

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

**STATİNLERİN ABSORPSİYON VE
PERMEABİLİTELERİ ÜZERİNE GREYFURT SUYUNUN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Ecz. Müge ATEŞ

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2024

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

**STATİNLERİN ABSORPSİYON VE
PERMEABİLİTELERİ ÜZERİNE GREYFURT SUYUNUN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Ecz. Müge ATEŞ

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Selma ŞAHİN**

ANKARA

2024

**STATİNLERİN ABSORPSİYON VE PERMEABİLİTELERİ ÜZERİNE GREYFURT
SUYUNUN ETKİSİNİN IN SİTU İNTESTİNAL PERFÜZYON TEKNİĞİ İLE
İNCELENMESİ**

Müge ATEŞ

Danışman: Prof. Dr. Selma ŞAHİN

Bu tez çalışması 17.07.2024 tarihinde jürimiz tarafından “Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İmran VURAL
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Sevgi TAKKA
(Gazi Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN
(Gazi Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Doç. Dr. Tuğba GÜLSÜN İNAL
(Hacettepe Üniversitesi)

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

12 Ağustos 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

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. 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).

17/07/2024

Müge ATEŞ

i

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” Madde 6.

- (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 ŞAHİN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Ecz. Müge ATEŞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bana karşı göstermiş olduğu sonsuz anlayış, ilgi ve verdiği desteklerden dolayı, bilimsel yönü kadar manevi değerlerini de örnek aldığım, danışmanım ve değerli Hocam Sn. Prof. Dr. Selma Şahin'e,

Tez çalışmalarımın hücre kültürü deneylerinde bana çok büyük desteği olan ve her ihtiyaç duyduğumda bana yol gösteren olan değerli hocam Doç. Dr. Tuğba Gülsün İnal'a,

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Erem Bilensoy başta olmak üzere tüm değerli hocalarıma, araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım sırasında benden desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Fatma Kır'a,

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde yürütmüş olduğum tez çalışmalarım sırasında bana her zaman yardımcı olan mesai arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Naile Öztürk ve Dr. Öğr. Üyesi Hayrettin Tonbul'a,

Tez çalışmalarımın sonuçlarının değerlendirilmesi için yaptığım istatistiksel hesaplamalar konusunda bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Gözde Ultav'a,

Tez çalışmalarımın hayvan deneylerini İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde yapabilmem için bana imkan sağlayan Eczacılık Fakültesi Eski Dekanımız Prof. Dr. Süleyman Sandal'a ve bu merkezde bana yardımcı olan tüm çalışanlara,

Hayatımın her anında benim arkamda olduğunu ve bu tezi eline aldığı anda benimle gurur duyacağını bildiğim canım babam Ecz. Fikret Geneş'e,

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan annem Mehpare Geneş'e,

Benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Tuna Ateş'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi varlıkları ile dünyamı güzelleştiren canım evlatlarım Ali, Zeynep ve Kerem'e ithaf ederim.

Bu çalışmanın hücre kültürü deneyleri Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: THD-2022-20223).

ÖZET

Ateş M., Statinlerin Absorpsiyon ve Permeabiliteleri Üzerine Greylfurt Suyunun Etkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Bu çalışmanın amacı statin grubu ilaçlardan seçilen dört model maddenin (atorvastatin, pravastatin, simvastatin, lovastatin) bağırsaklardan permeabilite ve absorpsiyonunu hem Caco-2 hücre hattı hem de in situ bağırsak perfüzyonu tekniği ile incelemektir. Öncelikle seçilen statinlerin çözünürlüklerinin belirlenmesi için denge çözünürlük deneyleri yapılmıştır. Statinlerin absorpsiyon ve permeabiliteleri üzerine bağırsakta yer alan taşıyıcı proteinlerin ve metabolizasyon enzimlerinin etkisini değerlendirmek için spesifik inhibitörlerin yanı sıra greylfurt suyu bileşeni naringin kullanılmıştır. Atorvastatin CYP3A4 substratı olduğu için spesifik inhibitör olarak ketokonazol, pravastatin OATP substratı olduğu için rifampin, simvastatin ve lovastatin ise P-gp substratı oldukları için elakridar kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında etkin maddelerin görünür permeabilite (P_{app}) değerleri spesifik inhibitörler veya naringin varlığında ve yokluğunda ayrı ayrı belirlenerek kıyaslanmıştır. In situ perfüzyon çalışmalarında ilium önce sadece etkin madde, sonra etkin madde ve inhibitör veya naringin içeren çözelti ile perfüze edilmiştir. Permeabilite (P_{eff}) değerleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Bütün çalışmalardan elde edilen örneklerdeki etkin madde miktarları, valide edilmiş HPLC yöntemleri kullanılarak tayin edilmiştir. Etkin maddelerin çözünürlükleri literatüre uyumlu olarak atorvastatin, simvastatin ve lovastatin için düşük; pravastatin için yüksek bulunmuştur. Caco-2 permeabilite sonuçlarına göre atorvastatinin permeabilitesi naringin varlığında önemli derecede değişmezken, ketokonazol varlığında önemli derecede ($p=0.0142$) azalmıştır. Pravastatinin permeabilitesi naringin ($p=0.0148$) ve rifampin varlığında ($p=0.0089$) önemli derecede artmıştır. Simvastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi ise naringin ve elakridar varlığında ($p<0.0001$) önemli derecede azalmıştır. Bağırsak perfüzyonu sonuçlarına göre atorvastatinin permeabilitesi naringin ($p=0,0009$) ve ketokonazol ($p= 0,0038$) varlığında azalmıştır. Pravastatinin permeabilitesi rifampin varlığında anlamlı değişiklik göstermezken, naringin ($p<0.0001$) ile azalmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular naringinin spesifik inhibitörlere benzer etki gösterdiğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Statinler, Caco-2, in situ bağırsak perfüzyonu, permeabilite, çözünürlük

Destekleyen Kurumlar: Bu çalışmanın hücre kültürü deneyleri Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: THD-2022-20223).

ABSTRACT

Ateş M., Investigation of the Effect of Grapefruit Juice on the Absorption and Permeability of Statins. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Biopharmaceutics and Pharmacokinetics Programme, Ph.D. Thesis, Ankara, 2024. The aim of this study is to examine the intestinal absorption of four model substances (atorvastatin, pravastatin, simvastatin, lovastatin) selected from the statins, using both the Caco-2 cell line and the in situ intestinal perfusion technique. Primarily, equilibrium solubility experiments were performed to determine the solubility of selected statins. The grapefruit juice component naringin, as well as specific inhibitors, was used to evaluate the effect of intestinal transporters and metabolizing enzymes on the absorption and permeability of statins. Since atorvastatin is a substrate of CYP3A4, ketoconazole was used as a specific inhibitor; rifampin was chosen because pravastatin is an OATP substrate; and elacridar was utilized because simvastatin and lovastatin are P-gp substrates. In cell culture studies, the apparent permeability (P_{app}) values of active substances were determined and compared separately in the presence and absence of specific inhibitors or naringin. In in situ perfusion studies, the ileum was perfused with a solution containing only the active substance, and then with a solution containing the active substance and inhibitor or naringin. Permeability (P_{eff}) values were calculated and compared. The amounts of active substances in the samples obtained from all studies were determined using validated HPLC methods. The solubility of the active substances was found to be low for atorvastatin, simvastatin and lovastatin, and high for pravastatin in accordance with literature. According to Caco-2 permeability results, while the permeability of atorvastatin did not change significantly in the presence of naringin, it decreased significantly ($p=0.0142$) in the presence of ketoconazole. The permeability of pravastatin increased significantly in the presence of naringin ($p=0.0148$) and rifampin ($p=0.0089$). The permeability of simvastatin through Caco-2 cells decreased significantly in the presence of naringin and elacridar ($p<0.0001$). According to intestinal perfusion results, the permeability of atorvastatin decreased in the presence of naringin ($p = 0.0009$) and ketoconazole ($p=0.0038$). While the permeability of pravastatin did not change significantly in the presence of rifampin, it decreased with naringin ($p<0.0001$). Findings from this study support that naringin has similar effects to specific inhibitors.

Key words: Statins, Caco-2, in situ intestinal perfusion, permeability, solubility

Supporting Institutions: Cell culture experiments of this study were supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: THD-2022-20223).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gastrointestinal Sistem	3
2.2. İntestinal İlaç Taşıyıcılar	12
2.2.1. ATP Bağlayıcı Kaset (ATP-Binding Cassette-ABC) Taşıyıcılar	13
2.2.2. Çözünen İlaç Taşıyıcıları (Solute Carrier-SLC)	24
2.3. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Özellikleri	26
2.3.1. Statinler	26
2.3.2. Spesifik İnhibitörler	39
2.4. Greyfurt-Greyfurt Suyu Bileşimi	43
2.4.1. Flavonoidler	43
2.4.2. Furanokumarinler	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. Gereçler	47
3.1.1. Kimyasal Maddeler	47
3.1.2. HPLC Gereçleri	48
3.1.3. Perfüzyon Gereçleri	48
3.1.4. Aletler	48
3.1.5. Deney Hayvanı	48

3.2. Yöntem	49
3.2.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	49
3.2.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüğünü Tayin Etmek Amacıyla Yapılan Çalışmalar	55
3.2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	56
3.2.4. <i>In Situ</i> Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları	60
3.3. İstatistiksel Analiz	67
4. BULGULAR	69
4.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	69
4.1.1. Seçicilik	72
4.1.2. Özgüllük	76
4.1.3. Doğrusallık	80
4.1.4. Doğruluk	84
4.1.5. Kesinlik	86
4.1.6. Duyarlılık	92
4.1.7. Stabilité	92
4.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüğünü Tayin Etmek Amacıyla Yapılan Çalışmalar	93
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	102
4.3.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	102
4.3.2. Model İlaçların Permeabilitesinin İncelenmesi	106
4.4. <i>In Situ</i> Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları	112
4.4.1. Atorvastatinle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları	113
4.4.2. Pravastatinle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları	117
5. TARTIŞMA	124
5.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	124
5.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüğünü Tayin Etmek Amacıyla Yapılan Çalışmalar	125
5.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	129
5.3.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	129
5.3.2. Model İlaçların Permeabilitesinin İncelenmesi	132
5.4. <i>In Situ</i> Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları	139

5.4.1. Atorvastatinle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları	141
5.4.2. Pravastatinle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları	143
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	147
7. KAYNAKLAR	150
8. EKLER	170
EK-1: Etik Kurul İzni	
EK-2: Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	172

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	ATP binding cassette (ATP bağlayıcı kaset) taşıyıcılar
BSS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
Caco-2	Kolon adenokarsinom hücre hattı
CYP	Sitokrom P450
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ (WHO)	Dünya Sağlık Örgütü
DSV	Doz-çözünürlük hacmi
F_a	Absorplanan fraksiyon
FBS	Fetal bovin serum
HBSS	Hank's Dengeli Tuz Çözeltisi
k_a	Absorpsiyon hız sabiti
LOD	Saptayabilme sınırı
LOQ	Tayin edilebilirlik sınırı
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MTT	Thiazolil mavisi tetrazolyum bromür
OATP	Organik anyon taşıyıcı polipeptitler
Ör.	Örneğin
P_{app}	Görünür permeabilite
P_{eff}	Efektif permeabilite
P-gp	P-glikoprotein
SH	Standart hata

SLC	Solute carrier (Çözünen ilaç) taşıyıcıları
SS	Standart sapma
TEER	Transepitel elektrik rezistans
VK	Varyasyon katsayısı

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	İnce bağırsak yüzeyinde yer alan vili ve mikrovililer.	5
2.2.	Enterosit yüzeyinde yer alan bazı ilaç taşıyıcı proteinler.	6
2.3.	Kolesterol sentezi ve karaciğerde statinlerin etki mekanizması.	27
2.4.	Atorvastatinin kimyasal yapısı.	32
2.5.	Pravastatinin kimyasal yapısı.	34
2.6.	Simvastatinin kimyasal yapısı.	36
2.7.	Lovastatinin kimyasal yapısı.	38
2.8.	Ketokonazolün kimyasal yapısı.	39
2.9.	Rifampinin kimyasal yapısı.	41
2.10.	Elakridarin kimyasal yapısı.	42
2.11.	Greyfurt suyu içinde bulunan bazı flavonoidlerin kimyasal yapıları.	44
2.12.	Greyfurt suyu içinde bulunan bazı furanokumarin türevleri (1: Paradisin A, 2: Paradisin B, 3: Paradisin C, 4: 17,18-dihidroksibergamottin, 5: 17-epoksibergamottin, 6: 17-ketobergamottin, 7: Bergamottin).	46
3.1.	Perfüzyon deneylerinde yapılan cerrahi işlemin şematik olarak gösterilmesi.	63
3.2.	Perfüzyon deneyi akış şeması.	66
4.1.	Atorvastatine ait HPLC kromatogramı.	70
4.2.	Pravastatine ait HPLC kromatogramı.	70
4.3.	Simvastatine ait HPLC kromatogramı.	71
4.4.	Lovastatine ait HPLC kromatogramı.	71
4.5.	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HBSS tamponunun 245 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramı.	73
4.6.	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HBSS tamponunun 235 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramı.	74

4.7.	Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan HEPES tamponunun 245 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramı.	75
4.8.	Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan HEPES tamponunun 235 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramı.	76
4.9.	Atorvastatin, ketokonazol ve naringin içeren HEPES tamponu çözeltisinin 245 nm'deki HPLC kromatogramı.	77
4.10.	Pravastatin, rifampin ve naringin içeren HEPES tamponu çözeltisinin 235 nm'deki HPLC kromatogramı.	78
4.11.	Simvastatin, elakridar ve naringin içeren HEPES tamponu çözeltisinin 235 ve 282 nm'deki HPLC kromatogramı.	79
4.12.	Lovastatin, elakridar ve naringin içeren HEPES tamponu çözeltisinin 235 nm'deki HPLC kromatogramı.	80
4.13.	Atorvastatine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi	81
4.14.	Pravastatine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.	82
4.15.	Simvastatine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.	83
4.16.	Lovastatine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.	84
4.17.	Atorvastatinin pH 1.2 (A), pH 4.5 (B) ve pH 6.8 (C) tamponlarındaki zamana bağlı çözünürlük profilleri (Ortalama \pm SS; n=3).	94
4.18.	Atorvastatinin farklı çözünme ortamlarındaki doygunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).	95
4.19.	Pravastatinin farklı tamponlardaki zamana bağlı çözünürlük profili (Ortalama \pm SS; n=3).	96
4.20.	Pravastatinin farklı çözünme ortamlarındaki doygunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).	97
4.21.	Simvastatinin farklı tamponlardaki zamana bağlı çözünürlük profili (Ortalama \pm SS; n=3).	98
4.22.	Simvastatinin farklı çözünme ortamlarındaki doygunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).	99

4.23.	Lovastatinin farklı tamponlardaki zamana bağlı çözünürlük profilleri (Ortalama \pm SS; n=3).	100
4.24.	Lovastatinin farklı çözünme ortamlarındaki doygunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).	101
4.25.	Atorvastatin, simvastatin ve lovastatinin pH 1.2 (A), pH 4.5 (B) ve pH 6.8 (C) ortamlarında tayin edilen karşılaştırmalı doygunluk çözünürlük değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).	102
4.26.	Farklı konsantrasyonlarda atorvastatin (ATOR) içeren çözeltilerin Caco-2 hücre canlılığı üzerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresinin etkisi (Ortalama \pm SS; n=5).	103
4.27.	Farklı konsantrasyonlarda pravastatin (PRA) içeren çözeltilerin Caco-2 hücre canlılığı üzerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresinin etkisi (Ortalama \pm SS; n=5). *p=0.0273	104
4.28.	Farklı konsantrasyonlarda simvastatin (SIM) içeren çözeltilerin Caco-2 hücre canlılığı üzerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresinin etkisi (Ortalama \pm SS; n=5). *p=0.0131	105
4.29.	Farklı konsantrasyonlarda lovastatin (LOV) içeren çözeltilerin Caco-2 hücre canlılığı üzerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresinin etkisi (Ortalama \pm SS; n=5). **p<0.003; ***p<0.001; ****p<0.0001	106
4.30.	Atorvastatinin (ator) naringin (nar) ve ketokonazol (keto) varlığında tayin edilen görünür permeabilite (P_{app}) değerleri (cm/sn; Ortalama \pm SS; n=7). *p=0.0142	108
4.31.	Pravastatinin (prav) naringin (nar) ve rifampin (rif) varlığında tayin edilen görünür permeabilite (P_{app}) değerleri (cm/sn; Ortalama \pm SS; n=7). *p=0.0148; **p=0.0089	109
4.32.	Simvastatinin (sim) naringin (nar) ve elakridar (ela) varlığında tayin edilen görünür permeabilite (P_{app}) değerleri (cm/sn; Ortalama \pm SS; n=7). **** p<0.0001	110

- 4.33. Model etkin maddelerin görünür permeabilite (P_{app}) katsayıları (cm/sn; Ortalama \pm SS; n=7). 111
- 4.34. İnhibitör olarak naringin kullanılan çalışmalarda ileumun perfüzyonu sonucu elde edilen atorvastatine ait konsantrasyon-zaman profili (-): naringin yok; (+): naringin var (Ortalama \pm SS; n=6). 113
- 4.35. İnhibitör olarak naringin kullanılan çalışmalarda atorvastatin için tayin edilen P_{eff} (cm/sn; A), F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6). *** $p \leq 0.001$ 114
- 4.36. İnhibitör olarak ketokonazol kullanılan çalışmalarda ileumun perfüzyonu sonucu elde edilen atorvastatine ait konsantrasyon-zaman profili (-): ketokonazol yok; (+): ketokonazol var. (Ortalama \pm SS; n=6). 115
- 4.37. İnhibitör olarak ketokonazol kullanılan çalışmalarda atorvastatin için tayin edilen P_{eff} (cm/sn; A), F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6). * $p=0.018$; ** $p<0.01$ 116
- 4.38. Atorvastatinin naringin ve ketokonazol varlığında (+) ve yokluğunda (-) tayin edilen P_{eff} (10^{-5} cm/sn; A), F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6) 117
- 4.39. İnhibitör olarak naringin kullanılan çalışmalarda ileumun perfüzyonu sonucu elde edilen pravastatine ait konsantrasyon-zaman profili (-): naringin yok; (+): naringin var (Ortalama \pm SS; n=6). 118
- 4.40. İnhibitör olarak naringin kullanılan çalışmalarda pravastatin için tayin edilen P_{eff} (cm/sn; A), F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6). **** $p<0.0001$ 119
- 4.41. İnhibitör olarak rifampin kullanılan çalışmalarda ileumun perfüzyonu sonucu elde edilen pravastatine ait konsantrasyon-zaman profili (-): rifampin yok; (+): rifampin var. (Ortalama \pm SS; n=6). 120

- 4.42.** İnhibitör olarak rifampin kullanılan çalışmalarda pravastatin için tayin edilen P_{eff} (cm/sn; A), F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6).* p=0.027 121
- 4.43.** Pravastatinin naringin ve rifampin varlığında (+) ve yokluğunda (-) tayin edilen P_{eff} (10^{-5} cm/sn; A), F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6). 122
- 4.44.** Atorvastatin için naringin ve ketokonazol varlığında (+) ve yokluğunda (-) hücre kültürü (Caco-2) ve *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen permeabilite değerleri (Ortalama \pm SS). 123
- 4.45.** Pravastatin için naringin ve rifampin varlığında (+) ve yokluğunda (-) hücre kültürü (Caco-2) ve *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen permeabilite değerleri (Ortalama \pm SS). 123

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Bazı ABC taşıyıcıları ve özellikleri.	14
2.2.	Bazı P-gp substratları ve inhibitörleri.	16
2.3.	MRP ailesi üyelerinin substratı olan bazı ilaçlar.	20
2.4.	BCRP için belirlenmiş bazı substrat ve inhibitör ilaçlar.	23
2.5.	Bazı SLC taşıyıcıları ve özellikleri.	25
2.6.	Statinlerin farmakokinetik özellikleri.	29
2.7.	Statinlerin ilaç etkileşimleri.	30
3.1.	Model ilaçların tayini için kullanılan HPLC yöntemleri.	49
3.2.	Etkin maddeler için hazırlanan stok ve standart çözeltilerin konsantrasyonları.	52
3.3.	Doğruluk ve kesinlik çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlar.	53
3.4.	Hücre canlılığı testinde kullanılan etkin madde konsantrasyonları.	58
3.5.	Model ilaçların Caco-2 hücrelerinden permeabilitelerinin incelenmesi amacıyla oluşturulan deney şeması	60
3.6.	Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltilerinin bileşimi.	61
4.1.	Model etkin maddeler için tayin edilen maksimum dalga boyları ve alıkonma zamanları.	69
4.2.	Atorvastatin için tayin edilen doğrusalılık bulguları.	81
4.3.	Pravastatin için tayin edilen doğrusalılık bulguları.	82
4.4.	Simvastatin için tayin edilen doğrusalılık bulguları.	83
4.5.	Lovastatin için tayin edilen doğrusalılık bulguları.	84
4.6.	Atorvastatin için doğruluk çalışmasından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=6).	85
4.7.	Pravastatin için doğruluk çalışmasından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=6).	85
4.8.	Simvastatin için doğruluk çalışmasından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=6).	86

4.9.	Lovastatin için doğruluk çalışmasından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=6).	86
4.10.	Atorvastatine için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular.	88
4.11.	Pravastatin için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular.	89
4.12.	Simvastatin için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular.	90
4.13.	Lovastatin için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular.	91
4.14.	Çalışmada kullanılan maddelerin duyarlılık bulguları.	92
4.15.	Çalışmada kullanılan maddelerin stabilite çalışmalarından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=3).	93
4.16.	Atorvastatinin farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerinde elde edilen çözünürlük sonuçları (mg/mL; Ortalama \pm SS; n=3).	94
4.17.	Atorvastatin için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).	95
4.18.	Pravastatinin farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerine ait çözünürlük sonuçları (mg/mL; Ortalama \pm SS; n=3).	96
4.19.	Pravastatin için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).	97
4.20.	Simvastatinin farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerine ait çözünürlük sonuçları (mg/mL; Ortalama \pm SS; n=3).	98
4.21.	Simvastatin için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).	99
4.22.	Lovastatinin farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerine ait çözünürlük sonuçları (mg/mL; Ortalama \pm SS; n=3).	100

4.23.	Lovastatin için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).	101
4.24.	Deney grupları için Caco-2 hücrelerinden ölçülen TEER değerleri (Ortalama \pm SS; n=7).	107
4.25.	Model etkin maddelerin görünür permeabilite (P_{app}) katsayıları ($\times 10^{-6}$ cm/sn; Ortalama \pm SS; n=7).	111
4.26.	Deney gruplarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler (Ortalama \pm SS).	112
4.27.	Atorvastatin-naringin grubunda atorvastatin için tayin edilen P_{eff} , F_a ve k_a değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6).	114
4.28.	Atorvastatin-ketokonazol grubunda atorvastatin için tayin edilen P_{eff} , F_a ve k_a değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6).	115
4.29.	Atorvastatinin naringin ve ketokonazol varlığında ve yokluğunda tayin edilen P_{eff} (cm/sn), F_a ve k_a (dk^{-1}) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6).	117
4.30.	Pravastatin-naringin grubunda pravastatin için tayin edilen P_{eff} , F_a ve k_a değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6).	118
4.31.	Pravastatin-rifampin grubunda pravastatin için tayin edilen P_{eff} , F_a ve k_a değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6).	120
4.32.	Pravastatinin naringin ve rifampin varlığında ve yokluğunda tayin edilen P_{eff} (cm/sn), F_a ve k_a (dk^{-1}) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6).	122
5.1.	Çalışmada kullanılan model ilaçların absorpsiyon ve metabolizasyonunda rol oynayan taşıyıcılar ve enzimler.	139
5.2.	Çalışmada kullanılan model ilaçların karşılaştırmalı oral absorpsiyon ve oral biyoyararlanım değerleri.	146

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlaçlar ve besinler arasındaki etkileşimler ilaç tedavisinin başarısı üzerine önemli derecede etki etmektedir. Bu etkileşimler besin içeriği, miktarı ve alınma zamanına bağlı olarak ilaçların farmakokinetik veya farmakodinamik özelliklerini değiştirmektedir. İlaç-besin etkileşimleri ilacın terapötik etkinlik ve yan etkilerini önemli derecede değiştirmektedir. Greyfurt suyu birçok ilaçla etkileşim gösterdiği bilinen C vitamini ve minerallerce zengin bir içecektir. Greyfurt suyu-ilaç etkileşimlerinin değerlendirildiği çalışmalarda greyfurt suyundaki etkin bileşenler, etkileşim mekanizması ve bu etkileşimin klinik önemi araştırılmıştır. Greyfurt suyu içerisinde bulunan flavonoid ve furanokumarinler ilaçlarla etkileşimine neden olan asıl bileşenleridir. Başlıca etkileşim mekanizmaları ise sitokrom 3A4 (CYP3A4) enzim sistemi, organik anyon taşıyıcı polipeptitler (OATP) ve P-glikoprotein (P-gp) inhibisyonu olarak bilinmektedir. Dolayısıyla bu enzim sistemi ve taşıyıcı proteinlerin substratı olan ilaçların greyfurt suyu ile birlikte kullanımında etkileşim göstermesi muhtemeldir. Greyfurt suyu ile etkileşimi en iyi bilinen ilaç grubu, hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan HMG-CoA redüktaz inhibitörleri olarak da adlandırılan statinlerdir. Bu etkileşim sonucu rabdomiyoliz, iskemik kalp hastalığı ve LDL kolesterol değerlerinde değişiklik gibi ciddi yan etkiler rapor edilmiştir. Greyfurt suyunun statinlerle etkileşimine neden olan asıl maddeler, greyfurt suyu içeriğindeki bileşenlerdir. Bu bileşenlerden naringin greyfurt suyunda en fazla miktarda bulunan ve etkileşimlerden sorumlu flavonoid sınıfı bir bileşiktir.

Bu tez çalışması için atorvastatin, pravastatin, simvastatin ve lovastatin model ilaç olarak seçilmiştir. Bunlardan atorvastatin CYP3A4, pravastatin OATP, simvastatin ve lovastatin ise P-gp substratıdır. Bu nedenle atorvastatin için CYP3A4 inhibitörü olarak ketokonazol, pravastatin için OATP inhibitörü olarak rifampin, simvastatin ve lovastatin için P-gp inhibitörü olarak elakridar kullanılacaktır. Bu tez çalışması kapsamında seçilen statinlerin greyfurt suyu ile etkileşiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla doğrultusunda yapılacak çalışmalar:

- Model ilaçların çözünürlük, hücre kültürü ve *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarından toplanan örneklerdeki miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analitik yöntem geliştirilecek ve valide edilecektir.

- Etkin maddelerin çözünürlüklerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki etkin maddelerin doygunluk çözünürlük değerleri tayin edilerek Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne göre çözünürlük sınıfları belirlenecektir.
- Caco-2 hücre hattı kullanılarak model ilaçların (atorvastatin, pravastatin, simvastatin, lovastatin) apikalden bazolaterale permeabilite katsayıları (P_{app}) naringin ve spesifik inhibitörler (ketokonazol, rifampin, elakridar) varlığında ve yokluğunda belirlenecektir. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen P_{app} değerleri literatür verileri ile kıyaslanacak ve etkin maddelerin Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne göre permeabilite sınıfları belirlenecektir.
- *In situ* bağırsak perfüzyonu çalışmaları ile model ilaçların permeabiliteleri (P_{eff}) naringin veya spesifik inhibitörlerin varlığında ve yokluğunda belirlenecektir. *In situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen permeabilite değerleri Caco-2 hücre hattından elde edilen permeabilite değerleri ile karşılaştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

İlaçlar sistemik etki elde etmek amacıyla; enteral (ör. oral, sublingual, bukkal, rektal), parenteral (ör. intramusküler, intravasküler, subkütan) ve diğer (ör. pulmoner, nazal) uygulama yolları olmak üzere 3 farklı şekilde uygulanmaktadır. Kullanım kolaylığı, ekonomik olması ve hasta uyuncunun yüksek olması nedeniyle en çok tercih edilen uygulama yolu oral yoldur. Oral yoldan uygulanan ilaçların sistemik dolaşıma geçerek etki bölgesine ulaşması ve etkisini gösterebilmesi için gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu gerekmektedir. İlaç absorpsiyonu tanım olarak ilacın uygulama veya absorpsiyon bölgesinden sistemik dolaşıma geçiş sürecini ifade etmektedir(1). Bu nedenle gastrointestinal sistem oral uygulanan ilaçların absorpsiyon ve biyoyararlanımı açısından oldukça önemlidir.

2.1. Gastrointestinal Sistem

Gastrointestinal kanal ağız ile başlayıp anüste sonlanmaktadır. Yaklaşık altı metre uzunluğunda olup, anatomik olarak özefagus, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsak olmak üzere 4 temel bölümden oluşmaktadır.

Ağız, çiğneme yoluyla ve tükürükteki enzimlerin etkisiyle yiyeceklerin mekanik ve kimyasal sindiriminin başladığı yer olup çok katlı yassı epitel hücrelerle kaplıdır. Ağızın çatısında kemikli bir bölge olan sert damak ve arkasında kas ve bağ dokudan oluşan hareketli yumuşak damak yer almaktadır. Sert damak konuşma, yutkunma ve çiğneme görevi alırken, yumuşak damak nazofarinksi kapatarak yutulan maddelerin burun boşluğuna hareketini önlemektedir (2). Oral ilaç uygulaması sonrasında mukozal yüzeylerden (sublingual, supralingual, bukkal gibi) absorpsiyon söz konusudur. Oral ilaç absorpsiyonunun en önemli avantajı etkinin hızlı başlamasıdır. Bu durum ilacın ağızda kalma süresiyle de ilişkilidir. Örneğin dilaltı nitrogliserin uygulamasında t_{maks} çok kısa iken, lorazepam için t_{maks} yaklaşık 2 saattir (3).

Özefagus, ağız boşluğu ile mideyi birbirine bağlayan kaslı bir borudur. Yaklaşık 250 mm uzunluk ve 20 mm çapa sahip olan yemek borusu yassı epitel hücrelerle kaplıdır. Mukus bezleri ise salgıları sayesinde özellikle yemek borusunun alt kısımlarını mide asidinden korumakla görevlidir. Özefagusta pH 5,0 ila 6,0 arasında değişmektedir (4). Gastrointestinal kanalın bu bölümü anatomik olarak servikal,

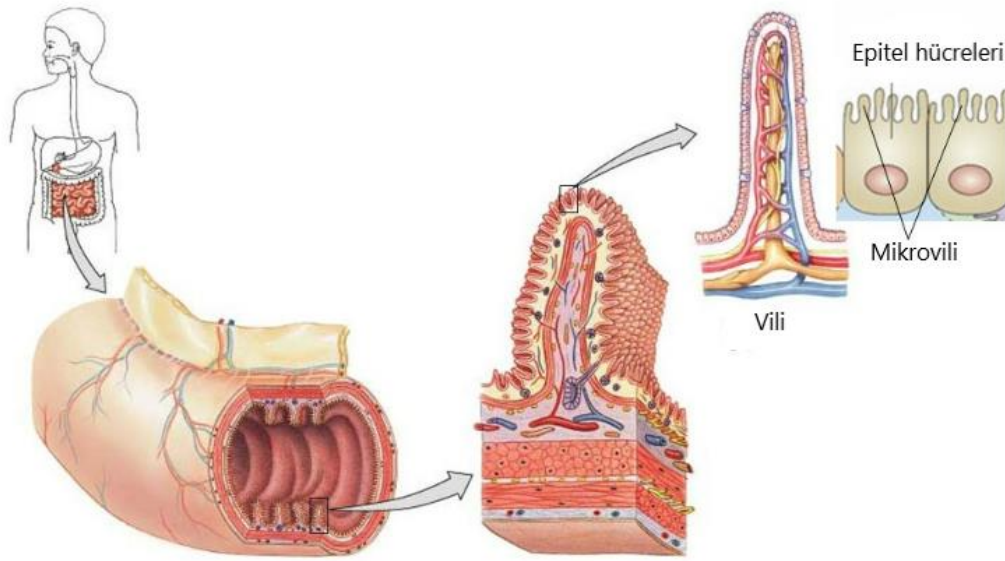
torasik ve abdominal özefagus olarak üç bölüme ayrılmaktadır. Antikolinerjikler, kalsiyum kanal blokerleri, nitrogliserin, östrojen gibi bazı ilaçlar yemek borusunu mideye bağlayan abdominal özefagusta (alt özefagus sfinkteri) gevşemeye yol açarak mide asidinin yemek borusuna kaçmasını kolaylaştırmaktadır (5). Özefagustan hızlı klerense bağlı olarak bu bölgeden ilaç absorpsiyonu ihmal edilse de kullanılan biyoadhezif sistemler kalış süresini uzatmaktadır (6). Bu adhezif sistemler gastro özofajial reflü, özofajial kanser gibi hastalıkların lokal tedavisine olanak sağlar (7).

Mide anatomik olarak fundus, korpus (gövde), antrum ve pilor olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. Midenin proksimal kısmı (fundus ve gövde) yutulan yiyecekler için rezervuar görevi görürken; distal kısmı (antrum ve pilor) yutulan katıları kremi bir kıvamına getirmek için karıştırma hareketinden sorumludur ve gastrik boşalma için pompa görevi görür. Midenin kapasitesi yaklaşık 1.5 litre olmasına rağmen, açlık durumunda 50 mL'den fazla sıvı içermez. Bu sıvılar çoğunlukla hidroklorik asit, gastrin hormonu, pepsinler ve mukus gibi mide sıvılarıdır. Midenin mukozal yüzeyindeki salgı hücreleri günde yaklaşık 2 litre mide sıvısı salgılar. Bu salgılardan hidroklorik asit mide pH'sının 1,0 ila 3,5 arasında kalmasını sağlar. Midenin yüzey alanı ince bağırsağa kıyasla küçük olduğu için çok düşük miktarda ilaç absorpsiyonu söz konusudur (4, 8). Asidik ve zayıf bazik yapıda ilaçlar mideden absorbe olmaktadır. Ayrıca midenin asit ortamında iyonize olmayan aspirin, tiyopental, antipirin gibi bazı ilaçlar da mideden absorpsiyona uğramaktadır. Mideden ilaç absorpsiyonu daha çok yağda çözünen ve non-iyonize ilaçlar için mümkün olmaktadır (9). Kullanılan başka ilaçlar (proton pompası inhibitörleri, antiasitler gibi), hastalıklar ve yaşa bağlı olarak mide pH'sının artması durumunda söz konusu ilaçların absorpsiyon ve biyoyararlanımlarında azalma gözlenmektedir (10).

İnce bağırsak gastrointestinal kanalın en uzun (4-5 m) bölümü olup, pH'sı 6,0 ila 7,5 arasında değişmektedir. İç çapı 25-30 mm olan ince bağırsağın sindirim ve absorpsiyon olmak üzere iki temel görevi vardır. Doudenum (20-30 cm), jejunum (2 m) ve ileum (3 m) olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. İnce bağırsak duvarı kan ve lenf damarları açısından oldukça zengindir. Üst mezenterik arter ile ince bağırsağı besleyen kan, hepatik portal ven ile karaciğere gelerek sistemik dolaşıma iletilir. Karaciğer birçok ilacın metabolizasyon bölgesi olduğu için ilaçlar burada

biyotransformasyona uğrayarak sistemik dolaşıma ulaşmadan yıkılırlar. Bu durum hepatik presistemik klerens veya ilk geçiş metabolizasyonu olarak adlandırılır.

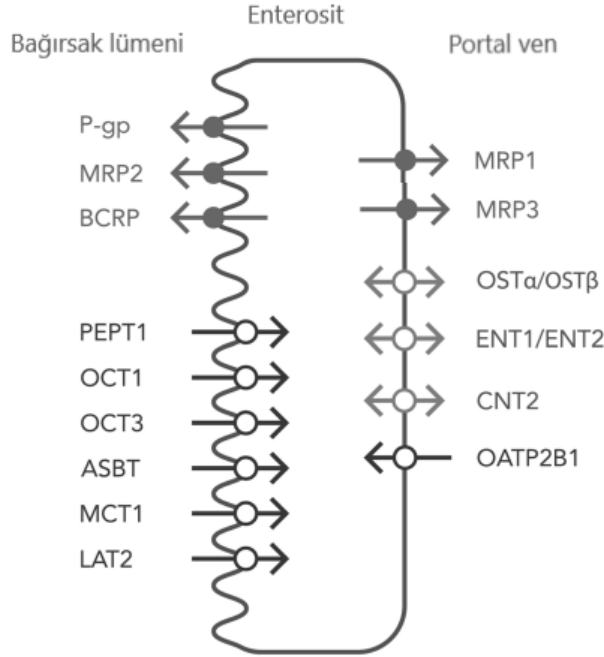
İnce bağırsağın yüzey alanı Kerckring kıvrımları, villi ve mikrovilli (Şekil 2.1) adı verilen özel yapılar sayesinde basit bir silindire kıyasla 600 kat artırılmıştır. Kerckring kıvrımları bağırsak çevresinde dairesel olarak uzanan, özellikle doudenum ve jejunumda gelişmiş submukozal kıvrımlardır ve birkaç milimetre derinliğindedir. Viluslar 0,5-1,5 mm uzunluğunda ve 0,1 mm çapında parmak benzeri uzantılardır. Mikrovilusların (1 μm uzunluk, 0,1 μm genişlik) 600 ila 1000 tanesi her bir vilusu kaplayarak yüzey alanını önemli ölçüde artırmaktadır (4). Bu durum vilus ve mikrovilusları ilaç absorpsiyonu açısından daha da önemli kılmaktadır. Yaklaşık 400 m^2 yüzey alanına sahip ince bağırsak ilaç absorpsiyonunun gerçekleştiği asıl bölgedir (11).



Şekil 2.1. İnce bağırsak yüzeyinde yer alan villi ve mikrovilluslar(12).

İlaç absorpsiyonu genellikle pasif difüzyon, daha az oranda kolaylaştırılmış difüzyon ve aktif taşıma ile gerçekleşmektedir. İnce bağırsağın apikal (lümen) ve bazolateral (kan) yüzeyinde yer alan özel taşıyıcı proteinler de ilaç absorpsiyonunda görev almaktadır (Şekil 2.2). Bu proteinler ilaçları taşıma yönüne göre ikiye ayrılır: Absorptif (*uptake-influx*) taşıyıcılar bağırsak lümeninden kana doğru taşıma yaparken, eksorptif (*efflux*) taşıyıcılar kandan bağırsak lümenine doğru taşınmayı

sağlamaktadırlar. Taşıyıcı proteinler haricinde vilusların uçlarında yoğun olarak çeşitli faz I ve II reaksiyon enzimleri de bulunmaktadır. İlaç metabolize edici olan bu enzimler arasında en iyi bilineni sitokrom P450 (CYP) enzimleri olup, CYP3A4 ilaçların intestinal metabolizasyonunda önemli rol oynamaktadır (13).



Şekil 2.2. Enterosit yüzeyinde yer alan bazı ilaç taşıyıcı proteinler (14).

Kalın bağırsak ileoçekal kavşak ile anüsü birbirine bağlayan, yaklaşık 1,5 m uzunluk ve 6 cm çapa sahip gastrointestinal kanalın son bölümüdür (pH 6,0-7,5). Çıkan kolon (yaklaşık 200 mm uzunlukta), transvers kolon (>450 mm), inen kolon (yaklaşık 300 mm) ve sigmoid kolon (yaklaşık 400 mm) olmak üzere dört kısımdan oluşur. Su ve elektrolitlerin (sodyum, potasyum, klorür, bikarbonat iyonları) absorpsiyonu ile dışkının depolanması ve atılması kalın bağırsağın iki temel fonksiyonudur (4, 8). Kolondan az miktarda ilaç absorpsiyonu da söz konusudur. Gama sintigrafi kullanılarak gastrointestinal geçişin gerçek zamanlı olarak değerlendirildiği farklı çalışmalarda furosemid, teofilin, ibuprofen, deksametazon, tamsulosin ve takrolimus gibi bazı ilaçların kolondan absorpsiyonunun olduğu gösterilmiştir (15). Ayrıca kolondaki aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar levadopa gibi bazı ilaçların metabolizasyonunu sağlamaktadır (1).

Gastrointestinal kanaldan ilaç absorpsiyonu üzerine etki eden faktörler üç grup altında toplanmaktadır:

- **Etkin maddeye ait özellikler** (suda çözünürlük, iyonizasyon sabiti, yağ/su partiyon katsayısı, biyolojik membranlardan permeabilite, enzim ve taşıyıcı sistemlere olan afinite gibi)

Çözünürlük, belli(1)rlı koşullar altında (çözücü, sıcaklık, pH gibi) maksimum çözünen konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. Pek çok ilaç zayıf asidik veya zayıf bazik yapıda olup, iyonizasyon sabiti (pKa) ve bulunduğu fizyolojik ortamın pH'sına bağlı olarak iyonize olurlar. pH ile ilaç iyonizasyonu arasındaki bu ilişki Henderson-Hasselbalch denklemi ile ifade edilmektedir:

$$\begin{aligned} \text{Zayıf asitler için: } \% \text{ Noniyonize ilaç} \\ = 100 / (1 + \text{antilog}(pH - pKa)) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Zayıf bazlar için: } \% \text{ Noniyonize ilaç} \\ = 100 / (1 + \text{antilog}(pKa - pH)) \end{aligned}$$

Bu eşitliğe bağlı olarak zayıf asidik ilaçlar yüksek pH'larda hızlı çözünürken, zayıf bazik ilaçlar yavaş çözünür (16). Zayıf asidik ilaçlar için pH'nın pKa'dan çok küçük olması durumunda ve zayıf bazik ilaçlar için pH'nın pKa'dan çok yüksek olması durumunda, çözünürlük pH'dan bağımsızdır (17). Bir ilacın çözünürlüğü biyolojik membranlardan geçirgenlik açısından da önemlidir. Örneğin lipofilik ilaçlar yüksek membran permeabilitesine sahipken, hidrofilik ilaçların membran permeabilitesi düşüktür (1).

Yağ/su partiyon katsayısı, ilaçların lipofilik-hidrofilik özellikleri ile ilişkili olup, ilaç molekülünün yağ fazı (genellikle oktanol kullanılır) ve su fazı arasındaki dağılımını ifade eden bir değerdir. Doğrudan ilaç konsantrasyonunun belirlenmesine ek olarak, elektroforez, kromatografi, in-silico yöntemler kullanılarak da hesaplanmaktadır (18). Negatif logP değerleri ilacın hidrofilik, pozitif değerler ise lipofilik olduğunu ifade etmektedir (19).

Permeabilite, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BSS)'ne göre etkin maddenin çözünürlüğü ile birlikte değerlendirilen temel özelliklerindedir. Permeabilitenin belirlenmesi için kullanılan yöntemler: İlacın yağ/su partiyon katsayısının belirlenmesi, insanlarda mutlak biyoyararlanım ve kütle denge çalışmaları, insanlarda *in vivo* bağırsak perfüzyon çalışmaları, hayvanlarda *in vivo* veya *in situ* perfüzyon çalışmaları, eksize edilmiş insan veya hayvan barsağında *in vitro* permeasyon çalışmaları ve epitel hücre kültüründe *in vitro* permeasyon çalışmaları şeklindedir (20). Fizyolojik membranlarda birim alan başına, birim zamanda taşınan ilaç miktarının ve gastrointestinal kanal ile sistemik dolaşım arasındaki konsantrasyon gradyanının ilaç permeabilitesinin bir fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Maksimum absorpsiyon, ilacın absorpsiyon bölgesinde maksimum konsantrasyona ve maksimum geçirgenliğe sahip olması durumunda gözlenmektedir (21). İntestinal efektif permeabilite (P_{eff}), etkin maddenin herhangi bir dozaj formundan emilim potansiyelini belirleyen önemli bir biyofarmasötik parametredir. P_{eff} 'i belirlemek için *in silico*, *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* modeller kullanılmaktadır. Bu modeller kullanılırken ilacın membranlardan taşınma mekanizması önemlidir. İlaçların birçoğu pasif difüzyonla taşınırken, taşıyıcı aracılı taşınma, aktif taşıma veya paraselüler difüzyon da farklı taşınma mekanizmaları olarak değerlendirilmelidir (22). Aynı zamanda ilacın gastrointestinal kanaldan emilim bölgesi de önemlidir. Genellikle ilaç permeabilitesinin bağırsağın üst bölgesinde (ince bağırsak) alt kısmına göre daha yüksek olduğu bilinmektedir. İnce bağırsaktaki gelişmiş vilus yapısı yüksek permeabiliteye katkı sağlamaktadır. Fakat bazı ilaçların bağırsağın alt kısımlarında da yüksek permeabilite gösterdiği bildirilmiştir (23).

- **Dozaj şekline ait özellikler** (dozaj şeklinin tipi, kullanılan yardımcı maddeler, uygulama yolu gibi)

Dozaj formu, karakteristik özellikler ve uygulama bölgesi gibi faktörlere bağlı olarak ilaç absorpsiyon hızında değişikliklere neden olmaktadır. Konvansiyonel ve değiştirilmiş salımlı dozaj formlarında ilaç salım hızlarındaki farklılıklar nedeniyle ilacın farmakokinetik veya farmakodinamik özellikleri değişiklik gösterebilir (24). Örneğin nifedipin ile yapılan bir çalışmada konvansiyonel salımlı kapsüllerde, yavaş salımlı tabletlere kıyasla plazma konsantrasyonları daha hızlı artmıştır. Bununla

birlikte yavaş salımlı tabletlerde daha düşük bir konsantrasyonda benzer hipotansif etki elde edilmiştir (25). Etkin maddenin pH'ya bağlı çözünürlüğü ve gastrointestinal kanaldan absorpsiyon bölgesine bağlı olarak geliştirilen farklı dozaj formları biyoyararlanımı artırmaktadır. Örneğin gastrointestinal kanalın üst kısımlarından emilen veya diazepam, klordiazepoksit ve sinnarizin gibi bağırsak sıvısında çözünmeyen ilaçlar için midede kalma süresinin arttırılması avantaj sağlamaktadır. Bu amaçla hidrodinamik olarak dengelenmiş sistemler, içinde polimer tarafından hapsedilen havanın yüzdürme özelliği sağladığı şişebilir bir hidrokolloid içeren tabletler veya granüller gibi dozaj formları tercih edilmektedir. Eritromisin gibi midenin asit ortamında hidrolize uğrayan veya ince bağırsaktan emilen ilaçlar için ise enterik kaplı dozaj formları veya biyoadhezif ilaç taşıyıcı sistemler tercih edilmektedir (26).

Yardımcı maddeler, formülasyonların hazırlanmasını kolaylaştıran ve genel olarak inert ve inaktif maddelerdir. Fakat yapılan çalışmalar bu maddelerin gastrointestinal kanalda ilaç absorpsiyonu ve metabolizasyonu etkilediğini, ilgili enzim ve taşıyıcı proteinlerin aktivitesini değiştirdiğini göstermektedir. Yardımcı maddeler ilaç çözünürlüğünün artırılması, tabletlerde basılabilirliğin sağlanması, yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde ilacın enkapsülasyonu ve ilaç salımının değiştirilmesi gibi amaçlarla veya dolgu maddeleri, tatlandırıcı ve renklendirici madde olarak formülasyonda önemli rol alırlar. Bazı yardımcı maddeler bağırsaklardaki taşıyıcı proteinleri inhibe ederek substratı olan ilacın absorpsiyonunu değiştirmektedir (27). Örneğin Cremophor® EL (polietoksillenmiş hint yağı) formülasyonlarda noniyonik yüzey aktif madde olarak kullanımının yanı sıra, P-gp substratı Rodamin 123'ün izole edilmiş sıçan bağırsak membranlarında apikalden basolaterale geçişini artırmıştır (28). Benzer şekilde PePT1 substratı sefiksim ile yapılan *in situ* closed loop ve *in vivo* plazma çalışmalarında enterik kaplama polimeri olarak oral formülasyonlarda kullanılan Eudragit® varlığında sefiksimin taşınmasının artarak yüksek plazma konsantrasyonlarına ulaştığı gösterilmiştir (29). Ek olarak katı dozaj formlarında dolgu maddesi olarak sıklıkla kullanılan mannitol'ün paraselüler yolla taşındığı bilinmektedir. Bu durum aynı formülasyonda kullanılan ve bu yolla absorbe olan nitrogliserin, izosorbit dinitrat gibi etkin maddeler için yarışmaya neden olabilir. Formülasyonlarda antioksidan, şelatlayıcı ajan, prezervatif ajan olarak kullanılan

EDTA'nın paraselüler geçirgenliği artırdığı bildirilmiştir. Tatlandırıcı olarak özellikle sıvı dozaj şekillerinde kullanılan glikoz ise MRP2 aracılı flurosein taşınmasını artırmıştır. Ayrıca glikoz varlığında ketoprofen, ibuprofen ve amoksisilinın sıçan jejunum membranında apikalden basolaterale taşınması artmıştır (30).

Uygulama yolu da absorpsiyonu etkileyen parametrelerdendir. Sistemik etki elde etmek için parenteral ve enteral olmak üzere iki temel uygulama yolu mevcuttur. Parenteral yol oluşturduğu ağrı ve rahatsızlık hissine rağmen, diğer uygulama yollarına göre avantaj sağlar. Oral yolla uygulanan ilaçlar gibi gastrointestinal kanalda düşük absorpsiyon ve/veya ilk geçiş metabolizasyonu maruziyeti olmadığı için biyoyararlanım daha yüksektir. Parenteral uygulama yollarından intravenöz (iv) uygulamada absorpsiyon söz konusu değilken, intramusküler (im) uygulamada absorpsiyon kastan çevre sıvılara oradan da kana difüzyonla gerçekleşmektedir. Dolayısıyla im uygulamada absorpsiyon kas dokularının farklı kanlanma hızına, yağ dokusunun varlığına, farklı yaş gruplarına ve cinsiyete bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Subkütan (sc) uygulamada ise ilaç absorpsiyon hızı oral uygulamaya kıyasla hızlı, fakat deri altı dokusu kas dokusuna göre daha az kanlandığı için im uygulamaya kıyasla yavaştır. Sc uygulamada absorpsiyon küçük moleküller için kılcal damarların vasküler endotelleri aracılığı ile daha büyük moleküller için lenfatik damarlar aracılığı ile gerçekleşir. İlaç absorpsiyonu esas olarak pasif difüzyonla gerçekleştiği için difüzyon (kılcal membran) alanı, ilaç difüzyon katsayısı, konsantrasyon gradyanı gibi parametreler absorpsiyon sınırlayıcı faktörlerdir. Bukkal ve sublingual uygulamada absorpsiyon ağızda başlar. Yüksek kan akışı nedeniyle etki hızlı başlar ve ilk geçiş eliminasyonundan kaçınılır. Çoğunlukla ağızdaki mukozal hücrelerin membranlarından pasif difüzyonla gerçekleşen absorpsiyon, orta polaritedeki ilaçlar için yüksektir. Rektal uygulamada da absorpsiyon epitel hücrelerden pasif difüzyonla gerçekleşmektedir. Oral uygulamaya kıyasla düşük yüzey alanı ve kısa kalma süresi nedeniyle ilacın fizikokimyasal özellikleri ve formülasyon özellikleri rektal emilim için önemlidir. Genellikle lipofilik ilaçlar hidrofilik ilaçlara göre daha iyi emilir (31).

- **Fizyolojik faktörler** (gastrik boşalma, gastrointestinal kanaldan geçiş süresi, pH, patolojik rahatsızlıklar, yaş gibi) (1).

Midede kalma süresi (gastrik boşalma) dozaj formuna ve açlık/tokluk durumuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Normal süre 5 dakika ile 2 saat arasında değişirken, bu süre 12 saate kadar da uzayabilir. Tokluk durumunda sıvı, pellet ve tablet dozaj formları yiyeceklerle birlikte boşalma eğiliminde iken, sürekli ve kontrollü salım sağlayan dozaj formları daha uzun süre midede kalabilir. Açlık durumunda ise böyle bir ayırım söz konusu değildir. Alınan yiyeceklerin içeriği, birlikte kullanılan diğer ilaçlar, hastalık durumu gibi etkenler de midede kalış süresini etkilemektedir. Genel olarak aşırı yağlı yiyecekler midede kalış süresini uzatarak ilaç absorpsiyonunu geciktirmektedir (4). Gecikmiş ilaç absorpsiyonu özellikle yarı ömrü kısa ilaçlar için terapötik etkinliği azaltmaktadır (32). Ayrıca ilaçların çözünürlüğü, absorpsiyonu ve stabilitesi mide pH'sına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Zayıf bazik ilaçlar midede daha kolay çözünürken, zayıf asidik ilaçların çözünmesi minimum düzeydedir. Zayıf bazik, suda az çözünen, yüksek permeabilite gösteren (BSS Sınıf II) ve özellikle düşük pKa değerine sahip ilaçların absorpsiyonu üzerine mide pH'sının etkisi belirgindir. Yüksek gastrik pH ketokonazol, itrakonazol, dipiridamol, indinavir, enoksasin, dazatinib ve sinnarizinin oral absorpsiyonunun azalmasına neden olmaktadır. Eritromisin, penisilin G, dedanosin ve digoksin gibi aside duyarlı ilaçlar ise midenin asidik ortamında bozulmaktadır (33).

Gastrointestinal kanal geçiş süresi ve pH ilaç absorpsiyonunu etkileyen önemli fizyolojik etmenlerdir. Geçiş süresi ince bağırsaklarda 4,3-4,6 saat arasında iken, kolonda 18-34 saat arasında değişkenlik göstermektedir (34). İnce bağırsaklardan geçiş süresi özellikle kontrollü, sürekli ve uzatılmış salım sağlayan dozaj formları, enterik kaplı dozaj formları, intestinal sıvılarda yavaş çözünen, intestinal taşıyıcı sistemler aracılığı ile absorblanan ve kolondan absorpsiyonu olmayan ilaçlar için önemlidir. Kolonik geçiş süresi dışkılama sıklığı ve süresine bağlıdır. Bireysel faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermesi haricinde ağızdan anüse toplam geçiş süresi 12-36 saattir (4). Gastrointestinal kanalın farklı bölgelerinde pH değişkenlik göstermektedir. Midede asidik (pH 1,5-3,5) olan pH değeri duodenumda 5,0-6,0 civarına yükselir. Jejunum ve ileum için pH 7,0-8,0 arasında iken kolonda pH 6,0'ya düşmektedir. Bu durum ilaçların iyonizasyon derecesini, çözünmesini, permeasyon davranışlarını etkilediği gibi değiştirilmiş salımlı formülasyonların etkinliğini de değiştirmektedir (34).

Yaşa bağı olarak gastrointestinal kanalda meydana gelen fizyolojik değişimler ilaç absorpsiyonunu da etkilemektedir. Mide ve bağırsak sıvılarının hacmi ve içeriği, intestinal taşıyıcı proteinler ve metabolizasyon enzimlerinin aktivitesi yaşa bağı olarak değişkenlik göstermektedir (35). Yapılan bir çalışmada yeni doğanlarda yüksek beslenme ihtiyacına bağı olarak yetişkinlere göre bağırsak permeabilitesinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (36). Prematüre bebeklerde CYP3A aktivitesinin düşük olmasına bağı olarak CYP3A substratı midazolamın oral biyoyararlanımı yetişkinlere göre yaklaşık 3 kat fazla bulunmuştur (37). Aksine yaşlı hastalarda ise su ve besin alımı azaldığı için bağırsak fonksiyonları azalmaktadır. Ayrıca ileri yaş hastalarda daha sık görülen hastalık ve çoklu ilaç kullanımı da ilaç absorpsiyonu üzerine etkili olmaktadır (34).

Patolojik hastalıklar gastrointestinal kanal da görülebileceği gibi sistemik hastalıklar da gastrointestinal (GIS) kanalı ve ilaç absorpsiyonunu etkileyebilir. Örneğin inflamatuvar bağırsak hastalığı mukozal bariyer fonksiyonunu değiştirirken, kolorektal kanser ve/veya mide kanseri GIS kanalda morfolojik değişikliklere bağı olarak motilite ve pH değişikliklerine neden olmaktadır. *Helicobacter pylori* enfeksiyonları özellikle mide mukozasında görülen ve gastritten peptik ülser kadar ciddi sonuçları olan inflamatuvar bir hastalık olup, mide asidi salgısını ve motiliteyi etkilemektedir. Ek olarak parkinson, diyabet, kistik fibrozis, obezite, AIDS gibi sistemik hastalıklar da oral ilaç absorpsiyonu üzerinde etkilidir (34).

2.2. İntestinal İlaç Taşıyıcılar

Bağırsaklarda yer alan taşıyıcılar birçok ilacın hem absorpsiyon (*uptake-influx*) hem de eksorpsiyonunda (*efflux*) önemli rol oynamaktadır. Enterositlerin apikal ve/veya bazolateral yüzeyinde yer alan taşıyıcıların ekspresyonu bölgesel olarak farklılık göstermektedir (38). İlaç molekülleri membranlardan pasif difüzyon, kolaylaştırılmış taşıma, aktif taşıma gibi farklı mekanizmalar aracılığı ile taşınmaktadır. Kolaylaştırılmış taşıma, çözünen maddelerin membrandan taşıyıcılar aracılığı ile enerji harcamadan taşınmasını ifade etmektedir. Aktif taşıma ise çözünen madde ve/veya iyonların ATP hidrolizi aracılığı ile taşınması olarak bilinmektedir. Taşınma mekanizmalarına göre taşıyıcılar da farklı isimlendirilmektedir. İnsan Geni

Adlandırma Komitesi (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) yönergelerine göre membran taşıyıcılar, çözünen taşıyıcı (*Solute Carrier-SLC*) ve ATP bağlayıcı kaset (*ATP-binding Cassette-ABC*) taşıyıcılar olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılmaktadır (39).

2.2.1. ATP Bağlayıcı Kaset (*ATP-Binding Cassette-ABC*) Taşıyıcılar

ABC taşıyıcıları integral membran proteinleri olup, ATP'ye bağlanarak şekerler, amino asitler, metal iyonları, peptitler, proteinler, hidrofobik bileşikler ve metabolitler gibi birçok molekülün plazma membranı boyunca taşınmasını sağlarlar. İnsanlarda tanımlanmış 49 ABC taşıyıcı alt tipi olup, filogenetik olarak 7 alt aileye (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG) ayrılmaktadır. Bu taşıyıcılar çeşitli ilaçları, ilaç konjugatlarını ve metabolitlerini hücreden dışarı taşımakla görevlidirler. Bunlardan P-glikoprotein (P-gp/ABCB1), çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler (*Multidrug Resistance Associated proteins /MRP'ler/ABCC'ler*) ve meme kanseri direnç proteini (*Breast Cancer Resistance Protein/BCRP/ABCG2*) gibi bazı taşıyıcılar çoklu ilaç direnci gelişiminde rol oynamaktadır. Bu taşıyıcılar (Tablo 2.1) bağırsak, böbrek ve beyin gibi çeşitli dokularda eksprese edilir ve ilaçların emilimi, dağılımı ve eliminasyonunda önemli rol oynarlar (40-43).

Tablo 2.1. Bazı ABC taşıyıcıları ve özellikleri.

Protein (Gen)	Membran Lokalizasyonu	Bulunduğu Dokular	Kaynak
MDR1 (P-gp) (ABCB1)	Apikal	Kan-beyin bariyeri, böbrek, karaciğer, ince bağırsak, plasenta, lenfositler	(43, 44)
MDR2 (ABCB4)	Apikal	Karaciğer, böbrek, dalak, ince-kalın bağırsak, pankreas, beyin, testis	(43, 45)
BSEP (ABCB11)	Apikal	Karaciğer, testis, akciğer, böbrek, kalın bağırsak	(43, 46)
MRP1 (ABCC1)	Bazolateral	Kan-beyin bariyeri, kolon, böbrek, akciğer, plasenta, iskelet kası, ince bağırsak, testis	(42, 43)
MRP2 (ABCC2)	Apikal	Böbrek, karaciğer, plasenta, ince bağırsak	(42, 43)
MRP3 (ABCC3)	Bazolateral	Böbrek üstü bezi, kolon, böbrek, karaciğer, pankreas, ince bağırsak	(42, 43)
MRP4 (ABCC4)	Bazolateral, Apikal	Kan-beyin bariyeri, böbrek, akciğer	(42, 43)
MRP5 (ABCC5)	Bazolateral, Apikal	-	(42, 43)
MRP6 (ABCC6)	Apikal	Böbrek, karaciğer	(42, 43)
MRP7 (ABCC10)	Apikal	Kalp, karaciğer, böbrek, pankreas, beyin, kalın bağırsak, dalak, testis	(43, 47)
MRP8 (ABCC11)	Apikal	Karaciğer, beyin, plasenta, testis	(43, 48)
MRP9 (ABCC12)	-	Karaciğer, akciğer, böbrek, beyin, pankreas, kalın bağırsak, testis	(43, 49)
BCRP (ABCG2)	Apikal	Beyin, testis, ince bağırsak, kalın bağırsak, karaciğer	(43, 50)

P-gp (ABCB1, MDR1) birçok ilacın hücre dışına taşınmasında etkili olan, ince bağırsak, karaciğer, böbrek, kan-beyin bariyeri gibi birçok dokuda bulunan, epitel hücrelerin apikal membranlarında yer alan ve ABC taşıyıcıları arasında yapısı en iyi aydınlatılmış olan taşıyıcı proteindir. P-gp 170 Dalton kütleyle sahip olup, iki transmembran alan ve iki hücre içi nükleotid bağlanma bölgesinden oluşur. Substrat bağlanma bölgesi proteinin hücre içi kısmında bulunur. P-gp fosforilasyondan sonra substratı olan molekülleri *flip-flop* mekanizmasıyla lümeneye doğru taşır. Defosforilasyon ile protein başlangıç durumuna geri döner. P-gp substratı olan moleküller genel olarak 200-1900 Da aralığında büyüklüğe sahip olup, birçoğu aromatik grup içermektedir. Ancak aromatik olmayan moleküller de taşınmaktadır. Ayrıca zayıf bazik veya yüksüz moleküller asidik bileşiklere kıyasla daha etkili P-gp substratı olma özelliğine sahiptir (41, 44). Bazı P-gp substrat ve inhibitörleri Tablo 2.2’de verilmiştir (51).

P-gp birçok ilacın intestinal absorpsiyonunda önemli rol oynamaktadır. Duodenumdan rektuma kadar epitel hücrelerin apikal yüzeyinde yer almasına rağmen ince bağırsakta yüksek ekspresyona sahiptir. P-gp substratı olan ilaçların absorpsiyonunu azaltmaktadır. Taşıyıcı proteinin inhibisyonu substrat olan ilaçların biyoyararlanımını artırırken, indüksiyonu biyoyararlanımı azaltmaktadır (52). P-gp’nin ilaç absorpsiyonunda etkili olduğu ilk olarak Caco-2 hücrelerinde vinblastinin absorpsiyonunun P-gp inhibitörü verapamil varlığında değerlendirilerek kanıtlanmıştır (53, 54). Ayrıca *mdr1a* nakavt farelerde paklitaksel’in oral absorpsiyonu incelenerek P-gp’nin ilaç emiliminde etkili olduğu *in vivo* olarak da kanıtlanmıştır (55). Bununla birlikte ilacın P-gp substratı olması düşük oral biyoyararlanım göstereceği anlamına gelmemektedir. İlacın substrat/inhibitör olduğu başka ilaç taşıyıcı proteinler ve/veya ilaç metabolize edici enzimler de biyoyararlanımın değerlendirilmesinde önemlidir. Örneğin P-gp substratı olduğu bilinen digoksin için oral biyoyararlanım %60-80 civarında iken, HIV proteaz inhibitörleri indinavir ve ritonavir için %60-75 civarındadır. Bu durum P-gp’nin ilaç emilimindeki rolünün her ilaç için niceliksel olarak önemli olmayabileceğini göstermektedir (56).

Tablo 2.2. Bazı P-gp substratları ve inhibitörleri (51).

Substratlar		İnhibitörler	
Anti-kanser ilaçlar	Antrasiklinler: dokсорubisin, daunorubisin	1. Kuşak	Verapamil, siklosporin A, tamoksifen
	Kamfotekinler: topotekan	2. Kuşak	PSC833 (valsopodar) VX710 (birikodar)
	Epipodofilotoksinler:etoposid, teniposid	3. Kuşak	LY335979 (zosukidar) OC144093 (ontojen) XR9576 (tarikidar) GF120918/GG918 (elakridar)
	Taksanlar: paklitaksel, dosetaksel	Diğerleri	Kurkuminoidler Flavonoidler Disülfiram Kremofor EL Nonidet P40 Benzil alkol
	Vinka alkaloidleri: vinblastin, vinkristin		
Tirosin kinaz inhibitörleri	İmatinib mesilat, gefitinib		
Doğal moleküller	Flavonoidler, kurkuminoidler, kolşisin, aktinomisin D		

Floresan boyalar	Rodamin 123, Hoechst 33342 (bisbenzimid), Kalsein AM (kalsein asetoksimetilester)
Steroidler	Aldosteron, kortikosteron, deksametason
Pestisitler	Metilparation, endosülfan
Anti-epileptikler	Topiramamat
Analjezikler	Morfin
Antibiyotikler	Eritromisin
Kolesterol düşürücü ilaçlar	Lovastatin, simvastatin
Antihelmintikler	İvermektin
Antihipertansifler	Rezerpin
Antihistaminikler	Terfenadin
Kalsiyum kanal blokerleri	Nifedipin, diltiazem, verapamil
Kalmodulin antagonistleri	Trifluperazin, trans-flupentiksol
Kardiyak glikozitler	Digoksin
HIV proteaz inhibitörleri	Nelfinavir, ritonavir, sakinavir
İmmunosupresif ajanlar	Siklosporin A, takrolimus
Doğrusal peptitler	ALLN (N-asetil-L-lösil-L-lösilnor lösilal) Löpeptin Pepstatin A
Siklik peptitler	PSC833 (Valspodar) Beauverisin

İyonoforlar	Gramisidin A, valinomisin	
Diğerleri	Simetidin, triton X-100	

Çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler (*Multidrug Resistance Associated Proteins*-MRP'ler) ABC taşıyıcı proteinlerden ABCC gen alt ailesinin bir sınıfını oluşturmaktadır. ABCC alt ailesi çoklu ilaç direnciyle ilişkili proteinler (MRP'ler), sülfonilüre reseptörlerini (SUR'ler) ve kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyiciyi (CFTR) olmak üzere üç sınıftan oluşmaktadır. MRP sınıfının toplam on üyesi (MRP1-ABCC1, MRP2-ABCC2, MRP3-ABCC3, MRP4-ABCC4, MRP5-ABCC5, MRP6-ABCC6, MRP7-ABCC10, MRP8-ABCC11, MRP9-ABCC12, ABCC13-psödo gen) karakterize edilmiştir (57). MRP1 en çok bağırsak, böbrek ve karaciğerde epitel hücrelerin bazolateral yüzeyine yer almaktadır (58, 59). İlaç dağılımında etkisi tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen daunorubisin, doksorubisin, vinkristin, rodamin 123 gibi bazı sitotoksik ilaçlara karşı direnç gelişiminde etkilidir (60, 61). Ayrıca kanda artan toksin seviyelerinin bağırsak ve böbrekler tarafından elimine edilmesinde ve toksinlerin hücrel birikimine karşı bariyer oluşturulmasında rol almaktadır (62). MRP2 (cMOAT), MRP1'in aksine dokuların apikal membranlarında yer alır (63). Substratları yapısal olarak MRP1 substratlarına benzerdir. Vinkristin, doksorubisin ve sisplatin gibi sitotoksik ajanlara karşı hücrel dirence aracılık eder. Ayrıca HIV proteaz inhibitörleri, nükleosid fosfonatlar, p-aminohippurik asit ve florokinolon antibiyotiklerin taşınmasında etkilidir (64, 65). Hepatositlerde bazı anyonik bileşiklerin safraya atılmasında ve safra asidi salgılanmasında rol almaktadır (62). MRP3 bazolateral membranda lokalize olup taurokolat, glikokolat, taurolitokolat-3-sülfat ve taurokenodeksikolat-3-sülfat gibi çok sayıda safra tuzlarını taşımaktadır (66). Karaciğerde ise normal boşaltım fonksiyonları tehlikeye girdiğinde ikincil bir koruyucu mekanizma gibi görev almaktadır (62). MRP4'ün yapılan çalışmalarda hem apikal hem de basolateral membranda ekspresyonu söz konusudur. Substratları arasında folik asit, folinik asit, metotreksat ve safra tuzları yer almaktadır (67, 68). Prostaglandin E'nin hücrel salımında MRP4'ün rol aldığı gösterilmiştir (69). Ayrıca pürin analoglarına karşı direnç gelişimine aracılık ettiği ve nükleosid fosfonat analogları PMEG (9-[fosfonilmetoksietil] guanin) ve adefovir'i (PMEA; 9-[2-fosfonilmetoksietil] adenin)

taşıdığı gösterilmiştir (70, 71). MRP5 birçok dokuda yer almasına rağmen antrasiklinler ve vinka alkaloidleri gibi antikanser ajanların direnç kazanmasında ve bağırsakta ilaç dağılımında önemli bir rolünün olmadığı belirtilmiştir (62, 72). MRP6'nın etoposid, doksorubisin ve sisplatin gibi sitotoksik ajanların taşınmasında rol aldığı, fakat vinblastin, vinkristin ve paklitaksel gibi diğer bazı MRP substratları için direnç oluşumuna neden olmadığı gösterilmemiştir (73). Diğer MRP üyeleri ve fonksiyonları ile ilgili olarak az sayıda çalışma bulunmaktadır. Tablo 2.3'te MRP üyelerinin bazı substratları özetlenmiştir (62).

Tablo 2.3. MRP ailesi üyelerinin substratı olan bazı ilaçlar (62).

		MRP1	MRP2	MRP3	MRP4	MRP5	MRP6
Antikanser ilaçlar							
Vinka alkaloidleri	Vinblastin		+				
	Vinkristin	+	+	+			
Antrasiklinler	Daunorubisin	+					+
	Doksorubisin	+	+				+
Epipodofilotoksinler	Etoposid	+	+	+			+
	Teniposid			+			+
Diğerleri	Sisplatin		+				+
	Metotreksat	+		+	+		
HIV ilaçları							
Proteaz inhibitörleri	İndinavir		+				
	Ritonavir		+				
	Sakinavir		+				
Nükleosid fosfonat analogları	Adefovir		+		+	+	
	Sidofovir		+				
Antibiyotikler							
Fluorokinolonlar	Grepafloksasin	+	+				

Endojen bileşikler							
Steroid hormonlar	Esteron sülfat	+					
	Dehidroepiandrosteron sülfat	+					
	Estradiol-17- β -glukuronid	+	+	+			
Safra tuzları	Taurokolat			+			
	Glikokolat			+			
	Taurokenodeoksikolat-3-sülfat		+	+			
	Taurolitokolat-3-sülfat		+	+	+		
Diğerleri							
GSH konjugatları	Lökotrien C4	+	+	+			+
	2,4-Dinitrofenil-S-glutatyon (DNP-SG)	+	+	+		+	+
Floresan boyalar	Kalsein	+					
	Rodamin 123	+					
	Fluo 3	+	+				

Meme kanseri direnç proteini (*Breast Cancer Resistance Protein/BCRP/ABCG2*) ilk olarak 1998’de tanımlanmış 75 kDa’luk bir membran proteinidir. İlaçların emilimi (ince bağırsak), eliminasyonu (karaciğer ve böbrek) ve dağılımı (kan-beyin ve plasenta bariyerleri) için önemli olan organlarda yüksek oranda eksprese edilir. Farelerin, ineklerin ve insanların meme bezlerinde BCRP ekspresyonunun emzirme sırasında güçlü bir şekilde indüklendiği ve bazı kemoterapötik ajanların süte salgılanmasından ve konsantrasyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. BCRP’nin fizyolojik önemi endojen toksinlere veya ksenobiyotiklere karşı doku koruması sağlaması ve porfirinler, riboflavin ve östrojenler gibi fizyolojik açıdan önemli endojen bileşiklerin hücrel homeostazisini düzenlemesidir (74). BCRP 655 amino asit içeren politopik bir transmembran proteini olup diğer ABC taşıyıcılarından farklı olarak yalnızca bir nükleotid bağlama alanı (NBD) ve bir membran kapsayan alan (MSD) içerir. BCRP karaciğer ve böbrekte ilaçların safra ve böbrek yoluyla eliminasyonunu kolaylaştırır. Kan-beyin bariyerinde ilaçların beyine geçişini önemli ölçüde sınırlandırır. Kan-plasenta bariyerinde ise ilaçları fetal dolaşımdan anne dolaşımına geri gönderir ve fetal maruziyeti sınırlar (75). Kimyasal ve farmakolojik özellikleri farklı olmasına rağmen BCRP’nin çok sayıda substrat ve inhibitörü bulunmaktadır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. BCRP için belirlenmiş bazı substrat ve inhibitör ilaçlar (75).

Substratlar		İnhibitörler	
Antrasinler	Mitoksantron	Tirosin kinaz inhibitörleri	Gefitinib
	Bisantren		İmatinib mesilat
	Aza-antrapirazol (BBR3390)		Erlotinib
Kampotekin türevleri	Topotekan		Nilotinib
	SN-38	Lapatinib	
	İrinotekan	HIV proteaz inhibitörleri	Ritonavir
	Diflomotekan		Sakinavir
Poliglutamalar	Metotreksat		Nelfinavir
	Metotreksat-Glu ₂	Lopinavir	
	Metotreksat-Glu ₃	HCV proteaz inhibitörleri	Boseprevir
Nükleosid analogları	Zidovudin		Telaprevir
	Zidovudin 5'-monofosfat	Kalsiyum kanal blokörleri	Dipiridamol
	Lamivudin (3TC)		Nikardipin
Diğer ilaçlar	Prazosin		Nimodipin
	İndolokarbazol	Nitrendipin	
	Flavopiridol	Antifungal azoller	Ketokonazol
	Kanertinib (CI1033)		İtrakonazol
	Imatinib mesylate (STI571)		Fluokonazol
	Gefitinib (ZD1839)	İmmünosupresanlar	Siklosporin A
	Nilotinib		Takrolimus
	Gliburide		Sirolimus
	Simetidin	Diğer ilaçlar	Novobiosin
	Sülfasalazin		Tamoksifen
	Nitrofurantoin		Rezerpin

	Rosuvastatin		Omeprazol
	Pantoprazol		Pantoprazol

2.2.2. Çözünen İlaç Taşıyıcıları (*Solute Carrier*-SLC)

SLC süper ailesi 65 alt aile ve 458 taşıyıcı proteinden oluşmaktadır. Farklı ailelere ait proteinler filogenetik olarak farklı üç boyutlu yapılara sahiptir. Bununla birlikte ortak olan yapısal özellikler de vardır. SLC proteinlerinin 1-16 arasında transmembran (TM) alanı içerdiği bilinmektedir. Birçoğu (yaklaşık %83) 7-12 arasında TM alanı içermektedir. SLC proteinleri, şekerler, amino asitler, vitaminler, nükleotidler, metaller, inorganik iyonlar, organik anyonlar, oligopeptitler ve ilaçlar dahil olmak üzere çok çeşitli molekülleri taşımaktadır (76). FDA onaylı 63 terapötik ajanın (özellikle hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar) SLC'ler tarafından taşındığı bildirilmiştir (77). Tablo 2.5'te bazı SLC taşıyıcılar ve özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.5. Bazı SLC taşıyıcıları ve özellikleri (78, 79).

Gen Ailesi (Gen)	Fonksiyon	Eksprese edilen organ/doku
SLC1 (SLC1A1-SLC1A7)	Yüksek afiniteli glutamat ve nötral amino asit taşıyıcı	Nöronlar, böbrek, bağırsak, beyin, karaciğer, kas, over, testis
SLC2 (SLC2A1-SLC2A11)	Kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcı	Karaciğer, pankreas, nöronlar, yağ doku, iskelet kası, bağırsak, beyin mikrogliya
SLC3 (SLC3A1,SLC3A2)	Dibazik ve nötral amino asit taşıyıcı	Böbrek, bağırsak, aktif çoğalan hücreler
SLC4 (SLC4A1-SLC4A10)	Anyon değiştirici, Sodyum bikarbonat yardımcı taşıyıcı	Eritrosit, lökosit, GIS kanal, nöronlar, kalp, pankreas, beyin, böbrek, retina, testis, dalak, over
SLC5 (SLC5A1-SLC5A7)	Sodyum/glikoz yardımcı taşıyıcı, İnositol taşıyıcı, Nötral amino asit taşıyıcı, Sodyum bağlı vitamin taşıyıcı, Kolin taşıyıcı, Sodyum iyodür simporter	Bağırsak, böbrek, beyin, kolon, over, tiroit dokuları
SLC6 (SLC6A1-SLC6A16)	Nörotransmitter taşıyıcı	Beyin, ileum, karaciğer, kalp, plasenta, kas, testis
SLC7 (SLC7A1-SLC7A11)	Katyonik amino asit taşıyıcı	Bağırsak, beyin, testis, plasenta, akciğer, karaciğer, timus, retina, böbrek
SLC8 (SLC8A1-SLC8A3)	Sodyum-kalsiyum değiştirici	Kalp, beyin, retina, iskelet kası
SLC16 (SLC16A1-SLC16A7)	Monokarboksilik asit taşıyıcı	Eritrosit, kas, bağırsak, böbrek, tümör hücreleri
SLC21 (SLC21A1-SLC21A14)	Organik anyon taşıyıcı	Karaciğer, beyin, akciğer, böbrek, testis
SLC22 (SLC22A1-SLC22A8)	Organik katyon taşıyıcı	Böbrek, karaciğer, bağırsak, kolon, plasenta, kemik iliği, iskelet kası, kalp
SLC27 (SLC27A1-SLC27A6)	Yağ asidi taşıyıcı	Adipoz doku, iskelet kası, kalp, böbrek, yağ doku
SLC30 (SLC30A1-SLC30A4)	Çinko taşıyıcı	Beyin, bağırsak

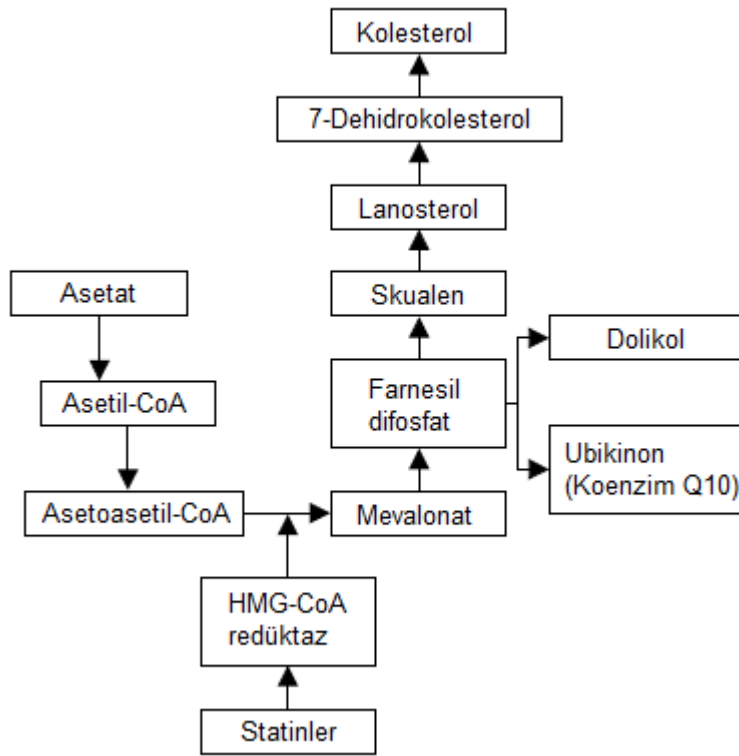
2.3. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Özellikleri

2.3.1. Statinler

3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri olarak da bilinen statinler, günümüzde klinikte kullanılan 7 üyesi bulunan (atorvastatin, serivastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin, rosuvastatin, pitavastatin) ve hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan bir ilaç grubudur (80). Miyopati, rabdomiyoliz gibi ciddi yan etkilerinden dolayı 2001’de piyasadan kaldırılan serivastatin haricinde iyi tolere edilebilen güvenli ilaçlardır. Statinlerin ilk üyesi olan mevastatin bir mantar türevi *Penicillium citrinum*’dan izole edilmiştir. Simvastatin, lovastatin ve pravastatin de mantarlardan elde edilmiş olmasına rağmen atorvastatin, serivastatin, fluvastatin, pitavastatin ve rosuvastatin tamamen sentetik bileşiklerdir. Kimyasal yapıları farklı olan statinler temelde 3 kısımdan oluşmaktadırlar. Bu kısımlar HMG-CoA enzimine bağlanma bölgesi, kompleks hidrofobik halka ve bu halka yapısına bağlı, ilacın çözünürlüğünden sorumlu olan yan gruplardır (81, 82).

Kolesterol hücre zarının temel bir bileşeni olup önemli fizyolojik fonksiyonları vardır. Karaciğerde sentezlenen ve dolaşımda bulunan kolesterol endojendir. Plazmada şilomikronlar, çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL-*very low density lipoprotein*), düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL-*low density lipoprotein*) ve/veya yüksek yoğunluklu lipoproteinlere (HDL-*high density lipoprotein*) bağlı olarak bulunur. Plazma kolesterolünün yaklaşık %60 ila 75’i doğrudan ateroskleroz ve koroner kalp hastalığı riskinin artmasıyla ilişkili olan LDL ile taşınır. LDL, hepatik ve endotelial lipazın etkisiyle VLDL’den oluşturulur ve LDL reseptörlerine bağlanarak karaciğer tarafından dolaşımdan uzaklaştırılır. LDL reseptörlerinin ekspresyonu, hepatositlerdeki kolesterol seviyesi ile ters orantılıdır. HMG-CoA redüktaz tarafından HMG-CoA’nın mevalonik aside dönüştürülmesi, endojen kolesterol oluşumunda hız sınırlayıcı bir adımdır. HMG-CoA redüktaz inhibitörleri tarafından kolesterol oluşumunun inhibisyonu (Şekil 2.3) hücre içi kolesterol depolarını azaltır. Bu durum LDL reseptörlerinin ekspresyonu ile sonuçlanır ve LDL-kolesterolün plazmadan temizlenmesi artırılır (83). Statinler HMG-CoA redüktaz enzimine bağlanma bölgesinde doğal substrat HMG-CoA’dan 3 kat fazla afiniteye sahip olup, doz ve

bireysel faktörlere bağlı olarak kolesterol sentezini %10-60 oranında azaltırlar (84). Ayrıca karaciğerde apolipoprotein B100 ve trigliserit açısından zengin lipoproteinlerin sentezini de azaltırlar (85).



Şekil 2.3. Kolesterol sentezi ve karaciğerde statinlerin etki mekanizması (84).

Statin grubu ilaçların etki mekanizması aynı olmasına rağmen kimyasal yapılarındaki farklılıklar nedeniyle farmakokinetik profilleri değişiklik göstermektedir (86). Ayrıca HMG-CoA redüktaz enzimine bağlanma eğilimleri ve hepatositlere girme yetenekleri de kimyasal yapıları sonucu değişiklik göstermektedir. Statinlere ait bu özellikler ve farklı farmakokinetik parametreler Tablo 2.6’da özetlenmiştir (87). Statinler ilaç-ilaç etkileşimlerine yol açan önemli farmakokinetik etkileşimler göstermektedir. Pravastatin haricinde tüm statinler karaciğerde sitokrom P450 izoenzimleri tarafından önemli ölçüde metabolize edilmektedir. Diğer ilaçların statinlerle birlikte kullanılması durumunda, ilaç kan düzeyleri değişerek yan etki riski

açığa çıkmaktadır. Statinlerin metabolizasyonlarında rol oynayan enzimler ve muhtemel ilaç etkileşimleri Tablo 2.7’de verilmektedir (88).

Yapılan çalışmalarda statinlerin kolesterol düşürücü etkileri dışında kan basıncını azaltma, yeni kemik oluşumunu hızlandırarak osteoporozu önleme, derin ven trombozu riskini azaltma ve Alzheimer hastalığına bağlı demansı önleme gibi etkileri de belirtilmiştir. Bununla birlikte statin tedavisine bağlı yan etkiler genellikle hafiftir. Hastaların yaklaşık %2'sinde bulantı, kabızlık, ishal, karın ağrısı, grip belirtileri, baş ağrısı, döküntü, artralji, miyalji, kas krampları ve yüksek transaminaz seviyeleri bildirilmiştir. Daha ciddi yan etkiler rabdomyolize yol açabilen miyopati, hepatit ve fulminan karaciğer yetmezliğidir. Nadiren bildirilen yan etkiler ise merkezi sinir sistemi ile ilgili olanlardır. Özellikle statinlerin bazı hastalarda uyku süresini azaltma eğilimi bildirilmiştir (89).

Tablo 2.6. Statinlerin farmakokinetik özellikleri (87).

	Lovastatin	Simvastatin	Pravastatin	Fluvastatin	Atorvastatin	Serivastatin	Rosuvastatin	Pitavastatin
*IC₅₀ (nM)	-	11,2	44,1	27,6	8,2	10,0	5,4	-
*Lipofilisite	3,91	4,4	-0,75 – -1,00	1,0 – 1,25	1,0 – 1,25	1,50 – 1,75	-0,25 – -0,50	1,5
Absorpsiyon (%)	30	60-85	35	98	30	>98	50	80
Biyoyararlanım (%)	5	<5	18	24-30	12	60	20	60-80
Hepatik ekstraksiyon (%)	≥70	≥80	45	≥70	70	50-60	63	-
Renal ekstraksiyon (%)	10	13	20	6	<5	30	10	-
Proteine bağlanma (%)	>98	>95	50	>98	>98	>99	90	96
Yarı ömür (saat)	2-5	2-5	1-3	1-3	7-20	1-3	20	10-13
Metabolizasyon	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	++
Aktif metabolitler	3	3	2	Yok	2	2	Minör	Minör
CYP enzim metabolizasyonu	3A4/5, 2C8	3A4/5, 2C8	3A4	2C9	3A4, 2C8	3A4, 2C8	2C9, 2C19	2C9
Uptake (influx) taşıyıcılar	SLCO1B1, MCT4	SLCO1B1	SLCO1B1/2 B1, OAT3, MCT1	SLCO1B1	SLCO1B1	SLCO1B1	SLCO1B1/1 B3/2B1/1A2, SLC10A1	SLCO1B1/1 B3
Efflux taşıyıcılar	ABCB1	ABCB1	ABCB1/B11/ C2/G2	ABCG2	ABCB1/G2	ABCB1/C2/ G2	ABCB1/C2/ G2	ABCB1/C2/ G2

*IC₅₀: Saflaştırılmış insan HMG-CoA redüktaz katalitik bölgede %50 inhibisyon sağlamak için gerekli konsantrasyon değeri

*Lipofilisite pH 7.4 veya pH 7.0 de uygulanan formun logD değeri olarak ifade edilmektedir.

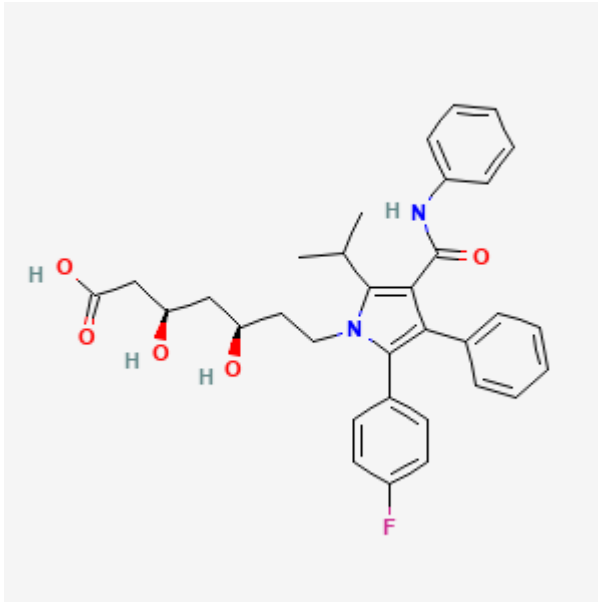
Tablo 2.7. Statinlerin ilaç etkileşimleri (88).

Statinler	Substratı olan CYP enzimi	İnhibitörler	İndüktörler	Diğer Etkileşimler
Lipofilik Statinler				
Lovastatin Atorvastatin Simvastatin	CYP3A4	Azol antifungaller (ketokonazol, itrakonazol) Makrolidler (eritromisin, klaritromisin, azitromisin) Nefazodon Siklosporin A Kalsiyum antagonistleri (mibefradil, diltiazem, verapamil) Proteaz inhibitörleri (amprenavir, indinavir) Midazolam Tamoksifen Amiodaron Greyfurt suyu	Rifampisin Fenitoin Tiazolidindion grubu anti-diyabetik ilaçlar Sarı kantaron	Fibratlar Gemfibrozil Varfarin Digoksin Niasin P-glikoproteinler
Fluvastatin	CYP2C9	Ketokonazol Flukonazol Sülfafenazol Kalsiyum kanal blokerleri Diklofenak	Rifampin Fenobarbital Fenitoin Troglitazon Tiazolidindion grubu anti-diyabetik ilaçlar	Fibratlar Varfarin Niasin
Pitavastatin	Glukuronidasyon	Nefazodon	Tiazolidindion grubu anti-diyabetik ilaçlar	Fibratlar Varfarin

	CYP3A4/CYP2C9 (az oranda)			
Hidrofilik Statinler				
Rosuvastatin	CYP2C9 (<%10) CYP2C19 (az oranda)	Ketokonazol Flukonazol Sülfafenazol	Rifampin Fenobarbital Fenitoin Troglitazon	Fibratlar Varfarin Digoksin
Pravastatin	Sülfasyon	Siklosporin A		Fibratlar Gemfibrozil Varfarin Niasin P-gp

Atorvastatin

Atorvastatin ((3*R*,5*R*)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-propan-2-ilpirol-1-il]-3,5-dihidroksiheptanoik asit; C₃₃H₃₅FN₂O₅; MA: 558,6 g/mol) Şekil 2.4 (90) HMG-CoA redüktaz enzimini geri dönüşümlü olarak inhibe eden ikinci kuşak, sentetik bir statindir. Distile su, asetonitril ve etanolde az çözünürken metanolde serbestçe çözünür (91). pKa değeri 4,46 olup, tedavide ön ilaç olan lakton formu yerine aktif hidroksi asit formunun kalsiyum tuzu kullanılır. Lakton formu asit formundan daha lipofilik özellikte olup, pH 7,4'te yağ/su partiyon katsayıları sırasıyla 4,2 ve 1,53'tür (92). Tedavide kullanılan atorvastatin kalsiyum tuzu pH ≤ 4,0 sulu çözeltilerde çözünmez, pH 7,4 fosfat tamponu ve suda az çözünür (93).



Şekil 2.4. Atorvastatinin kimyasal yapısı (90).

Atorvastatin kalsiyum BSS'ne göre Sınıf II (düşük çözünürlük, yüksek permeabilite) bir ilaç olup, oral biyoyararlanımı %12 civarındadır (94). Oral uygulamadan sonra yüksek membran permeabilitesi sayesinde hızlı bir şekilde absorpsiyona uğrayarak, maksimum plazma konsantrasyonuna 1-3 saat içinde ulaşır (95). Buna rağmen düşük biyoyararlanım sebepleri; düşük çözünürlük ve ilk geçiş eliminasyonudur (96). Atorvastatin gastrointestinal kanal duvarı ve karaciğerde yaygın olarak bulunan CYP3A4 enzim sistemi ile ilk geçiş metabolizasyonuna uğramaktadır (97). Metabolizasyon ürünleri olan orto- ve para-hidroksillenmiş türevler ve β-oksidasyon ürünlerinin de HMG-CoA redüktaz inhibisyon etkisi bulunmaktadır.

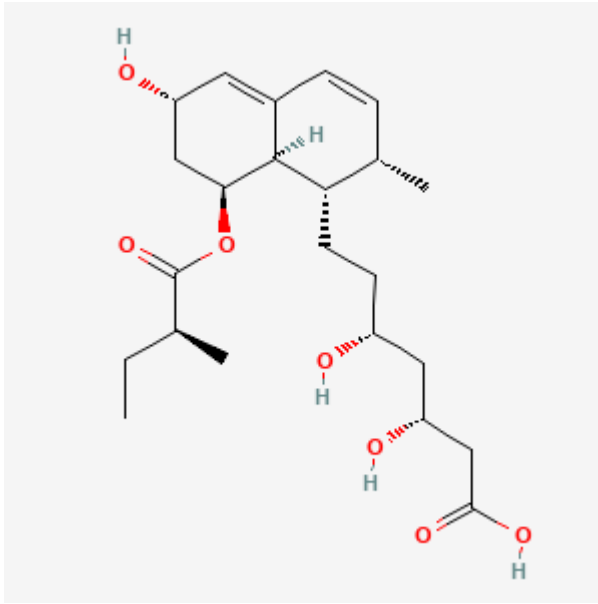
Atorvastatin, ana ilaca eşdeğer HMG-CoA redüktaz inhibisyon etkisine sahip bir metaboliti olan tek statindir (98). Plazma proteinlerine bağlanma oranı %98'den fazla olan atorvastatin, 5 mg dozda iv infüzyon ile uygulandıktan sonra ortalama dağılım hacmi 381L olarak hesaplanmıştır. Bu durum ilacın perifer dokulara yüksek oranda bağlandığını göstermektedir (95). Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) ortalama 14 saat olup, aktif metabolitler enzim inhibisyon etkisinin 20-30 saate kadar uzamasına neden olmaktadır. Bu durum ilacın gün içinde herhangi bir zaman diliminde alınabilmesine olanak sağlar. Yarı ömürleri kısa olan diğer statinler en yüksek etkiyi elde etmek için genellikle akşam uygulanmaktadır. Atorvastatin ve metabolitleri esas olarak safrayla ve daha az oranda idrarla atılmaktadır (81, 98).

Hiperlipidemi tedavisinde atorvastatin 10 ila 80 mg/gün dozda kullanılmaktadır. Başlangıç dozu günde bir defa 10 mg olup, günün herhangi bir saatinde yemeklerle birlikte veya aç karnına alınabilir (83). 16 normolipidemik bireyde 15 gün boyunca sabah veya akşam 40 mg atorvastatin uygulandıktan sonra farmakokinetik ve farmakodinamik incelemeler yapılmıştır. Atorvastatinin farmakokinetik parametrelerinin sabah ve akşam uygulamalarında farklı olduğu görülse de, serum lipid ve apolipoprotein değerlerinin benzer olduğu bulunmuştur (92). Bu durum uygulama zamanının klinik açıdan önemli olmadığını göstermektedir. Atorvastatin kullanımında yaşlı ve böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması gerekmezken, karaciğer yetmezliği olan hastalarda doz azaltımı gerekebilir. Ayrıca siklosporin, nikotinik asit, fibratlar, eritromisin veya azol antifungallerle birlikte kullanılması, miyopati ve rabdomiyoliz gibi yan etki riskini artırmaktadır (83).

Pravastatin

Pravastatin ((3R,5R)-7-[(1S,2S,6S,8S,8aR)-6-hidroksi-2-metil-8-[(2S)-2-metilbütanoil]oksi-1,2,6,7,8,8a-heksahidronaftalen-1-il]-3,5-dihidroksiheptanoik asit; $C_{23}H_{36}O_7$; MA: 424,5 g/mol) Şekil 2.5 (99) renksiz, kristalize tozudur. Su ve metanolde kolay çözünür. Kloroform, eter, aseton ve asetonitrilde çözünmez (100). Pravastatin ilk olarak köpek idrarında mevastatinin bir metaboliti olarak keşfedilmiş ve daha sonra *Streptomyces carbophilus* kullanılarak sentezlenmiştir. Tedavide kullanılan pravastatinin monosodyum tuzu olan pravastatin sodyum ($C_{23}H_{35}NaO_7$; MA: 446,52

g/mol) ise higroskopik kristalize tozudur. Pravastatin, hidronaftalin halkasının 6- pozisyonunda bir hidroksi grubu olduğu için mantar türevi diğer statinlerden (lovastatin ve simvastatin) farklıdır. Kimyasal yapısı nedeniyle hidrofilik olan pravastatinin oktanol-su partiyon katsayısı pH'ya bağlıdır. Asit yapısında olan ilacın pKa değeri 4,5 olup, pH 7,0'de 0,59'dur (101). Farmasötik form olan pravastatin sodyumun hidrat, anhidr, solvat ve ansolvat formlarda 12 farklı polimorfu (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K ve L) belirlenmiştir (102-104).



Şekil 2.5. Pravastatinin kimyasal yapısı (99).

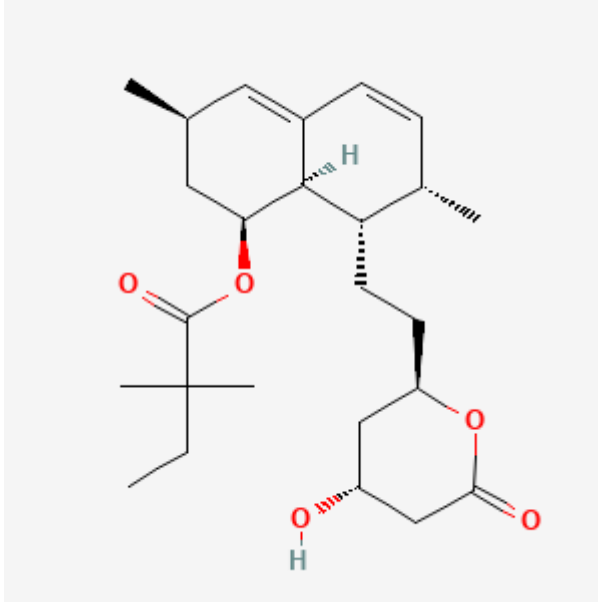
Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne göre Sınıf III'te yer alan pravastatin (105) için oral absorpsiyon %34, oral biyoyararlanım %18 civarındadır. Hidrofilik yapısı nedeniyle kan-beyin bariyeri dahil olmak üzere membranlardan permeabilitesi düşüktür. Hepatik dokulara aktif taşıma ile alınır ve hepatic ekstraksiyon oranı %47'dir. Pravastatin hepatic ve renal yollarla elimine edilir. Yapılan bir çalışmada iv ve oral pravastatin uygulamasından sonra iv dozun %41'i idrarla, %23'ü feçesle değişmemiş ilaç olarak atılırken, oral dozun %6'sı idrarla, %34'ü feçesle atılmıştır. İlacın metabolizasyonunda CYP3A enzim ailesi etkili değildir. İdrar, plazma ve feçeste tespit edilen 12 metabolitten başlıcaları 3' α -isopravastatin, 3' α ,5' β -dihidroksi-pravastatin, desasil-dehidro-pravastatin, 3''-hidroksi-pravastatin ve 6'-epipravastatin'dir (100, 101). Eliminasyon yarı ömrü 2 saat olan ilacın dağılım hacmi 35L olarak bildirilmiştir (106). Proteine bağlanma oranı %50'dir (81). Pravastatinin

OATP1B1, OATP2B1, MRP2, BSEP gibi taşıyıcıların substratı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (107).

Pravastatin hiperlipidemi ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde günlük 10, 20, 40 veya 80 mg dozlarda kullanılır. Siklosporin ile birlikte kullanımında günlük 20 mg, klaritromisin ile birlikte kullanımında günlük 40 mg doz aşılmamalıdır. Doz ayarlaması 4 hafta veya daha uzun sürede yapılmaktadır (108). Yetişkinlerde önerilen başlangıç dozu günde bir kez 40 mg, böbrek yetmezliği olan hastalarda önerilen başlangıç dozu günde bir kez 10 mg, 8-13 yaş arası çocuklarda önerilen başlangıç dozu günde bir kez 20 mg'dır ve 14-18 yaş arası gençlerde önerilen başlangıç dozu günde bir kez 40 mg'dır. Aşırı duyarlılık, aktif karaciğer hastalığı, hamilelik ve emzirme durumlarında kontrendikedir. Kas ağrısı, bulantı, kusma, üst solunum yolu enfeksiyonu, ishal ve baş ağrısı en sık bildirilen (\geq %2) yan etkilerdir (109).

Simvastatin

Simvastatin ((1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-Hidroksi-6-oksooksan-2-il]etil]-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-heksahidronaftalen-1-il 2,2-dimetilbutanoat; $C_{25}H_{38}O_5$; MA: 418,6 g/mol) Şekil 2.6 (110), *Aspergillus terreus*'un fermantasyon ürününden sentetik olarak üretilir. Bir tane stabil kristal formu vardır ve hidrat formu bulunmamaktadır (111, 112). Beyaz, kristalize ve higroskopik olmayan bir toz olup suda çözünmez. Metilen klorürde çok, etanolde serbestçe çözünür (113), (114) Yağ/su partison katsayısı pH arttıkça azalır ve pH 7,44'te 1,81 olarak verilmiştir (115).



Şekil 2.6. Simvastatinin kimyasal yapısı (110).

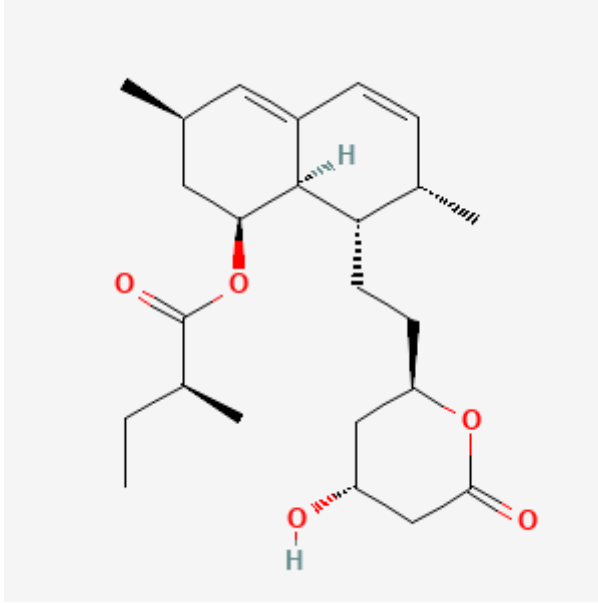
Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne göre Sınıf II'de yer alan simvastatin (111), lakton ön ilaç olarak uygulandıktan sonra vücutta enzimatik olarak hidrolize uğrar ve aktif olan asit formuna dönüşür (81). Simvastatinin yapısı aydınlatılmış metabolitleri β -hidroksi asit simvastatin, 6'- β -hidroksi simvastatin, 3''-hidroksi simvastatin, 6'-eksometilen simvastatin, 6'-formil simvastatin, 6'- β -karboksi simvastatindir. Bunlardan β -hidroksi asit simvastatin, 6'- β -hidroksi simvastatin ve 3''-hidroksi simvastatin metabolitleri için HMG-CoA redüktaz inhibitör aktiviteleri sırasıyla %100, %45 ve %22 olarak belirlenmiştir (116, 117). Simvastatinin oral absorpsiyonu %60-85 civarında olmasına rağmen, biyoyararlanımı %5'den azdır. Bunun nedeni hem CYP3A4 enzim sistemi hem de P-gp taşıyıcı proteinleri aracılığıyla bağırsak duvarında simvastatinin pre-sistemik eliminasyonudur. Metabolizasyonunda daha az oranda (%10-20) CYP2C8 enzim sistemi de rol almaktadır. Yapılan *in vivo* farmakogenetik çalışmalar simvastatin asidin OATP1B1 substratı olduğunu ve ritonavir, sakonavir gibi bazı ilaçlarla farmakokinetik etkileşiminin olduğunu göstermiştir (118, 119). Simvastatinin başlıca eliminasyon organı böbrekler olup, böbrek fonksiyonu normal olan yetişkinlerde eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 3 saattir (82). Aktif metabolit β -hidroksi asit simvastatinin yarı ömrü ise 1,9 saattir. Simvastatin asıl olarak feçesle (%60) ve daha az oranda idrarla (%13) elimine edilmektedir (117).

Total vücut klerensi 31.8 L/saat olup, proteine bağlanma oranı simvastatin ve simvastatin asit için sırasıyla %98 ve %94 olarak verilmiştir (120).

Simvastatin aktif karaciğer hastalığı olan hastalarda ve yeterli veri bulunmadığından hamile veya emziren kadınlarda kontrendikedir. Önemli ölçüde renal eliminasyona uğramadığı için, böbrek yetmezliği olan hastalarda doz modifikasyonu gerekli değildir. Simvastatin tedavisi sırasında serum karaciğer enzimleri düzenli olarak izlenmelidir. Artan miyopati ve rabdomiyoliz riski nedeniyle, nikotinic asit veya fibratlar ile birlikte uygulanması önerilmez. İmmünosupresif tedavi alan hastalarda simvastatinin başlangıç dozu günde 5 mg olup, maksimum simvastatin dozu günde 10 mg'ı geçmemelidir. Hiperkolesterolemi tedavisinde önerilen başlangıç dozu akşam tek doz olarak 5 mg veya 10 mg/gün'dür. Doz, hastanın cevabına bağlı olarak dört hafta aralıklarla akşam tek doz olarak 40 mg/gün'e kadar yükseltilebilir (116, 121).

Lovastatin

Lovastatin ((1S,3R,7S,8S,8aR)-8-(2-[(2R,4R)-4-Hidroksi-6-oksooksan-2-il]etil)-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-heksahidronaftalen-1-il (2S)-2-metilbütanoat; C₂₄H₃₆O₅; MA: 404,5 g/mol) Şekil 2.7 (122) beyaz kristalize toz olup, sudaki çözünürlüğü oda sıcaklığında 0,4 µg/mL'dir (123). Asetonda çözünür ve etanolde az çözünür (124). Oda sıcaklığında oktanol/su partiyon katsayısı 1.2x10⁴ olarak bildirilmiştir (125).



Şekil 2.7. Lovastatinin kimyasal yapısı (122).

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne göre Sınıf II ilaç olan lovastatin (126), simvastatine benzer şekilde ön ilaç olarak inaktif lakton formunda uygulanır. Vücutta aktif β -hidroksi asit formuna dönüşür (127). Oral uygulama sonrası dört saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşan lovastatinin absorpsiyonu %30 ve biyoyararlanımı %5 civarındadır. Statinlerin terapötik etki bölgesi olan hepatositlerde yer alan absorptif taşıyıcılardan OATP1B1 ve eksorptif taşıyıcılardan MDR1'in substratı olan lovastatin, aynı zamanda MDR1 için inhibitör görevi de görmektedir (118, 128). Metabolizasyonunda CYP3A4 enzim sistemi etkilidir. Eliminasyon yarı ömrü 3 saattir. Lipofilik yapıda olan ilaç %95 oranında proteinlere bağlanır. Renal atılım %10 iken, feçesle atılım %83 civarındadır (126).

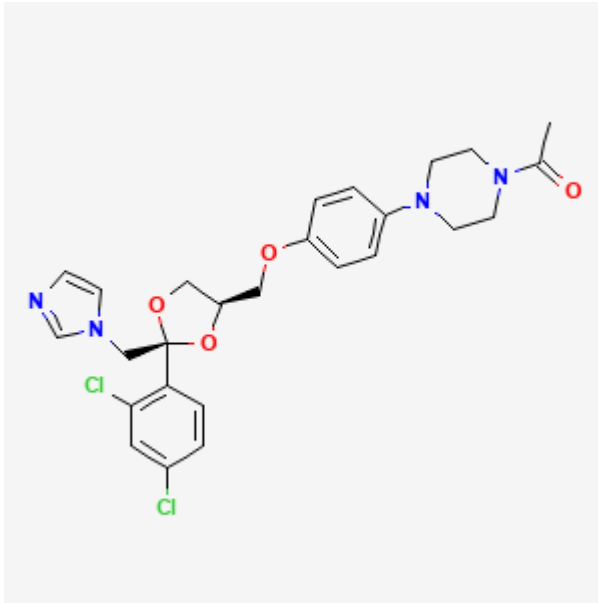
Hiperlipidemi ve koroner kalp hastalığı tedavisinde kullanılan lovastatin, aktif karaciğer hastalığı olan kişilerde kontrendikedir. Ayrıca itrakonazol, ketokonazol, eritromisin, klaritromisin gibi güçlü CYP3A4 inhibitörlerinin birlikte uygulanması ilaç-ilaç etkileşimleri açısından önerilmemektedir. Karın ağrısı, kabızlık, ishal, dispepsi, şişkinlik, bulantı gibi bilinen yan etkileri haricinde daha az sıklıkla görülen baş dönmesi, baş ağrısı, deride döküntü, kas krampları ve miyalji gibi etkiler de rapor edilmiştir. Başlangıç dozunun 20 mg/gün olacak şekilde akşam yemeği ile alınması önerilir. Doz ayarlaması en az dört hafta ara ile yapılmalı ve gerekirse sabah ve akşam

öğünleri ile birlikte tek veya bölünmüş dozlar halinde günde maksimum 80 mg olacak şekilde düzenlenmelidir (129).

2.3.2. Spesifik İnhibitörler

Ketokonazol

Ketokonazol (1-[4-[4-[(2S,4R)-2-(2,4-diklorofenil)-2-(imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioksolan-4-il]metoksi]fenil]piperazin-1-il]etanon; $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$; MA: 531.4 g/mol) Şekil 2.8 (130) beyaz toz görünümünde olup suda pratik olarak çözünmez. Diklorometanda kolay çözünür, metanolde çözünür ve etanolde az çözünür (131). 25°C'de suda çözünürlüğü 0,017 mg/mL olarak bildirilen ketokonazol zayıf bazik yapıda olup, iki farklı pKa değeri (6,51 ve 2,94) vardır (132, 133). Çözünürlüğü pH bağımlı olup, yüksek pH değerlerinde çözünürlük azalmaktadır (134).



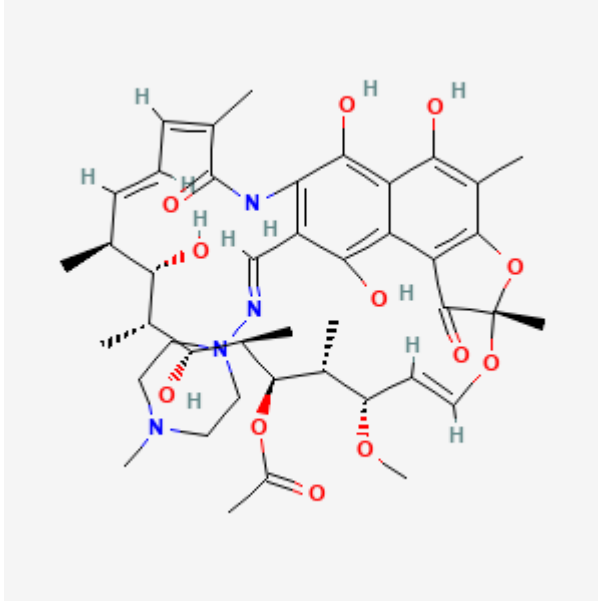
Şekil 2.8. Ketokonazolün kimyasal yapısı (130).

BSS Sınıf II'de yer alan ketokonazol, 1981 yılında FDA tarafından onaylanan ilk geniş spektrumlu antifungal ilaçtır. Sentetik imidazol türevi olup, oral ve topikal olarak uygulanmaktadır. pH bağımlı çözünürlüğü nedeniyle değişken absorpsiyon ve oral biyoyararlanım (%37-97) göstermektedir. (134, 135). Yüksek oranda proteine bağlanan (>%99) ilacın başlangıç yarılanma ömrü 2 saat, terminal yarılanma ömrü 8

saattir (132, 135). Ketokonazol oksidasyon, oksidatif O-dealkilasyon ve aromatik hidroksilasyon yoluyla geniş ölçüde metabolize edilir (136). Metabolizasyonunda CYP3A4 enziminin rol aldığı bilinmekle beraber (137), birçok çalışmada CYP3A4 enzimi ve ABCB1 taşıyıcısı üzerine inhibitör etkisi bildirilmiştir (138). Ketokonazol geri dönüşümlü bir CYP3A4 inhibitörüdür. Yarı ömrü kısa olduğu için vücutta birikmez. Tek ve tekrarlı dozlama sonrasında inhibitör etki açısından büyük bir fark gözlenmez. Ancak uzun yarılanma ömrüne sahip CYP3A4 substratları için tek doz uygulama sonrası etkileşim güvenilir bir şekilde değerlendirilemez (139). Farklı CYP substratları için farklı mekanizmaların (hidroksilasyon, oksidasyon) inhibisyonu değerlendirilmiş ve ketokonazolün inhibitör etkisinde hem yarışmalı hem de yarışmasız inhibisyonun etkin olduğu gösterilmiştir (140).

Rifampin

Rifampin CC1=CC=C(C=C1)C2=CC=CC=C2C3=CC=CC=C3C4=CC=CC=C4C5=CC=CC=C5C6=CC=CC=C6C7=CC=CC=C7C8=CC=CC=C8C9=CC=CC=C9C10=CC=CC=C10C11=CC=CC=C11C12=CC=CC=C12C13=CC=CC=C13C14=CC=CC=C14C15=CC=CC=C15C16=CC=CC=C16C17=CC=CC=C17C18=CC=CC=C18C19=CC=CC=C19C20=CC=CC=C20C21=CC=CC=C21C22=CC=CC=C22C23=CC=CC=C23C24=CC=CC=C24C25=CC=CC=C25C26=CC=CC=C26C27=CC=CC=C27C28=CC=CC=C28C29=CC=CC=C29C30=CC=CC=C30C31=CC=CC=C31C32=CC=CC=C32C33=CC=CC=C33C34=CC=CC=C34C35=CC=CC=C35C36=CC=CC=C36C37=CC=CC=C37C38=CC=CC=C38C39=CC=CC=C39C40=CC=CC=C40C41=CC=CC=C41C42=CC=CC=C42C43=CC=CC=C43C44=CC=CC=C44C45=CC=CC=C45C46=CC=CC=C46C47=CC=CC=C47C48=CC=CC=C48C49=CC=CC=C49C50=CC=CC=C50C51=CC=CC=C51C52=CC=CC=C52C53=CC=CC=C53C54=CC=CC=C54C55=CC=CC=C55C56=CC=CC=C56C57=CC=CC=C57C58=CC=CC=C58C59=CC=CC=C59C60=CC=CC=C60C61=CC=CC=C61C62=CC=CC=C62C63=CC=CC=C63C64=CC=CC=C64C65=CC=CC=C65C66=CC=CC=C66C67=CC=CC=C67C68=CC=CC=C68C69=CC=CC=C69C70=CC=CC=C70C71=CC=CC=C71C72=CC=CC=C72C73=CC=CC=C73C74=CC=CC=C74C75=CC=CC=C75C76=CC=CC=C76C77=CC=CC=C77C78=CC=CC=C78C79=CC=CC=C79C80=CC=CC=C80C81=CC=CC=C81C82=CC=CC=C82C83=CC=CC=C83C84=CC=CC=C84C85=CC=CC=C85C86=CC=CC=C86C87=CC=CC=C87C88=CC=CC=C88C89=CC=CC=C89C90=CC=CC=C90C91=CC=CC=C91C92=CC=CC=C92C93=CC=CC=C93C94=CC=CC=C94C95=CC=CC=C95C96=CC=CC=C96C97=CC=CC=C97C98=CC=CC=C98C99=CC=CC=C99C100=CC=CC=C100 [(7S,9E,11S,12R,13S,14R,15R,16R,17S,18S,19E,21Z)-2,15,17,27,29-penta hidroksi-11-metoksi-3,7,12,14,16,18,22-heptametil-26-[(E)-(4-metilpiperazin-1-il) imino metil]-6,23-diokso-8,30-dioksa-24-azatetrasiklo[23.3.1.14,7.05,28]triakonta-1(29), 2,4,9,19, 21,25,27-oktaen-13-il] asetat; C₄₃H₅₈N₄O₁₂; MA: 822,9 g/mol) Şekil 2.9 (141) kırmızı-turuncu renkte, kokusuz bir tozdur. 1 g rifampin 762 mL suda (pH<6) çözünür. Aseton, etanol ve eterde çok az çözünür; kloroform ve dimetil sülfoksitte serbestçe çözünür; etil asetat ve metanol ve tetrahidrofuran içinde çözünür. Rifampinin çözünürlüğü asidik pH'larda artmaktadır. Erime noktası 138-188 °C'dir. 4 konumundaki hidroksil grubu ve 3 konumundaki piperazin nitrojen grubuna bağlı olarak sırasıyla 1,7 ve 7,9 olmak üzere iki farklı pKa değerine sahiptir. Sudaki %1'lik süspansiyonunun pH değeri 4,5 ila 6,5 arasındadır (142).

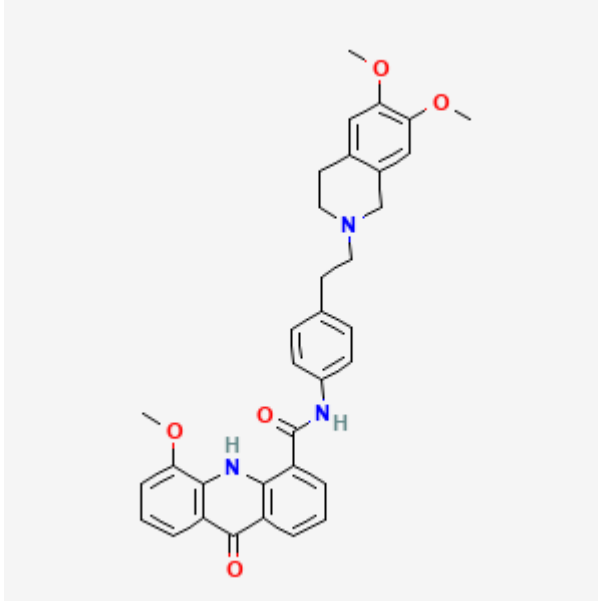


Şekil 2.9. Rifampinin kimyasal yapısı (141).

Rifampin (rifampisin) ilk kez 1968’de klinik kullanıma sunulan geniş spektrumlu antimikrobiyal ajandır. RNA'nın uzamasını engelleyerek bakteriyel RNA polimerazı inhibe eder. Asıl olarak tüberküloz tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, metisiline duyarlı ve metisiline dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Tüberküloz tedavisinde yetişkinlerde oral olarak 450-600 mg/gün dozda kullanılmaktadır (143, 144). 600 mg uygulamadan sonra C_{maks} 8-20mg/L ve t_{maks} 1,5-2,0 saat olarak belirlenmiştir. Oral biyoyararlanım %68 civarında olup, yarılanma ömrü 2-5 saat arasındadır. Rifampinin başlıca metabolizasyon yolları deasetilasyon ve hidrolizdir. Uygulanan dozun % 13-24 kadarı idrarla değişmemiş ilaç olarak atılır. Rifampinin metabolizasyonunda CYP enzim sistemi etkili olmamasına rağmen, ilacın özellikle CYP3A enzimleri üzerinde indüktif etkisi olması nedeniyle birçok ilacın farmakokinetiğini etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda rifampinin CYP1A2, CYP2C, CYP2D6 enzimleri ve P-gp taşıyıcı proteini üzerine de indükleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (145, 146). Ayrıca rifampinin OATP taşıyıcıları (özellikle OATP1B1, OATP1B3) üzerine inhibitör etkisinin olduğu bildirilmiştir. Selatogrel, bosentan, milveksian, klazosentan gibi OATP substratı ilaçlarla yapılan klinik çalışmalarda inhibitör etki gösterilmiş ve FDA tarafından da onaylanmıştır (147-151).

Elakridar

Elakridar (N-[4-[2-(6,7-dimetoksi-3,4-dihidro-1H-isokinolin-2-il)etil]fenil]-5-metoksi-9-okso-10H-akridin-4-karboksamid; $C_{34}H_{33}N_3O_5$; MA: 563,6 g/mol) Şekil 2.10 (152) suda çözünmeyen aşırı lipofilik ($\log P = 5,67$) bir katıdır (153). DMSO içinde çözünürlüğü 2 mg/mL olarak verilmiştir (154).



Şekil 2.10. Elakridarın kimyasal yapısı (152).

Elakridar 1990'lı yıllarda çoklu ilaç direnci gösteren kanserlerin tedavisi için geliştirilmiş üçüncü nesil P-gp inhibitörüdür. Sonraki yıllarda BCRP inhibitörü olduğu da bildirilmiştir. Preklinik çalışmalarda beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılan ve P-gp substratı olan ilaçların merkezi sinir sistemine taşınımını artırdığı gösterilmiştir (155). P-gp ve BCRP inhibitörü olarak paklitaksel, topotekan, imatinib, gefitinib gibi birçok ilaçla etkileşimi bildirilmiştir (156-158). Bu taşıyıcıların ikili inhibitörü olarak elakridar, hayvan deneylerinde substrat olan ilaçların oral biyoyararlanım ve beyin dağılımını artırmıştır. Aynı zamanda çoklu ilaç direnci gösteren tümörlerin tedavisi için klinik çalışmalarda da güvenle kullanılmıştır (159). Ancak lipofilik özelliğe sahip olduğu ve sulu çözeltilerde çözünmediği için formülasyon geliştirme ve ilaç uygulaması gibi konularda sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle preklinik çalışmalarda plazma ve doku konsantrasyonlarında, klinik çalışmalarda ise oral uygulama sonrası denekler arasında değişkenlik bulunmuştur (160).

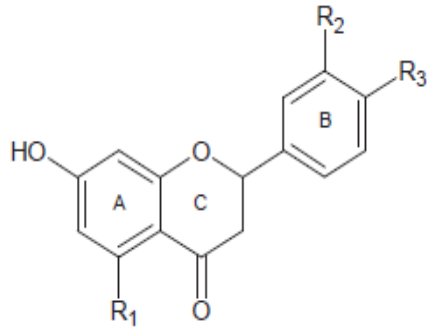
2.4. Greyfurt-Greyfurt Suyu Bileşimi

Greyfurt meyvesi *Rutaceae* (Sedef otugiller) familyasına ait tropikal bir narenciye olup, ağaçta salkımlar halinde yetişmektedir. En popüler çeşitleri kırmızı, beyaz ve pembedir (161). Dünyada en çok tüketilen turunçgillerden bir tanesi olan greyfurt meyvesi C vitamini, diyet lifi, şeker ve minerallerce zengindir. Ayrıca iyi bir organik asit ve fenolik bileşik kaynağıdır. İçeriğindeki bileşenler ve konsantrasyonları, meyvenin ve meyve suyunun tat özelliklerini ve kalitesini belirlemektedir. Greyfurt meyvesinde bulunan temel organik asitler sitrik ve maleik asitler olup, şeker olarak yüksek oranda sükröz içermektedir (162). Fenolik bileşikler ise antioksidan, antienflamatuvar, antikanser ve nöroprotektif etkileri ile bilinen ve çok ilgi gören madde grubudur (163). Greyfurt suyu içerisinde bulunan bu bileşenler birlikte kullanıldıklarında çok sayıda ilacın intestinal metabolizasyonu ve/veya transportunu etkilemektedir. Furanokumarinler ve flavonoidler olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadırlar. Söz konusu bileşenlerin greyfurt suyu içindeki konsantrasyonları üretim prosedürü, saklama koşulları, meyvenin kaynağı ve olgunluğu gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Aktif bileşenlerin miktarı greyfurt suyu-ilaç etkileşiminin mekanizması, geri dönüştürülebilirliği ve klinik verilerle karşılaştırma yapabilmek açısından önemlidir (164).

2.4.1. Flavonoidler

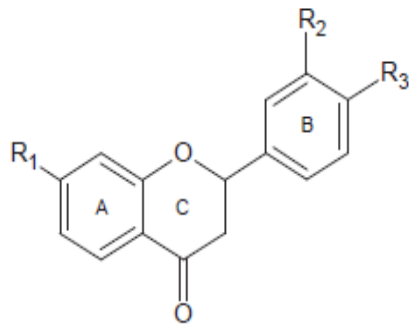
Flavonoidler altı alt grupta (flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, antosiyaninler ve flavanlar) sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.11). Flavanonlar narenciye meyvelerinde bol miktarda bulunan ve tipik lezzetini veren bileşenlerdir. Glikozid veya aglikon formlarında bulunurlar (165). Üç halka yapısı içeren flavonoid çekirdeğine şeker molekülleri bağlı ise glikozid, şeker yoksa aglikon olarak isimlendirilirler (166). Flavonoidler yapısal olarak ATP'ye benzemektedir. Bu nedenle çeşitli enzimatik bölgelere bağlanmak için ATP ile rekabet ederek farklı biyolojik etkilerden sorumlu olabilecekleri düşünülmektedir (167). Greyfurt suyu içinde 200-2000 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonda bulunduğu rapor edilen naringin, en fazla miktarda bulunan flavanoid sınıfı bileşendir. Aynı zamanda greyfurt suyunda acı tadı oluşturan ana bileşenlerden olup, sitokrom P450 enzim sisteminin inhibitörüdür. Naringenin bağırsaklarda naringenin hidrolizi ile oluşan aglikon formundadır (168, 169). Yapılan

çalışmalarda narirutin, hesperidin, neohesperidin, kuersetin, tangeretin, nobiletin, kemferol gibi birçok flavonoid grubu bileşen greyfurt suyundan tayin edilmiştir (170). Bu maddelerden tangeretin ve nobiletin oral uygulandıktan sonra benzopiren hidroksilaz ve bazı sitokrom P450 enzim sistemlerinin aktivitesini artırırken, naringin (kapsül formunda) ve kuersetin tek başlarına uygulandıklarında CYP3A4 üzerine belirgin bir inhibitör etki göstermemişlerdir (171).



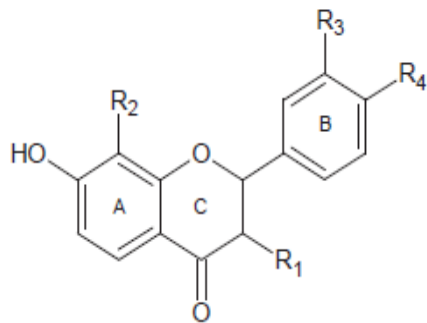
Flavon Aglikon

Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃
Naringenin	OH	H	OH



Flavanon o-glikozid

Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃
Narirutin	O-Ru	H	OH
Naringin	O-Nh	H	OH
Hesperidin	O-Ru	OH	O-CH ₃
Neohesperidin	O-Nh	OH	O-CH ₃
Didimin	O-Ru	H	O-CH ₃
Ponşirin	O-Nh	H	O-CH ₃



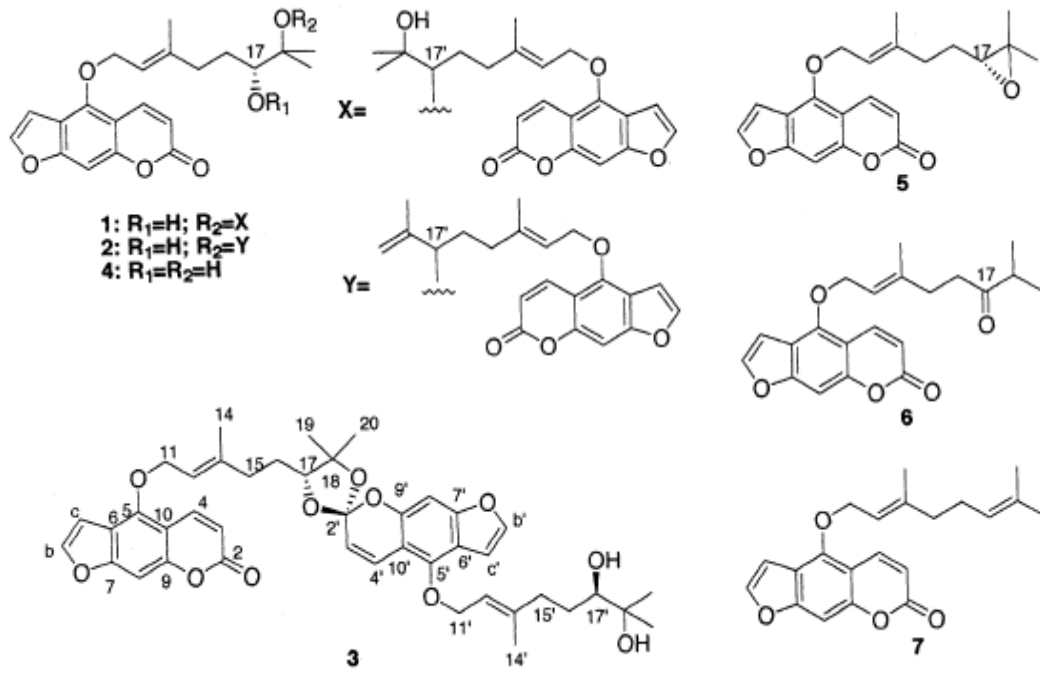
Flavonol Aglikon

Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Kuersetin	OH	H	OH	OH

şekil 2.11. Greyfurt suyu içinde bulunan bazı flavonoidlerin kimyasal yapıları (165).

2.4.2. Furanokumarinler

Furanokumarinler farklı bir kimyasal sınıf olup, üç halkalı bir baş ve alifatik kuyruk taşırlar. Furan halka kısmı sitokrom apoproteinine geri dönüşümsüz bağlanarak enzimatik aktiviteyi ortadan kaldıran reaktif bir ara ürün üretiminde önemli bir role sahiptir. Furanokumarinlerden bergamottin ve dihidroksibergamottin için bildirilen greyfurt suyundaki konsantrasyon aralıkları sırasıyla 1-37 μM ve 0,2-52,5 μM 'dir (169). Greyfurt suyunda en fazla miktarda bulunan iki furanokumarin türevinden dihidroksibergamottinin sudaki çözünürlüğü, yapısındaki hidroksil gruplarından dolayı bergamottine göre 1000 kat daha fazladır. Her iki bileşenin CYP3A4 inhibitör etkisinin mekanizma temelli ve geri dönüşümlü olduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir (172, 173). Furanokumarin türevleri kimyasal yapı olarak monomer, dimer ve trimer olmak üzere 3 grupta toplanırlar. Monomerler 7,8-pozisyonundan kumarin bağlı bir furan halkasına 6,7-pozisyonundan lineer bağlanmış başka bir furan halkası taşırlar. Bu yapıya 5 ve/veya 8 pozisyonunda metoksi, preniloksi veya geraniloksi yan zincirleri süstitüe edilmiştir. Dimerler ise iki lineer furanokumarin monomerinin yan zincirleri arasında eter bağı oluşumu veya bir monomerin diğerinin piron halkasına bağlanmasıyla oluşurlar (174). 2006 yılında yapılan bir çalışmada furanokumarinlerin CYP3A4 enzim sistemi üzerindeki inhibitör etkilerinin yapısal olarak değerlendirilmesi amacıyla kimyasal analogları sentezlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre yapıya 6,7-konumlarından hidrofilik gruplarla geraniloksi zincirlerinin bağlanması inhibitör etkiyi artırmaktadır. Bu sayede furanokumarinler CYP3A4 enzim sisteminde hem lipofilik hem hidrofilik bölgelerle etkileşime girmektedirler (175). Greyfurt suyu içerisinde yer alan bazı furanokumarinlerin kimyasal yapısı Şekil 2.12'de verilmektedir (176). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda greyfurt suyu furanokumarinlerinin antienflamatuvar, antioksidatif ve antikanser etkilerinin yanı sıra kemik sağlığını iyileştirdiği gösterilmiştir (163). Ayrıca 2000'li yıllardan bu yana bazı ülkelerde cilt hastalıklarının tedavisinde klinikte kullanılmaktadır (177).



Şekil 2.12. Greyfurt suyu içinde bulunan bazı furanokumarin türevleri (1: Paradisin A, 2: Paradisin B, 3: Paradisin C, 4: 17,18-dihidroksibergamottin, 5: 17-epoksibergamottin, 6: 17-ketobergamottin, 7: Bergamottin) (176).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Asetonitril	Sigma-Aldrich / Almanya
Atorvastatin	Nobel / Türkiye
Dekstroz	Sigma-Aldrich / Almanya
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Origen Lab / İspanya
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 4.5 g/L glikoz, stabil glutamin	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
Elakridar	Merck / Almanya
Fetal sığır serumu (FBS)	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
Hank's Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS), 0.35 g/L NaHCO ₃	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
HEPES	Sigma-Aldrich / Almanya
Kalsiyum klorür	Sigma-Aldrich / Almanya
Ketokonazol	Merck / Almanya
Lovastatin	Sigma-Aldrich / Almanya
Magnezyum klorür	Sigma-Aldrich / Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich / Almanya
Naringin	Sigma-Aldrich / Almanya
Orto-fosforik asit	Merck / Almanya
Penisilin / Streptomisin	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich / Almanya
Pravastatin	Deva Holding / Türkiye
Rifampin	Merck / Almanya
Simvastatin	Nobel İlaç / Türkiye
Sodyum dihidrojen fosfat	Sigma-Aldrich / Almanya
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich / Almanya
Thiazolil mavisi tetrazolyum bromür (MTT)	Applichem GmbH / Almanya
Tripsin-EDTA çözeltisi	Cegrogen Biotech GmbH / Almanya

3.1.2. HPLC Gereçleri

Dedektör (Thermo Finnigan Surveyor DAD)	Thermo Fisher Scientific / U.S.
Kolon (CNW, C18 250 x 4.6 mm, 5 µm)	ANPEL Laboratory Technologies / Çin
Vakumlu Pompa (Thermo Finnigan Surveyor)	Thermo Fisher Scientific / U.S.

3.1.3. Perfüzyon Gereçleri

Peristaltik Pompa	Gilson / Fransa
Tubingler	Gilson / Fransa

3.1.4. Aletler

Derin Dondurucu (-20 °C)	İlShin Lab. Co. Ltd. / Amerika
Floresans Mikroskop	Leica / Almanya
Hassas Terazı	Sartorius / Almanya
Hemasiyometre	Marienfeld Haemacytometer Laboratory
Hücre Kültürü İnkübatörü	Glassware/Almanya
Laminar Akış Kabini (Sınıf 2B)	Sanyo / Japonya
Mikropipet (10-100 µL, 100-1000 µL)	Faster / İtalya
Mikroplaka okuyucu	Brand / Almanya
Otoklav	Molecular Devices / ABD
pH Metre	Sanyo / Japonya
Santrifüj	Ohaus / Amerika
Ultrasonik Banyo	Hermle / Almanya
Vorteks	Kudos / Hindistan
Yatay Çalkalayıcılı Su Banyosu	IKA / Almanya
	Memmert / Almanya

3.1.5. Deney Hayvanı

Sprague-Dawley Dişi Sıçan	İnönü Üniversitesi/ Türkiye
---------------------------	-----------------------------

3.2. Yöntem

3.2.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Model ilaçların miktar tayinlerinin gerçekleştirilmesi için analitik yöntem olarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) seçilmiştir. HPLC analizinde foto diyot array (PDA) dedektörüne sahip Thermo Finnigan Surveyor HPLC sistemi kullanılmıştır. Etkin maddeler için kullanılan analitik yöntem koşulları Tablo 3.1’de verilmiştir. Geliştirilen miktar tayini yöntemleri hem hücre kültürü hem de intestinal perfüzyon çalışmalarından elde edilecek örneklerin analizinde kullanılacağı için biyoanalitik yöntem validasyon kriterlerine göre değerlendirme yapılmıştır. Bu amaçla etkin madde ve/veya inhibitör içermeyen perfüzyon çözeltisi sıçan bağırsağından geçirilmiş ve içerisine uygun konsantrasyonda model ilaçlar spike edilerek ve mobil faz ile uygun seyreltmeler yaparak validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. Model ilaçların tayini için kullanılan HPLC yöntemleri.

	Atorvastatin	Simvastatin	Lovastatin	Pravastatin
Sabit Faz	C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm	C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm	C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm	C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm
Mobil Faz	Asetonitril:0,05 M NaH ₂ PO ₄ (60:40)	Asetonitril:Su (pH:3.0) (90:10)	Asetonitril:Su (pH:3.0) (90:10)0	Asetonitril:0,05 M KH ₂ PO ₄ (45:55)
Akış Hızı	1 mL/dk	1 mL/dk	1 mL/dk	1 mL/dk
Dalga Boyu	245 nm	235 nm	235 nm	235 nm

Biyoanalitik yöntem validasyonu, yöntemin kabul edilebilirliğini ve analitik sonuçların güvenilirliğini sağlamak için gereklidir. Biyoanalitik yöntem, biyolojik örneklerdeki analit konsantrasyonlarını belirlemek için kullanılır. Klinikte ve uygulanabilen klinik dışı çalışmalarda analit miktarının belirlenmesi için kullanılan biyoanalitik yöntemin tam validasyonu gerçekleştirilmelidir. Bu tez çalışması

kapsamında geliştirilen analitik yöntemlerin validasyonu, International Conference on Harmonization kılavuzuna (ICH-M10) göre aşağıdaki parametreler incelenerek gerçekleştirilmiştir (178).

Seçicilik (*Selectivity*)

Analitik yöntemin, boş biyolojik matriksteki potansiyel girişim yapan maddelerin varlığında tayini yapılacak madde veya maddeleri ayırt etme ve ölçme yeteneğidir. En az 6 farklı kaynaktan elde edilen boş matriks numuneleri kullanılarak değerlendirilmektedir (178). Bu amaçla;

- Hücre kültürü çalışmaları için farklı gruplarda etkin madde ve/veya inhibitör madde içermeyen boş HBSS ortamı kullanılmıştır.
- Bağırsak perfüzyon çalışmaları için farklı sıçanlarda ileumun HEPES tamponu ile perfüzyonundan elde edilen numuneler kullanılmıştır.

Boş matrikslerde model ilaçların (atorvastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin) alıkonma zamanlarında, potansiyel girişim yapan maddelere ait hiçbir anlamlı yanıtın olmadığı gösterilmiştir.

Özgüllük (*Specificity*)

Analitik yöntemin analizi yapılacak madde veya maddeleri, diğer maddelerden (ör. analite yapısal olarak benzeyen maddeler, metabolitler, izomerler, safsızlıklar, numune hazırlama sırasında oluşan bozunma ürünleri veya eşlik eden diğer maddeler) ayırt etme ve tespit etme yeteneğidir (178).

Farklı çalışmalardan elde edilen numunelerdeki model ilaçların miktarını tayin etmek amacıyla kullanılan analitik yöntemlerin sadece etkin maddelere ait olduğunu göstermek amacıyla hücre kültürü ve bağırsak perfüzyonu ortamlarının etkin madde ile girişim yapıp yapmadığı HPLC kromatogramları incelenerek değerlendirilmiştir. Bu amaçla naringin ve ketoprofen içeren matriks numunelerinin 245 mn'de atorvastatinin alıkonma zamanında (~8.4 dk) pik vererek girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir. Naringin ve rifampin içeren matriks numunelerinin 235 mn'de pravastatinin alıkonma zamanında (~5.1 dk) pik vererek girişim yapıp yapmadığı

incelenmiştir. Naringin ve elakridar içeren matriks numunelerinin 235 nm’de lovastatinin alıkonma zamanında (~6.6 dk) pik vererek girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir. Naringin ve elakridar içeren matriks numunelerinin 235 nm’de simvastatinin alıkonma zamanında (~6.2 dk) pik vererek girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir. İlgili biyolojik matrikslerde model ilaçların (atorvastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin) kullanılan diğer maddelerle (naringin, ketokonazol, rifampin, elakridar) farklı alıkonma zamanlarında yanıt oluşturduğu gösterilmiştir.

Doğrusallık (*Linearity*)

Kalibrasyon eğrisi, analit konsantrasyonu ile kullanılan yöntemin analite yanıtı arasındaki ilişkiyi gösterir. Matrikse bilinen miktarda analit(ler) eklenmesiyle hazırlanan kalibrasyon standartları, kalibrasyon aralığını kapsar ve kalibrasyon eğrisini oluşturur. Kalibrasyon standartları çalışma örnekleriyle aynı biyolojik matriks içerisinde hazırlanmaktadır. Kalibrasyon standartları en az 6 farklı konsantrasyonda hazırlanarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmaktadır. Konsantrasyon-yanıt ilişkisini iyi tanımlayan doğrusal bir regresyon modeli kullanılmaktadır. Her kalibrasyon standardı tekrarlı olarak analiz edilmektedir ve kabul edilebilir tüm tekrarlardan elde edilen veriler regresyon analizinde kullanılmaktadır (178).

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla çalışmada kullanılan etkin maddeler (atorvastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin) için hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak kalibrasyon standartları hazırlanmıştır (Tablo 3.2). Bu standart çözeltilerin analizi sonucu elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiş ve bilinen konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak kalibrasyon doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (R^2) belirlenmiştir. Determinasyon katsayısının 1’e yakın olmasına göre değerlendirme yapılmıştır.

Tablo 3.2. Etkin maddeler için hazırlanan stok ve standart çözeltilerin konsantrasyonları.

	Atorvastatin	Simvastatin	Lovastatin	Pravastatin
Stok Çözelti (µg/mL)	100	100	100	100
Kalibrasyon Standartları (µg/mL)	2, 4, 8, 16, 32, 64	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64	1, 2, 4, 8, 16, 32	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64

Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan kalite kontrol çözeltileri, biyolojik çalışma numunelerine benzetilmektedir. Bu amaçla matrikse bilinen miktarda analit eklenerek çalışma örnekleri ile aynı koşullar altında saklanarak analiz edilir. Hazırlanan kalite kontrol çözeltileri, kalibrasyon eğrisi aralığında düşük, orta ve yüksek olmak üzere en az 3 konsantrasyon seviyesinde hazırlanmalıdır. Her konsantrasyon seviyesindeki doğruluk, gerçek konsantrasyonun $\pm\%15$ 'i içinde olmalıdır (178).

Doğruluk çalışmalarında her etkin madde için kullanılan kalibrasyon standartlarından düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 konsantrasyon noktası belirlenmiş (Tablo 3.3) ve 6 tekrarlı çalışılmıştır.

Analitik yöntemin doğruluğu ortalama bağıl hata (%OBH) olarak ifade edilmiştir (Eşitlik 3.1):

$$\%OBH = \frac{A - B}{B} \times 100 \quad (3.1)$$

A: Tayin edilen konsantrasyon

B: Gerçek konsantrasyon

Kesinlik (*Precision*)

Kesinlik çalışmalarında matrikse bilinen miktarda analit eklenerek çalışma örnekleri ile aynı koşullar altında saklanarak analiz edilir. Hazırlanan kalite kontrol çözeltileri, kalibrasyon eğrisi aralığında düşük, orta ve yüksek olmak üzere en az 3 konsantrasyon seviyesinde hazırlanmalıdır. Kesinlik, her bir çalışma içindeki (gün içi-tekrarlanabilirlik) ve farklı çalışmalardaki (günler arası-tekrar elde edilebilirlik) kalite kontrol çözeltilerinin analiz edilmesiyle belirlenmektedir. Doğruluk ve kesinlik aynı çalışmalar ve veriler kullanılarak değerlendirilmektedir. Gün içi kesinlik çalışılan her konsantrasyon seviyesinde en az 5 tekrar gerektirirken, günler arası kesinlik en az iki gün boyunca çalışılan her konsantrasyon seviyesinde en az 3 tekrar gerektirmektedir. Her seviyede belirlenen konsantrasyonların kesinliği (%VK) %15'i geçmemelidir (178).

Kesinlik çalışmalarında her etkin madde için kullanılan kalibrasyon standartlarından düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 konsantrasyon noktası belirlenmiş (Tablo 3.3) ve 6 tekrarlı çalışılmıştır.

Analitik yöntemin kesinliğini göstermek için ortalama değer bulunarak standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) değerleri tayin edilmiştir.

Tablo 3.3. Doğruluk ve kesinlik çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlar.

Düzye	Çalışılan Madde Konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	Atorvastatin	Pravastatin	Lovastatin	Simvastatin
Düşük	4	2	2	2
Orta	16	8	8	8
Yüksek	64	32	32	32

Duyarlılık (*Sensitivity*)

Analitik yöntemin güvenle tespit edebildiği en küçük konsantrasyon değeri LOD (*limit of detection*) ve kantitatif olarak ölçebildiği en küçük konsantrasyon değeri LOQ (*limit of quantification*) olarak ifade edilir. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden birisi olan sinyal-gürültü oranının belirlenmesi yöntemi,

bilinen düşük madde konsantrasyonlarına sahip çözeltilerden ölçülen sinyallerin boş çözeltilerle veya uygun bir taban çizgisi (*baseline*) bölgesindeki sinyallerle karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilir. Sinyal/gürültü oranı 3:1 olan konsantrasyon LOD, 10:1 olan konsantrasyon ise LOQ olarak belirlenmiş ve sırasıyla Eşitlik 3.2 ve Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır (179).

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S} \quad (3.2)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (3.3)$$

σ : Yanıtın standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Stabilite (*Stability*)

Numune hazırlama ve analiz sırasında yapılan her işlemin yanı sıra, numunelerin saklama koşullarının da analit konsantrasyonunu etkilemediğini göstermek için stabilite çalışması yapılmaktadır. Bu amaçla biyolojik matriks içindeki analitin stabilitesi kısa süreli, uzun süreli ve dondurma-çözme işlemi ile gösterilmesi gerekmektedir. Her konsantrasyon seviyesinde hesaplanan değer, gerçek konsantrasyonun $\pm\%15$ 'i içinde olmalıdır (178).

Stabilite çalışmaları için; biyolojik matriks (HEPES tamponu) içerisine her etkin maddeden 2 farklı konsantrasyonda (doğruluk ve kesinlik çalışmalarında kullanılan düşük ve yüksek konsantrasyon değerleri) eklenerek standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler hazırlandıktan hemen sonra ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurma-çözme işlemi uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra analiz edilerek hesaplanan konsantrasyon değerleri karşılaştırılmıştır.

3.2.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüğünü Tayin Etmek Amacıyla Yapılan Çalışmalar

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BSS) kapsamında etkin maddelerin çözünürlük sınıflarının belirlenmesinde kullanılan denge çözünürlük çalışmalarının tasarımı ve yürütülmesi ile ilgili hususlar Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO)'nün 2019 yılında yayınladığı rapor ile açıklanmıştır. Buna göre etkin maddenin yüksek çözünürlük göstermesi için en yüksek terapötik dozun pH 1.2 ila 6.8 arasında (37 ± 1 °C) 250 mL veya daha az sulu ortamda çözünmesi gerekmektedir. Ölçümlerin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 olmak üzere en az 3 farklı tampon ortamında en az 3 tekrarlı olarak yapılması önerilmektedir. Optimize edilmiş bir çalkalama hızıyla numunelerin genellikle 24 saat içinde dengeye ulaşması beklenir ve dengeye ulaşıncaya kadar çeşitli zaman noktalarında örnekler toplanır. Belirli veri tabanlarından edinilen çözünürlük bilgilerine göre, yaklaşık %30-40 fazla çözünmemiş madde kalacak şekilde tüplere maddeler tartılır ve üzerlerine 5 mL tampon eklenir. Çözünürlük öngörülenden fazla veya madde miktarı yetersizse hacim 3 mL'ye düşürülebilir (180).

- Çözünürlük çalışmalarında kullanılan ortamların hazırlanışı:

Çözünürlük çalışmalarında kullanılan tampon ortamları Amerikan Farmakopesi'ne göre ve fazlası üzerinden 500 mL hazırlanmıştır. Bu amaçla 200 mL'ye göre verilen miktarlar 500 mL'ye göre hesaplanmıştır.

pH 1.2 hidroklorik asit tamponu: 125 mL 0.2 M potasyum klorür çözeltisi (3.73 g KCl 250 mL suda çözündürülerek hazırlanmıştır) ve 212.5 mL 0.2 M hidroklorik asit çözeltisi (4.17 mL %37 HCl çözeltisi 250 mL'ye seyreltilerek hazırlanmıştır) karıştırılarak 500 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

pH 4.5 asetat tamponu: 1.495 g sodyum asetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ve 7 mL 2 N asetik asit çözeltisi karıştırılarak 500 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

pH 6.8 fosfat tamponu: 125 mL monobazik potasyum fosfat çözeltisi (6.81 g KH_2PO_4 250 mL suda çözündürülerek hazırlanmıştır) ve 56 mL 0.2 M sodyum hidroksit çözeltisi (0.8 g NaOH 100 mL suda çözündürülerek hazırlanmıştır) karıştırılarak 500 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

-

- Çözünürlük çalışmaları:

Denge çözünürlük deneyleri çalkalamalı su banyosu (37 °C) içerisinde ve 100 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan model ilaçlardan atorvastatin, simvastatin ve lovastatin BSS'ne göre Sınıf II ilaçlar olup düşük çözünürlüğe sahipken, pravastatin Sınıf III'te yer alır ve çözünürlüğü yüksektir. Deney süresi sonunda viallerde çözünmemiş katı madde kalmasını sağlamak için ve atorvastatin, simvastatin ve lovastatinin çözünürlük değeri 0.1 mg/mL'den küçük olduğu için her 3 model ilaçtan cam viallere 10 mg madde tartılarak üzerlerine 3 mL tampon çözeltilerden eklenmiştir. Pravastatinin çözünürlüğü yüksek olduğu için 100 mg madde üzerine 3 mL tampon çözeltilerden eklenmiştir. Bu amaçla ilgili kılavuzda bildirilen pH 1.2 HCl, 4.5 asetat ve 6.8 fosfat tamponları olmak üzere 3 farklı tamponda 3 tekrarlı çalışılmıştır. Her zaman noktası için ayrı vial kullanılmıştır. Örnekler 6, 12, 24, 48 ve 72. saatlerde toplanarak analiz edilinceye kadar -20 °C' de dondurularak saklanmıştır. HPLC ile gerçekleştirilecek olan miktar tayini öncesinde örnekler çözündürülerek şırınga ucu filtreden süzülmüştür. Ardından mobil faz ile uygun seyreltmeler yapılarak analiz gerçekleştirilmiştir.

Model ilaçların çözünürlük değeri, yapılan analizler sonucu oluşturulan çözünürlük-zaman grafiğinde eğrinin sabitlendiği nokta olarak bildirilmiştir. Çözünürlük değerlerinin düşük veya yüksek olma durumu kılavuzda bildirilen DSV (The *dose:solubility volume*, doz:çözünürlük hacmi) hesabına göre yapılmıştır. DSV, etkin maddenin çözünürlüğünün en düşük olduğu pH'da en yüksek terapötik dozun tamamen çözünmesi için gerekli sıvı hacmini ifade etmektedir ve mg/mL cinsinden hesaplanmaktadır. Bir etkin maddenin DSV değerinin pH 1.2-6.8 aralığında 250 mL'den küçük olması, yüksek çözünürlük gösterdiği anlamına gelmektedir. Buna göre model ilaçların DSV değerleri hesaplanmış ve çözünürlük değerlendirmesi yapılmıştır.

3.2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücrelerin Ekilmesi ve Çoğaltılması

Hücre kültürü çalışmaları ile model ilaçların (atorvastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin) permeabilitesini tayin etmek amacıyla bağırsak epitel

hücrelerine hem morfoloji hem de fonksiyon açısından oldukça benzerlik gösteren kolon adenokarsinom (Caco-2) hücre hattı kullanılmıştır. Caco-2 hücreleri kullanıma kadar -180°C azot tankında muhafaza edilmiştir. Çalışmalarda kullanılacak olan kültür ortamı (% 10 fetal sıgır serumu (FBS), 50 ünite/mL penisilin ve 50 µg/mL streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)) taze olarak hazırlanmıştır. Dondurulmuş Caco-2 içeren vial, 37°C su banyosunda sıvılaşına kadar bekletilmiş ve hücreler laminar akış kabini içerisinde kültür ortamı bulunan tüpe eklenmiştir. 1000 rpm'de 3 dk süreyle santrifüj edildikten sonra dibe çöken hücreler taze kültür ortamında resüspande edilerek 25 cm² hücre kültür kaplarına (T-flask) aktarılmıştır. Hücreler 37 °C'de nemli hava %5 CO₂ içeren atmosferde % 80-90 konfluent hale gelene kadar inkübe edilmiştir.

Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Canlılık tayini için Metil Tiazol Tetrazolyum Bromür (MTT) testi yapılmıştır. Etkin maddeleri farklı konsantrasyonlarda içeren çözeltiler (Tablo 3.4) 96-kuyucuklu plaklar içindeki hücrelere uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Etkin maddelerin konsantrasyonları belirlenirken farklı çalışmalarda kullanılan konsantrasyon değerleri göz önünde bulundurulmuştur (181-183). 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda kuyucuklara 25 µL MTT ilave edilmiştir (PBS içinde, 5 mg/mL). Dört saat inkübasyonu takiben besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 200 µL DMSO ilave edilerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklardaki çözeltilerin absorbanları mikropłaka okuyucuda (VERSAmax Microplate Reader, Molecular Devices) 570 nm'de okunmuştur. Boş kültür ortamında büyütülen hücreler, diğer tüm numuneler için kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol grubundaki büyümenin %100 olduğu göz önüne alınarak hücrelerin canlılığı hesaplanmıştır.

Tablo 3.4. Hücre canlılığı testinde kullanılan etkin madde konsantrasyonları.

Atorvastatin ($\mu\text{g/mL}$)	Lovastatin ($\mu\text{g/mL}$)	Simvastatin ($\mu\text{g/mL}$)	Pravastatin ($\mu\text{g/mL}$)
2	1	0.05	0.05
20	5	0.5	0.5
40	10	1	1
100	50	5	5
200	100	50	50

Hücrelerin Pasajlanması ve Permeabilite Deneyleri

Kültür kaplarındaki ortam uzaklaştırılarak pH 7,4 fosfatla tamponlanmış salin (*Phosphate buffered saline*; PBS) ile iki kez yıkanmıştır. Flasklara %0,025 tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 15 dk süreyle inkübatörde bekletildikten sonra besleme ortamı içeren tüpe eklenmiştir. 2000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendikten sonra üzerindeki ortam atılarak taze ortamda hücreler süspande edilmiştir. Hücre süspansiyonu 1:2 oranında pasajlanarak yeni kültür kaplarına alınmış ve inkübatörde çoğaltılmıştır.

Uygun pasaj sayısındaki (20-40) hücreler tripan mavisi dışlama yöntemi ile sayıldıktan sonra 12 kuyucuklu insertlere (0,4 μm) 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Apikal tarafa 0,5 mL ve bazolateral tarafa 1,5 mL büyüme ortamı eklenmiştir. Plaklar 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edilerek kültür ortamı (DMEM) gün aşırı değiştirilmiştir. 21 gün sonunda hücrelerin transepitel elektrik rezistansı (TEER) Milicell-ERS volt-ohmmetre ile ölçülmüştür. TEER değeri 600-1000 ohms·cm²'ye ulaşan hücreler ile permeabilite çalışmaları yapılmıştır. Uygun TEER değerine sahip olan hücreler, büyüme ortamı uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmıştır. Ardından transport ortamı (25 mM D-glikoz ve 10 mM HEPES içeren HBSS) eklenerek plaklar 37 °C'de % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından ortam tamamen uzaklaştırılmıştır. Belirtilen konsantrasyonlarda maddeleri içeren çözeltiler (Tablo 3.5) ilgili deney gruplarına göre apikal kompartmana eklenmiş ve 37°C'de 50-60 rpm'de 2 saat inkübasyona tabi tutulup bu sürenin sonunda bazolateral kompartmandan 200 μL örnek alınmıştır.

Toplanan örnekler analiz edilinceye kadar -20 °C' de dondurularak saklanmıştır. HPLC ile gerçekleştirilecek olan miktar tayini öncesinde örnekler çözündürülerek mobil fazla uygun seyreltmeler yapılmış ve analiz gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılacak model ilaçlar transport ortamı (25 mM D-glikoz ve 10 mM HEPES içeren *Hank's Balanced Salt Solution*; HBSS) içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Hem etkin maddeler hem de inhibitör maddeler DMSO içinde çözündürülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Apikal kompartmana eklenen çözeltiler, etkin madde ve inhibitör maddelerin belirtilen konsantrasyonlarını sağlayacak şekilde transport ortamı (25 mM D-glikoz ve 10 mM HEPES içeren *Hank's Balanced Salt Solution*; HBSS) ile seyreltilmiştir. Bu çözeltilerde DMSO konsantrasyonu %1'den düşük olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm gruplarla yapılacak deneylerde transport ortamının pH'sı hem apikal hem bazolateral kompartman için 7,4'e ayarlanmıştır. Model ilaçların konsantrasyonları MTT testi sonuçlarına göre ve inhibitör maddelerin konsantrasyonları literatürde yer alan çalışmalara göre belirlenmiştir (184-187).

Model ilaçların konsantrasyonları tayin edildikten sonra apikalden basolaterale doğru görünür permeabilite katsayısı (P_{app} , cm/s) hesaplanmıştır (188) (Eşitlik 3.4):

$$P_{app} = \frac{dC}{dt} \times \frac{V_r}{A \times C_0} \quad (3.4)$$

dC/dt : Birim zamanda taşınan madde konsantrasyonu ($\mu\text{M/s}$)

V_r : Bazolateral kompartmanın hacmi (1 cm^3)

A : Hücre tek tabakasının yüzey alanı ($1,131 \text{ cm}^2$)

C_0 : Apikal kompartmana eklenen maddenin başlangıç konsantrasyonu (μM)

Tablo 3.5. Model ilaçların Caco-2 hücrelerinden permeabilitelerinin incelenmesi amacıyla oluşturulan deney şeması

Grup	Apikal Kompartman	Bazolateral Kompartman
Kontrol	Atorvastatin (100 µg/mL)	HBSS Transport Ortamı
Naringin	Atorvastatin (100 µg/mL) + Naringin (600 µg/mL)	
İnhibitör	Atorvastatin (100 µg/mL) + Ketokonazol (50 µg/mL)	
Kontrol	Pravastatin (50 µg/mL)	HBSS Transport Ortamı
Naringin	Pravastatin (50 µg/mL) + Naringin (600 µg/mL)	
İnhibitör	Pravastatin (50 µg/mL) + Rifampin (85 µg/mL)	
Kontrol	Lovastatin (100 µg/mL)	HBSS Transport Ortamı
Naringin	Lovastatin (100 µg/mL) + Naringin (600 µg/mL)	
İnhibitör	Lovastatin (100 µg/mL) + Elakridar (0.5 µM)	
Kontrol	Simvastatin (50 µg/mL)	HBSS Transport Ortamı
Naringin	Simvastatin (50 µg/mL) + Naringin (600 µg/mL)	
İnhibitör	Simvastatin (50 µg/mL) + Elakridar (0.5 µM)	

3.2.4. *In Situ* Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları

Çözünürlük ve hücre kültürü çalışmalarından elde edilen bulgular doğrultusunda ve de simvastatin ve lovastatin etkin maddelerinin miktarlarının hayvan deneyleri için yetersiz olması ve temininde yaşanan zorluklar nedeniyle *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmaları atorvastatin ve pravastatin kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Deney Hayvanı

Bağırsak perfüzyonu deneyleri İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan (2018/A-12; EK 1) protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Perfüzyon deneylerinde deney hayvanı olarak temini daha kolay olan dişi Sprague-Dawley sıçanlar (250-300 g) kullanılmış ve İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Sıçanlar standart oda sıcaklığı (23-26 °C) ve %40-60 bağıl nem koşullarındaki, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü olan kontrollü ortamlarda yetiştirilmiştir. Standart diyet ile beslenen sıçanlar deneyden 12 saat önce aç bırakılmış ancak suya erişimleri kısıtlanmamıştır.

Perfüzyon Çözeltisi

Perfüzyon deneylerinde İnceçayır ve arkadaşlarının tek geçişli intestinal perfüzyon deneylerinde ileum segmenti için kullandıkları HEPES tamponu kullanılmıştır (189) (Tablo 3.6). Perfüzyon çözeltisi her deneyden önce taze olarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.6. Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi (189).

Madde	Konsantrasyon (mM)
HEPES	5
Kalsiyum klorür	1
Magnezyum klorür	0.5
Sodyum klorür	145
Sodyum dihidrojen fosfat	1
Potasyum klorür	3
Dekstroz	5

Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılacak model ilaçlar (atorvastatin, pravastatin) ve inhibitör maddelerin (naringin, ketokonazol, rifampin) perfüzyon çözeltisine eklenecek konsantrasyonları literatüre göre belirlenmiştir. Etkin madde

konsantrasyonları tedavide kullanılan en yüksek dozun 250 mL'ye bölünmesi ile hesaplanmıştır. Bu durum en yüksek dozun tavsiye edilen bir bardak su ile alınmasını takiben bağırsak segmentinde maksimum ilaç konsantrasyonunu temsil etmektedir (190). Ayrıca kullanılan model ilaç ve inhibitörlerin suda çözünürlükleri düşük olduğu için perfüzyon çözeltisine %1 DMSO eklenmiştir.

- Atorvastatin için tedavide kullanılan en yüksek doz 80 mg olmasına rağmen, etkin maddenin çözünürlük sorunu olması nedeniyle 40 mg doz seçilmiştir. Atorvastatin için perfüzyon çözeltisine eklenecek madde konsantrasyonu 160 µg/mL (=40 mg/250 mL) olarak belirlenmiştir.
- Pravastatin için tedavide kullanılan en yüksek doz 40 mg olmasına rağmen, etkin maddenin miktarının yetersiz olması nedeniyle 10 mg doz seçilmiştir. Pravastatin için perfüzyon çözeltisine eklenecek madde konsantrasyonu 40 µg/mL (=10 mg/250 mL) olarak belirlenmiştir.
- Naringin için perfüzyon çözeltisine eklenecek konsantrasyon, Shirasaka ve arkadaşlarının *in situ* sıçan intestinal *closed-loop* çalışmalarında kullandıkları konsantrasyon değerinden hareketle 1000 µM olarak belirlenmiştir (184, 185).
- Spesifik inhibitörler rifampin ve ketokonazolün perfüzyon çözeltisine eklenecek konsantrasyonları, bölümümüzde daha önce yapılmış tez çalışmalarında kullanılan konsantrasyon değerlerinden hareketle sırasıyla 100 µM ve 50 µg/mL olarak belirlenmiştir (186, 187).

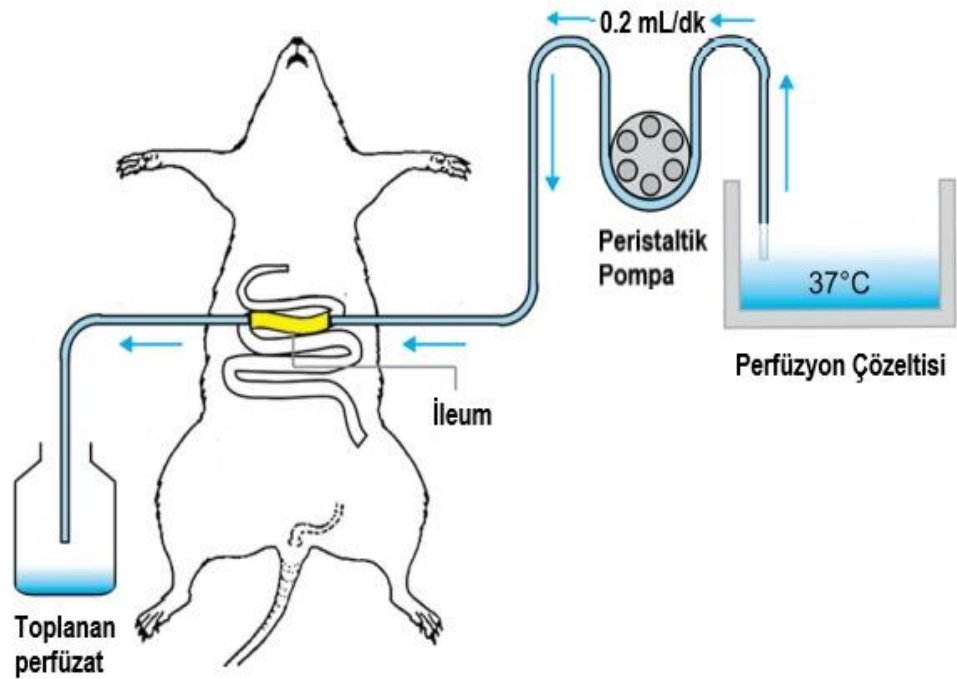
Cerrahi İşlem

Bağırsak perfüzyonu deneylerinde lümeden kayıp esasına dayanan ve ileumun perfüze edildiği *in situ single pass* bağırsak perfüzyon tekniği kullanılmıştır.

Tüm cerrahi işlemler anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sıçanlara ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Normal vücut sıcaklığının korunması için ısıtılmış bir ped üzerine yerleştirilen sıçanların karın bölgesi orta hat boyunca kesilmiştir. İnce bağırsak dokusundaki kan akımı devam ederken, ileum segmenti (3.0-4.8 cm) izole edilmiştir. İzole segmentin her iki ucuna yarım daire şeklinde kesikler oluşturularak silikon boru (*tubing*) ile

kanüle edilmiş ve cerrahi iplikle bağlanmıştır. İzole edilen ileum önce serum fizyolojik (37°C) ile yıkanmış ve temizlenme göstergesi olarak çözeltinin berrak gelmesi esas alınmıştır. Perfüzyon çözeltisinin akış hızı peristaltik pompa (Gilson Minipuls 3) aracılığıyla 0.2 mL/dk olarak ayarlanmış ve sirküle edilmemiştir.

Deney süresince perfüze edilen segmentin kurumasını önlemek için üzeri parafilm ile kapatılmış ve ara ara serum fizyolojik ile ıslatılmıştır. Perfüze edilen bütün çözeltiler sıcak su banyosunda 37°C'ye ısıtılmıştır. Deney sonunda hayvanlar eksanguinasyon yöntemi ile öldürülmüş ve daha sonra perfüze edilen segment çıkarılarak uzunluğu tekrar ölçülmüştür. Cerrahi işlem Şekil 3.1'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Perfüzyon deneylerinde yapılan cerrahi işlemin şematik olarak gösterilmesi.

Perfüzyon Deneyleri ve Deney Grupları

Perfüze edilen bağırsak segmenti ileum, serum fizyolojik ile yıkanarak temizlendikten sonra perfüzyon çözeltisi (HEPES Tamponu) ile yaklaşık 30 dakika dengeye ulaşana kadar perfüze edilmiştir. Model ilaçların absorpsiyon ve

permeabilitelerini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar 4 grup altında gerçekleştirilmiştir:

Grup 1 (n= 6): Atorvastatin (160 µg/mL) ve naringin (1000 µM) kullanılan çalışmalar

Grup 2 (n= 6): Atorvastatin (160 µg/mL) ve ketokonazol (50 µg/mL) kullanılan çalışmalar

Grup 3 (n= 6): Pravastatin (40 µg/mL) ve naringin (1000 µM) kullanılan çalışmalar

Grup 4 (n= 6): Pravastatin (40 µg/mL) ve rifampin (100 µM) kullanılan çalışmalar

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

Grup 1: İzole segment (ileum) perfüzyon çözeltisi (HEPES tamponu) ile dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 30 dk) perfüze edilmiştir. Ardından belirlenen konsantrasyonda atorvastatin (160 µg/mL) içeren HEPES tamponu ile ileum 60 dk perfüze edilmiş ve her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra naringin (1000 µM) perfüzyon çözeltisine eklenerek ileum 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu dengelenme süresinin sonunda ileum naringin içeren perfüzyon çözeltisiyle 60 dk daha perfüze edilerek her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Atorvastatinin absorpsiyon ve permeabilitesinde değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

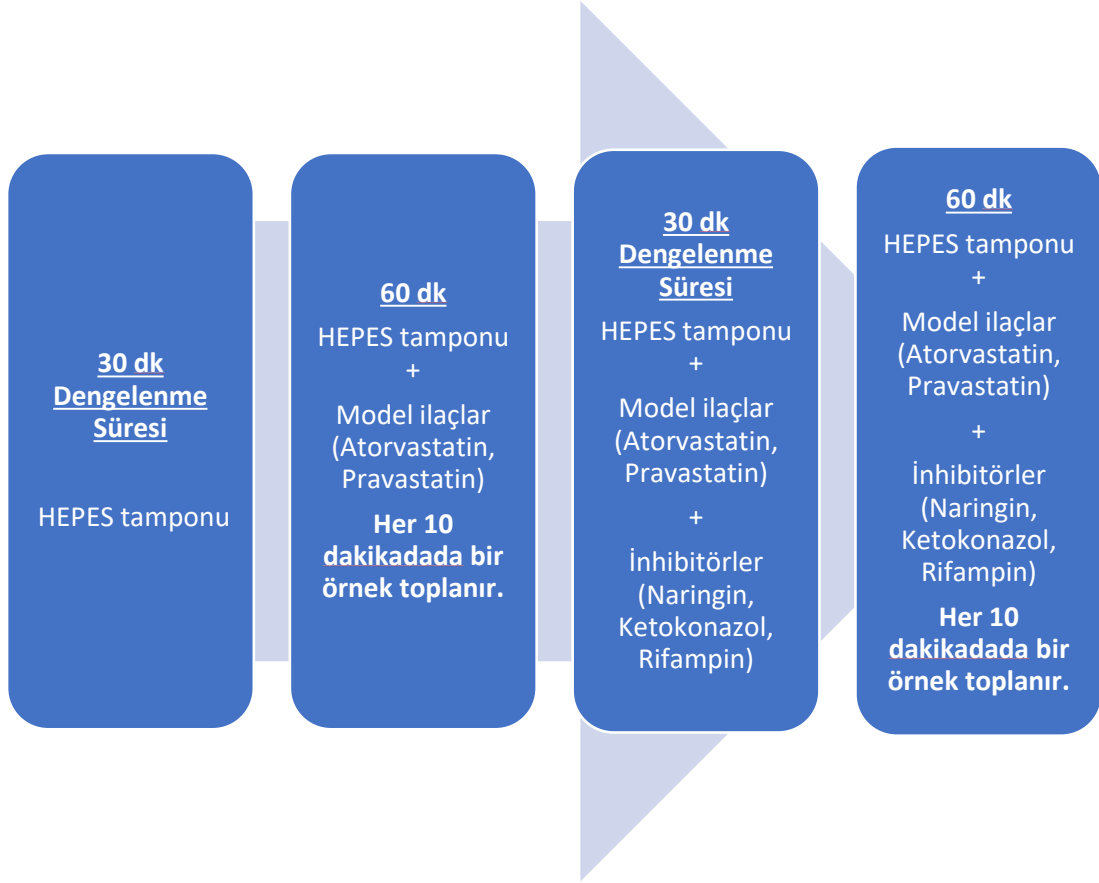
Grup 2: İzole segment (ileum) perfüzyon çözeltisi (HEPES tamponu) ile dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 30 dk) perfüze edilmiştir. Ardından belirlenen konsantrasyonda atorvastatin (160 µg/mL) içeren HEPES tamponu ile ileum 60 dk perfüze edilmiş ve her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra ketokonazol (50 µg/mL) perfüzyon çözeltisine eklenerek ileum 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu dengelenme süresinin sonunda ileum ketokonazol içeren perfüzyon çözeltisiyle 60 dk daha perfüze edilerek her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Atorvastatinin absorpsiyon ve permeabilitesinde değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

Grup 3: İzole segment (ileum) perfüzyon çözeltisi (HEPES tamponu) ile dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 30 dk) perfüze edilmiştir. Ardından belirlenen konsantrasyonda pravastatin (40 µg/mL) içeren HEPES tamponu ile ileum 60 dk perfüze edilmiş ve her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra naringin (1000

μM) perfüzyon çözeltisine eklenerek ileum 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu dengelenme süresinin sonunda ileum naringin içeren perfüzyon çözeltisiyle 60 dk daha perfüze edilerek her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Pravastatinin absorpsiyon ve permeabilitesinde değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

Grup 4: İzole segment (ileum) perfüzyon çözeltisi (HEPES tamponu) ile dengeye ulaşına kadar (yaklaşık 30 dk) perfüze edilmiştir. Ardından belirlenen konsantrasyonda pravastatin ($40 \mu\text{g/mL}$) içeren HEPES tamponu ile ileum 60 dk perfüze edilmiş ve her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra rifampin ($100 \mu\text{M}$) perfüzyon çözeltisine eklenerek ileum 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu dengelenme süresinin sonunda ileum rifampin içeren perfüzyon çözeltisiyle 60 dk daha perfüze edilerek her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Pravastatinin absorpsiyon ve permeabilitesinde değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

Perfüzyon deneylerinde toplanan örnekler analiz edilinceye kadar $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de dondurularak saklanmıştır. HPLC ile gerçekleştirilecek olan miktar tayini öncesinde örnekler çözündürülerek şırınga ucu filtreden süzümüştür. Ardından mobil faz ile uygun seyreltmeler yapılmış ve analiz gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Perfüzyon deneyi akış şeması

Perfüzyon deneylerinde model ilaçların miktar tayini gerçekleştirildikten sonra, belirlenen konsantrasyon değerleri rezervuardaki madde konsantrasyonuna oranlanarak normalize edilmiştir. Normalize edilen bu konsantrasyon değerleri zamana karşı grafiklenerek barsak lümeninden absorpsiyonu gösteren konsantrasyon-zaman profilleri elde edilmiştir. Ayrıca greyfurt suyu bileşeninin (naringin) ve spesifik inhibitörlerin (ketokonazol, rifampin) absorpsiyon üzerine etkisini belirtmek amacıyla % değişim değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

Perfüzyon deneylerinde metoprolol (yüksek permeabilite ajanı) ve fenol kırmızısı (sıfır permeabilite ajanı) etkin maddelerle girişim yaptığı için kullanılamamıştır. Perfüzyon deneylerinde su dengesini kontrol etmek amacıyla literatürde mevcut olan gravimetrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemin esası belirli

bir süre boyunca toplanan perfüzinin ağırlığının belirlenmesini ve bunun hacimsel bir parametreye dönüştürülmesine dayanmaktadır (191).

Model ilaçların permeabilite değerleri (P_{eff})'nin hesaplanmasında gravimetrik yöntem için literatürde önerilen eşitlik (Eşitlik 3.5) kullanılmıştır (192):

$$P_{eff} = \frac{-Q_{in} \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)}{2\pi r l} \quad (3.5)$$

Q_{in} : Perfüzatın bağırsak segmentine girerken ölçülen akış hızı (0.2 mL/dak)

C_{out} : Segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki etkin madde konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)

C_{in} : Segmente giren perfüzyon çözeltisindeki etkin madde konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)

r : Perfüze edilen barsak segmentinin yarıçapı (0.18 cm)

l : Perfüze edilen barsak segmentinin uzunluğu (cm)

Ayrıca model ilaçların ileumdan absorplanan fraksiyonları (F_a ; Eşitlik 3.6) ve absorpsiyon hız sabitleri (k_a ; Eşitlik 3.7) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (192):

$$F_a = 1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \quad (3.6)$$

$$k_a = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}}\right) \frac{Q}{\pi r^2 l} \quad (3.7)$$

3.3. İstatiksel Analiz

Tüm deneysel çalışmalardan elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8.4.2. programı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analizlerde güven aralığı en az % 95 olarak seçilmiştir. *In vitro* ve *in situ* deneylerden elde edilen verilerin karşılaştırılmasında parametrik bir test olan

Student's t testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farkın önemliliği elde edilen p değerinin α yanılma düzeyinden büyük ($p > \alpha$; istatistiksel olarak anlamsız) veya küçük ($p < \alpha$; istatistiksel olarak anlamlı) olmasına göre değerlendirilmiştir.

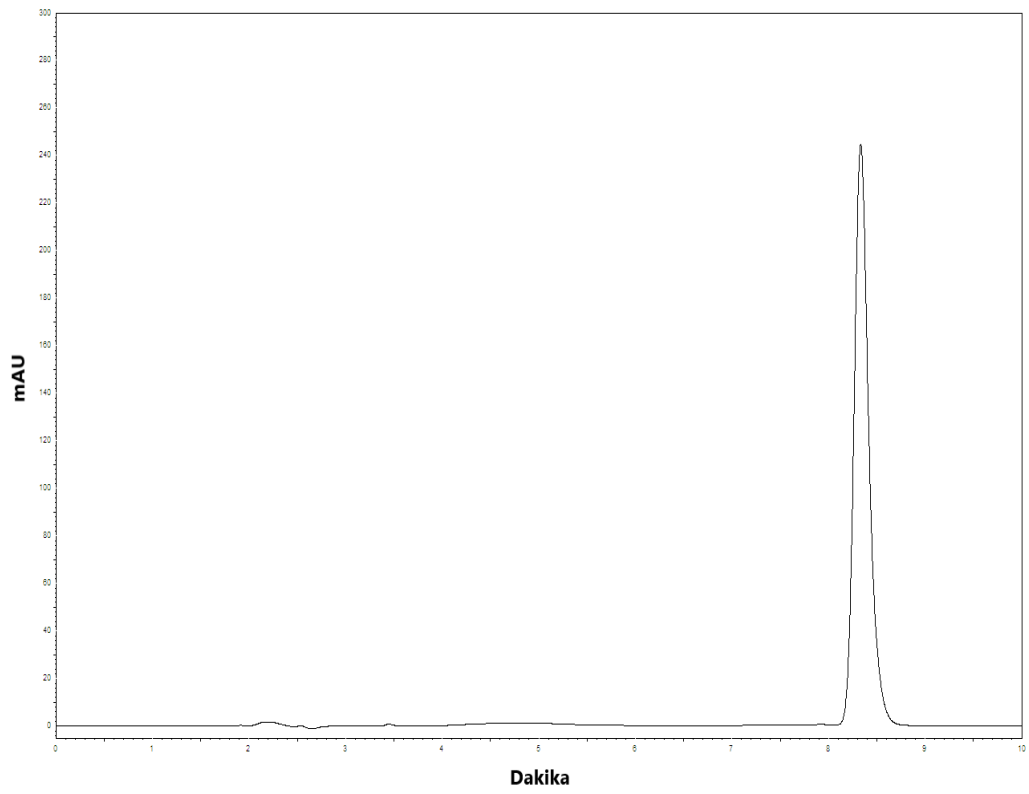
4. BULGULAR

4.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

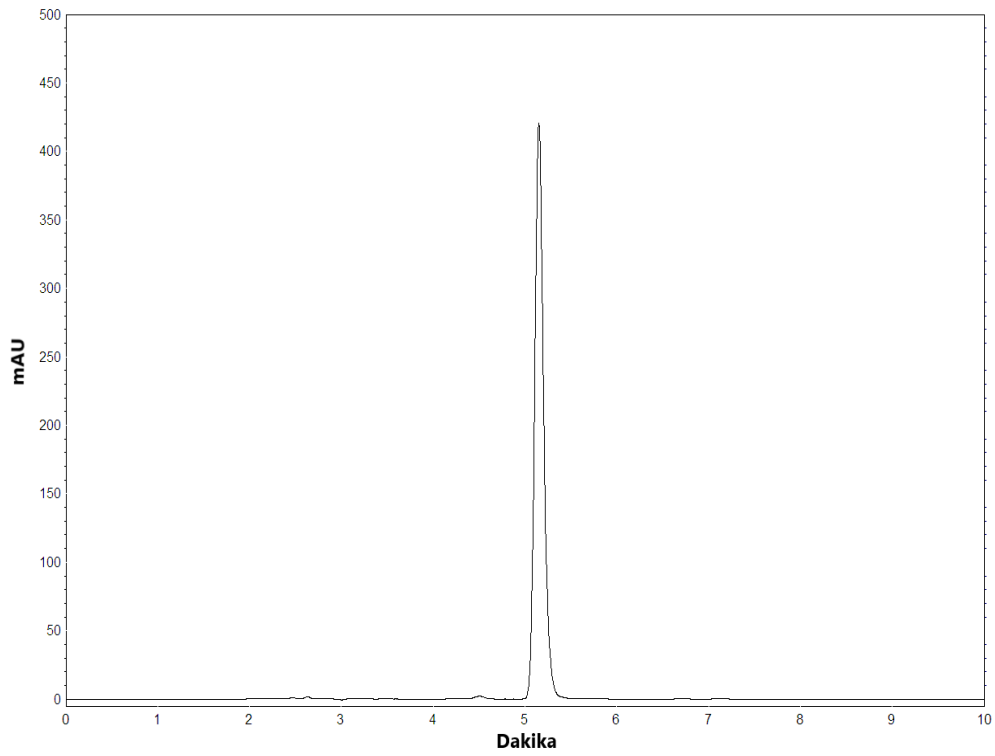
Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen numunelerdeki model ilaçların tayininde Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır. Numunelerin HPLC analizinde foto diyot array (PDA) dedektörüne sahip Thermo Finnigan Surveyor HPLC sistemi kullanılmıştır. Etkin maddeler için kullanılan analitik yöntem koşullarında (Bölüm 3.2.1’de Tablo 3.1) elde edilen maksimum dalga boyları ve alıkonma zamanları Tablo 4.1’de, HPLC kromatogramları Şekil 4.1-Şekil 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Model etkin maddeler için tayin edilen maksimum dalga boyları ve alıkonma zamanları.

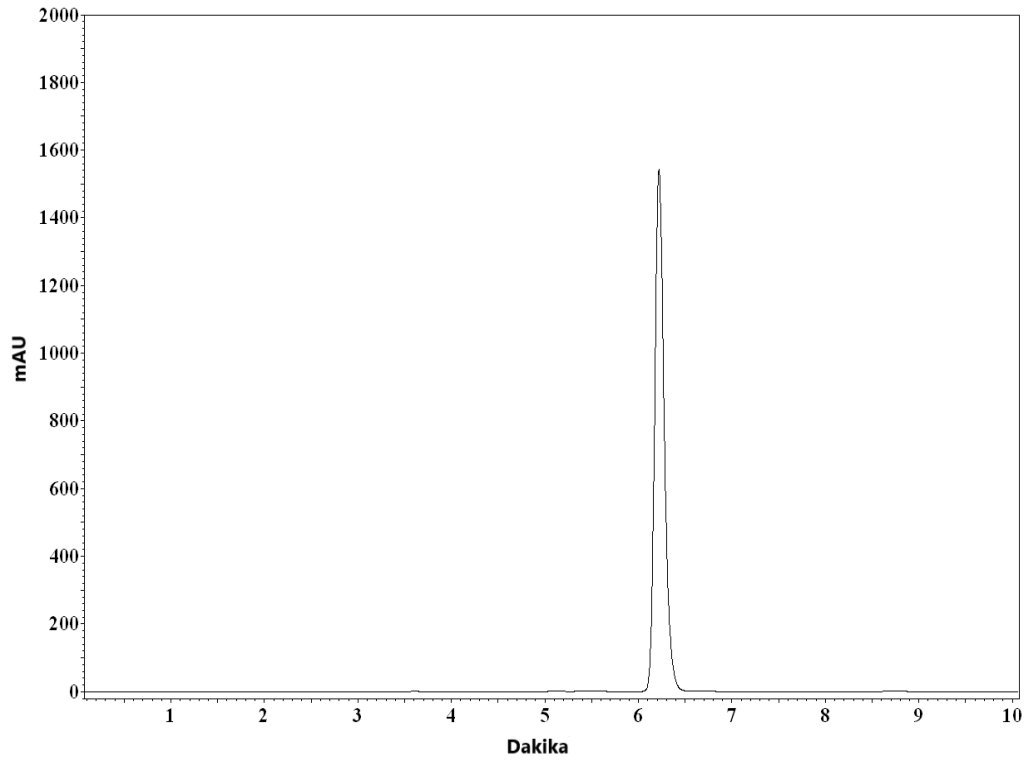
Madde	Maksimum dalga boyu (nm)	Alıkonma zamanı (dakika)
Atorvastatin	245	8.4
Pravastatin	235	5.1
Simvastatin	235	6.2
Lovastatin	235	6.6



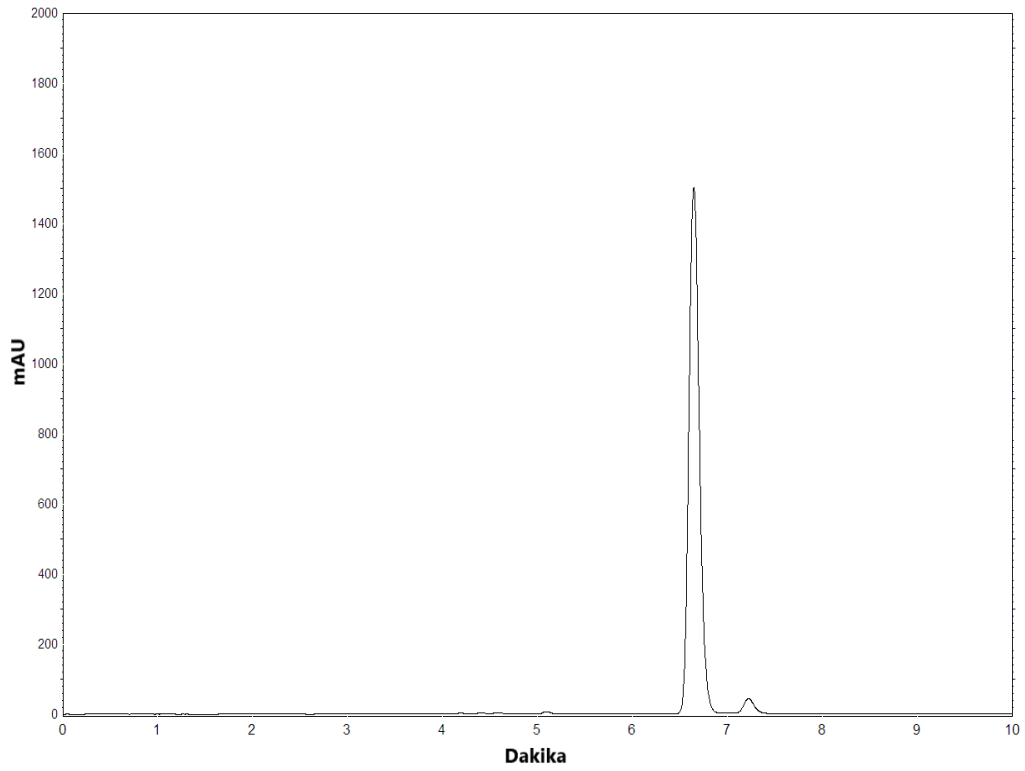
Şekil 4.1. Atorvastatine ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.2. Pravastatine ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.3. Simvastatine ait HPLC kromatogramı.



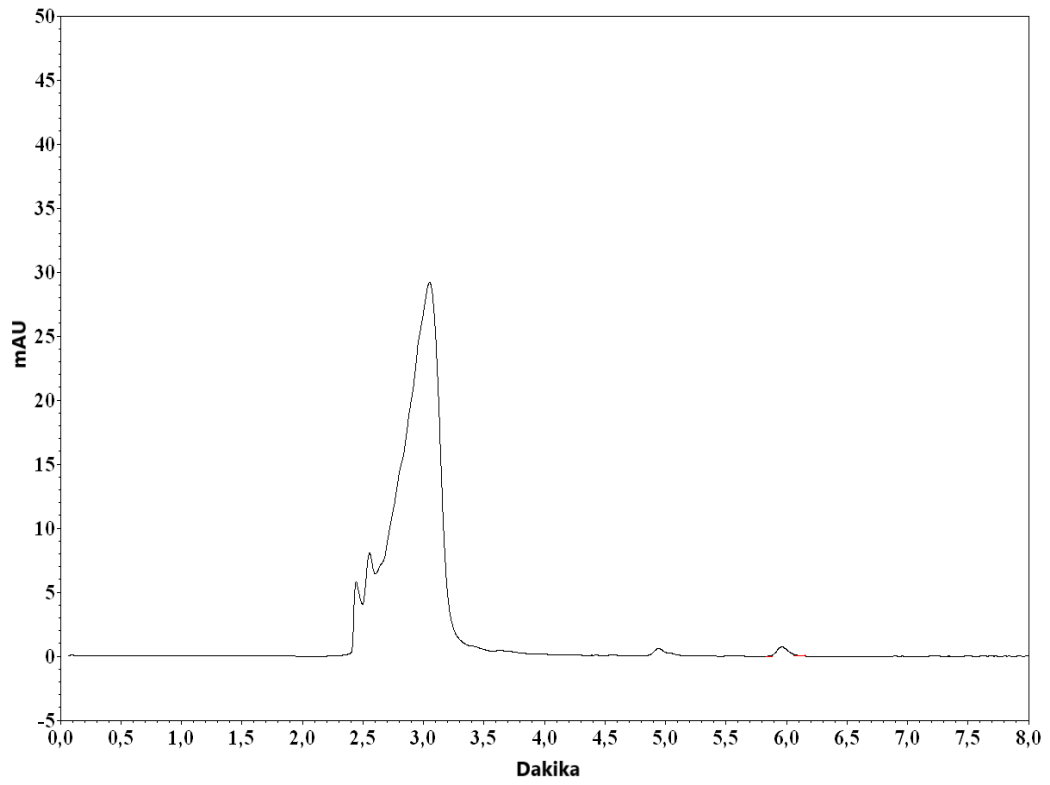
Şekil 4.4. Lovastatine ait HPLC kromatogramı.

Deneysel çalışmalardan elde edilen numunelerin analizinde kullanılan analitik yöntemin validasyonu Bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi seçicilik, özgüllük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik (gün içi ve günler arası), duyarlılık ve stabilite ölçütleri açısından biyoanalitik yöntem validasyon kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

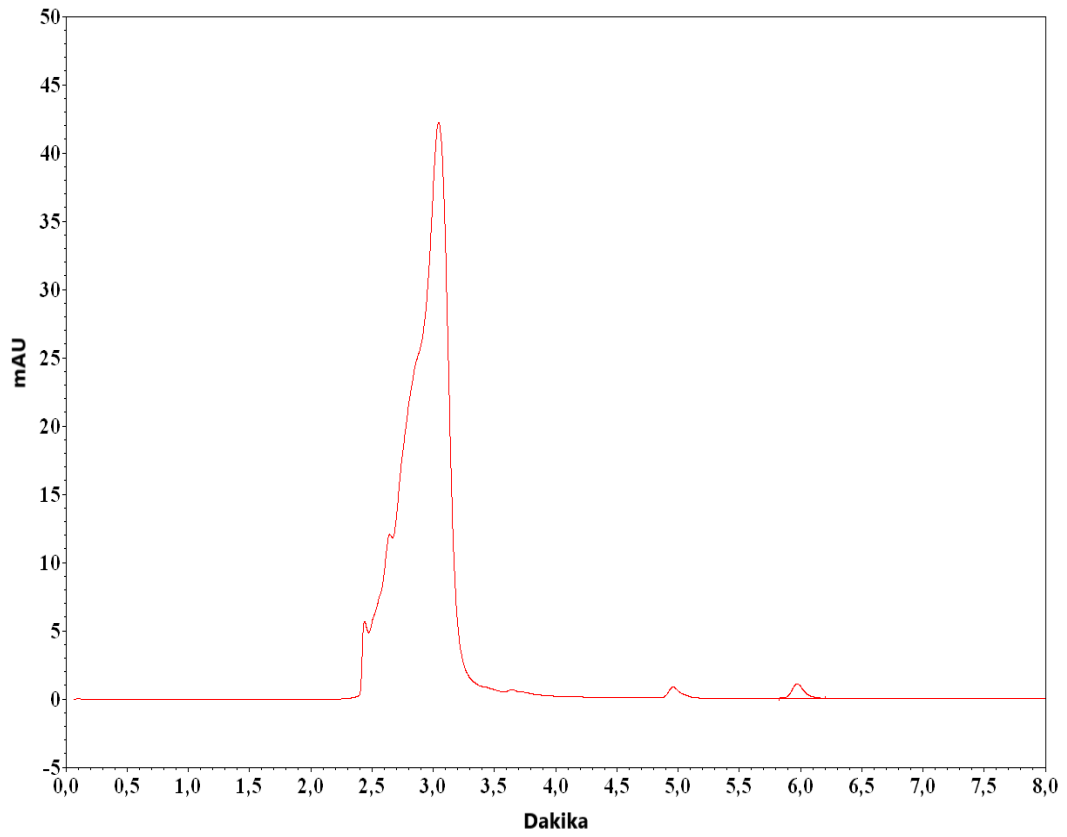
4.1.1. Seçicilik

Çalışmada kullanılan model ilaçların (atorvastatin, pravastatin, simvastatin, lovastatin) boş biyolojik matriksteki potansiyel girişim yapan maddeler varlığında HPLC yöntemi ile tayini gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları için farklı gruplarda inhibitör madde içermeyen boş HBSS ortamı kullanılırken bağırsak perfüzyon çalışmalarında farklı sıçanlarda ileumun HEPES tamponu ile perfüzyonundan elde edilen numuneler kullanılmıştır.

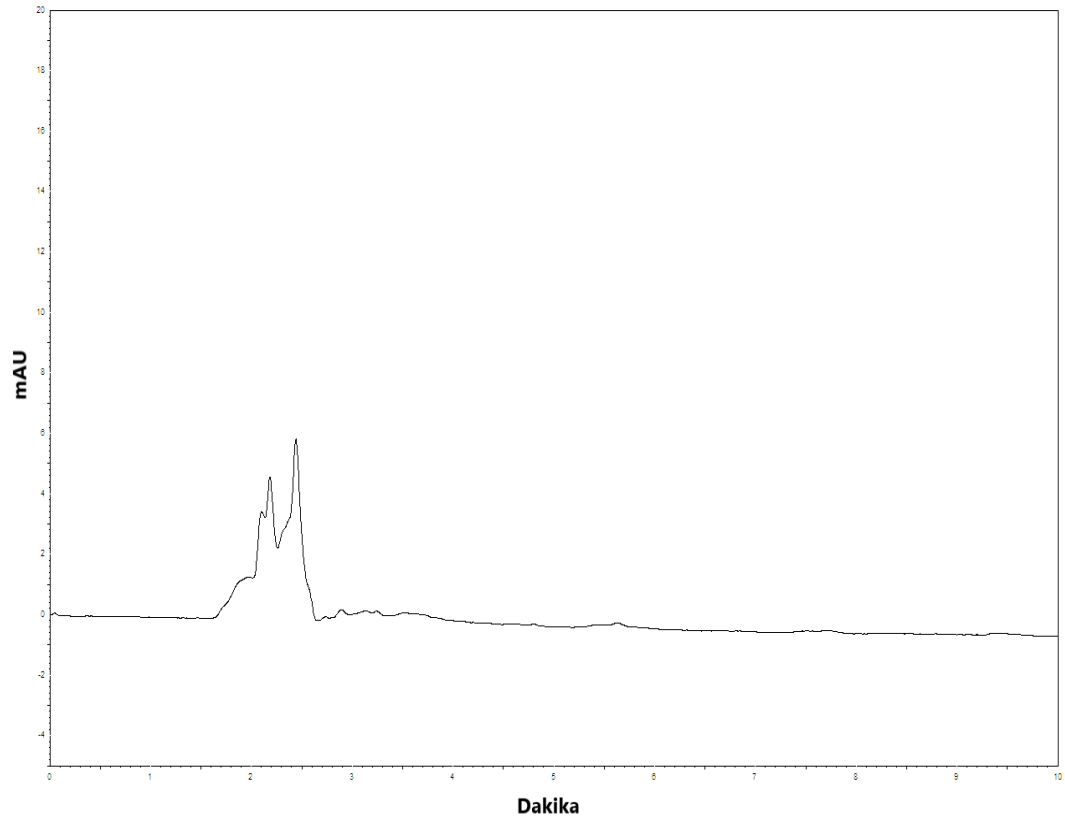
Hücre kültürü ve bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan boş matrikslerin atorvastatinin, pravastatin, lovastatin ve simvastatinin maksimum absorbans verdiği dalga boylarında (atorvastatin: 245 nm; pravastatin, lovastatin ve simvastatinin: 235 nm) pik verip vermediğini incelemek amacıyla Bölüm 3.2.1’de verilen aynı analiz koşullarında elde edilen HPLC kromatogramları incelenmiş ve potansiyel girişim yapan maddelere ait hiçbir anlamlı yanıtın olmadığı gösterilmiştir. HBSS ve HEPES tamponları için elde edilen kromatogramlar Şekil 4.5- Şekil 4.8.’de verilmiştir.



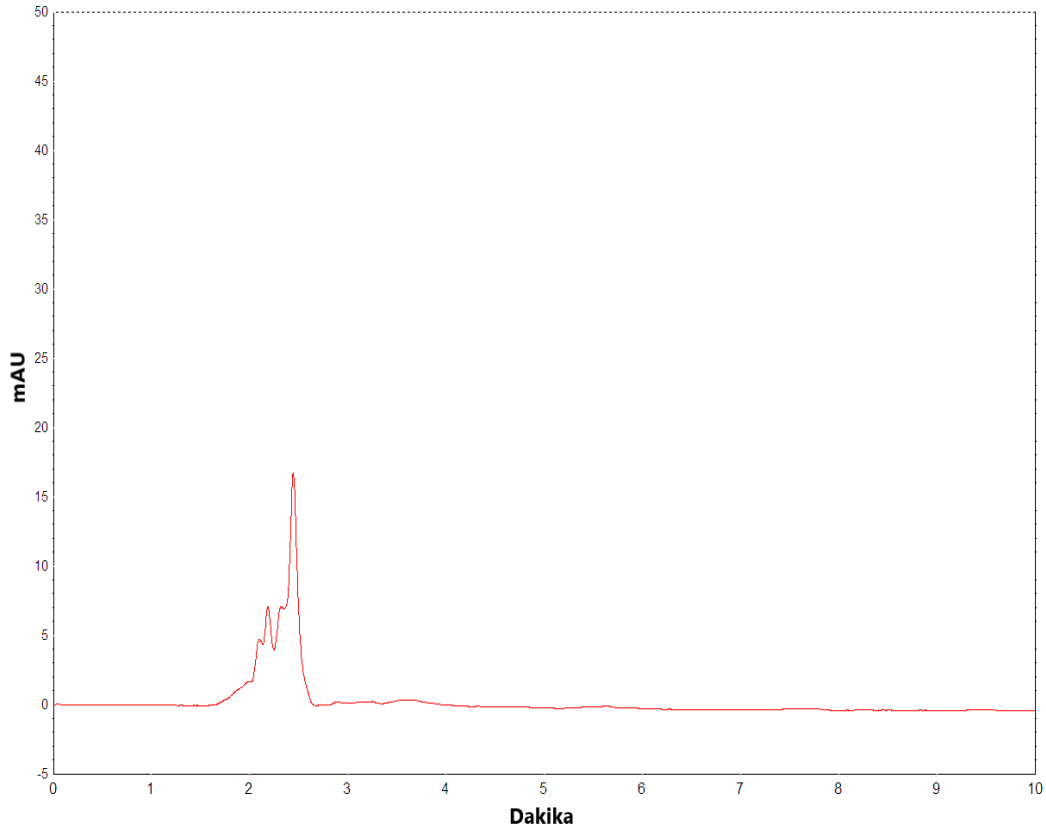
Şekil 4.5. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HBSS tamponunun 245 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramı.



Şekil 4.6. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HBSS tamponunun 235 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramı.



Şekil 4.7. Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan HEPES tamponunun 245 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramı.

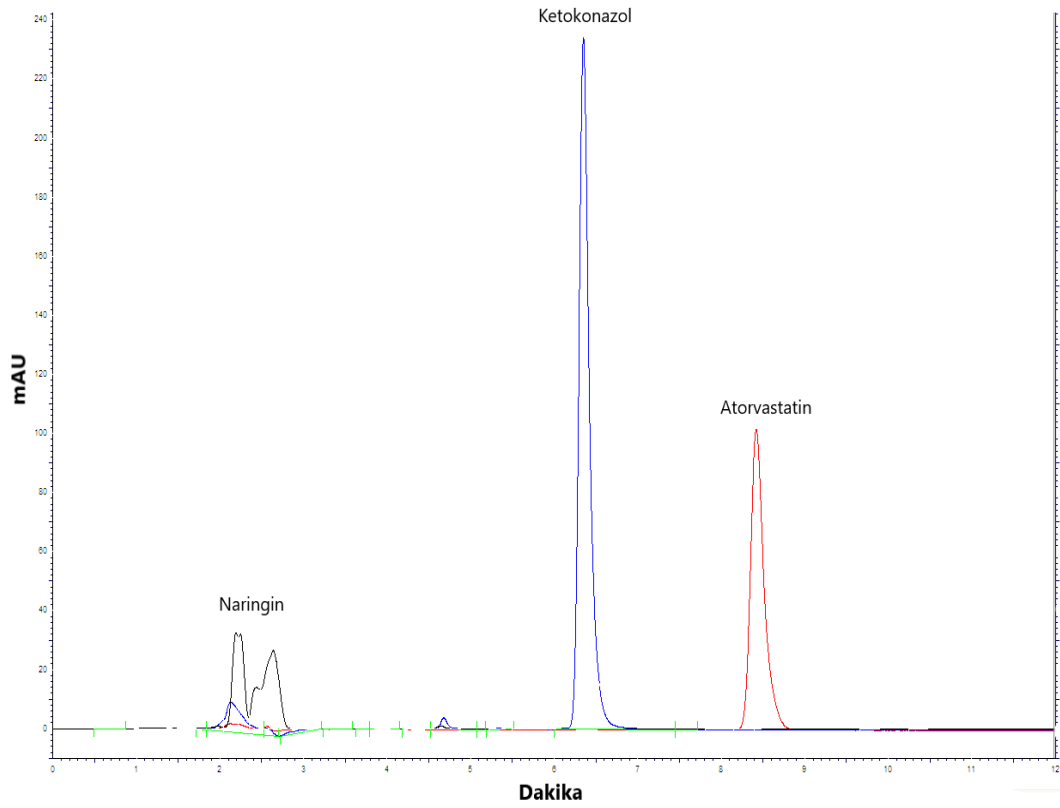


Şekil 4.8. Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan HEPES tamponunun 235 nm dalga boyunda elde edilen HPLC kromatogramı.

4.1.2. Özgüllük

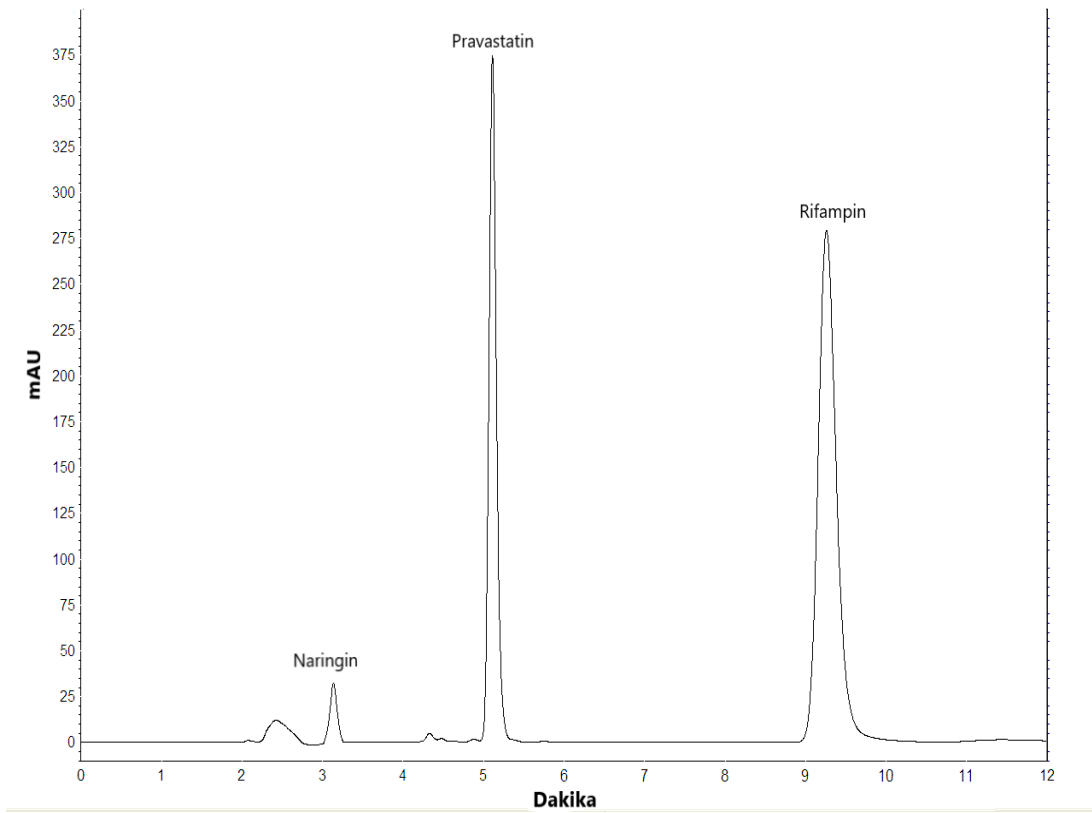
Çalışmada kullanılan model ilaçların (atorvastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin) birlikte kullanılacağı diğer maddeler ile (naringin, ketokonazol, rifampin, elakridar) ile aynı alıkonma zamanlarında pik verip vermediğini incelemek amacıyla Bölüm 3.2.1’de verilen aynı analiz koşullarında elde edilen HPLC kromatogramları incelenmiştir.

Atorvastatin ile birlikte kullanılan naringin ve ketoprofen’in model etkin maddenin alıkonma zamanında (~8.4 dk) pik vererek girişim yapmadığı tespit edilmiş, elde edilen bu bulgu atorvastatinin analizinde kullanılan yöntemin özgül olduğunu göstermiştir (Şekil 4.9).



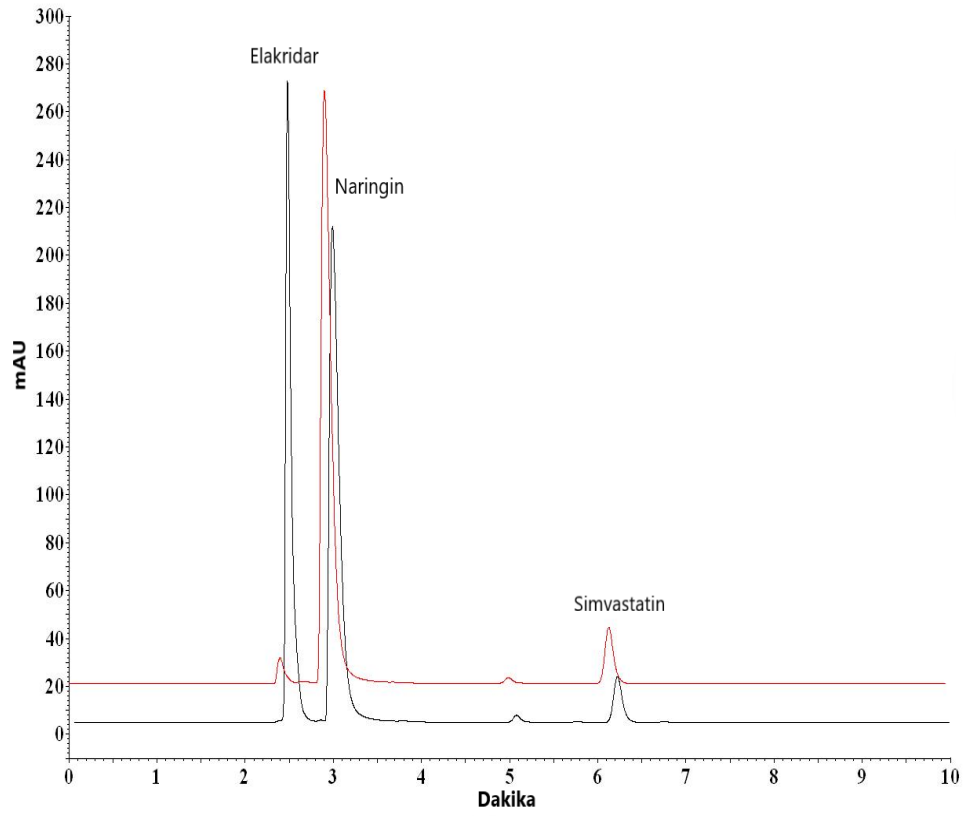
Şekil 4.9. Atorvastatin, ketokonazol ve naringin içeren HEPES tamponu çözeltisinin 245 nm'deki HPLC kromatogramı.

Pravastatin ile birlikte kullanılan naringin ve rifampin'in model etkin maddenin alıkonma zamanında (~5.1 dk) pik vererek girişim yapmadığı tespit edilmiş, elde edilen bu bulgu pravastatinin analizinde kullanılan yöntemin özgül olduğunu göstermiştir (Şekil 4.10).



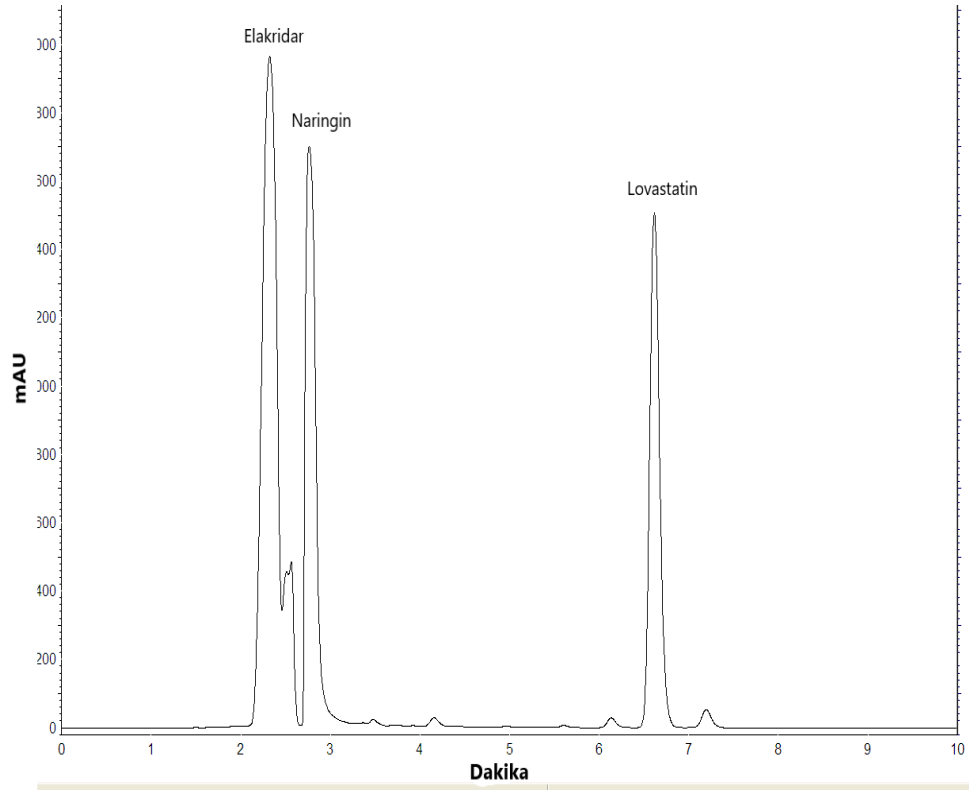
Şekil 4.10. Pravastatin, rifampin ve naringin içeren HEPES tamponu çözeltisinin 235 nm'deki HPLC kromatogramı.

Simvastatin ile birlikte kullanılan naringin ve elakridarın etkin maddenin alıkonma zamanında (~6.2 dk) pik vererek girişim yapmadığı tespit edilmiş, elde edilen bu bulgu simvastatinin analizinde kullanılan yöntemin özgül olduğunu göstermiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Simvastatin, elakridar ve naringin içeren HEPES tamponu çözeltisinin 235 ve 282 nm'deki HPLC kromatogramı.

Lovastatin ile birlikte kullanılan naringin ve elakridarın etkin maddenin alıkonma zamanında (~6.6 dk) pik vererek girişim yapmadığı tespit edilmiş, elde edilen bu bulgu lovastatinin analizinde kullanılan yöntemin özgül olduğunu göstermiştir (Şekil 4.12).



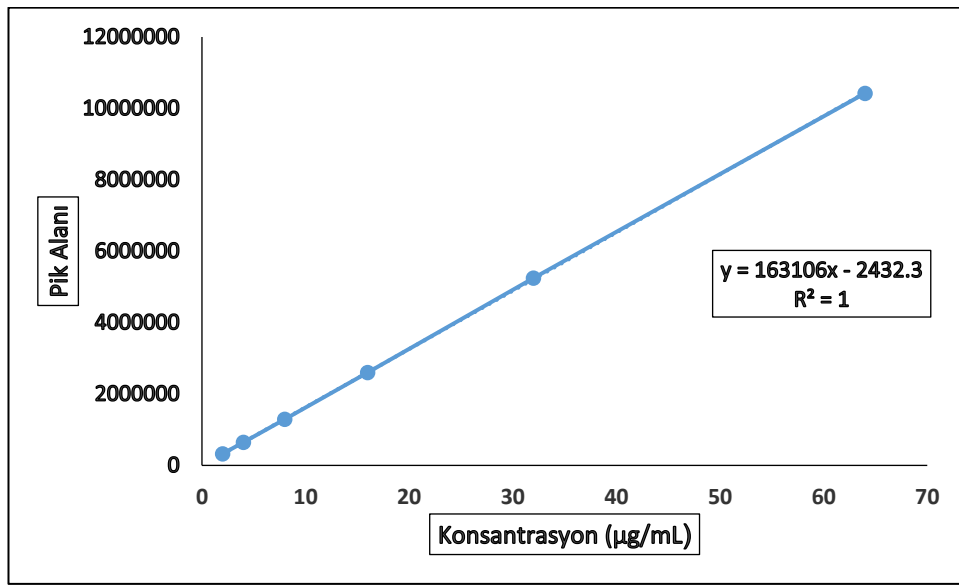
Şekil 4.12. Lovastatin, elakridar ve naringin içeren HEPES tamponu çözeltisinin 235 nm’deki HPLC kromatogramı.

4.1.3. Doğrusallık

Atorvastatin: Metanol içerisinde 100 µg/mL konsantrasyonda atorvastatin içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktan uygun seyreltmeler yapılarak 2, 4, 8, 16, 32, 64 µg/mL atorvastatin içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır (n=6). Stok çözeltilerin seyreltilmesinde mobil faz kullanılmıştır. Hazırlanan standart çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri grafiklenerek lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (R^2) tayin edilmiştir. Determinasyon katsayısının 1 (bir) olması pik alanı ve konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermiştir. Atorvastatine ait doğrusallık bulguları Tablo 4.2’de, kalibrasyon doğrusu ise Şekil 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Atorvastatin için tayin edilen doğrusallık bulguları.

Doğru Denklemi	$y = 163106x - 2432,3$
Determinasyon Katsayısı (R^2)	1
Doğrusallık Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	0,1 – 100
Nokta Sayısı	6
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,035
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,106

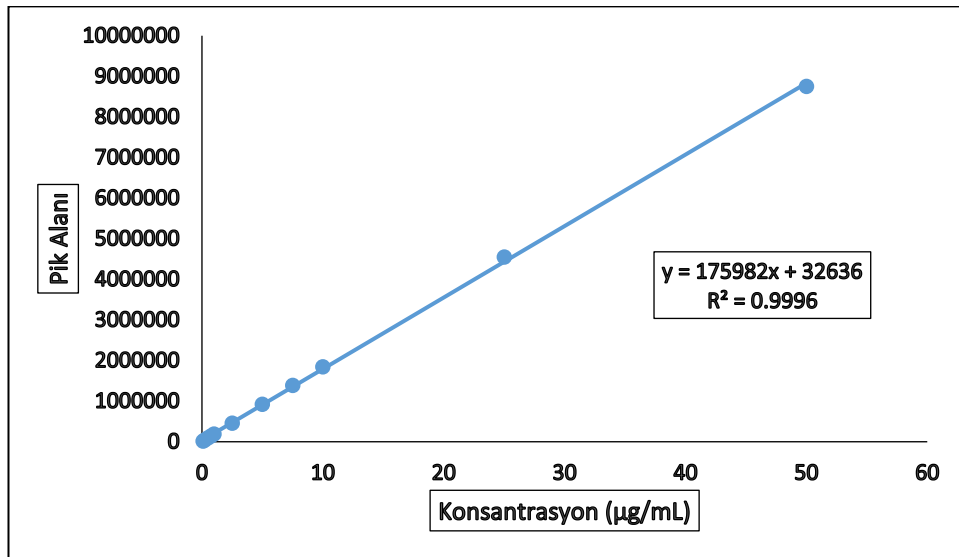
**Şekil 4.13.** Atorvastatine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.

Pravastatin: Distile su içerisinde 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda pravastatin içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktan uygun seyreltmeler yapılarak 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda pravastatin içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır ($n=6$). Stok çözeltilerin seyreltilmesinde mobil faz kullanılmıştır. Hazırlanan örneklerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri grafiklenerek lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (R^2) tayin edilmiştir. Determinasyon katsayısının 1'e yakın olması ($R^2=0,9996$) olması pik alanı ve konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu

göstermiştir. Pravastatine ait doğrusallık bulguları Tablo 4.3’de, kalibrasyon doğrusu ise Şekil 4.14’da verilmiştir.

Tablo 4.3. Pravastatin için tayin edilen doğrusallık bulguları.

Doğru Denklemi	$y = 175982x + 32636$
Determinasyon Katsayısı (R^2)	0,9996
Doğrusallık Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	0,1 – 75
Nokta Sayısı	7
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,183
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,555



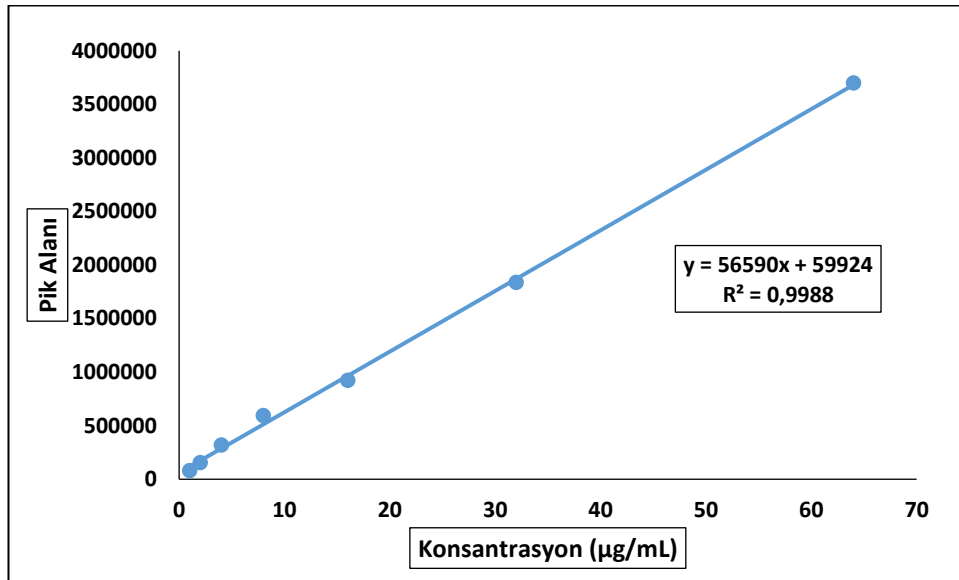
Şekil 4.14. Pravastatine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemini.

Simvastatin: Metanol içerisinde 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda lovastatin içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktan uygun seyreltmeler yapılarak 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda simvastatin içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır ($n=6$). Stok çözeltilerin seyreltilmesinde mobil faz kullanılmıştır. Hazırlanan örneklerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri grafiklenerek lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemini ve determinasyon katsayısı tayin edilmiştir. Determinasyon katsayısının 1'e yakın olması ($R^2=0,9988$) olması pik alanı

ve konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermiştir. Simvastatine ait doğrusallık bulguları Tablo 4.4'te, kalibrasyon doğrusu ise Şekil 4.15'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Simvastatin için tayin edilen doğrusallık bulguları.

Doğru Denklemi	$y = 56590x + 59924$
Determinasyon Katsayısı (R^2)	0,998
Doğrusallık Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	0,05 – 75
Nokta Sayısı	7
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,293
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,888



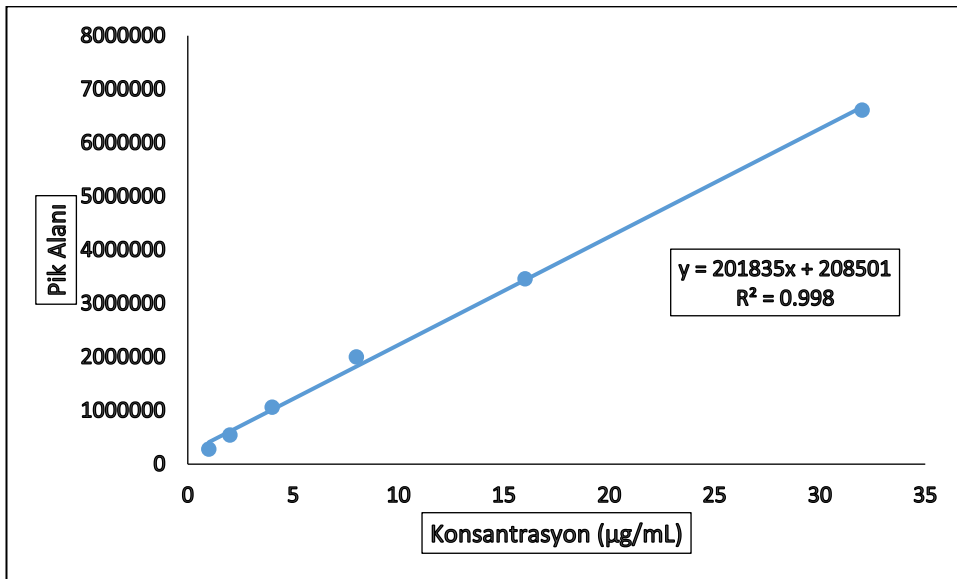
Şekil 4.15. Simvastatine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.

Lovastatin: Metanol içerisinde 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda lovastatin içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktan uygun seyreltmeler yapılarak 1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda lovastatin içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır ($n=6$). Stok çözeltilerin seyreltilmesinde mobil faz kullanılmıştır. Hazırlanan örneklerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri grafiklenerek lineer regresyon analizi ile standart doğru denklemi ve determinasyon katsayısı tayin edilmiştir. Determinasyon katsayısının 1'e yakın olması ($R^2=0,998$) olması pik alanı

ve konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermiştir. Lovastatine ait doğrusallık bulguları Tablo 4.5’te, kalibrasyon doğrusu ise Şekil 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.5. Lovastatin için tayin edilen doğrusallık bulguları.

Doğru Denklemi	$y = 201835x + 208501$
Determinasyon Katsayısı (R^2)	0,998
Doğrusallık Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	1 – 50
Nokta Sayısı	6
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,198
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,599



Şekil 4.16. Lovastatine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemini.

4.1.4. Doğruluk

Model etkin maddelerin tayininde kullanılan analiz yönteminin doğruluğunun tayini için gün içi kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar kullanılmıştır.

Atorvastatinin tayininde kullanılan analitik yönteminin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.6’te verilmiştir. Her bir

konsantrasyon için hesaplanan ortalama bağıl hata değerlerinin \pm %2'den küçük olması atorvastatinin tayininde kullanılan yöntemin doğruluğunu göstermiştir.

Tablo 4.6. Atorvastatin için doğruluk çalışmasından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=6).

Gerçek Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% Ortalama Bağıl Hata
4	4,04 \pm 0,02	1,11
16	15,98 \pm 0,07	-0,15
64	63,79 \pm 0,30	-0,33

Pravastatinin tayininde kullanılan analitik yönteminin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.7'te verilmiştir. Her bir konsantrasyon için hesaplanan ortalama bağıl hata değerlerinin \pm %15'den küçük olması pravastatinin tayininde kullanılan yöntemin doğruluğunu göstermiştir.

Tablo 4.7. Pravastatin için doğruluk çalışmasından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=6).

Gerçek Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% Ortalama Bağıl Hata
2	1,70 \pm 0,06	-15,04
8	8,21 \pm 0,03	2,59
32	33,52 \pm 0,21	4,74

Simvastatinin tayininde kullanılan analitik yönteminin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.8'de verilmiştir. Her bir konsantrasyon için hesaplanan ortalama bağıl hata değerlerinin \pm %12'den küçük olması lovastatinin tayininde kullanılan yöntemin doğruluğunu göstermiştir.

Tablo 4.8. Simvastatin için doğruluk çalışmasından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=6).

Gerçek Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% Ortalama Bağlı Hata
2	1,90 \pm 0,03	-5,10
8	7,12 \pm 0,03	-11,00
32	31,52 \pm 0,09	-1,50

Lovastatinin tayininde kullanılan analitik yönteminin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.9’da verilmiştir. Her bir konsantrasyon için hesaplanan ortalama bağlı hata değerlerinin \pm %3’ten küçük olması lovastatinin tayininde kullanılan yöntemin doğruluğunu göstermiştir.

Tablo 4.9. Lovastatin için doğruluk çalışmasından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=6).

Gerçek Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% Ortalama Bağlı Hata
2	1,95 \pm 0,02	-2,39
8	8,03 \pm 0,08	0,40
32	32,24 \pm 0,12	0,75

4.1.5. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliğini göstermek için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları yapılarak elde edilen bulgular ortalama, standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) değerleri ile ifade edilmiştir.

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

hareketle ortalama, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. Her 3 (düşük, orta, yüksek) konsantrasyon değerinde hesaplanan % varyasyon katsayısı değerleri atorvastatin için % 1'den, pravastatin için % 4'ten, simvastatin ve lovastatin için % 2'den küçük bulunmuştur. Değerlerin % 15'ten düşük çıkması yöntemin gün içinde kesinliğini göstermektedir.

Günler arası kesinlik çalışmaları için kalibrasyon doğrusu aralığında kalan ve çalışılacak numunelerin konsantrasyonları da göz önüne alınarak düşük, orta ve yüksek düzeyde üç konsantrasyon belirlenerek her konsantrasyon noktası için 6 farklı günde standartlar hazırlanmıştır. Hazırlanan standartların maddeye ait miktar tayini yöntemi kullanılarak analizleri yapılmış ve elde edilen bulgulardan hareketle ortalama, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. Her 3 (düşük, orta, yüksek) konsantrasyon değerinde hesaplanan % varyasyon katsayısı değerleri atorvastatin için % 1'den, pravastatin için % 3'ten, lovastatin için % 2'den, simvastatin için % 7'den küçük bulunmuştur. Değerlerin % 15'ten düşük çıkması yöntemin günler arasında kesinliğini göstermektedir.

Atorvastatin için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular Tablo 4.10'da verilmiştir. Çalışılan konsantrasyonlara ait varyasyon katsayısı değerleri %1'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.10. Atorvastatine için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Gün İçi ($\mu\text{g/mL}$)	Günler Arası ($\mu\text{g/mL}$)
4	4,020	3,938
	4,025	3,970
	4,063	3,982
	4,048	4,016
	4,041	3,970
	4,069	4,004
Ortalama	4,044	3,980
SS	0,020	0,028
%VK	0,488	0,701
16	16,099	15,687
	16,007	16,052
	15,964	16,010
	15,949	15,789
	15,883	15,960
	15,951	15,900
Ortalama	15,976	15,900
SS	0,072	0,139
%VK	0,452	0,873
64	63,865	64,494
	64,101	64,684
	63,942	63,569
	63,901	63,926
	63,241	64,005
	63,665	64,400
Ortalama	63,786	64,180
SS	0,302	0,417
%VK	0,473	0,650

Pravastatin için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular Tablo 4.11’de verilmiştir. Çalışılan konsantrasyonlara ait varyasyon katsayısı değerleri %4’ten küçük bulunmuştur.

Tablo 4.11. Pravastatin için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Gün İçi ($\mu\text{g/mL}$)	Günler Arası ($\mu\text{g/mL}$)
2	1,688	1,867
	1,816	1,913
	1,639	2,031
	1,660	1,940
	1,717	1,963
	1,675	1,926
	Ortalama	1,699
SS	0,063	0,055
%VK	3,699	2,816
8	8,192	7,512
	8,195	7,545
	8,278	7,700
	8,193	7,517
	8,194	7,583
	8,192	7,530
	Ortalama	8,207
SS	0,034	0,071
%VK	0,420	0,941
32	33,197	31,399
	33,557	30,570
	33,770	31,154
	33,411	31,696
	33,700	31,757
	33,464	32,354
	Ortalama	33,517
SS	0,208	0,605
%VK	0,620	1,920

Simvastatin için gün içi ve günler arası keskinlik çalışmalarından elde edilen bulgular Tablo 4.12’de verilmiştir. Çalışılan konsantrasyonlara ait varyasyon katsayısı değerleri %7’den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.12. Simvastatin içingün içi ve günler arası keskinlik çalışmalarından elde edilen bulgular.

Konsantrasyon (µg/mL)	Gün İçi (µg/mL)	Günler Arası (µg/mL)
2	1,918	1,137
	1,870	1,232
	1,868	1,342
	1,893	1,336
	1,892	1,345
	1,949	1,359
	Ortalama	1,898
SS	0,031	0,089
%VK	1,624	6,877
8	7,142	8,402
	7,103	8,430
	7,104	8,401
	7,172	8,313
	7,123	8,400
	7,091	8,427
	Ortalama	7,122
SS	0,030	0,043
%VK	0,421	0,506
32	31,399	31,545
	31,662	32,608
	31,539	32,765
	31,508	32,510
	31,494	32,520
	31,522	32,760
	Ortalama	31,521
SS	0,085	0,458
%VK	0,270	1,411

Lovastatin için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular Tablo 4.13’de verilmiştir. Çalışılan konsantrasyonlara ait varyasyon katsayısı değerleri %2’den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.13. Lovastatin için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen bulgular.

Konsantrasyon (µg/mL)	Gün İçi (µg/mL)	Günler Arası (µg/mL)
2	1,990	1,874
	1,936	1,922
	1,938	1,882
	1,947	1,918
	1,944	1,833
	1,957	1,893
	Ortalama	1,952
SS	0,020	0,033
%VK	1,029	1,726
8	8,086	8,133
	7,990	8,029
	8,036	8,083
	7,901	8,033
	8,097	8,333
	8,079	8,313
	Ortalama	8,032
SS	0,075	0,137
%VK	0,936	1,674
32	32,453	32,515
	32,215	32,211
	32,263	32,152
	32,164	32,658
	32,218	32,928
	32,119	32,879
	Ortalama	32,239
SS	0,116	0,328
%VK	0,360	1,007

4.1.6. Duyarlılık

Çalışmada kullanılan maddelerin bilinen konsantrasyonlardaki stok çözeltilerinin seyreltilmesiyle elde edilen örneklerin her bir maddeye özgü yöntemle analizi yapılarak sinyal/gürültü oranları tespit edilmiştir. Sinyal/gürültü oranı 3.3 olan konsantrasyon LOD, 10 olan konsantrasyon ise LOQ olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan maddelere ait LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.14. Çalışmada kullanılan maddelerin duyarlılık bulguları.

	Atorvastatin	Pravastatin	Lovastatin	Simvastatin
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,035	0,183	0,198	0,293
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,106	0,555	0,599	0,888

4.1.7. Stabilite

HEPES tamponu içerisine atorvastatin (4 ve 64 $\mu\text{g/mL}$), pravastatin, lovastatin, simvastatin (2 ve 32 $\mu\text{g/mL}$) belirtilen konsantrasyonlarda eklenerek standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler hazırlandıktan hemen sonra ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurma-çözme işlemi uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra analiz edilerek hesaplanan konsantrasyon değerleri Tablo 4.15'de verilmiştir. %VK değerlerinin %3'ten küçük bulunması analizi yapılan etkin maddelerin saklama süresi boyunca çözelti içinde bozunmadığını göstermektedir.

Tablo 4.15. Çalışmada kullanılan maddelerin stabilite çalışmalarından elde edilen bulgular (Ortalama \pm SS; n=3).

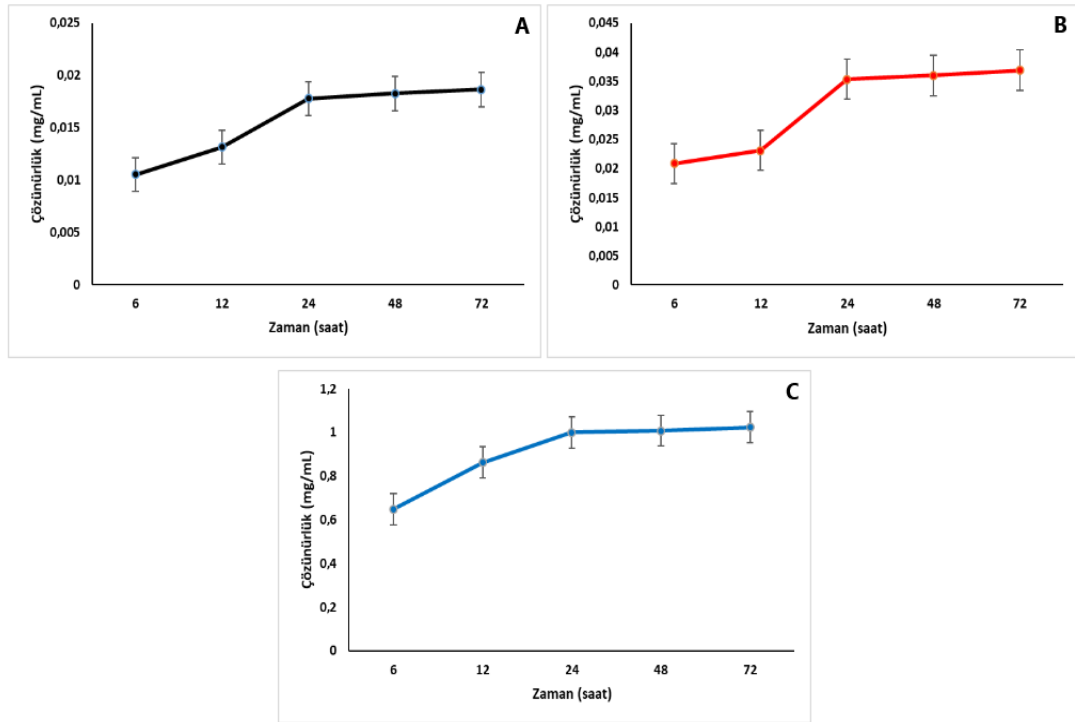
Madde	Gerçek Konsan trasyon $\mu\text{g/mL}$	0. saat	24. saat Dondur ma- çözme	48. saat Dondur ma- çözme	Ort	SS	% VK
Atorva- statin	4	3.970	4.048	4.020	4.013	0.039	0.985
	64	64.101	63.665	64.180	63.982	0.277	0.434
Prava- statin	2	1.963	1.940	2.031	1.978	0.047	2.377
	32	32.354	33.197	32.696	32.749	0.424	1.294
Simva- statin	2	2.198	2.248	2.159	2.200	0.043	1.951
	32	32.108	32.165	32.210	32.161	0.051	0.159
Lova- statin	2	1.997	2.044	2.057	2.033	0.032	1.551
	32	32.215	32.263	32.164	32.214	0.050	0.154

4.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüğünü Tayin Etmek Amacıyla Yapılan Çalışmalar

Atorvastatinin farklı tamponlarda (pH 1.2, 4.5 ve 6.8) ve farklı bekletme sürelerinde (6, 12, 24, 48 ve 72 saat) gerçekleştirilen çözünürlük çalışma sonuçları Tablo 4.16'da, elde edilen çözünürlük profilleri Şekil 4.17'de verilmiştir. Elde edilen çözünürlük profillerine göre her 3 tampon ortamında da eğrinin 24 saatten sonra sabitlendiği görülmektedir. Bu nedenle atorvastatinin doyumluk çözünürlüğü 24 saatten sonra elde edilen sonuçların ortalaması alınarak belirlenmiştir.

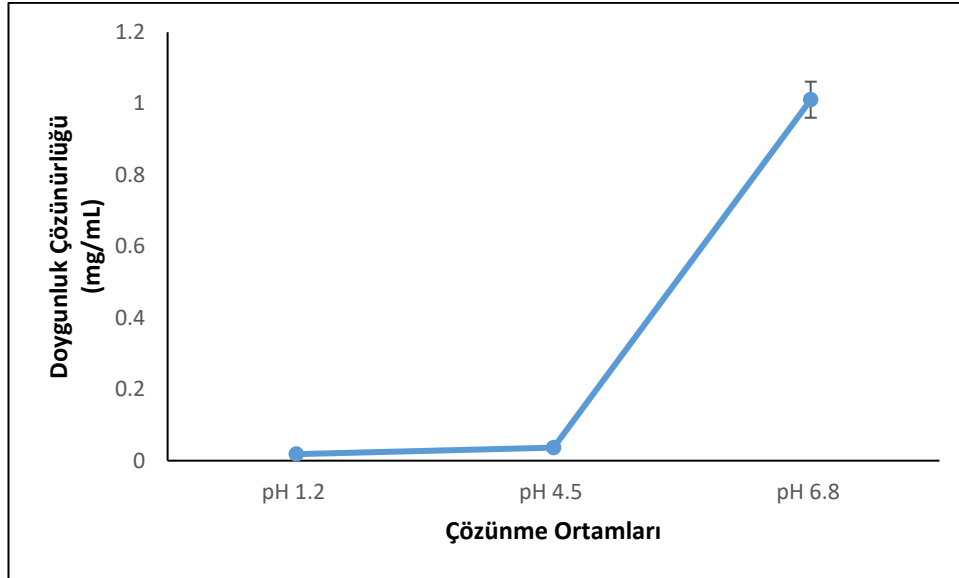
Tablo 4.16. Atorvastatinin farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerinde elde edilen çözünürlük sonuçları (mg/mL; Ortalama \pm SS; n=3).

Zaman (saat)	Çözünürlük (mg/mL)		
	pH 1.2	pH 4.5	pH 6.8
6	0,0105 \pm 0,0005	0,0209 \pm 0,0003	0,6490 \pm 0,0316
12	0,0131 \pm 0,0003	0,0231 \pm 0,0003	0,8628 \pm 0,0067
24	0,0178 \pm 0,0010	0,0353 \pm 0,0030	0,9998 \pm 0,0013
48	0,0183 \pm 0,0003	0,0360 \pm 0,0014	1,0087 \pm 0,0091
72	0,0186 \pm 0,0006	0,0369 \pm 0,0015	1,0245 \pm 0,0060



Şekil 4.17. Atorvastatinin pH 1.2 (A), pH 4.5 (B) ve pH 6.8 (C) tamponlarındaki zamana bağlı çözünürlük profilleri (Ortalama \pm SS; n=3).

Atorvastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki ortalama doygunluk çözünürlük değerleri sırasıyla $0,0182 \pm 0,0004$; $0,0360 \pm 0,007$ ve $1,011 \pm 0,0125$ mg/mL olarak hesaplanmıştır. Farklı ortamlardaki doygunluk çözünürlüğü Şekil 4.18'te verilmiştir.



Şekil 4.18. Atorvastatinin farklı çözünme ortamlarındaki doyunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).

Atorvastatinin en yüksek terapötik dozunun (80 mg) farklı ortamlarda belirlenen çözünürlük değerlerine bölünmesi ile hesaplanan DSV değerleri Tablo 4.17’de verilmiştir. DSV değeri pH 6.8 tamponunda 250 mL’den küçük olmasına rağmen, pH 1.2 ve 4.5 tamponlarında 250 mL’den büyük bulunmuştur. Bu durum atorvastatinin Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre çözünürlüğünün düşük olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.17. Atorvastatin için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).

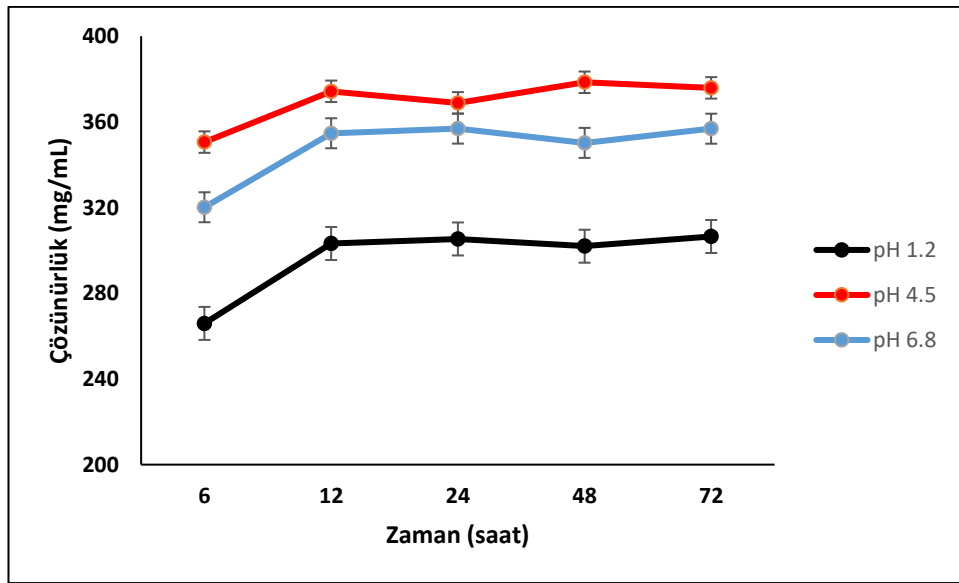
Ortam	DSV (mL)
pH 1.2 HCl tamponu	5373,60 \pm 1448,34
pH 4.5 asetat tamponu	2789,30 \pm 794,82
pH 6.8 fosfat tamponu	90,68 \pm 19,15

Pravastatinin farklı tamponlarda (pH 1.2, 4.5 ve 6.8) ve farklı bekleme sürelerinde (6, 12, 24, 48 ve 72 saat) gerçekleştirilen çözünürlük çalışma sonuçları Tablo 4.18’de, elde edilen çözünürlük profilleri Şekil 4.19’da verilmiştir. Elde edilen çözünürlük profillerine göre her 3 tampon ortamında da eğrinin 12 saatten sonra

sabitlendiği görülmektedir. Bu nedenle pravastatinin doygunluk çözünürlüğü 12 saatten sonra elde edilen sonuçların ortalaması alınarak belirlenmiştir.

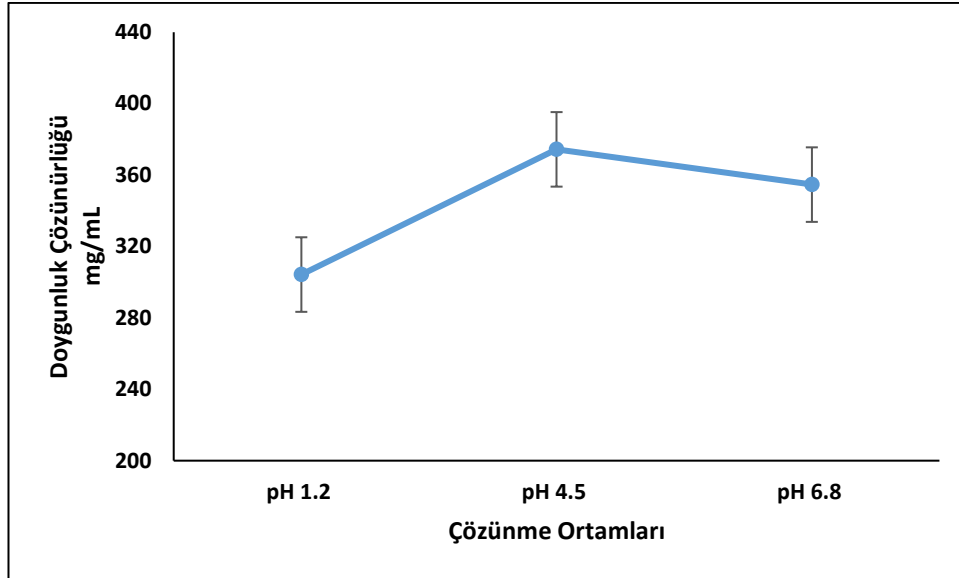
Tablo 4.18. Pravastatinin farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerine ait çözünürlük sonuçları (mg/mL; Ortalama \pm SS; n=3).

Zaman (saat)	pH 1.2 Tamponu	pH 4.5 Tamponu	pH 6.8 Tamponu
6	265,929 \pm 12,791	350,563 \pm 5,781	320,146 \pm 4,839
12	303,215 \pm 12,727	374,275 \pm 4,806	354,682 \pm 5,302
24	305,344 \pm 5,652	368,878 \pm 7,253	356,868 \pm 6,435
48	301,961 \pm 8,108	378,491 \pm 9,093	350,193 \pm 12,695
72	306,491 \pm 8,518	375,879 \pm 7,645	356,821 \pm 7,324



Şekil 4.19. Pravastatinin farklı tamponlardaki zamana bağlı çözünürlük profili (Ortalama \pm SS; n=3).

Pravastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki ortalama doygunluk çözünürlük değerleri sırasıyla 304,253 \pm 2,044; 374,381 \pm 4,059 ve 354,641 \pm 3,136 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Farklı ortamlardaki doygunluk çözünürlüğü Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Pravastatinin farklı çözünme ortamlarındaki doğunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).

Pravastatinin en yüksek terapötik dozunun (40 mg) farklı ortamlarda belirlenen çözünürlük değerlerine bölünmesi ile hesaplanan DSV değerleri Tablo 4.19'da verilmiştir. DSV değeri her 3 tampon ortamında da 250 mL'den küçük bulunmuştur. Bu durum pravastatinin Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre çözünürlüğünün yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.19. Pravastatin için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).

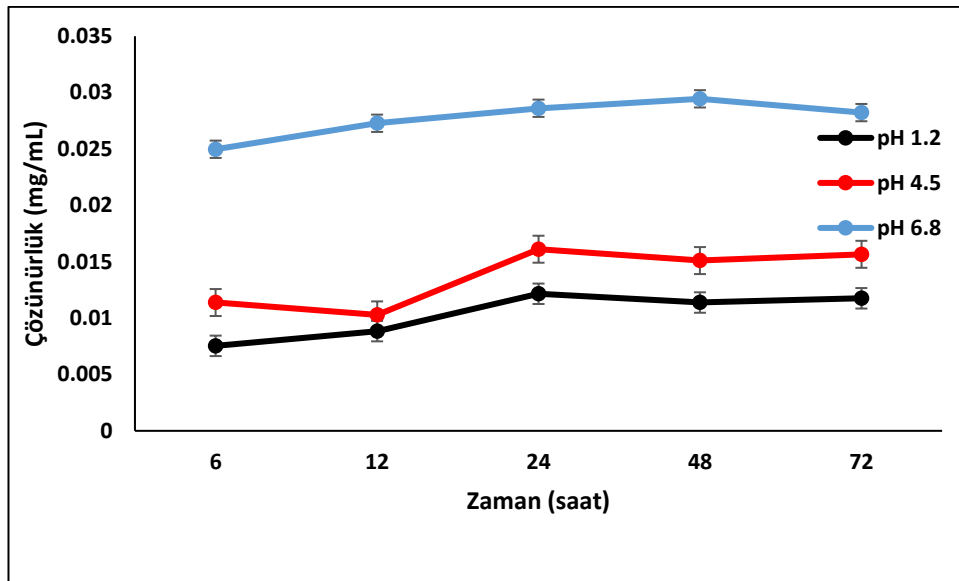
Ortam	DSV (mL)
pH 1.2 HCl tamponu	0,135 \pm 0,009
pH 4.5 asetat tamponu	0,108 \pm 0,003
pH 6.8 fosfat tamponu	0,115 \pm 0,006

Simvastatinin farklı tamponlarda (pH 1.2, 4.5 ve 6.8) ve farklı bekletme sürelerinde (6, 12, 24, 48 ve 72 saat) gerçekleştirilen çözünürlük çalışma sonuçları Tablo 4.20'de, elde edilen çözünürlük profilleri Şekil 4.21'de verilmiştir. Elde edilen çözünürlük profillerine göre her 3 tampon ortamında da eğrinin 24 saatten sonra

sabitlendiği görülmektedir. Bu nedenle pravastatinin doygunluk çözünürlüğü 24 saatten sonra elde edilen sonuçların ortalaması alınarak belirlenmiştir.

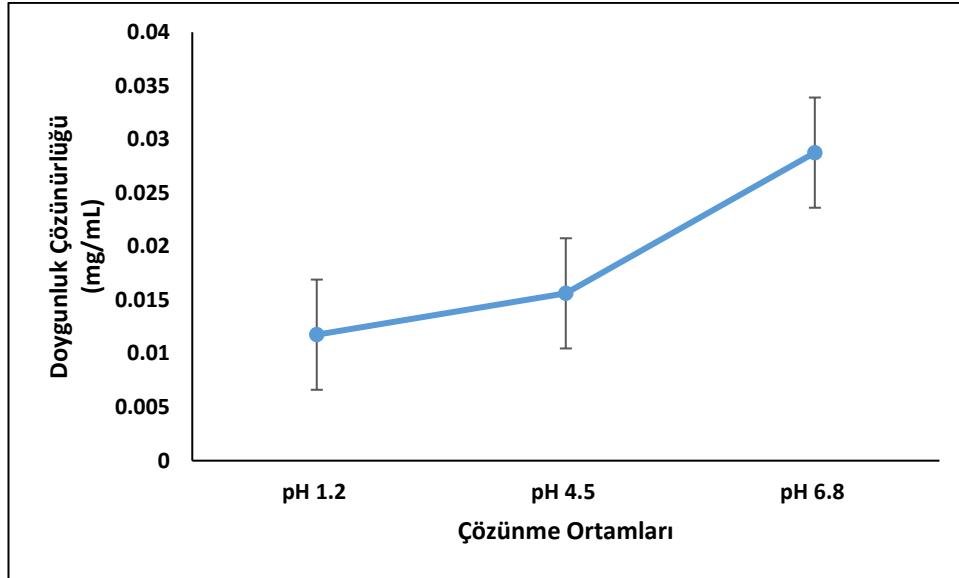
Tablo 4.20. Simvastatinin farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerine ait çözünürlük sonuçları (mg/mL; Ortalama \pm SS; n=3).

Zaman (saat)	pH 1.2 Tamponu	pH 4.5 Tamponu	pH 6.8 Tamponu
6	0,008 \pm 0,003	0,011 \pm 0,003	0,025 \pm 0,004
12	0,009 \pm 0,002	0,01 \pm 0,002	0,027 \pm 0,002
24	0,012 \pm 0,003	0,016 \pm 0,002	0,029 \pm 0,003
48	0,011 \pm 0,002	0,015 \pm 0,002	0,029 \pm 0,003
72	0,012 \pm 0,003	0,016 \pm 0,004	0,028 \pm 0,003



Şekil 4.21. Simvastatinin farklı tamponlardaki zamana bağlı çözünürlük profili (Ortalama \pm SS; n=3).

Simvastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki ortalama doygunluk çözünürlük değerleri sırasıyla $0,0118 \pm 0,0004$; $0,0156 \pm 0,0005$ ve $0,0288 \pm 0,0006$ mg/mL olarak hesaplanmıştır. Farklı ortamlardaki doygunluk çözünürlüğü Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.22. Simvastatinin farklı çözünme ortamlarındaki doyunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).

Simvastatinin en yüksek terapötik dozunun (80 mg) farklı ortamlarda belirlenen çözünürlük değerlerine bölünmesi ile hesaplanan DSV değerleri Tablo 4.21’de verilmiştir. DSV değeri her 3 tampon ortamında da 250 mL’den büyük bulunmuştur. Bu durum Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre simvastatinin çözünürlüğünün düşük olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.21. Simvastatin için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).

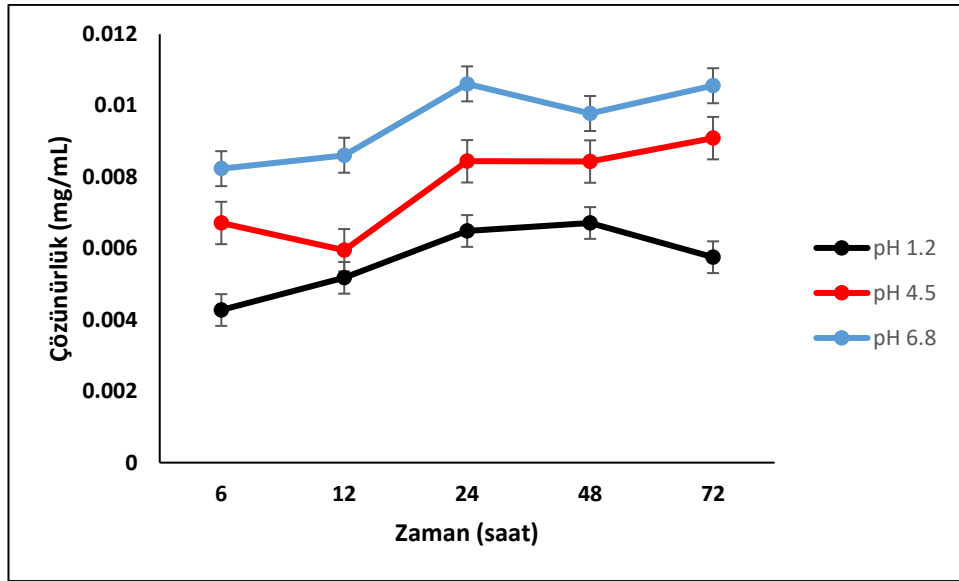
Ortam	DSV (mL)
pH 1.2 HCl tamponu	8016,54 \pm 1754,84
pH 4.5 asetat tamponu	6037,25 \pm 1282,33
pH 6.8 fosfat tamponu	2896,89 \pm 188,28

Lovastatinin farklı tamponlarda (pH 1.2, 4.5 ve 6.8) ve farklı bekletme sürelerinde (6, 12, 24, 48 ve 72 saat) gerçekleştirilen çözünürlük çalışma sonuçları Tablo 4.22’de, elde edilen çözünürlük profilleri Şekil 4.23’de verilmiştir. Elde edilen çözünürlük profillerine göre her 3 tampon ortamında da eğrinin 24 saatten sonra

sabitlendiği görülmektedir. Bu nedenle lovastatinin doygunluk çözünürlüğü 24 saatten sonra elde edilen sonuçların ortalaması alınarak belirlenmiştir.

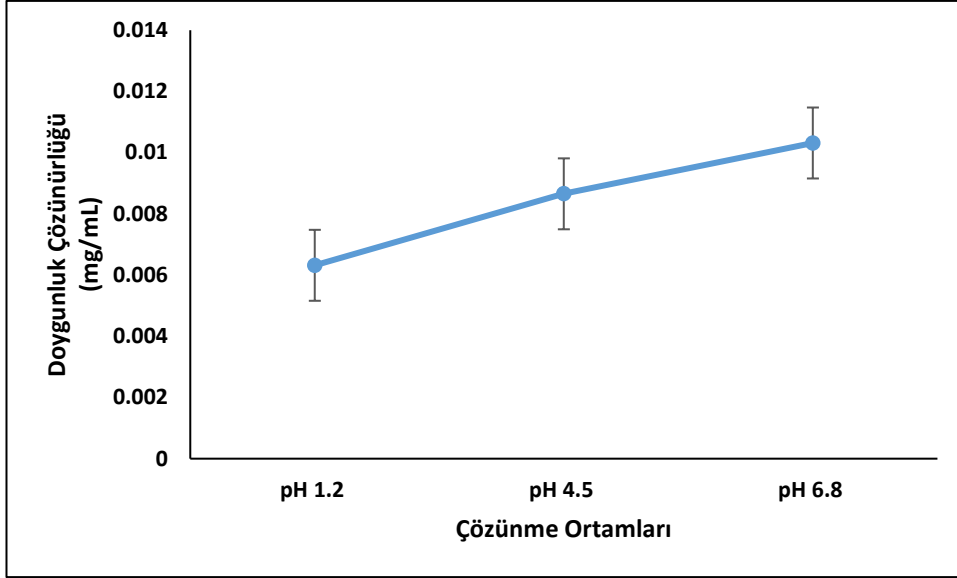
Tablo 4.22. Lovastatinin farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerine ait çözünürlük sonuçları (mg/mL; Ortalama \pm SS; n=3).

Zaman (saat)	pH 1.2 Tamponu	pH 4.5 Tamponu	pH 6.8 Tamponu
6	0,0043 \pm 0,0003	0,0067 \pm 0,0017	0,0082 \pm 0,0011
12	0,0052 \pm 0,001	0,0059 \pm 0,0008	0,0086 \pm 0,0017
24	0,0065 \pm 0,0018	0,0084 \pm 0,0013	0,0106 \pm 0,0006
48	0,0067 \pm 0,0013	0,0084 \pm 0,0013	0,0098 \pm 0,0026
72	0,0058 \pm 0,0014	0,0091 \pm 0,0009	0,0106 \pm 0,0009



Şekil 4.23. Lovastatinin farklı tamponlardaki zamana bağlı çözünürlük profilleri (Ortalama \pm SS; n=3).

Lovastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki ortalama doygunluk çözünürlük değerleri sırasıyla $0,0063 \pm 0,0005$; $0,0087 \pm 0,0004$ ve $0,0103 \pm 0,0005$ mg/mL olarak hesaplanmıştır. Farklı ortamlardaki doygunluk çözünürlüğü grafiği ise Şekil 4.24'de verilmiştir.



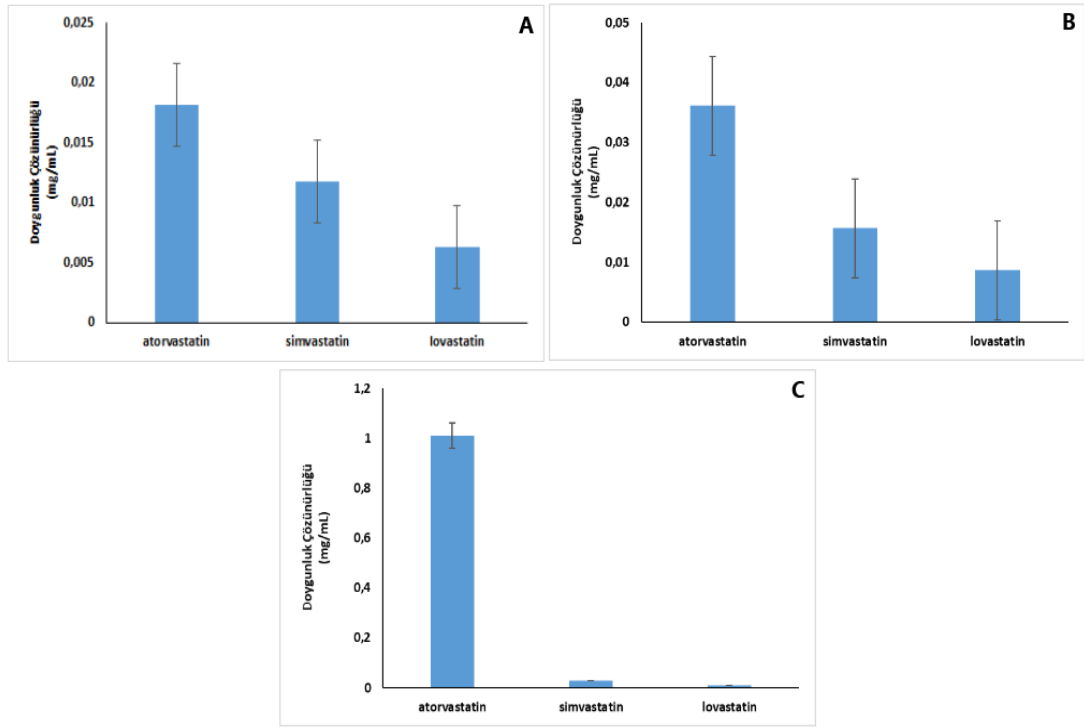
Şekil 4.24. Lovastatinin farklı çözünme ortamlarındaki doğunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).

Lovastatinin en yüksek terapötik dozunun (20 mg) farklı ortamlarda belirlenen çözünürlük değerlerine bölünmesi ile hesaplanan DSV değerleri Tablo 4.23’de verilmiştir. DSV değeri her 3 tampon ortamında da 250 mL’den büyük bulunmuştur. Bu durum Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre lovastatinin çözünürlüğünün düşük olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.23. Lovastatin için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).

Ortam	DSV (mL)
pH 1.2 HCl tamponu	3616,31 \pm 689,37
pH 4.5 asetat tamponu	2656,71 \pm 493,35
pH 6.8 fosfat tamponu	2115,40 \pm 249,08

Elde edilen bulgulara göre düşük çözünürlüğe sahip olduğu bulunan 3 etkin maddenin (atorvastatin, simvastatin, lovastatin) farklı tamponlardaki doğunluk çözünürlüğü değerleri Şekil 4.25’te verilmiştir.

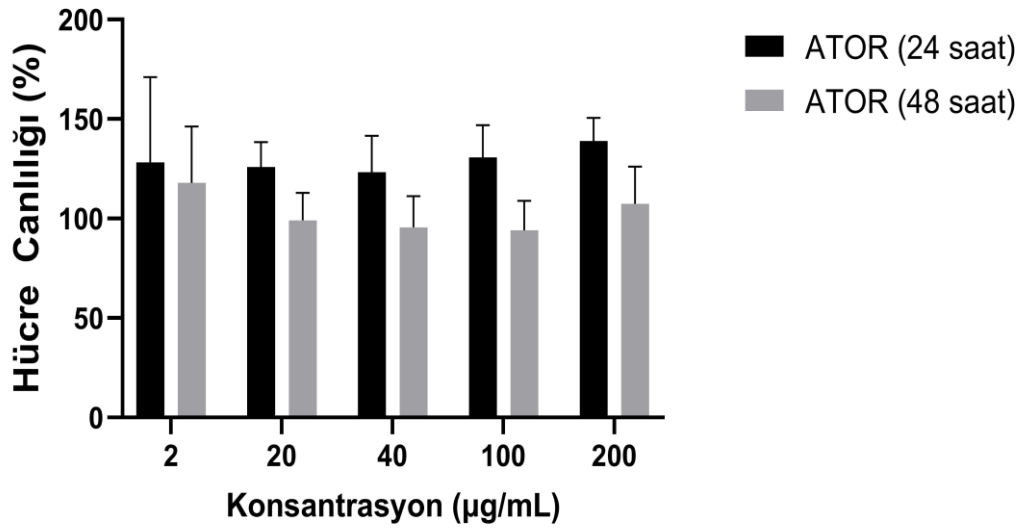


Şekil 4.25. Atorvastatin, simvastatin ve lovastatinin pH 1.2 (A), pH 4.5 (B) ve pH 6.8 (C) ortamlarında tayin edilen karşılaştırmalı doygunluk çözünürlük değerleri (Ortalama \pm SS; n=3).

4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

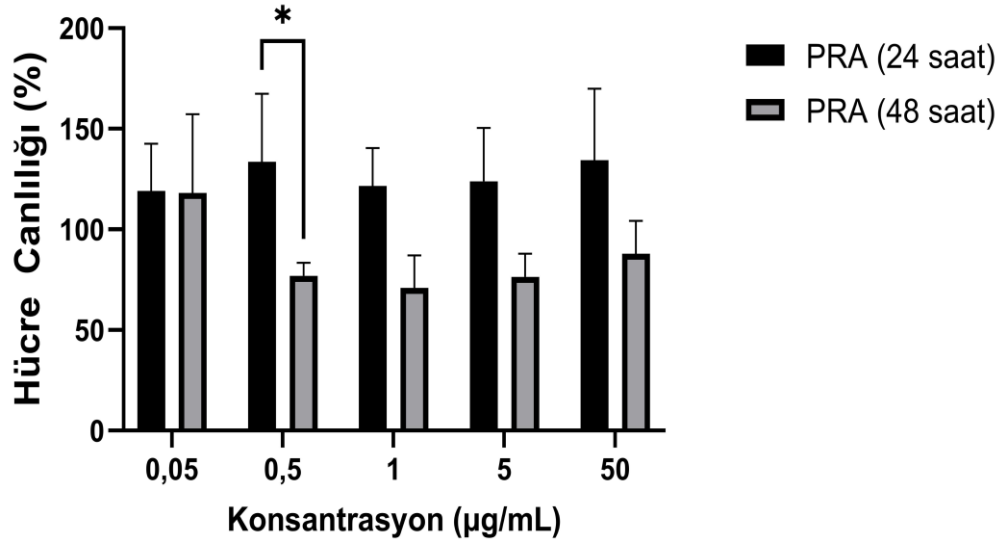
4.3.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Atorvastatin: Farklı konsantrasyonlarda (2, 20, 40, 100, 200 μ g/mL) hazırlanan atorvastatin çözeltilerinin Caco-2 hücreleri ile 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.26'da verilmiştir. 24 saat sonunda hiçbir konsantrasyon değerinde sitotoksik etki gözlenmemiştir. 48 saat inkübasyonda atorvastatin konsantrasyonu 100 μ g/mL'ye kadar arttıkça hücre canlılığını azalmıştır. Ayrıca inkübasyon süresi arttıkça sitotoksitenin arttığı gözlenmiştir. Fakat konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında meydana gelen azalma anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre permeabilite tayininde atorvastatin için kullanılacak konsantrasyon değeri 100 μ g/mL olarak belirlenmiştir.



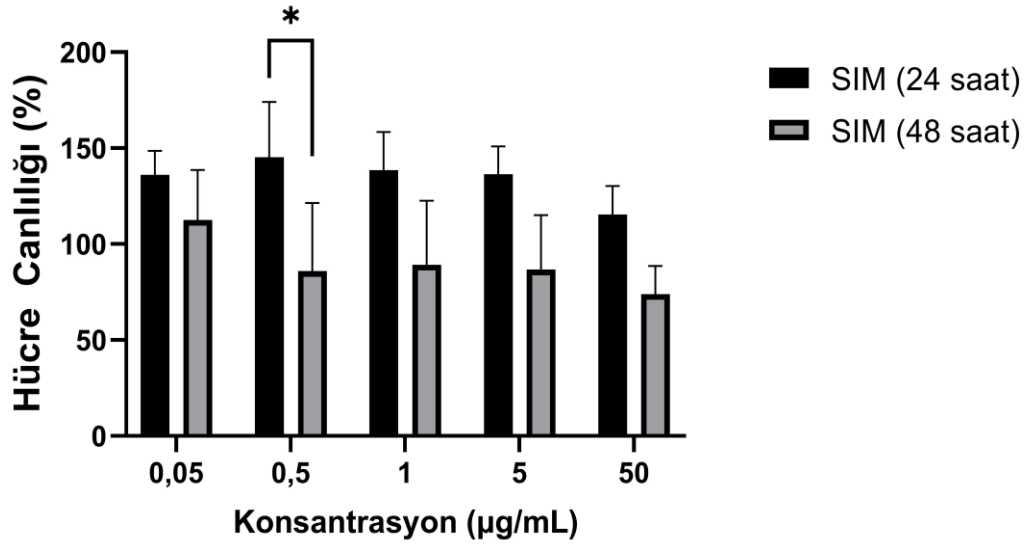
Şekil 4.26. Farklı konsantrasyonlarda atorvastatin (ATOR) içeren çözeltilerin Caco-2 hücre canlılığı üzerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresinin etkisi (Ortalama \pm SS; n=5).

Pravastatin: Farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.5, 1, 5, 50 µg/mL) hazırlanan pravastatin çözeltilerinin Caco-2 hücreleri ile 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.27’de verilmiştir. 24 saat inkübasyonda bütün konsantrasyonlarda hücre canlılığının %100’ün üzerinde olduğu ve 48 saat inkübasyonda tüm konsantrasyonlarda sitotoksitenin arttığı gözlenmiştir. Bu artış sadece 0.5 µg/mL konsantrasyonda anlamlı bulunmuştur (p=0.0273). Elde edilen sonuçlara göre permeabilite tayininde pravastatin için kullanılacak konsantrasyon değeri 50 µg/mL olarak belirlenmiştir.



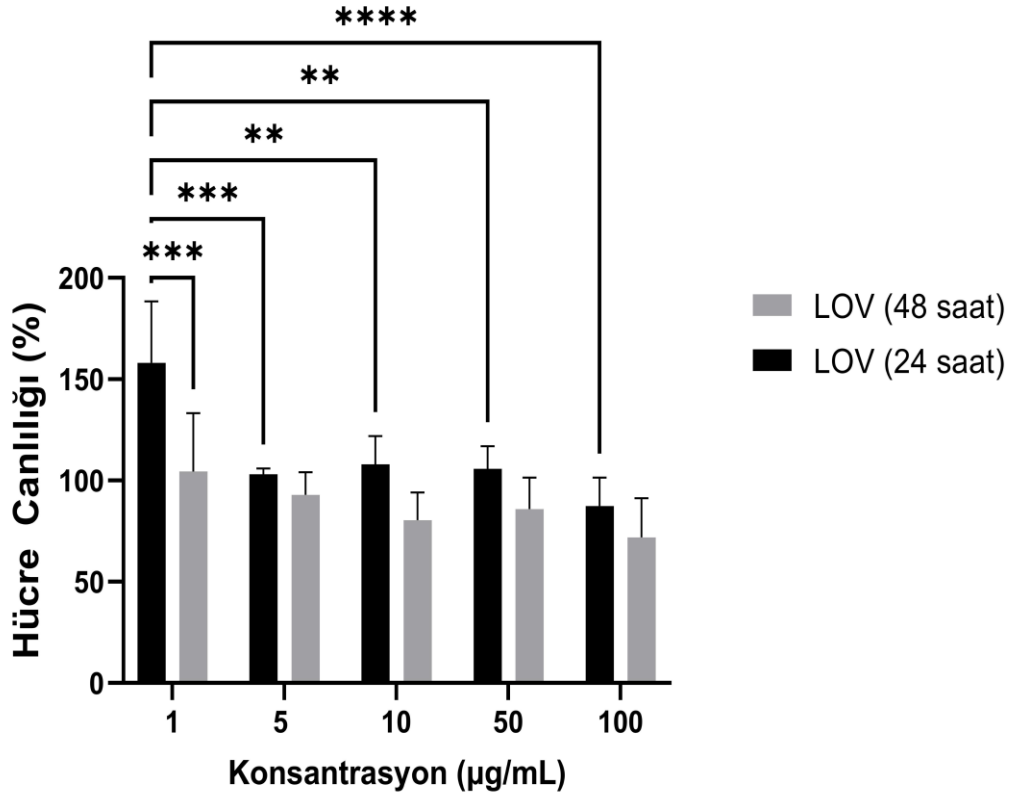
Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonlarda pravastatin (PRA) içeren çözeltilerin Caco-2 hücre canlılığı üzerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresinin etkisi (Ortalama \pm SS; n=5). *p=0.0273

Simvastatin: Farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.5, 1, 5, 50 µg/mL) hazırlanan simvastatin çözeltilerinin Caco-2 hücreleri ile 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.28’de verilmiştir. 24 saat inkübasyonda 0.5-50 µg/mL arası ve 48 saat inkübasyonda 1-50 µg/mL arası konsantrasyonlarda madde konsantrasyonu ile ters orantılı olarak hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. İnkübasyon süresinin uzaması sitotoksiteyi artırmıştır. Özellikle 0.5 µg/mL konsantrasyonda 48 saat sonunda hücre canlılığı önemli derecede (p=0.0131) azalmıştır. Elde edilen sonuçlara göre permeabilite tayininde simvastatin için kullanılacak konsantrasyon değeri 50 µg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlarda simvastatin (SIM) içeren çözeltilerin Caco-2 hücre canlılığı üzerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresinin etkisi (Ortalama \pm SS; n=5). *p=0.0131

Lovastatin: Farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 50, 100 µg/mL) hazırlanan lovastatin çözeltilerinin Caco-2 hücreleri ile 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.29’da verilmiştir. 24 saat inkübasyonda konsantrasyonun artması hücre canlılığını önemli derecede azaltmıştır. İnkübasyon süresinin artması bütün konsantrasyon değerlerinde sitotoksiteyi artırmıştır. Ancak bu artış 1 µg/mL konsantrasyonda anlamlı (p=0.001) bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre permeabilite tayininde lovastatin için kullanılacak konsantrasyon değeri 100 µg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda lovastatin (LOV) içeren çözeltilerin Caco-2 hücre canlılığı üzerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresinin etkisi (Ortalama \pm SS; n=5). **p<0.003; ***p \leq 0.001; ****p<0.0001

4.3.2. Model İlaçların Permeabilitesinin İncelenmesi

Caco-2 hücrelerinin pasajlanmasının ardından 12 kuyucuklu insertlere ekilen hücreler 21 gün inkübe edilerek TEER (transepitel elektrik rezistansı) değerleri ölçülmüştür. TEER değeri 600-1000 ohm·cm² ulaşan hücreler ile permeabilite çalışmaları yapılmıştır. Bütün deney gruplarında ölçülen TEER değerleri (Tablo 4.24) uygun bulunmuştur.

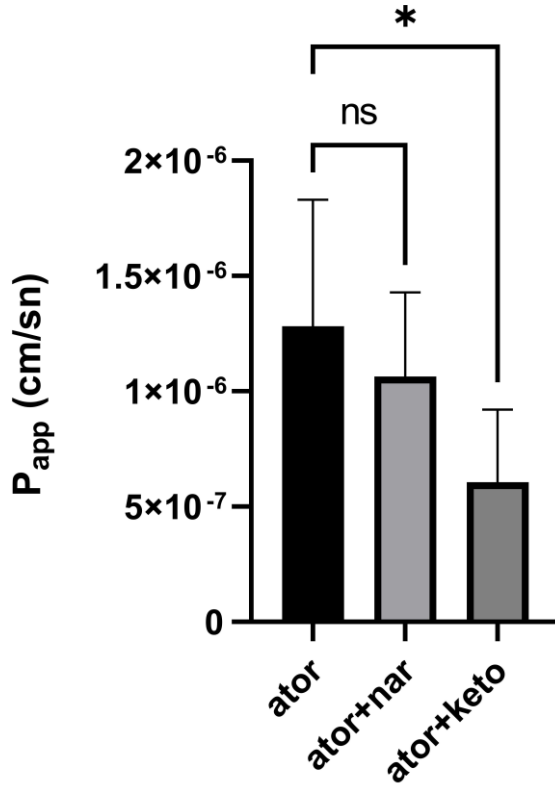
Tablo 4.24. Deney grupları için Caco-2 hücrelerinden ölçülen TEER değerleri (Ortalama \pm SS; n=7).

Grup	TEER değeri (ohm·cm ²)
Atorvastatin	1831 \pm 165.01
Atorvastatin + Naringin	1606.5 \pm 403.48
Atorvastatin + Ketokonazol	1917 \pm 71.49
Pravastatin	1891.5 \pm 98.02
Pravastatin + Naringin	1738 \pm 237.26
Pravastatin + Rifampin	1651.17 \pm 213.18
Lovastatin	1636,33 \pm 229,71
Lovastatin + Naringin	1808,83 \pm 138,53
Lovastatin + Elakridar	1796,17 \pm 86,43
Simvastatin	1763,17 \pm 129,96
Simvastatin + Naringin	1824,67 \pm 101,96
Simvastatin + Elakridar	1891,5 \pm 82,70

Model ilaçların permeabilitesi üzerine greyfurt suyu bileşeni naringinin etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar Bölüm 3.2.3.3'te Tablo 3.5'te verilmiştir. Bu çalışmalarda model ilaçların tek başlarına, greyfurt suyu bileşeni naringin varlığında ve spesifik inhibitörler varlığında Caco-2 hücrelerinde apikal'den bazolaterale P_{app} (cm/sn) değerleri tayin edilmiştir.

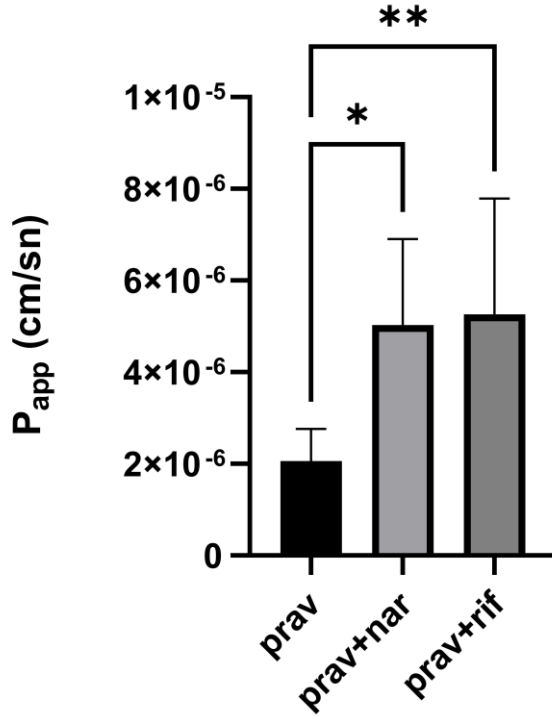
Atorvastatin: Atorvastatinin tek başına (kontrol), greyfurt suyu bileşeni naringin ve CYP3A4 inhibitörü ketokonazol varlığında hesaplanan görünür permeabilite (P_{app} ; cm/sn) Şekil 4.30'da verilmiştir. Atorvastatinin Caco-2

hücrelerinden permeabilitesi naringin varlığında önemli derecede değişmezken, ketokonazol varlığında önemli derecede ($p=0.0142$) azalmıştır.



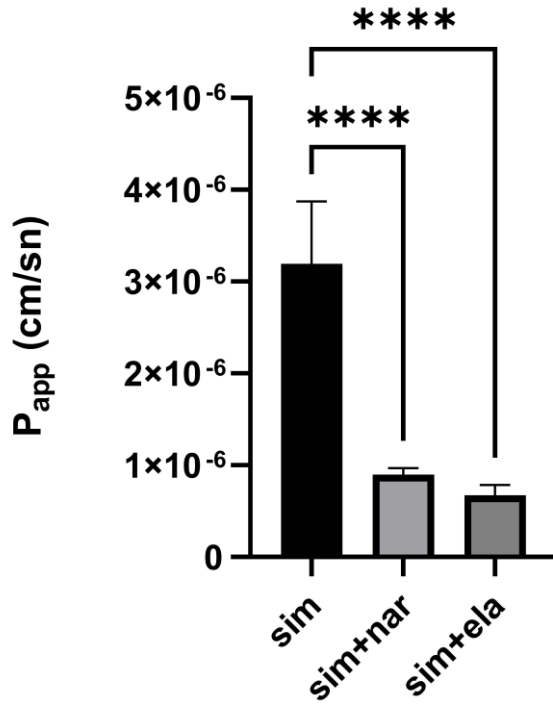
Şekil 4.30. Atorvastatinin (ator) naringin (nar) ve ketokonazol (keto) varlığında tayin edilen görünür permeabilite (P_{app}) değerleri (cm/sn; Ortalama \pm SS; $n=7$). * $p=0.0142$

Pravastatin: Pravastatinin tek başına (kontrol), greyfurt suyu bileşeni naringin ve OATP inhibitörü rifampin varlığında hesaplanan görünür permeabilite (P_{app} , cm/sn) Şekil 4.31'de verilmiştir. Pravastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi hem naringin varlığında ($p=0.0148$) hem de rifampin varlığında ($p=0.0089$) önemli derecede artmıştır.



Şekil 4.31. Pravastatinin (prav) naringin (nar) ve rifampin (rif) varlığında tayin edilen görünür permeabilite (P_{app}) değerleri (cm/sn; Ortalama \pm SS; n=7). *p=0.0148; **p=0.0089

Simvastatin: Simvastatinin tek başına (kontrol), greyfurt suyu bileşeni naringin ve P-gp inhibitörü elakridar varlığında hesaplanan görünür permeabilite (P_{app}) Şekil 4.32’de verilmiştir. Simvastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi naringin ve elakridar varlığında ($p < 0.0001$) önemli derecede azalmıştır.



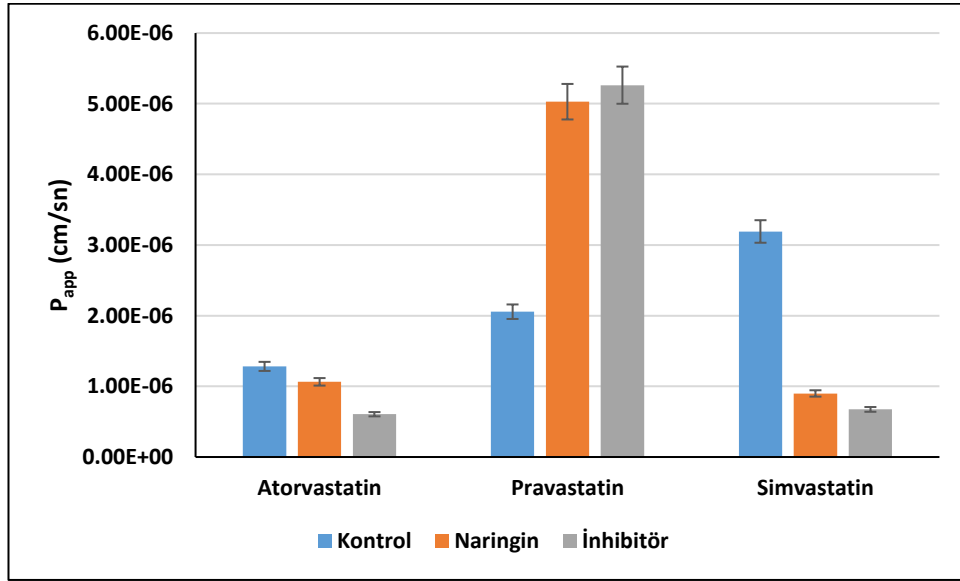
Şekil 4.32. Simvastatinin (sim) naringin (nar) ve elakridar (ela) varlığında tayin edilen görünür permeabilite (P_{app}) değerleri (cm/sn; Ortalama \pm SS; n=7). **** p<0.0001

Lovastatin: Lovastatinin tek başına (kontrol), greyfurt suyu bileşeni naringin ve P-gp inhibitörü elakridar varlığında görünür permeabilite (P_{app} , cm/sn) değerleri hesaplanamamıştır. Hücre kültürü çalışmaları sırasında hazırlanan lovastatin stok çözeltisine DMSO %1 konsantrasyonu aşmayacak şekilde eklenmesine rağmen tam çözünme sağlanmamış ve opak görünümde bir çözelti elde edilmiştir. Her üç grup için basolateral kompartmandan toplanan numunelerde yapılan HPLC analizi sonrasında kromatogramlarda lovastatin piki gözlemlenmediği için ilacın permeabilite katsayısı hesaplanamamıştır.

Çalışmada kullanılan tüm model etkin maddelerin Caco-2 hücrelerinde apikalden bazolaterale doğru permeabilite katsayıları Tablo 4.25 ve Şekil 4.33'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Tablo 4.25. Model etkin maddelerin görünür permeabilite (P_{app}) katsayıları ($\times 10^{-6}$ cm/sn; Ortalama \pm SS; n=7).

Madde	$P_{app} \times 10^{-6}$ (cm/sn)		
	Atorvastatin	Pravastatin	Simvastatin
Kontrol	1,283 \pm 0,548	2,059 \pm 0,701	3,192 \pm 0,682
Naringin	1,064 \pm 0,364	5,028 \pm 1,878	0,900 \pm 0,069
İnhibitör	0,606 \pm 0,315	5,263 \pm 2,524	0,674 \pm 0,111



Şekil 4.33. Model etkin maddelerin görünür permeabilite (P_{app}) katsayıları (cm/sn; Ortalama \pm SS; n=7).

4.4. *In Situ* Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları

Tüm perfüzyon deneylerinde kullanılan sıçanlara ait bilgiler Tablo 4.26’da verilmiştir.

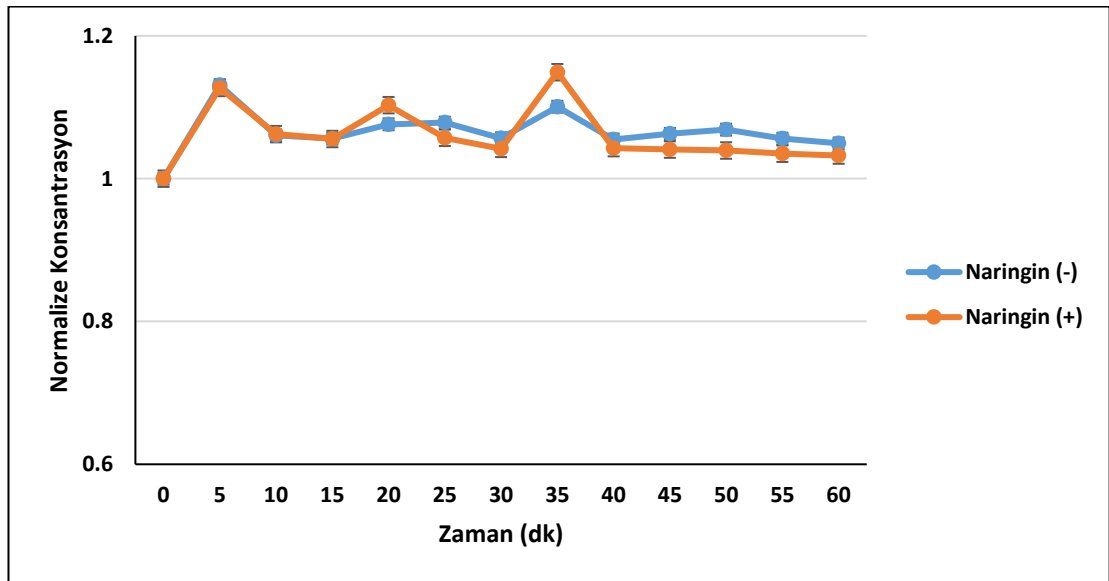
Tablo 4.26. Deney gruplarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler (Ortalama \pm SS).

Grup 1 (Atorvastatin + Naringin) (n=6)	
Sıçan ağırlığı (g)	289.67 \pm 33.09
Akış hızı (mL/dk)	
Q _{in}	0.195
Q _{out}	0.195
Perfüze edilen segment uzunluğu (İleum, cm)	4.38 \pm 0.88
Grup 2 (Atorvastatin + Ketokonazol) (n=6)	
Sıçan ağırlığı (g)	290 \pm 21.40
Akış hızı (mL/dk)	
Q _{in}	0.195
Q _{out}	0.197
Perfüze edilen segment uzunluğu (İleum, cm)	4.88 \pm 0.91
Grup 3 (Pravastatin + Naringin) (n=6)	
Sıçan ağırlığı (g)	289.67 \pm 26.99
Akış hızı (mL/dk)	
Q _{in}	0.190
Q _{out}	0.197
Perfüze edilen segment uzunluğu (İleum, cm)	5.47 \pm 0.45
Grup 4 (Pravastatin + Rifampin) (n=6)	
Sıçan ağırlığı (g)	270 \pm 39.26
Akış hızı (mL/dk)	
Q _{in}	0.192
Q _{out}	0.192
Perfüze edilen segment uzunluğu (İleum, cm)	5.68 \pm 1.31

4.4.1. Atorvastatinle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları

Atorvastatin-Naringin Grubuna Ait Bulgular

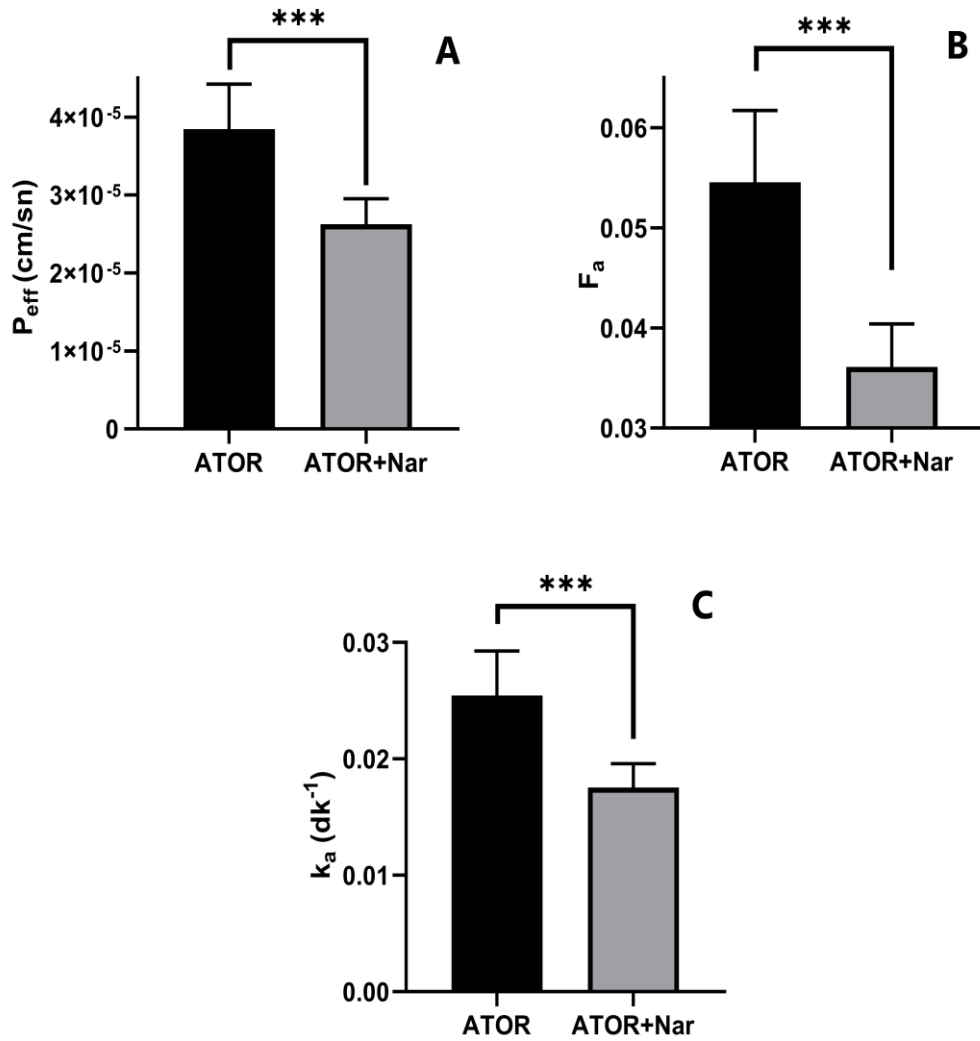
Naringinin CYP3A4 inhibitörü olarak kullanıldığı perfüzyon deneylerinde atorvastatinin ileum lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profili Şekil 4.34’de verilmiştir. Atorvastatin için naringin varlığında ve yokluğunda hesaplanan permeabilite (P_{eff} ; cm/sn), absorplanan fraksiyon (F_a) ve absorpsiyon hız sabiti (k_a ; dk⁻¹) değerleri Tablo 4.27 ve Şekil 4.35’de verilmiştir. Naringin kullanılan perfüzyon çalışmalarında atorvastatinin ileumdan absorpsiyonu önemli derecede ($p=0,0009$) azalmıştır. Ayrıca absorplanan fraksiyon ($p=0,0003$) ve absorpsiyon hız sabiti ($p=0,001$) değerleri de önemli derecede azalma göstermiştir.



Şekil 4.34. İnhibitör olarak naringin kullanılan çalışmalarda ileumun perfüzyonu sonucu elde edilen atorvastatine ait konsantrasyon-zaman profili (-): naringin yok; (+): naringin var (Ortalama \pm SS; n=6).

Tablo 4.27. Atorvastatin-naringin grubunda atorvastatin için tayin edilen P_{eff} , F_a ve k_a değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6).

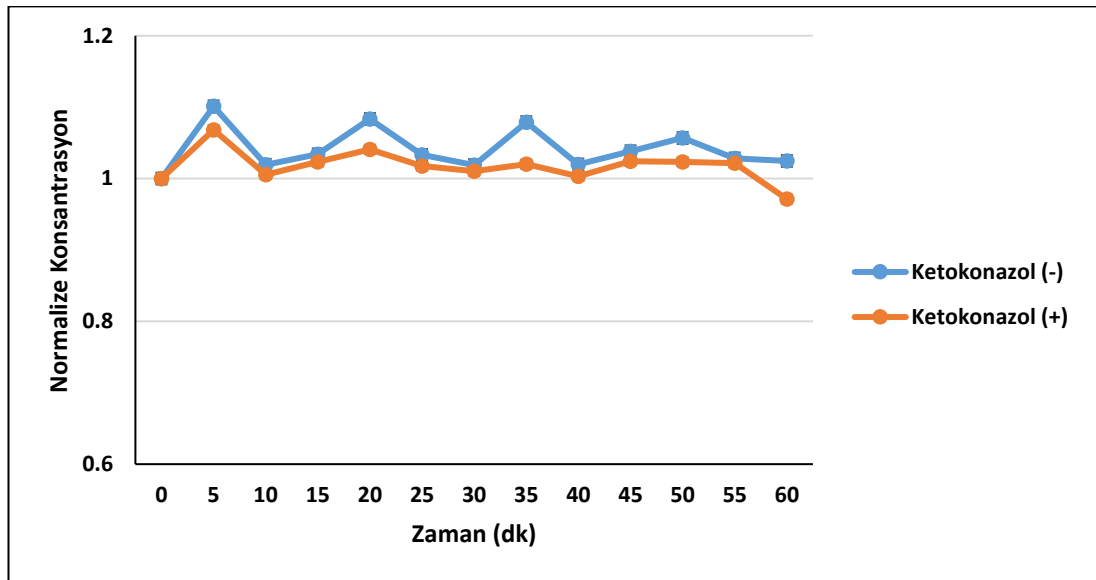
	P_{eff} (10^{-5} cm/sn)	F_a	k_a (dk^{-1})
Naringin (-)	$3,846 \pm 0,518$	$0,055 \pm 0,006$	$0,025 \pm 0,003$
Naringin (+)	$2,629 \pm 0,293$	$0,036 \pm 0,004$	$0,018 \pm 0,002$



Şekil 4.35. İnhibitör olarak naringin kullanılan çalışmalarda atorvastatin için tayin edilen P_{eff} (cm/sn; A) F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6). *** $p < 0.001$

Atorvastatin-Ketokonazol Grubuna Ait Bulgular

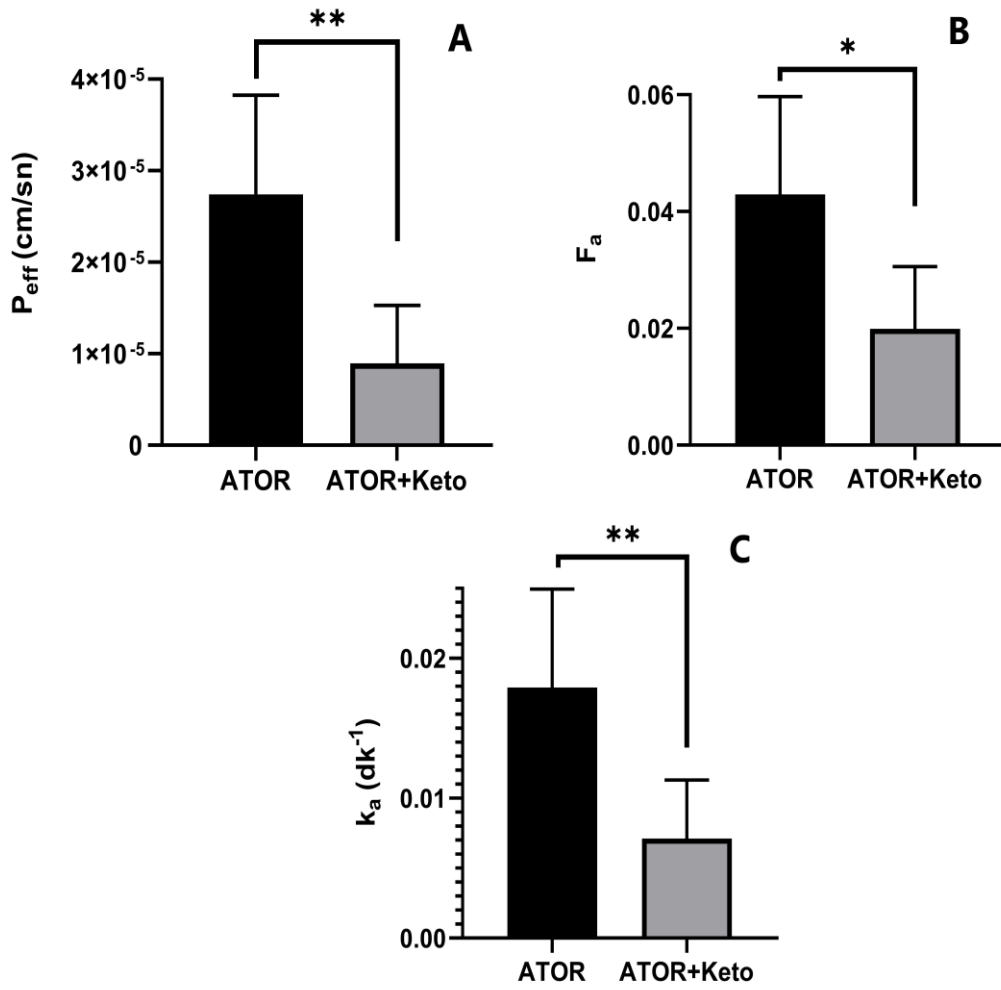
Ketokonazolün CYP3A4 inhibitörü olarak kullanıldığı perfüzyon deneylerinde atorvastatinin ileum lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profili Şekil 4.36’da verilmiştir. Atorvastatin için ketokonazol varlığında ve yokluğunda hesaplanan permeabilite (P_{eff} , cm/sn), absorplanan fraksiyon (F_a) ve absorpsiyon hız sabiti (k_a ; değerleri Tablo 4.28 ve Şekil 4.37’de verilmiştir. Ketokonazol kullanılan perfüzyon çalışmalarında atorvastatinin ileumdan absorpsiyonu önemli derecede ($p=0,0038$) azalmıştır. Ayrıca absorplanan fraksiyon ($p=0,018$) ve absorpsiyon hız sabiti ($p=0,0082$) değerleri de önemli derecede azalma göstermiştir.



Şekil 4.36. İnhibitör olarak ketokonazol kullanılan çalışmalarda ileumun perfüzyonu sonucu elde edilen atorvastatine ait konsantrasyon-zaman profili (-): ketokonazol yok; (+): ketokonazol var. (Ortalama \pm SS; n=6).

Tablo 4.28. Atorvastatin-ketokonazol grubunda atorvastatin için tayin edilen P_{eff} , F_a ve k_a değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6).

	P_{eff} (10^{-5} cm/sn)	F_a	k_a (dk^{-1})
Ketokonazol (-)	$2,742 \pm 1,693$	$0,043 \pm 0,026$	$0,018 \pm 0,011$
Ketokonazol (+)	$1,160 \pm 0,988$	$0,020 \pm 0,017$	$0,007 \pm 0,006$

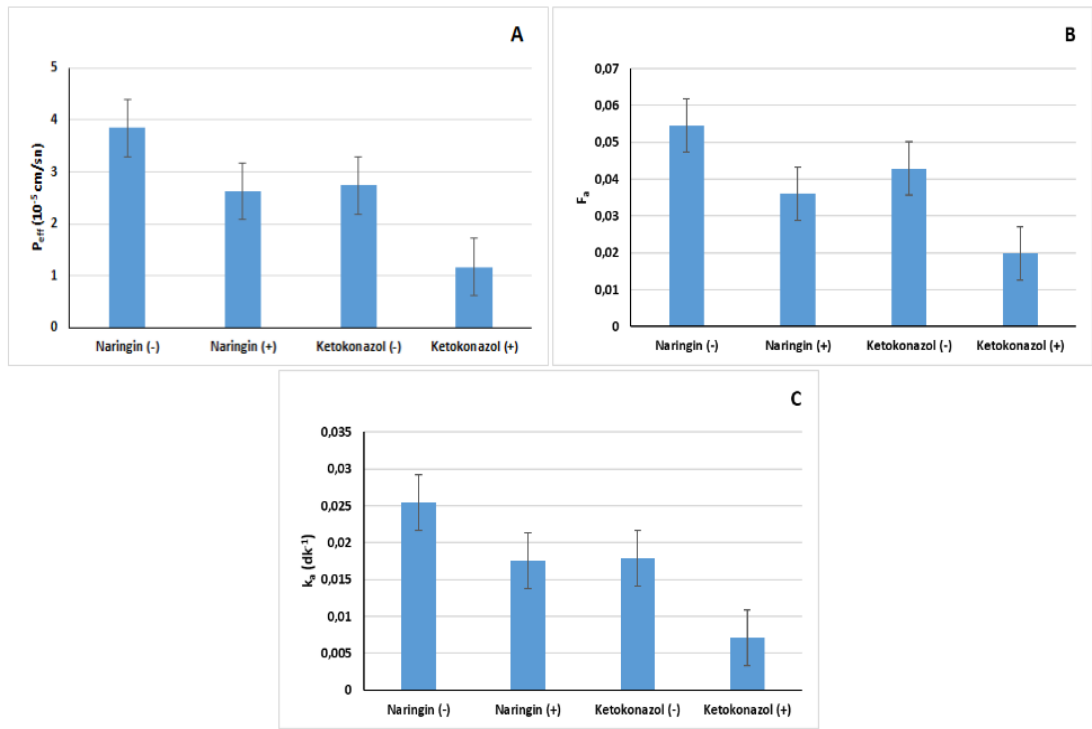


Şekil 4.37. İnhibitör olarak ketokonazol kullanılan çalışmalarda atorvastatin için tayin edilen P_{eff} (cm/sn; A), F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6). * p=0.018; **p<0.01

Atorvastatin için naringin ve ketokonazol varlığında ve yokluğuna tayin edilen P_{eff} (cm/sn), F_a ve k_a (dk^{-1}) değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo 4.29 ve Şekil 4.38’de sunulmuştur.

Tablo 4.29. Atorvastatinin naringin ve ketokonazol varlığında ve yokluğunda tayin edilen P_{eff} (cm/sn), F_a ve k_a (dk^{-1}) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6).

	P_{eff} (10^{-5} cm/sn)	F_a	k_a (dk^{-1})
Kontrol	3,846 \pm 0,518	0,055 \pm 0,006	0,025 \pm 0,003
Naringin (+)	2,629 \pm 0,293	0,036 \pm 0,004	0,018 \pm 0,002
Kontrol	2,742 \pm 1,693	0,043 \pm 0,026	0,018 \pm 0,011
Ketokonazol (+)	1,160 \pm 0,988	0,020 \pm 0,017	0,007 \pm 0,006



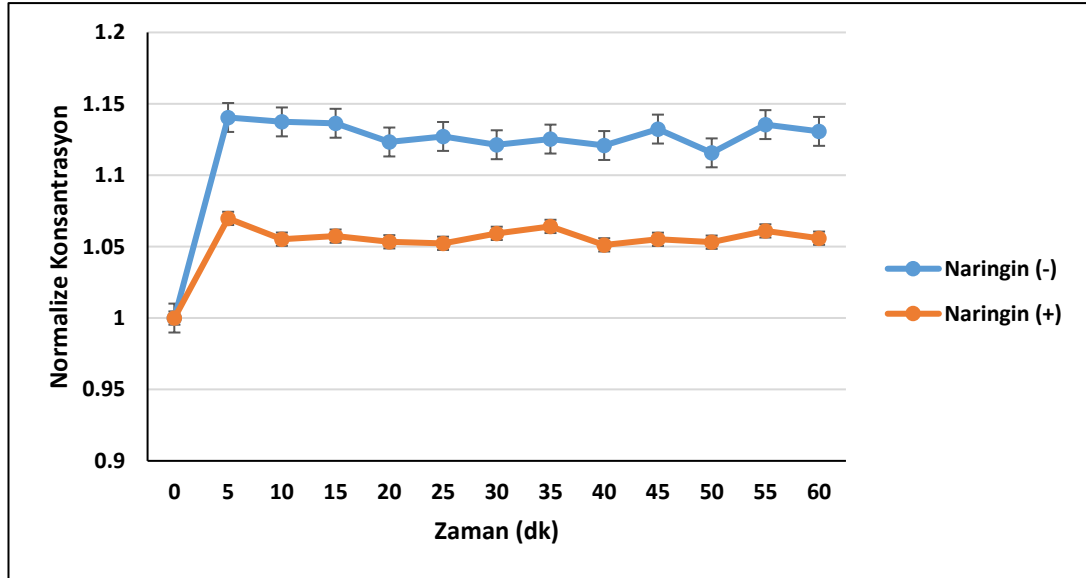
Şekil 4.38. Atorvastatinin naringin ve ketokonazol varlığında (+) ve yokluğunda (-) tayin edilen P_{eff} (10^{-5} cm/sn; A); F_a (B) ve k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6)

4.4.2. Pravastatinle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları

Pravastatin-Naringin Grubuna Ait Bulgular

Naringinin OATP inhibitörü olarak kullanıldığı perfüzyon deneylerinde pravastatinin ileum lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profili Şekil 4.39'da verilmiştir. Pravastatin için naringin varlığında ve yokluğunda hesaplanan permeabilite (P_{eff} ; cm/sn), absorplanan fraksiyon

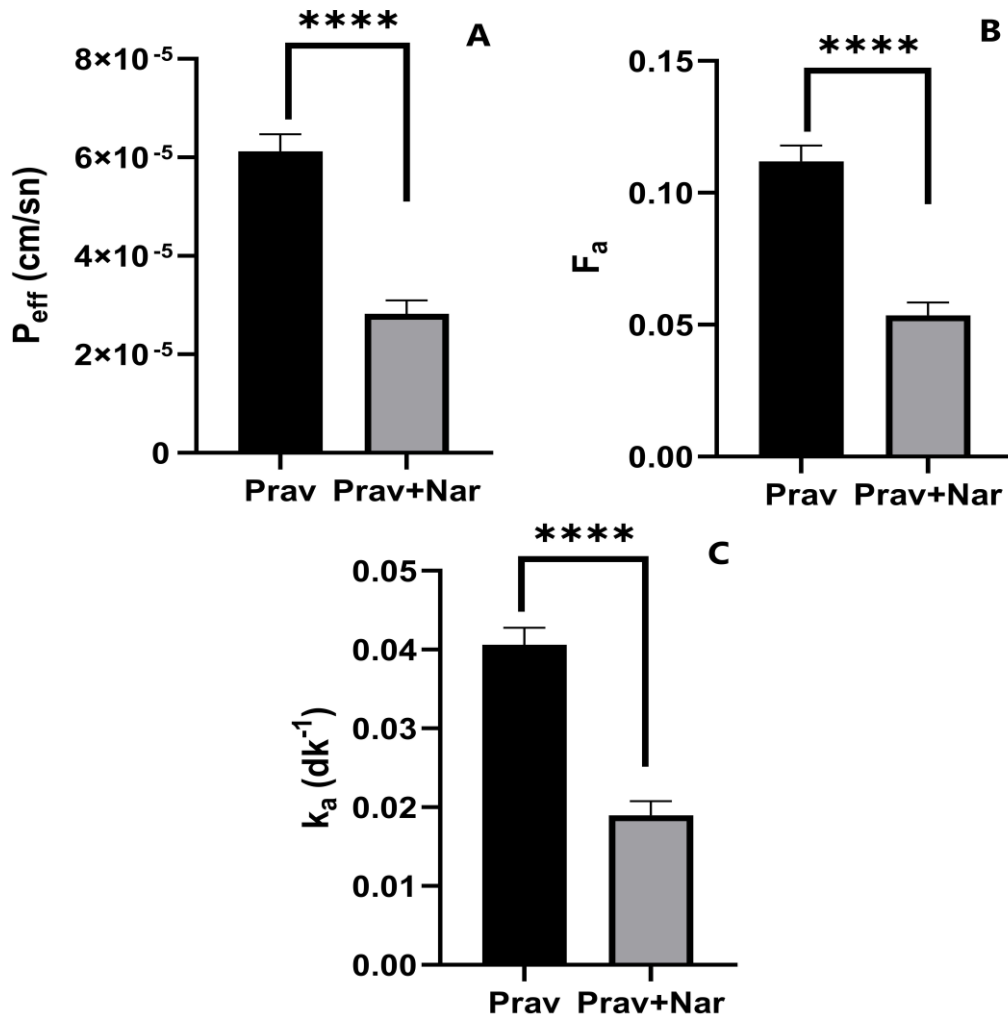
(F_a) ve absorpsiyon hız sabiti (k_a ; dk^{-1}) değerleri Tablo 4.30 ve Şekil 4.40'da verilmiştir. Naringin kullanılan perfüzyon çalışmalarında pravastatinin ileumdan absorpsiyonu önemli derecede ($p<0.0001$) azalmıştır. Ayrıca absorplanan fraksiyon ve absorpsiyon hız sabiti değerleri de önemli derecede azalma göstermiştir ($p<0.0001$).



Şekil 4.39. İnhibitör olarak naringin kullanılan çalışmalarda ileumun perfüzyonu sonucu elde edilen pravastatine ait konsantrasyon-zaman profili (-): naringin yok; (+): naringin var (Ortalama \pm SS; n=6).

Tablo 4.30. Pravastatin-naringin grubunda pravastatin için tayin edilen P_{eff} , F_a ve k_a değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6).

	P_{eff} (10^{-5} cm/sn)	F_a	k_a (dk^{-1})
Naringin (-)	6.120 ± 0.350	0.112 ± 0.006	0.041 ± 0.002
Naringin (+)	2.824 ± 0.274	0.054 ± 0.005	0.019 ± 0.002

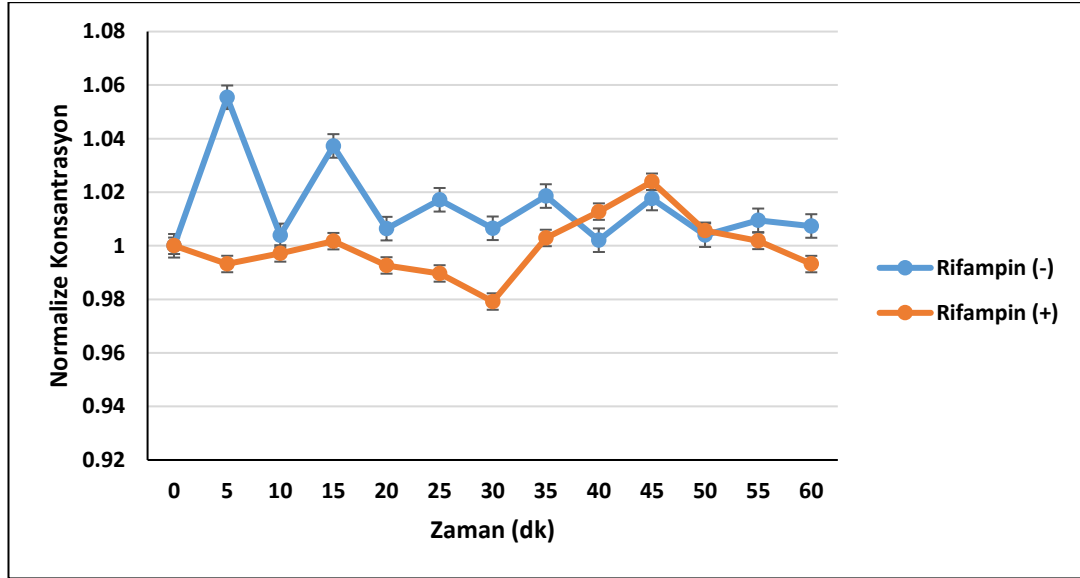


Şekil 4.40. İnhibitör olarak naringin kullanılan çalışmalarda pravastatin için tayin edilen P_{eff} (cm/sn; A) F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6). **** p<0.0001

Pravastatin-Rifampin Grubuna Ait Bulgular

Rifampinin OATP inhibitörü olarak kullanıldığı perfüzyon deneylerinde pravastatinin ileum lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonunu gösteren konsantrasyon-zaman profili Şekil 4.41'de verilmiştir. Pravastatin için rifampin varlığında ve yokluğunda hesaplanan permeabilite (P_{eff} ; cm/sn), absorplanan fraksiyon (F_a) ve absorpsiyon hız sabiti (k_a ; dk^{-1}) değerleri Tablo 4.31 ve Şekil 4.42'de verilmiştir. Rifampin kullanılan perfüzyon çalışmalarında pravastatinin ileumdan

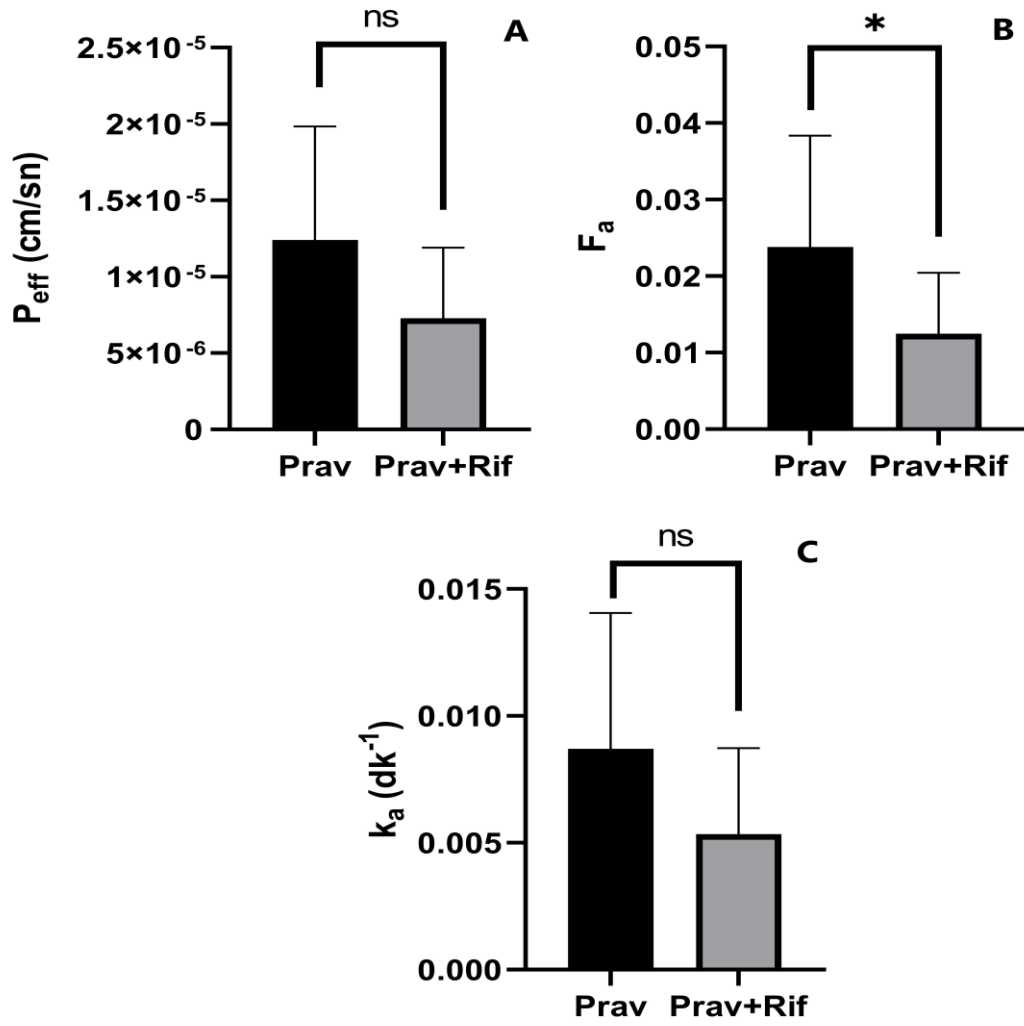
absorpsiyonu ve absorpsiyon hız sabiti anlamlı derecede değişmezken, absorplanan fraksiyon ($p=0,027$) azalma göstermiştir.



Şekil 4.41. İnhibitör olarak rifampin kullanılan çalışmalarda ileumun perfüzyonu sonucu elde edilen pravastatine ait konsantrasyon-zaman profili (-): rifampin yok; (+): rifampin var. (Ortalama \pm SS; n=6).

Tablo 4.31. Pravastatin-rifampin grubunda pravastatin için tayin edilen P_{eff} , F_a ve k_a değerleri (Ortalama \pm SS; n= 6).

	P_{eff} (10^{-5} cm/sn)	F_a	k_a (dk^{-1})
Rifampin (-)	1.241 ± 0.743	0.024 ± 0.015	0.009 ± 0.005
Rifampin (+)	0.727 ± 0.463	0.012 ± 0.008	0.005 ± 0.003

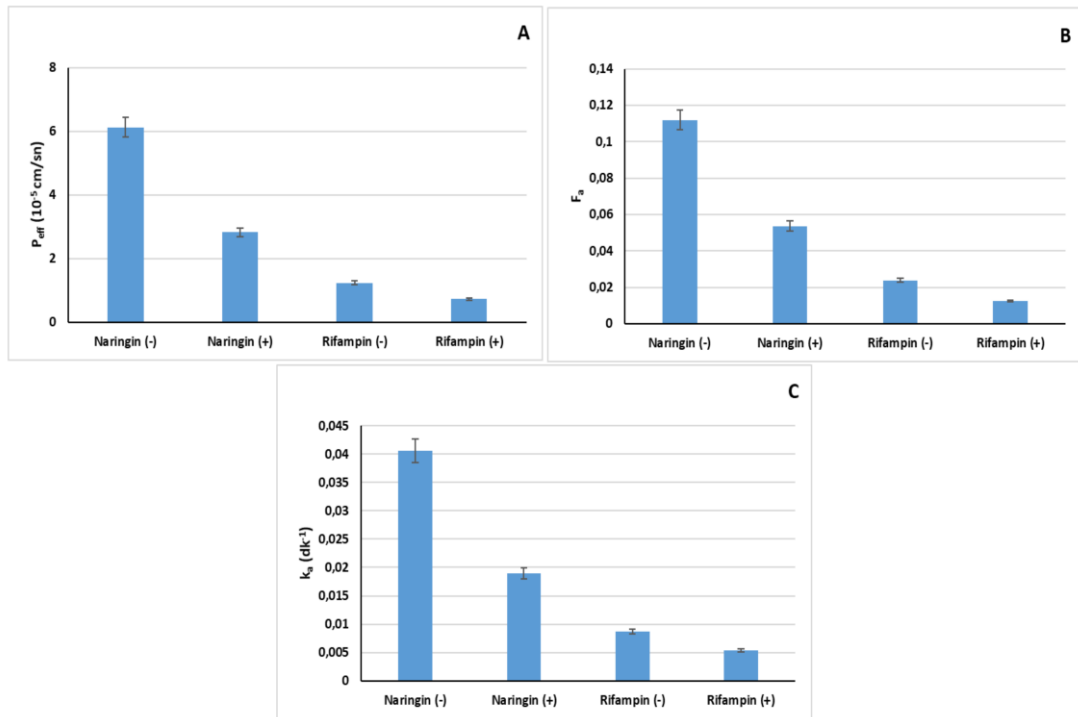


Şekil 4.42. İnhibitör olarak rifampin kullanılan çalışmalarda pravastatin için tayin edilen P_{eff} (cm/sn; A), F_a (B), k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6). * $p=0.027$

Pravastatin için naringin ve rifampin varlığında ve yokluğuna tayin edilen P_{eff} (cm/sn), F_a ve k_a (dk^{-1}) değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo 4.32 ve Şekil 4.43'de sunulmuştur.

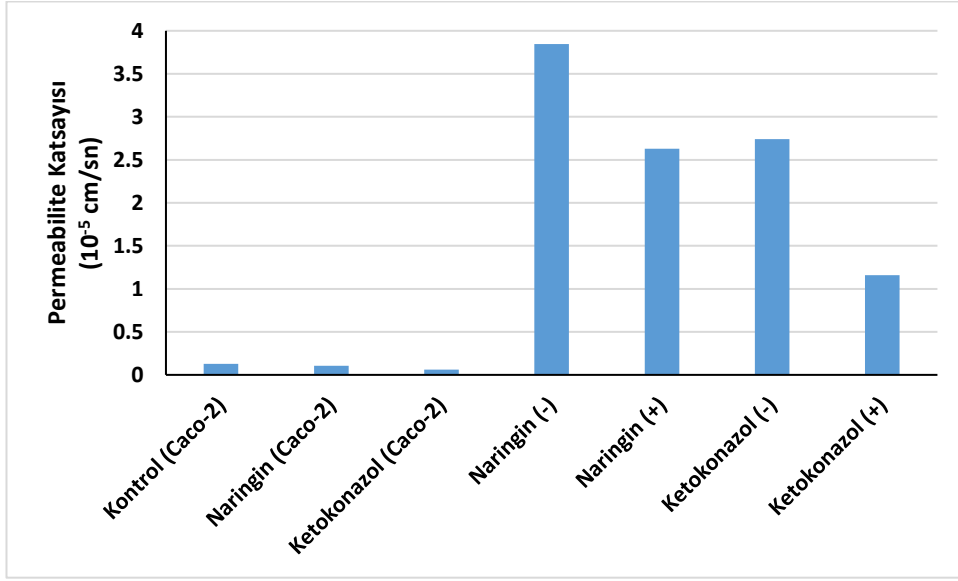
Tablo 4.32. Pravastatinin naringin ve rifampin varlığında ve yokluğunda tayin edilen P_{eff} (cm/sn), F_a ve k_a (dk^{-1}) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6).

	P_{eff} (10^{-5} cm/sn)	F_a	k_a (dk^{-1})
Kontrol	6.120 \pm 0.350	0.112 \pm 0.006	0.041 \pm 0.002
Naringin (+)	2.824 \pm 0.274	0.054 \pm 0.005	0.019 \pm 0.002
Kontrol	1.241 \pm 0.743	0.024 \pm 0.015	0.009 \pm 0.005
Rifampin (+)	0.727 \pm 0.463	0.012 \pm 0.008	0.005 \pm 0.003

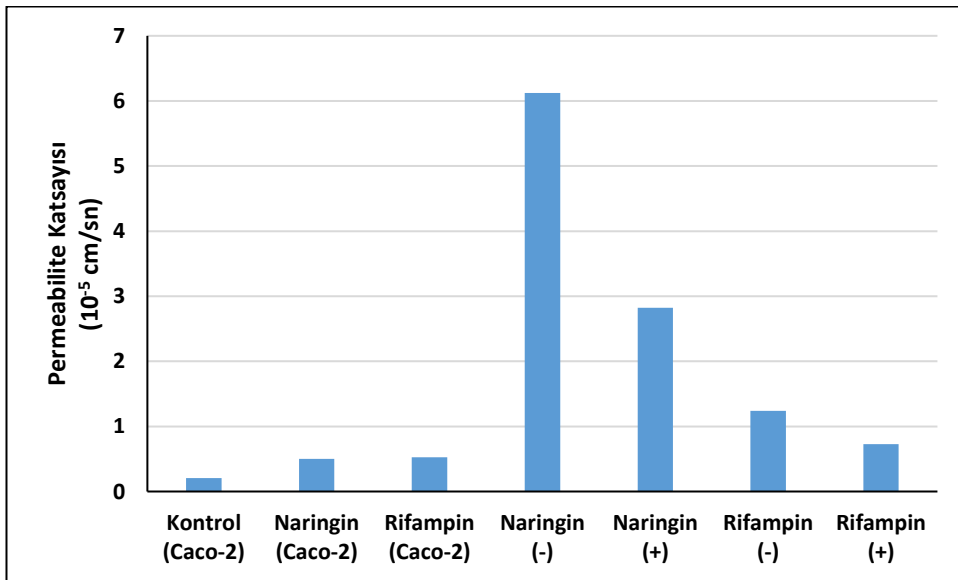


Şekil 4.43. Pravastatinin naringin ve rifampin varlığında (+) ve yokluğunda (-) tayin edilen P_{eff} (10^{-5} cm/sn; A); F_a (B) ve k_a (dk^{-1} ; C) değerleri (Ortalama \pm SS; n=6).

Atorvastatin ve pravastatin için inhibitörler yokken ve inhibitörler varlığında Caco-2 ve *in situ* bağırsak perfüzyonundan elde edilen permeabilite katsayısı değerleri karşılaştırmalı olarak sırasıyla Şekil 4.44 ve Şekil 4.45'te verilmiştir.



Şekil 4.44. Atorvastatin için naringin ve ketokonazol varlığında (+) ve yokluğunda (-) hücre kültürü (Caco-2) ve *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen permeabilite değerleri (Ortalama ± SS).



Şekil 4.45. Pravastatin için naringin ve rifampin varlığında (+) ve yokluğunda (-) hücre kültürü (Caco-2) ve *in situ* bağırsak perfüzyonu çalışmalarından elde edilen permeabilite değerleri (Ortalama ± SS).

5. TARTIŞMA

5.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Model ilaçların miktar tayinine ilişkin yapılan literatür taramalarında maddelerin analizinde birden çok yöntemin kullanıldığı bildirilmiştir. Atorvastatin için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ultraviyole (UV) spektrofotometresi, miseller elektrokinetik kapiler kromatografisi, Raman spektroskopisi, ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC) (193); pravastatin için HPLC, UV spektrofotometresi (194) yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) (195) UPLC (196); simvastatin için HPLC, UV spektrofotometresi, HPTLC (197), LC-MS/MS (198); lovastatin için HPLC (199), LC-MS/MS (200), kapiler elektroforez (201) gibi birçok analiz yöntemi kullanılmıştır. Hem katı dozaj formlarından hem de plazma, serum, idrar gibi biyolojik örneklerden miktar tayini için en çok tercih edilen yöntemin HPLC olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle tez çalışmamız kapsamında çözünürlük deneyleri, hücre kültürü deneyleri ve intestinal perfüzyon deneylerinden elde edilen örneklerin analizi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda sabit faz olarak çoğunlukla C18 kolon tercih edilirken, mobil faz olarak farklı karışımlar kullanılmıştır. Atorvastatin için asetonitril:formik asit (70:30), asetonitril:asetik asit (70:30), metanol:su (70:30), asetonitril:fosfat tamponu (55:45) (193, 202); pravastatin için asetonitril:su (40:60), asetonitril:amonyum asetat (60:40), metanol:amonyum asetat (60:40) (202, 203); simvastatin için asetonitril:amonyum asetat (75:25), asetonitril:formik asit (90:10), metanol:su (90:10) (202); lovastatin için asetonitril:fosforik asit (65:35) (199), asetonitril:amonyum asetat (71:29) (204), asetonitril:su (77:23) gibi farklı mobil faz karışımları farklı pH'larda ve farklı akış hızlarında kullanılmıştır. Bu çalışmada ise maddelerin alıkonma zamanları, analiz süresi ve pik keskinliği gibi parametreler göz önüne alınarak en ideal mobil faz karışımları belirlenmiştir. Atorvastatin için asetonitril:0,05 M NaH₂PO₄ (60:40), pravastatin için asetonitril:0,05 M KH₂PO₄ (45:55), simvastatin ve lovastatin için ise asetonitril:su (pH:3.0) (90:10) mobil faz karışımları (akış hızı: 1 mL/dk) ve sabit faz olarak C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Ayrıca yapılan ön çalışmalarda her madde için maksimum absorbans verdiği dalga boyu değeri belirlenmiş ve tüm analizler o dalga boylarında gerçekleştirilmiştir.

Kan, plazma, serum, vücut sıvıları gibi biyolojik bir matris içinde kimyasal ve biyolojik ilaçlar ve metabolitlerinin konsantrasyonları belirlenirken biyoanalitik yöntem uygulanmaktadır (178). Bu tez çalışması kapsamında seçilen model ilaçların (atorvastatin, simvastatin, lovastatin ve pravastatin) Caco-2 hücre hatlarından ve sıçan bağırsağından permeabiliteleri belirlenmiş ve kullanılan miktar tayini yöntemi biyoanalitik yöntem validasyon parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Kullanılan HPLC yöntemleri seçicilik, özgüllük, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik gibi validasyon parametreleri açısından değerlendirilmiş ve ilgili çalışmalardan elde edilen bulgular yöntemin güvenle kullanılabilceğini göstermiştir.

5.2. Etkin Maddelerin Çözünürlüğünü Tayin Etmek Amacıyla Yapılan Çalışmalar

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne (BSS) göre etkin maddelerin çözünürlük sınıflarının belirlenmesinde denge çözünürlük çalışmaları kullanılmaktadır. Buna göre bir etkin maddenin en yüksek terapötik dozunun pH 1.2 ve 6.8 arasında, en az 3 farklı tampon ortamında, 250 mL veya daha az sıvıda çözünmesi "yüksek çözünürlük" gösterdiği anlamına gelmektedir (WHO, 2019). İlgili kılavuzda yer alan bilgiler doğrultusunda her model ilaç (atorvastatin, pravastatin, simvastatin, lovastatin) pH 1.2, 4.5 ve 6.8 olmak üzere 3 farklı tampon ortamında, çalkalamalı su banyosu (37 °C) içerisinde, 100 rpm çalkalama hızı ile 72 saate kadar bekletilmiştir. 6, 12, 24, 48 ve 72 saatlerde alınan örnekler analiz edilerek hem etkin maddelerin doygunluk çözünürlüğü hem de çözünürlük sınıfı belirlenmiştir.

Atorvastatin BSS Sınıf II'de yer alan ve düşük çözünürlüğe sahip bir etkin madde olup (94), $\text{pH} \leq 4,0$ sulu çözeltilerde çözünmez ve pH 7,4 fosfat tamponu ile suda az çözünür (93). Sulu tamponlardaki çözünürlüğü pH 2.1'de 0.0204 mg/mL, pH 6.0'da 1.23 mg/mL olarak bildirilmiştir. Ayrıca 10 mg doz için doz/çözünürlük (*dose/solubility-D/S*) oranı pH 1.2'de 250 mL'den büyük olmasına rağmen pH 6.8'de 250 mL çözücünün yeterli olduğu belirtilmiştir (205). Bu bulgular pH arttıkça atorvastatin çözünürlüğünün arttığını göstermektedir. Farklı yardımcı maddeler kullanılarak hazırlanan atorvastatinin direkt basımla hazırlanmış tabletleri çözünürlük ve çözünme hızı açısından karşılaştırıldığında tamponlayıcı ajan olarak kullanılan

disodyum fosfatın ortam pH'sını alkalileştirerek etkin maddenin çözünürlük ve çözünme hızını artırdığı bildirilmiştir (206). Çalışmamızda atorvastatinin 3 farklı tampondaki çözünürlük değerleri belirlenmiştir. Çözünürlük-zaman profilleri çizilerek hangi zaman noktasında doygunluğa ulaşıldığı tespit edilmiştir. Atorvastatin için bu zaman noktası 24. saat olarak belirlenmiş ve doygunluk çözünürlüğü hesaplanırken 24, 48 ve 72. saat sonuçlarının ortalaması alınmıştır. Atorvastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki ortalama doygunluk çözünürlük değerleri sırasıyla 0.0182 ± 0.0004 , 0.0360 ± 0.007 ve 1.011 ± 0.0125 mg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre atorvastatinin çözünürlüğü literatüre uyumlu olarak artan pH ile artmıştır. Atorvastatinin çözünürlük sınıfını belirlemek amacıyla DSÖ'nün ilgili kılavuzunda (180) bildirilen doz:çözünürlük hacmi (*the dose:solubility volume, DSV*) hesaplanmıştır. Bu amaçla atorvastatinin en yüksek terapötik dozu (80 mg) her ortam için belirlenen çözünürlük değerlerine bölünerek DSV değerleri hesaplanmış ve bu değer 250 mL'den büyük ya da küçük olmasına göre çözünürlük sınıfı belirlenmiştir. DSV değeri sadece pH 6.8 tamponunda 250 mL'den küçük (90.6795 ± 19.1539 mL) bulunurken, pH 1.2 ve 4.5 tamponlarında sırasıyla 5373.5898 ± 1448.3389 ve 2789.3026 ± 794.8191 mL olarak tayin edilmiştir. Bu bulgular atorvastatinin çözünürlüğünün düşük olduğunu kanıtlamaktadır.

BSS'ne göre Sınıf III'te yer alan pravastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki çözünürlüğü sırasıyla 439.80 ± 17.42 , 503.87 ± 24.20 ve 479.58 ± 17.39 mg/mL olarak bildirilmiştir. Ayrıca pravastatinin en yüksek dozunu (40 mg) çözmek için gerekli pH 1.2 tampon hacminin 0.09 mL olduğu belirtilmiştir (207). Pravastatin nötral ve yüksek pH'larda çok çözünürken, asidik pH'larda laktonizasyon ve oksidasyon yoluyla bozunmaktadır (208). Çalışmamızda pravastatinin farklı tamponlardaki (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8) çözünürlük değerleri tayin edilerek çözünürlük-zaman profilleri çizilmiş ve doygunluğa ulaşılan zaman noktasının 12. saat olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle pravastatinin doygunluk çözünürlük değerleri 12, 24, 48 ve 72. saat sonuçlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Ayrıca etkin maddenin çözünürlüğünün düşük veya yüksek olma durumunu belirlemek için DSV hesaplaması yapılmıştır. Pravastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki ortalama doygunluk çözünürlük değerleri sırasıyla 304.253 ± 2.044 ; 374.381 ± 4.059 ve 354.641 ± 3.136 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgulara göre

pravastatinin çözünürlüğünün en yüksek olduğu pH değeri 4.5 olarak belirlenmiştir. Pravastatinin çözünürlük sınıfını belirlemek amacıyla en yüksek terapötik dozu (40 mg) her ortam için belirlenen çözünürlük değerlerine bölünerek DSV değerleri hesaplanmıştır. Üç farklı ortam için (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8) hesaplanan DSV değerlerinin (0.135 ± 0.009 , 0.108 ± 0.003 ve 0.115 ± 0.006 mL) 250 mL'den düşük bulunması pravastatinin çözünürlüğünün yüksek olduğunu göstermiştir.

Simvastatin BSS'ne göre Sınıf II bir etkin madde olup, pH arttıkça yağ/su partiyon katsayısı azalmaktadır (115). Sudaki çözünürlüğü $1.45 \mu\text{g/mL}$ olarak bildirilen simvastatinin, pH 1.2 ve 7.0 tamponlarındaki çözünürlüğü sırasıyla 14.5 ve $24.4 \mu\text{g/mL}$ olarak rapor edilmiştir (209). Başka bir çalışmada simvastatinin sudaki çözünürlüğü $3.33 \pm 0.07 \times 10^{-6}$ M, pH 7.4 fosfat tamponunda $5.14 \pm 0.14 \times 10^{-6}$ M ve pH 1.1 HCl tamponunda $7.47 \pm 0.19 \times 10^{-6}$ M olarak bildirilmiştir (210). Tez çalışması kapsamında simvastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki çözünürlük değerleri tayin edilerek çözünürlük-zaman profilleri çizilmiş ve doygunluğa ulaşılan zaman noktasının 24. saat olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle simvastatinin doygunluk çözünürlük değerleri 24, 48 ve 72. saat sonuçlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Simvastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki ortalama çözünürlük değerleri sırasıyla 0.0118 ± 0.0004 , 0.0156 ± 0.0005 ve 0.0288 ± 0.0006 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Tayin edilen bu çözünürlük değerleri Rao ve ark. sonuçları ile uyumlu olup simvastatinin çözünürlüğü pH ile artmıştır. Simvastatinin çözünürlük sınıfını belirlemek amacıyla en yüksek terapötik dozu (80 mg) her ortam için belirlenen çözünürlük değerlerine bölünerek DSV değerleri hesaplanmıştır. Üç farklı ortam için (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8) hesaplanan DSV değerlerinin (8016.541 ± 1754.840 , 6037.248 ± 1282.334 ve 2896.858 ± 188.277 mL) 250 mL'den büyük bulunması simvastatinin çözünürlüğünün düşük olduğunu desteklemektedir.

Lovastatin BSS Sınıf II'de yer alan bir etkin madde olup (126) ve pH 6.8 tamponundaki doygunluk çözünürlüğünün (0.031 mg/mL) distile su ve pH 1.2 tamponundan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (211). Lovastatinin pH 5.0'te stabil olduğu ve çözünürlüğünün pH'ya bağımlı olmadığı belirtilmiştir (212). Başka bir çalışmada etkin maddenin yapay mide sıvısı (pH 1.1) içindeki çözünürlüğü 1.16 ± 0.03 mg/900 mL, yapay bağırsak sıvısı (pH 7.0) içindeki çözünürlüğü 1.21 ± 0.03 mg/900 mL olarak belirlenmiştir (213). Bu çalışmada lovastatinin farklı tamponlardaki (pH

1.2, 4.5 ve 6.8) çözünürlük değerleri hesaplanarak çözünürlük-zaman profilleri çizilmiş ve doyunluğa ulaşılan zaman noktasının 24. saat olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle lovastatinin doyunluk çözünürlük değerleri 24, 48 ve 72. saat sonuçlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Lovastatinin pH 1.2, 4.5 ve 6.8 tamponlarındaki ortalama çözünürlük değerleri sırasıyla 0.0063 ± 0.0005 , 0.0087 ± 0.0004 ve 0.0103 ± 0.0005 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Chen ve arkadaşlarının bildirdiklerinin aksine artan pH ile lovastatinin çözünürlüğü artmıştır. Lovastatinin çözünürlük sınıfını belirlemek amacıyla en yüksek terapötik dozu (20 mg) her ortam için belirlenen çözünürlük değerlerine bölünerek DSV değerleri hesaplanmıştır. Üç farklı ortam için (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8) hesaplanan DSV değerlerinin (3616.312 ± 689.369 , 2656.713 ± 493.352 ve 2115.395 ± 249.076 mL) 250 mL'den büyük bulunması lovastatinin çözünürlüğünün düşük olduğunu göstermiştir.

5.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

5.3.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücre canlılığı testleri, canlı hücre sayısı ile ilişkili bir işaretleyici aktivitenin ölçümüne dayanarak hücre proliferasyonunun sonuçlarını ölçmek ve etkin maddelerin sitotoksik etkilerini test etmek amacıyla kullanılmaktadır (214). Bu testler boya eksklüzyon analizleri, kolorimetrik analizler, florometrik analizler, luminometrik analizler ve akış sitometrik analizler olarak sınıflandırılmaktadır. Tripan mavisi, eozin, kongo kırmızısı ve eritrosin B boya eksklüzyon analizlerinde kullanılan yöntemlerdir. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür (MTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3 bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H tetrazolyum monosodyum tuzu (WST-1), 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum monosodyum tuzu (WST-8), laktat dehidrojenaz (LDH), sülforhodamin B (SRB), nötral kırmızı alım (NRU) ve kristal mor leke (CVS) analizleri bu amaçla kullanılan kolorimetrik analizler arasında yer almaktadır. Resazurin ve 5-karboksifloresein diasetat asetoksimetil ester (5-CFDAAM) analizleri ise florometrik ölçümlerdir. Luminometrik analizler ise adenosin trifosfat ve gerçek zamanlı canlılık analizlerini içermektedir. Membran asimetrisi, membran geçirgenliği ve mitokondri analizleri akış sitometri analizleri arasında yer almaktadır (215).

Tetrazolyum tuzları ile yapılan kolorimetrik testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Tetrazolyum tuzları heterosiklik yapıda maddelerdir. Sadece canlı hücrelerde mitokondri tarafından kırılabilen tetrazolyum halkası, indirgenerek renkli formazan bileşiğine dönüşmektedir (216). Bu bileşik spesifik bir dalga boyunda ışık absorbansı ile ölçülmektedir. En yaygın kullanılan tetrazolyum tuzu MTT, suda çözünmediği için hücrelerde mor, iğne şekilli kristaller oluşturur. Bu nedenle absorbans ölçümünden önce kristalleri çözmek için DMSO veya izopropanol gibi bir organik çözücüye ihtiyaç vardır. Bu dezavantajına rağmen kullanımı kolay, güvenilir ve tekrarlanabilir olduğu için hücre canlılığı testlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (217). Bu nedenle tez çalışması kapsamında permeabilite çalışmalarında kullanılacak etkin madde konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla MTT testi yapılmıştır. Etkin

maddeleri farklı konsantrasyonlarda (181-183) içeren çözeltiler, hücrelere uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

Literatürde atorvastatinin farklı hücre hatlarında MTT testi ile hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. MCF7 meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda atorvastatin konsantrasyonu ve inkübasyon süresi arttıkça hücre canlılığının azaldığı bildirilmiştir (218, 219). Benzer durum kronik lenfositik lösemi (CLL) hücrelerinde de gözlenmiş olup 24 ve 48 saat sonunda artan atorvastatin konsantrasyonu hücre canlılığını azaltmıştır (220). Bu bulguların aksine A172 glioma hücre hattında 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat süreyle MTT hücre canlılığı testi gerçekleştirilmiş ve sadece 48 saat sonra 10 μM , 72 saat sonra 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda atorvastatin uygulamasının hücre canlılığı üzerine anlamlı bir etkisi olduğu bildirilmiştir (221). Başka bir çalışmada Caco-2 hücre hattında 0.1-100 μM atorvastatin uygulaması sonrası hücre canlılığında gruplar arasında istatistiksel bir fark olmadığı bildirilmiştir (222). Bu tez çalışması kapsamında 2, 20, 40, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda hazırlanan atorvastatin çözeltilerinin Caco-2 hücreleri ile 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. İnkübasyon süresi arttıkça sitotoksitenin arttığı ve hücre canlılığının azaldığı görülmektedir. 24 saat inkübasyon sonucunda 2, 20 ve 40 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda atorvastatin uygulamasında konsantrasyon arttıkça hücre canlılığı azalmaktadır. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). 48 saat inkübasyonda atorvastatin konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar arttıkça hücre canlılığını azaltmıştır. İnkübasyon süresinin hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 24 ve 48 saat sonunda atorvastatin konsantrasyonunun artması hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Elde edilen bu bulgular doğrultusunda Caco-2 hücrelerinden permeabilite tayininde atorvastatin için kullanılacak konsantrasyon değeri 100 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.

HeLa (insan rahim ağzı kanseri) hücre hattında pravastatinin hücre canlılığı üzerinde etkisinin 24 saat süreyle incelendiği bir çalışmada, artan pravastatin konsantrasyonunun herhangi bir sitotoksik etki oluşturmadığı bildirilmiştir (223). RD (insan rabdomiyosarkoma) ve L6 (sıçan iskelet kası) hücre hatlarında hidrofilik

statinlerin sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada da pravastatinin farklı konsantrasyonlarda uygulamasının kayda değer bir etki oluşturmadığı bildirilmiştir (224). Kolon, pankreas, prostat, mesane, deri ve akciğer gibi birçok dokunun kanserli hücrelerinde (Caco-2 dahil) yapılan bir çalışmada simvastatin ve pravastatinin hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Simvastatin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ederken pravastatinin önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (225). Bu çalışma kapsamında 0.05, 0.5, 1, 5 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan pravastatin çözeltilerinin Caco-2 hücreleri ile 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirildiğinde 24 saat inkübasyonda bütün konsantrasyonlarda hücre canlılığının %100'ün üzerinde olduğu ve 48 saat inkübasyonda sitotoksitenin arttığı gözlenmiştir. İnkübasyon süresinin hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirildiğinde sadece 0.5 µg/mL konsantrasyonda 24 saat ve 48 saat sonundaki hücre canlılığındaki azalma anlamlı ($p=0.0273$) bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre permeabilite tayininde pravastatin için kullanılacak konsantrasyon değeri 50 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Simvastatin için Caco-2 ve farklı hücre hatlarında yapılan MTT testlerinde 6.25-100 µg/mL konsantrasyonları arasında HeLa hücrelerinde (223); 0.1-20 µM konsantrasyonları arasında kolon (Caco-2, HCT-116), pankreas (MiaPaca), karaciğer (Hep G2, Hep 3B), meme (MCF-7, SKBr-3), prostat (LNCaP, PC-3), mesane (U-9, U-14), deri (SCC-P9) ve akciğer kanseri (Calu-3, Calu-6) hücrelerinde sitotoksik etki gösterilmiştir (Menter, 2011). Ek olarak simvastatin GLC-82 (akciğer adenokarsinoma) hücre hattında da 30 µM konsantrasyonda hücre canlılığında anlamlı azalma meydana getirmiştir (226). Simvastatin HepG2 ve Huh7 (hepatoselüler karsinoma) hücrelerinde de doz (2-16 µM) ve zamana (24, 48, 72 saat) bağlı olarak önemli sitotoksik etki göstermiştir (227). Bunların aksine MC3T3-E1 (fare osteoprekürsör) hücrelerinde 0.1 ve 1 µM konsantrasyonda simvastatin hücre büyümesini anlamlı derecede etkilememiştir (228). Bu tez çalışması kapsamında 0.05, 0.5, 1, 5 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan simvastatin çözeltilerinin Caco-2 hücrelerinde 24 ve 48 saat sonunda sitotoksik etkileri incelenmiştir. 24 saat inkübasyonda 0.5-50 µg/mL arası konsantrasyonlarda ve 48 saat inkübasyonda 1-50 µg/mL arası konsantrasyonlarda simvastatin konsantrasyonu ile ters orantılı olarak

hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca çalışılan tüm konsantrasyonlarda 48 saat sonunda sitotoksikite artmakla beraber bu artış sadece 0.5 µg/mL konsantrasyonda anlamlı (p=0.0131) bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre permeabilite tayininde simvastatin için kullanılacak konsantrasyon değeri 50 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Lovastatin ile yapılan MTT testlerinde HeLa hücrelerinde doza bağlı güçlü sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (229). Akut miyeloid lösemi ve akut lenfositik lösemi kaynaklı 59 farklı hücre hattında yapılan bir çalışmada 0-100 µM lovastatin konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Bazı hücre hatları lovastatine dirençli iken, bazıları aşırı duyarlılık göstermiştir (230). Yumurtalık kanseri hücre hatlarında sadece lovastatin ve lovastatin+sisplatin, lovastatin+doksorubisin kombinasyonlarının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, MTT testlerinin sonuçları 2-40 µM konsantrasyonda lovastatinin hücrelerde önemli aktivite azalmasına neden olduğunu MTT testleri ile gösterilmiştir (231). Caco-2 hücrelerinde ise zamana (24 ve 48 saat) ve konsantrasyona (1-100 µM) bağlı olarak lovastatin sitotoksitesinin arttığı XTT analizi ile gösterilmiştir (232). Bu tez çalışması kapsamında 1, 5, 10, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan lovastatin çözeltilerinin Caco-2 hücreleri üzerine etkileri 24 ve 48 saat süre ile incelenmiştir. 24 saat sonunda konsantrasyon artışının hücre canlılığı üzerine etkisi tüm konsantrasyonlar için anlamlı (p<0.003) bulunmuştur. Aynı konsantrasyon değerlerinde 48 saat inkübasyondaki sitotoksik etkinin 24 saat inkübasyona göre arttığı gözlenmiştir. Bu artış 1 µg/mL konsantrasyonda anlamlı (p=0.001) bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre permeabilite tayininde lovastatin için kullanılacak konsantrasyon değeri 100 µg/mL olarak belirlenmiştir.

5.3.2. Model İlaçların Permeabilitesinin İncelenmesi

Statin grubu ilaçlardan seçilen model ilaçların (atorvastatin, pravastatin, simvastatin ve lovastatin) bağırsaklardan absorpsiyonunu tahmin etmek için *in vitro* yöntem olarak FDA'nın önerdiği insan kolon adenokarsinoma hücreleri kaynaklı Caco-2 hücre hattı kullanılmıştır. Caco-2 hücreleri insan bağırsağının morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine benzerlik göstermekle birlikte çeşitli ilaç taşıyıcıların fonksiyonunu da değerlendirmek mümkündür (233). İnsan kolon hücreleri kaynaklı

HT-29, T-84, köpek böbrek hücreleri kaynaklı MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) ve domuz böbrek hücreleri kaynaklı LLC-PK1 hücre hatları çalışmalarda sıklıkla kullanılan diğer hücre hatlarıdır. Ayrıca *everted gut* ve *Ussing-Chamber* gibi *ex vivo* yöntemler de mevcuttur. *Ex vivo* yöntemlerin dezavantajları; dokularda canlılık kaybına yol açacak kan ve sinir desteğinin olmaması ve dokunun morfolojik ve işlevsellik açısından değişikliğe uğramasıdır. Hücre hattı olarak en sık kullanılan MDCK hücrelerinde en büyük avantaj çoğalma süresinin kısa olmasıdır. Ancak köpek hücrelerinden elde edildiği için tür farkından dolayı *in vitro-in vivo* korelasyonu kanıtlamak için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır (234). Caco-2 hücreleri uygun destekler üzerinde büyütüldüğünde polarize olarak hücreler arasındaki sıkı kavşaklar, transselüler taşınma, model maddelerin metabolik dönüşümü, taşıyıcı proteinler ve Faz II konjugasyon enzimleri gibi birçok açıdan insan bağırsak epitelini taklit etmektedir (235). Ayrıca ICH M9 kılavuzu BSS'ye göre bir etkin maddenin permeabilite sınıfının belirlenmesinde Caco-2 hücre hattından permeabilite tayinini önermektedir (233). Bu nedenle tez çalışmaları kapsamında seçilen model ilaçların (atorvastatin, pravastatin, simvastatin, lovastatin) permeabilitelerinin belirlenmesi ve bağırsaklardan absorpsiyonları üzerine CYP3A4 enzim sistemi ile OATP ve P-gp taşıyıcılarının etkisini değerlendirmek için Caco-2 hücre hattı kullanılmıştır. Bu amaçla greyfurt suyu bileşeni naringin ve ilgili enzim/taşıyıcı proteinlerin inhibitörleri varlığında ve yokluğunda etkin maddelerin Caco-2 hücrelerinden permeabiliteleri tayin edilmiştir.

Atorvastatin: Tez çalışmamızda atorvastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilite katsayıları (P_{app} ; 10^{-6} cm/sn; Ort \pm SS) kontrol, naringin ve inhibitör (ketokonazol) grupları için sırasıyla 1.283 ± 0.548 , 1.064 ± 0.364 ve 0.606 ± 0.315 olarak bulunmuştur. Atorvastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi naringin varlığında önemli derecede değişmezken, CYP3A4 inhibitörü ketokonazol varlığında önemli derecede ($p=0.0142$) azalmıştır. Literatürde atorvastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilitesini inceleyen çeşitli çalışmalar mevcuttur. Li ve ark. nın yaptıkları bir çalışmada atorvastatin, fluvastatin ve rosuvastatinin Caco-2 hücrelerinden apikalden bazolaterale (A→B) permeabilitelerinin çok düşük olduğu belirtilmiştir (236). Shulyak ve ark. atorvastatinin Caco-2 hücrelerinden A→B

permeabilite katsayısını $0.9 \pm 0.1 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bildirmişlerdir (237). Wu ve ark. pH 7.4'te atorvastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilitesini apikalden basolaterale $4.9 \pm 0.3 \times 10^{-6}$ cm/sn, basolateralden apikale $35.6 \pm 1.1 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak belirtmişlerdir (238). Diril ve ark. ise Caco-2 hücrelerinde atorvastatin için A→B permeabilite değerini $8.01 \pm 0.56 \times 10^{-5}$ cm/sn, B→A permeabilite değerini $1.59 \pm 0.40 \times 10^{-4}$ cm/sn olarak bildirmişlerdir (239). Yapılan çalışmalarda atorvastatin için Caco-2 hücrelerinde A→B permeabilite değerleri 0.9×10^{-6} cm/sn ile 80.1×10^{-6} cm/sn arasında yer almaktadır. Bizim çalışmamızda kontrol grubunda atorvastatin için tayin edilen permeabilite değeri ($1.283 \pm 0.548 \times 10^{-6}$ cm/sn) literatürde verilen sınırlar içerisinde yer almakta olup Shulyak ve ark. nın çalışmalarında elde edilen permeabilite değerine ($0.9 \pm 0.1 \times 10^{-6}$ cm/sn) benzerlik göstermektedir. Atorvastatinin gastrointestinal kanaldaki metabolizasyonu başlıca CYP3A4 ve CYP3A5 aracılığıyla gerçekleşmekte olup diğer CYP450 enzimleri (CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 gibi) ile metabolizasyona uğradığı gösterilmemiştir (240, 241). Taşıyıcı proteinlerle yapılan çalışmalarda ise atorvastatinin apikal taşıyıcılardan BCRP ve P-gp ile basolateral taşıyıcılardan MRP3 substratı olduğu gösterilmiştir (242, 243). *In vitro* modellerde atorvastatinin potansiyel P-gp inhibitörü olduğu ve bu etkinin yüksek konsantrasyonlarda gerçekleştiği bildirilmiştir (244, 245). Çalışmamızda naringin ve ketokonazol atorvastatin için CYP3A4 inhibitörü olarak kullanılmıştır. Literatürde farklı flavonoidlerin (naringin, naringenin, rutin, apigenin, kuersetin) atorvastatinin OATP aracılı taşınmasında etkisinin değerlendirildiği hücre kültürü çalışmaları (246) olmakta birlikte Caco-2 hücre hattının kullanıldığı bir çalışma mevcut değildir. Ayrıca ketokonazolün atorvastatinin intestinal permeabilitesi üzerine etkisinin değerlendirildiği hücre kültürü çalışması bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında ilk kez Caco-2 hücre hattı kullanılarak atorvastatinin intestinal permeabilitesi üzerine naringin ve ketokonazolün etkisi değerlendirilmiştir. Naringin ve ketokonazolün CYP3A4 inhibitör etkisi sonucu atorvastatinin daha az metabolizasyona uğrayarak permeabilitesinin artması beklenirken, permeabilite naringin ve ketokonazol varlığında azalmıştır. Bu durumun hücre içinde artan ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak P-gp substratı olan atorvastatinin hücrelerin apikal kısımlarına iletilmesi olabileceği düşünülmektedir. Greyfurt suyu bileşeni varlığında ketokonazole benzer

etkinin gözlenmesi, naringinin CYP3A4 inhibisyon etkisinin olduğunu göstermektedir. Ancak görünür permeabilite katsayısındaki azalma CYP3A4 inhibitörü ketokonazolde olduğu gibi anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda naringinin CYP3A4 inhibitörü etkisinin düşük olduğu söylenebilir.

Pravastatin: Pravastatin için Caco-2 hücrelerinden elde edilen görünür permeabilite katsayıları (P_{app} ; 10^{-6} cm/sn; Ort \pm SS) kontrol grubunda 2.059 ± 0.701 cm/sn, naringin grubunda 5.028 ± 1.878 cm/sn ve inhibitör (rifampin) grubunda 5.263 ± 2.524 cm/sn olarak bulunmuştur. Pravastatinin permeabilitesindeki artış naringin ($p=0.0148$) ve OATP inhibitörü rifampin varlığında ($p=0.0089$) istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Zhu ve ark. pravastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilitesini $79.33 \pm 4.80 \times 10^{-6}$ cm/sn (247); Lee ve ark. ise 0.14×10^{-6} cm/sn olarak bildirilmiştir (248). Kontrol grubunda elde ettiğimiz permeabilite değeri ($2,059 \pm 0,701 \times 10^{-6}$ cm/sn) literatürdeki çalışmalardan farklı bulunmuştur. Pravastatin metabolizasyonunda CYP3A enzimlerinin önemli katkısı yoktur. Oral uygulamadan sonra kısmen midede parçalanır, kısmen sitokrom P450 dışındaki enzimler tarafından metabolize edilir veya değişmemiş ilaç olarak idrar ve safraya atılır (118). Pravastatin in safra yolu ile atılımına MRP2 aracılık ederken (249) ilacın MRP3 substratı olabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (242). OATP1B1 substratı olduğu bilinen pravastatinin taşınmasında düşük oranda OATP2B1, BSEP ve BCRP taşıyıcıları da etkilidir (250). Literatürde naringinin pravastatinin OATP aracılı taşınımı üzerine etkisini değerlendirmek için *in vitro* (*Xenopus laevis* oositler, LLC-PK1 hücreleri), *in situ* (intestinal closed-loop) ve ratlarda farmakokinetik çalışmalar yapılmıştır (184, 251). Ayrıca rifampinin pravastatin ile etkileşimin değerlendirildiği insanlarda yapılmış farmakokinetik çalışmalar (252, 253) olmakla birlikte, OATP1B1 inhibitörü olarak rifampinin kullanıldığı ve pravastatinin insan hepatosit (SCHH) hücrelerinden taşınımının değerlendirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (254). Ancak pravastatinin Caco-2 hücrelerinde intestinal permeabilitesinin naringin ve rifampin varlığında değerlendirildiği bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda naringin ve rifampin OATP inhibitörü olarak kullanılmış ve bu inhibitörler varlığında pravastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi ilk defa değerlendirilmiştir. Naringin ve rifampin varlığında OATP1B1

substratı olan pravastatinin permeabilitesinin azalması beklenmektedir. Ancak naringin ve rifampin varlığında pravastatin P_{app} değerlerinde artış gözlenmiştir. Literatürde OATP1B1 substratı olan rifampinin otoindüksiyondan da sorumlu olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (255, 256). Bu bilgiler doğrultusunda hücre içi metabolizasyon enzimlerinden etkilenmeyen pravastatinin bu inhibitörler varlığında permeabilitesindeki artışın naringin ve rifampinin OATP1B1 taşıyıcı proteini için hem inhibitör hem de indükleyici etkilerinin olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Naringin varlığında rifampine benzer şekilde pravastatinin görünür permeabilite katsayısındaki anlamlı artış, naringinin de OATP indükleyici etkisi olduğunu desteklemektedir. Naringinin böyle bir etkisinin olup olmadığı yüksek oranda OATP1B1 eksprese eden transfekte hücre hattı kullanılarak daha detaylı olarak incelenebilir.

Simvastatin: Tez çalışmamızda simvastatine ait kontrol, naringin ve inhibitör (elakridar) gruplarında sırasıyla elde edilen görünür permeabilite katsayıları (P_{app} ; 10^{-6} cm/sn; Ort \pm SS) 3.192 ± 0.682 , 0.900 ± 0.069 ve 0.674 ± 0.111 cm/sn olarak tayin edilmiştir. Simvastatinin Caco-2 hücrelerinden A→B permeabilitesi naringin ve P-gp inhibitörü elakridar varlığında ($p < 0.0001$) önemli derecede azalmıştır. Simvastatinin metabolizasyonu asıl olarak CYP3A4 aracılığıyla gerçekleşmektedir (240). *In vitro* çalışmalarla simvastatinin potansiyel P-gp inhibitörü olduğu da bildirilmiştir (244, 245). Diğer taşıyıcılarla yapılan çalışmalarda simvastatinin BCRP, MRP2, MRP3, MRP4 ve MRP8 substratı olmadığı belirtilmiştir (242). Başka bir çalışmada ise simvastatinin P-gp ve OATP1B1 için hem inhibitör hem substrat olduğu, BCRP ve MRP2 için inhibitör olduğu gösterilmiştir (257). Literatürde simvastatinin naringenin ile etkileşiminin değerlendirildiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar (258-260) olmasına rağmen naringin ile etkileşimi değerlendirilmemiştir. Aynı zamanda elakridarın P-gp inhibitörü olarak simvastatinin permeabilitesi üzerine etkisinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında naringin ve elakridar P-gp inhibitörü olarak kullanılmış ve simvastatinin Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi üzerine etkisi ilk defa değerlendirilmiştir. P-gp inhibisyonu ile simvastatinin apikalden basolaterale (A→B) permeabilitesinin artması gerekmektedir. Ancak naringin ve elakridar varlığında

azalan permeabilite değerlerinin, hücre içinde simvastatinin CYP3A4 metabolizasyonuna uğraması sonucu olabileceği düşünülmektedir. Greyfurt suyu bileşeni naringin varlığında elakridara benzer etki gözlenmiş ve görünür permeabilite katsayısındaki azalma her iki madde için anlamlı bulunmuştur. Bu durum literatürde Caco-2, LLC-PK1, MDR1 gibi hücre hatlarında gösterilen naringinin P-gp inhibitör etkisi (261, 262) olduğunu desteklemektedir.

Lovastatin: Lovastatinle yapılan hücre kültürü çalışmalarında üç grup için (kontrol, naringin, elakridar) P_{app} değerleri hesaplanamamıştır. Deneyler sırasında hazırlanan lovastatin stok çözeltisinde DMSO konsantrasyonu %1'i aşmayacak şekilde artırılmasına rağmen, etkin madde için tam çözünme sağlanmamıştır. Buna rağmen permeabilite katsayısının hesaplanmasında, apikal kompartmandan uygulanan çözeltideki madde konsantrasyonu ile basolateral kompartmandan toplanan örneklerdeki madde konsantrasyonu önemli olduğu için deneylere devam edilmiştir. Ancak lovastatin apikal kompartmana eklenen çözelti içinde tam olarak çözünmediği için basolateral kompartmandan toplanan örneklerdeki madde miktarı geliştirilen HPLC yöntemi ile tayin edilemediği için bir permeabilite katsayısı hesaplanamamıştır. Bu duruma CYP3A4 ve P-gp substratı olan lovastatin için (240, 257) naringin ve elakridar varlığında gözlenen P-gp inhibisyonu sonucu hücre içinde artan madde konsantrasyonuna bağlı olarak artan CYP3A4 metabolizasyonu etkin maddenin yıkımına ve basolateral kompartmana geçen miktarın azalmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

Mevcut kılavuzlarda hücre kültürü çalışmalarından tayin edilen P_{app} değerlerinin yorumlanmasıyla ilgili bir açıklama bulunmamakla birlikte literatürde çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Yee, etkin maddelerin oral absorpsiyonlarını Caco-2 hücrelerinden tayin edilen permeabilite değerlerine göre sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırmaya göre $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/sn ise oral absorpsiyonun zayıf (%0–20%), $P_{app} = 1-10 \times 10^{-6}$ cm/sn ise oral absorpsiyonun orta derece (%20–70) ve $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm/sn ise oral absorpsiyonun iyi (70–100%) olduğu belirtilmiştir (263). Kogan ve ark. ise P_{app} değerine göre etkin maddenin permeabilitesini sınıflandırmış $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/sn ise permeabilitenin düşük, $P_{app} < 1 \times 10^{-5}$ cm/sn ise permeabilitenin orta derece ve $P_{app} > 1 \times 10^{-5}$ cm/sn ise permeabilitenin yüksek olduğu

belirtilmiştir (264). Yazdanian ve ark. $P_{app} < 0.4 \times 10^{-6}$ cm/sn ise etkin maddenin oral absorpsiyonunun çok zayıf, $P_{app} > 7 \times 10^{-6}$ cm/sn ise etkin maddenin oral absorpsiyonunun çok iyi olduğunu ifade etmiştir (265). Bu veriler doğrultusunda çalışmamızda atorvastatin, pravastatin ve simvastatin için kontrol gruplarında sırasıyla elde edilen P_{app} değerlerine ($1.283 \pm 0.548 \times 10^{-6}$ cm/sn, $2.059 \pm 0.701 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $3.192 \pm 0.682 \times 10^{-6}$ cm/sn) bakıldığında üç statin için permeabilitenin orta derecede olduğu söylenebilir. BSS'ne göre Sınıf II (düşük çözünürlük, yüksek permeabilite) etkin maddeler olan atorvastatin ve simvastatin için Caco-2 hücrelerinde elde edilen permeabilite değerleri düşük bulunmuştur.

Tez çalışmamızda kullanılan model ilaçların (atorvastatin, pravastatin, simvastatin ve lovastatin) BSS'ne göre hangi sınıfta yer aldıkları, metabolizasyonlarında rol oynayan enzimler, substrat ve inhibitörü olan taşıyıcılar Tablo 5.1'de özetlenmiştir. BSS'ne göre Sınıf II'de yer alan ilaçlar Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi'ne (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System-BDDCS) uygun olarak yüksek metabolizasyona uğramaktadır. Sınıf III ilaçlar ise düşük oranda metabolizasyona uğramaktadır. Yüksek permeabiliteye sahip Sınıf II ilaçların intestinal absorpsiyonunda eksorptif taşıyıcılar önemli rol oynarken, karaciğerde hem absorptif hem eksorptif taşıyıcılar rol almaktadır. Düşük permeabiliteye sahip Sınıf III ilaçlar için hem bağırsak hem de karaciğerde absorptif taşıyıcılar rol oynamaktadır (266). Çalışmamızda kullanılan model ilaçlardan atorvastatin, simvastatin ve lovastatin Sınıf II etkin maddeler olup, CYP3A4 enzimi ile yüksek oranda metabolizasyona uğramaktadır. Ek olarak bu etkin maddelerin intestinal absorpsiyonlarında eksorptif P-gp, MRP2, BCRP gibi taşıyıcılar önemli rol oynamaktadır. Pravastatin ise Sınıf III bir etkin madde olup önemli ölçüde metabolize edilmemektedir ve intestinal absorpsiyonunda absorptif OATP taşıyıcıları rol oynamaktadır.

Tablo 5.1. Çalışmada kullanılan model ilaçların absorpsiyon ve metabolizasyonunda rol oynayan taşıyıcılar ve enzimler.

Model İlaç	BSS Sınıfı	Metabolizasyon Enzimleri	Substrat Olan Taşıyıcılar	İnhibitör Olan Taşıyıcılar	Kaynak
Atorva- -statin	II	CYP3A4 CYP3A5 CYP2C8 CYP2C9 CYP2D6	P-gp MRP2 MRP3 BCRP	P-gp MRP2 BCRP OATP1B1	(240- 245, 257)
Prava- -statin	III	-	MRP2 MRP3 BSEP BCRP OATP1B1 OATP2B1		(242, 249, 250)
Simva- -statin	II	CYP3A4* CYP2C8	P-gp OATP1B1	P-gp MRP2 BCRP OATP1B1	(118, 240, 257)
Lova- -statin	II	CYP3A4* CYP2C8	P-gp OATP1B1	P-gp MRP2 OATP1B1	(118, 240, 245, 257)

*Simvastatin ve lovastatinin CYP3A4 enzimi için hem substrat hem inhibitör olduğu bildirilmiştir (118).

5.4. *In Situ* Bağırsak Perfüzyonu Çalışmaları

İlaçların permeabilitelerinin belirlenmesinde *in vitro* (hücre hatları, yapay membranlar) yöntemlere ek olarak *in situ* (intestinal perfüzyon) ve *ex vivo* (*everted sac*, *Ussing Chamber*) yöntemler de mevcuttur. *In situ* testlerin avantajı *in vivo* koşullara en yakın sonuçların elde edilmesidir. Yöntem anestezi ve cerrahi bir işlem gerektirmekle birlikte kan akışı ile innervasyon korunmaktadır. Dezavantajı ise hayvan kullanımı ve bir tarama yöntemi olmamasıdır. *In situ* perfüzyon çalışmaları tek geçişli (*single pass*) veya sirkülasyonlu (*recirculation*) yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Tek geçişli perfüzyon yönteminde anestezi altındaki hayvanın bağırsağının bir veya birden fazla bölümü proksimal ve distal olarak kanüle edilir, tampon çözeltiyle temizlenir ve ilaç çözeltisiyle perfüze edilir. Bağırsak

permeabilitesi (P_{eff}) ise perfüze edilen bölgeye giren ve çıkan çözeltilerdeki madde konsantrasyonu arasındaki farktan hesaplanır. Yapılan çalışmalarda tek geçişli *in situ* perfüzyon çalışma bulgularının *in vivo* absorpsiyon değerleri ile iyi bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (267, 268).

Tez önerisinde model ilaç olarak seçilen atorvastatin (BSS sınıf II), pravastatin (BSS Sınıf III), simvastatin (BSS Sınıf II) ve lovastatinin (BSS sınıf II) bağırsaklardan permeabilitesi ve absorpsiyonu üzerine greyfurt suyu bileşeni naringin ve inhibitörlerin (ketokonazol, rifampin, elakridar) etkisinin lümen kayıp esasına dayanan *in situ* tek geçişli perfüzyon tekniği ile incelenmesi planlanmıştır. Ancak *in situ* perfüzyon çalışmalarının tamamı pandemi döneminde gerçekleştirilmiş olduğu için özellikle simvastatin ve lovastatin için temin edilen miktarların perfüzyon deneyleri için yeterli olmaması, deney hayvanı temininde yaşanan sorunlar ve de hücre kültürü çalışmalarından elde edilen bulgular doğrultusunda *in situ* perfüzyon deneylerine atorvastatin ve pravastatin ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Perfüzyon deneylerinde pandemi döneminde temini daha kolay olan dişi sıçanlar kullanılmıştır. Perfüzyon çözeltisi olarak pH 7.4'e ayarlanmış HEPES tamponu kullanılmıştır (189). Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılacak model ilaçlar (atorvastatin, pravastatin) ve inhibitör maddelerin (naringin, ketokonazol, rifampin) perfüzyon çözeltisine eklenecek konsantrasyonları literatüre göre belirlenmiştir. Kullanılan model ilaç ve inhibitörlerin suda çözünürlükleri düşük olduğu için perfüzyon çözeltisine %1 konsantrasyonda DMSO eklenmiştir. Perfüzyon çalışmalarında kullanılacak etkin madde konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla tedavide kullanılan en yüksek dozun 250 mL'ye bölünmesi ile yaklaşımı uygulanmaktadır (166). Atorvastatin için tedavide kullanılan en yüksek doz 80 mg olmasına rağmen, etkin maddenin çözünürlük sorunu olması nedeniyle 40 mg doz seçilerek perfüzyon çözeltisine eklenecek atorvastatin konsantrasyonu 160 µg/mL olarak belirlenmiştir. Pravastatin için tedavide kullanılan en yüksek doz 40 mg olmasına rağmen, etkin maddenin miktarının yetersiz olması nedeniyle 10 mg doz seçilerek perfüzyon çözeltisine eklenecek pravastatin konsantrasyonu 40 µg/mL olarak belirlenmiştir. Naringin için perfüzyon çözeltisine eklenecek konsantrasyon 1000 µM olarak belirlenmiştir (167, 168). Spesifik inhibitörler rifampin ve

ketokonazolün perfüzyon çözeltisine eklenecek konsantrasyonları sırasıyla 100 µM ve 50 µg/mL olarak belirlenmiştir (186, 187).

In situ bağırsak perfüzyonu çalışmalarında perfüzyon çözeltisine yüksek permeabilite ajanı olarak metoprolol ve net su akışını (net water flux) değerlendirmek için fenol kırmızısının eklenmesi yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Bizim çalışmamızda atorvastatin ve pravastatinin her iki madde ile de girişim yapması ve uygulanan çözüm yaklaşımlarıyla bu girişim sorununun çözülememesi nedeniyle perfüzyon deneyleri metoprolol ve fenol kırmızısı kullanılmadan gerçekleştirilmiştir. Literatürde perfüzyon çalışmalarında net su akışını değerlendirmek için radyoaktif işaretli polietilen glikol, hemoglobün gibi absorplanmayan ajanların kullanıldığı alternatif yöntemler de mevcuttur (191, 269). Ancak hemoglobününün biyolojik materyal olması ve temininin güç olması, radyoaktif işaretli izotopların güvenlik açısından sorun yaratması nedenleriyle tercih edilmemektedir. Absorplanmayan bu maddelerle ilgili bu sorunların elimine edilmesi amacıyla gravimetrik yöntem basit bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin esası perfüzyon deneyi boyunca toplanan perfüzatın ağırlığının tayin edilmesi ve bu değerin hacim olarak ifade edilmesine dayanmaktadır. Perfüze edilen segmente giren ve çıkan hacme göre düzeltme yapıldıktan sonra ilacın P_{eff} değeri hesaplanmaktadır (191). Yapılan bir çalışmada permeabilite hesaplanmasında gravimetrik yöntem ve fenol kırmızısına göre su absorpsiyonunun düzeltilmesi amacıyla bu iki yöntemin birbiri yerine kullanılabilir olduğu gösterilmiştir (270). Tez çalışması kapsamındaki tüm perfüzyon deneylerinde gravimetrik yöntem kullanılmış ve permeabilite değerleri bu yöntem için önerilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (192).

5.4.1. Atorvastatinle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları

Perfüzyon deneylerinde izole segment (ileum) perfüzyon çözeltisi (HEPES tamponu) ile dengeye ulaşana kadar (30 dk) perfüze edilmiştir. Ardından 160 µg/mL atorvastatin içeren HEPES tamponu ile ileum 60 dk perfüze edilmiş ve her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra 1000 µM naringin (Grup 1) veya 50 µg/mL ketokonazol (Grup 2) perfüzyon çözeltisine eklenerek ileum 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu dengelenme süresinin sonunda ileum naringin veya ketokonazol içeren perfüzyon çözeltisiyle 60 dk daha perfüze edilerek her 10 dakikada bir örnek

toplanmıştır. Atorvastatinin permeabilitesinde değişiklik olup olmadığı naringin veya ketokonazol varlığında değerlendirilmiştir. Etkin maddenin permeabilite değeri (P_{eff}), absorplanan fraksiyonu (F_a) ve absorpsiyon hız sabiti (k_a) hesaplanmıştır (192).

Atorvastatin-naringin (Grup 1) grubunda hesaplanan permeabilite (P_{eff} ; 10^{-5} ; Ort \pm SS) değerleri naringin yokluğunda ve varlığında sırasıyla 3.846 ± 0.518 ve 2.629 ± 0.293 cm/sn olarak hesaplanmıştır. Naringin varlığında atorvastatinin permeabilite değerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0009$). Absorplanan fraksiyon (F_a ; Ort \pm SS) değerleri naringin yokluğunda ve varlığında sırasıyla 0.055 ± 0.006 ve 0.036 ± 0.004 olarak belirlenmiştir. Absorpsiyon hız sabiti (k_a ; dk^{-1} ; Ort \pm SS) değerleri ise aynı sıra ile 0.025 ± 0.003 ve 0.018 ± 0.002 dk^{-1} olarak bulunmuştur. Naringin varlığında atorvastatine ait F_a ($p=0.0003$) ve k_a ($p=0.001$) değerleri de önemli derecede azalma göstermiştir. Naringin varlığında atorvastatinin hem absorplanan fraksiyonundaki hem de absorpsiyon hız sabitindeki azalmanın permeabilite değerindeki azalmayla uyumlu olduğu görülmektedir. Literatürde intestinal perfüzyon çalışması ile atorvastatinin permeabilitesinin belirlendiği çok fazla çalışma olmamakla birlikte, yapılan bir çalışmada atorvastatin için 10, 20 ve 40 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarda ileumdan hesaplanan permeabilite (P_{eff} ; 10^{-4}) değerleri sırasıyla 0.475 ± 0.052 , 0.456 ± 0.067 ve 0.437 ± 0.116 cm/sn olarak bildirilmiştir (271). Bizim çalışmamızda inhibitör (naringin) yokken bulunan bağırsak permeabilite değeri ($3.846 \pm 0.518 \times 10^{-5}$ cm/sn); Mandal ve ark. nın sıçanlarda intestinal perfüzyon yöntemi ile belirlediği permeabilite değerine ($\sim 4.5 \times 10^{-5}$ cm/sn) benzerlik göstermektedir. Tez çalışmamız kapsamında potansiyel CYP3A4 inhibitörü olduğu düşünülen naringin varlığında ilk kez hem hücre kültürü hem de intestinal perfüzyon çalışmaları ile atorvastatinin permeabilitesi değerlendirilmiştir. Naringin varlığında atorvastatin permeabilitesinin her iki yöntemde de azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma hücre kültürü çalışmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, intestinal perfüzyon çalışmalarında P_{eff} değerinde kayda değer azalma gözlenmiştir ($p=0.0009$). Atorvastatin permeabilitesindeki azalmanın nedeni; CYP3A4 inhibisyonu sonucu hücre içinde artan ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak aynı zamanda bir P-gp substratı olan atorvastatinin hücrelerin apikal kısımlarına iletilmesi olduğu düşünülmektedir.

Atorvastatin-ketokonazol (Grup 2) grubunda hesaplanan permeabilite (P_{eff} ; 10^{-5} ; Ort \pm SS) değerleri ketokonazol yokluğunda ve varlığında sırasıyla 2.742 ± 1.693

ve 1.160 ± 0.988 olarak hesaplanmıştır. Ketokonazol varlığında atorvastatinin permeabilite değerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0038$). Absorplanan fraksiyon (F_a ; Ort \pm SS) değerleri ketokonazol yokluğunda ve varlığında sırasıyla 0.043 ± 0.026 ve 0.020 ± 0.017 olarak belirlenmiştir. Absorpsiyon hız sabiti (k_a ; dk^{-1} ; Ort \pm SS) değerleri ise aynı sıra ile 0.018 ± 0.011 ve 0.007 ± 0.006 şeklinde bulunmuştur. Ketokonazol varlığında atorvastatine ait F_a ($p=0.018$) ve k_a ($p=0.0082$) değerleri de önemli derecede azalma göstermiştir. Ketokonazol varlığında atorvastatinin hem absorplanan fraksiyonundaki hem de absorpsiyon hız sabitindeki azalmanın permeabilite değerindeki azalmayla uyumlu olduğu görülmektedir. Grup 2’de (atorvastatin-ketokonazol) ketokonazol yokken elde edilen permeabilite değeri ($2.742 \pm 1.693 \times 10^{-5}$ cm/sn), Grup 1’de (atorvastatin-naringin) naringin yokken elde edilen permeabilite değerinden ($3.846 \pm 0.518 \times 10^{-5}$ cm/sn) biraz daha düşük bulunmuştur. Benzer şekilde absorplanan fraksiyon (F_a) değerleri de Grup 2’de ketokonazol yokluğunda 0.043 ± 0.026 iken; Grup 1’de naringin yokluğunda 0.055 ± 0.006 olarak bulunmuştur. Absorpsiyon hız sabiti (k_a ; dk^{-1}) inhibitör yokken Grup 2’de (0.018 ± 0.011), Grup 1’e (0.025 ± 0.003) kıyasla daha düşük bulunmuştur.

Atorvastatin ile ketokonazol etkileşimi *in silico* moleküler modelleme ve *in vitro* sinerji testleri ile (272) ve transgenik farelerde farmakokinetik çalışmalarla (273) değerlendirilmiştir. Tez çalışmamız dahilinde ketokonazolün atorvastatin permeabilitesi üzerine etkisi ilk kez hem Caco-2 hücre kültürü hem de intestinal perfüzyon çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Her iki yöntem ile ketokonazol varlığında atorvastatinin permeabilite değeri anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$).

5.4.2. Pravastatinle Yapılan Perfüzyon Çalışmaları

Perfüzyon deneylerinde izole segment (ileum) perfüzyon çözeltisi (HEPES tamponu) ile dengeye ulaşana kadar (30 dk) perfüze edilmiştir. Ardından $40 \mu g/mL$ pravastatin içeren HEPES tamponu ile ileum 60 dk perfüze edilmiş ve her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Daha sonra $1000 \mu M$ naringin (Grup 3) veya $100 \mu M$ rifampin (Grup 4) perfüzyon çözeltisine eklenerek ileum 30 dk süreyle perfüze edilmiştir. Bu dengelenme süresinin sonunda ileum naringin veya rifampin içeren perfüzyon çözeltisiyle 60 dk daha perfüze edilerek her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır. Pravastatinin permeabilitesinde değişiklik olup olmadığı naringin veya rifampin

varlığında değerlendirilmiştir. Etkin maddenin permeabilite değeri (P_{eff}), absorplanan fraksiyonu (F_a) ve absorpsiyon hız sabiti (k_a) hesaplanmıştır (192).

Pravastatin-naringin (Grup 3) grubunda hesaplanan permeabilite (P_{eff} ; 10^{-5} ; Ort \pm SS) değerleri naringin yokluğunda ve varlığında sırasıyla 6.120 ± 0.350 cm/sn ve 2.824 ± 0.274 cm/sn olarak hesaplanmıştır. Naringin varlığında pravastatinin permeabilite değerindeki yaklaşık 3 katlık bir azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Absorplanan fraksiyon (F_a ; Ort \pm SS) değerleri naringin yokluğunda ve varlığında sırasıyla 0.112 ± 0.006 ve 0.054 ± 0.005 olarak belirlenmiştir. Absorpsiyon hız sabiti (k_a ; dk^{-1} ; Ort \pm SS) değerleri ise aynı sıra ile 0.041 ± 0.002 ve 0.019 ± 0.002 şeklinde bulunmuştur. Naringin varlığında pravastatine ait F_a ve k_a değerleri de anlamlı derecede azalma göstermiştir ($p < 0.0001$). Naringin varlığında pravastatinin hem absorplanan fraksiyonundaki hem de absorpsiyon hız sabitindeki azalmanın permeabilite değerindeki azalmayla uyumlu olduğu görülmektedir. Literatürde pravastatinin permeabilitesini değerlendirmek için *in vitro* ve *in situ* intestinal closed loop yöntemi kullanılan çalışmalar mevcuttur. *In situ* closed loop yöntemi ile sıçanlarda pravastatinin intestinal permeabilite değeri $4.20 \pm 0.29 \times 10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada $1000 \mu M$ naringin varlığında permeabilite $1.91 \pm 0.40 \times 10^{-6}$ cm/sn olacak şekilde azalmıştır (184). Bizim çalışmamızda *in situ* intestinal perfüzyon yöntemi ile pravastatin için elde ettiğimiz permeabilite değeri ($6.120 \pm 0.350 \times 10^{-5}$ cm/sn) literatür verilerinden yüksek bulunmuştur. Ancak Shirasaka ve ark. nın çalışmalarına benzer olarak naringin varlığında permeabilite değeri anlamlı derecede azalmıştır. OATP1B1 substratı olduğu bilinen pravastatinin taşınmasında az oranda OATP2B1, BSEP, MRP2 ve BCRP taşıyıcıları da etkilidir (250). Çalışmamızda naringin OATP inhibitörü olarak kullanılmış ve naringin varlığında OATP1B1 substratı olan pravastatinin permeabilitesinin azalmıştır. Ancak Caco-2 hücre kültürü çalışmalarında naringin varlığında pravastatinin permeabilitesinin arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla naringin varlığında pravastatin permeabilitesindeki değişim Caco-2 hücre kültürü ve intestinal perfüzyon çalışmalarında farklı bulunmuştur.

Pravastatin-rifampin (Grup 4) grubunda hesaplanan permeabilite (P_{eff} ; 10^{-5} ; Ort \pm SS) değerleri rifampin yokluğunda ve varlığında sırasıyla 1.241 ± 0.743 cm/sn ve 0.727 ± 0.463 cm/sn olarak hesaplanmıştır. Absorplanan fraksiyon (F_a ; Ort \pm SS)

değerleri rifampin yokluğunda ve varlığında sırasıyla 0.024 ± 0.015 ve 0.012 ± 0.008 olarak belirlenmiştir. Absorpsiyon hız sabiti (k_a ; dk^{-1} ; Ort \pm SS) değerleri ise aynı sıra ile 0.009 ± 0.005 ve 0.005 ± 0.003 şeklinde bulunmuştur. Rifampin varlığında pravastatine ait P_{eff} ve k_a değerleri önemli derecede değişmezken, F_a değeri önemli derecede azalmıştır ($p=0.027$). Rifampin varlığında pravastatinin hem absorplanan fraksiyonundaki hem de absorpsiyon hız sabitindeki azalmanın permeabilite değerindeki azalmayla uyumlu olduğu görülmektedir. Grup 4'te (pravastatin-rifampin) rifampin yokken elde edilen permeabilite değeri ($1.241 \pm 0.743 \times 10^{-5}$ cm/sn), Grup 3'te (pravastatin-naringin) naringin yokken elde edilen permeabilite değerinden ($6.120 \pm 0.350 \times 10^{-5}$ cm/sn) düşük bulunmuştur. Benzer şekilde absorplanan fraksiyon (F_a) değerleri de Grup 4'te rifampin yokluğunda 0.024 ± 0.015 iken; Grup 3'te naringin yokluğunda 0.112 ± 0.006 olarak bulunmuştur. Absorpsiyon hız sabiti (k_a ; dk^{-1}) inhibitör yokken Grup 4'te (0.009 ± 0.005), Grup 3'e (0.041 ± 0.002) kıyasla düşük bulunmuştur.

Pravastatin ile rifampin etkileşimi insanlarda farmakokinetik çalışmalarla (252, 253) değerlendirilmiştir. Tez çalışmamız dahilinde rifampinin pravastatin permeabilitesi üzerine etkisi ilk kez hem Caco-2 hücre kültürü hem de intestinal perfüzyon çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Caco-2 hücre kültürü çalışmalarında inhibitörler (naringin, rifampin) varlığında pravastatinin permeabilitesi artarken, intestinal perfüzyon çalışmalarında azalmıştır. Bu nedenle inhibitörlerin (naringin ve rifampin) pravastatinin permeabilitesi üzerine etkisinin sonuçları *in vitro* ve *in situ* modellerde uyumlu bulunmamıştır.

Bir ilacın oral biyoyararlanımı (F); absorplanan fraksiyon (F_a), gastrointestinal kanal duvarı eliminasyonundan kaçan fraksiyon (F_g) ve karaciğerde ilk geçiş eliminasyonundan kaçan fraksiyonun (F_h) bir ürünüdür. Tez çalışmamız kapsamında yapılan *in situ* bağırsak perfüzyonu deneylerinde belirlenen parametrelerden biri olan F_a değeri, tek başına biyoyararlanım hakkında bilgi sağlamak için yeterli değildir. Bu çalışmada kullanılan model ilaçların (atorvastatin, pravastatin, simvastatin, lovastatin) literatürde verilen oral biyoyararlanım ve oral absorpsiyon değerleri de birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu durum model ilaçların metabolizasyon enzimleri ve taşıyıcı proteinlere afinitelerine bağlı olarak gastrointestinal kanal ve/veya karaciğerde yıkımı ile açıklanabilir. Bu çalışmada kullanılan model ilaçların

oral biyoyararlanım ve oral absorpsiyon değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo 5.2’de verilmiştir.

Tablo 5.2. Çalışmada kullanılan model ilaçların karşılaştırmalı oral absorpsiyon ve oral biyoyararlanım değerleri.

Model İlaç	Oral Absorpsiyon (%)	Oral Biyoyararlanım (%)	Oral biyoyararlanımın dūřuk olma nedenleri
Atorvastatin	30	12	CYP450 enzimleri ile gastrointestinal kanal ve/veya karaciğerde metabolizasyon
Pravastatin	35	18	Gastrointestinal kanalda eksorptif taşıyıcılar aracılığıyla taşınma
Simvastatin	60-85	<5	CYP450 enzimleri ile gastrointestinal kanal ve/veya karaciğerde metabolizasyon
Lovastatin	30	5	CYP450 enzimleri ile gastrointestinal kanal ve/veya karaciğerde metabolizasyon

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında model ilaç olarak seçilen atorvastatin, pravastatin, simvastatin, lovastatin'in doyunluk çözünürlük çalışmaları ve Caco- 2 hücre hattından permeabiliteleri incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen bulgular doğrultusunda atorvastatin ve pravastatinin intestinal permeabiliteleri *in situ* intestinal perfüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Caco-2 hücre hattı ve intestinal perfüzyon çalışmalarında greyfurt suyu bileşeni naringin ve seçilen spesifik inhibitörler (ketokonazol: CYP3A4 inhibitörü, rifampin: OATP inhibitörü, elakridar: P-gp inhibitörü) varlığında ve yokluğunda etkin maddelerin permeabiliteleri tayin edilmiştir. Yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

Çözünürlük deneyleri:

- Tüm etkin maddeler için doyunluk çözünürlük çalışmaları pH 1.2, 4.5 ve 6.8 ortamlarında gerçekleştirilmiştir.
- Atorvastatinin pH bağımlı bir çözünürlük gösterdiği ve pH 6.8 tamponunda yüksek çözünürlüğe sahip olduğu, BSS'ne göre düşük çözünürlük gösterdiği bulunmuştur.
- Pravastatinin tüm ortamlarda (pH 1.2, 4.5 ve 6.8) yüksek çözünürlüğe sahip olduğu ve BSS'ne göre yüksek çözünürlük gösterdiği bulunmuştur.
- Simvastatinin tüm ortamlarda (pH 1.2, 4.5 ve 6.8) düşük çözünürlüğe sahip olduğu ve BSS'ne göre düşük çözünürlük gösterdiği bulunmuştur.
- Lovastatinin tüm ortamlarda (pH 1.2, 4.5 ve 6.8) düşük çözünürlüğe sahip olduğu ve BSS'ne göre düşük çözünürlük gösterdiği bulunmuştur.

Hücre kültürü çalışmaları:

- Tüm etkin maddelerin Caco-2 hücre hattından permeabilite çalışmalarında kullanılacak konsantrasyonlarını tayin etmek amacıyla 24 ve 48 saat süreyle MTT testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen

bulgular doğrultusunda permeabilite deneylerinde atorvastatinin 100 µg/mL, pravastatinin 50 µg/mL, simvastatinin 50 µg/mL, ve lovastatinin 100 µg/mL konsantrasyonlarda kullanılmasına karar verilmiştir.

- Atorvastatinin Caco-2 hücrelerinden apikalden bazolaterale permeabilitesi naringin varlığında önemli derecede değişmezken, ketokonazol varlığında önemli derecede ($p=0.0142$) azalmıştır.
- Pravastatinin Caco-2 hücrelerinden apikalden bazolaterale permeabilitesi hem naringin varlığında ($p=0.0148$) hem de rifampin varlığında ($p=0.0089$) önemli derecede artmıştır.
- Simvastatinin Caco-2 hücrelerinden apikalden bazolaterale permeabilitesi naringin ve elakridar varlığında ($p<0.0001$) önemli derecede azalmıştır.
- Lovastatinin miktar tayini gerçekleştirilemediği için Caco-2 hücrelerinden permeabilitesi tayin edilememiştir.

İntestinal perfüzyon çalışmaları:

- Naringinle birlikte uygulandığında atorvastatinin ileumdan absorpsiyonu ($p=0.0009$), absorplanan fraksiyonu ($p=0.0003$) ve absorpsiyon hız sabiti ($p=0.001$) değerleri önemli derecede azalmıştır.
- Ketokonazol ile birlikte uygulandığında atorvastatinin ileumdan absorpsiyonu ileumdan absorpsiyonu ($p=0.0038$), absorplanan fraksiyon ($p=0.018$) ve absorpsiyon hız sabiti ($p=0.0082$) değerleri önemli derecede azalmıştır.
- Naringin ile birlikte uygulandığında pravastatinin ileumdan absorpsiyonu ($p<0.0001$), absorplanan fraksiyonu ve absorpsiyon hız sabiti ($p<0.0001$). değerleri önemli derecede azalmıştır.
- Rifampin ile birlikte uygulandığında pravastatinin ileumdan absorpsiyonu ve absorpsiyon hız sabiti anlamlı derecede değişmezken, absorplanan fraksiyonu önemli derecede ($p=0.027$) azalmıştır.

Hücre kültürü ve intestinal perfüzyon çalışmalarından elde edilen bulgular greyfurt suyunda yüksek oranda bulunan nariniginin spesifik CYP3A4 inhibitörü olan ketokonazol ve OATP inhibitörü olan rifampine benzer bir etki gösterdiğini kanıtlamıştır. Greyfurt suyu-ilaç etkileşiminin statinler açısından değerlendirilmesi için, etkin maddelerin taşıyıcı proteinler ve metabolizasyon enzimleri ile etkileşiminin transfekte hücre hatları ile hücresel boyutta değerlendirilmesi, transgenik hayvan modellerinin kullanılması ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi önerilmektedir. Ayrıca elde edilen bulgular doğrultusunda CYP3A4 ve OATP substratı olan başka ilaçların da greyfurt suyu ile potansiyel etkileşmesi göz önünde bulundurulmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Talevi A, Quiroga A. ADME processes in pharmaceutical sciences. Talevi A, Pablo AM, editörler. Springer; 2018.
2. McQuilken SA. The mouth, stomach and intestines. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2021;22(5):330-5.
3. Bartlett JA, van der Voort Maarschalk K. Understanding the oral mucosal absorption and resulting clinical pharmacokinetics of asenapine. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13:1110-5.
4. Ashford M. Gastrointestinal tract–physiology and drug absorption. *Aulton's Pharmaceutics e-book: the design and manufacture of medicines*. 2017;300.
5. Gavaghan M. Anatomy and physiology of the esophagus. *AORN J*. 1999;69(2):372-86.
6. Luo Z, Paunovic N, Leroux JC. Physical methods for enhancing drug absorption from the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;175:113814.
7. Batchelor HK, Tang A, Dettmar PW, Hampson FC, Jolliffe IG, Craig DQM. Feasibility of a bioadhesive drug delivery system targeted to oesophageal tissue. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;57(2):295-8.
8. Banker GS, Siepmann J, Rhodes C. *Modern pharmaceuticals*: CRC Press; 2002.
9. Hogben CA, Schanker LS, Tocco DJ, Brodie BB. Absorption of drugs from the stomach. II. The human. *J Pharmacol Exp Ther*. 1957;120(4):540-5.
10. Mitra A, Kesisoglou F. Impaired drug absorption due to high stomach pH: a review of strategies for mitigation of such effect to enable pharmaceutical product development. *Mol Pharmaceut*. 2013;10(11):3970-9.
11. Azman M, Sabri AH, Anjani QK, Mustaffa MF, Hamid KA. Intestinal absorption study: challenges and absorption enhancement strategies in improving oral drug delivery. *Pharmaceutics-Base*. 2022;15(8).
12. [Internet]. 19.08.2016. [Erişim tarihi 01.03.2024]. Erişim adresi: <https://socratic.org/questions/what-would-be-the-result-if-there-were-no-villi-in-the-intestinal-tract-and-the->.
13. Doherty MM, Charman WN. The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism? *Clin Pharmacokinet*. 2002;41:235-53.
14. Drozdziak M, Czekawy I, Oswald S, Drozdziak A. Intestinal drug transporters in pathological states: an overview. *Pharmacol Rep*. 2020;72(5):1173-94.
15. Vertzoni M, Augustijns P, Grimm M, Koziolok M, Lemmens G, Parrott N, ve ark. Impact of regional differences along the gastrointestinal tract of healthy adults on oral drug absorption: An UNGAP review. *Eur J Pharm Sci*. 2019;134:153-75.

16. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: A review of fundamentals. *J Clin Pharmacol*. 2002;42(6):620-43.
17. Pudipeddi M, Serajuddin A, Grant D, Stahl P. Solubility and dissolution of weak acids, bases, and salts. *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, Wiley-VCH, Weinheim. 2002:19-39.
18. Yamamoto K, Ikeda Y. Kinetic solubility and lipophilicity evaluation connecting formulation technology strategy perspective. *J Drug Deliv Sci Tec*. 2016;33:13-8.
19. Taşkın D, Şahin T, Özdemir M, Yalcin B. Analysis of trace elements, anticholinesterase activity and ADME/tox profiling of some achillea species. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*. 2021;8(1):329-42.
20. Allam AN, El Gamal S, Naggar V. Bioavailability: A pharmaceutical review. *Int J Novel Drug Deliv Tech*. 2011;1(1):77-93.
21. Pade V, Stavchansky S. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. *J Pharm Sci*. 1998;87(12):1604-7.
22. Dahlgren D, Lennernas H. Intestinal permeability and drug absorption: predictive experimental, computational and in vivo approaches. *Pharmaceutics*. 2019;11(8).
23. Masaoka Y, Tanaka Y, Kataoka M, Sakuma S, Yamashita S. Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *Eur J Pharm Sci*. 2006;29(3-4):240-50.
24. Chen ML. Ethnic or racial differences revisited: impact of dosage regimen and dosage form on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(10):957-64.
25. Castaneda-Hernandez G, Hoyo-Vadillo C, Herrera J. Differences in nifedipine concentration-effect relationship between capsule and slow release tablet administration. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1995;33(1):56-60.
26. Rouge N, Buri P, Doelker E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *Int J Pharmaceut*. 1996;136(1-2):117-39.
27. Thakkar PH. Influence of excipients on drug absorption via modulation of intestinal transporters activity. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2015:69-82.
28. Shono Y, Nishihara H, Matsuda Y, Furukawa S, Okada N, Fujita T, ve ark. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by cremophor EL and other surfactants by an in vitro diffusion chamber method using the isolated rat intestinal membranes. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2004;93(4):877-85.
29. Nozawa T, Toyobuku H, Kobayashi D, Kuruma K, Tsuji A, Tamai I. Enhanced intestinal absorption of drugs by activation of peptide transporter PEPT1 using proton-releasing polymer. *J Pharm Sci*. 2003;92(11):2208-16.

30. Goole J, Lindley DJ, Roth W, Carl SM, Amighi K, Kauffmann J-M, ve ark. The effects of excipients on transporter mediated absorption. *Int J Pharmaceut.* 2010;393(1-2):17-31.
31. Ruiz ME, Scioli Montoto S. ADME processes in pharmaceutical sciences: dosage, design, and pharmacotherapy success. Switzerland: Springer Nature; 2024. Routes of drug administration; p. 129-172.
32. Nimmo W. Drugs, diseases and altered gastric emptying. *Clin Pharmacokinet.* 1976;1(3):189-203.
33. Abuhelwa AY, Williams DB, Upton RN, Foster DJ. Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;112:234-48.
34. Stillhart C, Vucicevic K, Augustijns P, Basit AW, Batchelor H, Flanagan TR, ve ark. Impact of gastrointestinal physiology on drug absorption in special populations??An UNGAP review. *Eur J Pharm Sci.* 2020;147.
35. Stillhart C, Vučićević K, Augustijns P, Basit AW, Batchelor H, Flanagan TR, ve ark. Impact of gastrointestinal physiology on drug absorption in special populations—An UNGAP review. *Eur J Pharm Sci.* 2020;147:105280.
36. Bezerra JA, Thompson SH, Morse M, Koldovský O, Udall J, John N. Intestinal permeability to intact lactose in newborns and adults. *Neonatology.* 1990;58(6):334-42.
37. Brussee JM, Yu HX, Krekels EHJ, de Roos B, Brill MJE, van den Anker JN, ve ark. First-pass CYP3A-mediated metabolism of midazolam in the gut wall and liver in preterm neonates. *Cpt-Pharmacomet Syst.* 2018;7(6):374-83.
38. Tamai I, Nakanishi T. Transporters in Drug Development: Discovery, Optimization, Clinical Study and Regulation. Springer; 2013. Analysis of Intestinal Transporters; p. 179-99.
39. Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ. Intestinal drug transporters: An overview. *Adv Drug Deliver Rev.* 2013;65(10):1340-56.
40. Dean M, Allikmets R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr.* 2001;33(6):475-9.
41. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliver Rev.* 2012;64:138-53.
42. Slot AJ, Molinski SV, Cole SPC. Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays Biochem.* 2011;50:179-207.
43. Liu X, Pan G. Drug transporters in drug disposition, effects and toxicity: Springer; 2019.
44. Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;201:261-83.
45. Chin JE, Soffir R, Noonan KE, Choi K, Roninson IB. Structure and expression of the human Mdr (P-Glycoprotein) gene family. *Mol Cell Biol.* 1989;9(9):3808-20.

46. Sohail MI, Dönmez-Cakil Y, Szöllosi D, Stockner T, Chiba P. The bile salt export pump: molecular structure, study models and small-molecule drugs for the treatment of inherited BSEP deficiencies. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2).
47. Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD. Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett.* 2001;162(2):181-91.
48. Bortfeld M, Rius M, König J, Herold-Mende C, Nies AT, Keppler D. Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system. *Neuroscience.* 2006;137(4):1247-57.
49. Yabuuchi H, Shimizu H, Takayanagi S, Ishikawa T. Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(4):933-9.
50. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15665-70.
51. Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 2011;50(1):161-78.
52. Finch A, Pillans P. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. *Australian prescriber.* 2014;37(4).
53. Hunter J, Hirst BH, Simmons NL. Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm Res.* 1993;10:743-9.
54. Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, Simmons NL, Hirst BH. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J Biol Chem.* 1993;268(20):14991-7.
55. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, et al. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(5):2031-5.
56. Lin JH, Yamazaki M. Clinical relevance of P-glycoprotein in drug therapy. *Drug Metab Rev.* 2003;35(4):417-54.
57. Toyoda Y, Hagiya Y, Adachi T, Hoshijima K, Kuo MT, Ishikawa T. MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. *Xenobiotica.* 2008;38(7-8):833-62.
58. Roelofsen H, Vos TA, Schippers IJ, Kuipers F, Koning H, Moshage H, et al. Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroenterology.* 1997;112(2):511-21.
59. Peng KC, Cluzeaud F, Bens M, Duong Van Huyen JP, Wioland MA, Lacave R, et al. Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(6):757-68.

60. Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* 1994;54(2):357-61.
61. Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, ve ark. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* 1994;54(22):5902-10.
62. Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2004;21(1):25-51.
63. Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, ve ark. Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(8):1213-21.
64. Van Aubel RA, Peters JG, Masereeuw R, Van Os CH, Russel FG. Multidrug resistance protein *mrp2* mediates ATP-dependent transport of classic renal organic anion p-aminohippurate. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279(4):F713-7.
65. Huisman MT, Smit JW, Crommentuyn KM, Zelcer N, Wiltshire HR, Beijnen JH, ve ark. Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS.* 2002;16(17):2295-301.
66. Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem.* 2000;275(4):2905-10.
67. Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, ve ark. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* 2002;62(11):3144-50.
68. Zelcer N, Reid G, Wielinga P, Kuil A, van der Heijden I, Schuetz JD, ve ark. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J.* 2003;371(Pt 2):361-7.
69. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, ve ark. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(16):9244-9.
70. Lai L, Tan TM. Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem J.* 2002;361(Pt 3):497-503.
71. Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, ve ark. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med.* 1999;5(9):1048-51.

72. McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23541-8.
73. Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H, Kruh GD. Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res.* 2002;62(21):6172-7.
74. Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab.* 2010;11(7):603-17.
75. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J.* 2015;17(1):65-82.
76. Pizzagalli MD, Bensimon A, Superti-Furga G. A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *FEBS J.* 2021;288(9):2784-835.
77. Rask-Andersen M, Masuram S, Fredriksson R, Schioth HB. Solute carriers as drug targets: current use, clinical trials and prospective. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):702-10.
78. Zhang EY, Knipp GT, Ekins S, Swaan PW. Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates. *Drug Metab Rev.* 2002;34(4):709-50.
79. He L, Vasiliou K, Nebert DW. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics.* 2009;3(2):195-206.
80. Bellosta S, Paoletti R, Corsini A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III50-7.
81. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19(1):117-25.
82. Srinivasa Rao K, Prasad T, Mohanta G, Manna P. An overview of statins as hypolipidemic drugs. *IJPSDR.* 2011;3(3):178-83.
83. Malhotra HS, Goa KL. Atorvastatin: an updated review of its pharmacological properties and use in dyslipidaemia. *Drugs.* 2001;61(12):1835-81.
84. Williams D, Feely J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(5):343-70.
85. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation.* 2000;101(2):207-13.
86. Amly W, Karaman R. Lipid lowering medications-uses, side effects, pharmacokinetic properties and approaches to improve bioavailability. *Commonly Used Drugs-Uses, Side Effects, Bioavailability and Approaches to Improve It.* 2015;131.

87. Hu M, Mak V, Chu T, Wayne M, Tomlinson B. Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: optimizing the prevention of coronary heart disease. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2009;7(1):1-26.
88. Maji D, Shaikh S, Solanki D, Gaurav K. Safety of statins. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013;17(4):636-46.
89. King DS, Wilburn AJ, Wofford MR, Harrell TK, Lindley BJ, Jones DW. Cognitive impairment associated with atorvastatin and simvastatin. *Pharmacotherapy*. 2003;23(12):1663-7.
90. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 60823, Atorvastatin. Retrieved July 7, 2024 from National Library of Medicine - National Institutes of Health; Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atorvastatin>.
91. Rodde MS, Divase GT, Devkar TB, Tekade AR. Solubility and bioavailability enhancement of poorly aqueous soluble atorvastatin: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Biomed Res Int*. 2014;2014:463895.
92. Lennernas H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(13):1141-60.
93. Kim JS, Kim MS, Park HJ, Jin SJ, Lee S, Hwang SJ. Physicochemical properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemi-calcium using spray-drying and SAS process. *Int J Pharm*. 2008;359(1-2):211-9.
94. Shayanfar A, Ghavimi H, Hamishekar H, Jouyban A. Coamorphous atorvastatin calcium to improve its physicochemical and pharmacokinetic properties. *J Pharm Pharm Sci*. 2013;16(4):577-87.
95. Khan S, Saha S, Poddar S, Bachar R, Shoyaib A, Chakrabarty J, ve ark. Bioequivalence studies and pharmacokinetic properties of atorvastatin 40 mg tablet in healthy bengali subjects. *MOJ Bioequiv Availab*. 2017;4(2):00064.
96. Khan FN, Dehghan MHG. Enhanced bioavailability of atorvastatin calcium from stabilized gastric resident formulation. *AAPS Pharmscitech*. 2011;12(4):1077-86.
97. Kumar N, Chaurasia S, Patel RR, Khan G, Kumar V, Mishra B. Atorvastatin calcium encapsulated eudragit nanoparticles with enhanced oral bioavailability, safety and efficacy profile. *Pharm Dev Technol*. 2017;22(2):156-67.
98. Poli A. Atorvastatin: pharmacological characteristics and lipid-lowering effects. *Drugs*. 2007;67 Suppl 1:3-15.
99. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 54687, Pravastatin. Retrieved July 7, 2024 National Library of Medicine - National Institutes of Health; Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pravastatin>.
100. Al-Badr AA, Mostafa GA. Pravastatin sodium. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2014;39:433-513.

101. Hatanaka T. Clinical pharmacokinetics of pravastatin: mechanisms of pharmacokinetic events. *Clin Pharmacokinet.* 2000;39(6):397-412.
102. Martín-Islán AP, Cruzado MC, Asensio R, Sainz-Díaz CI. Crystalline polymorphism and molecular structure of sodium pravastatin. *J Phys Chem B.* 2006;110(51):26148-59.
103. Jia CY, Yin QX, Song JL, Hou GY, Zhang MJ. Solubility of pravastatin sodium in water, methanol, ethanol, 2-propanol, 1-propanol, and 1-butanol from (278 to 333) K. *J Chem Eng Data.* 2008;53(10):2466-8.
104. Karaźniewicz-Łada M, Bąba 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.
105. Ruiz-Picazo A, Colón-Useche S, Perez-Amorós B, González-Alvarez M, Molina-Martínez I, González-Alvarez I, ve ark. Investigation to explain bioequivalence failure in pravastatin immediate-release products. *Pharmaceutics.* 2019;11(12).
106. A.Althanoon Z, Faisal IM, Ahmad AA, Merkhan MM. Pharmacological aspects of statins are relevant to their structural and physicochemical properties. *Systematic Reviews in Pharmacy.* 2020;11:167-71.
107. 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.
108. Pravastatin (Rx) Brand and Other Names: Pravachol Classes: Lipid-Lowering Agents, Statins; HMG-CoA Reductase Inhibitors: Medscape The Heart.org; Erişim adresi: <https://reference.medscape.com/drug/pravachol-pravastatin-342460>.
109. Full Prescribing Information Pravachol Label. Bristol-Myers Squibb Company Princeton, New Jersey 08543 USA; 1991.
110. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 54454, Simvastatin. Retrieved July 7, 2024: National Library of Medicine - National Institutes of Health; Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Simvastatin>.
111. Graeser KA, Strachan CJ, Patterson JE, Gordon KC, Rades T. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. *Cryst Growth Des.* 2008;8(1):128-35.
112. Kong RP, Zhu XY, Meteleva ES, Chistyachenko YS, Suntsova LP, Polyakov NE, ve ark. Enhanced solubility and bioavailability of simvastatin by mechanochemically obtained complexes. *Int J Pharmaceut.* 2017;534(1-2):108-18.
113. Robinson JG. Simvastatin: present and future perspectives. *Expert Opin Pharmacol.* 2007;8(13):2159-72.

114. Simvastatin Monograph European Pharmacopoeia 9.7. Council of Europe, European Department for the Quality of Medicines, European Pharmacopoeia Commission; 2019.
115. Joshi HN, Fakes MG, Serajuddin AT. Differentiation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors by their relative lipophilicity. *Pharmacy and Pharmacology Communications*. 1999;5(4):269-71.
116. Todd PA, Goa KL. Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs*. 1990;40(4):583-607.
117. Basniwal PK, Jain D. Simvastatin: review of updates on recent trends in pharmacokinetics, pharmacodynamics, drug-drug interaction, impurities and analytical methods. *Curr Pharm Anal*. 2012;8(2):135-56.
118. Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M. Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(7):463-74.
119. Dai LL, Fan L, Wu HZ, Tan ZR, Chen Y, Peng XD, et al. Assessment of a pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between simvastatin and extracts in healthy subjects. *Xenobiotica*. 2013;43(10):862-7.
120. Mauro VF. Clinical pharmacokinetics and practical applications of simvastatin. *Clinical Pharmacokinetics*. 1993;24(3):195-202.
121. Plosker GL, Mctavish D. Simvastatin - a reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy in hypercholesterolemia. *Drugs*. 1995;50(2):334-63.
122. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 53232, Lovastatin. Retrieved July 8, 2024: National Library of Medicine - National Institutes of Health; Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lovastatin>.
123. Sharannavar BR, Gadad AP. Physicochemical characterization and dissolution study of spray dried amorphous lovastatin with polyvinylpyrrolidone K30. 2018.
124. Lovastatin Monograph European Pharmacopoeia 6.8. Council of Europe, European Department for the Quality of Medicines, European Pharmacopoeia Commission; 2009.
125. Patel RP, Patel MM. Physicochemical characterization and dissolution study of solid dispersions of lovastatin with polyethylene glycol 4000 and polyvinylpyrrolidone K30. *Pharm Dev Technol*. 2007;12(1):21-33.
126. Zolkiflee NF, Mmr MMA, Aba M. Lovastatin: history, physicochemistry, pharmacokinetics and enhanced solubility. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2017;8:90-102.
127. Donovan JM, Kisicki JC, Stiles MR, Tracewell WG, Burke SK. Effect of colesvelam on lovastatin pharmacokinetics. *Ann Pharmacother*. 2002;36(3):392-7.

128. Holtzman CW, Wiggins BS, Spinler SA. Role of P-glycoprotein in statin drug interactions. *Pharmacotherapy*. 2006;26(11):1601-7.
129. Product Monograph Lovastatin Tablets, USP 20 mg and 40 mg. Sanis Health Inc. 1 President's Choice Circle Brampton, Ontario L6Y 5S5; 2017.
130. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 47576, Ketoconazole. Retrieved July 8, 2024: National Library of Medicine - National Institutes of Health; Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nizoral>.
131. Ketoconazole Monograph The International Pharmacopoeia Sixth Edition. World Health Organization Department of Essential Medicines and Health Products 2016.
132. Elder EJ, Evans JC, Scherzer BD, Hitt JE, Kupperblatt GB, Saghir SA, ve ark. Preparation, characterization, and scale-up of ketoconazole with enhanced dissolution and bioavailability. *Drug Dev Ind Pharm*. 2007;33(7):755-65.
133. Skiba M, Skiba-Lahiani M, Marchais H, Duclos R, Arnaud P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *Int J Pharmaceut*. 2000;198(1):1-6.
134. Shayanfar A, Jouyban A. Physicochemical characterization of a new cocrystal of ketoconazole. *Powder Technology*. 2014;262:242-8.
135. Kamble RN, Bothiraja C, Mehta PP, Varghese V. Synthesis, solid state characterization and antifungal activity of ketoconazole cocrystals. *J Pharm Investig*. 2018;48(5):541-9.
136. Van Tyle JH. Ketoconazole. Mechanism of action, spectrum of activity, pharmacokinetics, drug interactions, adverse reactions and therapeutic use. *Pharmacotherapy*. 1984;4(6):343-73.
137. Abou-Auda HS, Mustafa AA, Al-Humayyd MS. Pharmacokinetic interaction of ketoconazole and itraconazole with ciprofloxacin. *Biopharm Drug Dispos*. 2008;29(1):29-35.
138. Yong WP, Ramirez J, Innocenti F, Ratain MJ. Effects of ketoconazole on glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Clin Cancer Res*. 2005;11(18):6699-704.
139. Boulenc X, Nicolas O, Hermabessiere S, Zobouyan I, Martin V, Donazzolo Y, ve ark. CYP3A4-based drug-drug interaction: CYP3A4 substrates' pharmacokinetic properties and ketoconazole dose regimen effect. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2016;41(1):45-54.
140. Greenblatt DJ, Zhao Y, Venkatakrisnan K, Duan SX, Harmatz JS, Parent SJ, ve ark. Mechanism of cytochrome P450-3A inhibition by ketoconazole. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(2):214-21.
141. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 135398735, Rifampin. Retrieved July 8, 2024 National Library of Medicine - National Institutes of Health; Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rifampin>.

142. Holstege CP. Rifampin. In: Wexler P, editör. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Oxford: Academic Press; 2014.
143. Abulfathi AA, Decloedt EH, Svensson EM, Diacon AH, Donald P, Reuter H. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of rifampicin in human tuberculosis. *Clin Pharmacokinet*. 2019;58(9):1103-29.
144. Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(9):819-50.
145. van Giersbergen PL, Treiber A, Schneiter R, Dietrich H, Dingemans J. Inhibitory and inductive effects of rifampin on the pharmacokinetics of bosentan in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81(3):414-9.
146. Burman WJ, Gallicano K, Peloquin C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(5):327-41.
147. Schilling U, Dingemans J, Voors-Pette C, Romeijn C, Dogterom P, Ufer M. Effect of rifampin-mediated OATP1B1 and OATP1B3 transporter inhibition on the pharmacokinetics of the P2Y12 receptor antagonist selatogrel. *Clin Transl Sci*. 2020;13(5):886-90.
148. Han KM, Ahn SY, Seo H, Yun J, Cha HJ, Shin JS, ve ark. Bosentan and rifampin interactions modulate influx transporter and cytochrome P450 expression and activities in primary human hepatocytes. *Biomol Ther (Seoul)*. 2017;25(3):288-95.
149. Perera V, Wang Z, Lubin S, Christopher LJ, Chen W, Xu S, ve ark. Effects of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of milvexian, a potent, selective, oral small molecule factor XIa inhibitor. *Sci Rep*. 2022;12(1):22239.
150. Juif PE, Voors-Pette C, Ufer M, Dogterom P, Dingemans J. Influence of rifampin-mediated organic anion-transporting polypeptide 1B1/1B3 inhibition on the pharmacokinetics of clazosentan. *Clin Transl Sci*. 2019;12(5):440-4.
151. *Clinical Drug Interaction Studies Study Design, Data Analysis, and Clinical Implications Guidance for Industry Draft Guidance*, (2017).
152. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 119373, Elacridar. Retrieved July 8, 2024: National Library of Medicine - National Institutes of Health; Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Elacridar>.
153. Sane R, Agarwal S, Elmquist WF. Brain distribution and bioavailability of elacridar after different routes of administration in the mouse. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(8):1612-9.
154. Dash RP, Jayachandra Babu R, Srinivas NR. Therapeutic potential and utility of elacridar with respect to p-glycoprotein inhibition: an insight from the published in vitro, preclinical and clinical studies. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2017;42(6):915-33.

155. Sawicki E, Verheijen RB, Huitema AD, van Tellingen O, Schellens JH, Nuijen B, *et al.* Clinical pharmacokinetics of an amorphous solid dispersion tablet of elacridar. *Drug Deliv Transl Res.* 2017;7(1):125-31.
156. Vlaming ML, Lappchen T, Jansen HT, Kivits S, van Driel A, van de Steeg E, *et al.* PET-CT imaging with [(18)F]-gefitinib to measure Abcb1a/1b (P-gp) and Abcg2 (Bcrp1) mediated drug-drug interactions at the murine blood-brain barrier. *Nucl Med Biol.* 2015;42(11):833-41.
157. Bihorel S, Camenisch G, Lemaire M, Scherrmann JM. Modulation of the brain distribution of imatinib and its metabolites in mice by valsopodar, zosuquidar and elacridar. *Pharm Res.* 2007;24(9):1720-8.
158. Beijnen JH, Schellens JH. Drug interactions in oncology. *Lancet Oncol.* 2004;5(8):489-96.
159. Durmus S, Hendrikx JJ, Schinkel AH. Apical ABC transporters and cancer chemotherapeutic drug disposition. *Adv Cancer Res.* 2015;125:1-41.
160. Ningara N. Elacridar as adjuvant with anticancer drugs for brain tumors-delivery, safety, efficacy and toxicity. *EC Pharmacology and Toxicology.* 2018;6:36-44.
161. Seleim M, Hassan MA, Saleh A. Physico-chemical evaluation of white and pink grapefruit (*Citrus paradisi*) juice. *Assiut Journal of Agricultural Sciences.* 2019;50(3):112-22.
162. Kelebek H. Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey. *Industrial Crops and Products.* 2010;32(3):269-74.
163. Hung WL, Suh JH, Wang Y. Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *J Food Drug Anal.* 2017;25(1):71-83.
164. De Castro WV, Mertens-Talcott S, Rubner A, Butterweck V, Derendorf H. Variation of flavonoids and furanocoumarins in grapefruit juices: a potential source of variability in grapefruit juice-drug interaction studies. *J Agric Food Chem.* 2006;54(1):249-55.
165. Igual M, García-Martínez E, Camacho MM, Martínez-Navarrete N. Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. *Innov Food Sci Emerg.* 2011;12(2):153-62.
166. Zhang JX. Flavonoids in Grapefruit and Commercial Grapefruit Juices: Concentration, Distribution, and Potential Health Benefits. *Proc Fl State Hortic.* 2007;120:288-94.
167. Vanamala J, Reddivari L, Yoo KS, Pike LM, Patil BS. Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. *J Food Compos Anal.* 2006;19(2-3):157-66.
168. Fukuda K, Guo LQ, Ohashi N, Yoshikawa M, Yamazoe Y. Amounts and variation in grapefruit juice of the main components causing grapefruit-drug interaction. *J Chromatogr B.* 2000;741(2):195-203.

169. Hanley MJ, Cancalon P, Widmer WW, Greenblatt DJ. The effect of grapefruit juice on drug disposition. *Expert Opin Drug Met.* 2011;7(3):267-86.
170. Ross SA, Ziska DS, Zhao K, ElSohly MA. Variance of common flavonoids by brand of grapefruit juice. *Fitoterapia.* 2000;71(2):154-61.
171. Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Pharm Sci.* 2001;4(3):217-27.
172. Paine MF, Widmer WW, Hart HL, Pusek SN, Beavers KL, Criss AB, ve ark. A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(5):1097-105.
173. Paine MF, Criss AB, Watkins PB. Two major grapefruit juice components differ in intestinal CYP3A4 inhibition kinetic and binding properties. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(10):1146-53.
174. Guo LQ, Yamazoe Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(2):129-36.
175. Row EC, Brown SA, Stachulski AV, Lennard MS. Design, synthesis and evaluation of furanocoumarin monomers as inhibitors of CYP3A4. *Org Biomol Chem.* 2006;4(8):1604-10.
176. Ohta T, Maruyama T, Nagahashi M, Miyamoto Y, Hosoi S, Kiuchi F, ve ark. Paradisin C: a new CYP3A4 inhibitor from grapefruit juice. *Tetrahedron.* 2002;58(33):6631-5.
177. Melough MM, Chun OK. Dietary furocoumarins and skin cancer: A review of current biological evidence. *Food Chem Toxicol.* 2018;122:163-71.
178. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis, (2022).
179. ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures, (2022).
180. Protocol to conduct equilibrium solubility experiments for the purpose of Biopharmaceutics Classification System-based classification of active pharmaceutical ingredients for biowaiver, (2019).
181. Martinez TA, Zeybek ND, Müftüoğlu S. Evaluation of the cytotoxic and autophagic effects of atorvastatin on MCF-7 breast cancer cells. *Balkan Medical Journal.* 2018;35(3):256-62.
182. Tapia-Pérez JH, Kirches E, Mawrin C, Firsching R, Schneider T. Cytotoxic effect of different statins and thiazolidinediones on malignant glioma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;67:1193-201.
183. Antoine DJ, Srivastava A, Pirmohamed M, Park BK. Statins inhibit aminoglycoside accumulation and cytotoxicity to renal proximal tubule cells. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(4):647-54.
184. Shirasaka Y, Suzuki K, Nakanishi T, Tamai I. Intestinal absorption of HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin mediated by organic anion transporting polypeptide. *Pharm Res.* 2010;27:2141-9.

185. Shirasaka Y, Suzuki K, Shichiri M, Nakanishi T, Tamai I. Intestinal absorption of HMG-CoA reductase inhibitor pitavastatin mediated by organic anion transporting polypeptide and P-glycoprotein/multidrug resistance 1. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2011;26(2):171-9.
186. Gulsun Inal T. İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Diyabetin Etkisinin İncelenmesi [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2016.
187. Izat N. Karaciğerdeki İlaç Dispozisyonu Üzerine Rifampisin Etkisinin İncelenmesi ve Farmakokinetik Modelleme [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2020.
188. Wang Y, Cao J, Zeng S. Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of Ginkgo flavonols: quercetin, kaempferol, and isorhamnetin. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(6):751-8.
189. Incecayir T, Tsume Y, Amidon GL. Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and Caco-2 cells: use as a reference standard for BCS classification. *Mol Pharmaceut*. 2013;10(3):958-66.
190. Dahan A, West BT, Amidon GL. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSP/IP) approach in the rat. *Eur J Pharm Sci*. 2009;36(2-3):320-9.
191. Issa C, Gupta P, Bansal AK. Implications of density correction in gravimetric method for water flux determination using rat single-pass intestinal perfusion technique: a technical note. *AAPS Pharmscitech*. 2003;4(2):44.
192. Xie YS, Ren XL, Pan GX, Gao XM, Liu CX. The assessment of absorption of periplocin in situ via intestinal perfusion of rats by HPLC. *Biomedical chromatography*. 2008;22(2):196-201.
193. Kogawa AC, Pires AEDT, Salgado HRN. Atorvastatin: a review of analytical methods for pharmaceutical quality control and monitoring. *Journal of AOAC International*. 2019;102(3):801-9.
194. Bodiwala KB, Prajapati PB, Marolia BP, Rathod IS, Shah SA. Development and validation of pH independent spectrophotometric method for determination of pravastatin sodium in dosage forms. *Journal of Pharmacy And Applied Sciences*. 2014;1(1):23.
195. Zhang X, Vernikovskaya DI, Wang X, Nanovskaya TN, Costantine M, Hankins GD, ve ark. Quantitative determination of pravastatin and its metabolite 3 α -hydroxy pravastatin in plasma and urine of pregnant patients by LC-MS/MS. *Biomedical Chromatography*. 2016;30(4):548-54.
196. Shinde AC, Devhadrao NV, Bansode AS, Bansode AS. Analytical method development and validation of assay test of pravastatin sodium tablets. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2019;9(2):70-5.
197. Ashour S, Omar S. Science Repository. New Validated Analytical Method for Determination of Simvastatin in Tablet Formulations by RP-HPLC. *Drug and Drug Abuse*. 2020; 2(1):2-8.

198. Jemal M, Ouyang Z, Powell ML. Direct-injection LC–MS–MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J Pharm Biom Anal.* 2000;23(2-3):323-40.
199. Silva TD, Oliveira MA, de Oliveira RB, Vianna-Soares CD. Development and validation of a simple and fast HPLC method for determination of lovastatin, pravastatin and simvastatin. *J Chromatogr Sci.* 2012;50(9):831-8.
200. Saha A, Jangala H, Vats P, Thakur R, Khuroo A, Monif T. Stability indicating LC-MS/MS method for estimation of lovastatin in human plasma: application to a bioequivalence study. *J Anal Sci Technol.* 2015;6:1-11.
201. Li M, Fan L-Y, Zhang W, Sun J, Cao C-X. Quantitative analysis of lovastatin in capsule of Chinese medicine Monascus by capillary zone electrophoresis with UV–vis detector. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43(1):387-92.
202. Nirogi R, Mudigonda K, Kandikere V. Chromatography–mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;44(2):379-87.
203. Ashour S, Nakshbandi H, Omar S. Quantitative determination of pravastatin in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):135.
204. Zhang Z, Yang Z. HPLC determination of lovastatin in rat tissue. *Chromatographia.* 2007;66:487-91.
205. Popy FA, Dewan I, Parvin MN, Islam SA. Evaluation of in vitro equivalence for tablets containing the poorly water-soluble compound atorvastatin. *Dissolution Technol.* 2012;19(4):30-3.
206. Ahjel SW, Lupuleasa D. Enhancement of solubility and dissolution rate of different forms of atorvastatin calcium in direct compression tablet formulas. *Farmacia.* 2009;57(3):290-300.
207. Ruiz-Picazo A, Colón-Useche S, Perez-Amorós B, González-Álvarez M, Molina-Martínez I, González-Álvarez I, et al. Investigation to explain bioequivalence failure in pravastatin immediate-release products. *Pharmaceutics.* 2019;11(12):663.
208. Aubry AS, Sciascia DO. Development of a single in vitro dissolution method for a combination trilayer tablet formulation of clopidogrel and pravastatin. *Dissolution Technol.* 2011:12-9.
209. Rao M, Mandage Y, Thanki K, Bhise S. Dissolution improvement of simvastatin by surface solid dispersion technology. *Dissolution Technol.* 2010;17(2):27-34.
210. Bartkowiak A, Matyszewska D, Krzak A, Zaborowska M, Broniatowski M, Bilewicz R. Incorporation of simvastatin into lipid membranes: Why deliver a statin in form of inclusion complex with hydrophilic cyclodextrin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2021;204:111784.
211. UmakantVerma J, Mokale V. Preparation of freeze-dried solid dispersion powder using mannitol to enhance solubility of lovastatin and development of

- sustained release tablet dosage form. *Am J Pharm Sci Nanotechnol.* 2014;1:11-26.
212. Chen C-H, Yang J-C, Uang Y-S, Lin C-J. Improved dissolution rate and oral bioavailability of lovastatin in red yeast rice products. *Int J Pharmaceut.* 2013;444(1-2):18-24.
 213. Eموke R, Tokes B, Emese S. Physical and chemical study of lovastatin inclusion complexes. bioavailability improvement. *Acta Medica Marisiensis.* 2012;58(5).
 214. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, ve ark. Cell viability assays. Assay guidance manual [İnternet]. 2016.
 215. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers.* 2020;1(3):332-49.
 216. Tokur O, Aksoy A. In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2017;6(1):112-8.
 217. Aslantürk ÖS. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world.* 2018;2:64-80.
 218. Abolghasemi R, Ebrahimi-Barough S, Bahrami N, Aid J. Atorvastatin inhibits viability and migration of MCF7 breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP.* 2022;23(3):867.
 219. Al-khafaji AHY, Arif IS. Evaluation of anti-proliferative activity of simvastatin and atorvastatin on MCF7 cell line compared with doxorubicin using MTT test. *Al Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2018;18(2):163-9.
 220. Żołnierczyk JD, Borowiak A, Hikiş P, Cebula-Obrzut B, Błóński JZ, Smolewski P, et al. Promising anti-leukemic activity of atorvastatin. *Oncology Reports.* 2013;29(5):2065-71.
 221. Oliveira KA, Dal-Cim T, Lopes FG, Ludka FK, Nedel CB, Tasca CI. Atorvastatin promotes cytotoxicity and reduces migration and proliferation of human A172 glioma cells. *Molecular Neurobiology.* 2018;55:1509-23.
 222. Abbasi MM, Valizadeh H, Hamishehkar H, Bannazadeh M, Zakeri-Milani P. In vitro and in situ effects of atorvastatin and ezetimibe on P-glycoprotein expression and function. *Bangladesh Journal of Pharmacology.* 2016;11(4):911-9.
 223. Sanfelice RA, da Silva SS, Bosqui LR, Miranda-Sapla MM, Barbosa BF, Silva RJ, ve ark. Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion, replication and proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. *Acta Tropica.* 2017;167:208-15.
 224. Kobayashi M, Kagawa T, Takano R, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Effect of medium pH on the cytotoxicity of hydrophilic statins. *J Pharm Pharm Sci.* 2007;10(3):332-9.

225. Menter DG, Ramsauer VP, Harirforoosh S, Chakraborty K, Yang P, Hsi L, ve ark. Differential effects of pravastatin and simvastatin on the growth of tumor cells from different organ sites. *PLoS One*. 2011;6(12):e28813.
226. Gallelli L, Falcone D, Scaramuzzino M, Pelaia G, D'Agostino B, Mesuraca M, ve ark. Effects of simvastatin on cell viability and proinflammatory pathways in lung adenocarcinoma cells exposed to hydrogen peroxide. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2014;15:67.
227. Huang X, Ma J, Xu J, Su Q, Zhao J. Simvastatin induces growth inhibition and apoptosis in HepG2 and Huh7 hepatocellular carcinoma cells via upregulation of Notch1 expression. *Mol Med Rep*. 2015;11(3):2334-40.
228. Park JB, Zhang H, Lin CY, Chung CP, Byun Y, Park YS, et al. Simvastatin maintains osteoblastic viability while promoting differentiation by partially regulating the expressions of estrogen receptors alpha. *J Surg Res*. 2012;174(2):278-83.
229. Bhargavi S, Praveen V, Mariam S, Sreepriya M, Savitha J. Purification of Lovastatin from *Aspergillus terreus* (KM017963) and Evaluation of its Anticancer and Antioxidant Properties. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016;17(8):3797-803.
230. Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, ve ark. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clinical Cancer Research*. 2001;7(1):158-67.
231. Martirosyan A, Clendening JW, Goard CA, Penn LZ. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. *BMC Cancer*. 2010;10(1):103.
232. Beton K, Brożek-Pluska B. Biochemistry and Nanomechanical Properties of Human Colon Cells upon Simvastatin, Lovastatin, and Mevastatin Supplementations: Raman Imaging and AFM Studies. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2022;126(37):7088-103.
233. M9 Biopharmaceutics Classification SystemBased Biowaivers Guidance for Industry, (2021).
234. Balimane PV, Chong S, Morrison RA. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000;44(1):301-12.
235. van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Met*. 2005;1(2):175-85.
236. Li J, Volpe DA, Wang Y, Zhang W, Bode C, Owen A, ve ark. Use of transporter knockdown Caco-2 cells to investigate the in vitro efflux of statin drugs. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(7):1196-202.
237. Shulyak N, Liushuk K, Semeniuk O, Yarema N, Uglyar T, Popovych D, ve ark. Study of the dissolution kinetics of drugs in solid dosage form with lisinopril and atorvastatin and intestinal permeability to assess their equivalence in vitro. *Pharmacia*. 2022;69:61-7.


238. Wu X, Whitfield LR, Stewart BH. Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter. *Pharm Res.* 2000;17:209-15.
239. Diril M, Karasulu Y, Toskas M, Nikolakakis I. Development and permeability testing of self-emulsifying atorvastatin calcium pellets and tablets of compressed pellets. *Processes.* 2019;7(6):365.
240. Willrich MAV, Hirata MH, Hirata RDC. Statin regulation of CYP3A4 and CYP3A5 expression. *Pharmacogenomics.* 2009;10(6):1017-24.
241. Igel M, Sudhop T, Von Bergmann K. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins). *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;57:357-64.
242. Deng F, Tuomi S-K, Neuvonen M, Hirvensalo P, Kulju S, Wenzel C, ve ark. Comparative hepatic and intestinal efflux transport of statins. *Drug Metab Dispos.* 2021;49(9):750-9.
243. Bogman K, Peyer AK, Török M, Küsters E, Drewe J. HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. *Br J Pharmacol.* 2001;132(6):1183-92.
244. Wang E-j, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) characterized as direct inhibitors of P-glycoprotein. *Pharm Res.* 2001;18:800-6.
245. Holtzman CW, Wiggins BS, Spinler SA. Role of P-glycoprotein in statin drug interactions. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy.* 2006;26(11):1601-7.
246. Mandery K, Balk B, Bujok K, Schmidt I, Fromm MF, Glaeser H. Inhibition of hepatic uptake transporters by flavonoids. *Eur J Pharm Sci.* 2012;46(1-2):79-85.
247. Zhu X, Zhang X, Ma G, Yan J, Wang H, Yang Q. Transport characteristics of tryptanthrin and its inhibitory effect on P-gp and MRP2 in Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.* 2011;14(3):325-35.
248. Lee JB, Zgair A, Taha DA, Zang X, Kagan L, Kim TH, ve ark. Quantitative analysis of lab-to-lab variability in Caco-2 permeability assays. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;114:38-42.
249. Zamek-Gliszczyński MJ, Sangha V, Shen H, Feng B, Wittwer MB, Varma MV, ve ark. Transporters in drug development: International transporter consortium update on emerging transporters of clinical importance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2022;112(3):485-500.
250. Kivistö KT, Niemi M. Influence of drug transporter polymorphisms on pravastatin pharmacokinetics in humans. *Pharm Res.* 2007;24:239-47.
251. Shirasaka Y, Suzuki K, Nakanishi T, Tamai I. Differential effect of grapefruit juice on intestinal absorption of statins due to inhibition of organic anion transporting polypeptide and/or P-glycoprotein. *J Pharm Sci.* 2011;100(9):3843-53.

252. Kyrklund C, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Effect of rifampicin on pravastatin pharmacokinetics in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2004;57(2):181-7.
253. Deng S, Chen X-P, Cao D, Yin T, Dai Z-Y, Luo J, ve ark. Effects of a concomitant single oral dose of rifampicin on the pharmacokinetics of pravastatin in a two-phase, randomized, single-blind, placebo-controlled, crossover study in healthy Chinese male subjects. *Clinical Therapeutics.* 2009;31(6):1256-63.
254. Varma MV, Lai Y, Feng B, Litchfield J, Goosen TC, Bergman A. Physiologically based modeling of pravastatin transporter-mediated hepatobiliary disposition and drug-drug interactions. *Pharm Res.* 2012;29:2860-73.
255. Williamson B, Dooley KE, Zhang Y, Back DJ, Owen A. Induction of influx and efflux transporters and cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes by rifampin, rifabutin, and rifapentine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):6366-9.
256. Asaumi R, Menzel K, Lee W, Nunoya Ki, Imawaka H, Kusuhara H, ve ark. Expanded physiologically-based pharmacokinetic model of rifampicin for predicting interactions with drugs and an endogenous biomarker via complex mechanisms including organic anion transporting polypeptide 1B induction. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology.* 2019;8(11):845-57.
257. Rodrigues AC. Efflux and uptake transporters as determinants of statin response. *Expert Opin Drug Met.* 2010;6(5):621-32.
258. Ubeaud G, Hagenbach J, Vandenschrieck S, Jung L, Koffel J. In vitro inhibition of simvastatin metabolism in rat and human liver by naringenin. *Life Sciences.* 1999;65(13):1403-12.
259. Motawi TK, Teleb Z, El-Boghdady N, Ibrahim S. Effect of simvastatin and naringenin coadministration on rat liver DNA fragmentation and cytochrome P450 activity: an in vivo and in vitro study. *J Physiol Biochem.* 2014;70:225-37.
260. Le Goff N, Koffel J, Vandenschrieck S, Jung L, Ubeaud G. Comparison of in vitro hepatic models for the prediction of metabolic interaction between simvastatin and naringenin. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 2002;27:233-41.
261. Takanaga H, Ohnishi A, Matsuo H, Sawada Y. Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 1998;21(10):1062-6.
262. Shirasaka Y, Li Y, Shibue Y, Kuraoka E, Spahn-Langguth H, Kato Y, ve ark. Concentration-dependent effect of naringin on intestinal absorption of β 1-adrenoceptor antagonist talinolol mediated by p-glycoprotein and organic anion transporting polypeptide (Oatp). *Pharm Res.* 2009;26:560-7.

263. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharm Res.* 1997;14:763-6.
264. Kogan A, Kesselman E, Danino D, Aserin A, Garti N. Viability and permeability across Caco-2 cells of CBZ solubilized in fully dilutable microemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2008;66(1):1-12.
265. Yazdanian M, Glynn SL, Wright JL, Hawi A. Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharm Res.* 1998;15(9):1490.
266. Benet LZ, Broccatelli F, Oprea TI. BDDCS applied to over 900 drugs. *The AAPS Journal.* 2011;13:519-47.
267. Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm Res.* 1996;13:1336-42.
268. Volpe DA. Application of method suitability for drug permeability classification. *The AAPS Journal.* 2010;12:670-8.
269. Curran PF, Solomon A. Ion and water fluxes in the ileum of rats. *The Journal of General Physiology.* 1957;41(1):143-68.
270. Tuğcu-Demiröz F, Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Bermejo M. Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique. *Eur J Pharm Sci.* 2014;62:105-10.
271. Mandal S, Mandal SS, Sawant KK. Design and development of microemulsion drug delivery system of atorvastatin and study its intestinal permeability in rats. *International Journal of Drug Delivery.* 2010;2(1).
272. Mahmoud DE, Faraag AHI, Abu El-Wafa WM. In vitro study on the potential fungicidal effects of atorvastatin in combination with some azole drugs against multidrug resistant *Candida albicans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2021;37:1-13.
273. Chang JH, Ly J, Plise E, Zhang X, Messick K, Wright M, et al. Differential effects of rifampin and ketoconazole on the blood and liver concentration of atorvastatin in wild-type and Cyp3a and Oatp1a/b knockout mice. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(6):1067-73.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul İzni



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 14.03.2018
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
 Araştırma Protokol no.su : 2018/A-12
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soya : Sprague-Dawley
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 54 Adet
 Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı: 250-450 g

Prof. Dr. Selma ŞAHİN'nin yürütücüsü olduğu, "*Statinerin Absorpsiyon ve Permeabiliteleri Üzerine Greyfurt Suyunun Etkisinin In situ İntestinal Perfüzyon Tekniği ile İncelenmesi*" isimli 2018/A-12 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına; ay bilifiği ile karar verildi.

Prof.Dr. Davut ÖZBAĞ Başkan	Prof.Dr. Tayfun GÜLDÜR Başkan Yardımcısı	Prof.Dr. Metin ATAMBAY Üye
Prof.Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN Üye	Prof.Dr. Başak KAYHAN Üye	Doç.Dr. Şengül YÜKSEL Üye
Vet.Hek. Özge ÖZYALIN Üye	Akın ÖZ Sivil Üye	Av. M. Umut YALÇIN Sivil Üye

EK-2: Orijinallik Raporu

STATİNLERİN ABSORPSİYON VE PERMEABİLİTELERİ ÜZERİNE GREYFURT SUYUNUN ETKİSİNİN İN SİTU İNTESTİNAL PERFÜZYON TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 18	% 18	% 6	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	pdffox.com İnternet Kaynağı	% 4
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 4
4	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	dergi.fabad.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	<% 1

9. ÖZGEÇMİŞ
MÜGE ATEŞ