



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association
e-ISSN 2667-8381, 12 (1): 1-14, 2021
DOI: 10.38137/vftd.864222

BİLİMSEL ARAŞTIRMALARDA MİKRODİYALİZ TEKNİĞİ

Zeyno NUHOĞLU^{1a}, Abdurrahman AKSOY^{1b}

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Samsun

ORCID^a: 0000-0002-1080-2926, ORCID^b: 0000-0001-9486-312X

*Sorumlu Yazar: Zeyno NUHOĞLU
E-Posta: nuhogluzeyno@gmail.com

Geliş Tarihi: 19.01.2021
Kabul Tarihi: 22.02.2021

ÖZET

Mikrodiyaliz (MD), doku ve organlardaki fizyolojik ve kimyasal maddeleri belirlemek için hem hayvan hem de insanlarda kullanılan *in vivo* biyoanalitik örnekleme yöntemidir. “Mikro” son derece küçük ölçeği, “diyaliz” ise kimyasalların yarı geçirgen bir zar üzerindeki hareketini ifade eder. MD, kimyasal olayların sistemik kan seviyelerinde değişiklikler yaratmadan önce dokularda neler olup bittiğinin bir ön izlemesini sunar. Bu yöntem, ilk kez 1950’li yılların sonunda hayvan beynindeki endojen bileşikler incelemek için tasarlanmış; yıllar içerisinde diğer organlarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir. *In vivo* olan bu yöntemde; hemen hemen her doku, organ veya biyolojik sıvıdan elde edilen mikrodiyaliz örnekleme, hücre dışı sıvının bileşimini yansıtmaktadır. Özel olarak tasarlanmış probalar kullanılarak, bağlı olmayan analitler sürekli olarak örneklenir. Bu analitler, biyokimyasal işlevlerini değerlendirmek için örneklenen endojen molekülleri (nörotransmitter, hormon, glikoz) veya bu moleküllerin biyolojik sistem içindeki dağılımlarını belirlemek için örneklenen ekzojen bileşikler (farmasötikler) içerebilir. Ekzojen bileşiklerin lokal etkileri; merkezi sinir sistemi, hepatik doku, dermis, kalp düzeyinde mikrodiyaliz yoluyla incelenebilmektedir. Ayrıca, MD merkezi sinir sistemi çalışmalarında, antidepresan, antipsikotik, antiparkinson, halüsinojen, bağımlılık yapıcı maddeler ve deneysel ilaçlar gibi farklı farmakolojik ve toksikolojik maddelerin nörotransmisyon üzerindeki etkilerin araştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. MD, çok yönlü olmasından dolayı biyomedikal araştırmalar da dahil olmak üzere günümüzde birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu derlemenin amacı, mikrodiyaliz; temel prensiplerini tanımlamak, uygulama alanlarını belirtmek, avantaj ve dezavantajlarını ortaya koymak, klinik farmakoloji ve toksikoloji araştırmalarındaki önemini vurgulamaktır.

Anahtar Kelimeler: Ekstrasellüler sıvı, farmakoloji, mikrodiyaliz, örnekleme yöntemi, toksikoloji.

MICRODIALYSIS TECHNIQUE IN SCIENTIFIC RESEARCHES

ABSTRACT

Microdialysis (MD) is an *in vivo* bioanalytical sampling method used in both animals and humans to determine physiological and chemical substances in tissues and organs. “Micro” refers to the extremely small scale and “dialysis” refers to the movement of chemicals across a permeable membrane. MD provides a preview of what goes on in tissues, before chemical events can be reflected as changes in systemic blood levels. This method was designed for the first time in the late 1950s to study endogenous compounds in the animal brain. It has been developed for use in other organs over the years. In this *in vivo* method, sampling from almost any tissue, organ or biological fluid reflects the composition of the extracellular fluid. Using specially designed probes, unbound analytes are continuously sampled continuously. These may include endogenous molecules (e.g. neurotransmitters, hormones, glucose) sampled to assess their biochemical functions or exogenous compounds (e.g. pharmaceuticals) sampled to determine their distribution within the animal. Local effects of exogenous compounds have been studied in the central nervous system, hepatic tissue, dermis, heart and corpora lutea of experimental animals by means of microdialysis. Furthermore in central nervous studies, this technique has been extensively used for the study of the effects on neurotransmission at different central nuclei of diverse pharmacological and toxicological agents, such as antidepressants, antipsychotics, antiparkinsonians, hallucinogens, drugs of abuse and experimental drugs. MD is widely used today in many fields including biomedical research. The aim of this review is to define the basic principles of microdialysis, to indicate its application areas to reveal its advantages and disadvantages and to emphasize its importance in clinical pharmacology and toxicology research.

Keywords: Extracellular fluid, microdialysis pharmacology, sampling method, toxicology.

GİRİŞ

Tıbbi uygulamalardaki birçok tanı ve tedavi kararı, endojen moleküllerin kan konsantrasyonlarını ölçmeye dayanır. Ancak, biyokimyasal ve farmakolojik olaylar genellikle dokularda gerçekleşir. Doku kimyasının değerlendirilmesi teorik olarak daha doğru veriler sağlamaktadır. Bu değerlendirme, mikrodializ yöntemiyle ucuz ve minimal invaziv olarak gerçekleştirilir (Joukhadar ve ark., 2001; Lönnroth, 1991). Mikrodializ (MD), vücudun doku ve organlarına bağlanmamış sıvı konsantrasyonlarını ölçmek için biyomedikal çalışmalarda kullanılan; minimal invaziv bir örnekleme tekniğidir (De la Peña ve ark., 2000). MD, belirlenen bir bölgedeki maddeleri toplamak veya bu maddeleri bölgeye vermek için kullanılır. Bu yöntem, ilk kez hayvan beynindeki endojen bileşiklerin konsantrasyonlarını ölçmek için 1950'lerin sonlarında tasarlanmıştır. Daha sonraki yıllarda mikrodializ çeşitli dokulardaki hücre dışı sıvıda, endojen ve ekzojen bileşikleri araştırmak üzere yeniden geliştirilmiştir. Bu gelişmeler, 1990'lı yılların başında çok hızlı bir şekilde gerçekleşmiş ve mikrodializ bugünkü halini almıştır (Hammarlund-Udenaes, 2017). MD tekniği, *in vitro* çalışmalarda örnekleme için kullanılmasının yanında *in vivo* çalışmalarda da önemli bir yere sahiptir. Çok yönlülüğü nedeniyle, MD çeşitli alanlarda; özellikle farmakoloji, nörolojik bilimler ve biyomedikal araştırmalarda son yıllarda kullanılan oldukça popüler bir tekniktir (Kho ve ark., 2017; Ungerstedt, 1991). MD' de temel ilke, dokuya implante edilmiş ince bir dializ tüpünü fizyolojik bir sıvı ile perfüze ederek kılcal kan damarının işlevini taklit etmektir. Perfüze, maddelerin zar üzerinde ileri geri difüzyonuna bağlı olarak hücre dışı sıvısının bileşimini yansıtır. Mikrodializin en önemli özelliği, tüm kan kimyasının kaynağı olan hücre dışı sıvısının örneklenmesine izin vermesidir. Ayrıca, MD

büyük molekülleri perfüzeattan hariç tutarak kimyasal analizi kolaylaştırır. Bu teknik, nörotransmitter salınımını izlemek için nörolojik bilimlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (De la Peña ve ark., 2000). MD, ilaç ve metabolitlerin kan beyin bariyeri ve diğer organ bariyerlerindeki aktif taşıma mekanizmasının anlaşılmasında da önemli katkılar sağlamıştır (Hammarlund-Udenaes, 2017).

Bu derlemede mikrodializin; temel prensipleri, avantaj ve dezavantajları, yöntemin bilimsel araştırmalarda uygulanması, gelecek yıllardaki durumunun değerlendirilmesi sunulmaktadır. Ayrıca, MD'in çok yönlü uygulama alanları, güncel literatürlerle desteklenerek ortaya konulmaktadır.

MİKRODİYALİZİN TEMEL PRENSİPLERİ

Mikrodializ Tekniği ile İlgili Genel Bilgiler

Mikrodializ çalışmaları, 1950'li yılların sonunda beyinde nörotransmitter seviyelerinin ölçülmesiyle başlamıştır. Bu çalışmalar, günümüzdeki mikrodializ çalışmalarının da yapı taşı olmuştur. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar, mikrodializ ile ilgili yayınların %24'ünü oluşturmaktadır. Bu yayınların %72'si beyin ile ilişkiliyken, geri kalanı perifer organlardaki MD çalışmalarına dayanmaktadır (Hammarlund-Udenaes, 2017). *In vivo* mikrodializ, interstisyel (hücreler arası) doku sıvısının kimyasal bileşimini; yani hücrelerin ve diğer hedef yapıların (doku ve organların) doğrudan maruz kaldığı sıvıyı ölçer. MD, görüntüleme teknikleri veya biyosensörlerin aksine, örnekleme aracı olduğundan analitik bir cihaza gereksinim duyar. İnterstisyel sıvıdaki hemen hemen her çözünür molekül uygun bir analiz yöntemiyle birleştirildiğinde, mikrodializ ile ölçülebilmektedir. Bu yöntem, ilk kez 1972'de Delgado ve ark. tarafından prelinik farmakokinetik çalışmalara dahil edilmiştir (Joukhadar ve ark., 2001). Ancak,

insanlarda yapılan bu çalışmalar 1987'de yayımlanabilmiştir (Plock ve Kloft, 2005). Mikrodiyaliz klinik öncesi değerlendirme ve validasyondan, klinik uygulamaya kadarki aşamalarda kullanılan önemli bir teknik olarak farmakoloji çalışmalarında yer almaktadır. Bu yöntemde, analiz için yalnızca birkaç mikro litre sıvıya ihtiyaç vardır. Ayrıca, yöntem son derece hassas kimyasal detektörlerin geliştirilmesiyle yaygınlaşmaktadır (Müller, 2002). Klinik farmakokinetik çalışmalar, MD ile intersitisyel sıvıdaki çözünen maddelerin konsantrasyon-zaman profilleri hakkında bilgi sağlamayı amaçlamaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen verilerin doğruluğu mikrodiyaliz problemlerinin uygun kalibrasyon yöntemlerine duyulan ihtiyacı vurgulamıştır. Bu nedenle, mikrodiyaliz problemlerinin *in vivo* kalibrasyonu klinik farmakokinetik çalışmalarda önemli bir konu haline gelmiştir (Plock ve Kloft, 2005). Mikrodiyaliz sürekli bir örnekleme yöntemi olduğundan, kan örnekleme gibi nokta örnekleme yöntemlerinden farklıdır. Dokularda lokal ölçümler elde etme yeteneği sayesinde mikrodiyaliz; farmakokinetik, farmakodinamik, patoloji ve patofizyoloji alanlarında doku değişikliklerinin saptanmasında önemli keşiflere yol açmıştır (Shippenberg ve Thompson, 1997).

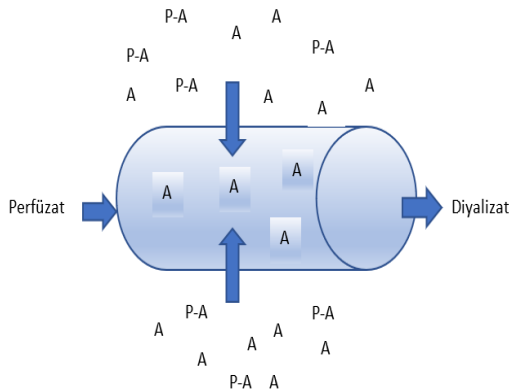


Şekil 1. Mikrodiyaliz ile İlişkili Önemli Noktalar (Müller, 2000, 2002; Shippenberg ve Thompson, 1997).

Mikrodiyaliz Tekniğinin Unsurları

Mikrodiyaliz, bir probun ucundaki yarı geçirgen zar vasıtasıyla, interstisyel sıvıdan çözünür moleküllerin örneklenmesine dayanır. Mikrodiyaliz sistemi; mikrodiyaliz pompası, prob olarak da adlandırılan mikrodiyaliz kateteri ve numunenin (diyalizat) toplandığı bir mikroviyalden oluşur. Mikrodiyaliz işlemi sırasında prob dokuya veya diğer matrislere implante edilir (Chaurasia, 1999; Plock ve Kloft, 2005). Tüm mikrodiyaliz problemleri, genellikle ilgili analitten yoksun fizyolojik çözelti ile perfüze edilen boru şeklindeki bir diyaliz membranından oluşur. Diyaliz membranı yarı geçirgendir. Bu membran, tüm çözünenlerin değil, sadece bazılarının serbestçe taşınmasına izin verir. Geçirgenlik tipik olarak molekül kütlesi <20.000 Da olan bileşiklerle sınırlıdır. Mikrodiyaliz probu hedef bölgeye (genellikle bir kan damarı veya doku) implante edilir. Yöntemde kullanılan fizyolojik çözelti (perfüzet) probun yarı geçirgen zarından yavaş ve sürekli olarak pompalanır. Bu çözelti, bir süre sonra çevre doku sıvısı ile dengelenir. Elde edilen mikrodiyaliz çözeltisi (diyalizat), doku sıvısının moleküllerinin temsili bir oranını içerir. Diyalizat, uygun analitik tekniklerle ilaç veya hedef moleküllerin varlığını belirlemek için analiz edilir (CMA, 2020; Shippenberg ve Thompson, 1997). Mikrodiyalizde kullanılan problemler, eş merkezli olarak tasarlanmıştır. Bu problemler; beyin, damar veya dokulara implante edilmektedir. Problemlerin iç çapı yaklaşık 0,15-0,3 mm arasında olan ince bir diyaliz tüpünden oluşmaktadır. Probun ucunda bulunan yarı geçirgen zar maddelerin basif difüzyonuna izin verir. Bir perfüzyon sıvısı proba giriş tüpünden sabit bir akış hızıyla (0,5-5 ul / dk) girer, membrandan geçer, daha sonra çıkış tüpünden taşınır ve son olarak bir mikroviyal içinde toplanır. Genel olarak perfüzet, çevredeki ortamın bileşimini taklit eden sulu bir çözeltidir. Bu şekilde moleküllerin prob öncesi sıvı

içine veya dışına aşırı geçişi önlenir (Plock ve Kloft, 2005). Numuneler anlık olarak analiz edilir veya daha sonraki analizler için biriktirilir. Çoğu analit için, intersitisyum ve perfüzyon ortamı arasındaki denge eksiktir; bu nedenle mikrodializ problemlerinin kalibre edilmesi gerekir. Çoğu kalibrasyon yöntemi, ilgili analitin perfüzyon ortamına ilave edilmesine ve prob ile doku arasında bir dengeleme ölçüsü olarak alınan; zardan kaybolma oranının ölçülmesine dayanır. Uygun kalibrasyon ile mikrodializ ölçümleri için bireyler arası değişim katsayıları analite bağlı olarak %10'dan %20'ye kadar değişmektedir (Joukhadar ve Müller, 2005).



Şekil 2. Mikrodializ Tekniğinde Perfüzasyon ve Diyalizat Arasındaki İlişki Diyagramı.

A: Analit; **P-A:** Proteine bağlı analiti temsil etmektedir (Weiss ve ark., 2000).

Mikrodializ Probu

Klinik öncesi çalışmalar için piyasada çeşitli mikrodializ problemleri bulunmaktadır (Müller, 2002). Mikrodializ probu, ucunda yarı geçirgen bir zara sahip özel olarak tasarlanmış bir kateterdir. Prob, kan damarının işlevini taklit eder. Mikrodializ için kullanılan problemler, çalışma sırasında kullanılacakları yere bağlı olarak şekil ve malzemelerinde büyük farklılıklar gösterebilmektedir (Plock ve Kloft, 2005). Mikrodializ probunun ilk ilkel versiyonu Delgado ve ark. (1972) tarafından üretilmiştir. Maymunlarda uzun süreli intraserebral perfüzyon

için kullanılan bu proba "dialyrotrot" adı verilmiştir. Probun yarı geçirgen zarı, bileşiklerin çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçmesini sağlar. Prob hedef dokuya implante edildiğinde, düşük akış hızında (2 ul/dk) bir fizyolojik tuz çözeltisi ile sürekli perfüze edilir. Endojen maddeler, hücre dışı sıvıdan prob içindeki perfüzyona, difüzyon yoluyla süzülür. Aynı anda prob; ekzojen bileşikler, besinler ve ilaçları lokal olarak birkaç güne kadar toplamak için kullanılır. Mikrodializ probunun ana tasarımı, eş merkezli iki tüpün birleşimine benzer. İlk olarak; perfüzyon sıvısı iç tüpe girer, distal ucuna akar daha sonra tüpten çıkar ve iç tüp ile dış dializ membranı arasındaki boşluğa girer. İkinci olarak, akış yönü tersine çevrilir ve sıvı, probun proksimal ucuna doğru hareket eder. Bu aşamada "dializ" moleküllerin hücre dışı sıvı ile perfüzyon sıvısı arasındaki difüzyonu gerçekleştirir. Dokunun hücre dışı sıvısından maddeler kateter membranı boyunca kateter içindeki perfüzyon sıvısına, daha sonra bu maddeler toplanır ve analiz için prob çıkışına dağılır (Shippenberg ve Thompson, 1997).

Perfüzyon Sıvıları

Mikrodializde kullanılan perfüzyon sıvıları, bileşim ve pH bakımından büyük farklılıklar gösterir. Perfüzyon sıvısının bileşimi; iyon gücü, ozmotik değeri ve pH'ı, dialize edilmiş dokunun hücre dışı sıvısına mümkün olduğunca yakın olmalıdır. Perfüzasyon, protein veya çok küçük bir konsantrasyonu olmaksızın, düşük oranda sodyum ve potasyum tuzları ve diğer iyonların sulu çözeltisidir. Bazı durumlarda, ilaçların mikrodializ probu ve tüp bağlantılarına yapışmasını önlemek için perfüzyon ortamına proteinler eklenmelidir. Nörotransmitter örnekleme için mikrodializ kullanan araştırmacılar endojen bileşiklerin miktarını doğru belirlemek için yüksek kalsiyum konsantrasyonlu perfüzyon çözeltileri

kullanılmaktadır (Maidment ve ark., 1989; Höcht ve ark., 2007). Tablo 1’de mikrodializ tekniğinde sıklıkla kullanılan perfüzyon sıvıları gösterilmektedir.

Tablo 1. Perfüzyon Çözeltilerinin Bileşimleri (Hocht ve ark., 2004; Höcht ve ark., 2007).

Perfüzyon ortamı Distile su	İçerik
Serum fizyolojik	% 0,9 NaCl
Ringer solüsyonu	147mM NaCl; 1.3 mM CaCl ₂ ; 4 mM KCl (pH:7,2)
Krebs Ringer solüsyonu	138 mM NaCl; 1mM CaCl ₂ ; 5mM KCl; 1mM MgCl ₂ ; 11mM NaHCO ₃
Krebs Ringer solüsyonu	122 mM NaCl; 1.2 mM CaCl ₂ ; 3 mM KCl,
Bikarbonat	1,2 mM MgSO ₄ ; 25 mM NaHCO ₃ ; 0.4 mM KH ₂ PO ₄ (pH:7,4)
Ringer çözeltisi (safra tuzu)	155 mM NaCl; 5mM KCl; 2,3 mM CaCl ₂ ; 20 mg/ml safra tuzu
Buffered Ringer solüsyonu	147 mM NaCl; 3,4 mM CaCl ₂ ; 2,8 mM KCl, 1,2 mM MgCl ₂ ; 0,6 mM K ₂ HPO ₄ 114 mM askorbat (pH:6,9)
Krebs- Henseleit	118 mM NaCl; 2,5 mM CaCl ₂ ; 4,7 mM KCl
Bikarbonat	0,6 mM MgSO ₄ ; 25 mM NaHCO ₃
Buffer	1,2 mM NaH ₂ PO ₄ , 11mM glikoz
Mock	127 mM NaCl; 1.1 mM CaCl ₂ ; 2,4 mM KCl
Serebrospinal	0,85 mM MgCl ₂ ; 28 mM NaHCO ₃ 0,5 mM KH ₂ PO ₄ , 0,5mM Na ₂ SO ₄ ; 5,9 mM glikoz (pH: 7,5)

Mikrodializ Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları

Tablo 2. Mikrodializ Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları (Azeredo ve ark., 2014; Erdo, 2015; Shippenberg ve Thompson, 1997; Zapata ve ark., 2009).

Mikrodializ	<p>Mikrodializ, en uygun <i>in vivo</i> tekniktir. Çok küçük doku bölgelerinden lokal örnekleme için izin verir. Endojen, ekzojen maddeleri ve bunlarla ilgili metabolitleri izlemek için uygundur. Hücreler arası kimyasal iletimin sürekli izlenmesini sağlar. Hücre dışı sıvıda aranan analitlerin mutlak konsantrasyonlarının belirlenmesini sağlar. Analizden önce numunelerin saflaştırılmasına gerek yoktur. Geri kazanılan maddelerin enzimatik parçalanma riski yoktur. Bir ilaç adayının doz ve zaman profilini belirlemek için diğer tekniklerden daha az hayvan deneyine gereksinim duyar.</p>
Mikrodializin Avantajları	<p>Mikrodializ <i>in vivo</i> örnekleminin en fizyolojik yoludur. Makromoleküller dokudan çıkamaz veya dokuya giremez. Örnekleme için itici güç sadece pasif difüzyondur. Probun yarı geçirgen zarı, dokuyu enfeksiyonlara karşı korur. Numuneler, serbestçe hareket eden hayvanlardan çalışma süresince sürekli olarak alınabilmektedir.</p>
Mikrodializin Dezavantajları	<p>MD probunun, beyne veya diğer hedef dokulara implantasyonu doku travmasına veya hasara neden olabilir. Beynin parankim dokusuna prob yerleştirilmesi 1-2 gün kan beyin bariyeri geçirgenliğini artırabilir. Birkaç molekül mikrodializ düzeneğine özel olmayan bağlanma gösterir. Prob geri kazanımı % 100’e ulaşmadığından kalibrasyon gerekir. Bu teknik ile belirli zaman aralığındaki ortalama konsantrasyon ölçülür. MD, oldukça hassas analitik analiz yöntemlerine ihtiyaç duyar. MD yöntemini çalışmak için özel cerrahi bilgiye ihtiyaç vardır.</p>

Doku Hasarı

Mikrodiyalizde kullanılan propların, dokuya implante edilmesi sırasında deney sonuçlarını etkileyebilecek minimum doku hasarı oluşabilmektedir. Bu nedenle, prob yerleştirildikten sonra doku-prob dengesinin sağlanması için, prob genellikle yarım saatten fazla sürede bir fizyolojik çözelti ile perfüze edilir. Yaklaşık yarım saatlik bu süre "doku dengelenmesine" izin vermek için yeterli kabul edilmektedir. Hayvan ve insanların çeşitli dokularında ölçülen doku travması belirteçlerinin (tromboksan B2, adenosin trifosfat, adenosin, K⁺, glikoz, laktat, laktat / piruvat oranı) prob yerleştirildikten otuz dakika sonra temel seviyelere ulaştığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Mikrodiyaliz proplarının yerleştirilmesinden sonra, lokal cilt dolaşımındaki değişiklikler Lazer Doppler perfüzyon görüntüleme kullanılarak araştırılmış ve değişikliklerin yaklaşık 40 dakika içinde başlangıç seviyesine geri döndüğü belirlenmiştir (Anderson, 1994). Küçük çaplı diyaliz tüplerinin implantasyonunun hayvanlarda ödem, yabancı cisim reaksiyonları veya kanamaya neden olmadığı yapılan çalışmada ortaya konulmuştur (Hickner ve ark., 1995).

Kan Beyin Bariyeri Hasarı

Mikrodiyaliz probunun beyne yerleştirilmesini takiben, kan beyin bariyerinin (KBB) hasarını değerlendirmek için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. KBB fonksiyonunun prob yerleştirilmesinden 2 saat sonra yeniden düzenlendiği kabul edilmiştir (Benveniste ve Hüttemeier, 1990). Ancak, KBB (kan-beyin bariyeri) hasarına dikkat çeken yayınlar da bulunmaktadır. Groothuis ve ark. (1998), probun beyne yerleştirildikten hemen sonra KBB geçirgenliğinde ilk artış ve yerleştirdikten 1-2 gün

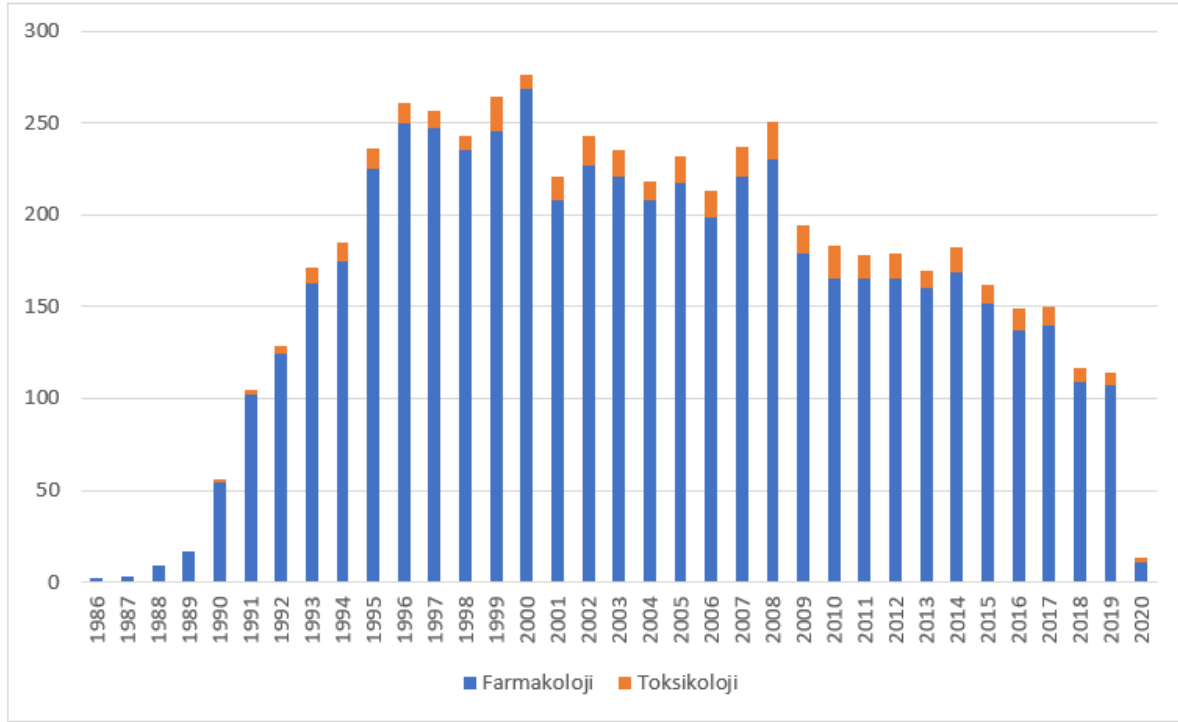
sonra ikinci artışın oluştuğunu ortaya koymuştur. Proplar, KBB geçirgenliğini değiştirdiği ve interstisyel hücre sıvısındaki ilaç konsantrasyonlarının ölçümlerini bozduğundan; ilaçların KBB'den geçişinde mikrodiyaliz yöntemi beyinde titizlikle çalışmalıdır (De Lange ve ark., 1997; Groothuis ve ark., 1998; Westergren ve ark., 1995).

Bakteriyel Kontaminasyon

Mikrodiyalizde kullanılan propların, sterilizasyonu son derece önemlidir. Çünkü, gerekli sterilizasyon sağlanmadığında dokularda bakteriyel üremeyi takiben enfeksiyon ve inflamasyon şekillenebilmektedir. Mikrodiyaliz proplarında farklı dezenfeksiyon ve sterilizasyon yöntemlerini incelenmiştir. Bu farklı işlemlere tutulan propları, temiz bir odada (kontrol grubu) üretilmiş ve paketlenmiş proplarla uzun süreli hayvan deneylerinde kullanarak karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucu kontrol grubunda bile hayvanların sağlığının bozulmadığını, dolayısıyla probun aseptik kullanımının hayvanların sağlığının korunmasında yeterli olduğunu göstermiştir. Mikrodiyaliz, diğer örnekleme tekniklerine kıyasla propların yerleştirilmesi açısından minimal invaziv ve tolere edilebilir bir teknik olarak kabul edilmektedir (Huff ve ark., 2003).

MİKRODİYALİZİN FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ARAŞTIRMALARDAKİ ROLÜ

In vivo mikrodiyaliz tekniği, beyin ve periferik dokulardaki ilaç dağılımını ve metabolizmasını araştırmak için farmakoloji ve toksikoloji alanında giderek daha fazla kullanılmaktadır (Chaurasia, 1999).



Grafik 1. Farmakoloji ve Toksikoloji Araştırmalarında Mikrodiyaliz Çalışmalarının Web of Science’da Yıllara Göre Dağılımı

Web of Science’da, “mikrodiyaliz (microdialysis)” anahtar kelimesi kullanılarak yapılan tarama sonucunda mikrodiyaliz; nörobilimlerde 10.171, farmakolojide 5.511 ve toksikoloji alanındaki 344 literatürle farmakoloji ve toksikoloji araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır.

Antimikrobiyal İlaç Araştırmalarında

Mikrodiyaliz

Son yıllarda, antimikrobiyal maddelerin doku penetrasyonu hastalıkların tedavisinde önemli bir ön koşul olarak görülmektedir. Çünkü, antimikrobiyal tedavinin başarısızlığı sadece bakteriyel dirençle açıklanamamıştır. Mikrodiyaliz ile bakteriyel enfeksiyon için anatomik olarak tanımlanmış hedef bölge olan intersitisyel boşluktaki bağlanmamış farmakolojik olarak aktif antimikrobiyal ilacın çevrimiçi ölçümü sağlanır (Joukhadar ve ark., 2001). Doku-ilaç konsantrasyonlarını ölçebilen uygun

yöntemlerin kullanılması; farmakolojik ve mikrobiyolojik olarak ilgili bölgedeki ilaç konsantrasyonları hakkında bilgi sağlayarak, tedavinin başarı oranını arttırmaktadır (Joukhadar ve Müller, 2005). Antibiyotiklerle hedef doku penetrasyonu üzerine yapılan çalışmalar, klinik ilaç gelişiminin önemli bir parçası olmakla birlikte; daha çok deri kabarcığı veya biyopsi çalışmalarına dayanmaktadır. Özellikle, deri kabarcığı sıvısı ve doku homojenatlarındaki toplam ilaç doku konsantrasyonlarının ölçümü yanıltıcı olabilir. Çünkü, sadece intersitisyel sıvıdaki bağlanmamış ilaç fraksiyonu antibakteriyel aktivite uygulamaktadır. Bununla birlikte, klinik doku dağılımı çalışmalarına yönelik alternatif yöntem arayışı başlamıştır ve bu nedenle mikrodiyalize yönelinmiştir. Antimikrobiyal ilaç araştırması alanında mikrodiyaliz özellikle uygun bir teknik oluşturur. Çünkü, bu yöntem intersitisyel sıvıdaki

bağlanmamış ilaç konsantrasyonlarının ölçülmesine izin verir. Son yıllarda, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi danışma komitesi, mikrodiyaliz antimikrobiyal ilaçların doku dağılımı ile ilgili klinik çalışmalar için potansiyel bir yöntem olduğunu kabul etmiştir. Mikrodiyaliz tekniği, antibiyotik ajanların hastalık bölgesindeki bakterileri etkili bir şekilde yok etmek için yeterli bir sürenin mevcut olup olmadığı sorusunu cevaplamada önemli bir araçtır. Bu nedenle, mikrodiyaliz, çeşitli durumlarda antibakteriyellerin doku dağılımı hakkındaki bilgilerimizi büyük ölçüde artıracak ve hastalarda ilaç dozaj rejimlerini uygun şekilde değiştirmeye yardımcı olacaktır. Endüstriyel araştırmalarda, hedef bölge konsantrasyonlarının ilaç geliştirme sürecine entegrasyonu, gelecekte ilaçların daha rasyonel ve verimli bir şekilde geliştirilmesine ve kullanılmasına katkıda bulunacaktır (Merrikin ve ark., 1983; Müller, 2000; Merrikin ve ark., 1983; Kunin ve ark., 1973).

Antineoplastik İlaç Araştırmalarında Mikrodiyaliz

Mikrodiyaliz problemleri tümör veya deriye yerleştirilir. Bu alanlarda, teknik *in vivo* penetrasyonu eşzamanlı olarak değerlendirmek için sitokinler de dahil olmak üzere ilaçları ve çözünür endojen faktörleri toplar. İlaçlar, toplanan biyobelirteçler üzerindeki etkileri değerlendirmek için intratümöral veya dermise prob yoluyla verilir. Birçok çalışmada, insan doku ve tümörlerindeki antineoplastik ajanların *in vivo* ölçümleri (Blöchl-Daum ve ark., 1996; Ekstrom ve ark., 1996; Müller ve ark., 1997; Mader ve ark., 1998; Müller ve ark., 1998; Wu ve ark., 2000) için mikrodiyalizin uygun olduğu gösterilmiştir. Tümörler ile ilişkili MD çalışmaları, kemoterapi tedavisinin başarısızlığını antineoplastik ilaçların, tümörlerin intersellüler sıvıya yetersiz penetrasyonuna dayandırmaktadır (Jain, 1987,

1996). Tümör damarları arasındaki yetersiz ilaç penetrasyonu sonucu; tümörlere yönelik terapötik potansiyelin düştüğü mikrodiyaliz ile yapılan klinik çalışmalarla gösterilmektedir. Klinik onkolojik çalışmalarla mikrodiyalizin, belirlenmiş sitotoksik maddelerin başlangıç farmakokinetiğinin *in vivo* ölçülmesiyle kemoterapideki başarının öngörebileceği vurgulanmıştır. Ronquist ve ark. (1992) gliomların tedavisinde bölgeye özgü ilaç iletimi için MD problemlerini başarılı bir şekilde terapötik araçlar olarak kullanmıştır.

Transdermal İlaç Çalışmalarında Mikrodiyaliz

Farmasötikler uzun yıllardır topikal olarak uygulanmaktadır. Son yıllarda transdermal ilaç uygulama sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Topikal ilaç tedavisi sırasında en önemli nokta; ilacın, klinik etkisini gösterebilmesi için cilde yüksek oranda ve hızlı bir şekilde nüfuz etmesidir. Bant sıyırma tekniği genellikle cildin en üst tabakası olan *Stratum corneum*'daki ilaç dağılımı hakkında bilgi verirken, daha derin cilt katmanları hakkında bilgi vermemektedir. Bu nedenle, düzenleyici otoriteler tarafından dermal mikrodiyaliz, biyoeşdeğerlik değerlendirmesi için potansiyel bir araç olarak kabul edilmektedir (Azeredo ve ark., 2014). Mikrodiyaliz, dermisteki ilaç seviyelerinin daha doğru gözlemlenmesini sağlar. Dermal mikrodiyaliz tekniği, eksiz edilmiş deriden alınan mikrodiyaliz numunelerindeki 5-florourasil (5-FU) konsantrasyonunun reseptör hücresinden alınan numunelerdeki konsantrasyonla eşzamanlı karşılaştırılarak *in vitro* olarak doğrulanmıştır (Ault ve ark., 1992). Başka bir çalışmada, 5-FU'nun dermal akısını izlemek için sıçanların dermisine lineer problemler implante edilmiştir (Ault ve ark., 1994). Nikotin, transdermal uygulama sistemleri açısından önemli bir ilaçtır. Mikrodiyaliz

kullanılarak nikotinin kutanöz farmakokinetiği üzerinde yapılan bir çalışmada, nikotin için ilk saptanma ve maksimum konsantrasyona ulaşma süresinde farklılıklar ve maksimum nikotin konsantrasyonlarında bireyler arası ciddi farklar bulunmuştur (Hegemann ve ark., 1995). MD, transdermal ilaçların biyoeşdeğerlik çalışmalarında da potansiyel bir araç olarak kullanılmaktadır (Erdo, 2015).

Ağrı Kesici İlaç Araştırmalarında Mikrodiyaliz

Scott ve ark. (1991), asetaminofen ve sülfat, glukuronat metabolitlerinin farmakokinetiğini incelemek için sıvı kromatografiye bağlı *in vivo* mikrodiyaliz örneklemesini kullanmıştır. Numuneler, tek bir deney hayvanı kullanılarak sıvı kaybı olmadan sürekli olarak (5 saatten fazla) toplanmıştır. Mikrodiyaliz örneklemesi ile elde edilen farmakokinetik sonuçlar, kan alımından elde edilenler sonuçlarla tam olarak uyumlu bulunmuştur. Gunaratna ve ark. (1994), yeni geliştirilen bir shunt probu kullanarak asetaminofenin, metabolik ve farmakokinetik profilini elde etmek için mikrodiyaliz tekniğini kullanmışlardır. Shunt problemlerinin oldukça uzun diyaliz membranı (3–6 cm) hassasiyeti arttırmaktadır. Prob, ilacın verilmesinden sonra ilacın metabolizması ve farmakokinetiği hakkında bilgi sağlamak için bir sıçanın safra kanalına implante edilmiştir (Gunaratna ve ark., 1994).

Endojen Maddelerin Tespitinde Mikrodiyaliz

Nörotransmitterler

Mikrodiyaliz, nörotransmitter salınımını saptamak, tanımlamak, ölçmek ve böylece akut beyin hasarı ve epilepside beyin nöromodülasyonunu daha iyi anlamak için kullanılan en temel yöntemlerden biridir. Özellikle, serebral mikrodiyaliz çoğunlukla nöroşirürjide klinik araştırma aracı olarak

kullanılmaktadır (Azeredo ve ark., 2014). Derin beyin stimülasyonu sırasında oral dozlamadan sonra levodopa farmakokinetiğinin yanı sıra, katekolamin düzeylerini belirlemek için Parkinson hastalarında nörotransmitter değişikliklerinin belirlendiği bir mikrodiyaliz çalışması yapılmıştır. Örnekleme zamanı derin beyin stimülasyonu sırasında beyin kimyasında olası değişiklikleri görmek için çok kısa olmasına rağmen; araştırmacılar bu tür klinik vakalarda mikrodiyaliz tekniğinin uygulanabilirliğini göstermişlerdir (Zsigmond ve ark., 2012).

Glikoz Seviyelerinin İzlenmesi

Hayati tehlikeye sahip hastaların, glisemik kontrolünün düzenli yapılması mortalite ve morbiditelerini önemli ölçüde azaltmakla birlikte tıbbi bakım maliyetini de düşürmektedir. Kan glikoz seviyelerini izlemek için intravenöz mikrodiyaliz kullanımı hala tartışmalıdır. Çünkü, özellikle kritik hastalarda bu yöntemin uygulanması doğru değildir. Feichtner ve ark. (2010), heparinize kanı periferik bir damardan *ex vivo* mikrodiyalizöre sürekli olarak çeken bir cihaz geliştirildi. Teknik ve klinik değerlendirmeler, sunulan cihazın doğru ve uzun süreli stabil kan glikoz seviyesini izlemede uygun mikrodiyalizat numuneleri sağladığını göstermektedir (Rooyackers ve ark., 2010).

Biyobelirteç Seviyeleri

Helmark ve ark. (2010), osteoartritli bir insan diz eklemine mikrodiyaliz probu yerleştirmiştir. Yapılan çalışmada, bu hastalarda fiziksel egzersizin fizyolojik etkisini belirlemek için kıkırdak ve iltihaplanmanın biyokimyasal belirteçleri ölçülmüştür. Sonuçlar, egzersiz yapmayan grupla karşılaştırıldığında, egzersiz yapan grupta hem intra-artiküler hem de peri-sinoviyal sıvıda interlökin-10 değerlerinin anlamlı şekilde arttığını göstermiş ve

egzersizin osteoartritli hastalar üzerindeki yararlı etkisi açıklanmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikrodiyaliz, teknik olarak çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bu yöntem, hem insan hem de hayvanlarda gerek klinik öncesi gerek klinik çalışmalarda önemli bir örnekleme tekniğidir. Son yayınların birçoğunda; antibiyotiklerin (Müller ve ark., 1996), antitümör ajanların (Blöchl-Daum ve ark., 1996) ve nikotinin (Müller ve ark., 1995) doku kinetiğini araştıran mikrodiyalizin klinik kullanımı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda, belirtilen maddelerin ekzojen olarak verildiğinde vücuttaki değişim kinetikleri araştırılmıştır (Müller ve ark., 1995). Mikrodiyalizle yapılan farmakolojik çalışmaların önemli bir bölümünde, endojen maddelerin deri altı hücre dışı sıvı konsantrasyonu incelenmiştir. Bu çalışmalarda, deri altı yağ dokusundaki glikoz, laktat, piruvat veya gliserol kinetiği oral uygulamadan sonra incelenmiştir. MD, insanlarda perifer dokulardaki ilaç konsantrasyonlarının da belirlenmesinde son yıllarda popüler bir yöntem haline gelmiştir. Bu teknik, metabolitlerin ve küçük moleküllerin hücre dışı sıvıda izlenmesi ve metabolik olarak aktif maddelerin bu bölmeyle lokal olarak verilmesini sağlar. Cimmino ve ark. (1997), mikrodiyalizle temel prensipleri (farklı prob tipleri, moleküler kesme, perfüzyon hızı, diyaliz tamponu) ve *in vivo* mikrodiyalizin teorik yönlerini (prob etkinliği, geri kazanım, perfüzyon hızı, doku metabolizmasının nicelendirilmesi) gözden geçirmişlerdir. Mikrodiyaliz ile yapılan periferik doku çalışmaları; iskelet kasları, deri altı yağ doku, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, pankreas, kan ve diğer periferik dokulardan oluşmaktadır (De la Peña ve ark., 2000). İskemik ve kemik doku hasarının belirlenmesine yönelik metabolitlerin doku kinetiği, insan iskelet kasının intersitisyel sıvı boşluğunda

mikrodiyaliz ile çalışılmıştır. MD, klinik farmakolojide de geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. İnsanlarda deri (Boelsma ve ark., 2000), tümör ve yağ dokularının örnekleme (Mader ve ark., 1998) bu yöntemle yapılmıştır. İntraserebral mikrodiyaliz, subaraknoid kanaması ve gecikmiş iskemisi olan hastaları izlemek için de kullanılmıştır (Nilsson ve ark., 1999). Ayrıca, yenidoğan ve çocukların vücut yağlarından alınan mikrodiyaliz örnekleme (Hildingsson ve ark., 2000) ameliyat sonrası gliserol ve laktat üretiminde yaşa bağlı varyasyonları araştırmak için de kullanılmıştır. Klinik öncesi farmakokinetik çalışmalarda ihtiyaç duyulan hayvan sayısının mikrodiyaliz tekniği uygulanarak önemli ölçüde azaltılabileceği öne sürülmüştür. Mikrodiyaliz, vücut sıvısında kayba neden olmamakla birlikte kan homeostazında da değişiklik yaratmamaktadır. Bu nedenle, hayvandan alınan örnek miktarını sınırlamamaktadır. *In vivo* mikrodiyaliz, periferik dokulardaki bileşiklerin bağlanmamış konsantrasyonlarını eşzamanlı olarak izler. Doğru kalibrasyona sahip prob ile kombine edilen mikrodiyaliz, ilaçların farmakokinetiklerini farklı dokularda *in vivo* incelemek için güvenilir bir tekniktir (Fettweis ve Borlak, 1996). İlaçların farmakokinetik/farmakodinamik profilinin araştırılması, hem anestezide hem de uyanık hayvanlarda mikrodiyaliz ile gerçekleştirilir. Spesifik beyin bölgelerindeki nörotransmitter düzeylerindeki değişiklikler ve sağlık/hastalıklı hayvanlardaki biyobelirteç konsantrasyonlarının *in vivo* mikrodiyaliz tekniğiyle incelenmesi önerilmektedir (Erdo, 2015).

GELECEKTE MİKRODİYALİZ

Mikrodiyaliz, doku kompozisyonu ve farmakokinetiğinin belirlenmesi için kullanılan en önemli örnekleme tekniklerinden biri haline

gelmiştir (Plock ve Kloft, 2005). MD tekniğindeki son gelişmeler göz önüne alındığında, yöntemin çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılan güçlü bir araç olduğu görülmektedir. Biyolojik sıvı kaybı olmadığından teknik, küçük hayvanlar ve yeni doğanlar da dahil olmak üzere hemen hemen her bireye ve dokuya uygulanabilmektedir. Bu yöntem, hastalıkların tanısının yanında; nörotransmisyonun izlenmesi, ilaç geliştirme ve etkinlik denemelerinde de standart bir uygulama haline gelecektir. MD yöntemi ile; enfekte olmuş organların antibiyotik penetrasyonunu değerlendirilmesi, hastalık durumlarında doku metabolizmasının izlenmesi, kimyasal tahlillerin minyatürleştirilmesi ve çevrimiçi otomasyonu sağlanabilecektir (Müller, 2002). Ayrıca, bu yöntem; endojen metabolizma, farmakokinetik, farmakodinamik, hastalık durumu ve ilerlemesi de dahil olmak üzere biyomedikal araştırmalarda büyük bir değer olacaktır. Geçmişte yöntemde karşılaşılan; problemlerin kırılması, doku hasarı ve iltihabı, zaman alıcı kalibrasyon prosedürleri gibi bazı teknik sorunlar yöntemin gelişmesinde sorunlar yaratmıştır (Azeredo ve ark., 2014; Lönnroth, 1991). Ancak, analitik yöntemlerin sürekli geliştirilmesi mikrodializ uygulamalarının ilerlemesini ve karşılaşılan sorunların çözülmesini teşvik edecektir. Mikrodializ tekniğinin sunduğu fayda, gelecekteki farmakokinetik/farmakodinamik çalışmalar üzerinde de etkili olacaktır (De la Peña ve ark., 2000). Bu derlemede, mikrodializ tekniğinin farmakoloji/toksikoloji araştırmalarındaki potansiyeli gösterilmiştir. Klasik uygulama alanlarının dışında, akla gelebilecek hemen hemen her alanda MD önemli bir teknik olarak kullanılmaktadır.

KAYNAKLAR

Anderson C, Andersson T, Wardell K. (1994). Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis

probe visualized by laser Doppler perfusion imaging. *J Invest Dermatol*, 102:807-811.

- Ault JM, Lunte CE, Meltzer NM, Riley CM. (1992). Microdialysis sampling for the investigation of dermal drug transport. *Pharm Res*, 9(10):1256-1261.
- Ault JM, Riley CM, Meltzer NM, Lunte CE. (1994). Dermal microdialysis sampling in vivo. *Pharm Res*, 11(11):1631-1639.
- Azeredo FJ, Dalla Costa T, Derendorf H. (2014). Role of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics: current status and future directions. *Clin Pharmacokinet*, 53(3):205-212.
- Benveniste H, Hüttemeier PC. (1990). Microdialysis— theory and application. *Prog Neurobiol*, 35(3):195-215.
- Blöchl-Daum B, Müller M, Meisinger V, Eichler H, Fassolt A, Pehamberger H. (1996). Measurement of extracellular fluid carboplatin kinetics in melanoma metastases with microdialysis. *Br J Cancer*, 73(7):920-924.
- Boelsma E, Anderson C, Karlsson AM, Ponc M. (2000). Microdialysis technique as a method to study the percutaneous penetration of methyl nicotinate through excised human skin, reconstructed epidermis, and human skin in vivo. *Pharm Res*, 17(2):141-147.
- Chaurasia CS. (1999). In vivo microdialysis sampling: theory and applications. *Biomed Chromatogr*, 13(5):317-332.
- Cimmino M, Geloan A. (1997). Tissue microdialysis: practical and theoretical aspects. *Diabetes Metab*, 23(2):164-170.
- CMA Microdialysis. (1984). Microdialysis Education. Erişim: www.microdialysis.com. Erişim tarihi: 27.02.2020
- De la Peña A, Liu P, Derendorf H. (2000). Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Deliv Rev*, 45(2-3):189-216.
- De Lange EC, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD. (1997). Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Res Rev*, 25(1):27-49.
- Delgado J. (1972). Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 198:9-21.
- Ekstrom PO, Andersen A, Saeter G, Giercksky KE, Slordal L. (1996). Continuous intratumoral microdialysis during high-dose methotrexate therapy in a patient with malignant fibrous histiocytoma of the femur: a case report. *Cancer Chemother Pharmacol*, 39(3):267-272.
- Erdo F. (2015). Microdialysis Techniques In Pharmacokinetic and Biomarker Studies. Past, Present and Future Directions A Review. *Clin Exp Pharmacol P*, 5(180):1459-2161.
- Feichtner F, Schaller R, Fercher A, Ratzler M, Ellmerer M, Plank J, Krause B, Pieber T, Schaupp L. (2010). Microdialysis based device for continuous extravascular monitoring of blood glucose. *Biomed Microdevices*, 12(3):399-407.
- Fettweis G, Borlak J. (1996). Topics in xenobiochemistry— application of microdialysis techniques in

- pharmacokinetic studies. *Xenobh*, 26(5):473-485.
- Groothuis DR, Ward S, Schlageter KE, Itskovich AC, Schwerin SC, Allen CV, Dills C, Levy RM. (1998). Changes in blood-brain barrier permeability associated with insertion of brain cannulas and microdialysis probes. *Brain Res*, 803(1-2):218-230.
- Gunaratna C, Lunte S, Zuo H. (1994). Shunt probe: a new microdialysis probe design for in vivo drug metabolism studies. *Curr Separations*, 13(3):80-83.
- Hammarlund-Udenaes M. (2017). Microdialysis as an important technique in systems pharmacology—a historical and methodological review. *AAPS J*, 19(5):1294-1303.
- Hegemann L, Forstinger C, Partsch B, Lagler I, Krotz S, Wolff K. (1995). Microdialysis in cutaneous pharmacology: kinetic analysis of transdermally delivered nicotine. *J Invest Dermatol*, 104(5):839-843.
- Helmark IC, Mikkelsen UR, Borglum J, Rothe A, Petersen MC, Andersen O, Langberg H, Kjaer M. (2010). Exercise increases interleukin-10 levels both intraarticularly and peri-synovially in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther*, 12(4):R126.
- Hickner RC, Ekelund U, Mellander S, Ungerstedt U, Henriksson J. (1995). Muscle blood flow in cats: comparison of microdialysis ethanol technique with direct measurement. *J Appl Physiol*, 79(2):638-647.
- Hildingsson U, Lönnqvist PA, Selldén H, Eksborg S, Ungerstedt U, Marcus C. (2000). Age-dependent variations in white adipose tissue glycerol and lactate production after surgery measured by microdialysis in neonates and children. *Pediatr Anesth*, 10(3):283-289.
- Hocht C, Opezzo JA, Taira CA. (2004). Microdialysis in drug discovery. *Curr Drug Discov Technol*, 1(4):269-285.
- Höcht C, Opezzo JA, Taira CA. (2007). Applicability of reverse microdialysis in pharmacological and toxicological studies. *J Pharmacol Tox Met*, 55(1):3-15.
- Huff JK, Bresnahan JF, Davies MI. (2003). Preliminary evaluation of several disinfection/sterilization techniques for use with microdialysis probes. *Life Sci*, 73(3):275-287.
- Jain RK. (1987). Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res*, 47(12):3039-3051.
- Jain RK. (1996). Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Scienc*, 271(5252):1079-1080.
- Joukhadar C, Derendorf H, Müller M. (2001). Microdialysis. *Eur J Clin Pharmacol*, 57(3):211-219.
- Joukhadar C, Müller M. (2005). Microdialysis: current applications to clinical pharmacokinetic studies and its role in the future. *Clin Pharmacokinet*, 44(9): 895-913.
- Kho CM, Ab Rahim SKE, Ahmad ZA, Abdullah NS. (2017). A review on microdialysis calibration methods: the theory and current related efforts. *Mol Neurobiol*, 54(5):3506-3527.
- Kunin CM, Craig WA, Kornguth M, Monson R. (1973). Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics. *Ann NY Acad Sci*, 226(1):214-224.
- Lönnroth P. (1991). Microdialysis—a new and promising method in clinical medicine. *Intern Med J*, 230(4):363-364.
- Mader RM, Brunner M, Rizovski B, Mensik C, Steger GG, Eichler HG, Müller M. (1998). Analysis of microdialysates from cancer patients by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 19(16-17):2981-2985.
- Maidment N, Brumbaugh D, Rudolph V, Erdelyi E, Evans C. (1989). Microdialysis of extracellular endogenous opioid peptides from rat brain in vivo. *Neuroscience*, 33(3):549-557.
- Merrikin DJ, Briant J, Rolinson GN. (1983). Effect of protein binding on antibiotic activity in vivo. *J Antimicrob Chemotherapy*, 11(3):233-238.
- Müller M. (2000). Microdialysis in clinical drug delivery studies. *Adv Drug Deliv Rev*, 45(2-3):255-269.
- Müller M. (2002). Science, medicine, and the future: microdialysis. *BMJ*, 324(7337):588.
- Müller M, Brunner M, Schmid R, Mader RM, Bockenheimer J, Steger GG, Steiner B, Eichler HG, Blöchl-Daum B. (1998). Interstitial methotrexate kinetics in primary breast cancer lesions. *Cancer Res*, 58(14):2982-2985.
- Müller M, Haag O, Burgdorff T, Georgopoulos A, Weninger W, Jansen B, Stanek G, Pehamberger H, Agneter E, Eichler H. (1996). Characterization of peripheral-compartment kinetics of antibiotics by in vivo microdialysis in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(12):2703-2709.
- Müller M, Mader RM, Steiner B, Steger GG, Jansen B, Gnant M, Helbich T, Jakesz R, Eichler HG, Blöchl-Daum B. (1997). 5-Fluorouracil kinetics in the interstitial tumor space: clinical response in breast cancer patients. *Cancer Res*, 57(13):2598-2601.
- Müller M, Schmid R, Nieszpaur-Los M, Fassolt A, Lönnroth P, Fasching P, Eichler H. (1995). Key metabolite kinetics in human skeletal muscle during ischaemia and reperfusion: measurement by microdialysis. *Eur J Clin Invest*, 25(8):601-607.
- Müller M, Schmid R, Wagner O, Osten Bv, Shayganfar H, Eichler HG. (1995). In vivo characterization of transdermal drug transport by microdialysis. *J Control Release*, 37(1-2):49-57.
- Nilsson OG, Brandt L, Ungerstedt U, Säveland H. (1999). Bedside detection of brain ischemia using intracerebral microdialysis: subarachnoid hemorrhage and delayed ischemic deterioration. *Neurosurgery*, 45(5):1176-1185.
- Plock N, Kloft C. (2005). Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *Eur J Pharm Sci*, 25(1):1-24.
- Ronquist G, Hugosson R, Sjölander U, Ungerstedt U. (1992). Treatment of malignant glioma by a new therapeutic principle. *Acta Neurochir*, 114(1-2):8-11.
- Rooyackers O, Blixt C, Mattsson P, Wernerman J. (2010). Continuous glucose monitoring by intravenous microdialysis. *Acta Anaesthesiol Scand*, 54(7):841-847.

- Scott DO, Sorenson LR, Steele KL, Puckett DL, Lunte CE. (1991). In vivo microdialysis sampling for pharmacokinetic investigations. *Pharm Res*, 8(3):389-392.
- Shippenberg TS, Thompson AC. (1997). Overview of microdialysis. *Curr Protoc Neurosci*, 1, Chapter 7: Unit7.1.
- Ungerstedt U. (1991) Microdialysis—principles and applications for studies in animals and man. *Intern Med J*, 230(4):365-373.
- Weiss DJ, Lunte CE, Lunte SM. (2000). In vivo microdialysis as a tool for monitoring pharmacokinetics. *Trac Trend Anal Chem*, 19(10):606-616.
- Westergren I, Nyström B, Hamberger A, Johansson BB. (1995). Intracerebral dialysis and the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 64(1):229-234.
- Wu Z, Smithers B, Anderson C, Roberts M. (2000). Can tissue drug concentrations be monitored by microdialysis during or after isolated limb perfusion for melanoma treatment? *Melanoma Res*, 10(1):47-54.
- Zapata A, Chefer VI, Shippenberg TS. (2009). Microdialysis in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, 47(1):7.2. 1-7.2. 29.
- Zsigmond P, Dermroth N, Kullman A, Augustinsson L-E, Dizdar N. (2012). Stereotactic microdialysis of the basal ganglia in Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*, 207(1):17-22.