



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

**DOKTORA  
TEZİ**

**YENİ BİR YÖNTEM İLE AEROSOL HALİNE GETİRİLEN  
PİRFENİDONUN İNHALASYON YOLUYLA  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**SERKAN ÜNLÜ**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MART 2020**



**YENİ BİR YÖNTEM İLE AEROSOL HALİNE GETİRİLEN  
PIRFENİDONUN İNHALASYON YOLUYLA ETKİNLİĞİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Serkan ÜNLÜ**

**DOKTORA TEZİ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Mart 2020**

Serkan ÜNLÜ tarafından hazırlanan “YENİ BİR YÖNTEM İLE AEROSOL HALİNE GETİRİLEN PİRFENİDONUN İNHALASYON YOLUYLA ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. M. Orhan ULUDAĞ  
Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi



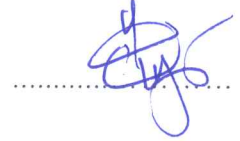
**Başkan:** Prof. Dr. Fatma AKAR  
Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



**Üye:** Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY  
Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



**Üye:** Prof. Dr. Tijen ÖNKOL  
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



**Üye:** Doç. Dr.T. Emrah BOZKURT  
Farmakoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



**Üye:** Prof. Dr. Nuray ARI  
Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 10/03/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mustafa ASLAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Serkan ÜNLÜ

10/03/2020

# YENİ BİR YÖNTEM İLE AEROSOL HALİNE GETİRİLEN PİRFENİDONUN İNHALASYON YOLUYLA ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Serkan Ünlü

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2020

## ÖZET

Pulmoner ilaç uygulaması, farmasötik formülasyon, hasta ve aerosol cihazı arasında başarılı bir etkileşim gerektirir. Son on yılda nebulizörler, basınçlı dozlama inhalatörler ve kuru tozlu inhalerler gibi klinik uygulamalarda kullanılan olağan cihazlara kıyasla daha küçük havadaki partiküller üreten aerosol yöntemleri geliştirmek için çeşitli yenilikler yapılmıştır. Günümüzde oldukça geliştirilen ve tıbbi üründen ziyade kişisel amaçlarla tüketici ürünleri olarak kullanılan elektronik atomizerler (Elektronik madde iletim sistemleri: EMİS) ilaç verilme amacı ile kullanılabilir. Pirfenidon, anti-fibrotik ve antiinflamatuvar etkilere sahip oral olarak kullanılan bir ajandır. Bleomisin kaynaklı pulmoner fibrozis modellerinde, antifibrotik etkinliği gösterilmiştir. Pirfenidonun biyoyararlanımının düşük ve hepatik metabolizasyonun hızlı olması nedeniyle oral dozu yüksektir. İlacın direk olarak akciğere verilmesi ile kullanılan ilaç dozu azaltılarak olası yan etkiler hafifletilebilir. Bu çalışmada pirfenidonun yeni bir yöntemle aerosol haline getirilerek ratlara farklı dozlarda olmak üzere inhalasyon yolu ile uygulanabilirliği ve oral olarak kullanıma kıyasla etkinliği değerlendirilmiştir. *In vivo* deneyler öncesi *In-Vitro* deneyler ile pirfenidon etkin maddesinin elektronik cihaz düzeneğinde sürüklenebilirliği ve tek pufta taşınabilen ilaç miktarları belirlenmiştir. Yanma ürünü kontrolü ve termostabilite değerlendirmesi yapılmıştır. Partikül boyutu ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre hayvan deneylerinde kullanılacak ilaç konsantrasyonları hazırlanmıştır. Deney protokolümüzde; tedavi ve kontrol gruplarında bleomisin ile pulmoner fibrozis oluşturulmuş ve bir hafta sonra başlamak üzere 7 gün boyunca tedavi gruplarına inhaler ya da oral pirfenidon tedavisi ve çözücü kontrol grubuna tek başına çözücü inhalasyonu uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise bu 7 gün süresince müdahale edilmemiştir. Tedavi sonunda ELISA ve patolojik incelemeler için akciğer dokuları toplanmıştır. Çalışmalarımız sonucunda EMİS aracılı iletimin fibrozis üzerinde aynı etkiye sahip olduğu ve öngörüldüğü gibi gereken dozun yaklaşık olarak 20 kat az olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle pirfenidonun EMİS aracılı inhalasyon yolu ile uygulanmasının fibrozis tedavisinde etkin olacağı ve oral yol ile uygulamada karşılaşılan yan etkilerin daha düşük şiddette görüleceği veya hiç görülmeyeceği ileri sürülebilir.

Bilim Kodu : 10103.03  
Anahtar Kelimeler: pulmoner, fibrozis, pirfenidon, inhaler  
Sayfa Adedi : 95  
Danışman : Prof. Dr. Mecit Orhan ULUDAĞ

# EFFICACY ASSESSMENT OF INHALED PIRFENIDON AEROSOLIZED WITH A NOVEL METHOD

(Ph. D. Thesis)

Serkan ÜNLÜ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

March 2020

## ABSTRACT

Pulmonary drug administration requires a successful interaction between the pharmaceutical formulation, the patient and the aerosol device. In the last decade, various innovations have been made to develop aerosol technologies that produce smaller airborne particles than conventional devices used in clinical applications such as nebulizers, pressure dosing inhalers, and dry powder inhalers. Electronic substance delivery systems (ESDS), which are mainly used as consumer products for personal purposes can be used for the purpose of drug administration. Pirfenidone is an orally used agent with anti-fibrotic and anti-inflammatory effects. Antifibrotic efficacy has been demonstrated in bleomycin-induced pulmonary fibrosis models. Due to high hepatic elimination of pirfenidone, oral dose is high. Direct administration of the drug to the lung may reduce the dose of the drug used and alleviate possible side effects. In this study, the applicability of pirfenidone into aerosol by a new method in different doses and its efficacy compared to oral use were evaluated. Preparations and experiments were carried out for the detailed evaluation of the systems to be used in the experiments.. In the In Vitro experiments, the druggability of the active substance pirfenidone in the electronic device and the amount of drug that can be transported to a single puff were determined. According to the data obtained, drug concentrations to be used in animal experiments were prepared. In our experiment protocol; pulmonary fibrosis was induced in the treatment and control groups with bleomycin and inhaler or oral pirfenidone treatment was administered to the treatment groups for 7 days and solvent inhalation alone was applied to the solvent control group for 7 days. The control group was not intervened during these 7 days. At the end of the treatment, rats were euthanized and lung tissues were collected for ELISA and pathological examinations. Result of the experiments showed that ESDS-mediated delivery has the same effect on fibrosis with oral administration with an approximately 20 fold less required dose. Therefore, it is considered that the administration of pirfenidone by ESDS-mediated inhalation will be effective in the treatment of fibrosis and that the side effects encountered in oral administration would probably be seen with less severity or not at all.

Science Code : 10103.03  
Key Words : pulmonary, fibrosis, pirfenidone, inhaler.  
Page Number : 95  
Advisor : Prof. Dr. Mecit Orhan ULUDAĞ

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve deney çalışmalarım süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. M. Orhan Uludağ'a,

Doktora eğitimimdeki emekleri için Prof. Dr. Nurettin Abacıoğlu'ya, Prof. Dr. Fatma Akar'a, Prof. Dr. Mustafa Ark'a, Prof. Dr. Nilüfer Turan'a, Dr. Öğr Üyesi Sevtap Han'a, Dr. Öğr Üyesi Nur Banu Bal'a

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji A.B. dalında deneylerim sırasında katkıları olan tüm arkadaşlarıma ve yardımcı personele, Doç. Vet. Hk. Ayşe M. Demirel'e ve Togan Kemal Güler ile Uzm. Dr. Muammer Melih Şahin'e,

Hayatımın her aşamasında karşılıksız sevgi ve desteğini esirgemeyen babam, Prof. Dr. Serdar Ünlü' ye ve annem Semra Ünlü' ye, sevgisi ve desteği ile hep yanımda olan eşim Firdevs İrem Kale Ünlü' ye

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

|                                                  | Sayfa |
|--------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                       | iv    |
| ABSTRACT.....                                    | v     |
| TEŞEKKÜR.....                                    | vi    |
| İÇİNDEKİLER .....                                | vii   |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....                          | x     |
| RESİMLERİN LİSTESİ .....                         | xi    |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                        | xii   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                    | xiv   |
| 1. GİRİŞ.....                                    | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                          | 3     |
| 2.1. Elektronik Madde Aktarma Sistemleri .....   | 3     |
| 2.1.1. Tanım .....                               | 3     |
| 2.1.2. Çalışma prensibi.....                     | 3     |
| 2.1.3. Güvenlilik .....                          | 8     |
| 2.1.4. İlaç veriliş yolu olarak kullanımı .....  | 16    |
| 2.2. Pulmoner Fibrozis.....                      | 16    |
| 2.2.1. Tanım .....                               | 16    |
| 2.2.2. Epidemiyoloji.....                        | 17    |
| 2.2.3. Etiyoloji.....                            | 18    |
| 2.2.4. Tanı .....                                | 20    |
| 2.2.5. Prognoz .....                             | 21    |
| 2.2.6. Tedavi .....                              | 22    |
| 2.3. Bleomisin ile Pulmoner Fibrozis Modeli..... | 23    |
| 2.4. Pirfenidon .....                            | 24    |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                         | 27    |

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. İn-vitro Deneyler .....                                                                              | 27 |
| 3.1.1. Validasyonu Yapılan Analitik Metot .....                                                           | 27 |
| 3.1.2. Validasyon Çalışmasında Kullanılan Ekipman, Ürün, Standart ve Reaktifler ..                        | 32 |
| 3.1.3. Valide Edilen Parametreler .....                                                                   | 33 |
| 3.1.4. Aerosol Partikül Büyüklüğünün Saptanması .....                                                     | 60 |
| 3.2. İn-Vivo Deneyler .....                                                                               | 62 |
| 3.2.1. Deney grupları .....                                                                               | 63 |
| 3.2.2. Biyokimyasal incelemeler, doku homojenizasyonu ve ELISA testleri .....                             | 64 |
| 3.2.3. Histopatolojik incelemeler .....                                                                   | 65 |
| 3.3. İstatistiksel Analiz .....                                                                           | 65 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                         | 67 |
| 4.1. İn-Vitro Deney Sonuçları .....                                                                       | 67 |
| 4.1.1. Taşınabilirlik Oranı .....                                                                         | 67 |
| 4.1.2. Yanma Ürünü Tespiti .....                                                                          | 68 |
| 4.1.3. Tek Pufta Verilen İlaç Miktarının Belirlenmesi .....                                               | 68 |
| 4.1.4. Aerosol Partikül Büyüklüğünün Saptanması .....                                                     | 69 |
| 4.2. İn-vivo deney sonuçları .....                                                                        | 69 |
| 4.2.1. Ağırlık, İştah ve Genel İyi Hali Takibi .....                                                      | 70 |
| 4.2.2. Enflamatuvar Yanıt ve Fibrozis Biyobelirteçlerinin Değerlendirilmesi .....                         | 71 |
| 4.2.3. Histopatolojik Değerlendirme .....                                                                 | 78 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                         | 87 |
| 5.1. Pulmoner Fibrozis Tedavisinde Pirfenidonun İnhalasyon ile Alınması Neden Gerekli? .....              | 87 |
| 5.2. İnhalasyon Yolu ile Verilen Pirfenidonun Etkinliği .....                                             | 90 |
| 5.3. Elektronik Madde İletim Sistemlerinin Sistemik İlaç Veriliş Yolu Olarak Kullanılma Potansiyeli ..... | 92 |

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.4. Elektronik Madde İletim Sistemlerinin İlaç Veriliş Yolu Olarak Kullanılmasının<br>Güvenliği..... | 93  |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                                            | 95  |
| KAYNAKLAR .....                                                                                       | 97  |
| EKLER.....                                                                                            | 115 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                        | 119 |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                                                                  | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 3.1. Pirfenidon miktar tayini doğrusallık çalışması grafiği.....                                                                                                 | 39    |
| Şekil 3.2. Enjeksiyon hacmi doğrusallık çalışması grafiği.....                                                                                                         | 40    |
| Şekil 4.1. Farklı atomizer ayarlarında ve değişik yoğunluktaki çözeltiler ile belirli süre (3s) içerisinde elde edilen buharda (60ml) taşınan etken madde miktarı..... | 69    |
| Şekil 4.2. Akciğer dokusu homojenatı TNF- $\alpha$ derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması.....                                                | 71    |
| Şekil 4.3. Akciğer dokusu homojenatı IL-6 derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması.....                                                         | 72    |
| Şekil 4.4 Akciğer dokusu homojenatı LPO derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması.....                                                           | 73    |
| Şekil 4.5. Akciğer dokusu homojenatı SOD derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması.....                                                          | 74    |
| Şekil 4.6. Akciğer dokusu homojenatı TGF- $\beta$ derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması.....                                                 | 75    |
| Şekil 4.7. Akciğer dokusu homojenatı TIMP derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması.....                                                         | 76    |
| Şekil 4.8 Akciğer dokusu homojenatı MMP-2 derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması.....                                                         | 77    |
| Şekil 4.9. Akciğer dokusu homojenatı hidroksiprolin derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması.....                                               | 78    |
| Şekil 4.10. Akciğer fibrozisi derecesi ile hidroksiprolin değerleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.....                                                        | 86    |

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                                                                 | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 2.1. Elektronik madde aktarma sistemlerinin basit şeması.....                                                                   | 16    |
| Resim 3.1. Copley NGI cihazı ile yapılan deney sırasında, buharın tüm membranlardan kolayca geçişini gösteren bulgular .....          | 61    |
| Resim 3.2. Aerosol partikül büyüklüğü ve dağılımı .....                                                                               | 61    |
| Resim 3.3. İntratrakeal bleomisin uygulanması.....                                                                                    | 62    |
| Resim 3.4. İnhalasyon ile pirfenidon uygulanması deney düzeneği.....                                                                  | 64    |
| Resim 4.1. Yanma ürünlerinin oluşmamasına ilişkin kromatogram.....                                                                    | 68    |
| Resim 4.2. Kontrol grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi.....                    | 80    |
| Resim 4.3. Propilen glikol inhalasyon grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi..... | 81    |
| Resim 4.4. Oral tedavi grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi.....                | 82    |
| Resim 4.5. İnhaler tedavi (10mg/kg) grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi.....   | 83    |
| Resim 4.6. İnhaler tedavi (20mg/kg) grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi.....   | 84    |
| Resim 4.7. İnhaler tedavi (40mg/kg) grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi.....   | 85    |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                                                      | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ekipman parametreleri .....                                                                             | 28    |
| Çizelge 3.2. Pirfenidon çözelti konsantrasyonları .....                                                                                                      | 29    |
| Çizelge 3.3. Atomizer parametreleri .....                                                                                                                    | 29    |
| Çizelge 3.4. Toplanan çözelti miktarı .....                                                                                                                  | 30    |
| Çizelge 3.5. Toplanan kör çözelti miktarları .....                                                                                                           | 30    |
| Çizelge 3.6. Çekilen buhar hacmi .....                                                                                                                       | 30    |
| Çizelge 3.7. Kullanılan ekipmanlar .....                                                                                                                     | 32    |
| Çizelge 3.8. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kolon bilgileri.....                                                                                        | 32    |
| Çizelge 3.9. Standartlar .....                                                                                                                               | 33    |
| Çizelge 3.10. Reaktifler .....                                                                                                                               | 33    |
| Çizelge 3.11. Pirfenidon özgülük çalışması sonuçları .....                                                                                                   | 35    |
| Çizelge 3.12. Pirfenidon doğrusallık çalışması sonuçları .....                                                                                               | 39    |
| Çizelge 3.13. Enjeksiyon hacmi doğrusallık çalışması sonuçları .....                                                                                         | 40    |
| Çizelge 3.14. t- Dağılım çizelgesi .....                                                                                                                     | 43    |
| Çizelge 3.15. Pirfenidon doğruluk çalışması sonuçları .....                                                                                                  | 43    |
| Çizelge 3.16. Pirfenidon tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları .....                                                                                        | 45    |
| Çizelge 3.17. Pirfenidon tekrar elde edilebilirlik metot kesinliği çalışması numune<br>çözeltisi sonuçları .....                                             | 47    |
| Çizelge 3.18. Pirfenidon % 100 metot kesinliği çalışması sonuçları.....                                                                                      | 47    |
| Çizelge 3.19. Pirfenidon tekrar uygulanabilirlik metot kesinliği çalışması numune<br>çözeltisi sonuçları .....                                               | 50    |
| Çizelge 3.20. Buharlaştırma sonrası yoğunlaştırılan sıvıdaki pirfenidon miktarı metot<br>kesinliği – tekrar uygulanabilirlik çalışması değerlendirmesi ..... | 50    |
| Çizelge 3.21. Pirfenidon % 100 tekrar uygulanabilirlik çalışması sonuçları.....                                                                              | 51    |
| Çizelge 3.22. Metot kesinliği – tekrar uygulanabilirlik çalışması değerlendirmesi .....                                                                      | 51    |
| Çizelge 3.23. Pirfenidon standart çözeltisi enjeksiyonu sonuçları .....                                                                                      | 53    |

**Çizelge****Sayfa**

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.24. Pirfenidon standart çözeltisi ve oda sıcaklığı (25 °c) stabilitesi sonuçları.....                               | 55 |
| Çizelge 3.25. Numune Çözeltisi Oda sıcaklığı (25 °C) Stabilitesi Sonuçları .....                                              | 55 |
| Çizelge 3.26. Sağlamlık çalışmasında değiştirilen metot parametreleri .....                                                   | 56 |
| Çizelge 3.27. Sağlamlık çalışmasında kullanılacak farklı kolon bilgileri .....                                                | 56 |
| Çizelge 3.28. Pirfenidon standart çözeltisi sağlamlık parametresi sonuçları (dalga boyu değişimi etkisi) .....                | 57 |
| Çizelge 3.29. Pirfenidon standart çözeltisi sağlamlık parametresi sonuçları (hareketli faz tampon pH'ı değişimi etkisi) ..... | 58 |
| Çizelge 3.30. Pirfenidon standart çözeltisi sağlamlık parametresi sonuçları (kolon değişimi etkisi) .....                     | 59 |
| Çizelge 4.1. Sürüklenebilirlik test sonuçları .....                                                                           | 67 |
| Çizelge 4.2. Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılması .....                                   | 70 |
| Çizelge 4.3. Tedavi grupları ve kontrol gruplarında histopatolojik inceleme sonuçları.....                                    | 79 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

$\Omega$

$^{\circ}\text{C}$

h

s

### Kısaltmalar

$A_N$

$A_S$

ATS

EMİS

ERS

GFR

GSS

Hv

IL

İPF

LPO

MMP-2

P

PDGF

SOD

TGF- $\beta$

TIMP

TNF- $\alpha$

TÖNA

V

$W_N$

$W_S$

### Açıklamalar

Ohm

Celcius

Hacim

Saniye

### Açıklamalar

Numune pikinin alanı

Standart pikinin alanı

Amerikan Toraks Cemiyeti

Elektronik madde iletim sistemleri

Avrupa Solunum Cemiyeti

Glomerüler filtrasyon hızı

Göreceli standart sapma

Yüksek vakumlu

İnterlökin

İdiopatik pulmoner fibrozis

Lipid peroksidasyonu

Matriks metalloproteinaz

Pirfenidon standardının potensi

Platelet kaynaklı büyüme faktörü

Süperoksit dismutaz

Tümör büyüme faktörü- $\beta$

Doku metaloproteinaz inhibitörü

Tümör nekrozis faktör- $\alpha$

Tütüne özgü nitrozamin

Volt

Numune tartımı (mg)

Standart tartımı (mg)

## 1. GİRİŞ

İlaçlar çeşitli yollarla (oral, parenteral, inhalasyon vb.) insan vücuduna verilebilir. Pulmoner yolun, pulmoner hastalıkları tedavi etmek için kullanılan çeşitli ilaçların lokal ve sistemik olarak verilmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Pulmoner ilaç uygulaması, farmasötik formülasyon, hasta ve aerosol cihazı arasında başarılı bir etkileşim gerektirir. Son on yılda nebulizörler, basınçlı dozlama inhalatörler ve kuru tozlu inhalerler gibi klinik uygulamalarda kullanılan olağan cihazlara kıyasla daha küçük partiküller üreten aerosol teknolojileri geliştirmek için çeşitli yenilikler yapılmıştır. Bu teknolojik atılımlar, astım, kistik fibroz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi akciğer hastalıklarında ilaçların derin penetrasyonunun sağlanmasında etkili olmuştur. Ancak, düşük maliyetli, hasta için rahat ve kullanımı kolay ve aerodinamik çapı yaklaşık 1 µm arasında olan küçük boyutlu aerosol partiküllerini üretebilen alternatif bir araca ihtiyaç duyulmaktadır [1–6]. Günümüzde elektronik atomizerler oldukça geliştirilmiştir. Bu cihazlar genel tıbbi ürünler olarak değil, genel tüketici ürünleri olarak düzenlenmiştir. Henüz ilaç veriliş amacı ile kullanılmasa da bu konuda önemli mesafe almıştır. Temel olarak bu cihazlar, pille çalışan kişisel buharlaştırıcılardır. Bu cihazlarda kullanılan dolum sıvısını (gliserol ve/veya propilen glikol), etken maddeyi ve diğer katkı maddelerini (su, etanol, tatlandırıcılar, vb.) içerir. Günümüzde yeni nesil güçlü cihazların, çok yüksek aerosol etken madde seviyeleri sağlayabildikleri gösterilmiştir. Küçük boyutlu aerosol partikülleri üretebilmesi, etkinliği, kullanıcı dostu ve müşteri odaklı olması klinik amaçlar için umut verici yönleridir [7–10].

Pirfenidon, anti-fibrotik ve antiinflamatuvar etkilere sahip oral olarak kullanılan bir piridon türevidir. Pirfenidon, bleomisin kaynaklı pulmoner fibrozisin hamster modelinde, antifibrotik etkinliği gösterildikten sonra, idiyopatik pulmoner fibroz, multipl skleroz, primer sklerozan kolanjit, kronik hepatit C gibi birçok bozukluğun tedavisinde klinik olarak değerlendirilmiştir [11, 12]. Elde edilen en geniş klinik veriler pirfenidonun pulmoner fonksiyonu stabilize etmeye yardımcı olabileceği ile ilişkilidir. Pirfenidon etki mekanizması tam olarak anlaşılamamasına rağmen, hem anti-inflamatuvar hem de anti-fibrotik etkiler sergiler. İlacın antifibrotik etkisi üzerinde oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Pirfenidonun antifibrotik mekanizmasının önemli bir yönü, hem tümör büyüme faktörü-β (TGF-β) üretimini hem de aktivitesini inhibe etmesiyle ilişkilidir [13–18]. Pirfenidon tedavisinin, TGF-β geni transkripsiyonunda % 33 oranında azalma sağladığı anlaşılmıştır [18]. Prokollajen I ve III genlerinin aşırı ekspresyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Ek olarak

pirfenidon, hücre dışı matriks sentezinde ve yeniden modellemede önemli bir rol oynadığı düşünülen bir kollajen özgül moleküler koruyucu olan ısı şok proteininin pulmoner fibroblast ekspresyonunu inhibe eder. Pirfenidonun etki mekanizması tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1 (IL-1) salınımında azalma ile yakından ilişkilidir [19–22]. Antioksidan özellikleri halen araştırılmaktadır.

Pirfenidon başlıca hepatik mikrozomlar ile metabolize edilir. CYP1A2 metabolizmanın yaklaşık yarısından sorumludur. Pirfenidon, 5-karboksipirfenidon metaboliti olarak atılır. Çok az kısmı değişmeden idrarla atılır. Dahası, pirfenidonun farmakokinetiği ve metabolizması, glomerüler filtrasyon hızındaki (GFR) azalmış veya son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda tam olarak değerlendirilmemiştir. Bu nedenle düşük GFR'ye sahip hastalarda uzun süreli etkinliği ve güvenliği bilinmemektedir. Pirfenidon, oral yoldan verildikten sonra 1-2 saat içinde hızla absorbe edilir ve  $2.1 \pm 0.4$  saatlik yarılanma ömrü ile plazmadan temizlenir. Kararlı doz durumu, günde üç kez 400 mg ile üçüncü gün elde edilebilir. Cinsiyetin farmakokinetik üzerine hiçbir etkisi yoktur [11, 23–25].

Bu çalışma, pirfenidonun çok daha düşük dozlarda ve lokal olarak uygulanmasını sağlayacak yeni nesil yüksek güçlü elektronik madde aktarım sistemlerinin (EMİS) inhaler terapi için aerosol oluşturma cihazı olarak kullanılmasını ve terapötik potansiyelini değerlendirmeyi önermektedir. Bu sınıf cihazların temel avantaj ve dezavantajlarını vurgulamak için, bu çalışma sistemik kullanımı bulunan, biyoyararlanımının düşük, hepatik metabolizasyonu hızlı ve hedef organı akciğer olan pirfenidonun lokal uygulanabilirliğine odaklanmaktadır. Bu çerçevede, yeni nesil yüksek güçlü elektronik cihazların inhale terapi için aerosol oluşturma cihazı olarak potansiyelini değerlendirmeyi önermektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Elektronik Madde Aktarma Sistemleri

#### 2.1.1. Tanım

Elektronik madde iletim sistemleri kısaca kişisel buharlaştırıcılar olarak adlandırılabilir. Bu cihazlar, içerisinde etken maddeler bulunan bir çözeltiyi ısı enerjisi ile buhara dönüştüren cihazlardır [26]. Çözeltinin ısıtılması için batarya ve enerjinin aktarılması için uygun donanım kullanılır. Etken madde, gliserin, propilen glikol ve su gibi çözücüler içerisinde bulunur [27]. Oluşturulan çözelti, değiştirilebilir kartuşlarda paketlenabilir ve yeniden doldurabilir, bazı cihazlar için tek kullanımlık da olabilir [28]. Genellikle küçük bir şarj edilebilir lityum-iyon batarya ile çalıştırılır. Çoğu modelde bir düğmeye basılarak ve uç tarafından teneffüs edilerek çalıştırılır. Mikroişlemci ile cihazın etkinleşmesi, çalışma süresi, tüketilen enerji miktarı ve çalışma süresi hesaplanıp, kaydedilebilir. Cihazlar günümüzde genellikle paslanmaz malzemeden ve camdan oluşmaktadır. Şekilleri de oldukça farklılık göstermektedir [29]. Bu metinde elektronik madde iletim sistemleri EMİS olarak kısaltılmıştır. EMİS'lerin tütün ürünlerinden daha az katran ve kanserojen ürettiği ve sigara bırakma konusunda topluma yararlı olabileceği belirtilmiştir [30–42]. İlerleyen yıllarda prospektif çalışmaların ve gözlemsel gerçek hayat verilerinin artmasıyla bu cihazların halk sağlığı üzerine olan etkisi daha açık bir şekilde ortaya konacaktır. Ayrıca, bu cihazların artan kullanım oranıyla nikotin bağımlılığı olmayan kişilerde, nikotin bağımlılığı geliştirme riskini doğurabileceği düşünülmektedir [43–47]. Piyasaya sürülebilen ilk EMİS cihazı 2004 yılında geliştirilmiştir ancak yanma prensibine dayanan tütün ürünlerini ortadan kaldırmak için gerçekleştirilen bu uğraşı son 50 yılı kapsayan bir süreçtir. Günümüzde EMİS endüstrisi, 2500 farklı marka ve cihaz türü mevcut olan büyük bir endüstri alanı olarak dikkat çekmektedir.

#### 2.1.2. Çalışma prensibi

EMİS, genellikle kaleme veya tanka benzer şekillerde üretilse de, birçok değişik çeşidi bulunmaktadır. EMİS bileşenleri arasında bir ağızlık, bir kartuş/tank (sıvı depolama alanı), bir ısıtma elemanı/atomizer, bir mikroişlemci, bir batarya ve bazılarının ucunda bir gösterge ışığı bulunmaktadır. Elektronik devre ve mikroişlemci içermeyen mekanik türleri de mevcuttur ve bu cihazlarda devre mekanik anahtar ile kontrol edilir [9, 10, 27, 28, 48–51].

EMİS'ler tek kullanımlık olabilir ancak genellikle yeniden kullanılabilir cihazlar olarak üretilir. Yeniden kullanılabilen EMİS'lerin tankı kullanıcı tarafından doldurulabilir, kartuş ile çalışan cihazlarda kartuş değişimi yapılabilir ve cihaz temizliğinin yapılması önem taşır. Bazı EMİS'ler, yanan tütüne benzer görünüm yaratmak amacıyla uç kısmında ışığa sahiptir. Bu ışık aynı zamanda pil durumunu da gösterebilir. İlk üretilen EMİS'ler, genellikle tütün ürünlerinin görünümlerine benzer yapıya sahiptir [9, 28, 50]. Daha sonra üretilen ve kişisel buharlaştırıcı olarak da adlandırılan cihazlar ile nikotin aktarım performansı da artmıştır [35]. Bu cihazlar daha yüksek kapasiteli piller barındırır ve şekilleri önceki cihazlara kıyasla farklılık gösterir. Birçok EMİS günümüzde çeşitli standartlar altında birbirine uyumlu olan değiştirilebilir parçalardan oluşmaktadır. Çok çeşitli bileşen kombinasyonları mevcuttur. Cihazı belli etmeden kullanmak isteyenlerin tercih edebileceği kalem veya bellek çubuklarına benzeyen cihazlar da üretilmiştir. Çeşitliliği ve kullanım oranı arttıkça kişiye özelliştirmiş EMİS'ler ortaya çıkmıştır [50, 52–54]. Günümüzde teneffüs kapasitelerine ve nikotin ihtiyaçlarına göre hava giriş özellikleri ayarlanabilen cihazların kullanımı artmaktadır. Yine teknolojinin de gelişimi ile EMİS'lere kullanım sıklığını, puf süresini ve sıklığını, kullanılan sıvı miktarını kaydedebilen, otomatik açma-kapama, batarya koruma fonksiyonları bulunan, belirli sıcaklık limitlerine sahip olan, şifre korumalı cihazlar üretilmiştir. Öyle ki günümüzde cep telefonu şeklinde EMİS'ler üretilmiş olup bunlara hücrel buharlaştırıcı adı verilmiştir. EMİS endüstrisi gelişmeye devam ettikçe, yeni ürünler hızlı bir şekilde geliştirilmekte ve pazara sunulmaktadır [7, 27, 55, 56].

### EMİS jenerasyonları

İlk cihazlar, kullanıcının teneffüs etmesiyle çalışan, genellikle uç kısmında bir ışık bulunan, sigaraya benzeyen, büyük aerosol partikülleri nedeniyle etkileri kısıtlı cihazlardır. Yeni cihazlar da ise daha küçük partikül boyutları yaratabilen daha verimli madde iletimi sağlayan değiştirilebilir ısıtıcı sistemleri ve yeniden doldurulabilir rezervuarlar ve şarj edilebilir piller bulunmaktadır. Birçok ülkede EMİS'ler hakkında yasal düzenleme yapılmadığından cihazların özellikleri değişkenlik gösterebilir.

#### *Birinci nesil EMİS*

Birinci nesil EMİS'ler tütün ürünleri gibi görünmektedir. Bu cihazlarda sistem bir kartuş, atomizer ve bataryadan oluşmaktaydı. Cihazların çoğu birbirine benzemesine rağmen

boyutlarında farklılıklar mevcuttu. Cihazlar tek kullanımlık olabildiği gibi, buhar üreten kısmı batarya kısmından ayrılabilen ve kartuşları değiştirilebilen tipleri de piyasaya sunuldu. Tütün ürünlerine benzeyen bu cihazlarda elektronik bir sensör ile hava akımı algılanıp batarya bölümü aktive edilebilir ya da bu işlem için sensör yerine bir güç düğmesi kullanılır. Güç düğmesi üzerinde veya cihazın ucunda bulunan bir ışık, cihazın çalıştığını gösterir. Bataryanın şarj edilmesi için batarya direkt şarj cihazına bağlanabilir ya da şarj edilebilir pilleri dışarıdan şarj eden bir elektronik kutu ile yapılabilir. Bu cihazlarda kullanılabilen değişik nikotin konsantrasyonları mevcuttur. Kullanıcı kendi seçimi ile nikotin miktarını ve aromayı belirleyebilir. Cihazların bu farklılıkları herhangi bir çözelti için kullanıcıya ve çevresindeki havaya verilen aerosol içerik seviyelerini etkiler. Birinci nesil EMİS'ler genellikle 3,7 V' u aşmayan düşük voltaj ile çalışan cihazlardır [35, 48, 57].

### *İkinci nesil EMİS*

İkinci nesil EMİS'ler, bu cihazlar hakkında daha fazla deneyime sahip kişiler tarafından kullanılma eğilimindedir. Birinci nesil ile kıyaslandığında genel olarak daha büyüktürler ve tütün ürünlerine daha az benzerler. Bu cihazlar bir tank ve ayrı bir batarya olmak üzere iki bölümden oluşur. Pillerin kapasitesi daha yüksektir ve genellikle çıkartılamazlar. Şarj edilebilir olmaları için, pili dişli bir konnektöre bağlanan bir USB şarj cihazı kullanırlar. Bazı piller "geçme" özelliğine sahiptir, bu nedenle şarj olurken bile kullanılabilirler. İkinci nesil EMİS'ler genellikle bir "klearomizer" kullanır. Klearomizer tankları çözelti ile tekrarlayan seferler doldurulabilir. Bu nedenle maliyetleri daha düşüktür. İkinci nesil cihazlarda kartuşlar da kullanılabilir ancak tek kullanımlık olduklarından maliyetleri daha yüksektir. Pil durumunu gösterebilen tasarımları vardır ve güç düğmesi aynı zamanda pili de kapatır, böylece yanlışlıkla çalıştırılmaz. İkinci nesil EMİS'ler de 3.7 V civarında voltajlara sahip olabilir. Bazı modellerde voltaj 3 V ile 6 V arasında ayarlanabilir [47, 58, 59].

### *Üçüncü nesil EMİS*

Üçüncü nesil cihazlar değişken voltajlı aygıtları içerir. Bataryalar genellikle entegre devreler içermez ve büyük ve birden fazla pilin sığabildiği silindir ya da dikdörtgenler prizması şeklindedir. Paslanmaz çelik, pirinç veya alüminyum gövde içerirler. Bataryaları çıkarılabilir ve değiştirilebilir. Üçüncü nesil cihazlar, watt, voltaj veya her ikisinin ayarlanmasına izin verir. Güç (batarya) bölümü, farklı atomizer türleriyle uyumluluk gösterebilir. Üçüncü nesil

cihazların atomizerleri değiştirilebilen dirençlere sahip olabilir. Buhar üretimini arttırmak için atomizer içine el yapımı bobinler yerleştirilebilir. Bu bobinler bazen gücü veya tadı artırmak için değiştirilebilir. Kullanılan daha büyük batarya bölümleri, daha fazla çözelti tutabilen büyük tankların takılmasına da izin verir. Bu cihazlar 8 V'a kadar çıkabilir ve çözeltiyi önceki nesillere göre çok daha fazla ısıtabilir [7, 47, 51, 58].

#### *Dördüncü nesil EMİS*

Dördüncü kuşak EMİS'ler paslanmaz çelikten ve camdan yapılır ve çok az plastik içerirler. Dördüncü kuşak içinde gelişmiş tanklar, atomizerler ve sıcaklık kontrol cihazları bulunur. Tek inhalasyon ile yüksek hacimlerde buhar üretimi sağlarlar. Yüksek voltajlarda çalışabilirler. Isıtma gücü oldukça fazladır. Genellikle deneyimli EMİS kullanıcıları tarafından tercih edilirler [7, 47, 51, 58].

#### Atomizer, kartomizer, clearomizer ve tank

Bir atomizer, çözeltiyi buharlaştıran küçük bir ısıtma elemanından (bobin) ve bobinin üzerine çeken esnek bir malzemeden oluşur. Atomizer, batarya ve çözelti her kişisel buharlaştırıcının ana bileşenleridir. Çözeltiyi çeken ve tutan fitil malzemesinin etrafına küçük bir direnç teli sarılması ile oluşturulur ve devreye bağlanarak çalışması sağlanır. Çalıştırıldığında direnç teli ısınır ve çözeltiyi buharlaştırır. Bobinin elektrik direnci, cihazın voltaj çıkışı, atomizerin hava akımı ve fitilin etkinliği, atomizerden gelen buhar miktarını ve yoğunluğunu etkiler. Atomizer bobinleri genellikle 0,4 $\Omega$  ila 2,8 $\Omega$  arasında değişen dirençlere sahiptir. Düşük dirençli bobinler buhar üretimini arttırmıştır ancak yangın ve tehlikeli pil arızaları riskini doğurabilir. Fitil malzemeleri atomizerler arasında farklılık gösterebilir. Kişilerin kendi tasarladıkları atomizörler, silika, pamuk, suni ipek, gözenekli seramik, kenevir ve bambu ipliği içerebilir [26, 28, 49, 58–60].

Kartomizerler sıvı haznesi içerisine yerleştirilmiş ısıtma birimlerinin olduğu ve çözeltinin poli-köpük yapıda malzeme ile tutulduğu atomizer tipidir. Kartomizerler genellikle yanma başladığında atılır, tekrar doldurulabilir olsalar da bu üreticiler tarafından önerilmez.

Klearomizerler, içerisi görülebilen bir tank içerisinde, fitil sistemi, bobin ve atomizerin bulunması ile oluşur. Bu özellik kullanıcının cihazdaki sıvı seviyesini izlemesini sağlar.

Klearomizer içinde kullanılan farklı fitilleme sistemleri vardır. Bazıları, çözeltiyi fitil ve bobin düzeneğine getirmek için yerçekimini kullanır. Diğerleri, kılcal harekete veya kullanıcının çözeltiyi hareket ettirmesine ihtiyaç duyar. Bobin ve fitiller tipik olarak, kullanıcı tarafından değiştirilebilen önceden hazırlanmış bir düzeneğin içindedir. Klearomizerler ile hava akış ayarlaması yapılabilir. Hazneler plastikten veya borosilikat camdan yapılabilir. Özel atomizerler kişilerin kendi ayarlamaları ile oluşturdukları klearomizerler gibi çalışan yapılardır. Kullanıcının istenen herhangi bir elektrik direncinde atomizör oluşturmaya izin verir. Tank atomizerleri veya damlama atomizerleri olarak sınıflandırılır. Tank atomizörlerinde fitil tarafından emilen sıvıyı tutmak için bir hazne bulunur. Hazne, plastik, cam veya metal olabilir [60].

### Güç kaynakları

Cihazlar değişken watt, değişken voltaj veya her ikisini sağlayabilecek şekilde güç kaynaklarına sahiplerdir. Bobine uygulanan güç miktarı üretilen ısıyı etkiler, böylece buhar çıkışını değiştirir. Değişken güç cihazları, bobinin direncini izler ve bobine kullanıcı tarafından belirlenen güç seviyesini uygulamak için voltajı otomatik olarak ayarlar. Cihazlar genellikle voltaj, güç ve bobinin direnci gibi bilgileri bir ekranda gösterir. Bu cihazlardan bazıları, menü sistemi aracılığıyla atomizer direncini ölçer, kalan pil voltajını gösterir, nefes sayacı ve kapanma veya kilitlenme gibi ek ayarların yapılmasını sağlar. Güç kaynağı, sıklıkla şarj edilebilir bir lityum-iyon bataryadır ve bir cihazın en büyük bileşenidir. Küçük cihazlarda daha küçük piller bulunur ve taşınması daha kolaydır ancak daha sıklıkla şarj edilmesi gerekir. Bazı EMİS'lerde uzun ömürlü, şarj edilebilir bataryalar veya şarj edilemeyen değiştirilebilir bataryalar kullanılır. Güç kaynağı için nikel-kadmiyum, nikel metal-hidrid, lityum iyon, alkalın ve lityum polimer ve lityum manganer pilleri denenmiştir. Gelişmiş cihazlarda sıcaklık kontrol sistemi mevcuttur ve bu sistem kullanıcının istenilen en yüksek sıcaklığı ayarlamasını sağlar. Isıtıldığında bobinin direncinde öngörülebilir bir değişiklik meydana gelir. Direnç değişiklikleri, bobin tipleri arasında farklılık gösterir. Sıcaklık kontrolü, bu direnç değişikliğinin tespit edilmesi ve mevcut voltajın birbirine eşleştirilmesi ile sağlanır. Nikel, titanyum, nikel alaşımları ve bazı paslanmaz çelikler, sıcaklık kontrolünde tel için kullanılan yaygın malzemelerdir. Bobin üretiminde en sık kullanılan khalhal adlı tel, bobin sıcaklığından bağımsız olarak sabit bir dirence sahiptir ve bu nedenle sıcaklık kontrolü için kullanılamaz. Sıcaklık kontrolü kuru fitillerin yanmasını veya çözeltinin aşırı ısınmasını engeller [26–28, 59].

### Çözelti

Çözelti (e-sıvı), tipik olarak toplam % 95 propilen glikol ve gliserinden oluşur ve geri kalan % 5, aromalar, etken madde (nikotin) ve diğer katkı maddeleridir. Birçok ülkede yasal düzenleme yapılmadığından sıvının bileşimi farklılık gösterebilir. Farklı etken madde konsantrasyonları, değişik tat, aroma ve kokuların, değişik çözücü oranlarında karıştırılmasıyla çok değişik ve yüksek sayıda çözelti hazırlanabilir. En sık kullanılan çözücüler propilen glikol ve gliserindir. Tetrahidrokannabinol veya diğer cannabinoidleri içeren çözeltiler de mevcuttur. Çözeltiler aslında sistemin güvenlik açısından en önemli kısmını oluşturmaktadır. Bu çözeltilerin saf olmaması ya da kontamine olması, uygunsuz koşullarda saklanması istenmeyen ürünlerin teneffüs edilmesine yol açabilir [51, 60–63].

#### **2.1.3. Güvenlilik**

EMİS'lerin güvenlik ve risk profili hakkındaki güncel çalışmalar kimyasal, toksikolojik ve klinik çalışmalar olarak değerlendirilebilir. Klinik araştırmalar kanıt düzeyi en yüksek, en çok bilgi sağlayan çalışmalar olsa da metodolojik, lojistik, etik ve finansal zorluklar nedeniyle gerçekleştirilmeleri zordur. Özellikle, gelecekte ortaya çıkabilecek potansiyel hastalık gelişimini değerlendirmek için uygun planlanmış kohortlarının uzun vadeli güvenlik/risk profilini incelemek gereklidir. Ancak bu çalışmalarda sonuçlara ulaşılmadan önce yüzlerce kullanıcıyı çok uzun süreler takip etmek gerekir. Bu nedenle, günümüzde yapılan çoğu çalışma in vitro etkilere odaklanmaktadır veya sigaraya bağlı kısa sürede gelişen hastalıklarla ilişkisini veya patofizyolojik mekanizmalarını değerlendirmek için sınırlı çalışmalar mevcuttur [56, 61].

Kimyasal analiz içeren araştırmalar, sonuçları hızlı bir şekilde elde etmek ve sunmak için nispeten basit ve ucuzdur. Ancak bu yaklaşımın bazı dezavantajları vardır. Araştırmalar genellikle bilinen özgül kimyasalları hedefler ancak çözeltide veya yayılan aerosolde tespit edilebilecek potansiyel toksik kirleticileri kapsayamaz. Çözelti içerisinde kullanılan aromalardaki kimyasal maddelerin tespitinde de sorunlar ortaya çıkabilir. Her ne kadar bu maddeler gıda endüstrisinde kullanım için onaylanmış olsalar da, ısıtma, buharlaştırma ve soluma üzerinde bilinmeyen etkileri olabilir. Kimyasal analiz çalışmaları aslında EMİS kullanımının etkileri hakkında nesnel bilgi sağlamaz; sadece teorik modellere ve sağlık otoriteleri tarafından belirlenen önceden belirlenmiş güvenlik seviyelerine dayanarak riski

hesaplamak için kullanılabilirler. Aerosollerinin kimyasal bileşimini değerlendirmek için yapılan çalışmalarda cihaz çalışırken tespit edilen direnç sıcaklığı, tütün sigarasının sıcaklığının yaklaşık % 5 ila 10'u kadardır [46, 61, 64, 65]. Ağır metaller, kanserojen polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve fenoller gibi toksik kimyasallar, az miktarda civa ve formaldehit ve asetaldehit gibi maddelerin de sadece izleri tespit edilmiştir. Tütün sigaralarından elde edilen toksik emisyon skoru temelinde değerlendirildiğinde ise EMİS 0 puan ile değerlendirilmiştir. Normal bir tütün sigarası için bu değer 100–134 puan arasındadır. EMİS cihazları ile ABD Gıda ve İlaç İdaresi dâhil birçok araştırmacı çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalarda, tütüne özgü nitrozaminlerin (TÖNA), dietilen glikol, amino-tandalafil ve rimonambant gibi maddelerin eser miktarda izlerini tespit etmişlerdir [66]. Ancak, yapılan çalışmalarda TÖNA seviyelerinin farmasötik nikotin replasman tedavileri ile benzer olduğu saptanmıştır. 105 değişik çözeltinin değerlendirildiği çalışmada araştırmacılar her bir ml çözelti için 12,99 ng TÖNA saptamışlardır ve bu değer nikotin replasman tedavisi alan grup ile benzerdir. Tütün sigaraları ile nitrozaminlere günlük tahmini maruziyetin, EMİS kullanımına kıyasla en az 1800 kat daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. EMİS cihazlarında nikotin seviyelerinin, etiketlenenin % 85-121'i olduğu ve nikotin bozunma ürünlerinin ise % 0-4,4 seviyelerinde olduğu daha sonra yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [67]. Bu düzeylerin ise kullanıcılara ölçülebilir bir zarar vermesi beklenmemektedir [68]. Ayrıca, karbonil bileşiklerinin tespiti için analizler yapılmıştır. Propilen glikol ve gliserolün termal bozunmasının, aldehitler gibi toksik bileşiklerin salıverilmesine yol açabileceği bilinmektedir [69, 70]. Çoğunlukla birinci nesil çözeltilerin kullanıldığı ve gerçekçi bir sigara içme modeli oluşturmayan bir çalışmada 15 karbonil salıverilmesi değerlendirilmiş ve sadece 3 karbonil (formaldehit, asetaldehit ve akrolein) tespit edilmiştir [42]. Bu tespit edilen karbonil seviyeleri ise tütün içimi ile oluşan seviyelere kıyasla oldukça azdır. Bu çalışmada kullanılan yöntem, puflar arası uygun zaman aralığı verilmemesi ve farklı özelliklere sahip cihazlarda aynı sayıda puf kullanılması nedeniyle verilerin değerlendirilmesinde güçlük yaratmaktadır. EMİS'lerde çözelti ile doğrudan temas halinde olan birkaç metal parçası olduğu göz önüne alındığında, buhardaki metallerle kirlenmenin beklendiği açıktır. Bu nedenle metal varlığı için deneyler yapılmış ve nikel, kadmiyum ve kurşun salınabileceği bulunmuştur ancak, nikel seviyeleri, farmasötik nikotin inhalatöründe mevcut olanlara benzerken, kurşun ve kadmiyum, inhalatöre kıyasla 2-3 kat daha yüksek saptanmıştır [71]. Yine de, mutlak seviyeler çok düşüktür ve tespit edilen seviyelerin kullanıcıların sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmasının muhtemel olmadığı belirtilmiştir [42]. Tüm aerosol, tüketici tarafından absorbe edilse dahi, ki aerosolün çoğu

gözle görülür şekilde nefesle dışarı verildiği için bu varsayım geçerli değildir, ortalama bir kullanıcının, çoğu metal için yabancı maddelerden elde edilen maksimum günlük doz limitinden 4 ila 40 kat daha düşük miktarlara maruz kalacağı saptanmıştır [61]. Aerosolde ayrıca eser miktarda silikat partikülleri de bulunmuştur. Bu tür parçacıklar fitili oluşturan malzemeden kaynaklanabilir ancak solunum yolu hastalıklarından sorumlu olan kristalin yani silika oksit parçacıklarının bulunup bulunmadığı netleştirilememiştir. Bu sonuçlar tütün ürünleri ile karşılaştırıldığında yaklaşık 1000 kat daha az mikropartikül saptanmıştır [61, 72]. Bu özgül moleküllerin yanısıra tütün dumanında mevcut 4000 üzerinde kimyasalın EMİS buharında bulunmadığının farkına varılması gerekmektedir. Çalışmaların standardize edilmemiş cihazlarda yapıldığı ve değişik bileşenlere sahip sıvıların kullanıldığı unutulmamalıdır.

Toksikolojik çalışmalar günümüze kadar genellikle hücre serileri üzerinde yapılmıştır ve sayıları kısıtlıdır. Sitotoksikite çalışmalarının belirli kısıtlılıkları mevcuttur. Bu çalışmalarda elde edilen veriler doğrudan *in-vivo* duruma uygulanamaz ve bu araştırma modellerinde toksik etkilerin yorumlanmasında aşırıya kaçma riski vardır. Sonuçlarda ortaya çıkabilecek potansiyel farklılıkların engellenmesi için buhar üretimi ve maruz kalma protokol standartları açıkça tanımlanmalıdır [61]. İnsan embriyonik kök hücrelerinde, fare sinir kök hücrelerinde ve insan pulmoner fibroblastlarında yapılan sitotoksikite çalışmalarında propilen glikol ve gliserol sitotoksik bulunmamasına rağmen, aroma vermek için kullanılan maddelerin sitotoksikite ve yoğunlukları arasında bir korelasyon saptanmıştır [73]. Çoğu araştırmalarda sadece EMİS sıvılarının buharları değil, sıvıların kendisi kullanılmıştır ve bu özellikleri nedeniyle çalışma bulgularının önemini sınırlandırmıştır. Bu ürünlerin kullanım amacının sadece soluma yoluyla olduğu ve EMİS sıvılarındaki aroma maddelerinin buharlaşma sıcaklığından dolayı aynı miktarda aerosolde bulunmasının muhtemel olmadığı göz önüne alınmalıdır. Hücrelerin EMİS için kullanılan sıvıya sürekli maruz bırakılması ki bazı çalışmalarda hücreler bu sıvı içerisinde 48 saat süreyle kültürlenmiştir, olası etkilerin değerlendirmesini kısıtlamıştır. Akciğerler EMİS kullanımı sırasında aerosolle temas ettiğinde, temas nefes başına 1-2 saniye sürmektedir ve aerosolün çoğu gözle görülebilir şekilde soluk ile dışarı verilmektedir. Bu çalışmalarda çoğunlukla tarçın aroması sitotoksik bulunmuştur ancak tarçın aroması % 3-5'e seyreltilmediği sürece EMİS'lerde kullanılmayan yoğun bir tatdır [61].

EMİS'ler ile üretilen buharının ilk sitotoksikite çalışması fibroblast hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir [74]. Piyasada sıkça satılan bir EMİS cihazı tarafından üretilen, aynı miktarda nikotin (9 mg / ml) içeren 21 sıvı numunenin buharı test edilmiş, ve hücre serileri bu buharların her birinde ve bir tütün sigarasından çıkan dumanla 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Yalnızca bir numunenin marjinal olarak sitotoksik olduğu bulunmuş, buna karşın sigara dumanı yaklaşık % 795 daha fazla sitotoksik olarak saptanmıştır [74]. Aynı grup, 20 EMİS sıvı numunesinin kardiyomiyoblastlarda sitotoksik etkisini ticari olarak temin edilebilen bir cihaz kullanılarak test etmiştir. Sıvı örnekleri çok çeşitli nikotin konsantrasyonlarına sahip ve tütün yapraklarının direk propilen glikol ve gliserol içine bırakılmasıyla elde edilen bir sıvı da kullanılmıştır. Özellikle tarçın aroması ve çözücü içerisine doğrudan yerleştirilen tütün yapraklarından hazırlanan çözeltiler sitotoksik olarak bulunmuştur. Tütün sigarasından çıkan dumanın ise 8 kat seyreltildiğinde bile sitotoksik olduğu gözlenmiştir [75]. EMİS çözücülerinin olası zararlarını değerlendirmek için çok az hayvan çalışması yapılmıştır. Robertson ve meslektaşları, birkaç ay boyunca solunan propilen glikol buharlarının primatları üzerindeki etkileri test etmiş ve hayvanların ölüm sonrası incelemesinden sonra herhangi bir organda toksisite kanıtı bulunamamıştır [76]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada da sıçan ve köpeklerde benzer gözlemler yapılmıştır [77]. Tiyatro sahne sisine ve havacılık endüstrisinde kullanılan propilen glikole maruz kalan insanlar üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları, EMİS çözeltilerinin insan kullanımında yer alması açısından endişeler doğurmuştur [78, 79]. Yapılan çalışmalarda solunum yollarında hafif tahriş saptanmasına rağmen ciddi ve geri dönüşümsüz bir solunum sistemi hastalığı ya da uzun dönem komplikasyonları saptanmamıştır. Bu çalışmalarda saf propilen glikol kullanılmadığı ve bazı yağların sıvıya eklendiği bunların da çalışma sonuçlarını etkileyebileceği ve EMİS kullanımına denk tutulamayacağının göz önünde bulundurulması gereklidir. Solunan gliserolün potansiyel zararı için kanıtlar azdır. Sprague-Dawley sıçanlarını kullanan bir çalışmada, akciğerlerde veya diğer organlarda herhangi bir değişiklik gözlenmeden, sadece yüksek doz buhara maruz kalan grupta epiglot epitelinin etkilendiği bulunmuştur [80]. Sonuç olarak, toksikolojik çalışmaların çoğunluğu EMİS buharının hemen hemen zararsız olabileceğini göstermektedir. Akciğer epitel hücreleri gibi farklı hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar dahil olmak üzere daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Klinik çalışmalar ve araştırma anketleri çok bilgilendirici olabilir ancak araştırılan ürünlerin güvenlik / risk profilini yeterince araştırmak için yüzlerce kullanıcının izlenmesini gerektirir.

Öte yandan, EMİS kullanıcılarının araştırma anketleri bu ürünlerin potansiyel zararları hakkında hızlı bir şekilde bilgi sağlayabilir ve çok daha az maliyetlidir. EMİS kullanıcılarında boğaz tahrişi ve öksürük en sık bildirilen yan etkiler olarak bulunmuştur [54, 71, 81, 82]. Randomize kontrollü çalışmalar da EMİS'lerin güvenlik analizini doğrulamıştır. ECLAT çalışması, birinci nesil bir cihazın 7.2, 5.4 veya 0 mg nikotin kartuşları ile etkinliğini ve güvenliğini araştırmak için tasarlanmış üç kollu, kontrollü, randomize, klinik bir çalışmadır [83]. Aynı çalışma sürekli EMİS kullanımının ikinci haftasında klinik olarak önemli pozitif gelişmeler olduğunu bildirmiştir. Çalışma sırasında ciddi olumsuz olayla karşılaşılmamıştır. ASCEND çalışması, birinci nesil bir cihazın (nikotin bulunduran sıvı ile ya da nikotinsiz sıvı ile) etkinliğini ve güvenliğini nikotin yamaları ile karşılaştırmak için tasarlanmış üç kollu, kontrollü, randomize, klinik bir çalışmadır. Buradaki üç çalışma grubunun hiçbirinde ciddi bir olumsuz olay olmadığı bildirilmiştir [84]. Kısa süreli *in-vivo* etkileri değerlendiren çalışmalarda kısa süreli kullanımın solunum fonksiyonu üzerindeki akut etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda spirometri bulguları belirtilmese de hava yolu direncinde artma ve nitrik oksit seviyelerinde ılımlı bir artış saptanmıştır [85, 86]. Sigara içimi sonrasında solunum fonksiyon testlerinde bozulma olduğu ancak, EMİS kullanımı sonrası solunum fonksiyonlarında herhangi bir değişiklik izlenmediği de bildirilmiştir [85, 86]. 11 mg/ml nikotin içeren çözeltinin bulunduğu EMİS kullanımı sonrası hemodinami ve sol ventrikül fonksiyonlarının değerlendirildiği çalışmalarda, diyastolik kan basıncında hafif bir yükselme saptanmıştır ancak diyastolik disfonksiyon saptanmamıştır [87]. Koroner arter kan akımının değerlendirildiği bir çalışmada ise EMİS kullanımının koroner arter akım rezervi üzerine herhangi bir etkisi bulunmamıştır [88]. Karbonmonoksit ve karboksihemoglobin düzeyleri hakkında ise çelişen yayınlar mevcuttur. Ancak güncel veriler bu parametrelerin EMİS kullanımı sonrası yükselmediğini göstermektedir [88, 89]. Lipoid pnömoni gelişimi ile ilgili endişeler ortaya çıksa da, bu patolojiyi yaratacak yağ bazlı sıvılar EMİS'lerde çözücü olarak kullanılmamaktadır. Ayrıca EMİS kullanımının beyaz kan hücresi sayımı üzerinde etkisi bulunamamıştır. Klinik çalışmaların hiçbirinde EMİS kullanımı ile ilişkili risk artışına kanıt olabilecek bulgular saptanmamıştır [61]. Pasif maruziyetinde değerlendirildiği çalışmalarda belirli organik ortam havasında belirli zararlı moleküllere rastlansa da bu moleküllerdeki artışın EMİS ile akut artmadığı ancak ortamda zaten var olan seviyenin ventilasyon sağlanmadığı için artmakta olduğu belirtilmiştir. EMİS kullanımı sonrası ortaya çıkan total organik karbon seviyeleri oldukça düşüktür. EMİS kullanımı ile ortaya çıkan aerosolün ortalama havada kalma süresi 11 saniyedir ve pasif maruziyete neden olması beklenmemektedir [61]. İnsanlar üzerinde pilot çalışmalar yakın

zamanda sonuçlanmaya başlamıştır. İnsan akciğerleri üzerinde EMİS buharının etkilerinin incelendiği yakın zamanda sonuçlanan çalışmada inflamatuvar sitokinlerde minimal yükselme saptanmasına rağmen mRNA ve microRNA gen ekspresyonunda değişim izlenmemiştir [20]. EMİS cihazlarında elektrik enerjisi, batarya kullanıldığından kazalar meydana gelebilmektedir. Ancak bu kaza sıklığı herhangi bir elektrikli aletten daha fazla değildir [61].

Yapılan çalışmaların sonuçlarını bilim ve tıp çevreleri farklı yorumlayabilmektedir. EMİS'ler ile ilgili endişeler ana başlıklar; nikotin alımı, parçacıklık maddeler, metal emisyonlar ve diğer toksinler olarak sıralanabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalıklar ve EMİS kullanımı arasındaki ilişki değerlendirilmiştir [90, 91]. Alzahrani ve arkadaşları yaptıkları çalışmada EMİS kullanımını miyokard enfarktüsü yaşama riski ile ilişkili olduğunu bulsa da bu çalışmanın dizaynı ve bulguları ile ilgili birçok tartışma vardır [91]. EMİS kullanımının kardiyovasküler hastalık riskinin artmasıyla ilişkili olduğuna dair kaygıları artırmıştır. Çalışmaların ortak noktası tütün sigaraların yanı sıra diğer risk faktörlerinin de risk için ayarlandığı analizlerde günlük e-sigara kullanımının, miyokard enfarktüsü riskinin artmasıyla ilişkili olduğudur. Ancak birçok araştırmacı tarafından bu bulgular ve sonuçların yorumlanması epidemiyolojik yanlış uygulama ve yanlış bilgilendirme olarak değerlendirilmiştir. Bu karşıt görüşlerin başlıca dayandığı husus risk artışının, bireyin öncelikle EMİS kullanımına maruz kalması ve sonrasında bu maruziyet nedeniyle hastalığın gelişmesi anlamına geldiği, ancak çalışma dizaynının bu bilgiyi sağlamadığı ile ilgilidir. Bahsi geçen çalışmalar kesitsel araştırmalardır ve EMİS kullanımının hastalığın gelişmesinden önce mi veya sonra mı başlatıldığına dair hiçbir bilgi sağlamamaktadır. Kalifornia- Los Angeles Üniversitesi'nden iki bilim adamı, yakın zamanda yayınlanan araştırmayla ilgili olarak, katılımcıların sadece % 10'unun kalp krizi geçirmeden önce EMİS kullananlar olarak yanlış sınıflandırılmaları durumunda, araştırmada belirtilen sonuçların belirgin şekilde değişeceğine dair görüşte bulunmuşlardır [92]. Çok yakın zamanda Journal of American College of Cardiology' de yayınlanan bir araştırma, bireylerin tütün sigarasını bırakıp EMİS kullanmaya başladıktan sonra vasküler fonksiyondaki iyileşmelerin 1 ay kadar erken bir sürede gözlemlendiğini belirtmiştir [93]. Bu iyileşme hem nikotin içeren hem de nikotin içermeyen EMİS kullananlar için benzerdir. Bu bulgu da nikotinin sigara ile ilişkili kardiyovasküler risk gelişiminde çok önemli olmadığını bir kez daha ortaya koymaktadır. Bu bulgu daha önce ağızda tutulan ancak yakılmadan tüketilen tütün ürünleri ile yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Çalışmadaki bir diğer bulgu

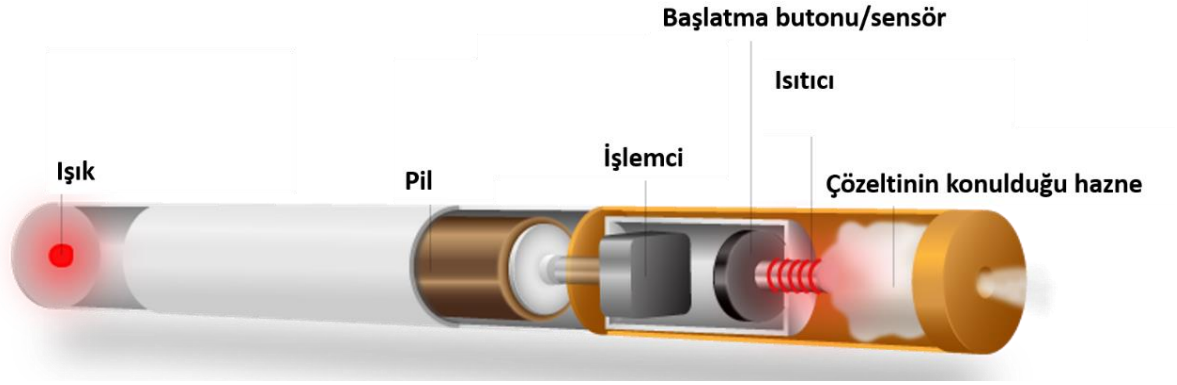
ise, sigarayı tamamen bırakmayan, ancak sigara tüketimini önemli ölçüde azaltanlarda bile kardiyovasküler fonksiyonlarında iyileşmeler gözlenmesidir. Bu, özellikle ikili kullanımın dahi faydası olduğunu göstermektedir. Çalışmada önemli prognostik belirteçlerden olan arteriyel sertlik ve endotel fonksiyonu ölçülmüştür [93]. Arteriyel sertlikte artma ve endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler hastalık gelişimi için yüksek risk oluşturur. Ancak bu bulgularla European Heart Journal'da yine çok yakın zamanda çıkan bir çalışmanın sonuçlarının çeliştiği söylenebilir [94]. Bu çalışmada araştırmacılar EMİS kullanımının artmış arter sertliği ve endotel fonksiyon bozukluğuna neden olduğunu belirmişlerdir. Ancak bu çalışma, EMİS kullanımı sonrasında birkaç dakika içerisinde arteriyel sertlik ve endotel fonksiyonundaki değişiklikleri değerlendiren birçok çalışmadan biri olarak dikkat çekmektedir. Yine de çalışmayla ilgili olarak Avrupa Kalp Cemiyeti tarafından etkileyici bir basın açıklaması yapılmıştır. Ancak, metodolojileri ve bulgularının prognostik değeri tartışmalıdır. Akut bir müdahaleden sonra yani bu çalışmada EMİS kullanımı sonrasında (özellikle nikotin maruziyeti sonrasında) ortaya çıkan etkilerin prognostik göstergeler kullanılması en önemli noktadır. Akut etkiler uzun dönem prognostik belirteçler olarak kullanılmamış ve onaylanmamıştır. İleriki yıllarda kalp hastalığı riskini arttırdığına ait yorumlar subjektif kalmaktadır. Aslında, değerlendirilen belirteçlerin ölçülmesindeki kullanılan ilkeler, kafein, nikotin ve alkol (hatta yiyecek) gibi uyarıcıların ölçümlerden birkaç saat önceye kadar tüketilmemesi gerektiğini belirtir. Karakteristik olarak, nikotin replasman tedavileri ve kafein, vasküler fonksiyon üzerinde hemen hemen aynı etkiye sahip olmasına karşın, gelecekte kalp hastalığı gelişimi için herhangi bir risk oluşturmazlar [61]. Özetle kanser riskinin azaltılmasındaki faydaların yanı sıra, çok kısa bir süre içerisinde vasküler fonksiyondaki iyileşmeyi gösteren önemli bir çalışma ortaya çıkmıştır. Ancak günümüzde EMİS hakkında her bilim adamının bir görüşü olduğu açıktır önemli nokta ise açık fikirli olarak ve önyargı ve yanlılıktan uzak durarak objektif olarak bulguların yorumlanmasıdır.

Son aylarda ortaya çıkan diğer bir endişe ise Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde izlenen akut akciğer hasarı vakalarıdır. ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından yürütülen araştırma ve yayınlanan son raporda ortaya çıkan bu salgının EMİS ile tetrahidrokannabinol kullanımı ve çözelti içerisinde bulunan E vitamini ile ilgili olduğu belirtilmiştir. İlk olarak, hastalığın klinik belirtisi lipoid pnömonidir ya da yağların solunmasına da atfedilen eozinofilik pnömonidir. Bu hastalık muhtemelen eksojen lipitlerin ya da diğer hidrokarbonların solunması ile gelişir. Geleneksel EMİS sıvıları (yani, aromalı

nikotin ya da nikotin olmayan sıvılar) suda çözünürdür. Bu nedenle, yağlara ihtiyaç yoktur ve çözücü olarak kullanılamaz; bunun yerine propilen glikol ve gliserol (alkol, poliol) çözücü olarak kullanılır. Buna karşılık, tetrahidrokannabinol lipidlerde çözünür ve ortak çözücüler ile çözünmesi zordur. Yasadışı tetrahidrokannabinol çözeltilerini hazırlamak amacıyla yüksek miktarda lipid çözücülerin kullanılması en görünür açıklamadır. E Vitamini, bütün vitamin takviyelerinde (sindirilen, solunmayan) yağlarda çözünen bir katkı maddesidir. EMİS sıvıları ise 10 yılı aşkın süredir dünyanın birçok ülkesinde milyonlarca kişi tarafından kullanılmaktadır ve ABD’ de izlenen salgına benzer bir vaka serisi izlenmemiştir. Sadece bir ülkeye sınırlı olan bu vakaların altında tetrahidrokannabinol yağlarının yasadışı satışı ve tüketimi yatmaktadır [95]. Tetrahidrokannabinol yağlarının inhalasyonunu sağlayan ancak çözücüsü farklı olan bu ürünlerin tüm EMİS ‘lere genellenmesi başlıca yanlışlığa yol açmaktadır.

Propilen glikol ve gliserol inhalasyonunun yakın zamanda fareler üzerinde yapılan çalışmalarda uzun vadede ciddi kronik akciğer iltihabı veya amfizem gelişimine neden olmadığı gösterilmiştir [96]. Ek olarak, 1930'larda ve 1940'larda, propilen glikol inhalasyonu üzerine geniş araştırmalar yapılmıştır bu araştırmaların başlıca yapılma nedeni propilen glikolün hem hayvanlarda hem de insanlarda antibakteriyel ve antiviral özelliklere sahip olduğunun bulunmasıdır [97, 98].

EMİS’ler tütün zararını azaltmada devrim niteliğinde bir üründür. Dumanı andıran buhar yaysalar da, yanma gerçekleşmemektedir. Hastalık sebebi olabileceğine dair şüpheler veya kanıtlar yoktur. Bahsi geçen özellikleri nedeniyle, EMİS'ler milyonlarca insanın bağımlılık nedeniyle oluşabilecek hastalıklarını engellemek ve mortaliteyi azaltmakta kullanılacak faydalı bir araç olabilir.



Resim 2.1. Elektronik madde aktarma sistemlerinin basit şeması

#### 2.1.4. İlaç veriliş yolu olarak kullanımı

Temel olarak, EMİS'ler pille çalışan kişisel buharlaştırıcılardır. Bu cihazlar arasında farklılıklar olsa da ortak fiziki prensip, bir çözeltinin ısıtılarak buharlaştırılıp, aerosol üretilmesi ve bunun kullanıcı tarafından solunmasıdır. Kısaca EMİS'ler termal aerosol üreten cihazlardır. Günümüzde yeni nesil EMİS'lerin, çok yüksek seviyede aerosol üretebildiği ve çözücü içerisindeki nikotini taşıyabilecekleri gösterilmiştir [7]. Küçük boyutlu aerosol partikülleri sayesinde sistemik uygulama için bir ilacı (yani nikotin) sağlamadaki etkinlikleri, kullanıcı dostu ve müşteri odaklı teknoloji geliştirme kapasiteleri EMİS cihazlarını klinik amaçlar için umut verici bir aerosol cihazı haline getirmektedir.

## 2.2. Pulmoner Fibrozis

İdiyopatik pulmoner fibrosis (İPF) terimi, 1900'lerin ortalarında tıbbi literatürde yer almaya başlamıştır.

### 2.2.1. Tanım

İlk başta klinisyenler ve radyologlar tarafından bilinmeyen nedenlerden kaynaklanan fibrozis ile ilerleyen pnömoniye atıfta bulunmak için kullanılmıştır. Bununla birlikte, şu anda idiyopatik interstisyel pnömoniler olarak tanıdığımız ve bağ dokusu bozuklukları veya fibrotik aşırı duyarlılık pnömonisi ile ilişkili interstisyel akciğer hastalığı gibi benzer klinik tabloları olan diğer benzer klinik sunu ve radyografik görünümleri olan farklı patolojiler de İPF vakaları olarak tanımlanmıştır [99–102]. Günümüzde tanım daha belirgin olarak

yapılmıştır. İPF; esasen yaşlı erişkinlerde ortaya çıkan, akciğerlerle sınırlı ve belirli histopatolojik ve/veya radyolojik patern ile ilişkili olan, bilinmeyen bir nedenden kaynaklanan, kronik, progresif fibrozis ile ilerleyen interstisyel pnömonilerin özel bir formu olarak tanımlanmaktadır. İPF tanımı, diğer idiyopatik interstisyel pnömonilerin ve çevresel maruziyetin, ilaç tedavisi veya sistemik hastalıklarla ilişkili interstisyel akciğer hastalıklarının tanımlarının dışlanmasını gerektirir. İnterstisyel akciğer hastalıkları, akciğerlerde yaygın, farklı derecelerde inflamasyon, fibrozis ile birlikte akciğer parankiminin yapısal bozulmasına neden olan akut veya kronik formları bulunan bir hastalık grubudur [99]. İnterstisyel akciğer hastalıkları tanımı birçok hastalığı kapsar. Genel sınıflaması dört ana başlık altında toplanabilir;

- a) Bilinen bir nedene (ilaç, mesleki maruziyet, çevresel maruziyet, kollajen doku hastalıkları vb.) bağlı olan interstisyel akciğer hastalıkları,
  - b) Granülomatöz interstisyel akciğer hastalıkları (hipersensitivite pnömonisi, sarkoidoz vb.),
  - c) İdiyopatik interstisyel pnömoniler,
  - d) Diğer interstisyel akciğer hastalıkları
- bu ana grupları oluşturur [101, 103, 104].

İdiyopatik interstisyel pnömoni sınıflaması ile ilgili çalışmalar 1969'da başlamıştır [105]. İdiyopatik interstisyel pnömoniler, respiratuar bronşiyolit ilişkili interstisyel akciğer hastalığı, nonspesifik interstisyel pnömoni, deskuamatif interstisyel pnömoni, kriptojenik organize pnömoni, akut interstisyel pnömoni, lenfositik interstisyel pnömoni, olağan interstisyel pnömoni, İPF olmak üzere yedi alt başlığa ayrılabilir. İPF, idiyopatik interstisyel pnömoniler arasında en sık izlenendir [99].

### 2.2.2. Epidemiyoloji

İPF; idiyopatik interstisyel pnömoniler içinde en sık olanıdır, ancak insidans ve prevalansı halen net olarak tanımlanamamıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde prevalansı ortalama olarak 35/100.000, Avrupa'da yaklaşık 20/100.000 dir. Hastalığın ortalama tanı konma yaşı 65 olup, erkek cinsiyette daha sık görülmektedir. Hastalığın tanısındaki zorluklar, yapılan tetkiklerdeki tanımlamaların farklılığı, hekimlerin farklı yaklaşımları tanı koyma sıklığını etkiyelebilir. Asya ve Güney Amerika'da insidansı daha düşük saptanmıştır, bunun nedeni

coğrafi farklılıklar olabileceği gibi bu bölgelerde hastalık hakkında yeterli bilgi düzeyinin bulunmaması olabilir. Hastalığın nadir görüldüğü düşünülse de çoğu solid organ kanseri ile benzer insidansa sahiptir [106–108]. Türkiye’de İPF sarkoidozdan sonra en sık ikinci interstisel akciğer hastalığıdır. İnsidansı 4.6/100.000 dir [109]. Cinsiyet ve yaş dağılımı değerlendirildiğinde, 50 yaş üstü erkeklerde en sık izlenen intersitisyel akciğer hastalığı İPF iken, 50 yaş üstü kadınlarda ise ikinci sıklıkta saptanan intersitisyel akciğer hastalığı olduğu bulunmuştur. İPF, mortalitesi ve morbiditesi yüksek bir hastalıktır. Ortalama yaşama süresi tanı konduktan sonra 2 ila 5 yıl arasında değişir. 5 yıllık mortalite oranı % 80’dir. İPF nedeni ölümlerin %60’ı solunum yetmezliği nedeni ile gerçekleşir [99]. Ülkemizde ise intersitisyel akciğer hastalıkları arasında sıklığı % 20 saptanmıştır [109].

### 2.2.3. Etiyoloji

İPF nedeni bilinmeyen hastalıklar arasında yer alsa da bazı muhtemel risk faktörleri araştırılmış ve tanımlanmıştır.

#### Tütün kullanımı

Birçok hastada sigara öyküsünün İPF gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir, sigara içimi ailesel ve sporadik İPF hastaları için majör risk faktörüdür. İPF hastalarının çoğunda nikotin bağımlılığı öyküsü mevcuttur. 20 paket/yıl üstü sigara içimi hastalığın sıklığını belirgin bir şekilde artırır. Deneysel pulmoner fibrozis modellerinde sigara ve bleomisin uygulanan deneklerin sadece bleomisin uygulanan deneklere göre daha yüksek miyofibroblast sayısına ve yaygın fibrotik lezyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Sigara dumanı alveolar epitel hücrelerinde belirli profibrotik genlerin aktivasyonuna ve TGF- $\beta$ 1 salgılamasına yol açar [110–112].

#### Çevresel maruziyet

Çok çeşitli çevresel ve mesleki etkenler İPF ile ilişkili bulunmuştur. Kurşuna, çeliğe, pirinç tozlarına, talaşa maruz kalanlarda, hayvancılık ile uğraşanlarda, kimyasal boya ve çözücülere maruz kalanlarda İPF gelişme riski normal topluma göre yüksektir. İPF hastalarının otopsislerinde lenf nodlarında inorganik partiküller saptanmıştır [111, 113–115].

### Mikrobiyal ajanlar

Mikrobik ajanların İPF etiyolojisindeki rolü oldukça fazla araştırılmış ancak tutarlı sonuçlar elde edilememiştir. Başlıca herpes virüslerin hastalığın başlamasında ve ilerlemesinde etkili olduğu düşünülmüş ancak birbiri ile çelişen bulgular ortaya çıkmıştır [116–118]. Ayrıca Epstein-Barr virüs proteinleri ve DNA'sı, İPF hastalarının akciğer endotellerinde saptanmıştır. Epstein-Barr virüs enfeksiyonlarının solunum fonksiyonlarında bozulmaya yol açarak İPF hastalarının takiplerinde önemli yer tutabileceği belirtilmiştir [119]. Hepatit C virüsü de İPF ile ilişkisi gösterilen başka bir mikrobik ajandır [120, 121]. Enfeksiyon etkenlerinin bakteriyel yükü (respiratuar mikrobiyom olarak da adlandırılan) içeren daha karmaşık bir etkileşim ile İPF hastalarında kötü prognozu öngörebileceği bildirilmiştir [122].

### Gastroözefageal reflü

Hastalık ciddiyeti ile asit veya alkalin reflü yoğunluğu arasında anlamlı bir korelasyon bulunamasa da İPF hastalarının çoğunda gastroözefageal reflü saptanmıştır. Miroaspirasyonlar ile asit veya alkalin içeriğin hastalığın gelişimi için bir risk faktörü olduğundan şüphelenilmektedir [123–126].

### Genetik faktörler

Hem sporadik hem de ailesel İPF gelişiminde genetik yatkınlık önemlidir. Olgularının yaklaşık %5'i aileseldir. Ailesel İPF'de otozomal dominant geçiş gösterdiği düşünülen mutasyonlar saptanmıştır [127]. Toplam 11 lokusta DNA metilasyonu ve transkripsiyonunda değişikliklerin olduğu karmaşık bir genetik hastalıktır [128, 129]. Aynı çevresel etkenlere maruz kalmış bireylerin hepsinde İPF gelişmemesi, farklı çevresel ortamlarda yetişen tek yumurta ikizlerinin İPF tanısı alması ve ailesel olguların olması İPF'nin genetik bir hastalık olduğunu gösteren bulgulardır. Ailesel İPF daha erken yaşlarda ortaya çıkar, aile bireyleri arasında histopatolojik tiplendirme farklılık gösterebilir [130, 131]. Sporadik İPF olgularında ise endoplazmik retikulum fonksiyonlarının bozulduğu [132, 133] ve akciğer dokusunun planlı hücre ölümüne daha yatkın ve duyarlı olabileceği düşünülmüştür. Yeterli kanıt sunulamasa da telomerlerin ve telomerase aktivitesinin de hastalık gelişiminde etkili olabileceği vurgulanmıştır [134–138]. Mevcut verilerin ışığı altında, genetik faktörlerin tek başına İPF gelişimi için yeterli olmadığı, ikincil bir etkenin de patofizyoloji de gerekli

olduğu görülmektedir. Ancak hangi çevresel faktörlerin, ne zaman ve hangi yollarla fibrotik süreci başlattığının aydınlatılması gerekmektedir [139, 140].

#### 2.2.4. Tanı

İPF'nin semptomları ve belirtileri genellikle hastalık ilerlemeden saptanamaz ve yavaş gelişir. Akut başlangıç nadirdir. En sık izlenen bulgular, nefes darlığı, kuru öksürük, bibaziler raller ve çomak parmağıdır. Genellikle yaşlı popülasyonu etkiler ve 50 yaş altında görülme sıklığı azdır. Dispne en belirgin bulgudur ve ilk olarak efor dispnesi izlenir. Hastalık ilerledikçe dinlenme sırasında da dispne ortaya çıkar. Dispne yakınmasının yanı sıra non-produktif öksürük de önemli bulgulardan bir tanesidir. İPF tanısının konulması için hastanın kliniği ve yakınmaları ek olarak hastalıkla uyumlu histopatolojik ve radyolojik bulgular da gereklidir. Amerikan Toraks Cemiyeti ve Avrupa Solunum Cemiyeti ortaklığı ile 2011 yılında İPF tanı ve tedavisi için bir kılavuz yayınlanmış [100], 2018 yılında bu kılavuzda güncelleme yapılmıştır [99].

Bu kılavuza göre İPF tanısı;

- İnterstisyel akciğer hastalığına sebep olabilecek nedenlerin dışlanması (bağ doku hastalığı, mesleki ve çevresel maruziyet, ilaç toksisitesi vb.)
- Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografide de İPF/olağan interstisyel pnömoni bulguları (cerrahi biyopsi uygulanmayan olgularda)
- Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi ve akciğer biyopsisi bulgularının özgül birlikteliği ile konmaktadır.

İPF tanısı klinik, histopatolojik ve radyolojik incelemeler gerektirir. Elde edilen bulgularda uyumluluk olması gerekir. Birçok bölümün (göğüs hastalıkları, patoloji, radyoloji) uzmanlarının birlikte çalışması ile tanı konulabilir. Radyolojik olarak ön-arka akciğer grafisi hastalığın ilk evrelerinde normal olabilir. Ek olarak periferik ve alt zonlarda yerleşen düzensiz çizgisel ve retiküler opasiteler ve buzlu cam opasiteleri görülebilir. Hastalığın ileri evrelerinde ise periferik ve alt zonlarda kaba retiküler ve retikülonodüler opasiteler izlenebilir. Son evre olan fibrozis gelişmesinde ise, azalmış akciğer volümleri, bal peteği görünümü kistler ve nadiren plevral effüzyonlar izlenebilir [99].

Olağan interstisyel pnömoni, İPF için özgül bir terim değildir. İPF dışında bağ dokusu hastalıkları, ilaç toksisitesi ve asbestozis gibi patolojilerde de izlenebilir. Haliyle radyolojik bulgular da bu hastalık grubunda benzer olabilir. Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografinin olağan interstisyel pnömoni tanısındaki başarısı yüksektir ve direk ön-arka akciğer grafilerine üstündür. Ancak yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografide normal bulgular izlenmesi İPF tanısını dışlamaz. Radyolojik bulgular genellikle klinik semptom ciddiyeti ile uyumlu değildir. Hastalığın ilerlemesi ile birlikte radyolojik bulgularda değişimler olur, öncelikle periferik ve alt zonlarda belirgin düzensiz çizgisel ve retiküler opasiteler, buzlu cam opasiteleri görülür. İleri evrede ise yine periferik ve alt zonlarda belirginleşen kaba retiküler ve retikülonodüler opasiteler izlenir. Son evrede, bal peteği görünümlü kistler, azalmış akciğer volümleri ve plevral effüzyon izlenir. Periferik ve subplevral akciğer alanlarında düzensiz çizgisel opasiteler; traksiyon bronşektazileri ve bal peteği görünümleri yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografinin tipik bulgusudur [99, 102, 103, 141].

Histopatolojik inceleme ile ön planda fibrozis değerlendirilir. İPF patogenizinde fibrozisle sonlanan yara iyileşmesi teorisi kabul edilmiştir. Yaralanmalara verilen artmış ve anormal yanıt nedeniyle hücre dışı matriks, fibroblast, miyofibroblast, makrofaj proliferasyonu artmıştır. Süreç sonucunda alveolar çökme ve fibrozis gelişir. Yoğun fibrozis ile akciğer yapısını yıkıcı skar veya bal peteği görünümü, tüm alanlarda baskın subplevral paraseptal fibrozis, fibrozis ile akciğer parankiminin düzensiz-yama tarzı tutulumu tipik bulgulardandır [142, 143].

İPF hastalarında vital kapasite azalmıştır. Rezidü hacim normal ya da düşük saptanabilir. Total akciğer kapasitesi azalmıştır. FEV<sub>1</sub> düşer, FEV<sub>1</sub>/FVC normal ya da hafif artmıştır. Karbonmonoksit difüzyon kapasitesi de azalmıştır. Hastalığın erken dönemlerinde ilk ve tek gözlenen değişiklik karbonmonoksit difüzyon kapasitesinde azalma olabilir [144–146].

### 2.2.5. Prognoz

İPF, en sık rastlanan fibrozis ile ilerleyen interstisyel pnömonidir ve bu hastalık grubu içerisinde en ölümcül olanıdır. Çoğu malignite türünden daha mortal seyreder. Tanı sonrası hastaların çoğu 2,4 ile 4,2 yıl arasında hayatını kaybeder. 5 yılın üzerinde sağkalım ancak % 20 vakada görülür. Klinik özellikler farklılık gösterebilir, kronik progresif ilerleyeceği gibi

ataklar halinde gelişen ve ataklar arası dengede seyreden vakalar gözlenebilir. Tanı konduğunda hastalığın hangi şekilde ilerleyeceğini önceden tahmin etmek zordur. Hızlı veya yavaş progresyon gösteren hastaların tedavi yaklaşımları farklılık göstermez. Ancak hastalık ile bilgi toplamak hastanın hayat kalitesini düzenleyek ipuçları sağlayabilir ya da akciğer nakli için hazırlık yapılmasına öncülük edebilir. Prognoz üzerinde etkili tanımlanmış bazı faktörler vardır. Hastalığın yaşlı popülasyonda daha mortal seyrettiğini vurgulayan çalışmalar olsa da genç yaşta tanı almış hastaların prognozlarının da kötü olduğu bilinmektedir. Cinsiyetin ve ırkın prognoz üzerine belirgin etkisi gösterilememiştir. Sigara içimi ve amfizem varlığı sağkalımı azaltan faktörlerdendir. Pulmoner hipertansiyon gelişimi prognozu oldukça etkiler. Bu durum hem semptomları kötüleştirir hem de sağ kalımı azaltan en önemli faktörlerdendir. Düşük vücut kitle indeksi ve çomak parmaklar da kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Bunun dışında solunum fonksiyon testleri ve 6 dakika yürüme testlerinde saptanan ileri bozukluklar kötü prognost göstergesidir [99, 147–149].

### 2.2.6. Tedavi

İPF tedavi edilemeyen ancak kontrol altında tutulabilen bir hastalıktır. Tedavi de kullanılan ilaçlar sınırlıdır. Akciğer nakli tedavi seçeneklerinin son basamağını oluşturur. Hastalığın şiddeti tedavi planlamasında önemli yer tutar. Hastalığın seyri çoğu zaman öngörülemmez, tedavi kararları hastaların tercihleri ve takip eden hekimlerin kararları doğrultusunda planlanması gerekir.

Oksijen tedavisi hastalar için günlük fonksiyonlarını sürdürmek, egzersiz toleransını artırmak ve pulmoner hipertansiyon gelişimini geciktirmek amacıyla kullanılır. Yaşam kalitesinde artış sağlar. İnfluenza ve pnömokok aşılarının hastalara uygulanması önerilir [99].

Hastalığın ileri evrelerinde öksürük ve dispne şiddeti arttığı için opiatlar ve solunum sıkıntısından kaynaklanan anksiyete için anksiyolitikler önerilebilir. Akciğer transplantasyonu [150, 151] genç ve ek hastalığı olmayan kliniği ağır ilerleyen hastalarda planlanmalıdır. Pulmoner rehabilitasyon İPF hastalarında yaşam kalitesini artıran ve önerilen bir tedavidir [152–157].

İPF için kullanılabilecek ilaçlar da sınırlıdır. Hastalığın patogenizinde otoimmün ve inflamatuvar bir sürecin olduğu düşünüldüğünden başlarda steroid ve immünsupresifler ve hatta sitotoksik ajanlar kullanılmıştır. Günümüzde hastalığın fibrozis ile ilerleyen bir patogeneze sahip olduğu gösterildiğinden bahsi geçen tedaviler artık kullanılmamaktadır. Fibrozis neden olan bu patogenezin durdurulması amacıyla fibroblastların miyelofibroblastlara dönüşüm basamağını ve dokuda birikimini hedefleyen pirfenidon ve nintedanib İPF hastalarında kullanılabilir [18, 158–165].

### **2.3. Bleomisin ile Pulmoner Fibrozis Modeli**

Hayvan modelleri uzun yıllardır kullanılmaktadır ve günümüzde translayonel tıp ve bilimin vazgeçilmez aşaması olmuşlardır.

#### **2.3.1. Tanım**

Fare ve sıçanlar, ucuz ve bakımı kolay olduklarından, insan organizmasına yüksek benzerlik gösterdiklerinden hayvan modellemelerinde en yaygın olarak kullanılan hayvanlardır [166]. İPF söz konusu olduğunda hastalığın modellenmesinde birkaç zorlukla karşılaşılmaktadır: İPF'nin kronik olan patofizyolojisinin, hayvan modelinde üretilmesi ve çoğaltılması zordur ve hastalığın nedeni hala bilinmediği için, henüz tam uygunluk gösteren bir akciğer hasarı tetikleyicisi yoktur. Buna rağmen, pulmoner fibroz için birçok hayvan modeli geliştirilmiştir ve bu modeller İPF'de yer alan süreçlerde kilit araçların tanımlanmasında hayati öneme sahiptir. Pulmoner fibrozisin modellenmesinde standart olarak kabul edilen en yaygın kullanılan ajan bleomisin [18, 166–171]. Bleomisin sülfat, streptomyces verticillustan izole edilen ve çeşitli kanserleri tedavi etmek için kullanılan bir antineoplastik / antibiyotik sitotoksik bir ilaçtır. DNA kırılmalarına neden olarak apoptozis tetikler. Bununla birlikte, bleomisin tedavisinin, akciğer gibi dokular üzerinde olumsuz etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu etkiler pulmoner yatakta fibrozis ile ilerlemektedir. Bahsi geçen yan etki fark edildikten sonra, İPF'in hayvan modeli için bleomisin kullanılmaya başlanmıştır. Bleomisin ile oluşturulan pulmoner fibrozis modelinde uygulamalar açısından çeşitli farklılıklar mevcuttur. Bleomisin bir kez ya da tekrarlayan dozlarda verilebilir. İlacın verilme yolu intravenöz, intraperitoneal, intratrakeal veya subkutan olabilir. En sık rastlanan uygulama yolu intratrakealdır ve inflamatuvar bir yanıtı yol açar [172]. İlk günlerde gün artmış epitelyal apoptozis, akut akciğer hasarı görülür. Bunu, iltihaplanmanın düzeldiği ve fibrozun

tespit edildiği bir geçiş dönemi izler. Fibrotik evre bleomisin uygulamasından üç hafta sonrasına kadar devam edebilir. 3 haftadan sonra genellikle iyileşme süreci başlamış olur. Bleomisin etkisi ile hücre dışı matriksin artması ve fibrozis bölgelerinin oluşması gerçekleşir. Bu süreden sonra, fibrozisin kendiliğinden düzelmesi ve minimal fibrozis ile neredeyse normal fizyolojik duruma geri dönüş izlenir [172].

Çalışmaların çoğunda, bleomisin tek bir intratrakeal uygulama ile verilmiştir. Fibrozis yaratmak için verilen doz da çalışmalar arası farklılık göstermektedir. 1 mg/kg -10 mg/kg arası dozlarda uygulama yapılmıştır [18, 22, 162, 166, 167, 169, 170, 172–175]. Doz yükseldikçe akut akciğer hasarına bağlı mortalite oranı artmaktadır. Bleomisin hayvan modeli, İPF patogenezi için incelemek için mevcut en iyi deneysel araç olmaya devam etmektedir. İPF'nin patofizyolojisi hakkında bilgiler sağlamaya devam etmekte ve yeni farmasötik bileşiklerin test edilmesini sağlamaktadır.

#### **2.4. Pirfenidon**

Pirfenidon, anti-fibrotik ve antiinflamatuvar etkilere sahip bir piridon türevidir ve idiyopatik pulmoner fibrozisin tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. 2008'de Japonya'da daha sonra Mart 2011'de Avrupa'da kullanımı onaylandı. Bu ülkeleri 2012'de Kanada ve 2014 yılında ABD izledi [12, 158, 159, 176].

Pirfenidon veya kimyasal isimlendirme ile 5-metil-1-fenil-2- (1 H) -piridon, kollajen ekspresyonunu, sentezini ve / veya birikimini hafifleterek ve inhibe ederek antifibrotik etki gösteren ve oral olarak kullanılan bir kimyasal moleküldür. Hücre dışı matriks proliferasyonu ve büyüme faktörlerinin ve prokollajen I ve II üretimini sağlayan hücreleri inhibe eder. Ek olarak, pirfenidonun bazı anti-enflamatuvar etkileri vardır ve oksidatif strese karşı korur. Pirfenidon, bleomisin kaynaklı pulmoner fibrozisin sıçan modelinde, antifibrotik etkinliği gösterildikten sonra, idiyopatik pulmoner fibroz, multipl skleroz, primer sklerozan kolanjit, kronik hepatit C gibi birçok bozukluğun tedavisinde klinik olarak değerlendirilmiştir [177–179]. Elde edilen en geniş klinik veriler pirfenidonun pulmoner fonksiyonu stabilize etmeye yardımcı olabileceği ile ilişkindir. Pirfenidonun etki mekanizması tam olarak anlaşılamamasına rağmen, hem anti-inflamatuvar hem de anti-fibrotik etkiler sergiler. İlacın antifibrotik etkisi üzerinde oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Pirfenidonun antifibrotik mekanizmasının önemli bir yönü, hem TGF- $\beta$  üretimini hem de

aktivitesini inhibe etmesiyle ilişkilidir. Pirfenidon tedavisinin, TGF- $\beta$  geni transkripsiyonunu % 33 oranında azalttığı belirtilmiştir [14]. Prokollajen I ve III genlerinin aşırı ekspresyonunu inhibe eder [22, 175, 180]. Ek olarak, pirfenidon, hücre dışı matris sentezinde ve yeniden şekillenmede önemli rol oynadığı düşünülen ısı şok proteinini pulmoner fibroblast tarafından ekspresyonunu inhibe eder. TNF- $\alpha$  ve interlökin-1 salınımında azalma ile yakından ilişkilidir [11, 19, 23, 181]. Antioksidan özellikleri halen araştırılmaktadır. Pirfenidon öncelikle karaciğer vasıtasıyla metabolize edilir. CYP1A2 eliminasyonun yarısından sorumludur. CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2D6 ise metabolizmada sınırlı rol oynar. Dahası, pirfenidonun farmakokinetiği ve metabolizması glomerüler filtrasyon hızındaki azalmış veya son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda tam olarak değerlendirilmemiştir [24, 177, 182–186]. Bu nedenle azalan veya minimum GFR'li hastalarda uzun süreli etkinlik ve güvenlik bilinmemektedir. Pirfenidon, oral yoldan verildikten sonra 1-2 saat içinde hızla absorbe edilir ve  $2.1 \pm 0.4$  saatlik yarılanma ömrü ile plazmadan temizlenir. İlaç, plazma proteinlerine, özellikle de albümine yaklaşık % 60 oranında bağlanır [177–179]. İlaç hepatik CYP1A2 enzim sistemi tarafından metabolize edilir. Uygulanan dozun hemen hemen % 80'i 24 saat içinde idrarla atılır. Kararlı doz durumu, günde üç kez 400 mg ile üçüncü gün elde edilebilir. Cinsiyetin farmakokinetik üzerine hiçbir etkisi yoktur. Meksika'da hipertrofik skar ve fibrotik dokunun tedavisi için bir jel formu da onaylanmıştır ve cilt ülserlerinin tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır [187].

Pirfenidon, sıklıkla dispepsi, bulantı, gastrit, gastroözofageal reflü hastalığı ve kusma gibi gastrointestinal yan etkiler ile ilişkilidir. Bu reaksiyonların ciddiyetini azaltmak için, pirfenidon, yemeklerden sonra alınmalıdır. Işığa duyarlılık reaksiyonlarına, döküntü, kaşıntı ve kuru cilde neden olduğu bilinmektedir. Hastalara genellikle güneş lambaları dâhil güneş ışığına doğrudan maruz kalmamaları ve koruyucu kıyafetler ve güneş koruyucu maddeler kullanmaları önerilir [177–179]. Devam eden ışığa duyarlılık reaksiyonları genellikle lokal semptomatik tedavi ile birlikte gerektiğinde doz ayarlaması ve gerekirse tedavinin geçici olarak kesilmesi ile yönetilir. Pirfenidon, hepatik enzim seviyelerini, özellikle aspartat transaminaz, alanin transaminaz ve gama-glutamil transpeptidaz seviyelerini artırabilir, tedavi süresince hepatik enzim seviyelerinin periyodik olarak izlenmesi gereklidir [24, 25, 177, 182, 183, 185, 186, 188].

Karaciğer yetmezliği olan hastalarda ve bir CYP1A2 inhibitörü etkiye sahip ajan kullanan kişilerde ilacı reçete ederken ekstra önlem alınması gerekir. İlaç, şiddetli karaciğer

yetmezliği olan hastalarda kontrendikedir. Pirfenidon tedavisi alan hastalarda baş dönmesi ve yorgunluk da bildirilmiştir. Genellikle hafif seyreder, şiddetli ise doz ayarlaması veya tedavinin kesilmesi gerekebilir. İlaç etkileşimlerinin çoğuna çeşitli sitokrom P450 enzimleri aracılık eder. Pirfenidon, CYP1A2 yolağı ile metabolize edildiğinden, bu enzimi inhibe eden herhangi bir ilacın, pirfenidonun toksisitesini artırması muhtemeldir: Fluvoxamine, pirfenidon tedavisi alan hastalarda kontrendikedir. Siprofloksasin, amiodaron ve propafenon gibi diğer CYP1A2 inhibitörleri dikkatli kullanılmalıdır. Sigara işilmesi, CYP1A2'yi indükleyerek pirfenidonun metabolizmasını hızlandırır ve etkisini azaltır. Hastalara pirfenidon tedavisi sırasında sigara işmekten kaşınmaları önerilmelidir [18, 182, 183, 188, 189].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. *İn-vitro* Deneyler

EMİS'ler ile pirfenidon sürüklenebilirliğinin incelenmesi, taşınabilirlik oranının tespiti, sürüklenen pirfenidon miktarının belirlenmesi, yanma ürünü oluşmadığının gösterilmesi amacı ile *in-vitro* testler gerçekleştirilmiştir. Deneylerde Joyetech Cubis Atomizer ve eVic batarya kullanılmıştır.

##### 3.1.1. Validasyonu Yapılan Analitik Metot

Bu validasyonun amacı; pirfenidon inhaler bitmiş ürünü miktar tayini analiz metodunun Uluslararası İnsani İlaç Kullanımına İlişkin Teknik Gereklilikleri Uyumlaştırma Konseyi (ICH) kılavuzu ve farmakopelere göre doğru ve güvenilir sonuçlar verdiğinin belirlenmesi ve metodun uygulanabilirliğinin kanıtlanması amacıyla analitik metot validasyonunun yapılmasını sağlamaktır. Pirfenidon İnhaler bitmiş ürünü Miktar Tayini Analitik Metot Validasyonu için Ali Raif İlaç Sanayi Ar-Ge Laboratuvarında ICH kılavuzu ve farmakopelere göre detaylı bir analitik metot validasyon çalışması yapılmıştır.

Metodun; özgüllük, doğrusalılık, aralık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve çözelti stabilitesi parametrelerinin kontrolleri yapılmıştır. Elde edilen bütün veriler kabul kriterleri dâhilindedir. Bu da, metodun Pirfenidon İnhaler bitmiş ürünü miktar tayini analizinde başarı ile uygulanabileceğini göstermektedir.

##### Analitik metot tanımı ve prensibi

Pirfenidon İnhaler bitmiş ürününün yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirilen miktar tayini analizinin metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.

##### Analitik metot şartları

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ekipman parametreleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ekipman parametreleri

|                          |                                                                          |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Kullanılan Standart      | Pirfenidon Çalışma Standardı                                             |
| Kullanılan Reaktifler    | Trietilamin<br>Orto-fosforik asit (%85'lik)<br>Metanol<br>Asetonitril    |
| Cihaz                    | Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK)                               |
| Dedektör                 | UV-VIS                                                                   |
| Kolon                    | PurospherSTAR RP-8 endcapped endcapped<br>250 x 4.6mm 5.0µ veya eşdeğeri |
| Dalga Boyu               | 220 nm                                                                   |
| Akış Hızı                | 1.0 ml/dk.                                                               |
| Enjeksiyon Hacmi         | 50 µl                                                                    |
| Kolon Sıcaklığı          | 40 °C                                                                    |
| Otoörnekleyici Sıcaklığı | 25 °C                                                                    |
| Enjeksiyon Süresi        | 20 dakika (izokritik sistem)                                             |
| Filtre                   | 0.45 µm PET                                                              |

Çözeltilerin hazırlanışı

Seyreltik orto-fosforik asit çözeltisinin hazırlanışı: 20 ml %85'lik orto-fosforik asit 100 ml'lik balon jojeye alınıp, hacmine distile su ile tamamlanmıştır.

Tampon çözeltisinin hazırlanışı: 0.9 ml trietilamin 650 ml distile su üzerine eklenip, iyice karıştırılmıştır. Seyreltik orto-fosforik asit ile pH'ı  $3.0 \pm 0.05$  olarak ayarlanmıştır.

Hareketli faz çözeltisinin hazırlanışı: Tampon çözeltisi, metanol ve asetonitril 650:130:220 (h/h/h) oranlarında karıştırılıp yüksek vakumlu membran fitreden süzülmüştür.

Seyreltme çözeltisi-1: Hareketli faz çözeltisi seyreltme çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Seyreltme çözeltisi-2: Saf propilenglikol kullanılmıştır.

Standart çözeltisinin hazırlanışı: 50.0 mg Pirfenidon çalışma standardı 25 ml'lik balon jojeye alınıp, seyreltme çözeltisi-1 ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik

karıştırıcıda karıştırılmış ve bu çözeltiden 1 ml alınarak 20 ml'lik balon jojeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile tamamlanıp 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülerek viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Numune çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlamak için 1000 mg Pirfenidon 10 ml'lik balon jojeye tartılmıştır. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi-2 ilave edilmiştir. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilip çözülmesi sağlanmıştır. Hacmine seyreltme çözeltisi-2 ile tamamlanmış ve bu çözeltiden alınan örnekler Çizelge 3.2'de belirtilen konsantrasyondaki çözeltiler Çizelge 3.3'te verilen atomizer parametrelerinde EMİS ile sürüklenmiştir. 3 saniye içerisinde (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5) 60 ml buhar (Çizelge 3.6) çekilip ve yoğunlaştırılmıştır. 5 ml seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilip, 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir.

Çizelge 3.2. Pirfenidon çözelti konsantrasyonları

| Çözelti Adı | Çözelti Konsantrasyonu |
|-------------|------------------------|
| Çözelti A   | 2mg/ml                 |
| Çözelti B   | 4mg/ml                 |
| Çözelti C   | 8mg/ml                 |
| Çözelti D   | 25mg/ml                |
| Çözelti E   | 50mg/ml                |
| Çözelti F   | 100mg/ml               |

Çizelge 3.3. Atomizer parametreleri

| Çözelti Adı | Parametreler      |
|-------------|-------------------|
| Çözelti A   | 8-10-12 Watt (3s) |
| Çözelti B   | 8-10-12 Watt (3s) |
| Çözelti C   | 8-10-12 Watt (3s) |
| Çözelti D   | 8-10-12 Watt (3s) |
| Çözelti E   | 8-10-12 Watt (3s) |
| Çözelti F   | 8-10-12 Watt (3s) |

Çizelge 3.4. Toplanan çözelti miktarı

|                                |                                                                         |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Puf Sayısı                     | 60 ml aerosol çekilerek, yoğunlaştırma sonrası 0.5 ml için yeterli sayı |
| Puf Süresi                     | 3sn                                                                     |
| Toplam Sıvı Miktarı (ml)       | 0.5 ml                                                                  |
| 2 Puf Arasında Geçen Süre (sn) | 30                                                                      |

Çizelge 3.5. Toplanan kör çözelti miktarları

|                                |                                                                         |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Puf Sayısı                     | 60 ml aerosol çekilerek, yoğunlaştırma sonrası 0.5 ml için yeterli sayı |
| Puf Süresi                     | 3sn                                                                     |
| Toplam Sıvı Miktarı (ml)       | 0.5 ml                                                                  |
| 2 Puf Arasında Geçen Süre (sn) | 30                                                                      |

Çizelge 3.6. Çekilen buhar hacmi

|               |      |
|---------------|------|
| Çözelti A     | 60ml |
| Çözelti B     | 60ml |
| Çözelti C     | 60ml |
| Çözelti D     | 60ml |
| Çözelti E     | 60ml |
| Çözelti F     | 60ml |
| Kör Çözeltisi | 60ml |

60 ml’lık aerosol için en yüksek konsantrasyon 100 mg/ml 12 Watt (3s) koşullarında elde edildiğinden ve farmakolojik deneylerde kullanılmasına karar verilen 100 mg/ml çözelti üzerinden analitik metot validasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

#### *Prosedür*

Seyreltme çözeltisi enjeksiyonu ile başlangıç seviyesi ve basınç dengelenmeye çalışılmıştır. Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılmıştır. İki adet standart çözeltisi hazırlanıp standart-1 çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılmıştır. Standart-2 çözeltisinden 2 enjeksiyon yapılmıştır. 3 adet numune çözeltisi hazırlanmış ve her birinden

2 enjeksiyon yapılmıştır. Yapılan enjeksiyonların kromatogramları kaydedilmiştir. 6 adet numune çözeltisi enjeksiyonları ardından standart-1 çözeltisinden 1'er kez kontrol enjeksiyon yapılmıştır. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması ve göreceli standart sapması hesaplanmıştır.

#### *Kabul kriterleri*

- Standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardaki Pirfenidon pikine ait alanların % göreceli standart sapma (GSS) değeri 1.5'den büyük olmamalıdır.
- Standart-1 ve standart-2 çözeltilerinden elde edilen Pirfenidon pik alanları ortalamaları arasındaki uyum % 98.0 - % 102.0 aralığında olmalıdır.
- Standart çözeltisi kromatogramındaki Pirfenidon pikinin teorik plaka sayısı 5000'den küçük olmamalıdır.

Standart ve numune çözeltilerinin çözelti stabilitesi aşağıda belirtildiği gibidir:

- Pirfenidon standart çözeltisi, oda sıcaklığı (25°C) koşulunda 48 saat boyunca stabildir.
- Numune çözeltisi, oda sıcaklığı (25°C) koşulunda 48 saat boyunca stabildir.

#### Hesaplama

$$\text{60 ml Buharda Bulunan Miktar (mg)} = [(C_s \times A_N \times P) / A_s] \times 5$$

( $A_N$ : Numune kromatogramındaki pirfenidon pikinin alanı,  $A_s$ : Standart kromatogramındaki pirfenidon pikinin alanı,  $C_s$ : Standardın tartımı (mg),  $P$ : Standardın potensi (as-is), 5: Yoğunlaşan buharın seyreltildiği hacim (ml))

$$\text{Sabit Hacimdeki Pirfenidon Yüzdesi (\%)} = (A_N \times C_s \times P) / (A_s \times C_N) \times 100$$

( $A_N$ : Numune kromatogramındaki pirfenidon pikinin alanı,  $A_s$ : Standart kromatogramındaki pirfenidon pikinin alanı,  $C_s$ : Standardın tartımı (mg),  $P$ : Standardın potensi (as-is)).  
Analizler sırasında bulunan bütün sonuçlar mg ve % sonuç cinsinden ifade edilmiştir.

### 3.1.2. Validasyon Çalışmasında Kullanılan Ekipman, Ürün, Standart ve Reaktifler

Validasyon çalışmasında kullanılan ekipmanlar Çizelge 3.7’de, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kolon bilgileri Çizelge 3.8’de, standartlar Çizelge 3.9’da ve reaktifler Çizelge 3.10’da verilmiştir. Pirfenidon İnhaler bitmiş ürünü miktar tayini analitik metot validasyon çalışmasında PAIN2-Y-01 seri numaralı ürün kullanılmıştır.

Çizelge 3.7. Kullanılan ekipmanlar

| Ekipman Adı                                                | Kalibrasyon Tarihi | Kalibrasyon Yenileme Tarihi |
|------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Mettler Toledo MT Analitik Terazı                          | 17.03.2018         | 17.09.2018                  |
| Waters Acquity Arc Sıvı Kromatografi Sistemi               | 26.08.2018         | 26.08.2019                  |
| Heidolph MR 3001 K Standart Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı | Kalibrasyon dışı   | Kalibrasyon dışı            |
| Bandelin Sonorex RK 510 Ultrasonik Banyo                   | Kalibrasyon dışı   | Kalibrasyon dışı            |

Çizelge 3.8. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kolon bilgileri

| Kolon Adı                    | Üretici Firma | Seri No. | Lot No.    | Kolon Boyutları                               |
|------------------------------|---------------|----------|------------|-----------------------------------------------|
| PurospherSTAR RP-8 endcapped | Merck         | 552565   | HX58040654 | PurospherSTAR RP-8 endcapped 250 x 4.6mm 5.0µ |
| PurospherSTAR RP-8 endcapped | Merck         | 621926   | HX68985254 | PurospherSTAR RP-8 endcapped 250 x 4.6mm 5.0µ |

Çizelge 3.9. Standartlar

| Standart Adı                       | Üretici | Lot No.   | Safılık (%)<br>(as is) | Son Kullanma<br>Tarihi | Saklama<br>Koşulu |
|------------------------------------|---------|-----------|------------------------|------------------------|-------------------|
| Pirfenidon<br>Çalışma<br>Standartı | Honour  | PF0010316 | 99.5                   | 06/2019                | 25°C-ODA<br>ŞARTI |

Çizelge 3.10. Reaktifler

| Reaktif adı                 | Üretici   | Reaktif kodu | Lot No.      | Son<br>Kullanma<br>Tarihi | Saklama<br>Koşulu |
|-----------------------------|-----------|--------------|--------------|---------------------------|-------------------|
| Trietilamin                 | Merck     | 8.08352.2500 | S7047452525  | 30.04.2020                | Oda koşulu        |
| Metanol                     | Merck     | 1.06035.2500 | 1616110009   | 08.2018                   | Oda koşulu        |
| %85'lik<br>Fosforik<br>Asit | Merck     | 1.00284.2500 | K45327063407 | 01.2019                   | Oda koşulu        |
| Asetonitril                 | J.T Baker | 9017         | 1427608002   | 11.2019                   | Oda koşulu        |

### 3.1.3. Valide Edilen Parametreler

#### Özgüllük

Özgüllük, safsızlık ve/veya yardımcı madde içeren karışımdan test edilen maddenin özgül olarak tayin edilebilmesidir. Bir analitik metodun özgüllüğü, etken madde veya bitmiş ürün içerisindeki analiz edilecek maddenin sinyalinin; safsızlık, yardımcı madde ve kullanılan çözelti sinyalleri ile girişim yapıp/yapmadığının kontrolü ile belirlenmiştir.

#### *DeneySEL açıklamalar*

Seyreltik orto-fosforik asit çözeltisinin hazırlanışı: 20 ml %85'lik orto-fosforik asit 100 ml'lik balon jojeye alınıp, hacmine distile su ile tamamlanmıştır.

Tampon çözeltisinin hazırlanışı: 0.9 ml trietilamin 650 ml distile su üzerine eklenip, iyice karıştırılmıştır. Seyreltik orto-fosforik asit ile pH'ı  $3.0 \pm 0.05$  olarak ayarlanmıştır.

Hareketli faz çözeltisinin hazırlanışı: Tampon çözeltisi, metanol ve asetonitril 650:130:220 (h/h/h) oranlarında karıştırılıp yüksek vakumlu membran filtreden süzölmüştür.

Seyreltme çözeltisi-1: Hareketli faz çözeltisi seyreltme çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Seyreltme çözeltisi-2: Saf propilenglikol kullanılmıştır.

Standart çözeltisinin hazırlanışı: 50.0 mg Pirfenidon çalışma standardı 25 ml'lik balon jojeye alınıp, seyreltme çözeltisi-1 ile çözölüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve bu çözeltiden 1 ml alınarak 20 ml'lik balon jojeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile tamamlanıp 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzölerek viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Numune çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlamak için 1000 mg Pirfenidon 10 ml'lik balon jojeye tartılmıştır. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi-2 ilave edilmiştir. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilip çözölmesi sağlanmıştır. Hacmine seyreltme çözeltisi-2 ile tamamlanmış ve bu çözeltiden alınan örnekler Çizelge 3.2'de belirtilen konsantrasyondaki çözeltiler Çizelge 3.3'te verilen atomizer parametrelerinde EMİS ile süröklenmiştir. 3 saniye içerisinde (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5) 60 ml buhar (Çizelge 3.6) çekilip ve yoğunlaştırılmıştır. 5 ml seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilip, 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzölüp, viallenmiştir.

Kör çözeltisinin hazırlanışı: Seyreltme çözeltisi-2 Elektronik Device de süröklenir. 3 saniye içerisinde 60 ml buhar çekilir ve yoğunlaştırılır. 5 ml seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilir. 0.45 µm PET filtreden süzölür, viallenir.

Prosedür olarak seyreltme çözeltisi enjeksiyonu ile başlangıç seviyesi ve basınç dengelenmeye çalışılmıştır. Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılmıştır. Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisi-2'den 1 enjeksiyon yapılmıştır. Daha sonra kör çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılmıştır. Standart çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılmıştır. Numune çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılmıştır. Kromatogramlardaki etken maddenin alıkonma zamanı, alanı, saflık açısı ve saflık eşik değeri raporlanmıştır.

Kabul kriterleri aşağıda verilmiştir;

- Hareketli faz çözeltisi ve seyreltme çözeltisi kromatogramlarından elde edilen pikler ile Pirfenidon piki arasında bir girişim olmamalıdır.
- Pirfenidon piki için pik saflığı açısı pik saflığı eşiğinden küçük olmalıdır. Kabul kriterlerinin sağlanıp sağlanmadığının değerlendirildiği pirfenidon özgüllük çalışması sonuçları Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Pirfenidon özgüllük çalışması sonuçları

| Bileşenler                           | Alıkonma Zamanı (RT) | Göreceli Alıkonma Zamanı (RRT) | Alan     | Saflık Açısı | Saflık Eşik Değeri |
|--------------------------------------|----------------------|--------------------------------|----------|--------------|--------------------|
| Seyreltme Çözeltisi-1                | -                    | -                              | -        | -            | -                  |
| Seyreltme Çözeltisi-2                | -                    | -                              | -        | -            | -                  |
| Kör Çözeltisi                        | -                    | -                              | -        | -            | -                  |
| Standart Çözeltisi                   | 10.256               | 1.00                           | 17724968 | 0.219        | 0.412              |
| Numune Çözeltisi (100 mg/ml)-12 watt | 10.460               | 1.02                           | 2452417  | 0.073        | 0.270              |

Pirfenidon piki, hareketli faz çözeltisi ve seyreltme çözeltisinden gelen herhangi bir pik ile girişim yapmadığı, pirfenidon pik saflığı açısı pik saflığı eşiğinden küçük olarak olduğu saptanmıştır. Sonuçlar kabul kriterlerini sağlamıştır.

#### Doğrusallık

Doğrusallık; belirlenmiş olan konsantrasyon aralığında, çözelti konsantrasyonu ile ölçülen cevaplar arasındaki lineerlik ilişkisidir.

### Deneysel açıklamalar

Doğrusallık stok çözeltisinin hazırlanışı: 20.0 mg Pirfenidon çalışma standardı 20 ml'lik balon jojeye alınıp, seyreltme çözeltisi ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır ( $C_{\text{Pirfenidon}} = 1 \text{ mg/ml}$ ).

%150 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 7.5 ml alınıp 50 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}} = 0.15 \text{ mg/ml}$ ).

%120 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 12.0 ml alınıp 100 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm 45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}} = 0.12 \text{ mg/ml}$ ).

%100 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 5,0 ml alınıp 50 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}} = 0.10 \text{ mg/ml}$ ).

%80 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 8 ml alınıp 100 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}} = 0.08 \text{ mg/ml}$ ).

%60 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 6 ml alınıp 100 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}} = 0.06 \text{ mg/ml}$ ).

%50 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 2,5 ml alınıp 50 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}} = 0.05 \text{ mg/ml}$ ).

%30 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 3 ml alınıp 100 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}=0.03 \text{ mg/ml}$ ).

%10 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 1 ml alınıp 100 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}=0.010 \text{ mg/ml}$ ).

%5 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 1 ml alınıp 200 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}=0.005 \text{ mg/ml}$ ).

%1 Doğrusallık çözeltisinin hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 2 ml alınıp ve 100 ml'lik balon joje içerisine aktarılmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1 ml alınıp 10 ml'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır. Hareketli faz çözeltisi ile hacmine tamamlanıp 30 sn. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}=0.0010 \text{ mg/ml}$ ).

Enjeksiyon Hacmi Doğrusallığı: Enjeksiyon hacmi doğrusallığı için % 150 doğrusallık çözeltisinden sırasıyla 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl ve 50 µl olacak şekilde enjeksiyonlar yapılmıştır.

Çalışmanın prosedürü aşağıda verilmiştir.

- Seyreltme çözeltisi enjeksiyonu ile baseline ve basınç dengelenmeye çalışılır.
- Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılır.
- %150 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.
- %120 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.
- %100 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.
- %80 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.
- %60 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.

- %50 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.
- %30 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.
- %10 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.
- %5 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.
- %1 Doğrusallık Çözeltisinden 3 enjeksiyon yapılır.
- Enjeksiyon hacmi doğrusallık çalışması için her hacimden 1 enjeksiyon yapılır.
- Her bir standardın kendi içinde konsantrasyonlara karşı sinyallerin grafiği çizilir ve oluşan doğrunun denklemi tayin edilir.
- Eğim, y-kesim noktası, korelasyon katsayısı raporlanır.

Hesaplamalar için % Y-kesim noktası:  $[Y_{\text{kesim noktası}} / (\%100 \text{ seviyesindeki alan})] \times 100$  formülü kullanılmıştır.

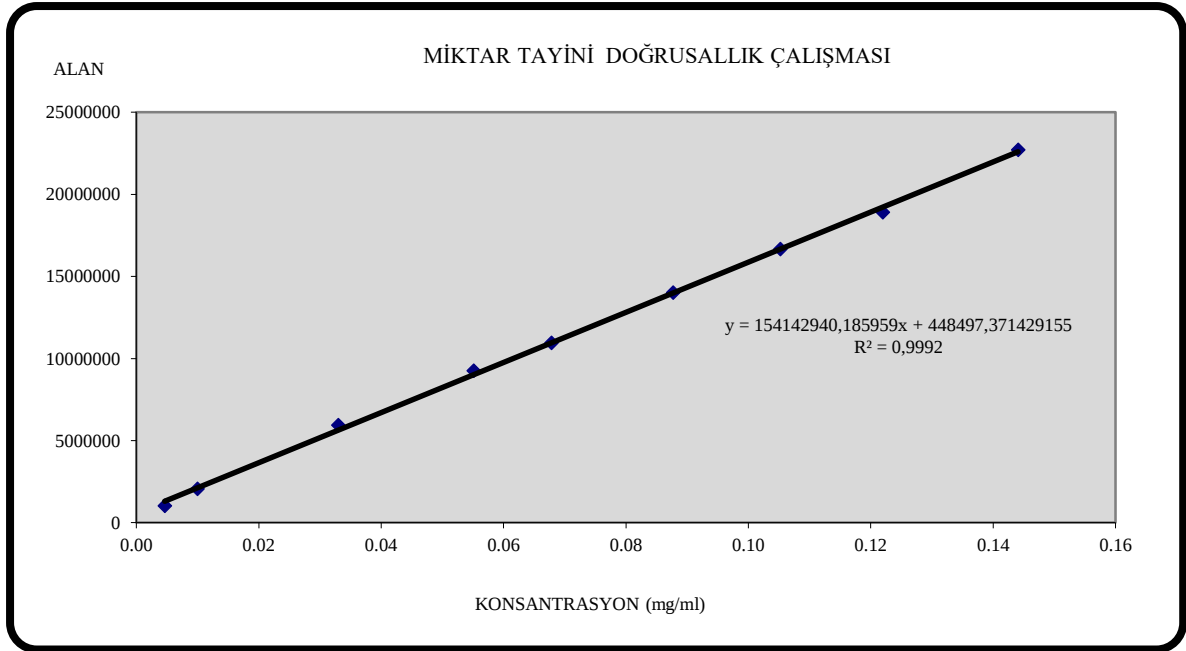
Deneyler için kabul kriterleri aşağıda verilmiştir;

- Korelasyon katsayısı  $R^2 \geq 0.998$  olmalıdır.
- % Y-kesim noktası kriteri % 3.0'den az olmalıdır.

Pirfenidon miktar tayini doğrusallık çalışması sonuçları Çizelge 3.12'de, enjeksiyon hacmi doğrusallık çalışması sonuçları Çizelge 3.13'te verilmiştir.

Çizelge 3.12. Pirfenidon doğrusallık çalışması sonuçları

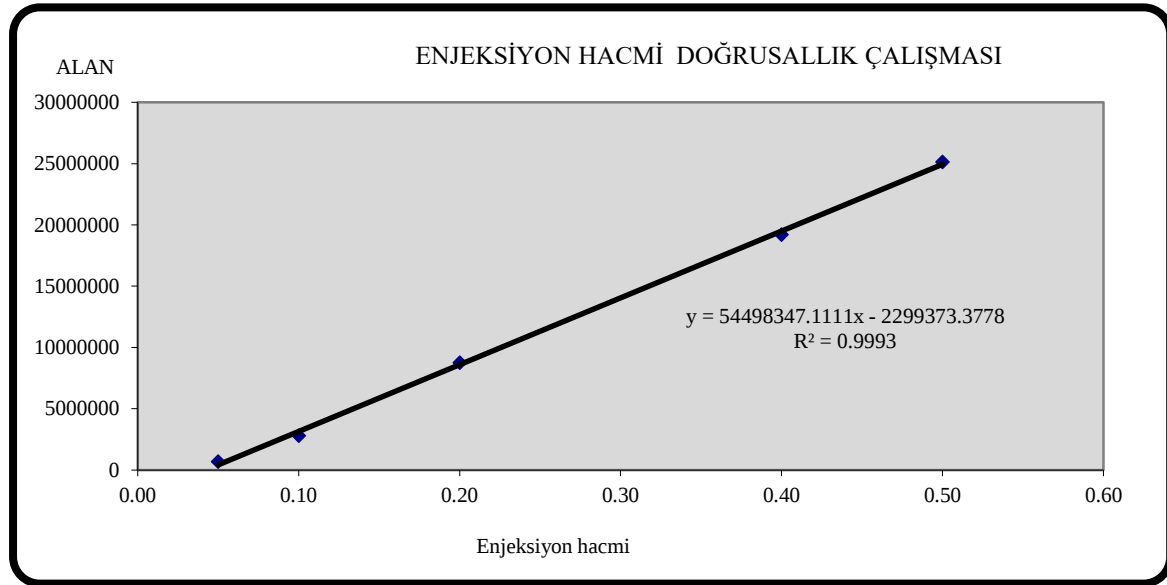
| Standart Konsantrasyonu (%) | Standart Konsantrasyonu (mg/ml) | Ortalama Alan | Hesaplanan Alan | Std. Sapma | % GSS | Kesim Noktası Kriteri |
|-----------------------------|---------------------------------|---------------|-----------------|------------|-------|-----------------------|
| % 1                         | 0.001                           | 204578        | 604952          | 601        | 0.29  |                       |
| % 5                         | 0.005                           | 1031527       | 1451617         | 5859       | 0.57  |                       |
| % 10                        | 0.010                           | 2057116       | 2261049         | 18769      | 0.91  |                       |
| % 30                        | 0.033                           | 5942999       | 5738355         | 66576      | 1.12  |                       |
| % 50                        | 0.055                           | 9258916       | 9081134         | 55831      | 0.60  |                       |
| % 60                        | 0.068                           | 10945379      | 11005329        | 123703     | 1.13  |                       |
| % 80                        | 0.088                           | 13999646      | 14005744        | 183883     | 1.31  |                       |
| % 100                       | 0.105                           | 16658482      | 16653969        | 58077      | 0.35  | 2.69                  |
| % 120                       | 0.122                           | 18897676      | 19190339        | 217021     | 1.15  |                       |
| % 150                       | 0.144                           | 22705799      | 22530095        | 339156     | 1.49  |                       |



Şekil 3.1. Pirfenidon miktar tayini doğrusallık çalışması grafiği

Çizelge 3.13. Enjeksiyon hacmi doğrusallık çalışması sonuçları

| Enj. Hacmi (µl) | Standart Konsantrasyonu (mg/ml) | Ortalama Alan | Hesaplanan Alan | Std. Sapma | % GSS    |
|-----------------|---------------------------------|---------------|-----------------|------------|----------|
| 5               | 0.144                           | 685605        | 651524          | 95.03      | 685605   |
| 10              | 0.144                           | 2805203       | 498925          | 17.79      | 2805203  |
| 20              | 0.144                           | 8760164       | 112314          | 1.28       | 8760164  |
| 40              | 0.144                           | 19231122      | 156178          | 0.81       | 19231122 |
| 50              | 0.144                           | 25143974      | 241805          | 0.96       | 25143974 |



Şekil 3.2. Enjeksiyon hacmi doğrusallık çalışması grafiği

Sonuçlar değerlendirildiğinde, pirfenidon doğrusallık korelasyon katsayısının  $R^2=0.9992$  olduğu, pirfenidon doğrusallık % Y-kesim noktası kriterinin % 2.69 olduğu, enjeksiyon hacmi doğrusallık korelasyon katsayısının  $R^2=0.9993$  olduğu saptanmıştır ve sonuçlar kabul kriterlerini sağlamaktadır.

#### Aralık

Analitik test metodunun doğru, kesin ve lineer sonuç verdiği alt ve üst konsantrasyon aralığıdır. Bir analitik yöntemin aralığı doğrusallık çalışmalarında oluşturulur. Uygun

doğrusallık, doğruluk ve kesinliğe sahip bir metotla tayin edilen bileşenin alt ve üst konsantrasyonları arasındaki aralık olarak tarif edilir.

Kabul kriterleri, doğrusallık ve doğruluk çalışmasında belirlenen aralık değeri kabul edilmiştir. Miktar tayini analizi doğrusallık parametresinde % 1 - % 150 konsantrasyon çalışma aralığı uygun bulunmuştur.

### Doğruluk

Analitik metodun doğruluğu, bu metot ile test edilen analiz sonuçlarının gerçek sonuçlara yakınlığıdır.

### Deneysel açıklamalar

Standart çözeltisinin hazırlanışı: 50.0 mg pirfenidon çalışma standardı 25 ml'lik balon jojeye alınıp, seyreltme çözeltisi-1 ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve bu çözeltiden 1 ml alınarak 20 ml'lik balon jojeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile tamamlanıp 0.45 µm polietilen filtreden filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Geri kazanım çözeltisinin hazırlanışı (% 1): Hassas bir şekilde tartımı alınan 5 mg pirfenidon etken maddesi 50 ml'lik balon joje içerisine aktarılıp seyreltme çözeltisi-2 ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve bu çözeltiden 1 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye alınır. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.001 mg/ml).

Geri kazanım çözeltisinin hazırlanışı (% 100): Hassas bir şekilde tartımı alınan 20.0 mg pirfenidon etken madde 2 ml'lik balon joje içerisine aktarılıp seyreltme çözeltisi-2 ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve bu çözeltiden 1 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Geri kazanım çözeltisinin hazırlanışı (% 150): Hassas bir şekilde tartımı alınan 30.0 mg pirfenidon etken madde 2 ml'lik balon joje içerisine aktarılıp seyreltme çözeltisi-2 ile

çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve bu çözeltiden 1 ml alınarak 100 ml'lik balon jöjeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp, 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzölmüş ve viallenmiştir (C<sub>Pirfenidon</sub>: 0.15 mg/ml).

Çalışmanın prosedürü aşağıda verilmiştir.

- Seyreltme çözeltisi enjeksiyonu ile baseline ve basınç dengelenmeye çalışılır.
- Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılır.
- İki adet standart çözelti hazırlanır.
- Standart-1 çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılır.
- Standart-2 çözeltisinden 2 enjeksiyon yapılır.
- Pirfenidon geri kazanım (%1, %100 ve %150) çözeltilerinden 3'er adet hazırlanır ve her birinden 3 enjeksiyon yapılır.
- Tek tek ve ortalama geri kazanım yüzdeleri, standart sapma, göreceli standart sapma ve % 95 güven aralığı hesaplanır.

Hesaplamalar için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

$$\% \text{ Geri kazanılan miktar} = (\text{Tespit edilen miktar} / \text{Teorik miktar}) \times 100$$

$$\text{Güven aralığı: } \bar{x} - t \left( \frac{s}{\sqrt{n}} \right) < \mu < \bar{x} + t \left( \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

(µ: ölçölmeye çalışılan gerçek değeri, s: standart sapma, n: ölçüm sayısı, t: serbestlik derecesindeki t dağılım değeri (n-1),  $\bar{x}$ : analiz sonuçlarının ortalaması)

Güven aralığı gerçek değeri kapsamıyor ise analizde sistematik bir hatanın olduğu değerlendirilmiştir. Serbestlik derecesi (n-1) ve %95 güven aralığında t-dağılım değeri Çizelge 3.14'te verilmiştir.

Çizelge 3.14. t- Dağılım çizelgesi

| Serbestlik derecesi (n-1) | %95 Güven aralığında t-dağılım değeri | Serbestlik derecesi (n-1) | %95 Güven aralığında t-dağılım değeri |
|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| 1                         | 12.706                                | 6                         | 2.447                                 |
| 2                         | 4.303                                 | 7                         | 2.365                                 |
| 3                         | 3.182                                 | 8                         | 2.306                                 |
| 4                         | 2.776                                 | 9                         | 2.262                                 |
| 5                         | 2.571                                 | 10                        | 2.228                                 |

Kabul kriteri olarak her bir geri kazanım değerinin, % 98.0 ile % 102.0 aralığında bulunması alınmıştır. Pirfenidon doğruluk çalışması sonuçları Çizelge 3.15’te verilmiştir.

Çizelge 3.15. Pirfenidon doğruluk çalışması sonuçları

| Seviye (%)              | Konulan Kons. (mg/ml) | Bulunan Kons. (mg/ml) | Geri Kazanım (%) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| %1-1                    | 0.001                 | 0.001                 | 101.8            |
| %1-2                    | 0.001                 | 0.001                 | 100.8            |
| %1-3                    | 0.001                 | 0.001                 | 98.6             |
| %100-1                  | 0.100                 | 0.100                 | 100.7            |
| %100-2                  | 0.100                 | 0.101                 | 101.3            |
| %100-3                  | 0.101                 | 0.099                 | 98.8             |
| %150-1                  | 0.151                 | 0.151                 | 100.2            |
| %150-2                  | 0.150                 | 0.152                 | 101.5            |
| %150-3                  | 0.151                 | 0.150                 | 99.9             |
| Ortalama                |                       |                       | 100.42           |
| Std. Sapma              |                       |                       | 1.13             |
| Göreceli Std. Sapma (%) |                       |                       | 1.13             |
| Güven Sınırı            |                       |                       | 0.87             |
| Güven Aralığı           |                       |                       | 99.5<br>101.3    |

Sonuçlar değerlendirildiğinde pirfenidon için her bir geri kazanım değeri % 98 - % 102 arasında bulunmuştur.

Pirfenidon için ortalama geri kazanım değeri % 100.42, standart sapma 1.13, GSS % 1.13 olarak saptanmıştır. % 95 güven aralığı % 99.5 - % 101.3, güven sınırı 0.87 olarak bulunmuştur. Sonuçların kabul kriterleri içerisinde olduğu tespit edilmiştir.

### Kesinlik

#### *Tekrarlanabilirlik*

Tekrarlanabilirlik parametresi, kullanılan ekipmanın performansının ölçüsüdür.

#### *Deneysel açıklamalar*

Standart çözeltisinin hazırlanışı: 20.0 mg pirfenidon çalışma standardı 20 ml'lik balon jöjeye alınıp, seyreltme çözeltisi ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, bu çözeltiden 5 ml alınarak 50 ml'lik balon jöjeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp, 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Kabul Kriteri olarak standart çözeltilerinin 6 ardışık enjeksiyonundan elde edilen standart pik alanları arasındaki % GSS 2.0'dan küçük olması, ve alıkonma zamanları arasındaki % GSS 2.0'dan küçük olması alınmıştır.

Pirfenidon tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları Çizelge 3.16'da verilmiştir.

Çizelge 3.16. Pirfenidon tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

| Enj. Sırası | Pirfenidon Pik Alanı | Alıkonma Zamanı |
|-------------|----------------------|-----------------|
| 1           | 17189739             | 10.55           |
| 2           | 17245378             | 10.54           |
| 3           | 17156386             | 10.54           |
| 4           | 17223867             | 10.55           |
| 5           | 17289456             | 10.55           |
| 6           | 17156345             | 10.55           |
| Ortalama    | 17210195             | 10.55           |
| Std. Sapma  | 52765                | 0.01            |
| % GSS       | 0.31                 | 0.05            |

Pirfenidon standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen pirfenidon pik alanları GSS % 0.05, alıkonma zamanları GSS % 0.02 olarak bulunmuştur. Sonuçların kabul kriterlerini sağladığı görülmüştür.

#### *Tekrar elde edilebilirlik (metot kesinliği)*

Tekrar elde edilebilirlik parametresi, aynı işlem koşulları altında kısa bir zaman aralığındaki kesinliği ifade eder.

#### *Deneyisel açıklamalar*

Standart çözeltisinin hazırlanışı: 50.0 mg pirfenidon çalışma standardı 25 ml'lik balon jojeye alınıp, seyreltme çözeltisi-1 ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, bu çözeltiden 1 ml alınarak 20 ml'lik balon jojeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp, 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Numune çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlamak için 1000 mg pirfenidon 10 ml'lik balon jojeye tartılıp, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi-2 ilave edilmiştir. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilip ve çözülmüştür. Hacmine seyreltme çözeltisi-2 ile tamamlanmıştır. Bu çözelti Çizelge 3.2'de belirtilen atomizer parametrelerinde EMİS ile sürüklenmiştir. 3 saniye içerisinde 60 ml buhar çekilip,

yoğunlaştırılmış ve 5 ml seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilmiştir. 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir.

% 100 Metot kesinliği çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlamak için 1000 mg pirfenidon 10 ml'lik balon jojeye tartılıp, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi-2 ilave edilmiştir. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilip çözülmüştür. Hacmine seyreltme çözeltisi-2 ile tamamlanıp bu çözeltiden 1 ml alınarak 100 ml'lik balon joje'ye aktarılmıştır. Hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilip bu çözeltiden 1 ml alınarak 10 ml'lik balon joje'ye aktarılmış ve hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilmiştir. 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Çalışmanın prosedürü aşağıda verilmiştir;

- Seyreltme çözeltisi enjeksiyonu ile baseline ve basınç dengelenmeye çalışılır.
- Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisinden-1'den 1 enjeksiyon yapılır.
- İki adet standart çözeltisi hazırlanır.
- Standart-1 çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılır.
- Standart-2 çözeltisinden 2 enjeksiyon yapılır.
- 6 adet numune çözeltisi hazırlanır ve her birinden 3 enjeksiyon yapılır.
- 6 adet % 100 Metot Kesinliği çözeltisi hazırlanır ve her birinden 3 enjeksiyon yapılır.

Kabul kriteri olarak birbirinden bağımsız hazırlanan 6 adet numunenin ve % 100 metot kesinliği çözeltisinin ortalama yüzdesel sonuçları arasındaki GSS % 2.0'dan küçük olması alınmıştır.

Pirfenidon metot kesinliği çalışması numune çözeltisi sonuçları ve pirfenidon % 100 metot kesinliği çalışması sonuçları sırasıyla Çizelge 3.17 ve Çizelge 3.18'de verilmiştir.

Çizelge 3.17. Pirfenidon tekrar elde edilebilirlik metot kesinliği çalışması numune çözeltisi sonuçları (buharlaştırma sonrası yoğunlaştırılan sıvıdaki pirfenidon miktarı (standart çözeltiye göre)

| Numune Çözeltisi | Ortalama Alan | Numune Kons. (mg/ml) | Sonuç (mg) |
|------------------|---------------|----------------------|------------|
| N-1              | 2568008       | 0.002                | 0.92       |
| N-2              | 2472075       | 0.002                | 0.96       |
| N-3              | 2568175       | 0.002                | 0.92       |
| N-4              | 2596916       | 0.002                | 0.93       |
| N-5              | 2670114       | 0.002                | 0.96       |
| N-6              | 2450491       | 0.002                | 0.95       |
|                  |               | Ortalama             | 0.94       |
|                  |               | Std. Sapma (SD)      | 0.02       |
|                  |               | % GSS                | 1.94       |

Çizelge 3.18. Pirfenidon % 100 metot kesinliği çalışması sonuçları

| % 100 Metot Kesinliği Çözeltisi | Ortalama Alan | Numune Kons. (mg/ml) | Sonuç (%) |
|---------------------------------|---------------|----------------------|-----------|
| N-1                             | 17696506      | 0.10414              | 102.2     |
| N-2                             | 17948584      | 0.10509              | 102.7     |
| N-3                             | 18290836      | 0.10558              | 104.2     |
| N-4                             | 18211420      | 0.10508              | 104.2     |
| N-5                             | 18543127      | 0.10704              | 104.2     |
| N-6                             | 18502319      | 0.10831              | 102.7     |
|                                 |               | Ortalama             | 103.4     |
|                                 |               | StdSapma             | 0.92      |
|                                 |               | GSS (%)              | 0.89      |

Buharlaştırma sonrası yoğunlaştırılan sıvıdaki pirfenidon miktarı için hazırlanan birbirinden bağımsız olan 6 adet pirfenidon numune çözeltisinden elde edilen % sonuçları arasındaki GSS % 1.94 olarak bulunmuştur. Birbirinden bağımsız hazırlanan 6 adet pirfenidon % 100

metot kesinliği çözeltilisinden elde edilen % sonuçları arasındaki GSS % 0.89 olarak bulunmuştur. Sonuçların kabul kriterlerini sağladığı görölmüştür.

#### *Tekrar uygulanabilirlik*

Tekrar uygulanabilirlik parametresi, farklı laboratuvarlarda rastgele değışimlerin (cihaz, analist vb.) analitik metoda etkisi ifade edilir.

#### *Deneysel açıklamalar*

Standart çözeltisinin hazırlanışı: 50.0 mg Pirfenidon çalışma standardı 25 ml'lik balon jojeye alınıp, seyreltme çözeltisi-1 ile çözölüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, bu çözeltiden 1 ml alınarak 20 ml'lik balon jojeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile tamamlanıp 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzölüp viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Numune çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlamak için 1000 mg pirfenidon 10 ml'lik balon jojeye tartılmıştır. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi-2 ilave edilip ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilip çözölmüştür. Hacmine seyreltme çözeltisi-2 ile tamamlanıp, bu çözeltiden alınan örnekler Çizelge 3.2'de belirtilen atomizer parametrelerinde EMİS ile sürüklenmiştir. 3 saniye içerisinde 60 ml buhar çekilip yoğunlaştırılmıştır. 5 ml seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilip 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzölüp, viallenmiştir.

% 100 Tekrar uygulanabilirlik çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlamak için 1000 mg pirfenidon 10 ml'lik balon jojeye tartılmıştır. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi-2 ilave edilip ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilip çözölmüştür. Hacmine seyreltme çözeltisi-2 ile tamamlanıp bu çözeltiden 1 ml alınarak 100 ml'lik balon joje'ye aktarılmıştır. Hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilip bu çözeltiden 1 ml alınarak 10 ml'lik balon joje'ye örneklenmiş ve hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilmiştir. 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzölüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Çalışmanın prosedürü aşağıda verilmiştir;

- Seyreltme çözeltisi enjeksiyonu ile baseline ve basınç dengelenmeye çalışılır.

- Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisinden-1'den 1 enjeksiyon yapılır.
- İki adet standart çözeltisi hazırlanır.
- Standart-1 çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılır.
- Standart-2 çözeltisinden 2 enjeksiyon yapılır.
- 6 adet numune çözeltisi hazırlanır ve her birinden 3 enjeksiyon yapılır.
- 6 adet % 100 tekrar uygulanabilirlik çözeltisi hazırlanır ve her birinden 3 enjeksiyon yapılır.
- Tekrar uygulanabilirlik çalışması farklı cihaz kullanılarak farklı iki kişi tarafından yürütülür.

Kabul kriterleri olarak, 6 numune çözeltisinden elde edilen ortalama geri kazanım yüzdeleri arasındaki % GSS 2.0'dan küçük olması ve metot kesinliği'nde elde edilen ortalama sonuçlarla, tekrar uygulanabilirlik çalışmasından elde edilen ortalama sonuçlar arasındaki % GSS 2.0'dan küçük olması alınmıştır.

Buharlaştırma sonrası yoğunlaştırılan sıvıdaki pirfenidon miktarının standart çözeltiye göre değerlendirilmesi ile ilgili sonuçlar Çizelge 3.19'da, metot kesinliği ve tekrar uygulanabilirlik çalışması değerlendirmesi ile ilgili sonuçlar Çizelge 3.20, Çizelge 3.21 ve Çizelge 3.22'de verilmiştir.

Çizelge 3.19. Pirfenidon tekrar uygulanabilirlik metot kesinliği çalışması numune çözeltisi sonuçları (buharlaştırma sonrası yoğunlaştırılan sıvıdaki pirfenidon miktarı (standart çözeltiye göre))

| Numune Çözeltisi | Ortalama Alan | Numune Kons. (mg/ml) | Sonuç (mg) |
|------------------|---------------|----------------------|------------|
| N-1              | 2528087       | 0.002                | 0.92       |
| N-2              | 2471456       | 0.002                | 0.96       |
| N-3              | 2569480       | 0.002                | 0.93       |
| N-4              | 2599997       | 0.002                | 0.93       |
| N-5              | 2671236       | 0.002                | 0.96       |
| N-6              | 2450491       | 0.002                | 0.95       |
|                  |               | Ortalama             | 0.94       |
|                  |               | Std. Sapma (SD)      | 0.02       |
|                  |               | % GSS                | 1.64       |

Çizelge 3.20. Buharlaştırma sonrası yoğunlaştırılan sıvıdaki pirfenidon miktarı (standart çözeltiye göre) metot kesinliği – tekrar uygulanabilirlik çalışması değerlendirmesi

|                                    |      |
|------------------------------------|------|
| 12 analiz sonucunun ortalaması (%) | 0.94 |
| 12 analiz sonucunun SD'si          | 0.02 |
| 12 analiz sonucunun GSS'si (%)     | 1.72 |
| Güven Sınırı                       | 0.01 |
| (% ) Güven Aralığı                 | 0.93 |
|                                    | 0.95 |

Çizelge 3.21. Pirfenidon % 100 tekrar uygulanabilirlik çalışması sonuçları

| % 100 Tekrar Uygulanabilirlik Çözeltisi | Ortalama Alan | Numune Konsantrasyonu (mg/ml) | Sonuç (%) |
|-----------------------------------------|---------------|-------------------------------|-----------|
| N-1                                     | 17704238      | 0.10473                       | 101.6     |
| N-2                                     | 17956946      | 0.10578                       | 102.1     |
| N-3                                     | 18307857      | 0.10703                       | 102.8     |
| N-4                                     | 18248112      | 0.10859                       | 101.0     |
| N-5                                     | 18573922      | 0.11001                       | 101.5     |
| N-6                                     | 18557732      | 0.10929                       | 102.1     |
|                                         |               | Ortalama                      | 101.9     |
|                                         |               | Standart sapma                | 0.62      |
|                                         |               | Göreceli standart sapma (%)   | 0.61      |

Çizelge 3.22. Metot kesinliği – tekrar uygulanabilirlik çalışması değerlendirmesi

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| 12 analiz sonucunun ORT (%)    | 102.61 |
| 12 analiz sonucunun SD'si      | 1.08   |
| 12 analiz sonucunun GSS'si (%) | 1.05   |
| Güven Sınırı                   | 0.68   |
| (% ) Güven Aralığı             | 101.93 |
|                                | 103.29 |

Sonuçlar değerlendirildiğinde, buharlaştırma sonrası yoğunlaştırılan sıvıdaki pirfenidon miktarı için hazırlanan birbirinden bağımsız 6 adet pirfenidon numune çözeltisinden elde edilen yüzdesel sonuçları arasındaki GSS % 1.64, metot kesinliği'nden ve tekrar uygulanabilirlik çalışmasından elde edilen 12 numune çözeltisinin ortalama yüzdesel sonuçları arasındaki GSS % 1.72, olarak bulunmuştur. % 100 tekrar uygulanabilirlik için hazırlanan birbirinden bağımsız 6 adet çözeltiden elde edilen yüzdesel sonuçları arasındaki GSS % 0.61, metot kesinliği'nden ve tekrar uygulanabilirlik çalışmasından elde edilen 12 numune çözeltisinin ortalama yüzdesel sonuçları arasındaki GSS % 1.05 olarak bulunmuştur. Sonuçlar kabul kriterlerini sağlamaktadır.

### Sistem uygunluğu

Sistem uygunluk testleri; analitik metodun, numunenin ve ekipmanın doğru ve kesin sonuçlar verdiğinin değeriendirilmesi için gerekli olan kavramlardır.

### *Deneyisel Açıklamalar*

Standart çözeltisinin hazırlanışı: 50.0 mg Pirfenidon çalışma standardı 25 ml'lik balon jojeye alınıp, seyreltme çözeltisi-1 ile çözölüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, bu çözeltiden 1 ml alınarak 20 ml'lik balon jojeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile tamamlanıp, 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzölüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Çalışmanın prosedürü aşağıda verilmiştir;

- Seyreltme çözeltisi enjeksiyonu ile baseline ve basınç dengelenmeye çalışılır.
- Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılır.
- Standart çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılır.
- % GSS, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı ve kapasite faktörü raporlanır.

Kolon etkinliği (Teorik plaka sayısı), simetri/kuyruklanma faktörü, kapasite faktörü, alıkonma zamanı kaydedilmiştir.

Kabul kriterleri olarak standart çözeltisinin 6 ardışık enjeksiyonundan elde edilen standart pik alanları arasındaki % GSS 2.0'dan küçük olması ve alıkonma zamanları arasındaki % GSS 2.0'dan küçük olması alınmıştır.

Pirfenidon standart çözeltisi enjeksiyonu sonuçları Çizelge 3.23'te verilmiştir.

Çizelge 3.23. Pirfenidon standart çözeltisi enjeksiyonu sonuçları

| Sistem Uygunluk Çözeltisi |           |                 |                 |                  |                     |
|---------------------------|-----------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------|
| Pirfenidon                | Pik Alanı | Alıkonma Zamanı | Simetri Faktörü | Kapasite Faktörü | Teorik Plaka Sayısı |
| 1                         | 17189739  | 10.55           | 1.25            | 8.94             | 10862               |
| 2                         | 17245378  | 10.54           | 1.25            | 8.94             | 10866               |
| 3                         | 17156386  | 10.54           | 1.25            | 8.94             | 10874               |
| 4                         | 17223867  | 10.55           | 1.25            | 8.94             | 10873               |
| 5                         | 17289456  | 10.55           | 1.25            | 8.94             | 10864               |
| 6                         | 17156345  | 10.55           | 1.25            | 8.94             | 10879               |
| Ortalama                  | 17210195  | 10.55           | 1.25            | 8.94             | 10869               |
| Std. Sapma                | 52765     | 0.01            | 0.00            | 0.00             | 6.65                |
| % GSS                     | 0.31      | 0.05            | 0.00            | 0.00             | 0.06                |

Sonuçlar değerlendirildiğinde, standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen standart alanları arasındaki GSS % 0.31, alıkonma zamanları arasındaki GSS % 0.05 olarak bulunmuştur ve bu sonuçlar kabul kriterlerini sağlamaktadır.

#### Çözelti stabilitesi

Çözelti stabilitesi çalışmasında, analitik metotta hazırlanan standart ve numune çözeltilerinin stabil olduğu koşullar ve süre belirlenir.

#### *Deneyisel Açıklamalar*

Standart çözeltisinin hazırlanışı: 50.0 mg pirfenidon çalışma standardı 25 ml'lik balon jojeye alınıp, seyreltme çözeltisi-1 ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, bu çözeltiden 1 ml alınarak 20 ml'lik balon jojeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi-1 ile tamamlanarak 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Numune çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlamak için 1000 mg pirfenidon 10 ml'lik balon jojeye tartılmıştır. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi-2

ilave edilip ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilip çözülmüştür. Hacmine seyreltme çözeltisi-2 ile tamamlanıp, bu çözeltiden alınan örnekler Çizelge 3.2’de belirtilen atomizer parametrelerinde EMİS ile sürüklenmiştir. 3 saniye içerisinde 60 ml buhar çekilip yoğunlaştırılmıştır. 5 ml seyreltme çözeltisi-1 ile seyreltilip, 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir.

Çalışmanın prosedürü aşağıda verilmiştir;

- Seyreltme çözeltisi enjeksiyonu ile baseline ve basınç dengelenmeye çalışılır.
- Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılır.
- 1 adet standart çözeltisi hazırlanır ve oda sıcaklığında (25°C) saklanır.
- 1 adet numune-1 çözeltisi hazırlanır ve oda sıcaklığında (25°C) saklanır.
- Oda sıcaklığındaki standart ve numune çözeltilerinden 0., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde 3’er enjeksiyon yapılır.
- Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması ve göreceli standart sapması ve % değişim hesaplanır.

Hesaplama % Değişim=  $|A_t - A_o| / A_o \times 100$  formülü ile yapılmıştır.

(A<sub>o</sub>: Başlangıç zamanındaki alan, A<sub>t</sub>: t zamanındaki alan)

Kabul Kriteri olarak % Değişim başlangıçta elde edilen sonuçların % 2.0’sinden fazla olmaması alınmıştır.

Pirfenidon standart çözeltisi ve oda sıcaklığı (25 °C) stabilitesi sonuçları Çizelge 3.24’de numune çözeltisi oda sıcaklığı (25 °C) stabilitesi sonuçları Çizelge 3.25’te verilmiştir.

Çizelge 3.24. Pirfenidon standart çözeltisi ve oda sıcaklığı (25 °c) stabilitesi sonuçları

| Standart Çözeltisi. Oda Sıcaklığı (25°C) |           |          |             |          |             |          |             |          |             |
|------------------------------------------|-----------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
|                                          | Başlangıç | 6. saat  | Değişim (%) | 12. saat | Değişim (%) | 24. saat | Değişim (%) | 48. saat | Değişim (%) |
| Alan-1                                   | 17247635  | 17234567 |             | 17456343 |             | 17234561 |             | 17435626 |             |
| Alan-2                                   | 17298734  | 17156345 |             | 17536082 |             | 17345624 |             | 17302345 |             |
| Alan-3                                   | 17198734  | 17309456 |             | 17230451 |             | 17527845 |             | 17023456 |             |
| Ortalama Alan                            | 17248368  | 17233456 | -0.09       | 17407625 | 0.92        | 17369343 | 0.70        | 17253809 | 0.03        |
| Std. Sapma                               | 50004     | 76562    |             | 158533   |             | 148074   |             | 210328   |             |
| GSS (%)                                  | 0.29      | 0.44     |             | 0.91     |             | 0.85     |             | 1.22     |             |

Çizelge 3.25. Numune Çözeltisi Oda sıcaklığı (25 °C) Stabilitesi Sonuçları

| Numune Çözeltisi. Oda Sıcaklığı (25°C) |           |         |             |          |             |          |             |          |             |
|----------------------------------------|-----------|---------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
|                                        | Başlangıç | 6. saat | Değişim (%) | 12. saat | Değişim (%) | 24. saat | Değişim (%) | 48. saat | Değişim (%) |
| Alan-1                                 | 700463    | 698564  |             | 700675   |             | 699564   |             | 701234   |             |
| Alan-2                                 | 699563    | 699096  |             | 700453   |             | 699453   |             | 701345   |             |
| Alan-3                                 | 698234    | 701453  |             | 699875   |             | 700342   |             | 699342   |             |
| Ortalama Alan                          | 699420    | 699704  | 0.04        | 700334   | 0.13        | 699786   | 0.05        | 700640   | 0.17        |
| Std. Sapma                             | 1121      | 1538    |             | 413      |             | 484      |             | 1126     |             |
| GSS (%)                                | 0.16      | 0.22    |             | 0.06     |             | 0.07     |             | 0.16     |             |

Sonuçlar değerlendirildiğinde standart çözeltisinin oda sıcaklığında 48 saat stabil olduğu, pirfenidon numune çözeltisinin oda sıcaklığında (25°C) 48 saat stabil olduğu ve bu koşullarda başlangıç alanlarına göre elde edilen değerler arasındaki farkın % 2.0'nin altında olduğu saptanmış olup bu sonuçlar kabul kriterlerini sağlamaktadır.

### Sağlamlık

Analitik bir metodun sağlamlığı, metot parametrelerinde yapılan kasıtlı ve küçük değişiklikler ile normal kullanım süresince metot güvenilirliğini sağlamayı amaçlayan, metot kapasitesinin ölçümüdür. Sağlamlık çalışmasında değiştirilen metot parametreleri Çizelge 3.26'da, sağlamlık çalışmasında kullanılan farklı kolon bilgileri Çizelge 3.27'de verilmiştir.

Çizelge 3.26. Sağlamlık çalışmasında değiştirilen metot parametreleri

| Parametre          | Gerçek Değer | Alt Değer | Üst Değer |
|--------------------|--------------|-----------|-----------|
| Dalga Boyu         | 220 nm       | 219 nm    | 221 nm    |
| Tampon pH değişimi | 3.0          | 2.9       | 3.1       |

Çizelge 3.27. Sağlamlık çalışmasında kullanılacak farklı kolon bilgileri

| Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kolon bilgileri |               |           |            |                                               |
|-----------------------------------------------------|---------------|-----------|------------|-----------------------------------------------|
| Kolon bilgisi                                       | Üretici firma | Seri no.: | Lot no.:   | Kolon boyutları                               |
| Validasyon süresince kullanılan kolon               | Merck         | 552565    | HX58040654 | PurospherSTAR RP-8 endcapped 250 x 4.6mm 5.0µ |
| Sağlamlık çalışmasında kullanılan kolon             | Merck         | 621926    | HX68985254 | PurospherSTAR RP-8 endcapped 250 x 4.6mm 5.0µ |

### *Deneyisel açıklamalar*

Standart çözeltisinin hazırlanışı: 20.0 mg pirfenidon çalışma standardı 20 ml’lik balon jojeye alınıp, seyreltme çözeltisi ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, bu çözeltiden 5 ml alınarak 50 ml’lik balon jojeye örneklenmiştir. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp, 0.45 µm polietilen tereftalat filtreden süzülüp, viallenmiştir ( $C_{\text{Pirfenidon}}$ : 0.1 mg/ml).

Çalışmanın prosedürü aşağıda verilmiştir;

- Seyreltme çözeltisi enjeksiyonu ile baseline ve basınç dengelenmeye çalışılır.
- Sistem dengeye geldikten sonra seyreltme çözeltisinden 1 enjeksiyon yapılır.
- Her çalışmada Çizelge 25 ve Çizelge 26’daki parametreler ayrı olarak test edilir.
- Her parametrede standart çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılır.
- Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması ve göreceli standart sapması hesaplanır.

- Parametre değişikliği öncesi ve sonrası alıkonma zamanı, simetri faktörü, kapasite faktörü ve teorik plaka sayısı raporlanır.

Kabul kriterleri standart çözeltisinin 6 ardışık enjeksiyonundan elde edilen pirfenidon pik alanları arasındaki % GSS 2.0'dan küçük olması ve alanlar arasındaki yüzdesel değişimin başlangıçta elde edilen sonuçların % 2.0'sinden fazla olmaması olarak alınmıştır. Pirfenidon standart çözeltisi sağlamlık parametreleri üzerinde dalga boyu değişimi etkisinin sonuçları Çizelge 28'de, pirfenidon standart çözeltisi sağlamlık parametreleri üzerinde hareketli faz tampon pH'ı değişimi etkisi Çizelge 29'da ve pirfenidon standart çözeltisi sağlamlık parametreleri üzerinde kolon değişimi etkisi Çizelge 30'da verilmiştir.

Çizelge 3.28. Pirfenidon standart çözeltisi sağlamlık parametresi sonuçları (dalga boyu değişimi etkisi)

|                               | Dalga Boyu Değişimi Etkisi-1:<br>219 nm |                 | Dalga Boyu Başlangıç şartı:<br>220 nm |                  | Dalga Boyu Değişimi Etkisi-2:<br>221 nm |                 |
|-------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|------------------|-----------------------------------------|-----------------|
| Standart Çözeltisi            | Pik Alanı                               | Alıkonma Zamanı | Pik Alanı                             | Alıkonma Zamanı  | Pik Alanı                               | Alıkonma Zamanı |
| 1                             | 17498536                                | 10.54           | 17245634                              | 10.55            | 17209452                                | 10.55           |
| 2                             | 17434075                                | 10.55           | 17494521                              | 10.54            | 17323560                                | 10.55           |
| 3                             | 17256340                                | 10.54           | 17134534                              | 10.55            | 17267845                                | 10.55           |
| 4                             | 17190567                                | 10.54           | 17245640                              | 10.55            | 17267845                                | 10.54           |
| 5                             | 17245678                                | 10.55           | 17178451                              | 10.55            | 17439831                                | 10.55           |
| 6                             | 17189563                                | 10.54           | 17423567                              | 10.55            | 17493458                                | 10.55           |
| Ortalama                      | 17302460                                | 10.54           | 17287058                              | 10.55            | 17333665                                | 10.55           |
| Std. Sapma                    | 131442                                  | 0.01            | 141539                                | 0.00             | 110454                                  | 0.00            |
| % GSS                         | 0.76                                    | 0.05            | 0.82                                  | 0.04             | 0.64                                    | 0.04            |
| Değişim (%)                   | 1.18                                    |                 |                                       |                  | 1.21                                    |                 |
| Standart Çözeltisi (Ortalama) | Alıkonma Zamanı (RT)                    |                 | Simetri Faktörü                       | Kapasite Faktörü | Teorik Plaka Sayısı                     |                 |
| 219 nm                        | 10.54                                   |                 | 1.25                                  | 2.98             | 10984                                   |                 |
| 220 nm                        | 10.54                                   |                 | 1.25                                  | 2.98             | 10984                                   |                 |
| 221 nm                        | 10.54                                   |                 | 1.25                                  | 2.98             | 10984                                   |                 |

Çizelge 3.29. Pirfenidon standart çözeltisi sağlamlık parametresi sonuçları (hareketli faz tampon pH'ı değişimi etkisi)

|                                  | Tampon pH Değişimi Etkisi-1:<br>pH : 2.9 |                 | Tampon pH Başlangıç Şartı:<br>pH : 3.0 |                  | Tampon pH Değişimi Etkisi-2:<br>pH : 3.1 |                 |
|----------------------------------|------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------|------------------|------------------------------------------|-----------------|
| Standart Çözeltisi               | Pik Alanı                                | Alıkonma Zamanı | Pik Alanı                              | Alıkonma Zamanı  | Pik Alanı                                | Alıkonma Zamanı |
| 1                                | 17290563                                 | 10.55           | 17345671                               | 10.55            | 17385645                                 | 10.55           |
| 2                                | 17356734                                 | 10.55           | 17456734                               | 10.54            | 17467435                                 | 10.54           |
| 3                                | 17189731                                 | 10.55           | 17178456                               | 10.55            | 17278945                                 | 10.54           |
| 4                                | 17423768                                 | 10.54           | 17134526                               | 10.54            | 17245638                                 | 10.55           |
| 5                                | 17345623                                 | 10.55           | 17435679                               | 10.54            | 17245298                                 | 10.55           |
| 6                                | 17523478                                 | 10.54           | 17412345                               | 10.54            | 17145234                                 | 10.55           |
| Ortalama                         | 17354983                                 | 10.55           | 17327235                               | 10.54            | 17294699                                 | 10.55           |
| Std. Sapma                       | 113728                                   | 0.01            | 138120                                 | 0.01             | 114494                                   | 0.01            |
| % GSS                            | 0.66                                     | 0.05            | 0.80                                   | 0.05             | 0.66                                     | 0.05            |
| Değişim (%)                      | 0.62                                     |                 |                                        |                  | 0.78                                     |                 |
| Standart Çözeltisi<br>(Ortalama) | Alıkonma Zamanı (RT)                     |                 | Simetri Faktörü                        | Kapasite Faktörü | Teorik Plaka Sayısı                      |                 |
| pH : 2.9                         | 10.55                                    |                 | 1.26                                   | 8.38             | 11082                                    |                 |
| pH : 3.0                         | 10.55                                    |                 | 1.25                                   | 8.94             | 10862                                    |                 |
| pH : 3.1                         | 10.54                                    |                 | 1.25                                   | 8.38             | 11032                                    |                 |

Çizelge 3.30. Pirfenidon standart çözeltisi sağlamlık parametresi sonuçları (kolon değişimi etkisi)

|                                  | Kolon Başlangıç şartı:<br>Seri No.: HX58040654 |                 | Kolon Değişimi Etkisi-1:<br>Seri No.: HX68985254 |                     |
|----------------------------------|------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------|---------------------|
| Standart Çözeltisi               | Pik Alanı                                      | Alıkonma Zamanı | Pik Alanı                                        | Alıkonma Zamanı     |
| 1                                | 17290563                                       | 10.54           | 17234578                                         | 10.55               |
| 2                                | 17356734                                       | 10.55           | 17445689                                         | 10.54               |
| 3                                | 17189731                                       | 10.55           | 17423489                                         | 10.54               |
| 4                                | 17423768                                       | 10.55           | 17345234                                         | 10.54               |
| 5                                | 17345623                                       | 10.55           | 17145690                                         | 10.54               |
| 6                                | 17523478                                       | 10.54           | 17423568                                         | 10.54               |
| Ortalama                         | 17354983                                       | 10.55           | 17336375                                         | 10.54               |
| Std. Sapma                       | 113728                                         | 0.01            | 121608                                           | 0.00                |
| % GSS                            | 0.66                                           | 0.05            | 0.70                                             | 0.04                |
| Değişim (%)                      |                                                |                 | 0.11                                             |                     |
| Standart Çözeltisi<br>(Ortalama) | Alıkonma<br>Zamanı (RT)                        | Simetri Faktörü | Kapasite Faktörü                                 | Teorik Plaka Sayısı |
| Seri No.: HX58040654             | 10.54                                          | 1.25            | 8.94                                             | 10862               |
| Seri No.: HX68985254             | 10.55                                          | 1.25            | 8.95                                             | 10873               |

Sonuçlar değerlendirildiğinde; dalga boyu değişimi sonucunda standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen pirfenidon pik alanları arasındaki GSS değerleri % 0.76 ve % 0.64 olarak bulunduğu ve alanlar arasındaki değişimin % 2.00'nin altında olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarak dalga boyu 219 nm-221 nm aralığında metodun sağlam olduğu belirlenmiştir. Hareketli faz tampon pH'ı değişimi sonucunda standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen pirfenidon pik alanları arasındaki GSS % 0.66 ve % 0.80 olarak bulunmuştur ve alanlar arasındaki % değişimin % 2.00'nin altında olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarak tampon pH'ı 2.9 – 3.1 aralığında metodun sağlam olduğu belirlenmiştir. Kolon değişimi sonucunda standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen pirfenidon pik alanları arasındaki GSS % 0.66 olarak bulunmuştur. Alanlar arasındaki değişim % 2.00'nin altında bulunmuştur. Buna bağlı olarak kolon değişiminde metodun sağlam olduğu belirlenmiştir. Dalga boyu değişimi, hareketli faz pH değişimi ve kolon değişimi parametrelerinde elde edilen sonuçların kabul kriterleri içerisinde olduğu ve sistem uygunluk parametrelerini sağladığı görülmüştür.

#### 3.1.4. Aerosol Partikül Büyüklüğünün Saptanması

Aerosol partikül büyüklüğünün saptanması amacıyla Copley NGI (Next Generation Impactor) ve Malvern Mastersizer 2000 cihazı kullanılmıştır. Copley NGI ile yapılan çalışmalarda buharın tüm membranları kolayca geçtiği görülmüş ve belirli seviyelerde yapılması planlanan deneylerin gerçekleştirilmesi Copley NGI cihazı ile mümkün olmamıştır. Deney sırasında buharın tüm membranlardan kolayca geçişi Resim 3.1.'de gösterilmiştir.

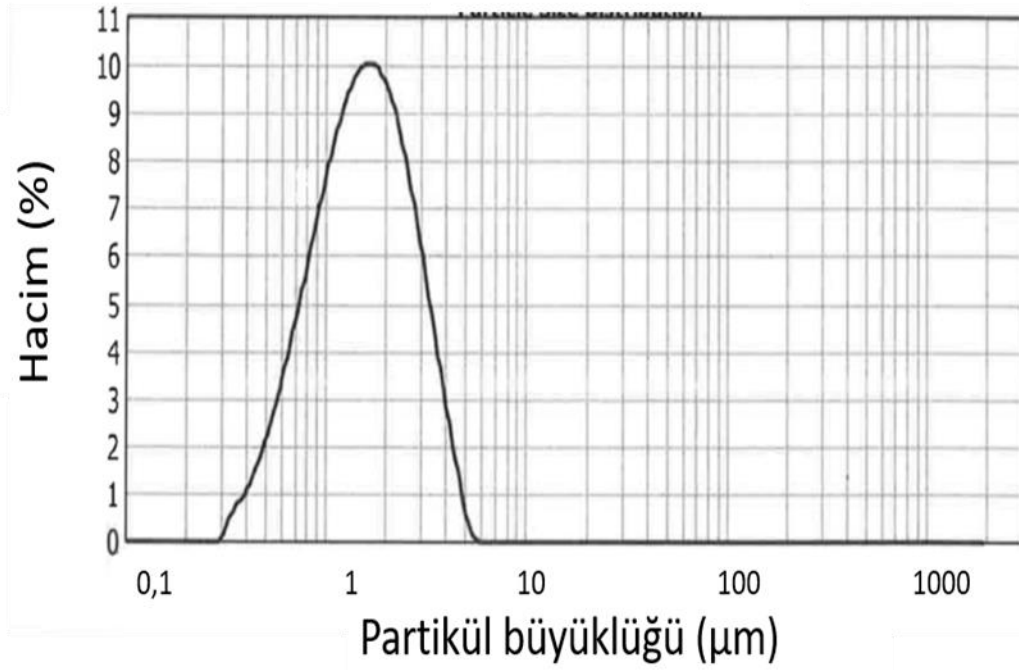
Pirfenidon taşıyan aerosol parçacıklarının partikül büyüklüğü dağılımı lazer kırınım yöntemi ile ölçülmüştür. Lazer kırınım yönteminin temeli, tanelerin büyüklüğü ile ışınların kırılma açısı arasındaki ters orantı ilişkisine dayanmaktadır.

Lazer kırınım yönteminde, tanelerin üzerine lazer ışınları gönderilmekte ve tanelere çarparak kırılan ve ileri yönde yansıyan ışınlar bir mercekten geçtikten sonra dedektörün üzerine düşmektedir. Dedektörün üzerine düşen ışınlar bir dönüştürücü vasıtasıyla sayısallaştırılarak bilgisayar aracılığıyla tane büyüklüğü ve yüzdesi hesaplanmaktadır.

Pirfenidon aerosolündeki parçacıkların boyutu Malvern Mastersizer 2000 cihazına doğrudan EMİS' ten vakum kullanılarak üretilen aerosol gönderilerek ölçülmüştür. Etken madde partiküllerinin bir dispersiyon ajanı içerisinde diperse edilerek ölçüm yapıldığı (25°C, 2000 rpm, 30 san.) yaş metot tercih edilmiştir. Resim 3.2.'de ölçümü yapılan kütlenin içerisindeki partiküllerin boyut dağılımı yüzdesel olarak gösterilmiştir.



Resim 3.1. Copley NGI cihazı ile yapılan deney sırasında, buharın tüm membranlardan kolayca geçişini gösteren bulgular



Resim 3.2. Aerosol partikül büyüklüğü ve dağılımı

### 3.2. *İn-Vivo* Deneyler

Deneylerde Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş. tarafından üretilen 220-260 g ağırlığındaki erkek Wistar Albino sıçanları kullanılmıştır. Denekler 12-12 ışık-karanlık döngüsü altında 21-24 °C'de normal laboratuvar koşullarında muhafaza edilmiştir.

Bu tez kapsamında yapılacak hayvan deneyleri için Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'ndan G.Ü.ET-18.006 kod numaralı, 05.02.2018 tarih ve E.21041 sayılı etik kurul izni alınmıştır. Pulmoner fibrozis sıçanlara anestezi altında (ketamin 80 mg/kg+ksilazin 10 mg/kg, ip), bleomisinin (5-10 mg/kg) tek doz intratrakeal uygulanması ile indüklenmiştir.



Resim 3.3. İntratrakeal bleomisin uygulanması

### 3.2.1. Deney grupları

Pulmoner fibrozis indüksiyonundan bir hafta sonra, hayvanlar rastgele 6 gruba ayrılarak her gruba 6 hayvan alınmıştır.

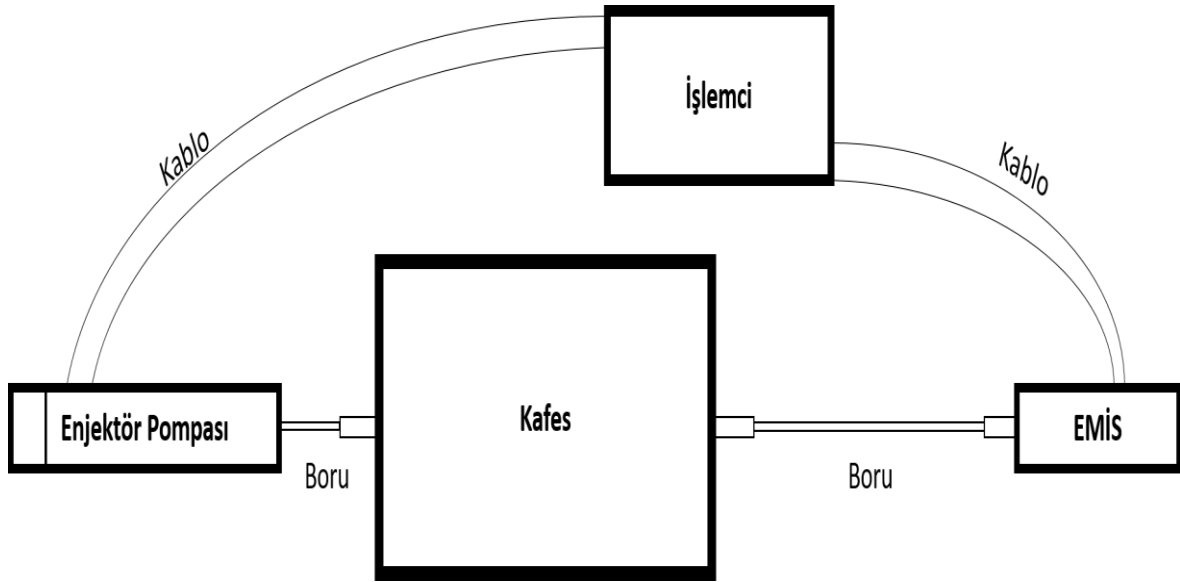
1. Grup (Kontrol): Bu grupta sıçanlarda pulmoner fibrosiz indüklenmiş ancak herhangi bir tedavi verilmemiştir.
2. Grup (Çözücü inhalasyonu verilen kontrol grubu): Bu grupta pulmoner fibrosiz indüklenmiş ancak etken madde içermeyen propilen glikol buharı verilmiştir.
3. Grup (Oral pirfenidon tedavisi alan grup): Bu gruptaki hayvanlara 7 gün boyunca 200 mg/kg oral pirfenidon tedavisi gavaj ile uygulanmıştır.
4. Grup (10 mg/kg pirfenidon inhalasyon tedavisi alan grup): Bu gruptaki hayvanlara pirfenidon aerosolü uygun doz ilaç verilinceye kadar kapalı bir alanda bırakılarak uygulanmıştır.
5. Grup (20 mg/kg pirfenidon inhalasyon tedavisi alan grup): Bu gruptaki hayvanlara pirfenidon aerosolü uygun doz ilaç verilinceye kadar kapalı bir alanda bırakılarak uygulanmıştır.
6. Grup (40 mg/kg pirfenidon inhalasyon tedavisi alan grup): Bu gruptaki hayvanlara pirfenidon aerosolü uygun doz ilaç verilinceye kadar kapalı bir alanda bırakılarak uygulanmıştır.

Pirfenidon dozunun seçimi sıçanlarda daha önce yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Oral pirfenidon tedavisi (200 mg /kg/gün[21] gavaj ile, inhaler pirfenidon tedavisi (10-20-40 mg/kg /gün dozlarında) kapalı alana aerosol ile uygulanmıştır. Çözücü inhalasyonu alan grup için sadece propilen glikol buharı kapalı alana uygulanmıştır. Oral yolla alınan pirfenidon salin içinde çözülerek gavaj ile ardışık 7 gün boyunca uygulanmıştır. Kapalı kutu 1 L hacminde, normoksik ve normokapnik koşullar altında olacak şekilde standardize edilmiştir.

Kafes içerisine alınan sıçanlara 7 gün süre ile 30 sn aralıklarla 3 sn sürecek puflar ile 60 ml aerosol verilmiştir (Resim3.4.). Kafes içerisine verilen toplam doz tedavi grupları için ayrı

ayrı hesaplanmıştır. Verilen toplam doz miktarı puf sayısının değiştirilmesi ile ayarlanmıştır. Deney hayvanları kapalı kutu içerisinde benzer süre tutulmuşlardır.

Deney hayvanları araştırma sonunda yüksek doz anestezi altında kanları alınarak sakrifiye edilmiştir. Deney hayvanlarından sol akciğer dokuları histopatolojik olarak fibrozis ve inflamasyon varlığı ve değişik ilaç gruplarının bu parameteler üzerine etkileri değerlendirmek için kullanılmıştır. Sağ akciğer dokuları ise oksidatif stres, inflamasyon belirteçleri ve hidroksiprolin miktarının değerlendirilmesi için biyokimyasal analizler için kullanılmıştır.



Resim 3.4. İnhalasyon ile pirfenidon uygulanması deney düzeneği

### 3.2.2. Biyokimyasal incelemeler, doku homojenizasyonu ve ELISA testleri

Toplanan sağ akciğer dokuları homojenizasyon tamponu eklenerek ultrasonik doku parçalayıcı yardımıyla homojenize edildi. 800 g'da 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısımları alınarak protein ve ELISA analizleri için -80 °C'de saklandı. ELISA yöntemi ile süperoksit dismutaz (SOD), lipid peroksidasyon aktiviteleri (LPO) değerlendirilecek, hidroksi prolin, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), tümör büyüme faktörü  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), tümör nekrozis faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, doku metaloproteinaz inhibitörü-1 (TIMP-1) ve matriks metaloproteinaz (MMP-2) gibi fibrotik belirteçlerin seviyeleri çalışılmıştır. ELISA kitleri "Mybiosource" firmasından temin edilmiş olup, üreticinin önerileri doğrultusunda analizler gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3. Histopatolojik incelemeler

Akciğer dokularını sıvı parafin içine yerleştirilip, parafin bloklar oluşturulduktan sonra 5 µm kalınlığında doku kesitleri hazırlandı. Her akciğer hematoksilen ve eozin ve Masson trikrom boyama yöntemleriyle boyandı. İnflamasyon ve fibrozis mevcudiyeti tedavi gruplarına kör bir patolog tarafından incelenmesi ile değerlendirilip derecelendirildi. Peribronşiyal ve perivasküler inflamasyonun derecesi, sırasıyla normal (Yok), hafif, orta veya şiddetli olarak semisubjektif derecelendirildi. Fibrozis incelemesinde uzun süre önce önerilen ancak günümüze kadar hemen her çalışmada değerlendirme kriteri olarak kullanılan Ashcroft [190] sınıflamasından yararlanıldı.

Histopatolojik incelemede akciğer fibrozisi; “Normal (Yok), Hafif şiddette, Orta Şiddette, Yüksek şiddette” olmak üzere dört aşamalı olarak değerlendirildi. Alveoler veya bronşiyol duvarlarının minimal fibröz kalınlaşması, hafif şiddette fibrozis olarak tanımlandı. Akciğer doku iskeletine belirgin bir zarar vermeden duvarların orta derecede kalınlaşması ve akciğer yapısında kesin hasar ve fibröz bant veya küçük fibröz alanların oluşumu ile birlikte izlenen fibrozis orta şiddette fibrozis olarak tanımlandı. Akciğer yapısının belirgin bozulması ve geniş fibrozis alanlarının izlenmesi, ek olarak "bal-peteği görünümü" saptanması yüksek şiddette fibrozis kategorisine yerleştirildi [190].

### 3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS for Windows Version 23.0 paket programında yapıldı. Sayısal değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma/hata ya da median [minimum – maksimum] değerler ile özetlendi. Kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde ile gösterildi. Sayısal değişkenlerin normalliği Shapiro Wilks testi ile incelendi. Tedavi grupları arasında sayısal değerler arasında farklılık olup olmadığı parametrik test varsayımlarının sağlanması durumunda bağımlı gruplarda tek yönlü varyans analizi testi ile parametrik test varsayımlarının sağlanmaması durumunda ise Kruskal-Wallis testi ile incelendi. Parametrik test varsayımlarının sağlanmadığı analizlerde post-hoc testi olarak Dunn ve Connerver nonparametrik karşılaştırma testi kullanıldı. Hidroskiprolin seviyeleri ile fibrozis derecesi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde Pearson korelasyon testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak alındı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. İn-Vitro Deney Sonuçları

#### 4.1.1. Taşınabilirlik Oranı

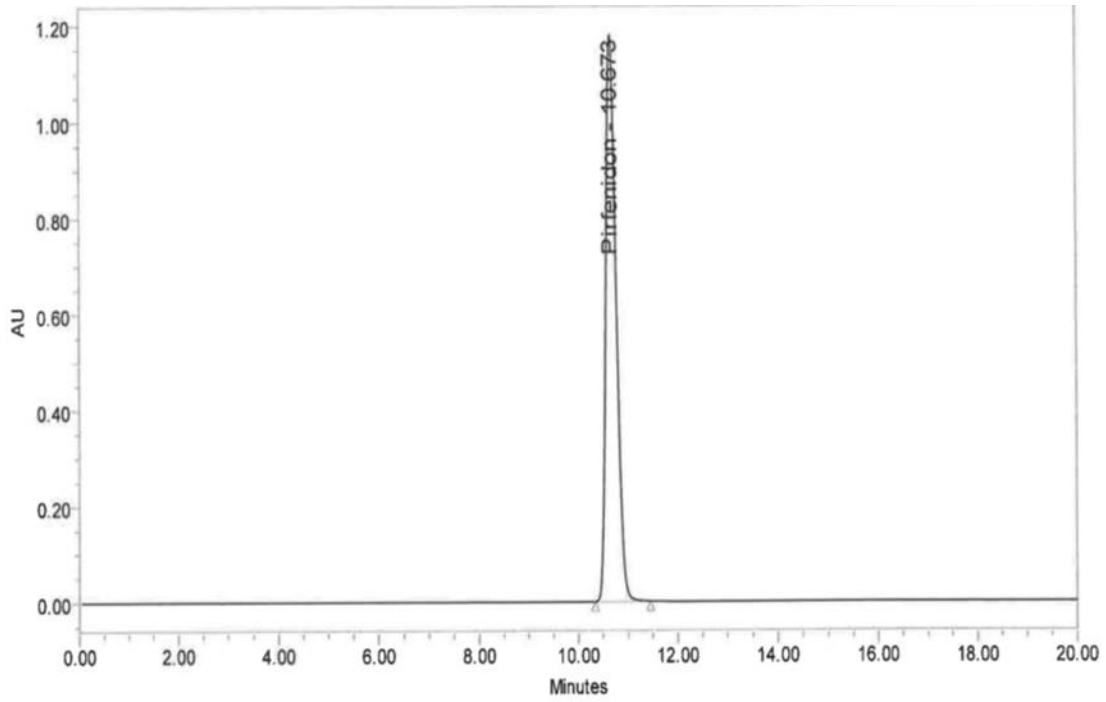
Pirfenidon'un EMİS ile sürüklenebilirliği ve taşınabilirlik oranı ölçülmüştür. 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml ve 100 mg/ml konsantrasyonlarında pirfenidon içeren çözeltiler 8, 10 ve 12 Watt'lık güç düzeyi test alınmıştır. Her bir konsantrasyondaki çözelti 8, 10 ve 12 Watt'lık bir enerji ile 3 ayrı puf olarak ve her bir puf süresi 3 saniye olacak şekilde uygulanmıştır. 2 puf arasındaki bekleme süresi 30 saniye olarak belirlenmiştir. Toplamda her bir farklı konsantrasyon için 60 ml aerosol toplanmıştır. Daha sonra elde edilen aerosol tekrar sıvılaştırılmış ve içerdiği pirfenidon miktarı ölçülmüştür. Karşılaştırma için kullanılan çözeltiler pirfenidon etken maddesini içermeyecek şekilde hazırlanmış olup, tüm şartlar pirfenidon içeren çözeltilerin uygulama şartları ile aynı tutulmuştur. Pirfenidonun cihaz içerisindeki stabilitesi ve yüzeylere tutunmasına bağlı etkin madde kayıpları ölçülmüştür. Sonuç olarak pirfenidonun cihaz içerisinden %100 sürüklendiği kanıtlanmıştır. EMİS sistemi ile pirfenidonun çözeltisinden %100 oranında sürüklenbildiği bulunmuştur. Çizelge 4.1'de pirfenidonun değişik konsantrasyonlarda ve atomizer ayarlarında taşınabilirlik oranları gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Sürüklenebilirlik test sonuçları

| Konsantrasyon | Cihaz Ayarları        |           |                       |           |                       |           |
|---------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
|               | 8 Watt                |           | 10 Watt               |           | 12 Watt               |           |
|               | Konsantrasyon (mg/ml) | Sonuç (%) | Konsantrasyon (mg/ml) | Sonuç (%) | Konsantrasyon (mg/ml) | Sonuç (%) |
| 2 mg/ml       | 0,0001                | %100,2    | 0,0001                | %100,0    | 0,0001                | %99,9     |
| 4 mg/ml       | 0,0001                | %100,3    | 0,0001                | %99,8     | 0,0001                | %99,6     |
| 8 mg/ml       | 0,0001                | %101,1    | 0,0001                | %99,9     | 0,0001                | %100,0    |
| 25 mg/ml      | 0,0001                | %100,3    | 0,0001                | %99,7     | 0,0001                | %100,0    |
| 50 mg/ml      | 0,0001                | %100,4    | 0,0001                | %99,8     | 0,0001                | %101,2    |
| 100 mg/ml     | 0,0001                | %100,0    | 0,0001                | %99,5     | 0,0001                | %100,6    |

#### 4.1.2. Yanma Ürünü Tespiti

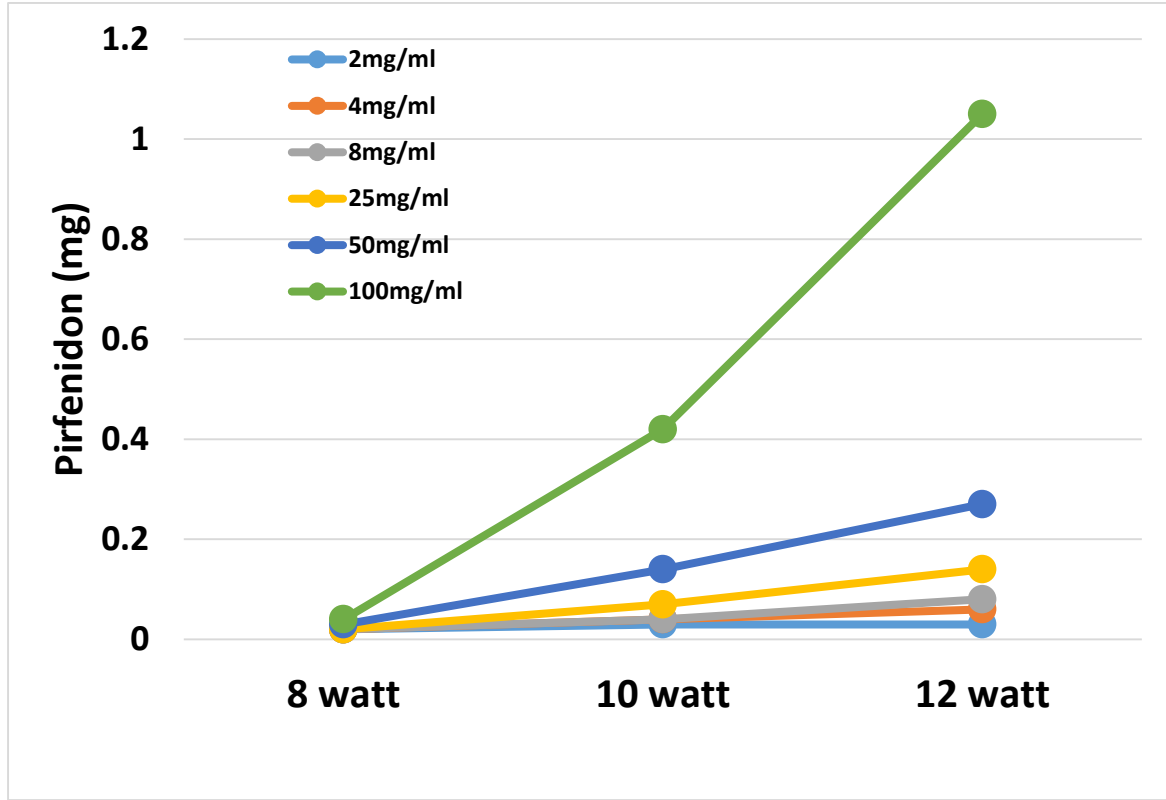
EMİS’de kullanılacak etken madde içeren çözeltinin termal açıdan stabil olması önemlidir. Pirfenidonun termal olarak stabil olduğu, buharlaştırma işlemi sırasında herhangi bir yanma ürünü oluşmadığı veya etken madde bozulması gelişmediği saptanmıştır.



Resim 4.1. Yanma ürünlerinin oluşmamasına ilişkin kromatogram

#### 4.1.3. Tek Pufta Verilen İlaç Miktarının Belirlenmesi

EMİS ile değişik yoğunluğa sahip çözeltiler ile farklı atomizer ayarlarında (watt) 3 saniye süre içerisinde elde edilen 60 ml buhar içinde taşınan ürün miktarı tespit edilmiştir. Çizelge 4.1’de pirfenidonun değişik konsantrasyonlarda ve atomizer ayarlarında taşınabilirlik oranları gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı atomizer ayarlarında ve değişik yoğunluktaki çözeltiler ile belirli süre (3s) içerisinde elde edilen buharda (60ml) taşınan etken madde miktarı.

#### 4.1.4. Aerosol Partikül Büyüklüğünün Saptanması

EMİS ile oluşturulan aerosollerin partikül büyüklüğü ve dağılımı Malvern Mastersizer 2000 cihazı ile lazer kırınım yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda elektronik nikotin dağıtım sistemleri aracılığıyla elde edilen aerosol partiküllerinin aerodinamik çapının 500 nm ila 1  $\mu$ m aralığında olduğu görülmüştür. Bu büyüklükteki partiküller akciğer alveollerine kadar iletilebilmektedir.

Ölçüm sonuçlarına göre D50 değeri ortalama olarak 1,2  $\mu$ m saptanmıştır. Bu değerdeki partikül boyutu dağılımının halihazırda tekniğin bilinen durumunda yer alan tüm inhalasyon yolu ile iletim yöntemlerinde elde edilen partikül boyutu dağılımından küçük olduğu açıktır.

#### 4.2. İn-vivo deney sonuçları

Sıçanların vücut ağırlıkları deney başlangıcında ve sonunda ölçülerek kaydedilmiştir. Çalışma protokolünün devamında 15. günde sıçanlar intraperitoneal ketamin (100 mg/kg)

ve ksilazin (10 mg/kg) enjeksiyonu ile uyuşturulmuş olup, sağ ve sol akciğerleri rezekte edilmiştir. Akciğerin bir lobu histopatolojik inceleme için % 10 tamponlu formalin çözeltisi içine alınmıştır. Diğer lob ise -80 °C'de dondurulmuş ve ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ile sitokin analizi için homojenatların süpernatantları hazırlanmıştır.

#### 4.2.1. Ağırlık, İştah ve Genel İyi Hali Takibi

Sıçanların başlangıç vücut ağırlıkları tüm deney gruplarında benzerdir (Çizelge 4.2.). Kontrol grubunda vücut ağırlıklarının tedavi alan gruplara kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda yer alan hayvanlarda vücut ağırlıkları artışının engellendiği, tedavi alan hayvanlarda ise vücut ağırlıklarının anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.2. de deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılması verilmiştir.

Çizelge 4.2. Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılması

|                           | Kontrol Grupları        |              | Tedavi Grupları   |                   |                   |                 | P     |
|---------------------------|-------------------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------|
|                           | Propilen Glikol-Kontrol | Kontrol      | İnhaler (10mg/kg) | İnhaler (20mg/kg) | İnhaler (40mg/kg) | Oral (200mg/kg) |       |
| İşlem öncesi ağırlık (g)  | 244 ± 24,3              | 255,6 ± 16,3 | 242,3 ± 13,4      | 236,3 ± 26,1      | 250,4 ± 29,9      | 242,3 ± 16,3    | 0.254 |
| İşlem sonrası ağırlık (g) | 206,9 ± 18,3            | 208,6 ± 12,6 | 293,5 ± 10,4*#    | 290,8 ± 18,5*#    | 317,8 ± 38,9*#    | 298,8 ± 9,7*#   | 0.001 |

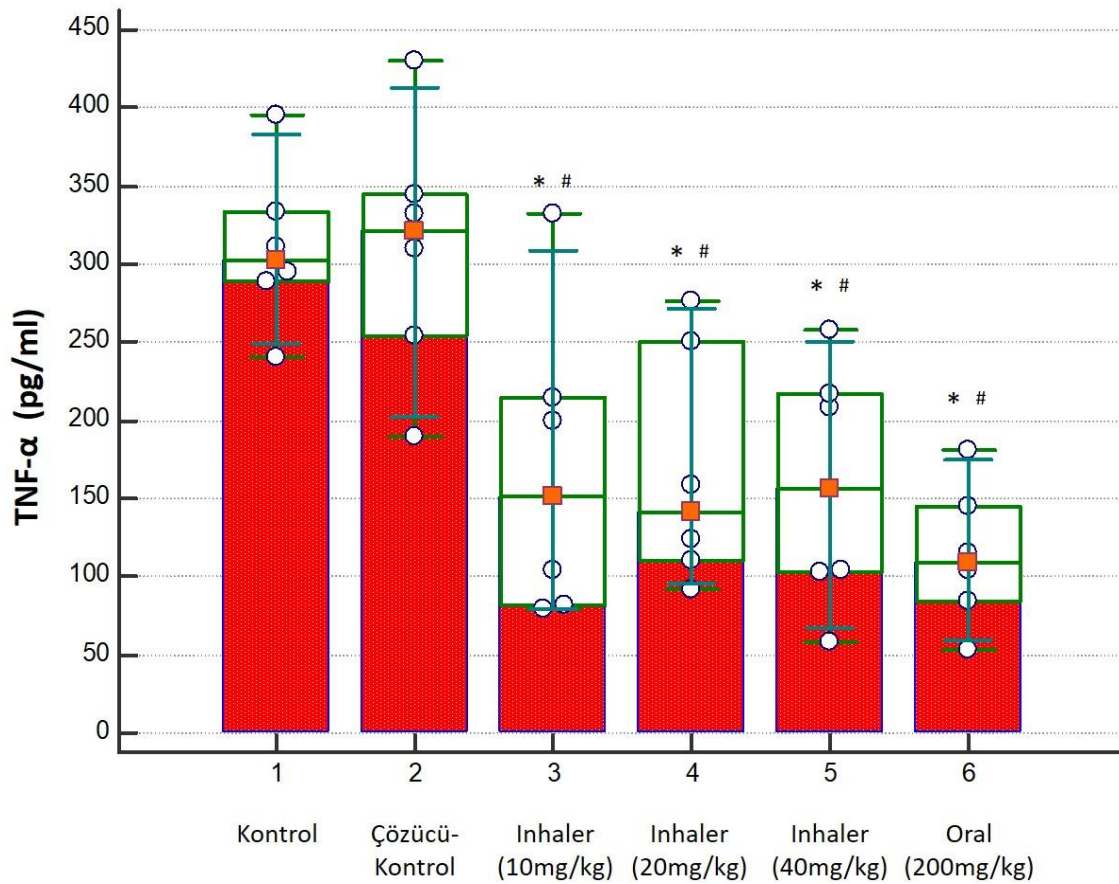
ANOVA, \*Kontrolden farklı, #Propilen glikol inhalasyon grubundan farklı

Tedavi gruplarındaki, sıçanların aktif, iştahlı ve iyi bir ruh haline sahip olduğu izlenmiştir. Ayrıca tüylerinin pürüzsüz ve parlak olduğu görülmüştür. Vücut ağırlıklarında artış tespit edilmiştir. Ancak kontrol gruplarında sıçanların hem aktivitesi hem de iştahı azalmıştır.

Tüyleri kararmış, sararmış ve vücut ağırlıklarında azalma tespit edilmiştir. Ek olarak, sıçanların sırt kemerlerinde, bacaklarında ve dudaklarının dış kenarlarında siyanoz izlenmiştir ve öksürük ve nefes darlığı semptomları saptanmıştır.

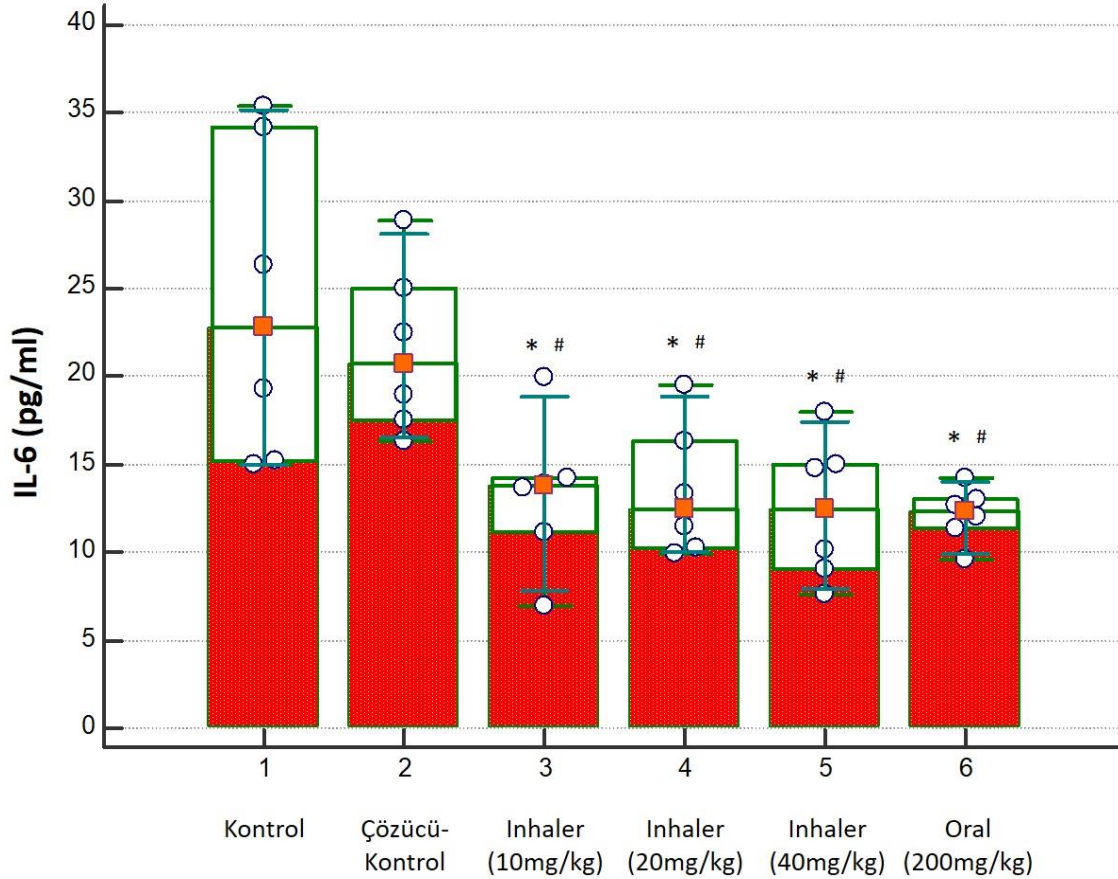
#### 4.2.2. Enflamatuvar Yanıt ve Fibrozis Biyobelirteçlerinin Değerlendirilmesi

Akciğer homojenatında bakılan TNF- $\alpha$  seviyeleri tedavi gruplarında düşük iken, kontrol gruplarında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (Şekil 4.2). Oral ve inhalasyon yolu ile pirfenidon uygulanan gruplar arasında hiçbir fark bulunmamıştır. Sonuçlar, oral ve inhalasyon yolu ile uygulanan pirfenidon tedavisinin inflamasyonun önemli bir belirteci olan TNF- $\alpha$  seviyelerinde belirgin azalma sağladığını göstermektedir.



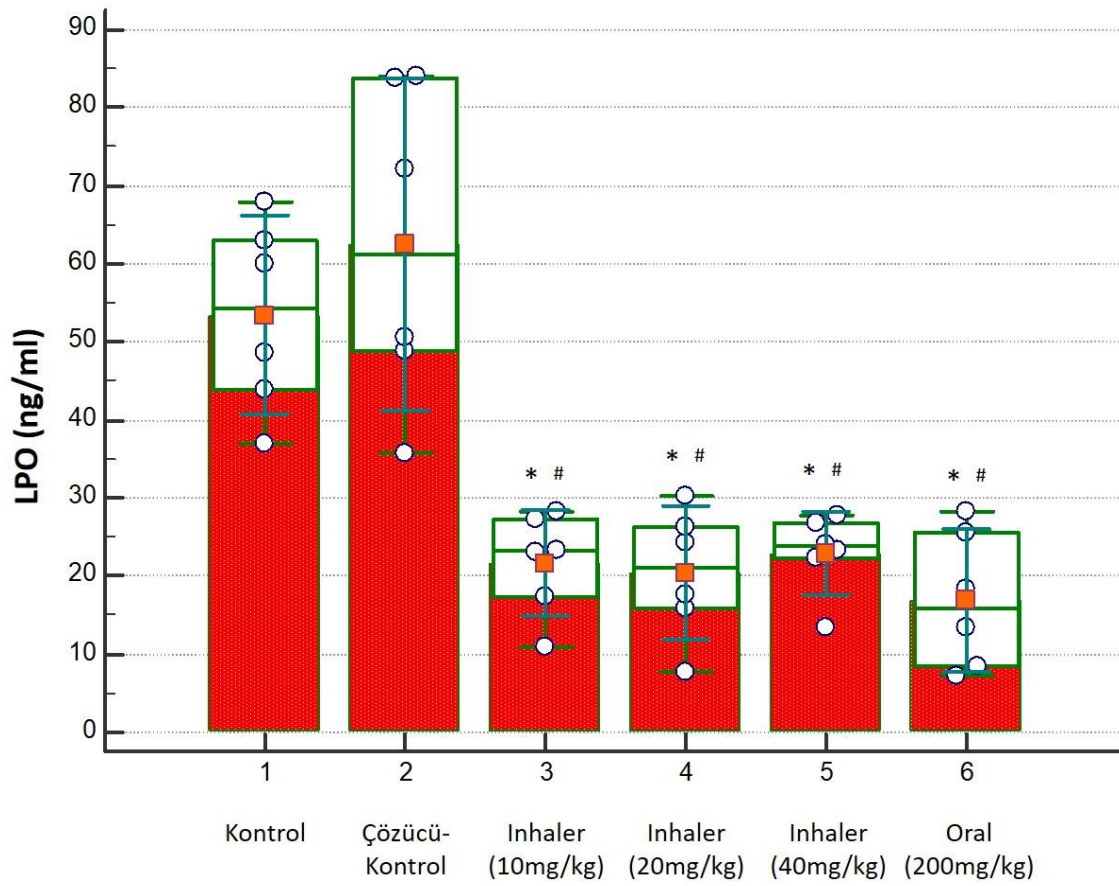
Şekil 4.2. Akciğer dokusu homojenatı TNF- $\alpha$  derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması. Yeşil kutucuklar kutu-bıyık grafiğini, açık mavi çizgi medyan değerler için %95 güven aralığını belirtmektedir. \*Kontrolden farklı, #Propilen glikol inhalasyon grubundan farklı, (n=6, Kruskal-Wallis p<0,001)

Akciğer homojenatında bakılan IL-6 seviyeleri tedavi alan gruplarda düşük iken, kontrol gruplarında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (Şekil 4.3). Oral ve inhalasyon yolu ile pirfenidon uygulanan gruplar arasında hiçbir fark bulunmamıştır. Sonuçlar, oral ve inhalasyon yolu ile uygulanan pirfenidon tedavisinin inflamasyonun önemli bir belirteci olan IL-6 seviyelerinde belirgin azalma sağladığını göstermektedir.



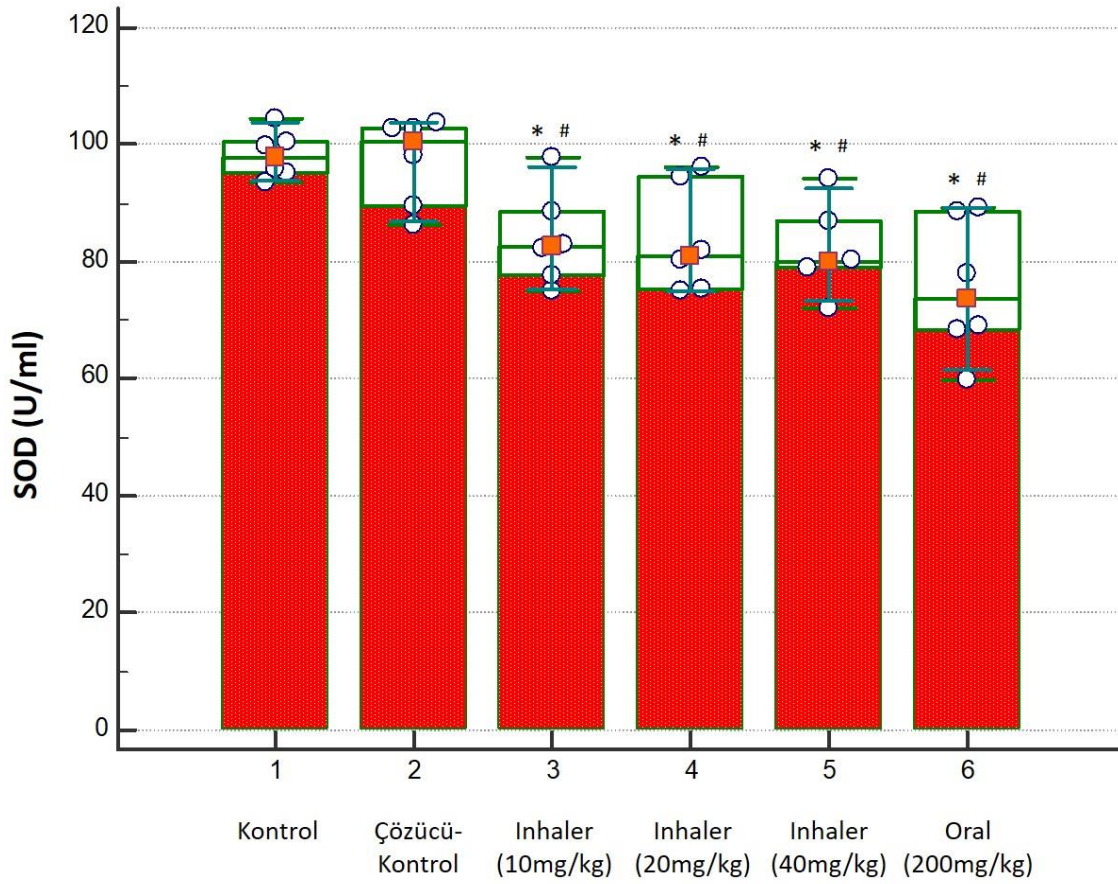
Şekil 4.3. Akciğer dokusu homojenatı IL-6 derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması. Yeşil kutucuklar kutu-bıyık grafiğini, açık mavi çizgi medyan değerler için %95 güven aralığını belirtmektedir. \*Kontrolden farklı, #Propilen glikol inhalasyon grubundan farklı, (n=6, Kruskal-Wallis p<0,001)

Akciğer homojenatında bakılan LPO seviyeleri tedavi gruplarında düşük iken, kontrol gruplarında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (Şekil 4.4). Oral ve inhalasyon yolu ile pirfenidon uygulanan gruplar arasında hiçbir fark bulunmamıştır. Sonuçlar, oral ve inhalasyon yolu ile uygulanan pirfenidon tedavisinin inflamasyonun önemli belirteçlerinden olan doku LPO seviyelerinde belirgin azalma sağladığını göstermektedir.



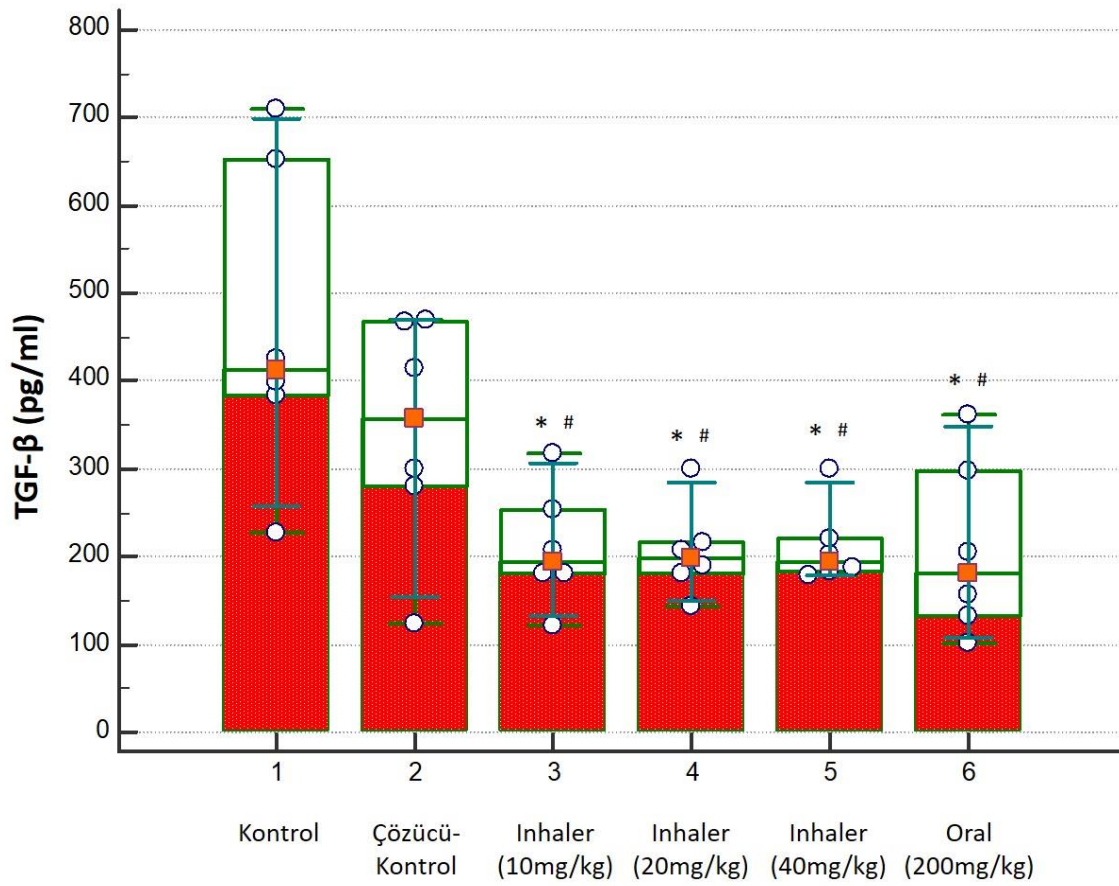
Şekil 4.4 Akciğer dokusu homojenatı LPO derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması. Yeşil kutucuklar kutu-bıyık grafiğini, açık mavi çizgi standart hatayı belirtmektedir. \*Kontrolden farklı, #Propilen glikol inhalasyon grubundan farklı, (n=6, ANOVA p<0,001)

Akciğer homojenatında bakılan SOD seviyeleri tedavi gruplarında düşük iken, kontrol gruplarında tedavi gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (Şekil 4.5). Oral ve inhalasyon yolu ile pirfenidon uygulanan gruplar arasında hiçbir fark bulunmamıştır. Sonuçlar, oral ve inhalasyon yolu ile uygulanan pirfenidon tedavisinin inflamasyonun önemli belirteçlerinden olan SOD aktivitesinde belirgin azalma sağladığını göstermektedir.



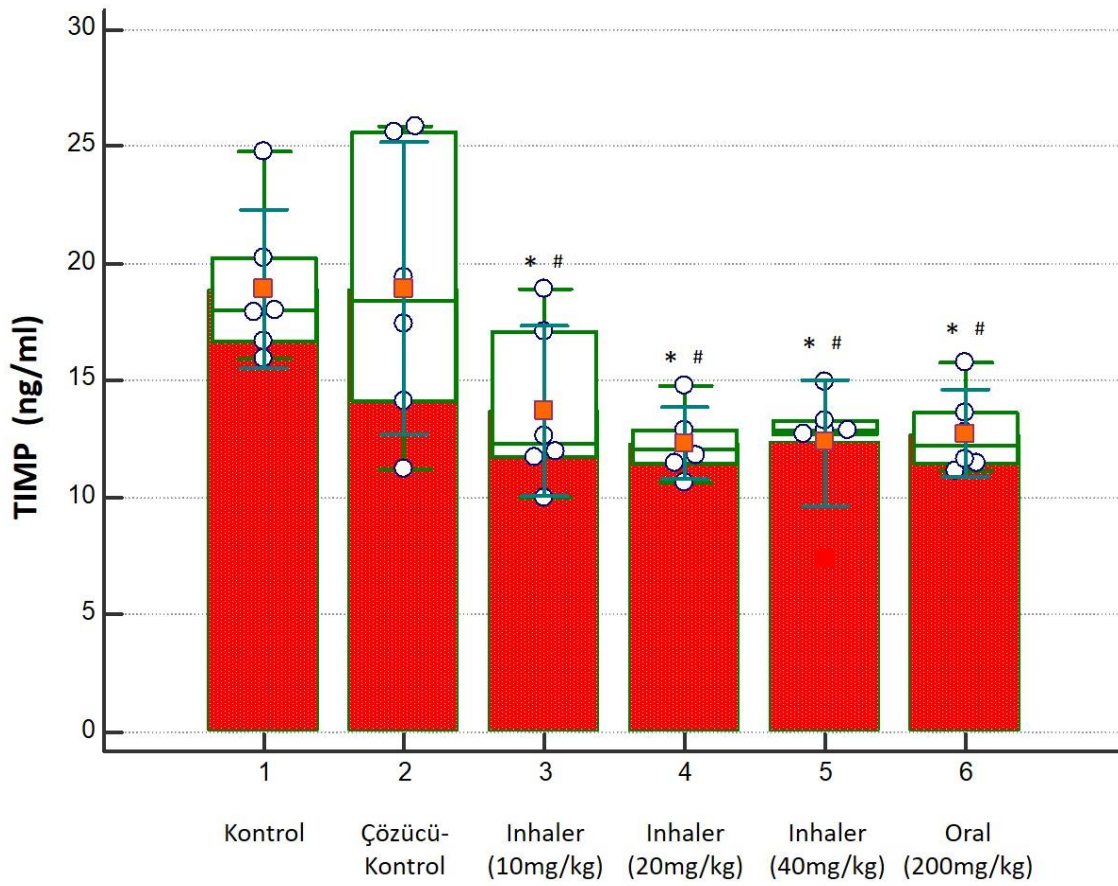
Şekil 4.5. Akciğer dokusu homojenatı SOD derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması. Yeşil kutucuklar kutu-bıyık grafiğini, açık mavi çizgi medyan değerler için %95 güven aralığını belirtmektedir. \*Kontrolden farklı, #Propilen glükol inhalasyon grubundan farklı, (n=6, Kruskal-Wallis p<0,001)

Akciğer homojenatında bakılan TGF- $\beta$  seviyeleri tedavi gruplarında düşük iken, kontrol gruplarında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (Şekil 4.6). Oral ve inhalasyon yolu ile pırfenidon uygulanan gruplar arasında hiçbir fark bulunmamıştır. Sonuçlar, oral ve inhalasyon yolu ile uygulanan pırfenidon tedavisinin inflamasyonun ve akciğer fibrozisin önemli bir belirteçi olan TGF- $\beta$  seviyelerinde belirgin azalma sağladığını göstermektedir.



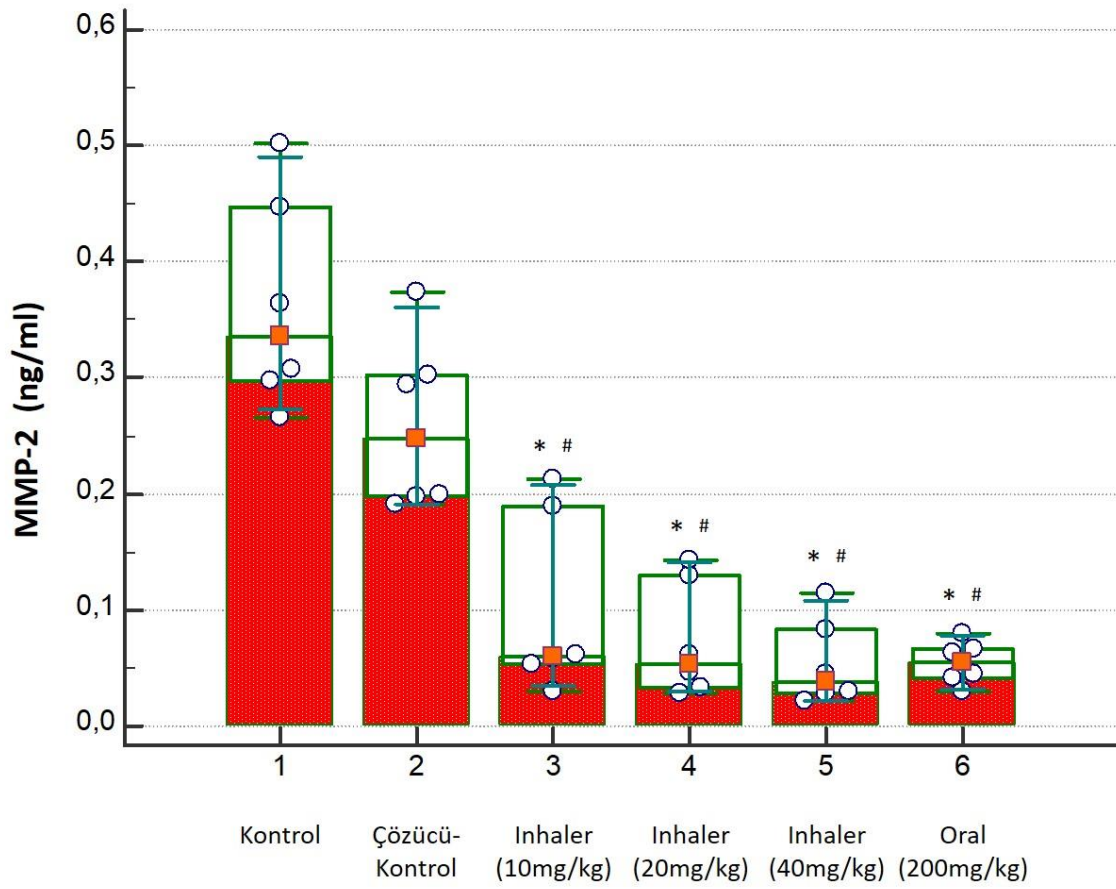
Şekil 4.6. Akciğer dokusu homojenatı TGF- $\beta$  derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması. Yeşil kutucuklar kutu-bıyık grafiğini, açık mavi çizgi medyan değerler için %95 güven aralığını belirtmektedir. \*Kontrolden farklı, #Propilen glikol inhalasyon grubundan farklı, (n=6, Kruskal-Wallis p<0,001)

Akciğer homojenatında bakılan TIMP seviyeleri tedavi gruplarında düşük iken, kontrol gruplarında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (Şekil 4.7). Oral ve inhalasyon yolu ile pirfenidon uygulanan gruplar arasında hiçbir fark bulunmamıştır. Sonuçlar, oral ve inhalasyon yolu ile uygulanan pirfenidon tedavisinin akciğer fibrozisin önemli bir belirteçi olan TIMP seviyelerinde belirgin azalma sağladığını göstermektedir.



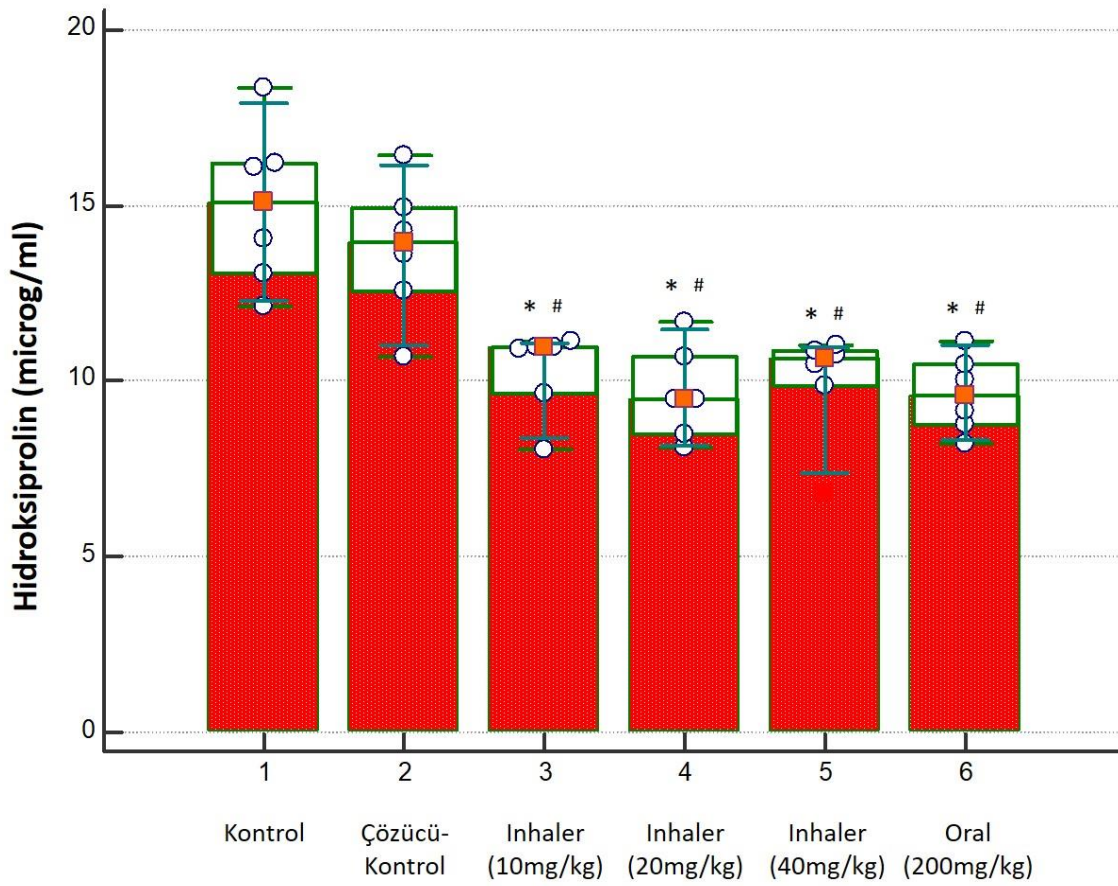
Şekil 4.7. Akciğer dokusu homojenatı TIMP derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması. Yeşil kutucuklar kutu-bıyık grafiğini, açık mavi çizgi medyan değerler için %95 güven aralığını belirtmektedir. \*Kontrolden farklı, #Propilen glikol inhalasyon grubundan farklı, (n=6, Kruskal-Wallis  $p<0,001$ )

Akciğer homojenatında bakılan MMP-2 seviyeleri tedavi gruplarında düşük iken, kontrol gruplarında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (Şekil 4.8). Oral ve inhalasyon yolu ile pirfenidon uygulanan gruplar arasında hiçbir fark bulunmamıştır. Sonuçlar, oral ve inhalasyon yolu ile uygulanan pirfenidon tedavisinin akciğer fibrozisin önemli bir belirteçi olan MMP-2 seviyelerinde belirgin azalma sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.8 Akciğer dokusu homojenatı MMP-2 derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması. Yeşil kutucuklar kutu-bıyık grafiğini, açık mavi çizgi medyan değerler için %95 güven aralığını belirtmektedir. \*Kontrolden farklı, #Propilen glikol inhalasyon grubundan farklı, (n=6, Kruskal-Wallis  $p<0,001$ )

Akciğer homojenatında bakılan hidroksiprolin seviyeleri tedavi gruplarında düşük iken, kontrol gruplarında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (Şekil 4.9). Oral ve inhalasyon yolu ile pirfenidon uygulanan gruplar arasında hiçbir fark bulunmamıştır. Sonuçlar, oral ve inhalasyon yolu ile uygulanan pirfenidon tedavisinin akciğer fibrozisin önemli bir belirteçi olan hidroksiprolin seviyelerinde belirgin azalma sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.9. Akciğer dokusu homojenatı hidroksiprolin derişimlerinin tedavi ve kontrol grupları arası karşılaştırması. Yeşil kutucuklar kutu-bıyık grafiğini, açık mavi çizgi medyan değerler için %95 güven aralığını belirtmektedir. \*Kontrolden farklı, #Propilen glikol inhalasyon grubundan farklı, (n=6, Kruskal-Wallis  $p<0,001$ )

#### 4.2.3. Histopatolojik Değerlendirme

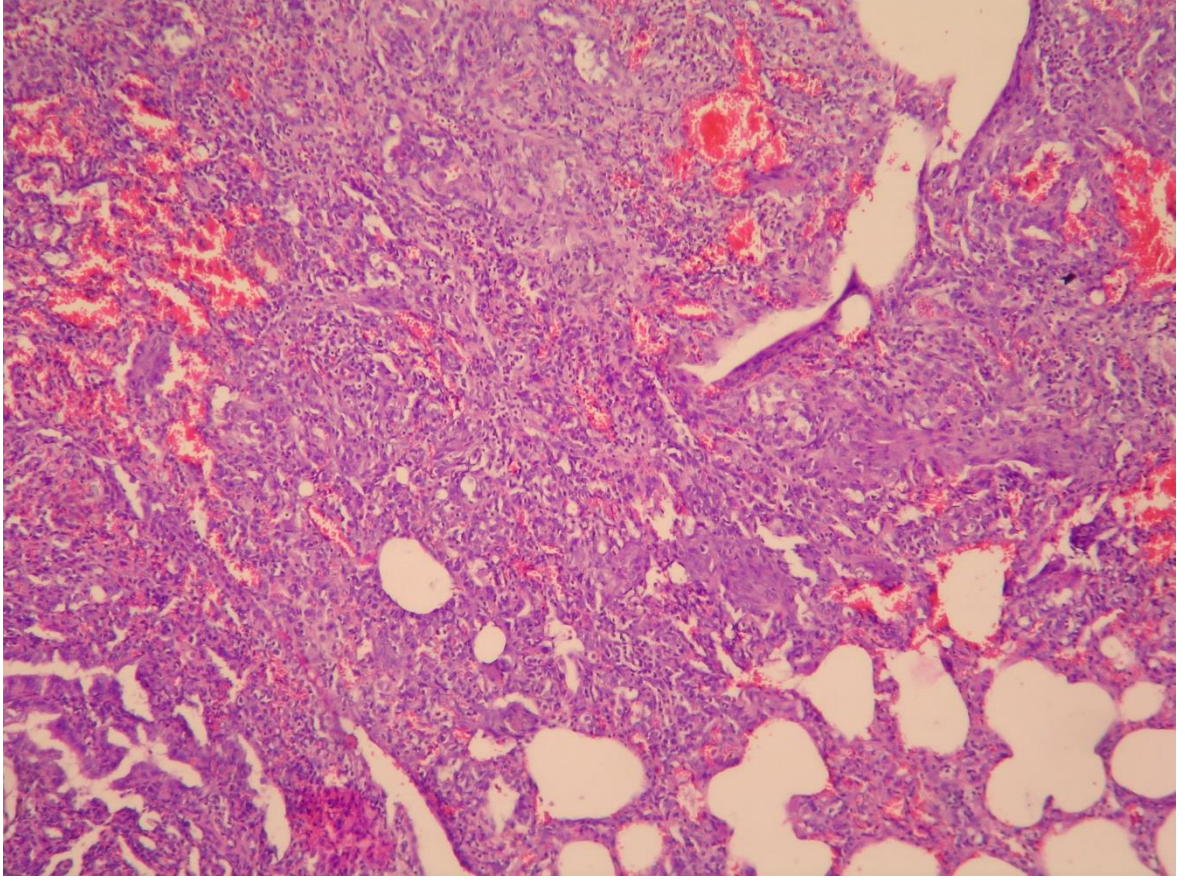
Histopatolojik inceleme sonuçları, oral ve inhalasyon yolu ile uygulanan pirfenidon tedavisinin inflamasyonu ve akciğer fibrozisini azalttığını göstermektedir. Kontrol gruplarında bulunan sıçanların akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde belirgin alveoler hemoraji, alveoler makrofaj infiltrasyonu, enflamasyon ve interstisyel ve peribronşiyal fibrozis izlenmektedir. Resim 4.2. kontrol grubuna ait, Resim 4.3. sadece propilen glikol inhalasyonu alan gruba ait, Resim 4.4., oral tedavi grubuna ait, Resim 4.5., inhaler tedaviyi 10mg/kg dozunda alan, Resim 4.6., inhaler tedaviyi 20mg/kg dozunda alan, Resim 4.7., inhaler tedaviyi 40mg/kg dozunda alan gruba ait örnek histopatolojik inceleme

sonuçlarını göstermektedir. Akciğer fibrozisi derecesi ile hidroksiprolin değerleri arasında da anlamlı ilişki saptanmıştır (Şekil 4.2.9.). Çizelge 4.3.'te histopatolojik inceleme sonuçları özetlenmiştir.

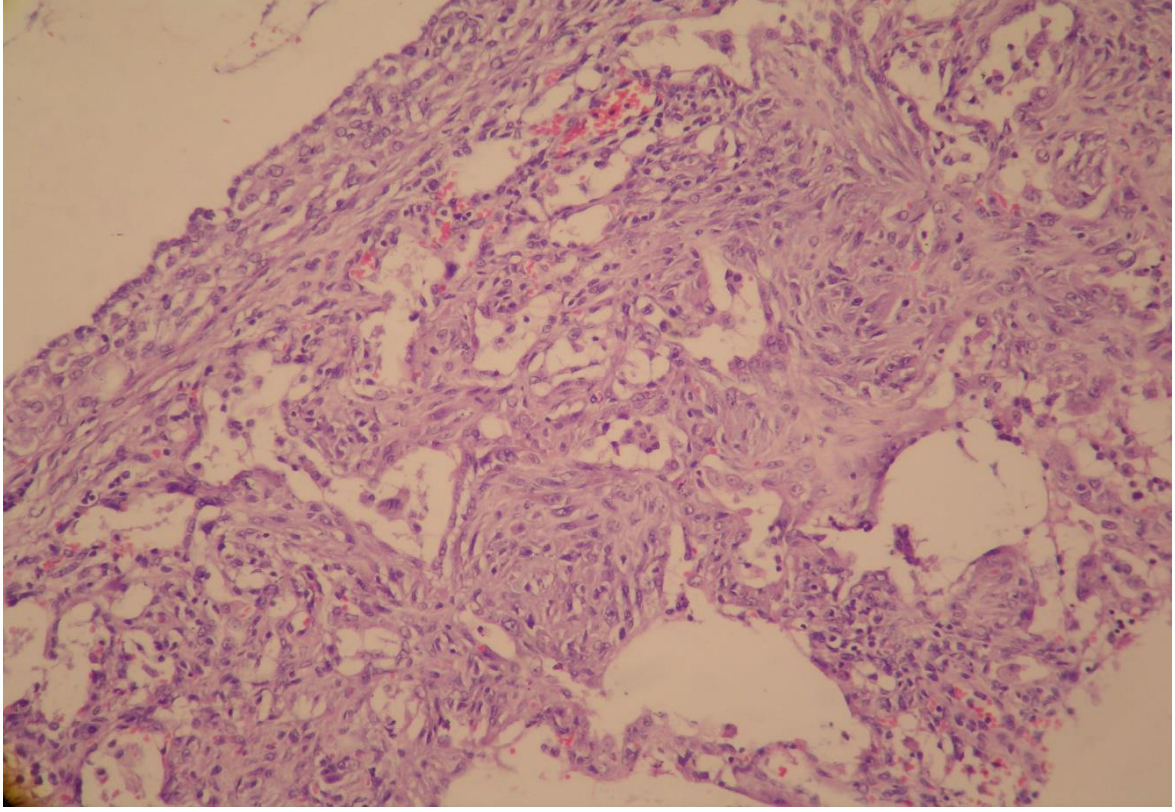
Çizelge 4.3. Tedavi grupları ve kontrol gruplarında histopatolojik inceleme sonuçları

|                          | Alveoler Hemoraji | Hemosiderin Depolanması | Alveoler makrofaj | İnterstisyel enflamasyon | Mukozaal Lenf Nodu | Peribronşiyal fibrosis* | İnterstisyel fibrosis* |
|--------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|
| İnhaler Tedavi (10mg/kg) | Yok-Çok nadir     | Yok                     | Yok               | Hafif- orta şiddette     | Yok                | Yok                     | Hafif                  |
| İnhaler Tedavi (20mg/kg) | Yok-Çok nadir     | Yok                     | Yok               | Hafif-orta şiddette      | Yok                | Yok                     | Hafif                  |
| İnhaler Tedavi (40mg/kg) | Yok               | Yok                     | Yok               | Hafif şiddette           | Yok                | Yok                     | Yok-Hafif              |
| Oral Tedavi (200mg/kg)   | Yok               | Yok                     | Yok               | Hafif şiddette           | Yok                | Yok                     | Hafif                  |
| Propilen Glikol-Kontrol  | Fokal             | Nadir                   | Nadir             | Orta-Yüksek Şiddette     | Orta şiddette      | Orta-yüksek dereceli    | Orta dereceli          |
| Kontrol                  | Fokal             | Nadir-Fokal             | Nadir             | Yüksek Şiddette          | Orta şiddette      | Yüksek dereceli         | Orta dereceli          |

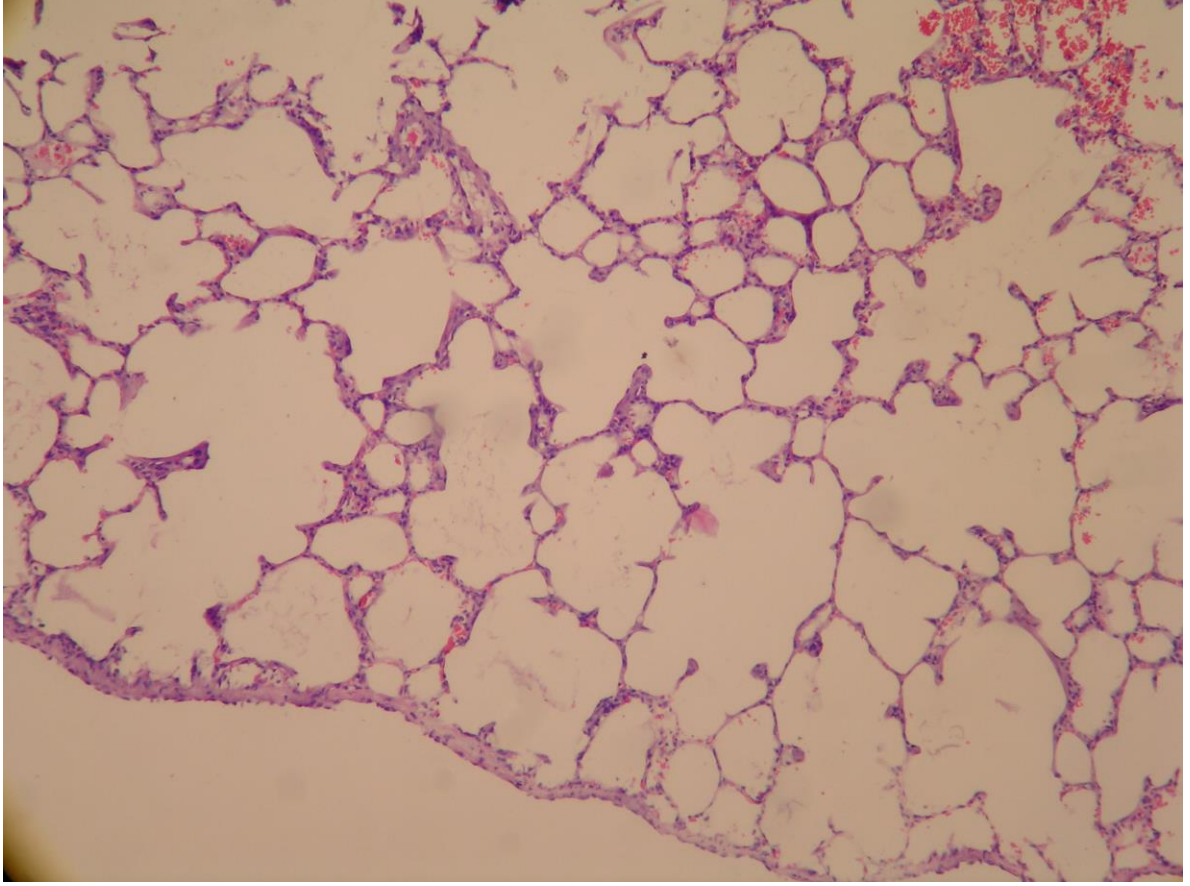
\*Ashcroft sınıflaması[190]



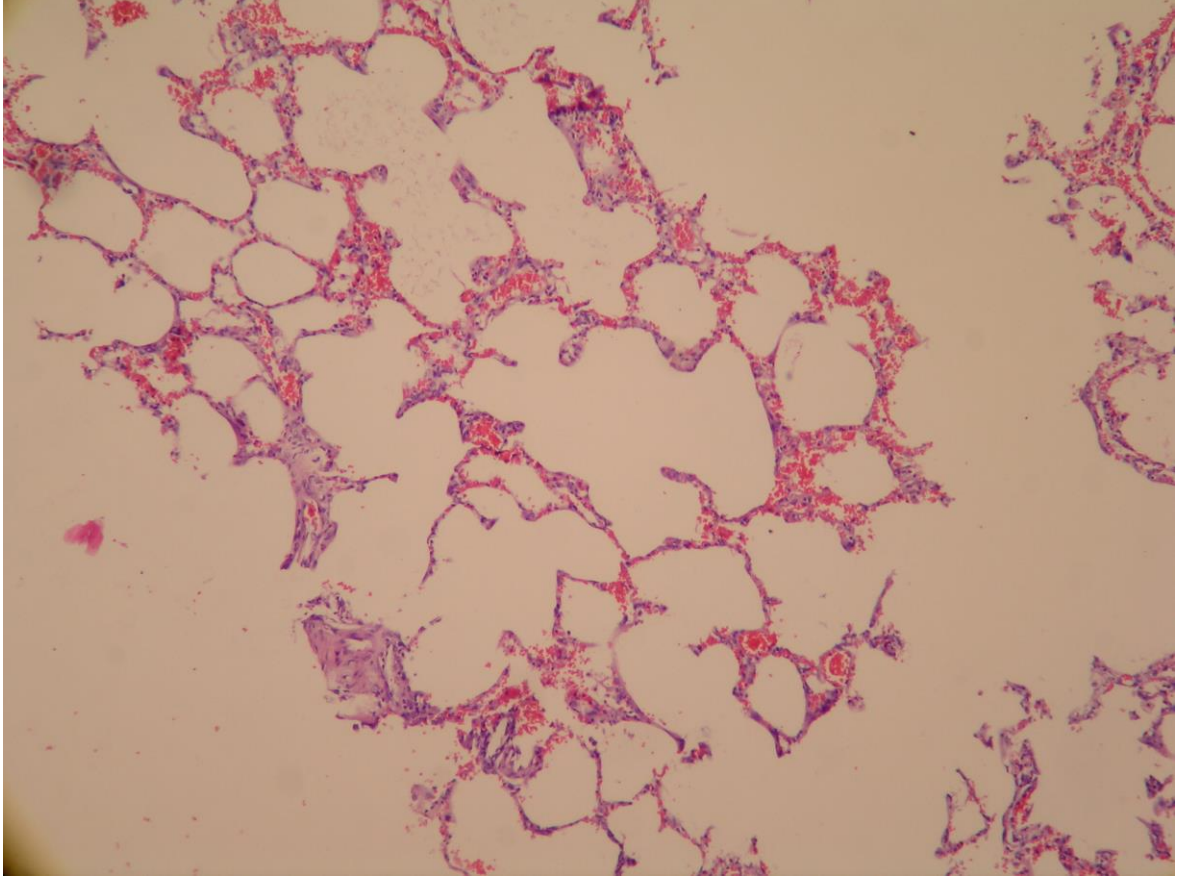
Resim 4.2. Kontrol grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi (Yaygın fibrozis izlenmektedir)



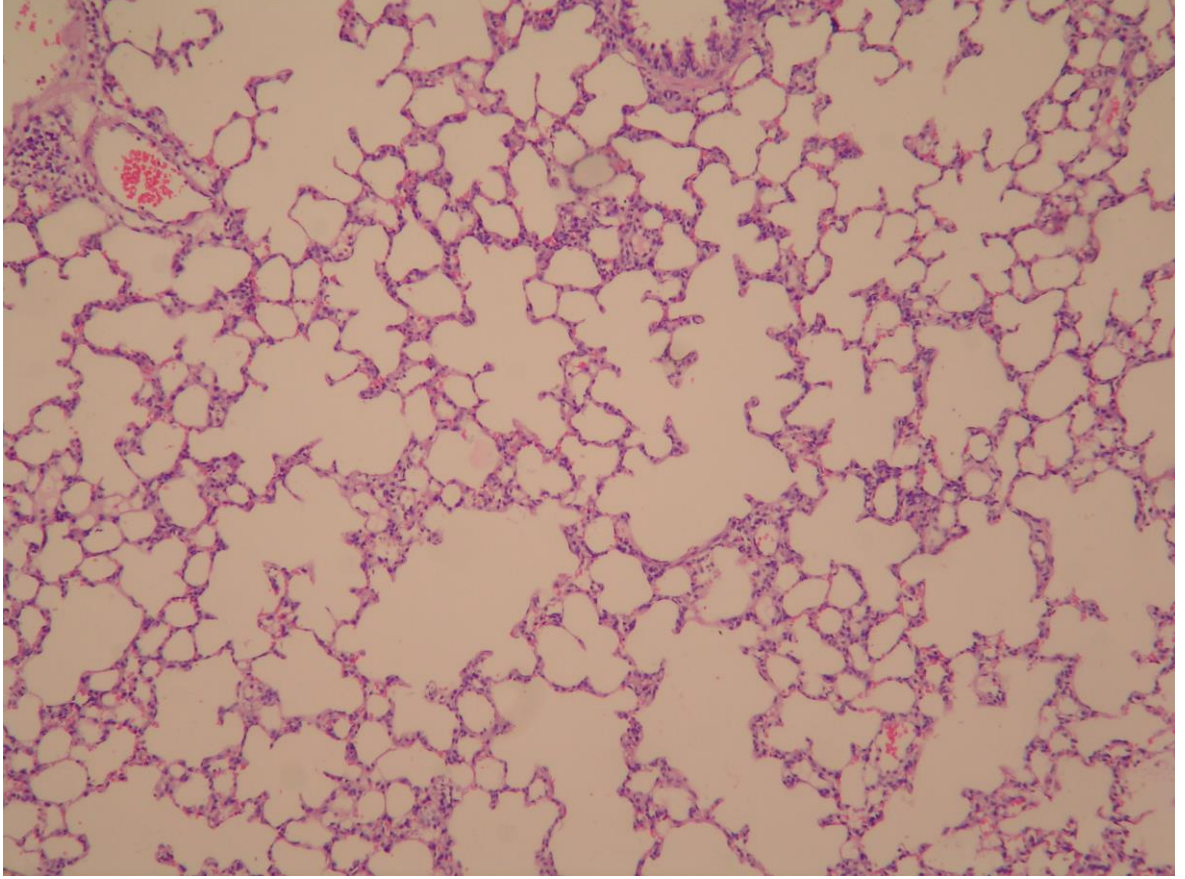
Resim 4.3. Propilen glikol inhalasyon grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi (Belirgin fibrozis izlenmektedir)



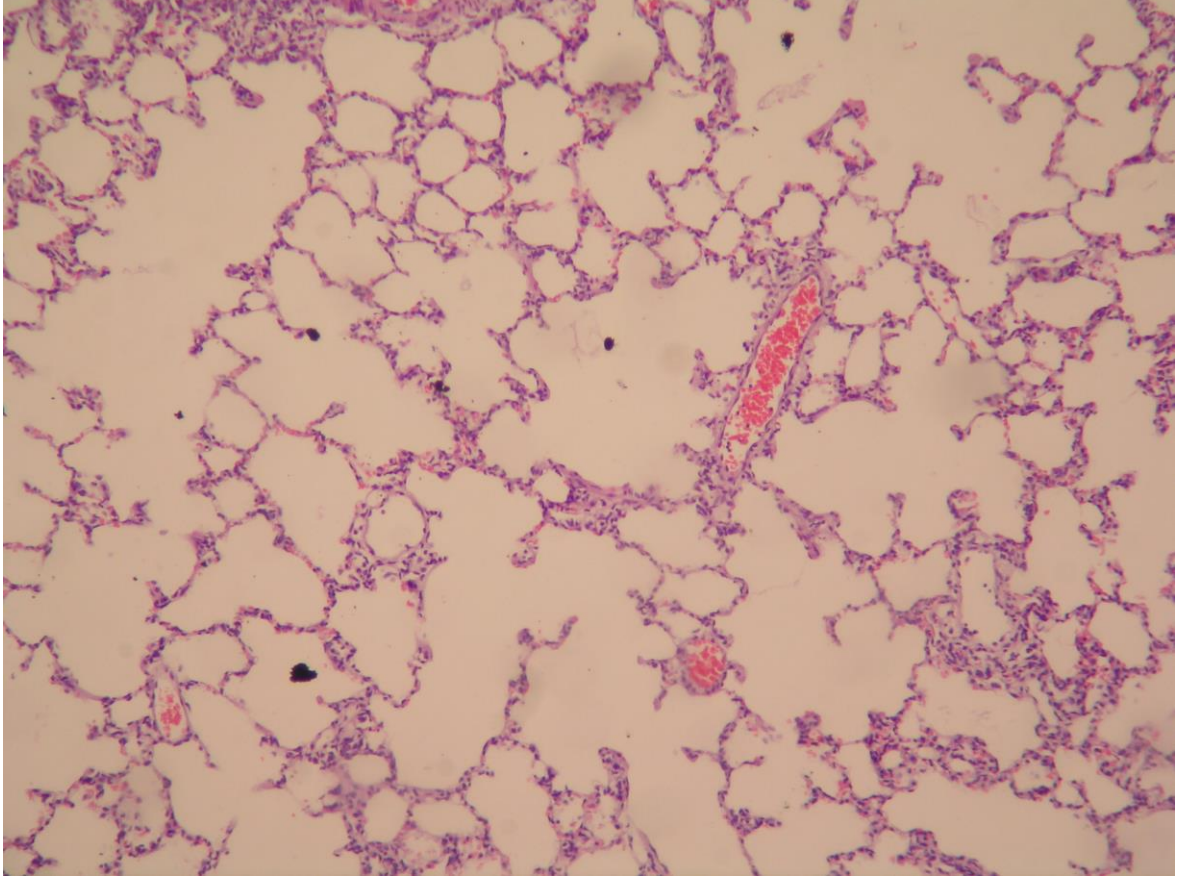
Resim 4.4. Oral tedavi grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi



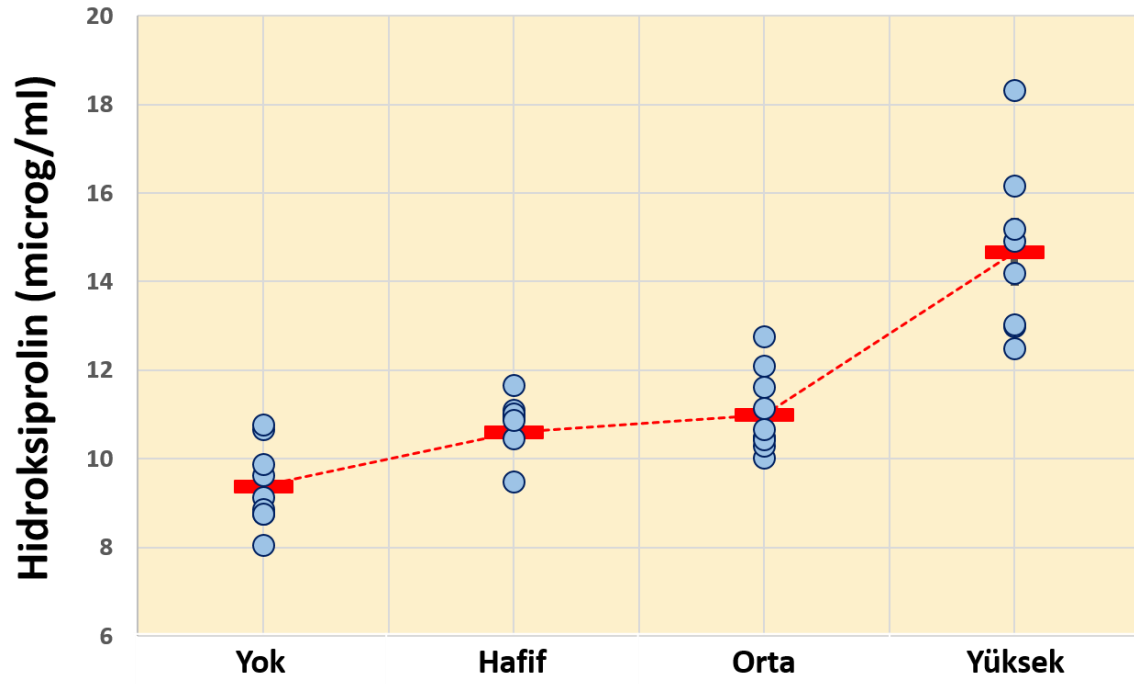
Resim 4.5. İnhaler tedavi (10mg/kg) grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi



Resim 4.6. İnhaler tedavi (20mg/kg) grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi



Resim 4.7. İnhaler tedavi (40mg/kg) grubunda bulunan bir sıçanın akciğer dokusunun mikroskop altında histopatolojik incelemesi



Şekil 4.10. Akciğer fibrozisi derecesi ile hidroksiprolin değerleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi - Fibrozis şiddeti arttıkça hidroksiprolin düzeylerinin de yükseldiği izlenmektedir ( $p < 0,001$  ANOVA)

## 5. TARTIŞMA

Bu tezde gerçekleştirilen çalışmalar ile pirfenidonun EMİS ile yüksek taşınırılığa sahip olduğu, taşınma sırasında yanma ürünü oluşmadığı ve pirfenidonun stabil kaldığı, fibrozis üzerinde EMİS aracılı iletimin oral kullanımla aynı etkiye sahip olduğu ancak gereken dozun yaklaşık olarak 20 kat az olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle pirfenidonun EMİS aracılı inhalasyon yolu ile uygulanmasının fibrozis tedavisinde etkin olacağı ve oral yol ile uygulamada karşılaşılan yan etkilerin daha düşük şiddette görüleceği veya hiç görülmeyeceği düşünülmektedir.

### 5.1. Pulmoner Fibrozis Tedavisinde Pirfenidonun İnhalasyon ile Alınması Neden Gerekli?

İdeal olarak, vücutta tedavi edici etki gösteren ilaçların hastaya iletiminde doğrudan ve hızlı bir şekilde etki bölgesine ulaşan ve buna bağlı olarak daha düşük dozlarda istenen etkiyi gösteren, dolayısıyla yan etkilerin hafifletilmesini ve/veya ortadan kalkmasını sağlayan iletim metodları tercih edilir [191–197].

Pirfenidon tedavisi günde üç defa 1 kapsül (toplam 801 mg/gün) oral yol uygulaması ile başlayıp, 14 günlük bir sürede günde üç defa 3 kapsül (2403 mg/gün) uygulaması ile devam etmektedir. Hiçbir hasta için 2,403 mg/gün üzerindeki dozlar önerilmemektedir. Yapılan klinik çalışmalarda, pirfenidon plasebo ile kıyaslandığında 1. yılda ölüm riskini % 48 azaltmıştır. Ancak pirfenidon kullanan hastalarda, bulantı (% 36), raş (% 32), dispepsi (% 19), sersemlik (% 18), kusma (% 14), fotosensitivite (% 12), anoreksi (% 11), abdominal ağrı, üst solunum yolu enfeksiyonu, diyare, yorgunluk, baş ağrısı, gastroözefageal reflü, sinüzit, insomnia, kilo kaybı ve artralji yan etkileri görülmüştür. Ayrıca, karaciğer enzimlerinde yükselme, fotosensitivite reaksiyonları ve gastrointestinal bozukluklar bildirilmiştir. Bu etkilerin doza bağlı olduğu görülmektedir. Pirfenidon tedavisi ile ilişkili olan bu yan etkiler, pirfenidon oral yoldan yüksek dozlarda uygulandığında şiddetlenmektedir [12, 158–160, 177, 182, 183].

Bireylerde bahsi geçen yan etkilerden biri veya birkaçının görülmesi durumunda yakın takip ve doz azaltılması veya ilacın kesilmesi önerilmektedir. Son dönemde yapılan bir çalışmada 2. derece veya daha kötü olarak derecelendirilen yan etkiler için uygulanan doz kademeli bir

şekilde azaltılmıştır. Ancak dozun minimum seviyeye düşürülmesine rağmen yan etkilerin devam ettiği veya arttığı durumda ilaç kesilmiştir. Uygulanan ilaç dozunun azaltılması veya tamamen kesilmesi hastaların tedavi edilme ve/veya yaşam süresinin uzama ihtimalini ortadan kaldırmaktadır [12, 159, 176, 184].

İnhalasyon yolu ile pirfenidon iletiminin oral yol ile iletme kıyasla birçok avantajı bulunmaktadır. Şöyle ki; pirfenidon düşük potensli bir ilaçtır. Bu sebeple oral yol ile uygulamada yüksek doz uygulaması gerekmektedir. Ancak inhalasyon yolu ile uygulamada düşük dozlarda istenen etkinin alınması mümkündür. Oral uygulamada yüksek doza bağlı yüksek toksisite meydana gelirken, inhalasyon yolu ile uygulamada düşük doza bağlı toksisite azalmıştır. Oral yol ile uygulamada gastrointestinal yan etkiler ciddi boyuttayken, inhalasyon yolu ile uygulamada gastrointestinal yan etkiler görülmez veya azalmıştır. Oral kullanımda hastanın aç veya tok olması pirfenidon emilimini ve yan etkilerin şiddetini değiştirirken, inhalasyon yolu ile alım bu değişkenden etkilenmez. İnhalasyon yolu ile alımda hasta toleransı oral uygulamaya göre daha yüksektir, dolayısıyla tedavi başlangıcında doz ayarlaması gerekmez [21, 198].

Bazı çalışmalar pirfenidon formülasyonlarının nebulizatör, kuru toz ve basınçlı gaz içeren inhalatörler aracılığıyla uygulanmasını değerlendirmektedir. Nebulizatörler, ses dalgaları veya basınçlı hava gibi yöntemler ile sıvı formdaki ilaçları buhar haline getiren ve solunum yoluyla alınabilmesini sağlayan cihazlardır. Ancak genel olarak nebulizatörlerin büyük boyutta olması ve hastane ortamlarında kullanılması sebebiyle bu tedavi yönteminde hasta uyuncu zordur. Son yıllarda gelişen teknolojiye bağlı olarak portatif nebulizatörler geliştirilmiş olsa da bu cihazlarda etkin tedavi için gerekli olan partikül boyutu elde edilememektedir. Doz kararlılığı da oldukça düşüktür. Basınçlı gaz içeren inhalatörler, rahatlıkla taşınabilir olmalarından dolayı nebulizatörlerden daha avantajlıdır ancak bu cihazların kullanımı dikkat, el ve solunum koordinasyonu gerektirdiğinden kullanım rahatlığı açısından dezavantajı bulunmaktadır. Ayrıca bu cihazlarda ilacın etkin ve yeterli bir şekilde hedef alana iletilme ihtimali düşüktür. Bu cihazlarda partikül büyüklüğünün yeteri kadar küçük olmaması sebebiyle dozun çok büyük bir kısmının akciğerlere ulaşmadan sistemik dolaşıma katılacak şekilde farklı noktalarda toplandığı belirlenmiştir. Kuru toz inhalatörler ise kullanım rahatlıkları açısından ön plana çıkmaktadır. Basınçlı gaz içeren inhalatörlerin aksine el ve solunum koordinasyonuna ihtiyaç duyulmaz ve bu sayede hastaların ilacı etkili şekilde almasında çok büyük rol oynar. Ancak bu tip cihazlarda da etkin

tedavi için gerekli olan partikül boyutunun elde edilememesi ve buna bağlı olarak ilacın akciğerlerde istenilen bölgeye tam olarak iletilmemesi bir sorun olarak devam etmektedir [191, 193, 194, 197–202].

Günümüzde inhalasyon yolu ile ilaç iletimi için kullanılan bu yöntemlerin birtakım eksiklikleri vardır. Bu nedenle bu yöntemlerde bulunan eksikliklerin üstesinden gelen farklı inhalasyon yolu ile ilaç iletim yöntemlerinin ve formülasyonlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Geliştirilecek yöntemlerin ve formülasyonların fiyat açısından ekonomik, verimli ve hasta uyumunun kolay olmasının yanı sıra küçük aerosol partikülleri oluşturmaya elverişli olması gereklidir [21].

Bu çalışmada EMİS ile pirfenidon aerosolize formda uygulanmaktadır. Aerosol haline getirilmiş pirfenidon uygulamasında kullanılan dozun daha düşük olması sebebiyle olumsuz yan etkilerin daha az görülebileceği düşünülmektedir. Pirfenidonun bu yöntem ile iletiminin daha homojen ve optimize olması beklenmektedir.

EMİS, nebulizatör cihazlarında üretilen aerosol partiküllerine kıyasla daha küçük partiküllerin elde edilmesi sayesinde akciğer alveollerine ilaç iletiminin daha etkin ve homojen olması sağlanmıştır.

Nebülizatörlerde çözücü olarak genellikle su kullanılmaktadır. Pirfenidonun su ile uygulanması sırasında etkin madde çözünürlüğün düşük olması sebebiyle istenilen dozda etkin maddenin uygulanamaması sorunu ile karşı karşıya kalınmaktadır. Pirfenidonun sudaki çözünürlüğü 10 mg/ml'dir. Bu çalışmamızda EMİS ile aerosol oluşturmak üzere kullanılan propilen glikolde pirfenidon çözünürlüğü 300 mg/ml'dir. Bu nedenle istenilen dozda etkin madde iletimi sağlanmaktadır.

Bu açıdan değerlendirildiğinde EMİS aracılığıyla pirfenidon iletimi hem oral hem de tekniğin bilinen durumunda yer alan diğer inhalasyon metotlarından daha avantajlıdır.

EMİS'lerde, nebulizatörlerde karşılaşılan eksik/ölü doz uygulaması problemi ile karşılaşılmamaktadır. Nebulizatörlerde başlangıçta uygulanan dozun sadece % 5-40'ı hastada etki alanına ulaşırken elektronik nikotin dağıtım sistemlerinde bu oran % 100'dür.

Elektronik nikotin dağıtım sistemlerinin farklı hasta gruplarında kullanıma olanak sağlaması sistemin bir diğer avantajıdır. Hastalar için günlük ihtiyaç duyulan doz, puflama süresi, puf sayısı veya uygulanan doz miktarının değiştirilmesiyle kolaylıkla ayarlanabilir.

## 5.2. İnhalasyon Yolu ile Verilen Pirfenidonun Etkinliği

Pirfenidonun inhalasyon yolu ile uygulanması histolojik ve biyokimyasal olarak gösterildiği üzere oral uygulama ile benzer etkiyi sağlamaktadır. Ancak inhalasyon yolu ile uygulanan doz oral yol ile verilen ilaç dozuna kıyasla oldukça düşüktür ve özgül olmayan etkileri ve yan etkileri azaltmak için güvenilir bir yöntem olarak görünmektedir. Ek olarak, pirfenidonun inhalasyon yoluyla uygulanması, hidroksiprolin içeriği gibi bazı biyokimyasal analizlerde oral veriliş yolundan daha iyi sonuçlar sağlamıştır. Çalışmamızda, intratrakeal bleomisin uygulanmış ve tedavi almayan deney gruplarında akciğer dokularında lipid peroksidasyon seviyelerinde tedavi gruplarına kıyasla önemli bir yükseklik dikkat çekmektedir. Bu etki SOD ve katalaz enzimatik aktivitelerinde de izlenmektedir. İnhalasyon ile pirfenidon uygulanması, lipid peroksidasyonunun azaltılmasında ve enzim aktivitelerinde olumlu etki göstermiş ve oral pirfenidon tedavisi ile aynı etkinliği göstermiştir. Pulmoner fibrozis patolojisinde rol oynayan reaktif oksijen radikallerinin etkilerinin hem oral hem inhaler pirfenidon tedavisi ile iyileştirilebileceği de savunulabilir [203]. Lipid peroksidasyonu ve enzim aktiviteleri bulgularına paralel olarak, akciğer dokusu histopatolojik incelemesi de hem oral hem de inhaler pirfenidonun antienflamatuvar ve antifibrotik etkilerini doğrulayan bulgular göstermektedir. EMİS aracılı inhalasyon yoluyla verilen pirfenidonun dozu ise yaklaşık 20 kat daha azdır. Bu nedenle özgül olmayan etkileri azaltan ve akciğerlere doğrudan ve homojen ilaç verilmesini başarılı bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Ayrıca akciğer dokusunda bulunan hidroksiprolin içeriği ile histopatolojik incelemede izlenen fibrozis derecesi yüksek ilişki göstermektedir. Buda hidroksiprolin analizinin fibrozis değerlendirilmesinde kullanılabilecek bir belirteç olduğunu kanıtlamaktadır. Pirfenidonun inhalasyon yoluyla veya oral yol ile verildiği tedavi gruplarında akciğer dokusundaki hidroksiprolin düzeyleri kontrol gruplarına kıyasla daha düşük saptanmıştır.

Tedavi gruplarında akciğer dokusunda saptanan MMP-2, TIMP, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF seviyeleri kontrol gruplarına kıyasla belirgin düşük saptanmıştır. Bleomisin kaynaklı akciğer hasarının pirfenidon tedavisi ile geriletebildiğini göstermektedir. İnhaler terapi ve oral

tedavi grupları arasında ise farklılık saptanmamıştır. Literatürde pirfenidonun nebülizer aracılığıyla inhalasyon yolu ile verilmesinin oral tedavi ile kıyaslanabilir olduğu gösterilmiştir. [21] Ancak EMİS ile pirfenidonun inhalasyon yolu ile uygulanmasının nebülizerle ortaya çıkabilecek dozlar arası farklılığını ve kullanım zorluğunu ortadan kaldıracığı söylenbilir. TGF-  $\beta$ 1'in farklı organlarda fibrozisin gelişmesinde oynadığı rol daha önce literatürde birçok kez belirtilmiştir [13, 16, 17]. Fibrozis gelişimini önlemek için TGF- $\beta$ 1 etkilerini sınırlamanın uygun yaklaşımlardan biri olduğu da gösterilmiştir [204]. Conte ve arkadaşları, pirfenidonun, TGF-  $\beta$ 1 ile indüklenen sinyal yollarını bloke ederek, insan akciğer fibroblast proliferasyonunu ve myofibroblastlara farklılaşmayı engellediğini belirtmiştir [205]. Nakayama ve arkadaşları, TGF-  $\beta$ 1 ile uyarılmış insan akciğer fibroblastlarında pirfenidonun ısı şok proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki inhibe edici etkisini bildirmişlerdir [181]. Choi ve arkadaşları, pirfenidonun, insan retinal pigment epitel hücre dizisinde nükleer translokasyonunu bloke ederek TGF-  $\beta$ 1 ile indüklenen fibrojenezi inhibe ettiğini belirtmişlerdir [206]. Hisatomi ve arkadaşları ise, pirfenidonun TGF-  $\beta$ 1 ile indüklenen kollajen tip I ve ısı şok proteini 47'nin aşırı ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir [207]. Ayrıca, TNF- $\alpha$  ve TGF-  $\beta$ 1 gibi bazı proinflamatuvar ve profibrojenik sitokinlerin pulmoner inflamasyon ve fibroziste önemli rol oynadıkları da belirtilmektedir [207]. Fibrozisin ilerleyişinde oksidatif stres ve TGF-  $\beta$ 1 arasındaki etkileşim de incelenmiştir. Fibrojenin en önemli aracısı olan TGF-  $\beta$ 1, fibroblastların aktif miyofibroblastlara farklılaşmasında, fibroblast apoptozunda, kollajen üretimi ve biriktirmesinde çok önemli rol oynamaktadır ve reaktif oksijen radikallerinin artmasına neden olarak oksidatif stresi uyarmaktadır. Sonuç olarak kısır bir profibrojenik döngüyü tetiklemektedir. Fibroblastların aktif miyofibroblastlara farklılaşması, fibroblast apoptozunun oluşmaması, kollajen üretimi ve birikmesi fibrojenin kritik belirleyicileri olduğundan, TGF-  $\beta$ 1 inhibisyonu, deneysel modellerde fibrozis gelişimini engelleyen bir belirteç olarak saptanmıştır [15, 208]. Bu çalışmada, TGF- $\beta$ 1 seviyelerinde bleomisin yarattığı pulmoner hasar kaynaklı artışın, inhalasyon ve oral pirfenidon tedavisi ile kontrol altına alınabileceği gösterilmiştir. İnhalasyon yolu ile uygulanan pirfenidonun oral yol ile uygulamaya benzer sonuçlar vermesi lokal tedavinin de pulmone fibrozis tedavisinde etkin olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

TNF- $\alpha$ , enflamatuvar fazın erken evrelerinde alveolar makrofajlardan salgılanan sitokinlerden biridir ayrıca akciğer hasarı sırasında fibrotik fazların geç evrelerinde de ekspresyonu artmaktadır. Pulmoner fibrozisin hayvan modellerinde çalışılan bir sitokindir.

TNF-  $\alpha$ , fibroblastların çoğalmasını ve MMP'ler gibi hücrel matriks birikimini sağlayan genlerinin ekspresyonunu sağlamaktadır. Ek olarak bazı proinflamatuvar sitokinlerin salınımında da rol oynar [19, 21, 22]. MMP'lerin ve bunların fizyolojik inhibitörleri olan TIMP'lerin aşırı ekspresyonu, fibrotik akciğer hastalıklarında gösterilmiştir [209, 210]. MMP'ler, enflamasyon, doku yeniden şekillenmesi ve fibrojeniz sırasında salgılanan hücre dışı matriksin düzenlenmesini sağlayan enzimler ailesi olarak değerlendirilebilir. TGF-  $\beta$ 1 ile indüklenen akciğer fibrojenizinin patogeneğinde TIMP ekspresyonunun artışı önemli rol oynamaktadır [211]. Ek olarak, MMP-2'nin, fibrotik akciğerlerde yaygın şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir. Pirfenidon fibroblastlardan TIMP salgılanmasını azaltabilir ve pulmoner fibrozis tedavisinde bu nedenle güçlü bir etki yarattığı ileri sürülebilir. Çalışmamızda kontrol gruplarında MMP-2 ve TIMP seviyeleri tedavi gruplarına kıyasla belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Oral tedavi alan grup ile inhaler tedavi alan gruplar arasında ise farklılık saptanmamıştır ancak inhaler yolla tedavi verilmesi ilaç dozunun 20 kat kadar düşürülmesine olanak vermiştir. Mevcut bulgular ışığında pirfenidonun inhalasyon tedavisinin daha verimli ve daha özgül olabileceği söylenebilir.

### **5.3. Elektronik Madde İletim Sistemlerinin Sistemik İlaç Veriliş Yolu Olarak Kullanılma Potansiyeli**

Inhaler tedaviler açısından EMİS'in sağladığı ana faydalar bu alanda kullanılan diğer ürünlere kıyasla, daha küçük aerosol partikülleri üretmek ve dozun kararlı olmasıdır. Değişik atomizer ayarları ile belirli sürede taşınan ilaç miktarının kararlı olması her soluk alışveriş sırasında doz ayarlamasına olanak sağlayarak yeni bir uygulama alanı yaratabilir. Bu nedenle günümüzde üzerinde oldukça yoğunlaşılan kişiselleştirilmiş tıp kavramına uygun olarak kullanıcı dostu aerosol cihazları olarak kullanılabilecekleri söylenebilir. EMİS'ler ayrıca değişken anatomik özellikte ve farklı akciğer fonksiyonları bulunan birçok hastalık grubu için nefes başına dozun ayarlanabilmesi, aynı güçte soluk alınırken soluk süresinin uzun tutularak daha fazla doz verilmesi imkânı sağladığından oldukça kullanışlı olabilir. Yine küçük aerosol partikülleri nedeniyle, patolojinin bulunduğu alveoler alana geçişi daha kolay sağlanmaktadır. Ayrıca EMİS ile ilaç verme aşamasında ölü boşluk bulunmaz.

Ancak eğitimsiz veya art niyetli kişiler tarafından kötüye kullanılabileceği de aşikârdır. Bu nedenle hastaların belirli bir eğitimden geçirilmesi önem taşımaktadır. Yine medikal kullanım uygunluk kriterlerinin belirlenmesi gereklidir. EMİS'lerin ilaç verme amacı ile

kullanılmasında verilecek etken maddenin termal kararlılığı çok önemlidir. Geliştirilen teknolojiler ile atomizerler belirli bir sıcaklığın üzerine çıkmaya da çözücünün buharlaşabileceği sıcaklık derecesine ulaştığında etken maddede bozulma olmamalıdır. Cihaz tasarımının hastalığın türüne ve hastalıkların özelliklerine göre belirlenebileceği unutulmamalıdır. Çözeltilerin ilaç konsantrasyonu, cihazın güç seviyesi, cihazın aktif kalma süresinin verilen ilaç miktarı üzerinde belirgin etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu özelliklerin bir ya da birkaçının değişmesi ilaç dozunda büyük değişimlere yol açabilir. Aynı zamanda bu özellik solunum fonksiyonları sınırlı olan hasta popülasyonunda daha düşük süreli inhalasyonla yüksek miktarlarda ilaç iletimini sağlayabileceğinden son derece kullanışlı da olabilir. Cihazların aktif kalma özellikleri de daha önceden belirlenerek kullanıcının yanlışlıkla atomizerleri fazla ısıtmasına olanak vermeden kullanılmasını sağlayabilir. Farklı bir senaryo ise el kordinasyonunun kısıtlı olduğu hastalarda cihaz aktifleştirme düğmesine uygun zaman aralığında basılamaması olabilir. Bu durumda da daha önceden belirlenmiş ve tek basma ile belirli süre aktif kalan cihazların üretilmesi bahsi geçen hasta grubu için kullanıcı dostu bir özellik olacaktır.

Akciğerler sistemik ilaç iletimi için de hızlı bir yol olarak kullanılabilir. Akciğer yatağında çok fazla kapiller bulunduğundan ilaç emilimi çok hızlı gerçekleşir. Alveolar alana ulaşan bir etken maddenin emilmesi de gaz değişimi gibi hızlı olacaktır. Uygulanan doz ile bazı etken maddelerin sistemik dolaşımında etkin konsantrasyona çıkması da muhtemel gözükmektedir.

EMİS'ler birçok özellikleri ve kişiye özgü değiştirilebilen ayarları sayesinde termal olarak kararlı olan ilaçları uygulamak için umut verici bir araç olarak nitelendirilebilir.

#### **5.4. Elektronik Madde İletim Sistemlerinin İlaç Veriliş Yolu Olarak Kullanılmasının Güvenliği**

Günümüzde EMİS piyasada oldukça yaygın kullanılmasına rağmen, bu cihazların güvenlik değerlendirmesi halen bir sorun olmaya devam etmektedir. Sigara içmeyi azaltma veya bırakma aracı olarak kullanıldığında, toksikolojik olarak değerlendirilmesi gereken hususlar, solunan nikotin, solunan aroma katkı maddeleri, ortaya çıkma ihtimali bulunan metalik nanoparçacıklar, çözücülerin yanmasıyla oluşabilecek organik ürünlerdir [212–215]. EMİS'lerin ilaç veriliş yolu olarak kullanılmasında etken maddenin vücut üzerindeki etkileri

ön planda olacaktır. Bu amaçla kullanılan EMİS'lerde nikotin olmayacağından tartışma konusu değildir. Ancak toksikolojik raporların çoğu oluşabilecek yanma ürünlerinin genellikle çözücü kaynaklı değil, çözeltiye eklenen aromalardan kaynaklandığını belirtmektedir. Yine de TÖNA oluşumu dikkatli değerlendirilmelidir. Yanma ürünü oluşturabilecek her türlü maddeden uzak durulmalı, değişik sıcaklıklarda deneyler tekrar edilmelidir. Deneylerimizde piyasada satışa sunulan bir ürün kullanılmıştır. Ancak EMİS'lerin ilaç veriliş amacıyla kullanılması gerçekleştiğinde cihaz özelliklerinin bu konuya özgü olarak tasarlanacağı unutulmamalıdır. Daha hassas ve sıcaklık kontrolü daha iyi olan cihazlarla yanma ürünleri tamamen ortadan kaldırılabilir. Ek olarak yeni EMİS sistemlerinde zaten sıcaklık kontrol mekanizması bulunduğundan yanma ürünü oluşma ihtimali ortadan kalkmaktadır. Başka bir husus ise ilaç veriliş yolu olarak kullanıldığında yüksek standartları olan saf çözücüler kullanılacağı gerçeğidir. Günümüzde ABD'de yaşanan salgın bu açıdan çok önemlidir. Çözücü içerisine eklenen herhangi bir madde EMİS aracılığı ile akciğerlere kadar iletilebilmektedir [95]. Bu bulgular aslında EMİS'lerin ne kadar etkin olduğunu kanıtlar niteliktedir. İçerisinde tedavi amaçlı etken madde ya da herhangi bir toksin konulsa bile EMİS aracılığı ile hızlı ve efektif biçimde akciğerlere iletilmektedir. Basitçe EMİS'leri enjektörlere benzetebiliriz, içerisine ne konulursa onu başarılı bir biçimde iletebilen yeni cihazlar olarak değerlendirmek yanlış olmayacaktır. Ancak EMİS'lerin ilaç veriliş yolu olarak kullanılması için medikal uygunluk kriterlerini sağlaması gerektiğinden günümüzde kullanılan cihazlardan çok daha güvenli olacağı söylenebilir. Metal parçalardan kaynaklanan nanopartiküllerin miktarı bu limitler içerisinde değerlendirilecektir. Günümüzde nebulizatörlerden ve diğer inhaler sistemlerden de parçaçıklı madde maruziyeti bulunmaktadır ve EMİS'lerle salınan miktar bu ilaç veriliş yollarına benzerdir. EMİS sistemlerinde çözücü olarak kullanılan propilen glikol intravenöz ve inhalasyon yolu ile kullanılan birçok ilaç için çözücü olarak kullanılmaktadır. Sistemik dolaşıma girmesinin zararı gösterilememiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız, EMİS'lerin yüksek özgüllikle pirfenidon iletimi için kullanılabileceğini göstermiştir. Pirfenidon EMİS ile pirfenidon çözeltisinden % 100 oranında sürüklenebilmektedir ve termal olarak kararlı kalmıştır, herhangi bir yanma ürünü oluşmadığı bulunmuştur. Ek olarak pirfenidonun EMİS aracılı inhalasyon yolu ile uygulanmasının fibrozis üzerinde oral uygulama ile aynı etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Ancak aynı etkiyi elde etmek için uygulanan doz miktarı oral uygulamada inhalasyon yolu ile uygulamaya kıyasla 20 kat fazladır.

Ortaya koyduğumuz yöntem pirfenidon etkin maddesine ilaveten steroidler (prednizolon), kortikosteroidler, nintedanib, sitotoksik maddeler (azatiyoprin ve siklofosfamid); hem endotelin reseptörü A hem de B'yi hedef alan inhibitörler ve seçici olarak endotelin reseptörü A'yı hedefleyen inhibitörler (ambrisentan, bosentan vb.) platelet kaynaklı büyüme faktörü aktivitesini azaltan ajanlar (imatinib mesilat); fosfodiesteraz 4 inhibitörleri olan ajanlar (Roflumilast); fosfodiesteraz 5 inhibitörleri (sildenafil sitrat, tadalafil vb.) ve antibiyoterapide kullanılan molekülleri ve bu etken maddelerin birçok kombinasyonunu içerebilir. Yakın gelecekte EMİS'lerin akciğer patolojilerinin lokal tedavisinde etkili ve güvenli bir yol olarak kullanılabileceği değerlendirilebilir.

Sonuç olarak pirfenidonun EMİS aracılı inhale kullanımının fibrozis tedavisinde etkin olabileceği ve oral yol ile uygulamada karşılaşılan yan etkilerin daha düşük şiddette görüleceği veya hiç görülmeceği düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Labiris, N. R., and Dolovich, M. B. (2003). Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 56(6), 600–612.
2. Scheuch, G., Kohlhaeufel, M. J., Brand, P., and Siekmeier, R. (2006). Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(9–10), 996–1008.
3. Daniher, D. I., and Zhu, J. (2008). Dry powder platform for pulmonary drug delivery. *Particuology*, 6(4), 225–238.
4. Chow, A. H. L., Tong, H. H. Y., Chattopadhyay, P., and Shekunov, B. Y. (2007). Particle Engineering for Pulmonary Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, 24(3), 411–437.
5. Olsson, B., Bondesson, E., Borgström, L., Edsbäcker, S., Eirefelt, S., Ekelund, K., Gustavsson, L., and Hegelund-Myrbäck, T. (2011). Pulmonary Drug Metabolism, Clearance, and Absorption. *Controlled Pulmonary Drug Delivery*, 21–50.
6. Courrier, H. M., Butz, N., and Vandamme, T. F. (2002). Pulmonary Drug Delivery Systems: Recent Developments and Prospects; *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19(4–5), 425–498.
7. Pourchez, J., de Oliveira, F., Perinel-Ragey, S., Basset, T., Vergnon, J. M., and Prévôt, N. (2017). Assessment of new-generation high-power electronic nicotine delivery system as thermal aerosol generation device for inhaled bronchodilators. *International Journal of Pharmaceutics*, 25(518), 264–269.
8. Torjesen, I. (2013). E-cigarettes are to be regulated as medicines from 2016. *British Medical Journal*, 346(1), 3859–3859.
9. Grana, R., Benowitz, N., and Glantz, S. A. (2014). E-Cigarettes. *Circulation*, 129(19), 1972–1986.
10. Riker, C. A., Lee, K., Darville, A., and Hahn, E. J. (2012). E-Cigarettes: Promise or Peril? *Nursing Clinics of North America*, 47(1), 159–171.
11. Schaefer, C. J., Ruhrmund, D. W., Pan, L., Seiwert, S. D., and Kossen, K. (2011). Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. *European Respiratory Review : An Official Journal of the European Respiratory Society*, 20(120), 85–97.
12. Valeyre, D., Albera, C., Bradford, W. Z., Costabel, U., King, T. E., Leff, J. A., Noble, P. W., Sahn, S. A., and du Bois, R. M. (2014). Comprehensive assessment of the long-term safety of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*, 19(5), 740–747.
13. Fernandez, I. E., and Eickelberg, O. (2012). The Impact of TGF- $\beta$  on Lung Fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 111–116.

14. Isaka, Y. (2018). Targeting TGF-beta Signaling in Kidney Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2532.
15. Willis, B. C., and Borok, Z. (2007). TGF- $\beta$ -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(3), 525–534.
16. Meng, X., Nikolic-Paterson, D. J., and Lan, H. Y. (2016). TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), 325–338.
17. Akhurst, R. J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10), 790–811.
18. Oku, H., Shimizu, T., Kawabata, T., Nagira, M., Hikita, I., Ueyama, A., Matsushima, S., Torii, M., and Arimura, A. (2008). Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *European Journal of Pharmacology*, 590(1–3), 400–408.
19. Grattendick, K. J., Nakashima, J. M., Feng, L., Giri, S. N., and Margolin, S. B. (2008). Effects of three anti-TNF-alpha drugs: etanercept, infliximab and pirfenidone on release of TNF-alpha in medium and TNF-alpha associated with the cell in vitro. *International Immunopharmacology*, 8(5), 679–687.
20. Song, M.-A., Reisinger, S. A., Freudenheim, J. L., Brasky, T. M., Mathé, E. A., McElroy, J. P., Nickerson, Q. A., Weng, D. Y., Wewers, M. D., and Shields, P. G. (2020). Effects of Electronic Cigarette Constituents on the Human Lung: A Pilot Clinical Trial. *Cancer Prevention Research*, 13(2), 1-7.
21. Rasooli, R., Rajaian, H., Pardakhty, A., and Mandegary, A. (2018). Preference of Aerosolized Pirfenidone to Oral Intake: An Experimental Model of Pulmonary Fibrosis by Paraquat. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 31(1), 25–32.
22. Yu, W., Guo, F., and Song, X. (2017). Effects and mechanisms of pirfenidone, prednisone and acetylcysteine on pulmonary fibrosis in rat idiopathic pulmonary fibrosis models. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 450–455.
23. Kakugawa, T., Mukae, H., Hayashi, T., Ishii, H., Abe, K., Fujii, T., Oku, H., Miyazaki, M., Kadota, J., and Kohno, S. (2004). Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The European Respiratory Journal*, 24(1), 57–65.
24. Antoniu, S. A. (2006). Pirfenidone for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 15(7), 823–828.
25. Lee, B. S., Margolin, S. B., and Nowak, R. A. (1998). Pirfenidone: a novel pharmacological agent that inhibits leiomyoma cell proliferation and collagen production. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(1), 219–223.
26. Caponnetto, P., Campagna, D., Papale, G., Russo, C., and Polosa, R. (2012). The emerging phenomenon of electronic cigarettes. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 6(1), 63–74.

27. Orellana-Barrios, M. A., Payne, D., Mulkey, Z., and Nugent, K. (2015). Electronic Cigarettes—A Narrative Review for Clinicians. *The American Journal of Medicine*, 128(7), 674–681.
28. Bertholon, J. F., Becquemin, M. H., Annesi-Maesano, I., and Dautzenberg, B. (2013). Electronic Cigarettes: A Short Review. *Respiration*, 86(5), 433–438.
29. Benowitz, N. L., and Goniewicz, M. L. (2013). The Regulatory Challenge of Electronic Cigarettes. *Journal of American Medical Association*, 310(7), 685.
30. Etter, J.-F., Bullen, C., Flouris, A. D., Laugesen, M., and Eissenberg, T. (2011). Electronic nicotine delivery systems: a research agenda. *Tobacco Control*, 20(3), 243–248.
31. Chapman, S. (2013). Should electronic cigarettes be as freely available as tobacco cigarettes? No. *British Medical Journal*, 346(1), 3840–3840.
32. Farsalinos, K. E., Spyrou, A., Tsimopoulou, K., Stefopoulos, C., Romagna, G., and Voudris, V. (2014). Nicotine absorption from electronic cigarette use: comparison between first and new-generation devices. *Scientific Reports*, 4(1), 4133.
33. Cullen, K. A., Ambrose, B. K., Gentzke, A. S., Apelberg, B. J., Jamal, A., and King, B. A. (2018). Notes from the Field: Use of Electronic Cigarettes and Any Tobacco Product Among Middle and High School Students — United States, 2011–2018. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 67(45), 1276–1277.
34. Polosa, R., Caponnetto, P., Morjaria, J. B., Papale, G., Campagna, D., and Russo, C. (2011). Effect of an electronic nicotine delivery device (e-Cigarette) on smoking reduction and cessation: a prospective 6-month pilot study. *BMC Public Health*, 11, 786.
35. Schripp, T., Markewitz, D., Uhde, E., and Salthammer, T. (2012). Does e-cigarette consumption cause passive vaping? *Indoor Air*, 23(1), 25–31.
36. Leduc, C., and Quoix, E. (2015). Is there a role for e-cigarettes in smoking cessation? *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 10(2), 130–135.
37. Oh, A. Y., and Kacker, A. (2014). Do electronic cigarettes impart a lower potential disease burden than conventional tobacco cigarettes?: Review on e-cigarette vapor versus tobacco smoke. *The Laryngoscope*, 124(12), 2702–2706.
38. Vakkalanka, J. P., Hardison, L. S., and Holstege, C. P. (2014). Epidemiological trends in electronic cigarette exposures reported to U.S. Poison Centers. *Clinical Toxicology*, 52(5), 542–548.
39. Goniewicz, M. L., Knysak, J., Gawron, M., Kosmider, L., Sobczak, A., Kurek, J., Prokopowicz, A., Jablonska-Czapla, M., Rosik-Dulewska, C., Havel, C., Jacob, P. 3rd, and Benowitz, N. (2013). Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tobacco Control*, 23(2), 133–139.
40. Grana, R. A., Popova, L., and Ling, P. M. (2014). A Longitudinal Analysis of Electronic Cigarette Use and Smoking Cessation. *Journal of American Medical Association Internal Medicine*, 174(5), 812.

41. Thiri6n-Romero, I., P6rez-Padilla, R., Zabert, G., and Barrientos-Guti6rrez, I. (2019). Respiratory Impact of Electronic Cigarettes and Low-Risk Tobacco. *Revista de Investigacion Clinica*, 71(1), 17–27.
42. Cobb, N. K., Byron, M. J., Abrams, D. B., and Shields, P. G. (2010). Novel Nicotine Delivery Systems and Public Health: The Rise of the “E-Cigarette.” *American Journal of Public Health*, 100(12), 2340–2342.
43. Dockrell, M., Morrison, R., Bauld, L., and McNeill, A. (2013). E-Cigarettes: Prevalence and Attitudes in Great Britain. *Nicotine and Tobacco Research*, 15(10), 1737–1744.
44. Jimenez Ruiz, C. A., Solano Reina, S., de Granda Orive, J. I., Signes-Costa Minaya, J., de Higes Martinez, E., Riesco Miranda, J. A., Altet G6mez, N., Lorza Blasco, J. J., Barrueco Ferrero, M., and de Lucas Ramos, P. (2014). The Electronic Cigarette. Official Statement of the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR) on the Efficacy, Safety and Regulation of Electronic Cigarettes. *Archivos de Bronconeumolog6a*, 50(8), 362–367.
45. Cho, J. H., Shin, E., and Moon, S.-S. (2011). Electronic-Cigarette Smoking Experience Among Adolescents. *Journal of Adolescent Health*, 49(5), 542–546.
46. Bullen, Christopher, Howe, C., Laugesen, M., McRobbie, H., Parag, V., Williman, J., and Walker, N. (2013). Electronic cigarettes for smoking cessation: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 382(9905), 1629–1637
47. Britton, J., Arnott, D., McNeill, A., and Hopkinson, N. (2016). Nicotine without smoke—putting electronic cigarettes in context. *British Medical Journal*, 27(353), 1745.
48. McRobbie, H., Bullen, C., Hartmann-Boyce, J., and Hajek, P. (2014). Electronic cigarettes for smoking cessation and reduction. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12(1), 10216
49. Odum, L. E., O’Dell, K. A., and Schepers, J. S. (2012). Electronic Cigarettes. *Journal of Pharmacy Practice*, 25(6), 611–614.
50. Grana, R. A. (2013). Electronic Cigarettes: A New Nicotine Gateway? *Journal of Adolescent Health*, 52(2), 135–136.
51. Cooke, A., Fergeson, J., Bulkhi, A., and Casale, T. B. (2015). The Electronic Cigarette: The Good, the Bad, and the Ugly. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 3(4), 498–505.
52. Pepper, J. K., and Brewer, N. T. (2013). Electronic nicotine delivery system (electronic cigarette) awareness, use, reactions and beliefs: a systematic review. *Tobacco Control*, 23(5), 375–384.
53. Adkison, S. E., O’Connor, R. J., Bansal-Travers, M., Hyland, A., Borland, R., Yong, H.-H., Cummings K.M., McNeill A., Thrasher J.F., Hammond D. and Fong, G. T. (2013). Electronic Nicotine Delivery Systems. *American Journal of Preventive Medicine*, 44(3), 207–215.

54. Etter, Jean-François. (2010). Electronic cigarettes: a survey of users. *BMC Public Health*, 10(1), 231.
55. Unger, M., and Unger, D. W. (2018). E-cigarettes/electronic nicotine delivery systems: a word of caution on health and new product development. *Journal of Thoracic Disease*, 10(22), 2588–2592.
56. Kaisar, M. A., Prasad, S., Liles, T., and Cucullo, L. (2016). A decade of e-cigarettes: Limited research and unresolved safety concerns. *Toxicology*, 365, 67–75.
57. Bhatnagar, A., Whitsel, L. P., Ribisl, K. M., Bullen, C., Chaloupka, F., Piano, M. R., Robertson, R. M., McAuley, T., Goff, D., and Benowitz, N. (2014). Electronic Cigarettes. *Circulation*, 130(16), 1418–1436.
58. Crotty Alexander, L. E., Vyas, A., Schraufnagel, D. E., and Malhotra, A. (2015). Electronic cigarettes: the new face of nicotine delivery and addiction. *Journal of Thoracic Disease*, 7(8), 248–251.
59. Knorst, M. M., Benedetto, I. G., Hoffmeister, M. C., and Gazzana, M. B. (2014). The electronic cigarette: the new cigarette of the 21st century? *Jornal Brasileiro de Pneumologia: Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisilogia*, 40(5), 564–572.
60. Famele, M., Ferranti, C., Abenavoli, C., Palleschi, L., Mancinelli, R., and Draisci, R. (2014). The Chemical Components of Electronic Cigarette Cartridges and Refill Fluids: Rev of Analytical Methods. *Nicotine and Tobacco Research*, 17(3), 271–279.
61. Farsalinos, K. E., and Polosa, R. (2014). Safety evaluation and risk assessment of electronic cigarettes as tobacco cigarette substitutes: A systematic review. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 5(2), 67–86.
62. Etter, Jean-François, and Bullen, C. (2011). Electronic cigarette: users profile, utilization, satisfaction and perceived efficacy. *Addiction*, 106(11), 2017–2028.
63. Rom, O., Pecorelli, A., Valacchi, G., and Reznick, A. Z. (2014). Are E-cigarettes a safe and good alternative to cigarette smoking? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340(1), 65–74.
64. Laugesen, M. (2008, October). *Safety Report on the Ruyan® e-cigarette Cartridge and Inhaled Aerosol*. *Health New Zeland*, 1.
65. Laugesen, M. (2009). *Ruyan®E-cigarette Bench-top tests*. Society for Research on Nicotine and Tobacco (Society for Research on Nicotine and Tobacco abstracts), 1.
66. Internet: Westenberger, B. (2009) *Evaluation of e-Cigarettes*. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Division of Pharmaceutical Analysis. Available at: Web: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/Scienceresearch/UCM173250.pdf>
67. Kim, H.-J., and Shin, H.-S. (2013). Determination of tobacco-specific nitrosamines in replacement liquids of electronic cigarettes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatograph.*, 1291, 48–55.

68. Cahn, Z., and Siegel, M. (2010). Electronic cigarettes as a harm reduction strategy for tobacco control: A step forward or a repeat of past mistakes? *Journal of Public Health Policy*, 32(1), 16–31.
69. Antal, M. J., Mok, W. S. L., Roy, J. C., -Raissi, A. T., and Anderson, D. G. M. (1985). Pyrolytic sources of hydrocarbons from biomass. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 8, 291–303.
70. Stein, Y. S., Antal, M. J., and Jones, M. (1983). A study of the gas-phase pyrolysis of glycerol. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 4(4), 283–296.
71. Farsalinos, K., Romagna, G., Tsiapras, D., Kyrzopoulos, S., and Voudris, V. (2013). Evaluation of Electronic Cigarette Use (Vaping) Topography and Estimation of Liquid Consumption: Implications for Research Protocol Standards Definition and for Public Health Authorities' Regulation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(6), 2500–2514.
72. Williams, M., Villarreal, A., Bozhilov, K., Lin, S., and Talbot, P. (2013). Metal and Silicate Particles Including Nanoparticles Are Present in Electronic Cigarette Cartomizer Fluid and Aerosol. *PLoS ONE*, 8(3), 57987.
73. Bahl, V., Lin, S., Xu, N., Davis, B., Wang, Y., and Talbot, P. (2012). Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reproductive Toxicology*, 34(4), 529–537.
74. Romagna, G., Alliffranchini, E., Bocchietto, E., Todeschi, S., Esposito, M., and Farsalinos, K. E. (2013). Cytotoxicity evaluation of electronic cigarette vapor extract on cultured mammalian fibroblasts (ClearStream-LIFE): comparison with tobacco cigarette smoke extract. *Inhalation Toxicology*, 25(6), 354–361.
75. Farsalinos, K., Romagna, G., Alliffranchini, E., Ripamonti, E., Bocchietto, E., Todeschi, S., Tsiapras, D., Kyrzopoulos, S., and Voudris, V. (2013). Comparison of the Cytotoxic Potential of Cigarette Smoke and Electronic Cigarette Vapour Extract on Cultured Myocardial Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(10), 5146–5162.
76. Robertson, O. H., Puck, T. T., Lemon, H. F., and Loosli, C. G. (1943). The lethal effect of triethylene glycol vapor on air-borne bacteria and influenza virus. *Science*, 97(2510), 142–144.
77. Werley, M. S., McDonald, P., Lilly, P., Kirkpatrick, D., Wallery, J., Byron, P., and Venitz, J. (2011). Non-clinical safety and pharmacokinetic evaluations of propylene glycol aerosol in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs. *Toxicology*, 287(1–3), 76–90.
78. Varughese, S., Teschke, K., Brauer, M., Chow, Y., van Netten, C., and Kennedy, S. M. (2005). Effects of theatrical smokes and fogs on respiratory health in the entertainment industry. *American Journal of Industrial Medicine*, 47(5), 411–418.
79. Wieslander, G. (2001). Experimental exposure to propylene glycol mist in aviation emergency training: acute ocular and respiratory effects. *Occupational and Environmental Medicine*, 58(10), 649–655.

80. Renne, R. A., Wehner, A. P., Greenspan, B. J., Deford, H. S., Ragan, H. A., Westerberg, R. B., Buschbom, R. L., Burger, G. T., Hayes, A. W., Suber, R. L., and Mosberg, A. T. (1992). 2-Week and 13-Week Inhalation Studies of Aerosolized Glycerol in Rats. *Inhalation Toxicology*, 4(2), 95–111.
81. Polosa, R., Rodu, B., Caponnetto, P., Maglia, M., and Raciti, C. (2013). A fresh look at tobacco harm reduction: the case for the electronic cigarette. *Harm Reduction Journal*, 10(1), 19.
82. Dawkins, L., Turner, J., Roberts, A., and Soar, K. (2013). ‘Vaping’ profiles and preferences: an online survey of electronic cigarette users. *Addiction*, 108(6), 1115–1125.
83. Caponnetto, P., Auditore, R., Russo, C., Cappello, G., and Polosa, R. (2013). Impact of an Electronic Cigarette on Smoking Reduction and Cessation in Schizophrenic Smokers: A Prospective 12-Month Pilot Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(2), 446–461.
84. Bullen, C., McRobbie, H., Thornley, S., Glover, M., Lin, R., and Laugesen, M. (2010). Effect of an electronic nicotine delivery device (e cigarette) on desire to smoke and withdrawal, user preferences and nicotine delivery: randomised cross-over trial. *Tobacco Control*, 19(2), 98–103.
85. Vardavas, C. I., Anagnostopoulos, N., Kougias, M., Evangelopoulou, V., Connolly, G. N., and Behrakis, P. K. (2012). Short-term Pulmonary Effects of Using an Electronic Cigarette. *Chest*, 141(6), 1400–1406.
86. Palamidas, A., Tsikrika, S., Katsaounou, P., Vakali, S., Gennimata, S.-A., kaltsakas, G., Gratziou, C., and Koulouris, N. (2017). Acute effects of short term use of e-cigarettes on airways physiology and respiratory symptoms in smokers with and without airways obstructive diseases and in healthy non smokers. *Tobacco Prevention and Cessation*, 3(5), 1-8.
87. Farsalinos, K. E., Tsiapras, D., Kyrzopoulos, S., Savvopoulou, M., and Voudris, V. (2014). Acute effects of using an electronic nicotine-delivery device (electronic cigarette) on myocardial function: comparison with the effects of regular cigarettes. *BMC Cardiovascular Disorders*, 14(1), 78.
88. Farsalinos, K., Romagna, G., Alliffranchini, E., Ripamonti, E., Bocchietto, E., Todeschi, S., Tsakalou, M., Avramidou, E., Vasilopoulou, D., Romagna, D., and Voudris, V. (2013). Immediate effects of electronic cigarette use on coronary circulation and blood carboxyhemoglobin levels: comparison with cigarette smoking. *European Heart Journal*, 34(suppl 1), 102.
89. Van Staden, S. R., Groenewald, M., Engelbrecht, R., Becker, P. J., and Hazelhurst, L. T. (2013). Carboxyhaemoglobin levels, health and lifestyle perceptions in smokers converting from tobacco cigarettes to electronic cigarettes. *South African Medical Journal*, 103(11), 865.
90. Bhatta, D. N., and Glantz, S. A. (2019). Electronic Cigarette Use and Myocardial Infarction Among Adults in the US Population Assessment of Tobacco and Health. *Journal of the American Heart Association*, 8(12), 12317.

91. Alzahrani, T., Pena, I., Temesgen, N., and Glantz, S. A. (2018). Association Between Electronic Cigarette Use and Myocardial Infarction. *American Journal of Preventive Medicine*, 55(4), 455–461.
92. Middlekauff, H. R., and Gornbein, J. (2019). Association of Electronic Cigarette Use With Myocardial Infarction: Persistent Uncertainty. *American Journal of Preventive Medicine*, 56(1), 159–160.
93. George, J., Hussain, M., Vadiveloo, T., Ireland, S., Hopkinson, P., Struthers, A. D., Donnan, P. T., Khan, F., and Lang, C. C. (2019). Cardiovascular Effects of Switching From Tobacco Cigarettes to Electronic Cigarettes. *Journal of the American College of Cardiology*, 74(25), 3112–3120.
94. Kuntic, M., Oelze, M., Steven, S., Kröller-Schön, S., Stamm, P., Kalinovic, S., Frenis, K., Vujacic-Mirski, K., Bayo Jimenez, M. T., Kvandova, M., Filippou, K., Al Zuabi, A., Brückl, V., Hahad, O., Daub, S., Varveri, F., Gori, T., Huesmann, R., Hoffmann, T., Schmidt, F. P., Keaney, J. F., Daiber, A., and Münzel, T. (In press). Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction: evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH oxidase (NOX-2). *European Heart Journal*, 1–13.
95. Giroud, C., de Cesare, M., Berthet, A., Varlet, V., Concha-Lozano, N., and Favrat, B. (2015). E-Cigarettes: A Review of New Trends in Cannabis Use. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 9988–10008.
96. Madison, M. C., Landers, C. T., Gu, B.-H., Chang, C.-Y., Tung, H.-Y., You, R., Hong, M. J., Baghaei, N., Song, L.-Z., Porter, P., Putluri, N., Salas, R., Gilbert, B. E., Levental, I., Campen, M. J., Corry, D. B., and Kheradmand, F. (2019). Electronic cigarettes disrupt lung lipid homeostasis and innate immunity independent of nicotine. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4290–4304.
97. Lester, W. J., Dunklin, E., and Robertson, O. H. (1952). Bactericidal Effects of Propylene and Triethylene Glycol Vapors on Airborne Escherichia coli. *Science*, 115(2988), 379–382.
98. Mather, J. M., and McClure, A. D. (1945). Experiences with the Use of Propylene Glycol as a Bactericidal Aerosol in an R.C.A.F. Barracks. *Canadian Journal of Public Health / Revue Canadienne de Sante'e Publique*, 36(5), 181–187.
99. Raghu, G., Remy-Jardin, M., Myers, J. L., Richeldi, L., Ryerson, C. J., Lederer, D. J., Behr, J., Cottin, V., Danoff, S. K., Morell, F., Flaherty, K. R., Wells, A., Martinez, F. J., Azuma, A., Bice, T. J., Bouros, D., Brown, K. K., Collard, H. R., Duggal, A., Galvin, L., Inoue, Y., Jenkins, R. G., Johkoh, T., Kazerooni, E. A., Kitaichi, M., Knight, S. L., Mansour, G., Nicholson, A. G., Pipavath, S. N. J., Buendía-Roldán, I., Selman, M., Travis, W. D., Walsh, S., and Wilson, K. C. (2018). Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 198(5), 44–68.

100. Raghu, G., Collard, H. R., Egan, J. J., Martinez, F. J., Behr, J., Brown, K. K., Colby, T. V., Cordier, J.-F., Flaherty, K. R., Lasky, J. A., Lynch, D. A., Ryu, J. H., Swigris, J. J., Wells, A. U., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D. M., Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman, M., Dudden, R. F., Griss, B. S., Protzko, S. L., and Schünemann, H. J. (2011). An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(6), 788–824.
101. Travis, W. D., Costabel, U., Hansell, D. M., King, T. E., Lynch, D. A., Nicholson, A. G., Ryerson, C. J., Ryu, J. H., Selman, M., Wells, A. U., Behr, J., Bouros, D., Brown, K. K., Colby, T. V., Collard, H. R., Cordeiro, C. R., Cottin, V., Crestani, B., Drent, M., Dudden, R. F., Egan, J., Flaherty, K., Hogaboam, C., Inoue, Y., Johkoh, T., Kim, D. S., Kitaichi, M., Loyd, J., Martinez, F. J., Myers, J., Protzko, S., Raghu, G., Richeldi, L., Sverzellati, N., Swigris, J., and Valeyre, D. (2013). An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(6), 733–748.
102. Raghu, G., Rochwerg, B., Zhang, Y., Garcia, C. A. C., Azuma, A., Behr, J., Brozek, J. L., Collard, H. R., Cunningham, W., Homma, S., Johkoh, T., Martinez, F. J., Myers, J., Protzko, S. L., Richeldi, L., Rind, D., Selman, M., Theodore, A., Wells, A. U., Hoogsteden, H., and Schünemann, H. J (2015). An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(2), 3–19.
103. Behr, J. (2012). Approach to the Diagnosis of Interstitial Lung Disease. *Clinics in Chest Medicine*, 33(1), 1–10.
104. Demedts, M., and Costabel, U. (2002). ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *European Respiratory Journal*, 19(5), 794–796.
105. Liebow, A. Carrington, C. B. (1969). The Interstitial Pneumonias. *Frontiers of Pulmonary Radiology, Grune and Stratton, New York*, 102-141.
106. Kim, D. S. (2006). Classification and Natural History of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 285–292.
107. Raghu, G., Weycker, D., Edelsberg, J., Bradford, W. Z., and Oster, G. (2006). Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(7), 810–816.
108. Raghu, G., Chen, S.-Y., Hou, Q., Yeh, W.-S., and Collard, H. R. (2016). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in US adults 18–64 years old. *European Respiratory Journal*, 48(1), 179–186.
109. Musellim, B., Okumus, G., Uzaslan, E., Akgün, M., Cetinkaya, E., Turan, O., Akkoclu, A., Hazar, A., Kokturk, N., and Calisir, H. C.. (2013). Epidemiology and distribution of interstitial lung diseases in Turkey. *The Clinical Respiratory Journal*, 8(1), 55–62.

110. Baumgartner, K. B., Samet, J. M., Stidley, C. A., Colby, T. V, and Waldron, J. A. (1997). Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155(1), 242–248.
111. Miyake, Y., Sasaki, S., Yokoyama, T., Chida, K., Azuma, A., Suda, T., Suda, T., Kudoh, S., Sakamoto, N., Okamoto, K., Kobashi, G., Washio, M., Inaba, Y., and Tanaka, H. (2005). Case-control study of medical history and idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Respirology*, 10(4), 504–509.
112. Ryu, J. H., Colby, T. V, Hartman, T. E., and Vassallo, R. (2001). Smoking-related interstitial lung diseases: a concise review. *European Respiratory Journal*, 17(1), 122–132.
113. Iwai, K., Mori, T., Yamada, N., Yamaguchi, M., and Hosoda, Y. (1994). Idiopathic pulmonary fibrosis. Epidemiologic approaches to occupational exposure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 150(3), 670–675.
114. Taskar, V. S. (2006). Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis an Environmental Disease? *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 293–298.
115. Kitamura, H., Ichinose, S., Hosoya, T., Ando, T., Ikushima, S., Oritsu, M., and Takemura, T. (2007). Inhalation of inorganic particles as a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis—Elemental microanalysis of pulmonary lymph nodes obtained at autopsy cases. *Pathology - Research and Practice*, 203(8), 575–585.
116. Tang, Y.-W., Johnson, J. E., Browning, P. J., Cruz-Gervis, R. A., Davis, A., Graham, B. S., Brigham, K. L., Oates, J. A., Loyd, J. E., and Stecenko, A. A. (2003). Herpesvirus DNA Is Consistently Detected in Lungs of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2633–2640.
117. Calabrese, F., Kipar, A., Lunardi, F., Balestro, E., Perissinotto, E., Rossi, E., Nannini, N., Marulli, G., Stewart, J. P., and Rea, F. (2013). Herpes Virus Infection Is Associated with Vascular Remodeling and Pulmonary Hypertension in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE*, 8(2), 55715.
118. Yonemamaru, M., Kasuga, I., Kusumoto, H., Kunisawa, A., Kiyokawa, H., Kuwabara, S., Ichinose, Y., and Toyama, K. (1997). Elevation of antibodies to cytomegalovirus and other herpes viruses in pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 10(9), 2040–2045.
119. Zamo, A., Poletti, V., Reghellin, D., Montagna, L., Pedron, S., Piccoli, P., and Chilosi, M. (2005). HHV-8 and EBV are not commonly found in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases : Official Journal of WASOG*, 22(2), 123–128.
120. Kanazawa, H., Hirata, K., and Yoshikawa, J. (2003). Accelerated Decline of Lung Function in COPD Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection\*. *Chest*, 123(2), 596–599.
121. Brunetti, G., Delmastro, M., Nava, S., Pignatti, P., Bossi, A., Gatti, M., and Furione, M. (2003). Detection of HCV-RNA in bronchoalveolar lavage from a woman with pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine*, 97(6), 736–738.

122. Molyneaux, P. L., and Maher, T. M. (2014). Respiratory microbiome in IPF: cause, effect, or biomarker? *The Lancet Respiratory Medicine*, 2(7), 511–513.
123. Lee, J. S., Ryu, J. H., Elicker, B. M., Lydell, C. P., Jones, K. D., Wolters, P. J., King, T. E., and Collard, H. R. (2011). Gastroesophageal Reflux Therapy Is Associated with Longer Survival in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(12), 1390–1394.
124. Raghu, G. (2003). The role of gastroesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American Journal of Medicine*, 115(3), 60–64.
125. Raghu, G. (2006). High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 27(1), 136–142.
126. Gribbin, J., Hubbard, R., and Smith, C. (2009). Role of diabetes mellitus and gastro-oesophageal reflux in the aetiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine*, 103(6), 927–931.
127. Fingerlin, T. E., Murphy, E., Zhang, W., Peljto, A. L., Brown, K. K., Steele, M. P., Loyd, J. E., Cosgrove, G. P., Lynch, D., Groshong, S., Collard, H. R., Wolters, P. J., Bradford, W. Z., Kossen, K., Seiwert, S. D., du Bois, R. M., Garcia, C. K., Devine, M. S., Gudmundsson, G., Isaksson, H. J., Kaminski, N., Zhang, Y., Gibson, K. F., Lancaster, L. H., Cogan, J. D., Mason, W. R., Maher, T. M., Molyneaux, P. L., Wells, A. U., Moffatt, M. F., Selman, M., Pardo, A., Kim, D. S., Crapo, J. D., Make, B. J., Regan, E. A., Walek, D. S., Daniel, J. J., Kamatani, Y., Zelenika, D., Smith, K., McKean, D., Pedersen, B., Talbert, J., Kidd, R. N., Markin, C. R., Beckman, K. B., Lathrop, M., Schwarz, M. I., and Schwartz, D. A. (2013). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nature Genetics*, 45(6), 613–620.
128. Yang, I. V., Coldren, C. D., Leach, S. M., Seibold, M. A., Murphy, E., Lin, J., Rosen, R., Neidermyer, A. J., McKean, D. F., Groshong, S. D., Cool, C., Cosgrove, G. P., Lynch, D. A., Brown, K. K., Schwarz, M. I., Fingerlin, T. E., and Schwartz, D. A. (2013). Expression of cilium-associated genes defines novel molecular subtypes of idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 68(12), 1114–1121.
129. Yang, I. V., Pedersen, B. S., Rabinovich, E., Hennessy, C. E., Davidson, E. J., Murphy, E., Guardela, B. J., Tedrow, J. R., Zhang, Y., Singh, M. K., Correll, M., Schwarz, M. I., Geraci, M., Sciurba, F. C., Quackenbush, J., Spira, A., Kaminski, N., and Schwartz, D. A. (2014). Relationship of DNA Methylation and Gene Expression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(11), 1263–1272.
130. Talbert, J. L., Schwartz, D. A., and Steele, M. P. (2014). Familial Interstitial Pneumonia. *Clinical Pulmonary Medicine*, 21(3), 120–127.
131. Javaheri, S., Lederer, D. H., Pella, J. A., Mark, G. J., and Levine, B. W. (1980). Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Monozygotic Twins. *Chest*, 78(4), 591–594.

132. Lawson, W. E., Cheng, D.-S., Degryse, A. L., Tanjore, H., Polosukhin, V. V., Xu, X. C., Newcomb, D. C., Jones, B. R., Roldan, J., Lane, K. B., Morrissey, E. E., Beers, M. F., Yull, F. E., and Blackwell, T. S. (2011). Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), 10562–10567.
133. Torres-González, E., Bueno, M., Tanaka, A., Krug, L. T., Cheng, D.-S., Polosukhin, V. V., Sorescu, D., Lawson, W. E., Blackwell, T. S., Rojas, M., and Mora, A. L. (2012). Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Age-Related Susceptibility to Lung Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(6), 748–756.
134. Armanios, M. Y., Chen, J. J.-L., Cogan, J. D., Alder, J. K., Ingersoll, R. G., Markin, C., , Lawson, W. E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J. A. 3rd, Lansdorp, P. M., Greider, C. W., and Loyd, J. E. (2007). Telomerase Mutations in Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 356(13), 1317–1326.
135. Gutierrez-Rodrigues, F., Santana-Lemos, B. A., Scheucher, P. S., Alves-Paiva, R. M., and Calado, R. T. (2014). Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans. *PLoS ONE*, 9(11), 113747.
136. Diaz de Leon, A., Cronkhite, J. T., Katzenstein, A.-L. A., Godwin, J. D., Raghu, G., Glazer, C. S., Rosenblatt, R. L., Girod, C. E., Garrity, E. R., Xing, C., and Garcia, C. K. (2010). Telomere Lengths, Pulmonary Fibrosis and Telomerase (TERT) Mutations. *PLoS ONE*, 5(5), e10680.
137. Hao, L.-Y., Armanios, M., Strong, M. A., Karim, B., Feldser, D. M., Huso, D., and Greider, C. W. (2005). Short Telomeres, even in the Presence of Telomerase, Limit Tissue Renewal Capacity. *Cell*, 123(6), 1121–1131.
138. Lee, J., Reddy, R., Barsky, L., Scholes, J., Chen, H., Shi, W., and Driscoll, B. (2009). Lung alveolar integrity is compromised by telomere shortening in telomerase-null mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 296(1), 57–70.
139. Kropski, J. A., Blackwell, T. S., and Loyd, J. E. (2015). The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 45(6), 1717–1727.
140. Kropski, J. A., Young, L. R., Cogan, J. D., Mitchell, D. B., Lancaster, L. H., Worrell, J. A., Markin, C., Liu, N., Mason, W. R., Fingerlin, T. E., Schwartz, D. A., Lawson, W. E., Blackwell, T. S., Phillips, J. A., and Loyd, J. E. (2017). Genetic Evaluation and Testing of Patients and Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(11), 1423–1428.
141. Fell, C. D., Martinez, F. J., Liu, L. X., Murray, S., Han, M. K., Kazerooni, E. A., Gross, B. H., Myers, J., Travis, W. D., Colby, T. V., Toews, G. B., and Flaherty, K. R. (2010). Clinical Predictors of a Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(8), 832–837.
142. Tiitto, L., Bloigu, R., Heiskanen, U., Paakko, P., Kinnula, V. L., and Kaarteenaho-Wiik, R. (2006). Relationship between histopathological features and the course of idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia. *Thorax*, 61(12), 1091–1095.

143. Rozin, G. F., Gomes, M. M., Parra, E. R., Kairalla, R. A., de Carvalho, C. R. R., and Capelozzi, V. L. (2005). Collagen and elastic system in the remodelling process of major types of idiopathic interstitial pneumonias (IIP). *Histopathology*, 46(4), 413–421.
144. Chetta, A., Marangio, E., and Olivieri, D. (2004). Pulmonary Function Testing in Interstitial Lung Diseases. *Respiration*, 71(3), 209–213.
145. Martinez, F. J. (2006). Pulmonary Function Testing in Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 315–321.
146. Laszlo, G. (2006). Standardisation of lung function testing: helpful guidance from the ATS/ERS Task Force. *Thorax*, 61(9), 744–746.
147. Daniil, Z. D., Gilchrist, F. C., Nicholson, A. G., Hansell, D. M., Harris, J., Colby, T. V., and du Bois, R. M. (1999). A Histologic Pattern of Nonspecific Interstitial Pneumonia Is Associated with a Better Prognosis Than Usual Interstitial Pneumonia in Patients with Cryptogenic Fibrosing Alveolitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(3), 899–905.
148. Stern, J.-B., Mal, H., Groussard, O., Brugière, O., Marceau, A., Jebrak, G., and Fournier, M. (2001). Prognosis of Patients With Advanced Idiopathic Pulmonary Fibrosis Requiring Mechanical Ventilation for Acute Respiratory Failure. *Chest*, 120(1), 213–219.
149. Ryerson, C. J., Abbritti, M., Ley, B., Elicker, B. M., Jones, K. D., And Collard, H. R. (2011). Cough predicts prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*, 16(6), 969–975.
150. Gloeckl, R., Halle, M., and Kenn, K. (2012). Interval versus continuous training in lung transplant candidates: A randomized trial. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 31(9), 934–941.
151. Lederer, D. J., Arcasoy, S. M., Barr, R. G., Wilt, J. S., Bagiella, E., D'Ovidio, F., Sonett, J. R., and Kawut, S. M. (2006). Racial and Ethnic Disparities in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A UNOS/OPTN Database Analysis. *American Journal of Transplantation*, 6(10), 2436–2442.
152. Rochester, C. L. (2003). Exercise training in chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Rehabilitation Research and Development*, 40(5), 59.
153. Nici, L., Donner, C., Wouters, E., Zuwallack, R., Ambrosino, N., Bourbeau, J., Carone, M., Celli, B., Engelen, M., Fahy, B., Garvey, C., Goldstein, R., Gosselink, R., Lareau, S., MacIntyre, N., Maltais, F., Morgan, M., O'Donnell, D., Prefault, C., Reardon, J., Rochester, C., Schols, A., Singh, S., and Troosters T. (2006). American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement on Pulmonary Rehabilitation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(12), 1390–1413.
154. Huppmann, P., Sczepanski, B., Boensch, M., Winterkamp, S., Schönheit-Kenn, U., Neurohr, C., Behr, J., and Kenn, K. (2012). Effects of inpatient pulmonary rehabilitation in patients with interstitial lung disease. *European Respiratory Journal*, 42(2), 444–453.

- 155.Ferreira, A., Garvey, C., Connors, G. L., Hilling, L., Rigler, J., Farrell, S., Cayou, C., Shariat, C., and Collard, H. R. (2009). Pulmonary Rehabilitation in Interstitial Lung Disease. *Chest*, 135(2), 442–447.
- 156.Singh, S. J., ZuWallack, R. L., Garvey, C., and Spruit, M. A. (2013). Learn from the past and create the future: the 2013 ATS/ERS statement on pulmonary rehabilitation. *European Respiratory Journal*, 42(5), 1169–1174.
- 157.Jackson, R. M., Gómez-Marín, O. W., Ramos, C. F., Sol, C. M., Cohen, M. I., Gaunaurd, I. A., Gaunaurd, I. A., Cahalin, L. P., and Cardenas, D. D. (2014). Exercise Limitation in IPF Patients: A Randomized Trial of Pulmonary Rehabilitation. *Lung*, 192(3), 367–376.
- 158.Robert M Jackson, R., and Gomez-Marin, O. (2011). Development and utility of pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: review of preclinical science and recent clinical trials. *Transplant Research and Risk Management*, 3, 55-63.
- 159.Myllärniemi, M., and Kaarteenaho, R. (2015). Pharmacological treatment of idiopathic pulmonary fibrosis – preclinical and clinical studies of pirfenidone, nintedanib, and N-acetylcysteine. *European Clinical Respiratory Journal*, 2, 26385.
- 160.Shi, S., Wu, J., Chen, H., Chen, H., Wu, J., and Zeng, F. (2007). Single- and Multiple-Dose Pharmacokinetics of Pirfenidone, an Antifibrotic Agent, in Healthy Chinese Volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 47(10), 1268–1276.
- 161.Oku, H., Nakazato, H., Horikawa, T., Tsuruta, Y., and Suzuki, R. (2002). Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ , enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock. *European Journal of Pharmacology*, 446(1–3), 167–176.
- 162.Antoniou, S. A..(2005). Pirfenidone for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: Therapeutic potential prompts further investigation. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 14(1), 1443–1447.
- 163.Taniyama, M., Ohbayashi, S., Narita, M., Nakazawa, R., Hasegawa, S., Azuma, N., Teraoka, S., Ota, K., Yamauchi, S., and Margolin, S. B. (1997). Pharmacokinetics of an antifibrotic agent, pirfenidone, in haemodialysis patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 52(1), 77–78.
- 164.Bruss, M. L., Margolin, S. B., and Giri, S. N. (2004). Pharmacokinetics of orally administered pirfenidone in male and female beagles. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(5), 361–367.
- 165.Giri, S. N., Wang, Q., Xie, Y., Lango, J., Morin, D., Margolin, S. B., and Buckpitt, A. R. (2002). Pharmacokinetics and metabolism of a novel antifibrotic drug pirfenidone, in mice following intravenous administration. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 23(5), 203–211.
- 166.Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., and Kolb, M. (2008). The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(3), 362–382.

167. Robbe, A., Tassin, A., Carpentier, J., Declèves, A.-E., Mekinda Ngono, Z. L., Nonclercq, D., and Legrand, A. (2015). Intratracheal Bleomycin Aerosolization: The Best Route of Administration for a Scalable and Homogeneous Pulmonary Fibrosis Rat Model? *BioMed Research International*, 2015, 198418.
168. Vaidya, P. J., Sandeepa, H. S., Singh, T., Susheel Kumar, S. K., Bhargava, R., Ramakrishnan, G., and Chhajed, P. N. (2016). Combined prednisolone and pirfenidone in bleomycin-induced lung disease. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(3), 1198–1202.
169. Bendstrup, E., Hyldgaard, C., Agerbæk, M., Andersen, C. U., and Hilberg, O. (2014). No effect of pirfenidone treatment in fulminant bleomycin-induced pneumonitis. *Respiratory Medicine Case Reports*, 12, 47–49.
170. Cisneros-Lira, J., Gaxiola, M., Ramos, C., Selman, M., and Pardo, A. (2003). Cigarette smoke exposure potentiates bleomycin-induced lung fibrosis in guinea pigs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(4), 949–956.
171. Redente, E. F., Jacobsen, K. M., Solomon, J. J., Lara, A. R., Faubel, S., Keith, R. C., Henson, P. M., Downey, G. P., and Riches, D. W. H. (2011). Age and sex dimorphisms contribute to the severity of bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301(4), 510–518.
172. Mouratis, M. A., and Aidinis, V. (2011). Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 17(5), 355–361.
173. Chen, S.-S., Yin, Z.-F., Chen, T., Qiu, H., Wei, Y.-R., Du, S.-S., Jin, Y. P., Zhao, M. M, Wu, Q., Weng, D., and Li, H.-P. (2017). Development of a non-infectious rat model of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Thoracic Disease*, 9(1), 96–105.
174. Gurujeyalakshmi, G., Hollinger, M. A., and Giri, S. N. (1999). Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 276(2), 311–318.
175. Steffen, L., Ruppert, C., Hoymann, H.-G., Funke, M., Ebener, S., Kloth, C., Muhlfield, C., Ochs, M., Knudsen, L., and Lopez-Rodriguez, E. (2017). Surfactant replacement therapy reduces acute lung injury and collapse induration-related lung remodeling in the bleomycin model. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 313(2), 313–327.
176. Nagai, S., Hamada, K., Shigematsu, M., Taniyama, M., Yamauchi, S., and Izumi, T. (2008). Open-label compassionate use one year-treatment with pirfenidone to patients with chronic pulmonary fibrosis. *Internal Medicine*, 41(12), 1118–1123.
177. Cho, M. E., and Kopp, J. B. (2010). Pirfenidone: an anti-fibrotic therapy for progressive kidney disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19(2), 275–283.
178. Rockey, D. C. (2008). Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease. *Clinics in Liver Disease*, 12(4), 939–962.

179. Francois, H., and Chatziantoniou, C. (2018). Renal fibrosis: Recent translational aspects. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 68(69), 318–332.
180. Mitani, Y., Sato, K., Muramoto, Y., Karakawa, T., Kitamado, M., Iwanaga, T., Nabeshima, T., Maruyama, K., Nakagawa, K., Ishida, K., & Sasamoto, K. (2008). Superoxide scavenging activity of pirfenidone–iron complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(1), 19–23.
181. Nakayama, S., Mukae, H., Sakamoto, N., Kakugawa, T., Yoshioka, S., Soda, H., Oku, H., Urata, Y., Kondo, T., Kubota, H., Nagata, K., and Kohno, S. (2008). Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts. *Life Sciences*, 82(3–4), 210–217.
182. Saito, S., Alkhatib, A., Kolls, J. K., Kondoh, Y., and Lasky, J. A. (2019). Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Journal of Thoracic Disease*, 11(Suppl 14), 1740–1754.
183. Maher, T. M., and Strek, M. E. (2019). Antifibrotic therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: time to treat. *Respiratory Research*, 20(1), 205.
184. Verma, N., Kumar, P., Mitra, S., Taneja, S., Dhooria, S., Das, A., Duseja, A., Dhiman, R. K., and Chawla, Y. (2018). Drug idiosyncrasy due to pirfenidone presenting as acute liver failure: Case report and mini-review of the literature. *Hepatology Communications*, 2(2), 142–147.
185. Lancaster, L. H., de Andrade, J. A., Zibrak, J. D., Padilla, M. L., Albera, C., Nathan, S. D., Wijsenbeek, M. S., Stauffer, J. L., Kirchgaessler, K.-U., and Costabel, U. (2017). Pirfenidone safety and adverse event management in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, 26(146), 170057.
186. Sathiyamoorthy, G., Sehgal, S., and Ashton, R. W. (2017). Pirfenidone and Nintedanib for Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Southern Medical Journal*, 110(6), 393–398.
187. Cantu-Cantu, M. Z., Lyra-Gonzalez, I., and Armendariz-Borunda, J. (2013). Coadjuvant treatment with surgery and pirfenidone in severe facial trauma due to dog bite. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 24(2), 675–678.
188. Ley, B., Swigris, J., Day, B.-M., Stauffer, J. L., Raimundo, K., Chou, W., and Collard, H. R. (2017). Pirfenidone Reduces Respiratory-related Hospitalizations in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 196(6), 756–761.
189. Card, J. W., Racz, W. J., Brien, J. F., Margolin, S. B., and Massey, T. E. (2003). Differential effects of pirfenidone on acute pulmonary injury and ensuing fibrosis in the hamster model of amiodarone-induced pulmonary toxicity. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 75(1), 169–180.

190. Ashcroft, T., Simpson, J. M., and Timbrell, V. (1988). Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *Journal of Clinical Pathology*, 41(4), 467–470.
191. Islam, N., and Gladki, E. (2008). Dry powder inhalers (DPIs)—A review of device reliability and innovation. *International Journal of Pharmaceutics*, 360(1–2), 1–11.
192. Wang, Y.-B., Watts, A. B., Peters, J. I., and Williams, R. O. (2014). The impact of pulmonary diseases on the fate of inhaled medicines—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1–2), 112–128.
193. Smith, I. J., and Parry-Billings, M. (2003). The inhalers of the future? A review of dry powder devices on the market today. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 16(2), 79–95.
194. Zeng, X. M., Martin, G. P., Marriott, C., and Pritchard, J. (2000). The influence of carrier morphology on drug delivery by dry powder inhalers. *International Journal of Pharmaceutics*, 200(1), 93–106.
195. Newman, S. P., and Busse, W. W. (2002). Evolution of dry powder inhaler design, formulation, and performance. *Respiratory Medicine*, 96(5), 293–304.
196. Chougule, M., Padhi, B., Jinturkar, K., and Misra, A. (2007). Development of Dry Powder Inhalers. *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, 1(1), 11–21.
197. Patton, J. S., and Byron, P. R. (2007). Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(1), 67–74.
198. Crowder, T., and Atkins, P. (2003). The Design and Development of Inhalation Drug Delivery Systems. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 1, 1–31.
199. Amaro, M. I., Tajber, L., Corrigan, O. I., and Healy, A. M. (2011). Optimisation of spray drying process conditions for sugar nanoporous microparticles (NPMs) intended for inhalation. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(1), 99–109.
200. Steckel, H., and Bolzen, N. (2004). Alternative sugars as potential carriers for dry powder inhalations. *International Journal of Pharmaceutics*, 270(1–2), 297–306.
201. Mosén, K., Bäckström, K., Thalberg, K., Schaefer, T., Kristensen, H. G., and Axelsson, A. (2004). Particle Formation and Capture During Spray Drying of Inhalable Particles. *Pharmaceutical Development and Technology*, 9(4), 409–417.
202. Abramson, H. A. (1950). Aerosols II The Role of Particle Size in Inhalation Therapy by Atomization and by Penicillin Dusts. *Diseases of the Chest*, 18(5), 435–449.
203. Cheresh, P., Kim, S.-J., Tulasiram, S., and Kamp, D. W. (2013). Oxidative stress and pulmonary fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(7), 1028–1040.
204. Liu, R.-M., and Desai, L. P. (2015). Reciprocal regulation of TGF- $\beta$  and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biology*, 6, 565–577.

205. Conte, E., Gili, E., Fagone, E., Fruciano, M., Iemmolo, M., and Vancheri, C. (2014). Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- $\beta$ -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 13–19.
206. Choi, K., Lee, K., Ryu, S.-W., Im, M., Kook, K. H., and Choi, C. (2012). Pirfenidone inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1-induced fibrogenesis by blocking nuclear translocation of Smads in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Molecular Vision*, 18, 1010–1020.
207. Hisatomi, K., Mukae, H., Sakamoto, N., Ishimatsu, Y., Kakugawa, T., Hara, S., Fujita, H., Nakamichi, S., Oku, H., Urata, Y., Kubota, H., Nagata, K., and Kohno, S. (2012). Pirfenidone inhibits TGF- $\beta$ 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulmonary Medicine*, 12(1), 24.
208. Kasai, H., Allen, J. T., Mason, R. M., Kamimura, T., and Zhang, Z. (2005). TGF- $\beta$ 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research*, 6(1), 56.
209. Craig, V. J., Zhang, L., Hagood, J. S., and Owen, C. A. (2015). Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Targets for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(5), 585–600.
210. Dancer, R. C. A., Wood, A. M., and Thickett, D. R. (2011). Metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 38(6), 1461–1467.
211. Hostettler, K. E., Zhong, J., Papakonstantinou, E., Karakiulakis, G., Tamm, M., Seidel, P., Sun, Q., Mandal, J., Lardinois, D., Lambers, C., and Roth, M. (2014). Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 15(1), 157.
212. Kreuter, J. (2007). Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(1), 1–10.
213. Sung, J. C., Pulliam, B. L., and Edwards, D. A. (2007). Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends in Biotechnology*, 25(12), 563–570.
214. Biazar, E., Majdi, Zafari, M., Avar, M., Aminifard, S., Zaeifi, D., Ai, Jafarpour, Montazeri, and Gh. (2011). Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1117–1127.
215. Yang, W., Peters, J. I., and Williams, R. O. (2008). Inhaled nanoparticles—A current review. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1–2), 239–247.

## **EKLER**

## EK-1. Etik kurul onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 05/02/2018-E.21041



**T.C.**  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**



Sayı : 66332047-604.01.02-  
Konu : Değerlendirme ve Onay

**Sayın Doç. Dr. Mecit Orhan ULUDAĞ**  
**Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi**

Araştırmacı grubu Mecit Orhan ULUDAĞ, Serkan ÜNLÜ ve Sevtap HAN'dan oluşan, G.Ü.ET-18.006 kod numaralı ve "*Yeni Bir Yöntem ile Aerosol Haline Getirilen Pirfenidonun İnhalasyon Yoluyla Etkinliğinin Değerlendirilmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-18.006 and entitled "*Efficacy Assessment of Inhaled Pirfenidon Aerosolized with a Novel Method*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır  
**Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ**  
**Kurul Başkanı**

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino (Erkek)  
Hayvan Sayısı : 36

Ek:1 Liste

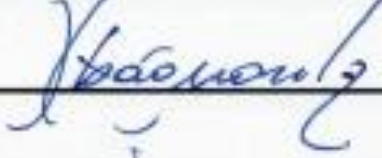
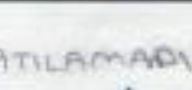
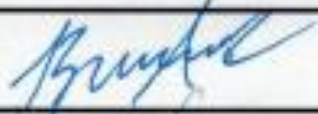
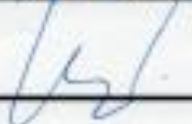


Ankara  
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76  
e-Posta: [hadysk@gazi.edu.tr](mailto:hadysk@gazi.edu.tr) - İnternet Adresi: <http://hadysk.gazi.edu.tr/>

Bilgi için: Burak Çirak  
Genel Evrak Sorumlusu  
Telefon No:0312 229 78 00

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik kurul onayı

| GAZİ ÜNİVERSİTESİ<br>HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM<br>LİSTESİ |                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| TOPLANTI TARİHİ : 26.01.2018                                                        | TOPLANTI SAYISI : 01                                                                 |
| ADI-SOYADI                                                                          | İMZA                                                                                 |
| Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ<br>(Başkan)                                              |   |
| Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL<br>(Başkan Yrd.)                                        |   |
| Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU                                                               | KATILAMADI                                                                           |
| Prof.Dr.Tuncay PEKER                                                                | KATILAMADI                                                                           |
| Prof.Dr.Fatma AKAR                                                                  |  |
| Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK                                                         |  |
| Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ                                                           |  |
| Doç.Dr.Süleyman YEŞİL                                                               |  |
| Doç.Dr.Emre BARIŞ                                                                   |  |
| Doç.Dr.İpek SÜNTAR                                                                  |  |
| Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR                                                            | KATILAMADI                                                                           |
| Vet.Hek.Burcu AVCI                                                                  |  |
| Osman İÇ                                                                            |  |



10-20 Aralık 2012

# XII. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

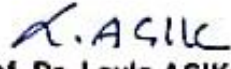
## KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, **Çerkan UNLU**

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi  
Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve  
Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından,  
10-20 Aralık 2012 tarihleri arasında düzenlenen  
"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu XII"ye katılarak,  
Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve  
bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

  
Prof. Dr. Süleyman BÜYÜKBERBER  
Rektör

  
Prof. Dr. Nurettin TÜRKÖZKAN  
Merkez Müdürü

  
Prof. Dr. Leyla AÇIK  
Etik Kurul Başkanı

**ÖZGEÇMİŞ****Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı : ÜNLÜ, Serkan  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1986 - Ankara  
Medeni hali : Evli  
Telefon : 03122026760  
e-posta : unlu.serkan@gmail.com



| <b>Eğitim Derecesi</b> | <b>Okul/Program</b>                                                        | <b>Mezuniyet yılı</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Doktora                | Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri<br>Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı | Devam Ediyor          |
| Yüksek lisans          | Leuven Üniversitesi, İleri Medikal<br>Görüntüleme Yüksek Lisansı           | 2017                  |
| Tıpta uzmanlık         | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Kardiyoloji Anabilim Dalı               | 2016                  |
| Lisans                 | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi                                            | 2010                  |
| Lise                   | Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi                                       | 2004                  |

| <b>İş Deneyimi, Yıl</b> | <b>Çalıştığı yer</b>                                                        | <b>Görev</b>             |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 2019-devam ediyor       | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Kardiyoloji Anabilim Dalı                | Öğretim görevlisi doktor |
| 2016-2019               | Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs<br>Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi | Uzman doktor             |
| 2016-2017               | Leuven Üniversitesi ve Gasthuisberg<br>Hastanesi, Kardiyoloji Bölümü        | Araştırma görevlisi      |
| 2011-2016               | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Kardiyoloji Anabilim Dalı                | Araştırma görevlisi      |
| 2010-2011               | Acil Sağlık Hizmetleri, Ankara İl<br>Sağlık Müdürlüğü                       | Pratisyen doktor         |

### **Yabancı Dil**

İngilizce (YDS 2018:95)

### **Başarı ve Ödüller**

- 1 Türk Kardiyoloji Derneği, Genç Kardiyologları Teşvik Ödülleri 2019 Yılı En Başarılı Genç Kardiyologu Ödülü
- 2 Avrupa Kardiyoloji Derneği, Kardiyovasküler Görüntüleme Grubu, 2016 Yılı Araştırma Bursu-Birincilik
- 3 Ankara Pediatrik Nöroloji Toplantıları, 2010 Yılı Prof. Dr. Kalbiye Yalaz En iyi Sunum Ödülü

### **Yayınlar**

1. Dobrovie M, Bézy S, Ünlü S, Chakraborty B, Petrescu A, Duchenne J, Beela AS, Voigt JU. How Does Regional Hypertrophy Affect Strain Measurements With Different Speckle-Tracking Methods? J Am Soc Echocardiogr. 2019 Nov;32(11):1444-1450. doi: 10.1016/j.echo.2019.06.008. Epub 2019 Jul 31.
2. Ünlü S, Duchenne J, Mirea O, Pagourelas ED, Bézy S, Cvijic M, Beela AS, Thomas JD, Badano LP, Voigt JU; EACVI-ASE Industry Standardization Task Force. Impact of

- apical foreshortening on deformation measurements: a report from the EACVI-ASE Strain Standardization Task Force. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2019 Jul 30. pii: jez189. doi: 10.1093/ehjci/jez189. [Epub ahead of print]
3. Duchenne J, Turco A, Ünlü S, Pagourelas ED, Vunckx K, Degtiarova G, Bézy S, Cvijic M, Nuyts J, Claus P, Rega F, Gheysens O, Voigt JU. Left Ventricular Remodeling Results in Homogenization of Myocardial Work Distribution. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2019 May;12(5):e007224. doi: 10.1161/CIRCEP.118.007224.
  4. Ünlü S, Pagourelas E, Sezenöz B, Şahinarslan A, Uludağ OM, Gökalp G, Arınsoy T, Çengel A. Higher ultrafiltration rate is associated with right ventricular mechanical dispersion. *Anatol J Cardiol*. 2019 Mar;21(4):206-213. doi: 10.14744/AnatolJCardiol.2019.26243.
  5. Ünlü S, Mirea O, Pagourelas ED, Duchenne J, Bézy S, Bogaert J, Thomas JD, Badano LP, Voigt JU; EACVI-ASE-Industry Standardization Task Force. Layer-Specific Segmental Longitudinal Strain Measurements: Capability of Detecting Myocardial Scar and Differences in Feasibility, Accuracy, and Reproducibility, Among Four Vendors A Report From the EACVI-ASE Strain Standardization Task Force. *J Am Soc Echocardiogr*. 2019 May;32(5):624-632.e11. doi: 10.1016/j.echo.2019.01.010. Epub 2019 Mar 14.
  6. Beela AS, Duchenne J, Petrescu A, Ünlü S, Penicka M, Aakhus S, Winter S, Aaronson M, Stefanidis E, Fehske W, Willems R, Szulik M, Kukulski T, Faber L, Ciarka A, Neskovic AN, Stankovic I, Voigt JU. Sex-specific difference in outcome after cardiac resynchronization therapy. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2019 May 1;20(5):504-511. doi: 10.1093/ehjci/jez231.
  7. Ünlü S, Şahinarslan A, Sezenöz B, Uludağ OM, Gökalp G, Seçkin Ö, Arınsoy ST, Gülbahar Ö, Boyacı NB. High-sensitive troponin T increase after hemodialysis is associated with left ventricular global longitudinal strain and ultrafiltration rate. *Cardiol J*. 2018 Oct 19. doi: 10.5603/CJ.a2018.0118. [Epub ahead of print]
  8. Hacıyev R, Ünlü S, Yalçın MR, Taçoş G, Çengel A. Pulmonary hypertension spectrum: 16 years of experience from a single center. *Türk Kardiyol Dern Ars*. 2018 Dec;46(8):667-674. doi: 10.5543/tkda.2018.10.5543/tkda.2018.28909.
  9. Koçyiğit D, Tokgözoğlu L, Kayıkçioğlu M, Altay S, Aydoğdu S, Barçın C, Bostan C, Çakmak HA, Çatakoğlu AB, Emet S, Ergene O, Kalkan AK, Kaya B, Kaya C, Kaymaz C, Koylan N, Kültürsay H, Oğuz A, Özpelit E, Ünlü S. Is there a gender gap in secondary

- prevention of coronary artery disease in Turkey? *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2018 Dec;46(8):683-691. doi: 10.5543/tkda.2018.10.5543/tkda.2018.45392.
10. Ünlü S, Şahinarslan A, Kılıç HK, Gökalp G, Sezenöz B, Erbaş G, Yalçın RM, Araç M. Long Term Vitamin-K Antagonist Usage is Associated with Coronary Artery Calcification. *Herz.* 2018 Oct 1. doi: 10.1007/s00059-018-4760-9. [Epub ahead of print]
  11. Ünlü S, Nurkoç SG, Sezenöz B, Cingirt M, Gülbahar Ö, Abacı A. Impact of statin use on high sensitive troponin T levels with moderate exercise. *Acta Cardiol.* 2018 Oct 17:1-6. doi: 10.1080/00015385.2018.1510801. [Epub ahead of print]
  12. Kızıltunç E, Ünlü S, Yakıcı IE, Kundi H, Korkmaz A, Çetin M, Örnek E. Clinical characteristics and prognosis of cardiac tamponade patients: 5-year experience at a tertiary center. *Herz.* 2018 Nov 23. doi: 10.1007/s00059-018-4769-0. [Epub ahead of print]
  13. Eyiöl A, Yayla Ç, Ünlü S, Tufan A, Cemri M, Yalçın R, Boyacı B. Relationship of serum HLA-B alleles and TNF- $\alpha$  with rheumatic heart disease. *Turk J Med Sci.* 2018 Aug 16;48(4):724-729. doi: 10.3906/sag-1707-58.
  14. Türkoğlu S, Ünlü S, Taçoş GA, Özdemir M. Right Coronary Artery Originating from the Left: Do Not Miss the Diagnosis!. *Cardiol Res Pract.* 2018 Mar 20;2018:1210791.
  15. Duchenne J, Turco A, Bézy S, Ünlü S, Pagourelas ED, Beela AS, Degtiarova G, Vunckx K, Nuyts J, Coudyzer W, Claus P, Rega F, Gheysens O, Voigt JU. Papillary muscles contribute significantly more to left ventricular work in dilated hearts. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2018 Mar 23. doi: 10.1093/ehjci/jeu043.
  16. Beela AS, Ünlü S, Duchenne J, Ciarka A, Daraban AM, Kotrc M, Aaronson M, Szulik M, Winter S, Penicka M, Neskovic AN, Kukulski T, Aakhus S, Willems R, Fehske W, Faber L, Stankovic I, Voigt JU. Assessment of mechanical dyssynchrony can improve the prognostic value of guideline-based patient selection for cardiac resynchronization therapy. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2018 Feb 22. doi: 10.1093/ehjci/jeu029
  17. Ünlü S, Mirea O, Duchenne J, Pagourelas ED, Bézy S, Thomas JD, Badano LP, Voigt JU. Comparison of Feasibility, Accuracy, and Reproducibility of Layer-Specific Global Longitudinal Strain Measurements Among Five Different Vendors: A Report from the EACVI-ASE Strain Standardization Task Force. *J Am Soc Echocardiogr.* 2017 Dec 12. pii: S0894-7317(17)30802-7. doi: 10.1016/j.echo.2017.11.008.
  18. Cvijic M, Duchenne J, Ünlü S, Michalski B, Aaronson M, Winter S, Aakhus S, Fehske W, Stankovic I, Voigt JU. Timing of myocardial shortening determines left ventricular

- regional myocardial work and regional remodelling in hearts with conduction delays. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2017 Dec 19. doi: 10.1093/ehjci/jex325
19. Ünlü S, Şahinarslan A, Gökalp G, Seçkin Ö, Arınsoy ST, Boyacı NB, Çengel A. The impact of volume overload on right heart function in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Echocardiography*. 2018 Mar;35(3):314-321.
  20. Sinan ÜY, Unlu S. The role of -omics technology in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of cardiovascular diseases. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2017 Jul;45(5):470-484
  21. Altay S, Yıldırım Türk Ö, Çakmak HA, Aşkın L, Sinan ÜY, Beşli F, Gedikli Ö, Özden Tok Ö, Özpamuk Karadeniz F, Ünlü S. et al. New oral anticoagulants-TURKey (NOAC-TURK): Multicenter crosssectional study. *Anatol J Cardiol*. 2017 May;17(5):353-361.
  22. Sezenöz B, Aydoğdu Taçoy G, Ünlü S, Taşel B, Türkoğlu S, Alsancak Y, Gökalp G, Çengel A. Heart rate variability in Eisenmenger syndrome and its correlation with echocardiographic parameters and plasma BNP, high sensitivity troponin-I level. *Anatol J Cardiol*. 2017 Jan;17(1):78-79.
  23. Tokgözoğlu L, Kayıkçıoğlu M, Altay S, Aydoğdu S, Barçın C, Bostan C, Çakmak HA, Çatakoğlu AB, Emet S, Ergene O, Kalkan AK, Kaya B, Tulunay Kaya C, Kaymaz C, Koylan N, Kültürsay H, Oğuz A, Özpelit E, Ünlü S. EUROASPIRE-IV: European Society of Cardiology study of lifestyle, risk factors, and treatment approaches in patients with coronary artery disease: Data from Turkey. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2017 Mar;45(2):134-144
  24. Taçoy G, Çengel A, Alsancak Y, Ünlü S, Turkoğlu S. Combination Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension: Single Centre Long-term Experience. *West Indian Med J*. 2015 May 12;65(1):46-51.
  25. Unlu S, Farsalinos K, Ameloot K, Daraban AM, Ciarka A, Delcroix M, Voigt JU. Apical traction: a novel visual echocardiographic parameter to predict survival in patients with pulmonary hypertension. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015 Jun 1. doi: 10.1093/ehjci/jev131
  26. Farsalinos KE, Daraban AM, Ünlü S, Thomas JD, Badano LP, Voigt JU. Head-to-Head Comparison of Global Longitudinal Strain Measurements among Nine Different Vendors: The EACVI/ASE Inter-Vendor Comparison Study. *J Am Soc Echocardiogr*. doi: 10.1016/j.echo.2015.06.011
  27. Abaci A, Unlu S, Alsancak Y, Kaya U, Sezenoz B. Short and long term complications of device closure of atrial septal defect and patent foramen ovale: meta-analysis of

- 28,142 patients from 203 studies. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2013 Dec 1;82 (7):1123-38.
28. Bas HD, Baser K, Yavuz E, Bolayir HA, Yaman B, Unlu S, Cengel A, Bagriacik EU, Yalcin R. A shift in the balance of regulatory T and T helper 17 cells in rheumatic heart disease *J Investig Med*. 2014 Jan;62(1):78-83 23
29. Alsancak Y, Cengel A, Akyel A, Ozkan S, Sezenoz B, Unlu S, et al. Relationship between serum vitamin d levels and angiographic severity and extent of coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. doi: 10.1111/eci.12490
30. Kiziltunc E, Abaci A, Ozkan S, Alsancak Y, Unlu S, Elbeg S, Cemri M, Cetin M, Sahin M. The Relationship between Pre-Infarction Angina and Serum Sphingosine-1-Phosphate Levels. *Acta Cardiol Sin* 2014;30:546552SU



*GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..*



*Gazili olmak argucalıktır*

