve ark. LC-MS/MS assay for pitavastatin in human plasma and subsequent application to a clinical study in healthy Chinese volunteers. *Asian J Pharm Sci.* 2014;9(6):348-55.
243. Takehara I, Yoshikado T, Ishigame K, Mori D, Furihata KI, Watanabe N, ve ark. Comparative study of the dose-dependence of OATP1B inhibition by rifampicin using probe drugs and endogenous substrates in healthy volunteers. *Pharm Res.* 2018;35(7):138.
244. Bozek P, Hutta M, Hrivnáková B. Rapid analysis of porphyrins at low ng/l and microg/l levels in human urine by a gradient liquid chromatography method using octadecylsilica monolithic columns. *J Chromatogr A.* 2005;1084(1-2):24-32.
245. Respaud R, Benz-de Bretagne I, Blasco H, Hulot JS, Lechat P, Le Guellec C. Quantification of coproporphyrin isomers I and III in urine by HPLC and determination of their ratio for investigations of multidrug resistance protein 2 (MRP2) function in humans. *J Chromatogr B.* 2009;877(30):3893-8.
246. Shen H, Chen W, Drexler DM, Mandlkar S, Holenarsipur VK, Shields EE, ve ark. Comparative evaluation of plasma bile acids, dehydroepiandrosterone sulfate, hexadecanedioate, and tetradecanedioate with coproporphyrins I and III as markers of OATP inhibition in healthy subjects. *Drug Metab Dispos.* 2017;45(8):908-19.
247. Ramanathan R, King-Ahmad AJ, Holliman CL, Rodrigues AD. A highly selective and sensitive LC-MS/HRMS assay for quantifying coproporphyrins as organic anion-transporting peptide biomarkers. *Bioanalysis.* 2017;9(22):1787-806.
248. Moreno-Exebio L, Grande-Ortiz M. [Validation of a liquid chromatography method for rifampicin determination in human plasma]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2014;31(1):56-61.
249. Pfeifer ND, Harris KB, Yan GZ, Brouwer KL. Determination of intracellular unbound concentrations and subcellular localization of drugs in rat sandwich-cultured hepatocytes compared with liver tissue. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(11):1949-56.
250. McFeely SJ, Ritchie TK, Yu J, Nordmark A, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I. Identification and evaluation of clinical substrates of organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3. *Clin Transl Sci.* 2019;12(4):379-87.

251. Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P, Ballatori N. Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(1):G271-G8.
252. Powell J, Farasyn T, Kock K, Meng X, Pahwa S, Brouwer KL, ve ark. Novel mechanism of impaired function of organic anion-transporting polypeptide 1B3 in human hepatocytes: post-translational regulation of OATP1B3 by protein kinase C activation. *Drug Metab Dispos*. 2014;42(11):1964-70.
253. Muller F, Sharma A, Konig J, Fromm MF. Biomarkers for in vivo assessment of transporter function. *Pharmacol Rev*. 2018;70(2):246-77.
254. Soars MG, Grime K, Sproston JL, Webborn PJ, Riley RJ. Use of hepatocytes to assess the contribution of hepatic uptake to clearance in vivo. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(6):859-65.
255. Sager JE, Yu J, Ragueneau-Majlessi I, Isoherranen N. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation approaches: A systematic review of published models, applications, and model verification. *Drug Metab Dispos*. 2015;43(11):1823-37.
256. Cattori V, Hagenbuch B, Hagenbuch N, Stieger B, Ha R, Winterhalter KE, ve ark. Identification of organic anion transporting polypeptide 4 (OATP4) as a major full-length isoform of the liver-specific transporter-1 (RLST-1) in rat liver. *FEBS Lett*. 2000;474(2-3):242-5.
257. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, ve ark. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*. 2001;120(2):525-33.
258. Chu X, Bleasby K, Evers R. Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(3):237-52.
259. Hagenbuch B, Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*. 2008;38(7-8):778-801.
260. Nakanishi T, Tamai I. Genetic polymorphisms of OATP transporters and their impact on intestinal absorption and hepatic disposition of drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2012;27(1):106-21.
261. Kellick K. Organic ion transporters and statin drug interactions. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(12):65.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 69

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 20.08.2020 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2019/07
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2018/53 (ONAY TARİHİ: 18.09.2018)
KARAR NUMARASI	: 2020/07-08
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Selma ŞAHİN
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 18.09.2023
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Ecz. Nihan İZAT (Doktora Tezi), Prof. Dr. Selma
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: ŞAHİN
DİĞER YARDIMCI	: Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER, Arş. Gör. Uzm. Kim.
ARAŞTIRMACILAR	: Ozan KAPLAN
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 54 Adet Sprague Dawley Sıçan (300 gr)

Kurulumuzun 18.09.2018 tarihli toplantısında onaylanmış olan 2018/53 kayıt numaralı Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Selma ŞAHİN'in araştırma yürütücüsü olduğu "Karaciğerdeki İlaç Dispozisyonu Üzerine Rifampisin'in Etkisinin İncelenmesi ve Farmakokinetik Modelleme" başlıklı proje için vermiş olduğunuz 17.08.2020 tarihli deney hayvanı sayısı revizyonu dilekçeniz, Kurulumuzun 20.08.2020 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve **uygun bulunmuştur**. Proje kapsamında kullanılacak deney hayvanı sayısı "54 Adet Sprague Dawley Sıçan (300 gr)" olarak güncellenmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2: MATLAB® (R2019b) Programı ile Uygulanan Kodlar ve Komutlar

1. Tek Alt Kompartman Modeli

1.1. Komut dosyası

```

%% veriler

drug_name = {'Pitavastatin'}; %ilac adi
MW = 0.4205; % molekul agirligi ug/mol

fitdata=importfile('fitdatapool.txt', 1, inf);
fitdata2=fitdata(25:end,:);

datamean=43.2630; %datamean kontrol+inh verisi

t=importtimepoints('fitdatapool.txt', [1, Inf]);
t2=t(25:end,:);

tmax=max(t2);
tmin=min(t2);

%% Sistem parametreleri

%parametreler_a

Q_p = 15; % mL/min
V_p = 150; % mL
V_ES = 0.201*40*0.3; % mL/g karaciger *40g karaciger/sican kg*0.3 kg
sican
V_IS = 0.482*40*0.3; % mL/g karaciger *40g karaciger/sican kg*0.3 kg
sican
fu_p = 0.1; % 1% BSA icin
fu_IS = 0.053; % sican hepatosiylerinde pitavastatin serbest
fraksiyonu

a=[Q_p;V_p;V_ES;V_IS;fu_p;fu_IS]; % sistem parametreleri

%% Sabit parametreler

%parametreler_b

CLpasif = 15.696; % mL/dk
CLaktif= 171.36; % mL/dk (deger ilk simulasyon icin verilmistir)
% CLaktif= 1098;
CLsafra = 0.074; % mL/dk (deger ilk simulasyon icin
verilmistir)
% CLsafra = 1.365;
b=[CLpasif;CLaktif;CLsafra]; % sabit/kestirimi yapılacak
parametreler

%% Klerens kestirimi %on simulasyon calismasinda baslangic kosulları
alınacak

initcond=[datamean;0;0;0]; %baslangic kosullari deneysel

% aktif ve safra

```



```

x0 = [CLaktif; CLsafra];
lb = [0; 0];
ub = [inf; inf];

objfun2 = @(x) iprl_objfun(x, fitdata2, t2, initcond, a, b);

lsqoptions = optimset('Algorithm', 'trust-region-reflective', 'Diagnostics', ...
    'on', 'Display', 'iter', 'MaxFunEvals', 10000, 'Maxiter', 1000, ...
    'TolX', 1e-8, 'PrecondBandWidth', 0);

[x, resnorm, residual, ~, ~, ~, jacobian] = lsqnonlin(objfun2, x0, lb, ub, lsqoptions);

jacobian_full = full(jacobian);
vr = sum((residual - mean(residual)).^2) / (length(residual) - length(x));
Cov = inv(jacobian_full * jacobian_full) * var(residual);
sd = sqrt(diag(Cov));
CV = sqrt(diag(Cov)) ./ x * 100; % percentage CV

corr = (Cov ./ sd) ./ (sd');
Summary = [x, sd, CV];

CLaktif = x(1);
CLsafra = x(2);

a = [Q_p; V_p; V_ES; V_IS; fu_p; fu_IS];
b = [CLpasif; CLaktif; CLsafra];

%% reziduel hesabi
initcond = [datamean; 0; 0; 0]; % baslangic kosullari deneysel
simdata = sim_iprl_objfun(t2, initcond, a, b);

%% kestirim degerleri
perfusate_predicted = simdata(:, 1); % perfuzat
liver_predicted = simdata(:, 2); % karaciger
bile_predicted = simdata(:, 3); % safra

%% gozlem degerleri
perfusate_observed = fitdata2(:, 1); % perfuzat
liver_observed = fitdata2(:, 2); % karaciger
bile_observed = fitdata2(:, 3); % safra

%% reziduel
resid = [fitdata2 - simdata];
perfusate_resid = resid(:, 1); % perfuzat
liver_resid = resid(:, 2); % karaciger
bile_resid = resid(:, 3); % safra

resid_all = resid(:);
resid_all(any(isnan(resid_all), 2), :) = [];
resnorm2 = sum((resid_all).^2);

% 1. kolon zaman, 2. kolon gozlem, 3. kolon kestirim, 4. kolon reziduel
iprl_perf = [t2 perfusate_observed perfusate_predicted perfusate_resid];

```

```

iprl_perf(any(isnan(iprl_perf),2),:) = []; % perfüzet

iprl_liver=[t2 liver_observed liver_predicted liver_resid];
iprl_liver(any(isnan(iprl_liver),2),:) = []; % karaciğer

iprl_bile=[t2 bile_observed bile_predicted bile_resid];
iprl_bile(any(isnan(iprl_bile),2),:) = []; % safra
%% Simülasyon
t_sim = [0:0.1:60];
s =iprl_multisolvesimulation(t_sim,a,b,initcond);

sumliver= s(2,:)+s(3,:);
massbalance=sum(s);
pred_s= [s(1,:); sumliver(1,:);s(end,:)];

simulated_perf= pred_s(1,:); %perfüzet simülasyon
simulated_liver= pred_s(2,:); %karaciger simülasyon
simulated_bile= pred_s(3,:); %safra simülasyon

```

1.2. Grafikler için komutlar

```

%% PERFUSAT GRAFIKLERI

% zamana karsi gozlem ve kestirim degerleri grafigi
figure('Position', [400 10 800 800])
subplot (2,2,1)
h1 = plot(t_sim,simulated_perf, 'black');
hold on
scatter(iprl_perf(:,1),iprl_perf(:,2),'ko');
set(gca,'Xtick',[0 3 5 10 15 20 30 45 60])
set(gca, 'FontName', 'Times')
title('Miktar - Zaman','FontSize', 12, 'fontweight','b')
xlabel('Zaman (dk)','FontSize', 10, 'fontweight','b')
ylabel('Perfüzattaki pitavastatin miktarı (µg)','FontSize', 10,
'fontweight','b')
legend('Kestirim profili', 'Gözlem değerleri', 'location','best')
set(legend,'FontSize', 8, 'FontName', 'Times')
hold off

%

p = polyfit(iprl_perf(:,2),iprl_perf(:,3),1); % p returns slope and
intercept of any polynomial function; here 1 indicates first order
(linear)
ypfit = polyval(p,iprl_perf(:,2)); % returns predicted y for all
values of x using slope and intercepts defined in p same as yfit =
p(1)*x+p(2)
ypresid = iprl_perf(:,3) - ypfit;
SSresidp = sum(ypresid.^2);
SStotalp = (length(iprl_perf(:,3))-1)*var(iprl_perf(:,3));
rsq_p = 1 - SSresidp/SStotalp;

LOU = [0.1;100];
TFB = [0.05;50];
TFA = [0.2;200];
xsim = linspace(1,100,0.01);

LOBF = polyval(p,xsim);

```

```

% gozlem degerlerine karsi kestirim degerleri grafigi

subplot (2,2,2)
h2 = loglog(iprl_perf(:,2),iprl_perf(:,3),'ko'...
    ,LOU,LOU,'k'...
    ,TFB,LOU,'k:'...
    ,TFA,LOU,'k:');
hold on;
xlim([7 100]);
ylim([7 100]);
set(gca,'FontName','Times')
title('Kestirim - Gözlem (log - log)','FontSize',12,
'fontweight','b')
xlabel('Perfüzattaki pitavastatin miktarı-Gözlem (µg)','FontSize',
10, 'fontweight','b')
ylabel('Perfüzattaki pitavastatin miktarı-Kestirim (µg)','FontSize',
10, 'fontweight','b')
set(h2(1),'LineWidth',1.0)
set(h2(2),'MarkerEdgeColor','c','MarkerFaceColor','c','MarkerSize',10)

% zamana karsi agirlikli reziduel grafigi
subplot (2,2,3)
h3 = plot(iprl_perf(:,1),(iprl_perf(:,4)/iprl_perf(:,3)),'ko'); %
weighted residuals
hold on
plot([0,60],[0,0],'k-')
title('Ağırlıklı Rezidüel - Zaman','FontSize',12, 'fontweight','b')
xlabel('Zaman (dk)','FontSize',10, 'fontweight','b')
ylabel('Ağırlıklı rezidüel','FontSize',10, 'fontweight','b')
xlim([0 60]);
ylim([-1 1]);
set(gca,'FontName','Times')
set(gca,'Xtick',[0 3 5 10 15 20 30 45 60])
set(h3(1),'LineWidth',1.0)

% kestirim degerlerine karsi agirlikli reziduel grafigi

subplot (2,2,4)
h4 = semilogx(iprl_perf(:,3),(iprl_perf(:,4)/iprl_perf(:,3)),'ko');
hold on
plot([1 100],[0,0],'k-')
hold off
title('Kestirim - Ağırlıklı Rezidüel','FontSize',12,
'fontweight','b')
xlabel('Perfüzattaki pitavastatin miktarı-Kestirim (µg)','FontSize',
10, 'fontweight','b')
ylabel('Ağırlıklı rezidüel','FontSize',10, 'fontweight','b')
xlim([min(iprl_perf(:,3)) max(iprl_perf(:,3))]);
ylim([-1 1]);
set(gca,'FontName','Times')
set(h4(1),'LineWidth',1.0)

%% KARACIGER GRAFIKLERI

% zamana karsi gozlem ve kestirim degerleri grafigi
figure('Position',[400 10 800 800])
subplot (2,2,1)
h1_liver = plot(t_sim,simulated_liver, 'black');

```

```

hold on
scatter(iprl_liver(:,1),iprl_liver(:,2),'ko');
set(gca,'Xtick',[0 15 60],'FontName','Times')
title('Miktar - Zaman','FontSize',12,'fontweight','b')
xlabel('Zaman (dk)','FontSize',10,'fontweight','b','FontName','Times')
ylabel('Karaciğerdeki pitavastatin miktarı (µg)','FontSize',10,'fontweight','b')
legend('Kestirim profili','Gözlem değerleri','location','best')
set(legend,'FontSize',8)
hold off

%
p_1 = polyfit(iprl_liver(:,2),iprl_liver(:,3),1); % p returns slope
and intercept of any polynomial function; here 1 indicates first
order (linear)
ylfit = polyval(p_1,iprl_liver(:,2)); % returns predicted y for all
values of x using slope and intercepts defined in p same as yfit =
p(1)*x+p(2)
ylresid = iprl_liver(:,3) - ylfite;
SSresidl = sum(ylresid.^2);
SStotall = (length(iprl_liver(:,3))-1)*var(iprl_liver(:,3));
rsq_1 = 1 - SSresidl/SStotall;

LOU_1 = [1;100];
TFB_1 = [0.5;50];
TFA_1 = [2;200];
xsim_1 = linspace(0.1,1,0.0001);

LOBF_1 = polyval(p_1,xsim_1);

% gozlem degerlerine karsi kestirim degerleri grafigi

subplot (2,2,2)
h3_liver = loglog(iprl_liver(:,2),iprl_liver(:,3),'ko'...
,LOU_1,LOU_1,'k'...
,TFB_1,LOU_1,'k:'...
,TFA_1,LOU_1,'k:');
hold on;

xlim([5 100]);
ylim([5 100]);
set(gca,'FontName','Times')
title('Kestirim - Gözlem (log - log)','FontSize',12,'fontweight','b')
xlabel('Karaciğerdeki pitavastatin miktarı-Gözlem (µg)','FontSize',10,'fontweight','b')
ylabel('Karaciğerdeki pitavastatin miktarı-Kestirim (µg)','FontSize',10,'fontweight','b')
set(h3_liver(1),'LineWidth',1.0)
set(h3_liver(2),'MarkerEdgeColor','c','MarkerFaceColor','c','MarkerSize',10)

% zamana karsi agirlikli reziduel grafigi
subplot (2,2,3)

```

```

h4_liver =
plot(iprl_liver(:,1), (iprl_liver(:,4)/iprl_liver(:,3)), 'ko'); %
weighted residuals
hold on
plot([0,tmax],[0,0], 'k-')
title('Ağırlıklı Rezidüel - Zaman', 'FontSize', 12, 'fontweight', 'b')
xlabel('Zaman (dk)', 'FontSize', 10, 'fontweight', 'b')
ylabel('Ağırlıklı rezidüel', 'FontSize', 10, 'fontweight', 'b')
xlim([tmin tmax]);
ylim([-1 1]);
set(gca, 'Xtick', [0 15 60])
set(gca, 'FontName', 'Times')
set(h4_liver(1), 'LineWidth', 1.0)

% kestirim degerlerine karsi agirlikli reziduel grafigi

subplot (2,2,4)
h5_liver =
semilogx(iprl_liver(:,3), (iprl_liver(:,4)/iprl_liver(:,3)), 'ko');
hold on
plot([10 100],[0,0], 'k-')
hold off
title('Kestirim - Ağırlıklı Rezidüel', 'FontSize', 12,
'fontweight', 'b')
xlabel('Karaciğerdeki pitavastatin miktarı-Kestirim
(µg)', 'FontSize', 10, 'fontweight', 'b')
ylabel('Ağırlıklı rezidüel', 'FontSize', 10, 'fontweight', 'b')
xlim([min(iprl_liver(:,3)) max(iprl_liver(:,3))]);
ylim([-1 1]);
set(gca, 'FontName', 'Times')
set(h5_liver(1), 'LineWidth', 1.0)

%% SAFRA GRAFIKLERI

% zamana karsi gozlem ve kestirim degerleri grafigi
figure('Position', [400 10 800 800])
subplot (2,2,1)
h1_bile = plot(t_sim, simulated_bile, 'black');
hold on
scatter(iprl_bile(:,1), iprl_bile(:,2), 'ko');
set(gca, 'Xtick', [0 15 60], 'FontName', 'Times')
title('Miktar - Zaman', 'FontSize', 12, 'fontweight', 'b')
xlabel('Zaman (dk)', 'FontSize', 10, 'fontweight', 'b')
ylabel('Safradaki pitavastatin miktarı (µg)', 'FontSize', 10,
'fontweight', 'b')
legend('Kestirim profili', 'Gözlem değerleri', 'location', 'best')
set(legend, 'FontSize', 8)
hold off

%
p_b = polyfit(iprl_bile(:,2), iprl_bile(:,3), 1); % p returns slope
and intercept of any polynomial function; here 1 indicates first
order (linear)
ybfite = polyval(p_b, iprl_bile(:,2)); % returns predicted y for all
values of x using slope and intercepts defined in p same as yfit =
p(1)*x+p(2)
ybresid = iprl_bile(:,3) - ybfite;
SSresidb = sum(ybresid.^2);
SStotalb = (length(iprl_bile(:,3))-1)*var(iprl_bile(:,3));

```

```

rsq_b = 1 - SSresidb/SStotalb;

LOU_b = [0.1;100];
TFB_b = [0.05;50];
TFA_b = [0.2;200];
xsim_b = linspace(0.01,0.1,0.00001);

LOBF_b = polyval(p_b,xsim_b);

% gozlem degerlerine karsi kestirim degerleri grafigi

subplot (2,2,2)
h3_bile = loglog(iprl_bile(:,2),iprl_bile(:,3),'ko'...
    ,LOU_b,LOU_b,'k'...
    ,TFB_b,LOU_b,'k:'...
    ,TFA_b,LOU_b,'k:');
hold on;
xlim([0.1 20]);
ylim([0.1 20]);
set(gca,'FontName','Times')
title('Kestirim - Gözlem (log - log)','FontSize',12,
    'fontweight','b')
xlabel('Safradaki pitavastatin miktarı-Gözlem (µg)','FontSize',10,
    'fontweight','b')
ylabel('Safradaki pitavastatin miktarı-Kestirim (µg)','FontSize',
    10, 'fontweight','b')
set(h3_bile(1),'LineWidth',1.0)
set(h3_bile(2),'MarkerEdgeColor','c','MarkerFaceColor','c','MarkerSi
ze',10)

% zamana karsi agirlikli reziduel grafigi
subplot (2,2,3)
h4_bile = plot(iprl_bile(:,1),(iprl_bile(:,4)/iprl_bile(:,3)),'ko');
% weighted residuals
hold on
plot([0,tmax],[0,0],'k-')
title('Ağırlıklı Rezidüel - Zaman','FontSize',12, 'fontweight','b')
xlabel('Zaman (dk)','FontSize',10, 'fontweight','b')
ylabel('Ağırlıklı rezidüel','FontSize',10, 'fontweight','b')
xlim([tmin tmax]);
ylim([-1 1]);
set(gca,'FontName','Times')
set(gca,'Xtick',[0 15 60])
set(h4_bile(1),'LineWidth',1.0)

% kestirim degerlerine karsi agirlikli reziduel grafigi

subplot (2,2,4)
h5_bile =
semilogx(iprl_bile(:,3),(iprl_bile(:,4)/iprl_bile(:,3)),'ko');
hold on
plot([0.1 100],[0,0],'k-')
hold off
title('Kestirim - Ağırlıklı Rezidüel','FontSize',12,
    'fontweight','b')
xlabel('Safradaki pitavastatin miktarı-Kestirim (µg)','FontSize',
    10, 'fontweight','b')
ylabel('Ağırlıklı rezidüel','FontSize',10, 'fontweight','b')

```

```
xlim([min(iprl_bile(:,3)) max(iprl_bile(:,3))]);
ylim([-1 1]);
set(gca, 'FontName', 'Times')
set(h5_bile(1), 'LineWidth', 1.0)
```

1.3. Fonksiyonlar

```
function dA=iprl(~,A,a,b)

%parametreler_a
Q_p = a(1);
V_p = a(2);
V_ES = a(3);
V_IS = a(4);
fu_p = a(5);
fu_IS = a(6);

%parametreler_b
CLpasif = b(1);
CLaktif= b(2);
CLsafra = b(3);

%diferansiyel denklemler
dA=[0;0;0;0]; % 4 denklem tanımlanacağını belirtir
dA(1)= Q_p*((A(2)/V_ES)-(A(1)/V_p)); % perfuzat
dA(2)= (Q_p*(A(1)/V_p-A(2)/V_ES))+ (CLpasif*((fu_IS*A(3)/V_IS)-
(fu_p*A(2)/V_ES)) - ...
(CLaktif*fu_p*A(2)/V_ES); % karaciger ekstraseluler
dA(3)= (CLpasif*((fu_p*A(2)/V_ES)-(fu_IS*A(3)/V_IS)) +
(CLaktif*fu_p*A(2)/V_ES)-...
(CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS); % karaciger intraseluler
dA(4)= (CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS);% safra
end

function s =iprl_multisolvesimulation(t_sim,a,b,initcond)
tmax=max(t_sim);
options=odeset('RelTol',1e-8,'AbsTol',1e-10);
sol = ode45(@iprl, [0, tmax], initcond,options,a,b);
s = deval(sol,t_sim);
end

function simdata = sim_iprl_objfun(t2,initcond,a,b)
tmax=max(t2);
options = optimset();
```

```

odefun = @ (t2,A) iprl(t2,A,a,b);

sol = ode45(odefun,[0,tmax],initcond,options);

simulatedData = deval(sol,t2);

simdata=
[simulatedData(1,:);(simulatedData(2,:)+simulatedData(3,:));...
    simulatedData(4,:)]';
end

function resid = iprl_objfun(x,fitdata2,t2,initcond,a,b)

b(2)=x(1);
b(3)=x(2);

tmax=max(t2);

options = optimset();

odefun = @ (t2,A) iprl(t2,A,a,b);

sol = ode45(odefun,[0,tmax],initcond,options);

simulatedData = deval(sol,t2);

simData2=
[simulatedData(1,:);(simulatedData(2,:)+simulatedData(3,:));...
    simulatedData(4,:)]';

resid = [fitdata2-simData2];
resid= resid(:);
resid(isnan(resid))=[];
end

```

2.5 Alt Kompartman Modeli

2.1. Komut dosyası

```

%% veriler

drug_name = {'Pitavastatin'}; %ilac adi
MW = 0.4205; % molekul agirligi ug/mol

fitdata=importfile('fitdatapool.txt', 1, inf);
fitdata2=fitdata(25:end,:);

datamean=43.2630; %datamean kontrol+inh verisi

t=importtimepoints('fitdatapool.txt', [1, Inf]);
t2=t(25:end,:);

tmax=max(t2);
tmin=min(t2);
%% Sistem parametreleri

%parametreler_a

Q_p = 15; % mL/min

```



```

V_p = 150; % mL
V_ES = 0.201*40*0.3; % mL/g karaciger *40g karaciger/sican kg*0.3 kg
sican
V_IS = 0.482*40*0.3; % mL/g karaciger *40g karaciger/sican kg*0.3 kg
sican
fu_p = 0.1; % 1% BSA icin
fu_IS = 0.053; % sican hepatosiylerinde pitavastatin serbest
fraksiyonu

a=[Q_p;V_p;V_ES;V_IS;fu_p;fu_IS]; % sistem parametreleri

%% Sabit parametreler

%parametreler_b

CLpasif = 15.696; % mL/dk
CLaktif= 171.36; % mL/dk (deger ilk simulasyon icin verilmistir)
% CLaktif= 1098;
CLsafra = 0.074; % mL/dk (deger ilk simulasyon icin
verilmistir)
% CLsafra = 1.365;
b=[CLpasif;CLaktif;CLsafra]; % sabit/kestirimi yapilacak
parametreler

%% Klerens kestirimi %on simulasyon calismasinda baslangic kosulları
alınacak

initcond=[datamean;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0];

% aktif ve safra
x0 = [CLaktif;CLsafra]; %tahmin degeri
lb = [0;0];
ub = [inf;inf];

objfun2 = @(x) ipr1_objfun5(x,fitdata2,t2,initcond,a,b);

lsqnoptions= optimset('Algorithm','trust-region-
reflective','Diagnostics',...
'on','Display','iter','MaxFunEvals',10000,'Maxiter',1000,...
'TolX',1e-8,'PrecondBandWidth',0);

[x,resnorm,residual,~,~,~,jacobian]=lsqnonlin(objfun2,x0,lb,ub,lsqno
ptions);

jacobian_full=full(jacobian);
vr = sum((residual-mean(residual)).^2)/(length(residual)-length(x));
Cov = inv(jacobian_full'*jacobian_full)*var(residual);
sd = sqrt(diag(Cov));
CV = sqrt(diag(Cov))./x*100; % percentage CV
corr = (Cov./sd)./(sd')
Summary = [x,sd,CV]

CLaktif=x(1);
CLsafra=x(2);

a=[Q_p;V_p;V_ES;V_IS;fu_p;fu_IS];
b=[CLpasif;CLaktif;CLsafra];

```

```

%% reziduel hesabi
initcond=[datamean;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0];
simdata=sim_iprl_objfun5(t2,initcond,a,b);

%kestirim degerleri
perfusate_predicted=simdata(:,1); %perfuzat
liver_predicted=simdata(:,2); %karaciger
bile_predicted=simdata(:,3); %safra

%gozlem degerleri
perfusate_observed=fitdata2(:,1); %perfuzat
liver_observed= fitdata2(:,2); %karaciger
bile_observed= fitdata2(:,3); %safra

%rezidüel
resid=[fitdata2-simdata];
perfusate_resid=resid(:,1); %perfuzat
liver_resid=resid(:,2); %karaciger
bile_resid=resid(:,3); %safra

resid_all=resid(:);
resid_all(any(isnan(resid_all),2),:)= [];
resnorm2=sum((resid_all).^2);

%1.kolon zaman , 2. kolon gozlem, 3. kolon kestirim, 4. kolon
reziduel
iprl_perf=[t2 perfusate_observed perfusate_predicted
perfusate_resid];
iprl_perf(any(isnan(iprl_perf),2),:)= []; % perfüzat

iprl_liver=[t2 liver_observed liver_predicted liver_resid];
iprl_liver(any(isnan(iprl_liver),2),:)= []; % karaci?er

iprl_bile=[t2 bile_observed bile_predicted bile_resid];
iprl_bile(any(isnan(iprl_bile),2),:)= []; % safra
%% Simülasyon
t_sim = [0:0.1:60];
s =iprl_multisolvesimulation5(t_sim,a,b,initcond);
sumliver= s(2,:)+s(3,:)+s(4,:)+s(5,:)+s(6,:)+s(7,:)...
+s(8,:)+s(9,:)+s(10,:)+s(11,:);

massbalance=sum(s);
pred_s= [s(1,:); sumliver(1,:);s(end,:)];

simulated_perf= pred_s(1,:); %perfüzat simülasyon
simulated_liver= pred_s(2,:); %karaci?er simülasyon
simulated_bile= pred_s(3,:); %safra simülasyon

```

2.2. Grafikler (Bkz. 1.2.)

2.3. Fonksiyonlar

```

function dA=iprl5(~,A,a,b)
%parametreler_a
Q_p = a(1);
V_p = a(2);
V_ES = a(3);
V_IS = a(4);
fu_p = a(5);

```

```

fu_IS = a(6);

%parametreler_b

CLpasif = b(1);
CLaktif= b(2);
CLsafra = b(3);

%diferansiyel denklemler

dA=[0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0]; % 12 denklem tanımlanacağını belirtir

dA(1)= Q_p*(A(6)/(V_ES/5)-(A(1)/V_p)); % perfuzat

dA(2)= (Q_p*(A(1)/V_p - A(2)/(V_ES/5)))+
(CLpasif/5*((fu_IS*A(7)/(V_IS/5))-(fu_p*A(2)/(V_ES/5)))) - ...
((CLaktif/5)*fu_p*A(2)/(V_ES/5)); % karaciger ekstraseluler-1

dA(3)= (Q_p*(A(2)/(V_ES/5) - A(3)/(V_ES/5)))+
(CLpasif/5*((fu_IS*A(8)/(V_IS/5))-(fu_p*A(3)/(V_ES/5)))) - ...
((CLaktif/5)*fu_p*A(3)/(V_ES/5)); % karaciger ekstraseluler-2

dA(4)= (Q_p*(A(3)/(V_ES/5) - A(4)/(V_ES/5)))+
(CLpasif/5*((fu_IS*A(9)/(V_IS/5))-(fu_p*A(4)/(V_ES/5)))) - ...
((CLaktif/5)*fu_p*A(4)/(V_ES/5)); % karaciger ekstraseluler-3

dA(5)= (Q_p*(A(4)/(V_ES/5) - A(5)/(V_ES/5)))+
(CLpasif/5*((fu_IS*A(10)/(V_IS/5))-(fu_p*A(5)/(V_ES/5)))) - ...
((CLaktif/5)*fu_p*A(5)/(V_ES/5)); % karaciger ekstraseluler-4

dA(6)= (Q_p*(A(5)/(V_ES/5) - A(6)/(V_ES/5)))+
(CLpasif/5*((fu_IS*A(11)/(V_IS/5))-(fu_p*A(6)/(V_ES/5)))) - ...
((CLaktif/5)*fu_p*A(6)/(V_ES/5)); % karaciger ekstraseluler-5

dA(7)= (CLpasif/5*((fu_p*A(2)/(V_ES/5))-(fu_IS*A(7)/(V_IS/5))) +
((CLaktif/5)*fu_p*A(2)/(V_ES/5)))-...
((CLsafra/5)*fu_IS*A(7)/(V_IS/5));% karaciger intraseluler-1

dA(8)= (CLpasif/5*((fu_p*A(3)/(V_ES/5))-(fu_IS*A(8)/(V_IS/5))) +
((CLaktif/5)*fu_p*A(3)/(V_ES/5)))-...
((CLsafra/5)*fu_IS*A(8)/(V_IS/5));% karaciger intraseluler-2

dA(9)= (CLpasif/5*((fu_p*A(4)/(V_ES/5))-(fu_IS*A(9)/(V_IS/5))) +
((CLaktif/5)*fu_p*A(4)/(V_ES/5)))-...
((CLsafra/5)*fu_IS*A(9)/(V_IS/5));% karaciger intraseluler-3

dA(10)= (CLpasif/5*((fu_p*A(5)/(V_ES/5))-(fu_IS*A(10)/(V_IS/5))) +
((CLaktif/5)*fu_p*A(5)/(V_ES/5)))-...
((CLsafra/5)*fu_IS*A(10)/(V_IS/5));% karaciger intraseluler-4

dA(11)= (CLpasif/5*((fu_p*A(6)/(V_ES/5))-(fu_IS*A(11)/(V_IS/5))) +
((CLaktif/5)*fu_p*A(6)/(V_ES/5)))-...
((CLsafra/5)*fu_IS*A(11)/(V_IS/5));% karaciger intraseluler-5

dA(12)= (CLsafra*fu_IS*(A(7)+A(8)+A(9)+A(10)+A(11))/(V_IS));% safra

function s =ipr1_multisolvesimulation5(t_sim,a,b,initcond)

tmax=max(t_sim);

```

```

options=odeset('RelTol',1e-8,'AbsTol',1e-10);

sol = ode45(@ipr15, [0, tmax], initcond,options,a,b);

s = deval(sol,t_sim);

end
function simdata = sim_ipr1_objfun5(t2,initcond,a,b)

tmax=max(t2);

options = optimset();

odefun = @ (t2,A) ipr15(t2,A,a,b);

sol = ode45(odefun,[0,tmax],initcond,options);

simulatedData = deval(sol,t2);

simdata=
[simulatedData(1,:);(simulatedData(2,:)+simulatedData(3,:)...
+simulatedData(4,:)+simulatedData(5,:)+simulatedData(6,:)+...
simulatedData(7,:)+simulatedData(8,:)+simulatedData(9,:)+...
simulatedData(10,:)+simulatedData(11,:));simulatedData(12,:)]';
end

function resid = ipr1_objfun5(x,fitdata2,t2,initcond,a,b)

b(2)=x(1);
b(3)=x(2);

tmax=max(t2);

options = optimset();

odefun = @ (t2,A) ipr15(t2,A,a,b);
sol = ode45(odefun,[0,tmax],initcond,options);

simulatedData = deval(sol,t2);

simData2=
[simulatedData(1,:);(simulatedData(2,:)+simulatedData(3,:)...
+simulatedData(4,:)+simulatedData(5,:)+simulatedData(6,:)+...
simulatedData(7,:)+simulatedData(8,:)+simulatedData(9,:)+...
simulatedData(10,:)+simulatedData(11,:));simulatedData(12,:)]';

resid = [fitdata2-simData2];
resid= resid(:);
resid(isnan(resid))=[];
end

```

3. Belirsizlik analizi ve PRCC Analizi

3.1. Komut dosyası

```

%% BELIRSIZLIK VE DUYARLILIK ANALIZLERI
%% PRCC analizi

%% PRCC analizi

clear
close all

%% parametreler

drug_name = {'Pitavastatin'};
MW = 0.4205; % ug/mol
t = [0:0.1:60]';
t2= [0:0.1:15]';
initcond=[43.2630;0;0;0]; %baslangic kosullari deneysel

n_samples = 1000;
P= load(P);
P = loadParam(n_samples);
param_names = {'Q_{P} (mL/dk)', 'V_{P} (mL)', 'V_{ES} (mL)', 'V_{IS} (mL)', 'fu_{P}', 'fu_{IS}', 'CL_{pasif} (mL/dk)', 'CL_{aktif} (mL/dk)', 'CL_{safra} (mL/dk)'};
param_names2 = {'Q_{P}', 'V_{P}', 'V_{ES}', 'V_{IS}', 'fu_{P}', 'fu_{IS}', 'CL_{pasif}', 'CL_{aktif}', 'CL_{safra}'};
n_param = size(P,2);

% parametreler icin dagilim seklinin kontrolu
figure()
for i = 1:n_param
    subplot(3,3,i)
    histogram(P(:,i))
    ylabel('Frekans')
    title(param_names{i})
    set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 10)
end

%% Simulasyon

lt = length(t);

simulated_perf = zeros(lt, n_samples);
simulated_liver = zeros(lt, n_samples);
simulated_bile = zeros(lt, n_samples);

%60 dk simulasyon
for i = 1:n_samples

    simdata = mc_iprl_objfun(t, initcond, P(i,:));

    simulated_perf(:,i) = simdata(:,1);
    simulated_liver(:,i) = simdata(:,2);
    simulated_bile(:,i) = simdata(:,3);

end

%15 dk simulasyon

```

```

for i = 1:n_samples

    simdata = mc_iprl_objfun(t2, initcond, P(i,:));

    simulated_perf2(:,i) = simdata(:,1);
    simulated_liver2(:,i) = simdata(:,2);
    simulated_bile2(:,i) = simdata(:,3);

end

%kestirim AUC
auc_perf60=trapz(t, (simulated_perf/150/MW)); %60 dk
auc_perf15=trapz(t2, (simulated_perf2/150/MW)); %15 dk

%kestirim karacigerdeki miktar
A_liver60=simulated_liver(end, :); %A60, karaci?er
A_liver15=simulated_liver2(end, :); %A15, karaci?er

%kestirim safradaki miktar
A_bile60= simulated_bile(end, :); %A60, safra
A_bile15= simulated_bile2(end, :); %A15, safra

outputs=[auc_perf15; auc_perf60; A_liver15; A_liver60; A_bile15;...
    A_bile60];
output_names = {'EAA_{0-15} ( $\mu$ M.dk)', 'EAA_{0-60} ( $\mu$ M.dk)',...
    'A_{15, karaci?er} ( $\mu$ g)', 'A_{60, karaci?er} ( $\mu$ g)', 'A_{15,
safra} ( $\mu$ g)',...
    'A_{60, safra} ( $\mu$ g)'};
output_names2 = {'EAA_{0-15}', 'EAA_{0-60}',...
    'A_{15, karaci?er}', 'A_{60, karaci?er}', 'A_{15, safra}',...
    'A_{60, safra}'};
n_outputs = size(outputs,2);

%% g?zlem degerleri

load 'fitdatapool.mat'

%gozlem EAA (AUC)
AUC15_observed=
[6.2281;7.3643;8.5774;8.3353;8.8791;9.5139;9.8890;9.8589];
AUC60_observed=
[20.2823;18.9420;13.4427;19.2322;17.4955;26.8506;14.5426;16.8915;16.
9381;28.6048;22.4162];

%gozlem karacigerdeki miktar
Aliver15_observed= fitdatapool.liver(1:120);
Aliver15_observed(any(isnan(Aliver15_observed),2),:) = [];

Aliver60_observed= fitdatapool.liver(121:168);
Aliver60_observed(any(isnan(Aliver60_observed),2),:) = [];

%gozlem safradaki miktar
Abile15_observed= fitdatapool.bile(1:120);
Abile15_observed(any(isnan(Abile15_observed),2),:) = [];

Abile60_observed= fitdatapool.bile(121:168);
Abile60_observed(any(isnan(Abile60_observed),2),:) = [];

```

```

%% Belirsizlik analizleri
% Empirik kumulatif dagilim yogunluk fonksiyonu
% auc_perfuzat
figure('Position', [400 10 800 800]) ;
subplot(2,1,1);
[y2,x2]=ecdf(log(auc_perf15));
[y1,x1]=hist(log(auc_perf15));
[ax,~,~]=plotyy(x1,y1./n_samples,x2,y2,@(x,y)bar(x,y,1,'c'),'stairs'
);
set(gca,'FontName','Times','FontSize',14)
ylabel(ax(1),'Histogram: Kestirim değerlerinin fraksiyonu',
'FontSize',12,'FontName','Times');
ylabel(ax(2),'Kümülatif yođunluk fonksiyonu: Kümülatif olasýlýk',
'FontSize',12,'FontName','Times');
xlabel('log(EAA_{0-15})');
title(output_names(1));

subplot(2,1,2);
[y2,x2]=ecdf(log(auc_perf60));
[y1,x1]=hist(log(auc_perf60));
[ax,~,~]=plotyy(x1,y1./n_samples,x2,y2,@(x,y)bar(x,y,1,'c'),'stairs'
);
set(gca,'FontName','Times','FontSize',14)
ylabel(ax(1),'Histogram: Kestirim değerlerinin fraksiyonu',
'FontSize',12,'FontName','Times');
ylabel(ax(2),'Kümülatif yođunluk fonksiyonu: Kümülatif olasýlýk',
'FontSize',12,'FontName','Times');
xlabel('log(EAA_{0-60})');
title(output_names(2));

% Amax_liver
figure('Position', [400 10 800 800]) ;
subplot(2,1,1);
[y2,x2]=ecdf(log(A_liver15));
[y1,x1]=hist(log(A_liver15));
[ax,~,~]=plotyy(x1,y1./n_samples,x2,y2,@(x,y)bar(x,y,1,'c'),'stairs'
);
set(gca,'FontName','Times','FontSize',14)
ylabel(ax(1),'Histogram: Kestirim değerlerinin fraksiyonu',
'FontSize',12,'FontName','Times');
ylabel(ax(2),'Kümülatif yođunluk fonksiyonu: Kümülatif olasýlýk',
'FontSize',12,'FontName','Times');
xlabel('Log(A_{15, karaciğer})');
title(output_names(3));

subplot(2,1,2);
[y2,x2]=ecdf(log(A_liver60));
[y1,x1]=hist(log(A_liver60));
[ax,~,~]=plotyy(x1,y1./n_samples,x2,y2,@(x,y)bar(x,y,1,'c'),'stairs'
);
set(gca,'FontName','Times','FontSize',14)
ylabel(ax(1),'Histogram: Kestirim değerlerinin fraksiyonu',
'FontSize',12,'FontName','Times');
ylabel(ax(2),'Kümülatif yođunluk fonksiyonu: Kümülatif olasýlýk',
'FontSize',12,'FontName','Times');
xlabel('Log(A_{60, karaciğer})');
title(output_names(4));

```

```

% Amax_bile
figure('Position', [400 10 800 800]) ;
subplot(2,1,1);
[y2,x2]=ecdf(log(A_bile15));
[y1,x1]=hist(log(A_bile15));
[ax,~,~]=plotyy(x1,y1./n_samples,x2,y2,@(x,y)bar(x,y,1,'c'),'stairs'
);
set(gca,'FontName','Times','FontSize',14)
ylabel(ax(1),'Histogram: Kestirim değerlerinin fraksiyonu',
'FontSize',12,'FontName','Times');
ylabel(ax(2),'Kümülatif yoğunluk fonksiyonu: Kümülatif olasılık',
'FontSize',12,'FontName','Times');
xlabel('Log(A_{15, safra})');
title(output_names(5));

subplot(2,1,2);
[y2,x2]=ecdf(log(A_bile60));
[y1,x1]=hist(log(A_bile60));
[ax,~,~]=plotyy(x1,y1./n_samples,x2,y2,@(x,y)bar(x,y,1,'c'),'stairs'
);
set(gca,'FontName','Times','FontSize',14)
ylabel(ax(1),'Histogram: Kestirim değerlerinin fraksiyonu',
'FontSize',12,'FontName','Times');
ylabel(ax(2),'Kümülatif yoğunluk fonksiyonu: Kümülatif olasılık',
'FontSize',12,'FontName','Times');
xlabel('Log(A_{60, safra})');
title(output_names(6));

% Kutu grafikleri
figure('Position', [400 10 800 800]) ;
subplot(3,2,1);
g1 = [ones(size(AUC15_observed)); 2*ones(size(auc_perf15'))];
boxplot([AUC15_observed; auc_perf15'], g1)
set(gca,'XTickLabel',{'Gözlem','Kestirim'})
set(gca,'FontName','Times','FontSize',14)
title(output_names(1));
ylabel('EAA (µM.dk)');
hold on;
scatter(2,mean(auc_perf15),'b');
scatter(1,mean(AUC15_observed),'b');

subplot(3,2,2);
g2 = [ones(size(AUC60_observed)); 2*ones(size(auc_perf60'))];
boxplot([AUC60_observed; auc_perf60'], g2)
set(gca,'XTickLabel',{'Gözlem','Kestirim'})
set(gca,'FontName','Times','FontSize',14)
title(output_names(2));
ylabel('EAA (µM.dk)');
hold on;
scatter(2,mean(auc_perf60),'b');
scatter(1,mean(AUC60_observed),'b');

subplot(3,2,3);
g3 = [ones(size(Aliver15_observed)); 2*ones(size(A_liver15'))];
boxplot([Aliver15_observed; A_liver15'], g3)
set(gca,'XTickLabel',{'Gözlem','Kestirim'})
title(output_names(3));
ylabel('Miktar (µg)');

```



```

set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 14)
hold on;
scatter(2, mean(A_liver15), 'b');
scatter(1, mean(A_liver15_observed), 'b');

subplot(3, 2, 4);
g4 = [ones(size(A_liver60_observed)); 2*ones(size(A_liver60'))];
boxplot([A_liver60_observed; A_liver60'], g4)
set(gca, 'XTickLabel', {'Gözlem', 'Kestirim'})
title(output_names(4));
ylabel('Miktar (µg)');
set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 14)
hold on;
scatter(2, mean(A_liver60), 'b');
scatter(1, mean(A_liver60_observed), 'b');

subplot(3, 2, 5);
g5 = [ones(size(A_bile15_observed)); 2*ones(size(A_bile15'))];
boxplot([A_bile15_observed; A_bile15'], g5)
set(gca, 'XTickLabel', {'Gözlem', 'Kestirim'})
title(output_names(5));
ylabel('Miktar (µg)');
set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 14)
hold on;
scatter(2, mean(A_bile15), 'b');
scatter(1, mean(A_bile15_observed), 'b');

subplot(3, 2, 6);
g6 = [ones(size(A_bile60_observed)); 2*ones(size(A_bile60'))];
boxplot([A_bile60_observed; A_bile60'], g6)
set(gca, 'XTickLabel', {'Gözlem', 'Kestirim'})
title(output_names(6));
ylabel('Miktar (µg)');
set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 14)
hold on;
scatter(2, mean(A_bile60), 'b');
scatter(1, mean(A_bile60_observed), 'b');
legend('show', 'Ortalama', 'Position', [0.825 0.03 0.05 0.05])

% table - statistical metrics:

stats_auc_perf15=[mean(auc_perf15); geomean(auc_perf15);
median(auc_perf15); std(auc_perf15)/mean(auc_perf15)*100;
prctile(auc_perf15,5); prctile(auc_perf15,95)];
stats_auc_perf60=[mean(auc_perf60); geomean(auc_perf60);
median(auc_perf60); std(auc_perf60)/mean(auc_perf60)*100;
prctile(auc_perf60,5); prctile(auc_perf60,95)];
stats_A_liver15=[mean(A_liver15); geomean(A_liver15);
median(A_liver15); std(A_liver15)/mean(A_liver15)*100;
prctile(A_liver15,5); prctile(A_liver15,95)];
stats_A_liver60=[mean(A_liver60); geomean(A_liver60);
median(A_liver60); std(A_liver60)/mean(A_liver60)*100;
prctile(A_liver60,5); prctile(A_liver60,95)];
stats_A_bile15=[mean(A_bile15); geomean(A_bile15); median(A_bile15);
std(A_bile15)/mean(A_bile15)*100; prctile(A_bile15,5);
prctile(A_bile15,95)];

```

```

stats_A_bile60=[mean(A_bile60); geomean(A_bile60); median(A_bile60);
std(A_bile60)/mean(A_bile60)*100; prctile(A_bile60,5);
prctile(A_bile60,95)];

%istatistik tablosu elde etme ve kaydetme
StatsTable1=table(categorical({'Arithmetic mean';'Geometric
mean';'Median';'CV (%)';'percentile: 5th';'percentile:
95th'}),stats_auc_perf15,stats_auc_perf60,stats_A_liver15,
stats_A_liver60, stats_A_bile15, stats_A_bile60,...
'VariableNames', {'Stats' 'AUC perfusate 15 min', 'AUC perfusate
60 min',...
'A in liver 15 min', 'A in liver 60 min', 'A in bile 15 min',...
'A in bile 60 min'});

filename = 'statstable1.xlsx';
writetable(StatsTable1,filename, 'Sheet',1, 'Range', 'A1');

%% Korelasyon grafikleri

for j= 1:6
    figure('units','inch','position',[0,0,10,10*8/8]);
    for i = 1:n_param
        subplot(3,3,i)
        scatter(P(:,i),outputs(j,:))
        set(gca,'FontName','Times','FontSize',16)
        ylabel(output_names{j})
        title(param_names{i})
        set(gca,'FontWeight','bold');
    end
end

%% PRCC analizi

[rho_perf15, pval_perf15]=partialcorri(outputs(1,:),'
P','Type','Spearman');
[rho_perf60, pval_perf60]=partialcorri(outputs(2,:),'
P','Type','Spearman');
[rho_liver15, pval_liver15]=partialcorri(outputs(3,:),'
P','Type','Spearman');
[rho_liver60, pval_liver60]=partialcorri(outputs(4,:),'
P','Type','Spearman');
[rho_bile15, pval_bile15]=partialcorri(outputs(5,:),'
P','Type','Spearman');
[rho_bile60, pval_bile60]=partialcorri(outputs(6,:),'
P','Type','Spearman');

% Plot PRCC's
figure('units','inch','position',[0,0,10,7*6/6]);
subplot(3,2,1);
bar((rho_perf15),'r');
set(gca,'FontName','Times','FontSize',12)
title(output_names(1));
ylabel('PRCC');
set(gca,'XTickLabel',param_names2);
xtickangle(45)
set(gca,'YTick',(-1:0.5:1))

```

```

subplot(3,2,2);
bar((rho_perf60), 'r');
set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 12)
title(output_names(2));
ylabel('PRCC');
set(gca, 'XTickLabel', param_names2);
xtickangle(45)
set(gca, 'YTick', (-1:0.5:1))

subplot(3,2,3);
bar(rho_liver15);
set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 12)
title(output_names(3));
ylabel('PRCC');
set(gca, 'XTickLabel', param_names2);
xtickangle(45)
set(gca, 'YTick', (-1:0.5:1))

subplot(3,2,4);
bar(rho_liver60);
set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 12)
title(output_names(4));
ylabel('PRCC');
set(gca, 'XTickLabel', param_names2);
xtickangle(45)
set(gca, 'YTick', (-1:0.5:1))

subplot(3,2,5);
bar((rho_bile15), 'y');
set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 12)
title(output_names(5));
ylabel('PRCC');
set(gca, 'XTickLabel', param_names2);
xtickangle(45)
set(gca, 'YTick', (-1:0.5:1))

subplot(3,2,6);
bar((rho_bile60), 'y');
set(gca, 'FontName', 'Times', 'FontSize', 12)
title(output_names(6));
ylabel('PRCC');
set(gca, 'XTickLabel', param_names2);
xtickangle(45)
set(gca, 'YTick', (-1:0.5:1))

% PRCC tablosu olusturma ve kaydetme
prccTable2=table(categorical(param_names)', rho_perf15', pval_perf15',
...
    rho_perf60', pval_perf60', rho_liver15', pval_liver15',
rho_liver60', ...
pval_liver60', rho_bile15', pval_bile15', rho_bile60', pval_bile60', ...
    'VariableNames', {'Parameters' 'PRCC_AUC perfusate 15 min',
'Pval_AUC perfusate 15 min', ...
    'PRCC_AUC perfusate 60 min', 'Pval_AUC perfusate 60 min', ...
    'PRCC_A in liver 15 min', 'Pval_Amax in liver 15 min', ...
    'PRCC_A in liver 60 min', 'Pval_Amax in liver 60 min', ...
    'PRCC_A in bile 15 min', 'Pval_Amax in bile 15 min', ...
    'PRCC_A in bile 60 min', 'Pval_Amax in bile 60 min'});

```

```

filename = 'prcctable2.xlsx';
writetable(prcctTable2,filename,'Sheet',1,'Range','A1');

%% KÝsme sÝra korelasyon grafikleri

[~,idxperf15]=sort(auc_perf15,'descend');
[~,idxperf60]=sort(auc_perf60,'descend');
[~,idxliver15]=sort(A_liver15,'descend');
[~,idxliver60]=sort(A_liver60,'descend');
[~,idxbile15]=sort(A_bile15,'descend');
[~,idxbile60]=sort(A_bile60,'descend');

[~,idxParam]=sort(P,'descend');

idx=[idxperf15; idxperf60; idxliver15; idxliver60;idxbile15;
idxbile60];
n_idx=size(idx,1);

for j=1:6
    figure('units','inch','position',[0,0,10,10*8/8])
    temp = 1:length(idx(j,:));
    r = ones(length(idx(j,)),1);
    r(idx(j,:)) = temp;

temp = repmat([1:length(idx(j,:))]',1,9);

for iParam = 1:9
    temp = 1:length(idx(j,:));
    temp2 = ones(length(idx(j,)),1);
    temp2(idxParam(:,iParam)) = temp;
    r_param(:,iParam) = temp2;
end

for iParam = 1:9

subplot(3,3,iParam);
scatter(r_param(:,iParam),r);
set(gca,'FontName','Times','FontSize',16)
title(param_names2{iParam});
ylabel(output_names2{j})
set(gca,'FontWeight','bold');
end

end

```

3.2. Fonksiyonlar

```

function [P] = loadParam(n_samples)

%% parametreler icin ortalama degerler

Q_p = 15;
V_p = 150;
V_ES = 0.201*40*0.3;
V_IS = 0.482*40*0.3;
fu_p = 0.1;
fu_IS = 0.053;
CLpasif = 15.696;
CLaktif= 171.36;
CLsafra = 0.074;

paramlist=[Q_p;V_p;V_ES;V_IS;fu_p;fu_IS;CLpasif;CLaktif;CLsafra];

%% Parametrelerdeki belirsizlik, varyasyon eklenmesi

% Q_p ve V_p deneysel varyasyon
P1_inf = paramlist(1:2)*0.95;
P1_sup = paramlist(1:2)*1.05;

U1 = rand(n_samples, 2);

P_QpVp = zeros(n_samples, 2);

for i = 1:n_samples
    P_QpVp(i, :) = P1_inf' + U1(i,:).*(P1_sup' - P1_inf');
end

% V_ES ve V_IS deneysel varyasyon
P2_inf = paramlist(3:4)*0.9;
P2_sup = paramlist(3:4)*1.1;

U2 = rand(n_samples, 2);

P_VESVIS = zeros(n_samples, 2);

for i = 1:n_samples
    P_VESVIS(i, :) = P2_inf' + U2(i,:).*(P2_sup' - P2_inf');
end

% fu_p, fu_IS ve CLpasif % 30 varyasyon
P3_inf = paramlist(5:7)*0.7;
P3_sup = paramlist(5:7)*1.3;

U3 = rand(n_samples, 3);

P_fupfuISCLpasif = zeros(n_samples, 3);

for i = 1:n_samples
    P_fupfuISCLpasif(i, :) = P3_inf' + U3(i,:).*(P3_sup' - P3_inf');
end

%CL_aktif sýnýr degerler

P4_inf = 171.36;
P4_sup = 1098;

```

```

U4 = rand(n_samples, 1);
P_CLaktif = P4_inf + U4.*(P4_sup - P4_inf);

%CLsafra s?n?r degerler

P5_inf = 0.074;
P7_sup = 1.365;
U7 = rand(n_samples, 1);
P_CLsafra = P5_inf + U7.*(P7_sup - P5_inf);

% parametre vektorunun olusturulmas?
P = [P_QpVp, P_VESVIS, P_fupfuISCLpasif, P_CLaktif, P_CLsafra];

end

```

```

function [dA]= mc_iprl(~,A,paramlist)
%girdi parametreleri
Q_p = paramlist(1);
V_p = paramlist(2);
V_ES = paramlist(3);
V_IS = paramlist(4);
fu_p = paramlist(5);
fu_IS = paramlist(6);
CLpasif = paramlist(7);
CLaktif= paramlist(8);
CLsafra = paramlist(9);

%diferansiyel denklemler

dA=[0;0;0;0]; % 4 denklem yazilacagini belirtir

dA(1)= Q_p*((A(2)/V_ES)-(A(1)/V_p)); % perfusat

dA(2)= (Q_p*(A(1)/V_p-A(2)/V_ES))+ (CLpasif*((fu_IS*A(3)/V_IS)-
(fu_p*A(2)/V_ES))) - ...
(CLaktif*fu_p*A(2)/V_ES); % karaciger ekstraseluler

dA(3)= (CLpasif*((fu_p*A(2)/V_ES)-(fu_IS*A(3)/V_IS))) +
(CLaktif*fu_p*A(2)/V_ES)-...
(CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS);% karaciger intraseluler

dA(4)= (CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS);% safra

end

```

```

function simdata = mc_iprl_objfun(t,initcond,paramlist)

options = optimset();

odefun = @ (t,A) mc_iprl(t,A,paramlist);

sol = ode45(odefun,t,initcond,options);

simulatedData = deval(sol,t);

```

```

simdata=
[simulatedData(1,:);(simulatedData(2,:)+simulatedData(3,:));...
simulatedData(4,:)]';

```

```
end
```

4. Monte Carlo Simülasyonu

4.1. Komut dosyası

```

%% MONTE CARLO ANALIZI

clear
close all

%% parametreler

drug_name = {'Pitavastatin'}; %ilac adi
MW = 0.4205; % ug/mol
t = [0:0.1:60]'; %simulasyon zaman noktaları

initcond=[43.2630;0;0;0]; %başlangıç koşulları deneysel

n_samples = 1000;
P = loadParam(n_samples);
param_names = {'Q_{P} (mL/dk)', 'V_{P} (mL)', 'V_{ES} (mL)', 'V_{IS} (mL)', 'fu_{P}', 'fu_{IS}', 'CL_{pasif} (mL/dk)', 'CL_{aktif} (mL/dk)', 'CL_{safra} (mL/dk)'};
param_names2 = {'Q_{P}', 'V_{P}', 'V_{ES}', 'V_{IS}', 'fu_{P}', 'fu_{IS}', 'CL_{pasif}', 'CL_{aktif}', 'CL_{safra}'};
n_param = size(P,2);

% parametreler için dağılım şeklinin kontrolü
figure()
for i = 1:n_param
    subplot(3,3,i)
    histogram(P(:,i))
    ylabel('Frekans')
    title(param_names{i})
    set(gca,'FontName','Times')
end

%% Simulasyon

lt = length(t);

simulated_perf = zeros(lt, n_samples);
simulated_liver = zeros(lt, n_samples);
simulated_bile = zeros(lt, n_samples);

for i = 1:n_samples

    simdata = mc_iprl_objfun(t, initcond, P(i,:));

    simulated_perf(:,i) = simdata(:,1);
    simulated_liver(:,i) = simdata(:,2);
    simulated_bile(:,i) = simdata(:,3);

```

```

end

%% Grafikler

load 'fitdatapool.mat'
fitdatapool.perf=fitdatapool.perf;
plotResults(t, simulated_perf, simulated_liver, simulated_bile,
fitdatapool)

%% Filtreleme

limit_bile = 5;
limit_perf=10;
idx_hit = false(n_samples,1);

for i = 1:n_samples
    idx_bile = simulated_bile(end,i) < limit_bile;
    idx_perf = simulated_perf(end,i) > limit_perf;
    idx_hit(i) = idx_bile;
    %     idx_hit(i) = idx_perf;
    %     idx_hit(i) = idx_bile && idx_perf;
end

plotResults(t, simulated_perf(:,idx_hit),
simulated_liver(:,idx_hit), simulated_bile(:,idx_hit), fitdatapool)
% yline(subplot(1,3,1),10,'k--', 'DisplayName','Filtre')
yline(subplot(1,3,3),5,'k--', 'DisplayName','Filtre')

%% Kolmogorov Smirnov Testi

[kstat, pval, h] = MCFiltering(P, idx_hit, param_names2);

```

4.2. Fonksiyonlar

```

function [P] = loadParam(n_samples)

%% mean parameters

Qp = 15; % expressed in mL/min
Vp = 150; % expressed in mL
Ve = 0.201*40*0.3; % mL/g liver*40g liver/rat kg*0.3 kg rat
Vt = 0.482*40*0.3; % mL/g liver*40g liver/rat kg*0.3 kg rat
fup = 0.1; % for 1.5% BSA in perfusate
fut = 0.053; % unbound fraction of pitavastatin estimated in rat
hepatocytes
CLpassive = 15.696; %expressed in mL/min
CLactive= 275; % expressed in mL/min
CLbiliary = 0.36; % expressed in mL/min (value inserted just
for the simulation)

% CLactive= 171.36; % expressed in mL/min
% CLbiliary = 0.074; % expressed in mL/min (value inserted
just for the simulation)

paramlist=[Qp;Vp;Ve;Vt;fup;fut;CLpassive;CLactive;CLbiliary];

%% Add variability

```



```

% Qp and Vp
P1_inf = paramlist(1:2)*0.95;
P1_sup = paramlist(1:2)*1.05;

U1 = rand(n_samples, 2);

P_QpVp = zeros(n_samples, 2);

for i = 1:n_samples
    P_QpVp(i, :) = P1_inf' + U1(i,:).*(P1_sup' - P1_inf');
end

% Ve and Vt due to reported CV
P2_inf = paramlist(3:4)*0.9;
P2_sup = paramlist(3:4)*1.1;

U2 = rand(n_samples, 2);

P_VeVt = zeros(n_samples, 2);

for i = 1:n_samples
    P_VeVt(i, :) = P2_inf' + U2(i,:).*(P2_sup' - P2_inf');
end

% fup, fut and CLpassive 30%
P3_inf = paramlist(5:7)*0.7;
P3_sup = paramlist(5:7)*1.3;

U3 = rand(n_samples, 3);

P_fupfutCLpassive = zeros(n_samples, 3);

for i = 1:n_samples
    P_fupfutCLpassive(i, :) = P3_inf' + U3(i,:).*(P3_sup' -
P3_inf');
end

%CLactive limits

P4_inf = 171.36;
P4_sup = 1098;
U4 = rand(n_samples, 1);
P_CLactive = P4_inf + U4.*(P4_sup - P4_inf);

%CLbiliary limits

P5_inf = 0.074;
P7_sup = 1.365;
U7 = rand(n_samples, 1);
P_CLbiliary = P5_inf + U7.*(P7_sup - P5_inf);

% build parameters vector
P = [P_QpVp, P_VeVt, P_fupfutCLpassive, P_CLactive, P_CLbiliary];

end

```

```

function [dA]= mc_iprl(~,A,paramlist)
%girdi parametreleri
Q_p = paramlist(1);
V_p = paramlist(2);
V_ES = paramlist(3);
V_IS = paramlist(4);
fu_p = paramlist(5);
fu_IS = paramlist(6);
CLpasif = paramlist(7);
CLaktif= paramlist(8);
CLsafra = paramlist(9);

%diferansiyel denklemler

dA=[0;0;0;0]; % 4 denklem yazilacagini belirtir

dA(1)= Q_p*((A(2)/V_ES)-(A(1)/V_p)); % perfusat

dA(2)= (Q_p*(A(1)/V_p-A(2)/V_ES))+ (CLpasif*((fu_IS*A(3)/V_IS)-
(fu_p*A(2)/V_ES))) - ...
      (CLaktif*fu_p*A(2)/V_ES); % karaciger ekstraseluler

dA(3)= (CLpasif*((fu_p*A(2)/V_ES)-(fu_IS*A(3)/V_IS))) +
      (CLaktif*fu_p*A(2)/V_ES)-...
      (CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS);% karaciger intraseluler

dA(4)= (CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS);% safra

end

function simdata = mc_iprl_objfun(t,initcond,paramlist)

options = optimset();

odefun = @ (t,A) mc_iprl(t,A,paramlist);

sol = ode45(odefun,t,initcond,options);

simulatedData = deval(sol,t);

simdata=
[simulatedData(1,:);(simulatedData(2,:)+simulatedData(3,:));...
simulatedData(4,:)]';

end

function [kstat, pstat, h] = MCFiltering(P, idx_hit, param_names)

n_param = size(P,2);
kstat = zeros(n_param, 1);
pstat = zeros(n_param, 1);
h = zeros(n_param, 1);

for i = 1:n_param
    P_hit = P(idx_hit,i);
    P_nhit = P(~idx_hit,i);
    [h(i), pstat(i), kstat(i)] = kstest2(P_hit, P_nhit);
end

```

```

%% Istatistik test grafigi

figure()
bar(kstat)
set(gca, 'xticklabel', param_names, 'FontName', 'Times')
title('kstat')
xtickangle(45)

%% parametreler histogram grafigi

figure('units', 'inch', 'position', [0,0,10,10*8/8]);
for i = 1:n_param
    subplot(3,3,i)
    hold on
    histogram(P(idx_hit,i), 'normalization', 'probability')
    histogram(P(~idx_hit,i), 'normalization', 'probability')
    title(param_names{i})
    set(gca, 'FontName', 'Times')
    if i==9
        legend('isabet eden', 'isabet etmeyen', 'location',
'none', 'Position', [0.825 0.03 0.05 0.05])
    end
end

end

function [] = plotResults(t, simulated_perf, simulated_liver,
simulated_bile, data)

%% perfuzat grafigi

median_perfusate = median(simulated_perf, 2);
sup_perfusate = prctile(simulated_perf, 97.5, 2);
inf_perfusate = prctile(simulated_perf, 2.5, 2);
sup_perfusate2 = prctile(simulated_perf, 75, 2);
inf_perfusate2 = prctile(simulated_perf, 25, 2);

CI95_area = [sup_perfusate; flipud(inf_perfusate)];
CI50_area = [sup_perfusate2; flipud(inf_perfusate2)];
t_area = [t; flipud(t)];

face_alpha = 0.5;
face_color1 = 'c';
face_color2 = 'r';

figure('units', 'inch', 'position', [0,0,8,8*8/8]);
subplot(1,3,1)
hold on
fill(t_area, CI95_area, face_color1, 'FaceAlpha', face_alpha,
'LineStyle', 'none')
fill(t_area, CI50_area, face_color2, 'FaceAlpha', face_alpha,
'LineStyle', 'none')
plot(t, median_perfusate, 'LineWidth', 2)
xlabel('Zaman (dk)')
ylabel('Perfüzattaki pitavastatin miktarı (µg)')
title('Perfüzat')
plot(data.time, data.perf, '*')

```

```

set(gca, 'FontWeight', 'bold', 'FontName', 'Times');
legend('95%', '50%', 'Ortanca', 'Gözlem
değerleri', 'Location', 'northeast')

%% karaciger grafigi

median_liver = median(simulated_liver, 2);
sup_liver = prctile(simulated_liver, 97.5, 2);
inf_liver = prctile(simulated_liver, 2.5, 2);
sup_liver2 = prctile(simulated_liver, 75, 2);
inf_liver2 = prctile(simulated_liver, 25, 2);

CI95_area = [sup_liver; flipud(inf_liver)];
CI50_area = [sup_liver2; flipud(inf_liver2)];
t_area = [t; flipud(t)];

face_alpha = 0.5;
face_color1 = 'c';
face_color2 = 'r';

subplot(1,3,2)
hold on
fill(t_area, CI95_area, face_color1, 'FaceAlpha', face_alpha,
'LineStyle', 'none')
fill(t_area, CI50_area, face_color2, 'FaceAlpha', face_alpha,
'LineStyle', 'none')
plot(t, median_liver, 'LineWidth', 2)
xlabel('Zaman (dk)')
ylabel('Karaciğerdeki pitavastatin miktarı (µg)')
title('Karaciğer')
plot(data.time, data.liver, '*')
set(gca, 'FontWeight', 'bold', 'FontName', 'Times');
legend('95%', '50%', 'Ortanca', 'Gözlem
değerleri', 'Location', 'southeast')

%% safra grafigi

median_bile = median(simulated_bile, 2);
sup_bile = prctile(simulated_bile, 97.5, 2);
inf_bile = prctile(simulated_bile, 2.5, 2);
sup_bile2 = prctile(simulated_bile, 75, 2);
inf_bile2 = prctile(simulated_bile, 25, 2);

CI95_area = [sup_bile; flipud(inf_bile)];
CI50_area = [sup_bile2; flipud(inf_bile2)];
t_area = [t; flipud(t)];

face_alpha = 0.5;
face_color1 = 'c';
face_color2 = 'r';

subplot(1,3,3)
hold on
fill(t_area, CI95_area, face_color1, 'FaceAlpha', face_alpha,
'LineStyle', 'none')
fill(t_area, CI50_area, face_color2, 'FaceAlpha', face_alpha,
'LineStyle', 'none')
plot(t, median_bile, 'LineWidth', 2)
xlabel('Zaman (dk)')

```

```

ylabel('Safradaki pitavastatin miktarı (µg)')
title('Safra')
plot(data.time, data.bile, '*')
set(gca,'FontWeight','bold','FontName','Times');
legend('95%', '50%', 'Ortanca', 'Gözlem
değerleri', 'Location', 'northwest')

end

```

5. Tek Alt Kompartman Modelinde Kontrol ve inhibitör koşulu ile veri analizi

5.1. Komut dosyası

```

close all
clc
clear
%% veriler

drug_name = {'Pitavastatin'}; %ilac adi
MW = 0.4205; % molekul agirligi ug/mol

fitdata1=importfile('fitdatapool.txt', 1, inf);
fitdata2=fitdata1(25:end,:); %fitdatapool
fitdata3=importfile('fitdatahighinhibitor.txt', 1, inf);
fitdata4=fitdata3(13:end,:); %high inhibitor
fitdata=[fitdata2; fitdata4];

fitdata_massbalance= sum(fitdata');
fitdata_massbalance(isnan(fitdata_massbalance))=[];
datamean=mean(fitdata_massbalance);

t1=importtimepoints('fitdatapool.txt', [1, Inf]);
t2=t1(25:end,:); %fitdatapool
t3=importtimepoints('fitdatahighinhibitor.txt', [1, Inf]);
t4=t3(13:end,:); %high inhibitor

t=[t2;t4];

tmax=60;
tmin=0;
%% Sistem parametreleri

%parametreler_a

Q_p = 15; % mL/min
V_p = 150; % mL
V_ES = 0.201*40*0.3; % mL/g karaciger *40g karaciger/sican kg*0.3 kg
sican
V_IS = 0.482*40*0.3; % mL/g karaciger *40g karaciger/sican kg*0.3 kg
sican
fu_p = 0.1; % 1% BSA icin
fu_IS = 0.053; % sican hepatosiylerinde pitavastatin serbest
fraksiyonu

a=[Q_p;V_p;V_ES;V_IS;fu_p;fu_IS]; % sistem parametreleri

%% Sabit parametreler

%parametreler_b

```

```

CLpasif = 15.696;          % mL/dk
CLaktif= 171.36;         % mL/dk (deger ilk simulasyon icin verilmistir)
CLaktif_inh= 171.36*0.4; % mL/dk (deger ilk simulasyon icin
verilmistir)
CLsafra = 0.074;         % mL/dk (deger ilk simulasyon icin
verilmistir)

b=[CLpasif;CLaktif;CLaktif_inh;CLsafra]; % sabit/kestirimi yapilacak
parametreler

%% Klerens kestirimi

initcond=[datamean;0;0;0]; %baslangic kosullari deneysel

% %%aktif, aktif inh, safra
x0 =[171.36;0;0.074]; % tahmin degeri
lb = [0;0;0];
ub = [inf;inf;inf];

objfun2 = @(x) iprl_objfun(x,fitdata,t,initcond,a,b);

lsqnoptions= optimset('Algorithm','trust-region-
reflective','Diagnostics',...
    'on','Display','iter','MaxFunEvals',10000,'Maxiter',1000,...
    'TolX',1e-8,'PrecondBandWidth',0);

[x,resnorm,residual,~,~,~,jacobian]=lsqnonlin(objfun2,x0,lb,ub,lsqno
ptions);
jacobian_full=full(jacobian);
vr = sum((residual-mean(residual)).^2)/(length(residual)-length(x));
Cov = inv(jacobian_full'*jacobian_full)*var(residual);
sd = sqrt(diag(Cov));
CV = sqrt(diag(Cov))./x*100; % % varyasyon katsayisi

corr = (Cov./sd)./(sd')
Summary = [x,sd,CV] % ortalama standart sapma ve varyasyon katsayisi

CLaktif=x(1);
CLaktif_inh=x(2);
CLsafra=x(3);

inhibition=100-(CLaktif_inh/CLaktif*100); %inhibisyon

a=[Q_p;V_p;V_ES;V_IS;fu_p;fu_IS];
b=[CLpasif;CLaktif;CLaktif_inh;CLsafra];

%% reziduel hesabi

%kestirim degerleri

simdata=iprl_objfun_simdata(t,initcond,a,b);

simdata_pool=simdata(1:144,:); %kontrol grubu simulasyonu
simdata_highinh=simdata(145:216,:); %inhibitor grubu simulasyonu

perfusate_predicted=simdata(:,1); %perfuzat
liver_predicted=simdata(:,2); %karaciger

```

```

bile_predicted=simdata(:,3); %safra

perfusate_predicted_pool=simdata_pool(:,1); %kontrol grubu perfuzat
liver_predicted_pool=simdata_pool(:,2); %kontrol grubu karaciger
bile_predicted_pool=simdata_pool(:,3); %kontrol grubu safra

perfusate_predicted_highinh=simdata_highinh(:,1); %inhibitor grubu
perfuzat
liver_predicted_highinh=simdata_highinh(:,2); %inhibitor grubu
karaciger
bile_predicted_highinh=simdata_highinh(:,3); %inhibitor grubu safra

%gozlem degerleri
perfusate_observed=fitdata(:,1); %perfuzat
liver_observed= fitdata(:,2); %karaciger
bile_observed= fitdata(:,3); %safra

perfusate_observed_pool=fitdata2(:,1); %kontrol grubu perfuzat
liver_observed_pool=fitdata2(:,2); %kontrol grubu karaciger
bile_observed_pool=fitdata2(:,3); %kontrol grubu safra

perfusate_observed_highinh=fitdata4(:,1); %inhibitor grubu perfuzat
liver_observed_highinh=fitdata4(:,2); %inhibitor grubu karaciger
bile_observed_highinh=fitdata4(:,3); %inhibitor grubu safra

resid=[fitdata-simdata]; %reziduel
resid_pool=[fitdata2-simdata_pool]; %kontrol grubu reziduel
resid_highinh=[fitdata4-simdata_highinh]; %inhibitor grubu reziduel

perfusate_resid=resid(:,1); %perfuzat reziduel
liver_resid=resid(:,2); %karaciger reziduel
bile_resid=resid(:,3); %safra reziduel

perfusate_resid_pool=resid_pool(:,1); %perfuzat reziduel kontrol
grubu
liver_resid_pool=resid_pool(:,2); %karaciger reziduel kontrol grubu
bile_resid_pool=resid_pool(:,3); %safra reziduel kontrol grubu

perfusate_resid_highinh=resid_highinh(:,1); %perfuzat reziduel
inhibitor grubu
liver_resid_highinh=resid_highinh(:,2); %karaciger reziduel
inhibitor grubu
bile_resid_highinh=resid_highinh(:,3); %safra reziduel inhibitor
grubu

%1.kolon zaman , 2. kolon gozlem, 3. kolon kestirim, 4. kolon
reziduel

ipr1_perf=[t perfusate_observed perfusate_predicted
perfusate_resid];
ipr1_perf(any(isnan(ipr1_perf),2),:) = []; % Perfuzat

ipr1_liver=[t liver_observed liver_predicted liver_resid];
ipr1_liver(any(isnan(ipr1_liver),2),:) = []; % Karaciger

ipr1_bile=[t bile_observed bile_predicted bile_resid];
ipr1_bile(any(isnan(ipr1_bile),2),:) = []; % Safra

```

```

iprl_perf_pool=[t2 perfusate_observed_pool perfusate_predicted_pool
...
    perfusate_resid_pool];
iprl_perf_pool(any(isnan(iprl_perf_pool),2),:) = []; % Kontrol grubu
perfuzat

iprl_liver_pool=[t2 liver_observed_pool liver_predicted_pool ...
    liver_resid_pool];
iprl_liver_pool(any(isnan(iprl_liver_pool),2),:) = []; % Kontrol
grubu karaciger

iprl_bile_pool=[t2 bile_observed_pool bile_predicted_pool ...
    bile_resid_pool];
iprl_bile_pool(any(isnan(iprl_bile_pool),2),:) = []; % Kontrol grubu
safra

iprl_perf_highinh=[t4 perfusate_observed_highinh ...
    perfusate_predicted_highinh perfusate_resid_highinh];
iprl_perf_highinh(any(isnan(iprl_perf_highinh),2),:) = []; %
Inhibitor grubu perfuzat

iprl_liver_highinh=[t4 liver_observed_highinh
liver_predicted_highinh ...
    liver_resid_highinh];
iprl_liver_highinh(any(isnan(iprl_liver_highinh),2),:) = []; %
Inhibitor grubu karaciger

iprl_bile_highinh=[t4 bile_observed_highinh bile_predicted_highinh
...
    bile_resid_highinh];
iprl_bile_highinh(any(isnan(iprl_bile_highinh),2),:) = []; %
Inhibitor grubu safra

%% Simülasyon
t_sim = [0:0.1:60];

simulation_pool =iprl_simulation_pool(t_sim,a,b,initcond); % kontrol
simulasyon
simulation_highinh =iprl_simulation_highinh(t_sim,a,b,initcond);
%inhibitor simulasyon

b2= [CLpasif;CLaktif;0;CLsafra]; % %100 inhibisyon simulasyonu
simulation_zero =iprl_simulation_highinh(t_sim,a,b2,initcond);

```

5.2. Grafikler (Bkz. 1.2.)

5.3. Fonksiyonlar

```

function dA=iprl(~,A,a,b)

%parametreler_a
Q_p = a(1);
V_p = a(2);
V_ES = a(3);
V_IS = a(4);
fu_p = a(5);

```



```

fu_IS = a(6);

%parametreler_b

CLpasif = b(1);
CLaktif= b(2);
CLsafra = b(4);

%diferansiyel denklemler

dA=[0;0;0;0]; % 4 denklem tanımlanacağını belirtir

dA(1)= Q_p*((A(2)/V_ES)-(A(1)/V_p)); % perfuzat

dA(2)= (Q_p*(A(1)/V_p-A(2)/V_ES))+ (CLpasif*((fu_IS*A(3)/V_IS)-
(fu_p*A(2)/V_ES))) - ...
      (CLaktif*fu_p*A(2)/V_ES); % karaciger ekstraseluler

dA(3)= (CLpasif*((fu_p*A(2)/V_ES)-(fu_IS*A(3)/V_IS))) +
      (CLaktif*fu_p*A(2)/V_ES)-...
      (CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS); % karaciger intraseluler

dA(4)= (CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS);% safra
end

function dA=ipr1_inh(~,A,a,b)
%parametreler_a
Q_p = a(1);
V_p = a(2);
V_ES = a(3);
V_IS = a(4);
fu_p = a(5);
fu_IS = a(6);

%parameters_b

CLpasif = b(1);           % expressed in mL/min
CLaktif_inh= b(3);       % expressed in mL/min
CLsafra = b(4);         % expressed in mL/min

%diferansiyel denklemler

dA=[0;0;0;0]; % 4 denklem tanımlanacağını belirtir

dA(1)= Q_p*((A(2)/V_ES)-(A(1)/V_p)); % perfuzat

dA(2)= (Q_p*(A(1)/V_p-A(2)/V_ES))+ (CLpasif*((fu_IS*A(3)/V_IS)-
(fu_p*A(2)/V_ES))) - ...
      (CLaktif_inh*fu_p*A(2)/V_ES); % karaciger ekstraseluler

dA(3)= (CLpasif*((fu_p*A(2)/V_ES)-(fu_IS*A(3)/V_IS))) +
      (CLaktif_inh*fu_p*A(2)/V_ES)-...
      (CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS); % karaciger intraseluler

dA(4)= (CLsafra*fu_IS*A(3)/V_IS); % safra
end

```

```

function residual = iprl_objfun(x, fitdata, t, initcond, a, b)

b(2)=x(1);
b(3)=x(2);
b(4)=x(3);

tmax=60;

options = optimset();

t_pool= t(1:144);
t_highinh= t(145:216);

    odefun_pool= @ (t_pool,A) iprl(t_pool,A,a,b);

    odefun_highinh= @ (t_highinh,A) iprl_inh(t_highinh,A,a,b);

sol_pool = ode45(odefun_pool, [0,tmax], initcond, options);
sol_highinh = ode45(odefun_highinh, [0,tmax], initcond, options);

simulatedData_pool = deval(sol_pool,t_pool);
simulatedData_highinh = deval(sol_highinh,t_highinh);

simulatedData=[simulatedData_pool,simulatedData_highinh];

simdata=
[simulatedData(1,:); (simulatedData(2,:)+simulatedData(3,:)); ...
simulatedData(4,:)]';

residual = [fitdata-simdata];
residual= residual(:);
residual(isnan(residual))=[];
end

```

```

function simdata = iprl_objfun_simdata(t, initcond, a, b)
tmax=60;

options = optimset();

t_pool= t(1:144);
t_highinh= t(145:216);

    odefun_pool= @ (t_pool,A) iprl(t_pool,A,a,b);

    odefun_highinh= @ (t_highinh,A) iprl_inh(t_highinh,A,a,b);

sol_pool = ode45(odefun_pool, [0,tmax], initcond, options);
sol_highinh = ode45(odefun_highinh, [0,tmax], initcond, options);

simulatedData_pool = deval(sol_pool,t_pool);
simulatedData_highinh = deval(sol_highinh,t_highinh);

simulatedData=[simulatedData_pool,simulatedData_highinh];

simdata=
[simulatedData(1,:); (simulatedData(2,:)+simulatedData(3,:)); ...
simulatedData(4,:)]';

```

```

end

function simulation_highinh
=iprl_simulation_highinh(t_sim,a,b,initcond)

MW = 0.4405;
tmax=max(t_sim);

options=odeset('RelTol',1e-8,'AbsTol',1e-10);

sol = ode45(@iprl_inh, [0, tmax], initcond,options,a,b);

simulation_highinh = deval(sol,t_sim);

simulation_highinh=
[simulation_highinh(1,:);(simulation_highinh(2,:)+simulation_highinh
(3,:));...
simulation_highinh(4,:)]';

end
function simulation_pool =iprl_simulation_pool(t_sim,a,b,initcond)

tmax=max(t_sim);

options=odeset('RelTol',1e-8,'AbsTol',1e-10);

sol = ode45(@iprl, [0, tmax], initcond,options,a,b);

simulation_pool = deval(sol,t_sim);

simulation_pool=
[simulation_pool(1,:);(simulation_pool(2,:)+simulation_pool(3,:));..
.
simulation_pool(4,:)]';
end

```

6. Kestirim ile elde edilen parametrelerin duyarlılık analizleri için ek kodlar

```

n_samples = 25;
param_names2 = {'Q_{P}', 'V_{P}', 'V_{ES}', 'V_{IS}', 'fu_{P}',
'fu_{IS}', 'CL_{pasif}'};
n_param = size(P,2);

CLaktif = zeros(n_samples,1);
CLaktif_inh = zeros(n_samples,1);
CLsafra = zeros(n_samples,1);

%%aktif, aktif inh, safra

for i = 1:n_samples

    initcond=[datamean;0;0;0];
    x0 = [171.36;0;0.074]; % tahmin degeri
    lb = [0;0;0];
    ub = [inf;inf;inf];
    objfun2 = @(x) iprl_objfun(x,fitdata,t,initcond,P(i,:),CL);

```

```
lsqoptions= optimset('Algorithm','trust-region-reflective','Diagnostics',...
    'on','Display','iter','MaxFunEvals',10000,'Maxiter',1000,...
    'TolX',1e-8,'PrecondBandWidth',0);

[x,resnorm,residual,~,~,~,jacobian]=lsqnonlin(objfun2,x0,lb,ub,lsqoptions);
jacobian_full=full(jacobian);

    CLaktif(i,:)= x(1);
    CLaktif_inh(i,:)= x(2);
    CLsafra(i,:)= x(3);
end

%%
CL_predicted=[CLaktif,CLaktif_inh,CLsafra];

output_names = {'CL_{aktif} (mL/dk)', 'CL_{aktif-inh} (mL/dk)',...
    'CL_{safra} (mL/dk)'};
output_names2 = {'CL_{aktif}', 'CL_{aktif-inh}',...
    'CL_{safra}'};
n_outputs = size(CL_predicted,2);

CL_finalprediction= [278.5681,112.2686,0.3470];
```

EK-3: Turnitin Dijital Makbuz**Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Nihan İzat
Assignment title: KARACİĞERDEKİ İLAÇ DİSPOZİSY..
Submission title: Karacigerdeki Ilac Dispozisyonu Uze..
File name: fampisinin_Etkisinin_Incelenmesi_ve..
File size: 8.02M
Page count: 189
Word count: 34,958
Character count: 235,280
Submission date: 06-Dec-2020 11:54AM (UTC+0300)
Submission ID: 1466184214



EK-4: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: KARACİĞERDEKİ İLAÇ DİSPOZİSYONU ÜZERİNE
RİFAMPİSİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ VE
FARMAKOKİNETİK MODELLEME

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: NİHAN İZAT

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 189

Karacigerdeki Ilac Dispozisyonu Uzerine Rifampisinin Etkisinin Incelenmesi ve Farmakokinetik Modelleme			
ORIGINALITY REPORT			
2%	2%	1%	0%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	www.musbed.com Internet Source		<1%
2	videoicerik.meb.gov.tr Internet Source		<1%
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source		<1%
4	www.biyolojidersim.com Internet Source		<1%
5	link.springer.com Internet Source		<1%
6	bmcpharmacoltoxcol.biomedcentral.com Internet Source		<1%
7	Submitted to University of Houston System Student Paper		<1%
8	TÜRKCAN, İrem and NALBANT, Asude Dilek. "Dental protetik materyallerin biyolojik uyumluluğu ve test yöntemleri", Gazi		<1%

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nihan İzat

Yazışma adresi:

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 06100 Sıhhiye/Ankara Türkiye

E-posta: nizat@hacettepe.edu.tr, nihanizat@gmail.com

Eğitim

Lise: 2005-2009

Ankara Atatürk Lisesi, Ankara

Lisans: 2009-2014

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara

Doktora: 2014-2020

Hacettepe Üniversitesi, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Doktora Programı,
Ankara

Akademik ve Mesleki Deneyim (2014-...)

Araştırma Görevlisi (2014- günümüze kadar)

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Misafir Doktora Öğrencisi (10.2019-03.2020)

Manchester Üniversitesi, Biyoloji, Tıp ve Sağlık Fakültesi,

Uygulamalı Farmakokinetik Araştırma Merkezi, Manchester, İngiltere

Bilimsel/Mesleki Derneklere Üyelikler (2015 -...)

Hacettepe Eczacılık Teknolojisi Derneği (HETEK)

Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)

American Association of Pharmaceutical Sciences (AAPS)

Araştırma Projeleri

1. Karaciğerdeki İlaç Dispozisyonu Üzerine Rifampisin Etkisinin İncelenmesi ve Farmakokinetik Modelleme. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TSA-2019-17756), Araştırmacı (2019-...)
2. Rasajilin İçeren Ağızda Dağılan Tablet Formülasyonlarının Geliştirilmesi In Vitro ve In Vivo Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TDK-2018-17258), Araştırmacı (2017-2018).
3. Caco2 Hücrelerden Paraselüler İlaç Permeabilitesi Üzerine Permeabilite Artırıcı Ajanların Etkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Project number: THD-2017-14082), Araştırmacı (2017-2018).

Burslar

1. TÜBİTAK 2211-A Programı (*2014 Yılı 2. Dönem*)
2. TÜBİTAK 2214-A Programı (*2018 Yılı 2. Dönem*)

Yayınlar

Kitap Bölümleri

1. M. ATES, N. İZAT, F. KIR, T. GULSUN, S. SAHİN, Evaluation of Pharmacokinetics and Biodistribution of Targeted Nanoparticles, Drug Delivery with Targeted Nanoparticles: in vitro and in vivo Evaluation Methods, eds. Yılmaz Capan, Adem Sahin, Hayrettin Tonbul, ISBN 9780128037966. Pan Stanford Publishing, **Under Copyediting**
2. T. GULSUN & N. İZAT, S. SAHİN, Brain and The Drug Transporters, Nanotechnology Methods for Neurological Diseases and Brain Tumors, eds. Yasemin Gursoy Ozdemir, Sibel Bozdog Pehlivan, Emine Sekerdag, ISBN 9780128037966. Elsevier, 2017.

Araştırma Makaleleri

Uluslararası

1. **N. IZAT**, O. KAPLAN, M. CELEBIER, S. SAHIN, Bioanalytical Method Validation of an RP-HPLC Method for Determination of Rifampicin in Liver Perfusion Studies, *Current Pharmaceutical Analysis*, 2020, **Accepted, Ahead of print.**
2. T. GÜLSÜN, Y. AKDAĞ ÇAYLI, **N. IZAT**, M. ÇETİN, L. ÖNER, S. SAHIN, Development and Characterization of Metformin Hydrochloride-and Glyburide-Containing Orally Disintegrating Tablets, *Pharmaceutical Development and Technology*, 25(8), 999-1009, 2020.
3. Y. AKDAĞ ÇAYLI, T. GÜLSÜN, **N. IZAT**, M. ÇETİN, L. ÖNER, S. SAHIN, Characterization and Comparison of Deferasirox Fast Disintegrating Tablets Prepared by Direct Compression and Lyophilization Methods, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101760, 2020.
4. Y. AKDAĞ ÇAYLI, T. GÜLSÜN, **N. IZAT**, L. ÖNER, S. SAHIN, Comparison of Dissolution Profiles and Apparent Permeabilities of Commercially Available Metformin Hydrochloride Tablets in Turkey, *Dissolution Technologies* 27 (1)1-8, 2020.
5. T. GÜLSÜN, **N. IZAT**, Y. AKDAĞ ÇAYLI, M. ÇETİN, L. ÖNER, S. SAHIN, Development and Evaluation of Terbutaline Sulfate Orally Disintegrating Tablets by Direct Compression and Freeze Drying Methods, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, 251-258, 2018.

Ulusal

1. T. GÜLSÜN İNAL, Y. AKDAĞ ÇAYLI, **N. IZAT**, L. ÖNER, S. SAHIN, Effect of Particle Size and Surfactant on the Solubility, Permeability and Dissolution Characteristics of Deferasirox, *Journal of Research in Pharmacy*, 23(5), 851-859, 2019.

Derleme Makaleler

1. **N. IZAT**, S. SAHIN, Hepatic Transporter-Mediated Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions: Recent Studies and Regulatory Recommendations, *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 2020, **Under Review**.
2. Y. AKDAĞ ÇAYLI, T. GÜLSÜN İNAL, **N. IZAT**, M. ÇETİN, L. ÖNER, S. SAHIN, Evaluation of Preparation Methods for Orally Disintegrating Tablets, *Medicine* 9 (1), 265-9, 2020.
3. **N. IZAT**, F. YERLIKAYA & Y. ÇAPAN, A Glance on The History of Quality by Design, *Open Access Drug Design and Delivery*, 2(1), 1-8, 2014.

Bildiriler

Sözlü Bildiriler

1. **N. IZAT**, T. GÜLSÜN İNAL & S. SAHIN, Influence of Permeability Enhancers on The Paracellular Permeability of Metformin Hydrochloride Across Caco-2 Cells, Oral Presentation, 19th International Pharmaceutical Technology Symposium, 17 - 19 September, 2018.

Poster Bildirileri

1. E. OZDEMIR, **N. IZAT**, S SAHIN. Investigation of Hepatic Distribution of Rasagiline Mesylate in the In Situ Isolated Perfused Rat Liver Preparation. 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 14-16 October, 2019, İzmir.
2. **N. IZAT**, F. KIR, O. KAPLAN, M. CELEBIER, S. SAHIN. Bioanalytical Validation of an Hplc Method for the Analysis of Rifampicin Accumulation in Rat Liver. 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 14-16 October, 2019, İzmir.
3. **N. IZAT**, T. GÜLSÜN İNAL & S. SAHIN, Effect of Permeability Enhancers on Paracellular Transport of Furosemide Across Caco-2 Cell Monolayers, Globalization of Pharmaceutics Education Network GPEN 2018, 26 - 29 September, 2018.
4. E. ÖZDEMİR, T. GÜLSÜN İNAL, **N. IZAT** & S. SAHIN, Determination of Rasagiline Permeability Across Caco-2 Cell Lines, 19th International Pharmaceutical Technology Symposium, 17 - 19 September, 2018.

5. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, **N. İZAT** & S. SAHIN, Investigation of Deferasirox Permeability from Lyophilized Orally Disintegrating Tablet, 2017 AAPS Annual Meeting and Exposition, 12 - 15 November, 2017.
6. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, **N. İZAT** & S. SAHIN, Investigation of Terbutaline Sulfate Permeability from Orally Disintegrating Tablets, 2017 AAPS Annual Meeting and Exposition, 12 - 15 November, 2017.
7. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, M. İNAL, **N. İZAT** & S. SAHIN, Development and Characterization of Indomethacin and Curcumin Containing Nanofibers, GPSS 2017, 11 - 13 October, 2017.
8. T. GÜLSÜN İNAL, **N. İZAT**, H. AKSOY & S. ŞAHİN, Evaluation of Spice-drug Interactions on the Bioavailability of Orally Administrated Drugs, GPSS 2017, 11 October 2017, 13 October 2017.
9. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, M. ÇETİN, **N. İZAT** & S. SAHIN, Development and Evaluation of Lyophilized Orally Disintegrating Tablets Containing Metformin Hydrochloride and Glyburide, 77th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2017, 10 -14 September, 2017.
10. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, M. S. KAYNAK, **N. İZAT** & S. SAHIN, Development and Evaluation of Terbutaline Sulfate Containing Orally Disintegrating Tablets, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13 - 17 November ,2016.
11. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, **N. İZAT** & S. SAHIN, Effect of Particle Size on Deferasirox Dissolution Time, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13 - 17 November, 2016.
12. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, **N. İZAT** & S. SAHIN, Evaluation of Surfactant Effect on The Saturation Solubility and Permeability of Deferasirox, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 November, 2016.
13. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, **N. İZAT** & S. SAHIN, Formulation and Characterization of Mometasone Furoate Monohydrate and

- Formoterol Fumarate Dihydrate Containing Dry Powder Inhaler Formulations, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13 - 17 November ,2016.
14. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, M. ÇETİN, **N. İZAT**, E. DEMİRTÜRK & S. SAHİN, Development and In Vitro Evaluation of Deferasirox Orally Disintegrating Tablets by Lyophilization Method, 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 18 - 21 September, 2016.
 15. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, **N. İZAT**, E. DEMİRTÜRK & S. SAHİN, Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Rofecoxib, 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 18 - 21 September, 2016.
 16. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, M. ÇETİN, **N. İZAT**, E. DEMİRTÜRK & S. SAHİN, Preparation and Evaluation of Lyophilized Orally Disintegrating Tablets Containing Terbutaline Sulphate, 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 18 - 21 September, 2016.
 17. N. GÖKHAN KELEKÇİ, B. AYAZGÖK, S. AYDIN, Y. AKDAĞ ÇAYLI, M. ÇELEBİER, S. ERDOĞAN, M. G. GÜNDÜZ, **N. İZAT**, E. P. KELİCEN UĞUR, B. KILIÇARSLAN, B. SÖZEN ŞAHNE, Z. T. TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ, S. SAHİN & F. N. YALÇIN, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesinin Akreditasyon Süreci Ve Bu Sürecin Kazanımları, 1. Ulusal Akreditasyon Toplantısı, 27 April 2016.
 18. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, **N. İZAT** & S. SAHİN, Influence of Verapamil on Metformin Permeability Across Caco 2 Cells, International Gazi Pharma Symposium Series 2015, 12 - 15 November, 2015.
 19. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, M. S. KAYNAK, **N. İZAT** & S. SAHİN, Development of Metformin Hydrochloride and Glyburide Containing Orally Disintegrating Tablets, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25 - 29 October, 2015.
 20. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, **N. İZAT** & S. SAHİN, Evaluation of Dissolution Results of Commercially Available Metformin Hydrochloride Tablets, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25 -29 October, 2015.

21. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, N. İZAT & S. SAHİN, Preparation and Evaluation of Deferasirox Containing Orally Disintegrating Tablets by Direct Compression Method, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25 - 29 October, 2015.
22. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, N. İZAT & S. SAHİN, Investigation of Metformin Permeability from Commercially Available Metformin Hydrochloride Tablets, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 10 - 12 September, 2015.
23. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, N. İZAT & S. SAHİN, Investigation of Permeabilities of Metformin and Glyburide from Orally Disintegrating Tablets, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 10 - 12 September, 2015.
24. Y. AKDAĞ ÇAYLI, L. ÖNER, T. GÜLSÜN İNAL, N. İZAT & S. SAHİN, Permeability Studies of Orally Disintegrating Tablets Containing Deferasirox, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 10 - 12 September, 2015.

AAPS Blog

Selma Sahin, Nihan Izat, An Old Combination Meets in A New ODT Formulation ((<https://aapsblog.aaps.org/tag/selma-sahin/>) 27 Tuesday 2015, Orlando-USA

Katıldığı Bilimsel Toplantılar

1. Globalization of Pharmaceutics Education Network (GPEN 2018), 26-29.09.2018 Singapore
2. 19th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS-2018), 17-19.09.2018 Antalya, Turkey
3. 2017 AAPS Annual Meeting and Exposition, 12-15.11.2017 San Diego-USA
4. 2nd Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), 11.13.10.2015 Ankara, Turkey
5. Lab on A Chip&Microfluidics 2017- Organ on a Chip Europe 2017, 10-11.05.2017 Munich, Germany
6. 18th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS-2016), 18-21.10.2016 Antalya, Turkey – Assistant

7. 1st Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2015), 12-15.10.2015 Antalya, Turkey
8. 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29.10.2015 Orlando-USA
9. Obesity - Problem of the 21st Century, Twinnet Project, EPSA 1-7.10.2013 Belgrade, Serbia
10. Antibiotics are not Candies, Youth Exchange, 15-22.10.2012 Ankara, Turkey
11. Symposium on Herbal Drugs, 28-29.09.2012 Cappodocia, Turkey
12. 1st International Certificate Programme on P4 Medicine, 13-15.09.2012 Cappodocia, Turkey
13. 34th EPSA Annual Congress, Lisbon, Portugal, 11-17.04.2011 Lisbon, Portugal
14. 18th International Symposium on Microencapsulation, 12-14.09.2011 Antalya, Turkey
15. Early Diagnosis of Cancer Saves Lives, Youth Exchange, 1-8.10.2011 Ankara, Turkey

Diğer Topluluklar

Kangoo Jumps Ankara, *Eğitmen (2014 – günümüze kadar)*

Ankara Üniversitesi Çocuk ve Gençlik Halk Dansları Topluluğu, *Eğitmen (2015 – 2017)*

Hacettepe Üniversitesi Halk Oyunları Topluluğu, *Dansçı, Eğitmen (2011 – 2015)*

European Pharmaceutical Students' Association, EPSA, *Üye (2009 – 2014)*

Anadolu Turizm Araştırma ve Gençlik Kulübü, *Dansçı (2006 – 2013)*

Yabancı Dil

İngilizce ((YDS (Foreign Language Exam) 90/100)

English Language Training at American Cultural Language Schools European Language Portfolio Level: C2

Kullandığı Yazılımlar

MATLAB, SymCyp, GastroPlus, R Studio, IBM SPSS, GraphPad