

İN VİTRO OKSİDDATİF MİKROZOMAL I. FAZ İLAÇ METABOLİZMASI TEKNİKLERİ

TECHNIQUES IN *IN VITRO* OXIDATIVE MICROSOMAL PHASE I DRUG METABOLISM

Mert ÜLGEN*

SUMMARY

The body has mechanisms that remove unwanted molecules and convert them into derivatives of the administered molecule. These derivatives are more prone to elimination, usually by the liver. This process of "metabolism" usually leads to the formation of molecules that are more water soluble. The metabolites of a drug can, however, also possess pharmacological and / or toxicological activity, which may be beneficial or detrimental to the system. It is vital, therefore, to be able to detect, identify and investigate the drug metabolites so that the effects of the administered agent can be monitored accurately. Using *in vitro* techniques, the fate of drugs in biological systems can be followed and the reaction mechanism (s) can be elucidated. Understanding the pathways of metabolism enables the pharmacists and doctors to understand and control the use of drugs more effectively and safely. In the present paper, the techniques studying the *in vitro* oxidative microsomal phase I metabolism of drug molecules will be reviewed.

ÖZET

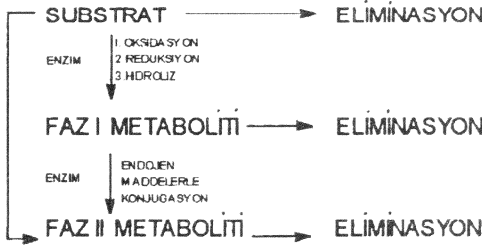
Vücut, istenmeyen molekülleri elimine edip bu molekülleri diğer türevlere dönüştüren mekanizmalara sahiptir. Bu türevler, genellikle karaciğer vasıtası ile eliminasyona yatkındır. Metabolizma işlevi, genel olarak suda daha çok çözünen moleküllerin oluşumuna yol açar. Buna rağmen, bir ilacın metabolitleri ayrıca sisteme faydalı veya zararlı farmakolojik ve toksikolojik aktiviteler gösterebilir. Bu nedenle alınan bileşiğin etkilerinin doğru olarak gözlenebilmesi için, ilaç metabolitlerinin tespiti, teşhisi ve araştırılması çok önemlidir. *In vitro* teknikleri kullanarak, biyolojik sistemler içerisindeki ilaçların akibeti takip edilebilir ve reaksiyon mekanizmaları açığa çıkartılabilir. Metabolizma yollarının anlaşılması, eczacı ve doktorların daha etkili ve güvenli ilaç kullanımını anlamalarını ve bunu kontrol etmelerini sağlar. Bu yayında, ilaç molekülleri üzerinde yapılan *in vitro* oksidatif mikrozomal faz I metabolizma çalışma teknikleri anlatılacaktır.

* Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 81010 Haydarpaşa / İSTANBUL.

GİRİŞ

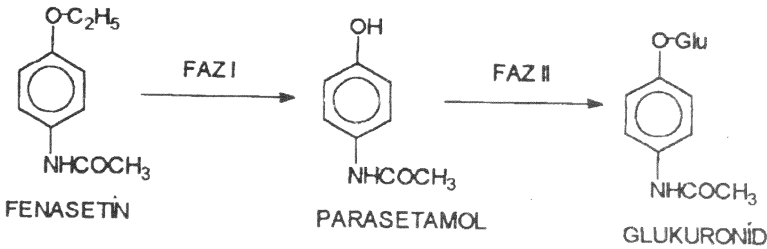
İlaçlar dahil, organizmamıza dışarıdan alınan ve çoğu birçok avantaj getirmek üzere üretilmiş çeşitli tiplerde ve çeşitli kullanım alanlarına sahip "ksenobiyotik" adı altında bilinen kimyasal maddelerin çoğu vücutta enzimatik mekanizmalarla metabolize edilerek genellikle non - toksik ve kolayca elimine edilebilen diğer kimyasallara "metabolitlere" dönüştürülür (1,2,3). Ksenobiyotikler arasında ilaçlardan başka, gıdalara bilerek ya da kontaminant olarak katılan çeşitli kimyasallar ve gıda katkı maddeleri, ayrıca sentetik tadlandırıcılar, rujlardaki kozmetikler, diş pastaları, yıkama sıvılarındaki deterjanlar, yıkama tozları, beyazlatıcılar, sabundaki kimyasallar, meyve ve sebzelerdeki pestisidler (insektisid ve herbisidler), kontraseptif kimyasallar ve hava kirliliği gibi organizmanın maruz kalabileceği maddeler sayılabilir. Metabolik reaksiyonların doğal olarak amacı; ksenobiyotikleri; vücuttaki glukuronik asid ve amino asidler gibi birtakım endojen maddelerle konjuge olabilecek şekilde vücuttan kolayca elimine edilebilen non - toksik bir şekile dönüştürmektedir. Ancak, metabolizma sonucu, daha toksik, daha aktif ve nonpolar metabolitler de meydana gelebilmesi nedene ile, özellikle eğer bu ksenobiyotikler kullanım alanına sahiplerse, kullanımlarının emin olup olmadığını, herhangi bir toksisite göstermeden önce organizmadan kolayca elimine edilip edilmediklerini ve ayrıca organizmada birikim yapıp yapmadıklarını anlamak, dolayısı ile bu kimyasalların organizmadaki akıbetlerini, dönüştükleri metabolitleri ve bu metabolitlerin organizmaya yapacağı etkileri deneysel olarak saptamak çok önemlidir.

Enzimlerle kontrol edilen iki ayrı faz halinde yürüyen metabolizma reaksiyonların 1. fazında; ilaçlardan genellikle oksidasyon, reduksiyon veya hidrolitik bir reaksiyonla meydana gelen faz 1 metabolitleri, bir 2. faz reaksiyonu ile molekülün konjugasyon ürünlerini oluşturacak şekilde sentez reaksiyonuna uğradıktan sonra 2. faz metabolitleri halinde elimine edilir. Herbir fazda daha polar ürünler oluşur (Şekil 1).



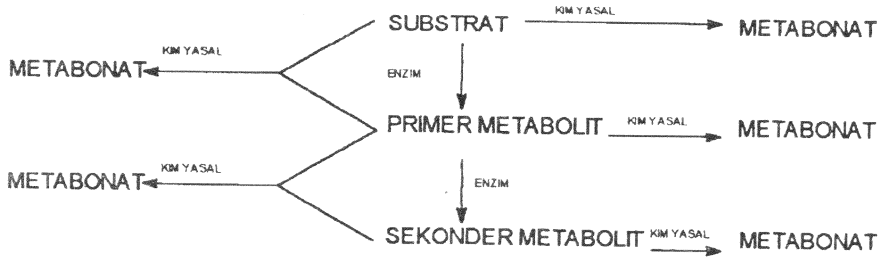
Şekli - 1 : Metabolizmanın fazları

İlaç aktivitesinin son noktası olan 2. fazın oluşturduğu metabolitler, genellikle suda çözünen asid bir yapıya sahip olan non - toksik ve kolay atılabilir karakterli maddelerdir (4,5,6). Bir metabolizma reaksiyonuna örnek olarak, Fenasetin'in bir 1. faz metabolik reaksiyonuna uğrayarak oksidatif deetilasyon reaksiyonu ile aktif p-asetilaminofenol metaboliti verdiğini ve bu metabolitin de bir 2.faz (sentez) reaksiyonu ile inaktif p-asetilaminofenol glukuronidi şeklinde elimine edildiğini söyleyebiliriz (Şekil 2) (7).



Şekil - 2 : Fenasetin 'in metabolizma ürünleri.

Ayrıca, organizmada; bir substrattan veya bu substrattan enzimatik olarak meydana gelen primer ve sekonder metabolitlerden, " non - enzimatik" veya diğer bir deyimle kimyasal bir reaksiyonla " metabonat" adlı verilen yeni maddeler oluşabilir (Şekil 3). Özellikle sekonder aminler ve bunların metabolik ara ürünleri üzerinden metabonat tipinde maddelerin oluşumu modern metodlarla tespit edilmiştir (8,9,10).



Şekil - 3 : Metabolizma sonunda oluşan non - enzimatik ürünler : Metabonat.

Ksenobiyotiklerin uğrayabilecekleri metabolik yolların, oluşan metabolitlerin etkilerinin ve ayrıca gerek *in vivo* gerekse *in vitro* olarak uygulanan tekniklerin çok yönlülüğü nedeniyle, bu derlemede, metabolizma çalışmalarında en önemli yeri tutan oksidatif 1. faz reaksiyonlarının araştırılmasında uygulanan ve *in vitro* olarak karaciğer mikrozomal preparatlarını kullanan tekniklere ana hatlar halinde değinilecektir.

UYGULANAN DENEYSEL YÖNTEMLER

Ksenobiyotiklerin metabolizmasını sağlayan enzimler, en yoğun olarak karaciğer hücrelerinde endoplazmik retikulum (E. R.) denilen bir yapı içinde bulunur (11). Karaciğer homojenize edildiğinde, bir ağ şeklinde olan E. R. kırılarak santrifüj teknikleri ile izole edilebilen mikrozom denilen küçük veziküller oluşturulur. Bu şekilde hazırlanan mikrozomal preparatları kullanarak, ilaçların metabolizması test tüplerinde çalışılabilir. Bu mikroskobik partiküller, oksidasyon, reduksiyon ve hidroliz gibi 1. faz ve ayrıca çeşitli 2. faz sentez reaksiyonlarını üstlenirler. Böylece basit bir örnekle mikrozomlar, benzeni fenole oksitlerken, nitrobenzeni aniline redükler, prokaini p- aminobenzoik aside hidroliz eder veya fenolden fenil glukuronid sentezini yaparlar (5,6).

Şekil 4'de de gösterildiği gibi, bir *in vitro* mikrozomal metabolizma çalışmasında izlenecek safhalar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. Metabolizması araştırılacak ksenobiyotığın diğer bir deyimle substratın ve onun muhtemel metabolitlerinin tespiti, sentezi ve identifikasyonu, çözünürlük ve stabilite deneyleri

2. Substrat ve muhtemel metabolitlerinin logP ve pKa gibi bir-takım fizikokimyasal parametrelerinin tayini

3. Substrat ve muhtemel metabolitlerinin kromatografik ayrımları ve ön ekstraksiyon denemeleri

4. Biyolojik sistemin (karaciğer mikrozomal preparatının) ha-zırlanması ve gerekli ko-faktörlerin tespiti

5. Biyolojik sistemle reaksiyon (Inkübasyon)

6. Substrat ve muhtemel metabolitlerinin birbirinden ayrımını sağlayacak kromatografik sistemin ve biyolojik sistemden substrat ve muhtemel metabolitlerinin ekstraksiyonunu sağlayacak organik sol-ventin ve sonunda bu solventi uzaklaştıracak ortamın tayini (Se-parasyon, Ekstraksiyon ve Evaporasyon)

7. Metabolitlerin teşhis ve identifikasyonları

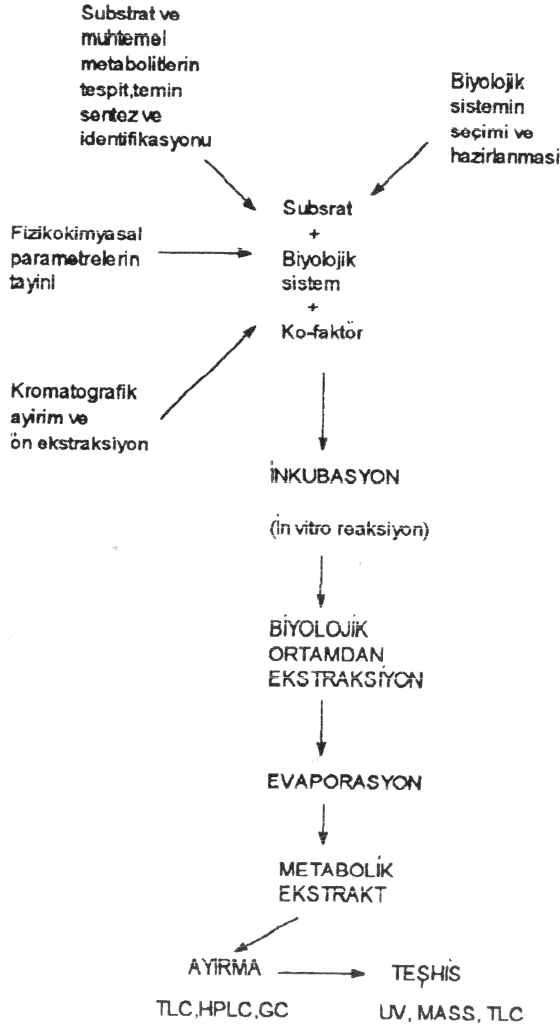
8. Deneyler sonunda tespit edilmeleri halinde yeni " Bilinmeyen" metabolitlerin indirekt teşhisleri

9. Mekanizma tayini için ara metabolitlerin inkübasyonu

10. Kantitatif testlerle metabolitlerin miktarlarının tayini

11. Tür farklılıkları, pH, substrat konsantrasyonu, enzim kon-santrasyonu, ko-faktör miktarları ve inkübasyon süresi gibi bazı pa-rametrelerin değiştirilmesi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi

12. Enzim indüksiyonu ve inhibisyonu yapan ajanların ilavesi ile metabolik reaksiyonda rol oynayan enzimlerin tayin edilmesi



Şekil - 4 : İlaç metabolizma çalışmalarının safhaları.

1. Substrat ve muhtemel metabolitlerinin tespiti, sentezi ve identifikasyonu, çözünürlük ve stabilite deneyleri

Bir metabolizma deneyinin ilk safhası, metabolizması araştırılacak kimyasalın "substratın" tespittir. Substrat, ilaç olarak kullanılmak

üzere araştırılması yapılmakta olan bir molekül olabileceği gibi tedavi değeri olmayan "model" bir kimyasal bileşik de olabilir. Bir model bileşik üzerinde yapılacak metabolizma deneyinden alınacak sonuçlar, benzeri yapıda tedavi etkisi araştırılan bir yapının metabolizması hakkında bir fikir ve ayrıca literatüre katkılar sağlar. Üretim aşamasındaki bir ilaç maddesinin üzerinde yapılması gereken kalite kontrol deneyleri yanında ilaç metabolizma yollarının da araştırılarak açığa çıkartılması, yabancı ülkelerde kanun otoritelerince gerekli görülen bir işlemdir. İlaç metabolizmasında mekanizma problemlerinin açığa çıkartılmasının tek yolu yapı-metabolik aktivite tayinine imkan veren deneyler yapmaktır. Örneğin bir model bileşiğin yapısında bulunan substituentlerin cinsini ve konumunu değiştirerek dizayn edilecek farklı substratlar üzerinde yapılacak metabolizma denemeleri ile olaya sebep olan fonksiyonel gruplar ve elamanlar tayin edilir. Fonksiyonel grupların değiştirilmesi ile ilgi alanındaki yapının üzerindeki elektronik, sterik etkiler ve lipofilik özellikler değiştirilebilir. Metabolize olabilecek grupların maskelenmesi ile, metabolik reaksiyonlar inhibe edilerek veya indüklenerek reaksiyon mekanizmaları açığa çıkartılır. Önce, literatürlerin, bilgilerin ve tahminlerin ışığı altında bir hipotez ileri sürülerek düşünülen metabolik yollar ve muhtemel metabolitler saptanır. Bu doğrultuda, substrat ve muhtemel metabolitler sentez yolu ile veya ticari olarak temin edilirler. Bunların yapıları ve saflıkları, spektroskopik, spektrometrik ve kromatografik analiz yöntemleriyle saptanır. Metabolitlerin çoğu, örneğin, N-oksidasyon metabolitleri olan hidroksilaminler, nitroso bileşikler, nitronlar, azoksi torevleri ve bazı aromatik hidroksi bileşikler, kimyasal olarak stabil olmadıkları için sentez çalışmaları ve saklanmaları özel önem gerektirir. Bu nedenle madde ve metabolitlerin ideal saklanma şartları ve hangi çözücülerde daha stabil oldukları araştırılır. Bu, ilerdeki aşamalarda gerekecek örnek hazırlama işlemi açısından önem taşır. Bozunma ürünleri, ısı, ışık, pH etkisi ve çözünürlükleri incelenir.

2. Substans ve muhtemel metabolitlerinin logP ve pKa gibi birtakım fizikokimyasal parametrelerinin tayini

Bir ksenobiyotiğin fizikokimyasal özellikleri onun biyolojik sistemle etkileşmesini ve metabolizmasını değiştirebilir. Bu özelliklerden en önemlileri ve tayin edilmeleri gereken lipofilik veya hidrofilik durumunu gösteren yağ / su partiyon katsayısı (logP değeri) ikincisi ise iyonizasyon sabitesi yani pKa değeridir. Bir ksenobiyotiğin lipidde çö-

zünebilirliği onun ilaç metabolize edici enzim sistemine varabileceğinin ve metabolize olma oranının artacağına belirtisidir (12). Bu değerin ölçülmesinde en yaygın metod maddenin n-oktanol ve su arasındaki dağılımını UV spektroskopisi ile tayin etmektir. İyonizasyon sabitesi olan pKa da fiizyolojik koşullarda absorpsiyon ve metabolizmayı etkileyen bir kriterdir (13). UV yöntemleri veya potansiyometrik olarak ölçülebilen bu değer ayrıca kromatografik ayırmada kullanılacak yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) sistemi hakkında ön bir fikir üretmeyi sağlar.

3. Substrat ve muhtemel metabolitlerinin kromatografik ayırımları ve ön ekstraksiyon denemeleri

Yeni bir ilacın veya molekülün metabolizması çalışılacağı zaman, bu çalışmadan önce, ilk işlem bu metabolitlerin birbirlerinden ve substratın muhtemel metabolitlerinin biyolojik sistemden ekstraksiyonunu çalışmaktır (14, 15, 16, 17).

a. Ayırma işlemi

Ayırma işlemi, ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz - likid kromatografisi (GC) (18) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (19) ile yapılabilir. Amaç, standart madde ve oluşan metabolitlerden elde edilen $R_f \times 100$ ve retensiyon zamanı değerlerinin karşılaştırılmasıdır. Bu metabolitlerin yapılarının UV, NMR, IR ve Mass spektrometrik ve spektroskopik teknikler ile ispatı da gerekir (20). Bugün modern aletler, kromatografik ve spektroskopik yöntemleri birarada kullanarak, örneğin GC - Mass, HPLC - UV ve HPLC - Mass (21) kombine teknikleri şeklinde metabolik ürünlerin güvenilir, hassas, kolay ve hızlı bir şekilde analizlerine imkan vermektedir. TLC, HPLC kadar hassas bir yöntem olmamakla birlikte çok kullanılan hazırlanması ve şartları kolay olan bir tekniktir. Madde ve metabolitlerinin polaritelerinin farklılıklarından yararlanılarak uygun çözücü karışımlarında ayrılımları sağlanır. Ya 254 nm veya 366 nm de ultraviyole ışık altında lekeler tespit edilir ya da lekeler özel reaktifler püskürtmek suretiyle görünür hale getirilir. $R_f \times 100$ değerleri kaydedilir. Metabolizma çalışmalarında en çok kullanılan cihaz HPLC'dir. Maddeler ve metabolitlerinin, uygun bir çözücü sistemi (mobil faz) ve kolon (stasyonere faz) kullanarak uygun retensiyon zamanları ve tekrarlanabilir deney koşulları elde etmek kaydı ile ayırımı yapılır. Biyolojik örneklerle çalışmada mutlaka ön - kolon kullanmak gerekir. Ön - kolon biyolojik kirlilikleri tutarak kolonun kirlenmesini geciktirerek ko-

lonun ömrünü arttırır. Ön - kolon zamanla kirlendiğinde, sistem basıncında artış ve pik şekillerinde bozulmalar meydana gelir. Bu nedenle ön - kolon dolgu maddesi değiştirilir. Genellikle maddeler ve metabolitleri farklı polariteler gösterdikleri için zıt faz HPLC daha yoğun olarak kullanılır. Metabolitlerin çoğu minimum pH aralıklarında bile farklı stabilite ve pik alanları gösterdiklerinden çoğunlukla belirli bir pH seçimine gerek duyulur. En çok kullanılan zıt faz çözücüleri, asetonitril, metanol, su ve tampon sistemleri ve bunların belli oranlardaki karışımlarıdır. Ayırım yapılacak çok fazla sayıda ve benzer polaritede maddelerin varlığında, (İsokratik" ayırım denilen tek bir çözücü sistemi ile yapılan ayırımın başarısız olduğu durumlarda) " Gradient" ayırım tekniği kullanılır. Programlanabilen solvent dağıtma sistemi ile iki ayrı pompa gerektiren gradient teknikte temel prensip, kromatografi esnasında çözücülerin yüzdelerinin değiştirilmesi ile maddeleri farklı zamanlarda elüe etmektir. Ancak sistemin pahalılığı, basınç oynamaları, kolon ve pompa tıkanmaları gibi sorunları nedeni ile bundan mümkün olduğunca kaçınmak doğru bir yaklaşımdır. Kantitatif metabolizma tayinlerinde, substrat ile benzer yapılarda olan ve ya ekstraksiyon öncesi internal olarak, ya da ekstraksiyondan sonra internal olarak takılan standartlar kullanmak oluşan metabolit miktarlarını saptamak için gerekmektedir. Internal standartın iyi ekstrakte edilebilmesi, metabolitler kadar önem taşımakta ayrıca standart olarak kullanılan maddelerin retensiyon zamanının substrat ve metabolitlerden farklı olması, bunlarla etkileşmemesi, saf ve stabil olması gerekmektedir.

b. Ekstraksiyon ve evaporasyon işlemleri

Bu deneylerde, ilaç ve metabolitlerinin biyolojik sistemden en iyi bir verimle ekstraksiyonunu sağlayacak solvent saptanır. İlaç ve metabolitlerinin biyolojik sıvı veya doku homojenatlarından ekstraksiyonu onları suyla karışmayan organik solventlere çekmekle yapılır. Solvente çekilen maddenin stabilitesi, solventin kolay uçuculuğu, ekstraksiyon sıvılarını seçmedeki önemli kriterlerdendir. Metabolik ekstraksiyon çalışmalarında kullanılan en önemli solventler diklorometan, dietileter, kloroform, petrol eteri (k.n. = 40 - 60°C), etil asetat, metanol, 2- propanol, asetonitril ve bunların karışımlarıdır. Ekstraksiyonun amacı mümkün olduğunca iyi bir verimle metabolitleri biyolojik sistemden organik çözücüye çekmektir. Metabolitlerin bu çözücüde stabil olmaları şarttır. Bu nedenle diklorometan ve dietileter, düşük kaynama noktalarına sahip ol-

dukları için ısı ile bozulan maddelerin ekstaksiyonlarında başarı ile kullanırlar. Bunlar 40 ila 45° 'lik su banyolarında azot gazı kullanılmadan ekstrakte edilebilirler. Kaynama noktası yüksek olan solventlerle ekstaksiyona gerek duyulan durumlarda azot gazı altında uçurma işlemi yürütülür. Azot gazı tüpü, 10-20 evaporasyon tüpüne aynı anda kılcal borularla azot akımı verebilecek bir cam düzeneğe bağlanarak evaporasyon sağlanır. Ekstraksiyon sıvılarındaki safsızlıklar ilaç ve metabolitleri ile reaksiyona girebilir ve artifakt maddeler oluşturabilirler (22,23). Örneğin dietileter, ilaç ve metabolitlerini oksijenlenmiş ürünlere dönüştürebilecek peroksidleri içerebilir. Bu maddeler o zaman, *metabonat* olarak tayin edilebilirler (Şekil 3). Bu problemler, ilgili safsızlığı kullanmadan hemen önce izole etmekle önlenmelidir. Metabolitlerin çok az miktarda oluşabileceği düşünülürse saflaştırma işleminin çok önem taşımakta olduğu anlaşılır. İlaç ve metabolitleri nötral, asidik, bazik veya amfoter karakterdedirler. Bu nedenle ekstaksiyon verimini yüksek tutmak amacı ile ekstaksiyon solüsyonunun pH'nın ayarlanması önemli olabilir. Ancak metabolitlerin çoğu, pH değişimlerine duyarlılık gösterdiklerinden, bu işlem kolaylıkla yine *metabonat* olarak tayin edilebilecek bazı bozunma ürünlerinin tayinine yol açabilir (22,23). Bu olay, nötral ve asidik maddelerle bazik maddelere göre daha az vuku bulur. Çoğu bazik ilaç maddelerinin, primer N- oksitlenmiş metabolitleri pH değişimlerine hassas olup ekstaksiyon esnasında izomerizasyon ve kimyasal bozunma meydana gelebilir. Ekstraksiyon işlemi için saf halde olası metabolitler, denatüre mikrozomal preparatlar ve ekstaksiyon solventleri ayrıca fosfat tamponu çözeltisi, pH metre, bir HPLC sistemi, 10 mL'lik lik kapaklı tüpler, en az 3000 rpm devir yapabilen bir banko santrüfjü ve mikropipetler gerekir. Ekstaksiyon işleminden önce bir HPLC sistemi ile madde ve external veya internal standartı ayırmak gerekir. Önce en az 5 farklı konsantrasyon olmak üzere, madde ve standartın bilinen konsantrasyonları ile alınan kromatogramlardan elde edilen pik alanlarının oranı ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi düzenlenir. 10 mL'lik kapaklı santrüfjü tüpleri en az ikili paralel halde hazırlanır. Bu tüplere 2 mL fosfat tamponu, 1 ml denatüre edilmiş biyolojik sistem ve miktarı belli madde solüsyonu konur. Bu durumda miktarı belli internal standart koyma durumunda bu standardın önceden iyi ekstrakte edildiğini bilmek gerekir (internal standart). Her tüp 1 defa 5'er ml lik değişik solventlerle ekstrakte edilir. Bu esnada 1 ila 2 dakika vortex tüp karıştırıcısı ile ve sonra 10 ila 20 da-

kika süreyle her seferinde en az 10 ila 20 adet kapaklı deney tüpünü alabilen ve 60°C lik bir açıyla salınım hareketi yapabilen bir cihaz ile karıştırılma sağlanır. Tüp içerikleri, normal olarak 5-10 dakika 3000 rpm. de santrüfjü edildikten sonra organik faz, pastör pipetleri ile temiz kapaklı tüplere çekilir. Substrat ve metabolitlerini içeren organiz faz bir su banyosunda mümkün olan en düşük temparatürde, bazı durumlarda sadece azot gazı altında çok az miktarda sıvı kalacak ekilde uçurulur. Böylelikle tek bir 5 mL' de en yüksek verimi veren solvent bulunur. Bazı maddelerin kuvvetli hidrofilik özelliklerinden dolayı her tüp içerisine 1 g civarında NaCl ilave edilerek sudaki çözünürlükleri azaltılır. Bazen 1 M 0.5 mL HCl veya 1 M 0.5 mL NaOH sölüsyonları ile pH değıştirilerek madde suda çözünemeyeceği non - iyonize duruma getirilir. Ancak çoğu metabolitler bu pH aralıklarında bozunabilirler (Örneğin hidroksilaminler bazik ortamda nitronlara, nitronlar da asid ortamda aldehitlere dekompoze olurlar). Aminofenoller ve 3-substitue piridin-N- oksidlerinin ekstraksiyonunda çözünen metabolitlerin çözünürlüğünü azltmıştır. Bu nedenle pH değışimlerinden mümkün olduğunca kaçınmak gerekir. Bundan sonra sadece bu solventi kullanarak kaç defa 5'er mL lik ekstraksiyonla verimin artacağı bulunur. Sonunda kaç kez 5'er mL lik ekstraksiyon yapılacağına karar verilir ve bu tüm metabolik deneylerde kullanılır (11, 13, 14).

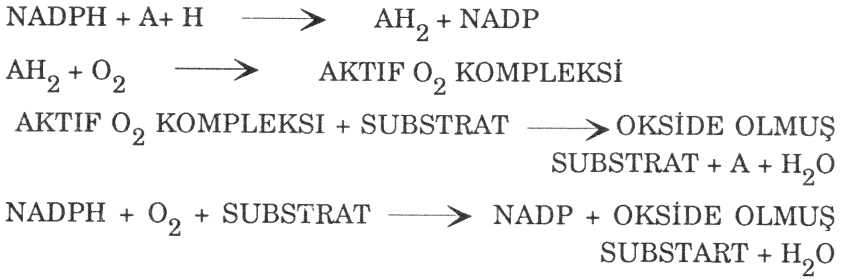
4. Biyolojik sistemin (karaciğer mikrozomal preparatının) hazırlanması ve gerekli ko-faktörlerin tespiti

İlaç metabolizma araştırmalarında bilgiler, canlı deney hayvanları üzerinde yapılacak *in vivo* testlerle elde edilebileceğine rağman çeşitli durumlarda destekleyici bilgiler edinebilmek amacıyla *in vitro* deneyler gerekir (16,17). Bazı araştırcılar için ilgi alanı bir bileşiğin metabolik ürünleri olduğu halde, çoğu olayın enzimatik yönünü araştırmayı hedef alır. Metabolik yol kompleks ise, *in vivo* çalışmalarla primer metabolitler gözlenemez. Bunları eliminasyon ürünlerinden saptamak ta her zaman mümkün olmayabilir. *In vitro* deneyler primer metabolitlerin tespitine ve *in vivo* olarak hangi metabolitlerin araştırılması gerektiğine ışık tutar. Ayrıca insan dokusu ile çalışmalar, insanda oluşacak muhtemel metabolitler hakkında göstergeler verir. *In vitro* deneyler enzimolojik araştırmalara imkan verir. Ayrıca vücuttaki en önemli metabolizma yerini açığa çıkartır. Ancak bir doku *in vitro* olarak maddeyi metabolize ediyorsa bu doku, her zaman *in vivo* olarak

bileşiğin metabolizmasında katkıda bulunacak anlamına gelmez *In vitro* çalışmalarla, çok kısa ömürlü ve bozunmadan eliminasyonları imkansız olan metabolitlerin oluşum yolları ve üretilme oranı saptanır. İlgili enzim açığa çıkartılır ve aktivitenin indüklenip indüklenmeyeceğine karar verilebilir (16,17). En uzun zamandan beri tayin edilmiş olan *in vitro* metabolik teknik, izole edilmiş organ perfüzyonu olup ilk defa karaciğerle yapılmıştır. Daha sonra doku parçaları ile ve ayrıca akciğer, barsak ve karaciğer hücreleri, eritrositler ve lenfositler gibi izole hücreler üzerinde *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bu teknikler bileşiklerin metabolizma yollarını ve oranını tayin etmede faydalı bilgiler sağladıkları halde, ilgili spesifik enzimlerin araştırılmasında uygulama alanları kısıtlıdır. Ayrıca, uzun zaman, teknik deneyim ve pahalı aletler gerektirdiklerinden bu problemler, bugün en çok kullanılan ve hücre alt fraksiyonlarını kullanan spesifik tekniklerin uygulanması ile azaltılmıştır. hücre fraksiyonlarını kullanan spesifik tekniklerin uygulanması ile azaltılmıştır. Hücre alt fraksiyonları, santrifüj teknikleri ile izole edilen sitosol, mitokondri, nukleus ve mikrozomal fraksiyonlardan ibarettir. Organellerin arasındaki boyut farklılıkları farklı devirlerle uygulanan santrifüjleme işlemleri ile izolasyonlarını sağlar. Mikrozomal preparatlar, ilaç metabolizma deneylerinde kullanılan en önemli fraksiyonları teşkil ettiklerinden hazırlanması hakkında detaylı bilgi verilecektir (16,17).

Hepatik Mikrozomal fraksiyon, karma fonksiyonlu oksidazları, flavin içeren monooksijenazları, epoksit hidrolazı, UDP - glukuroniltransferazları, deasetilaz ve esteraz enzimlerini taşıyan karaciğer mikrozomal fraksiyonudur (16,17,22,23). Bu işlevden sorumlu enzimler, önemli ölçüde vücutta ksenobiyotikleri metabolize eden en önemli organ olan karaciğerin hücrelerindeki endoplazmik retikulumda (E.R.) bulunurlar. E. R. içerisinde mikrozomları taşır. İzole edilecek mikrozomlar RNA, fosfolipid, protein ve çoğu elektron transport sistemleri ile ilgili enzim sistemlerini içerirler. Bunlar çeşitli sitokrom P450 izoenzimleri (24) ve mikrozomal flavin içeren monooksijenazlardır (MFMO) (25). Steroidlerin, yağ asidlerinin ve ksenobiyotiklerin metabolizmasını yürütürler. Aktiviteleri için redüklenmiş adenin dinükleotid fosfat (NADPH), moleküler oksijen ve magnezyum iyonlarına gereksinim duyarlar. NADPH'in görevi mikrozomlarda bulunan ve oksijen ile aktif bir oksijen ara ürünü yapan ve bunu substrata transfer eden bir komponenti redüklemektir. Bu sisteme karma fonksiyon oksidaz (MFO) denilir. bu

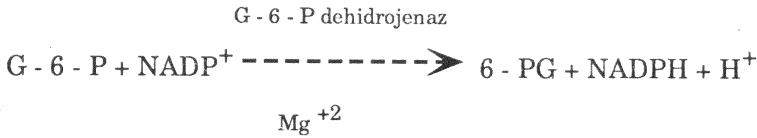
reaksiyon esnasında bir atom oksijen substrata diğer atom ise suya gider (11) :



A = Mikrozomal komponentin okside olmuş şekli

AH₂ = Mikrozomal komponentin redüklenmiş şekli

Çoğu metabolizma reaksiyonlarında NADPH gereksinimi olduğundan bu madde inkübasyon ortamına direkt ilave edilebilir, ancak çoğu kez pahalı olduğu için aşağıdaki eşitliğe göre kimyasal olarak sentezi sağlanır (16,17) :



G - 6 - P = Glukoz - 6 - fosfat

NADP = Nikotinamidadeninükleotidfosfat

6 - PG = 6 - fosfoglukonolakton

NADPH = Redüklenmiş nikotinamidadeninükleotid

(Magnezyum iyonları G - 6 - P dehidrojenaz enziminin esansiyel

kofaktörüdür.)

Karaciğer Mikrozomal Preparatlarının Hazırlanması

Mikrozomal preparatlar; sıçan, kobay, tavşan, kedi, köpek, maymun gibi deney hayvanlarının karaciğerlerinden hazırlanabilirler. Deney hayvanlarını kurban etmeden 24 saat önce sadece su verilmelidir. Hayvanların bu şekilde aç bırakılması glukojen seviyelerini azaltarak sant-

rüfuj teknikleriyle izolasyon esnasında mikrozom kaybını önler. Hayvan kesimi öncesi eğer bir anestezi kullanılıyorsa bu madde enzimatik aktiviteyi etkilememelidir. Karaciğer çıkartıldıktan sonra tüm işlemler buz üzerinde yapılmalı, tüm çözeltiler ve malzemeler soğuk şartlarda tutulmalıdır. İlk karaciğer homojenatı 0.25 M izotonik sukroz solüsyonu içerisinde yapılır. Karaciğer 30 - 60 saniye en üst hızda homojenize edilip meli ve bu işlem mümkün olduğunca çabuk yapılmalıdır. Bu işlemden sonra teflon uçlu bir çubuk ve bu çubuğun girebileceği bir cam tüpten oluşan el ile homojenizasyonu sağlayan bir düzeneğin yardımıyla homojen bir karışım sağlanır. *In vitro* metabolizma araştırmalarında hassas bir terazi, elektrikli homojenizatör, pastör pipetleri, 3000 rpm devire kadar çıkabilen bir banko santrüfjü, 15500 rpm devire kadar çıkabilen soğutmalı bir santrüfjü, 10' mL lik kapaklı cam tüpler, buz paketleri ve -70°C ye kadar inebilen soğutucu bir depo gerekir. Mikrozomlar, doku homojenatlarının post - mitokondriyel supernatantlarının yüksek devirde (14000 g) santrüfjülenmesiyle de hazırlanabildikleri halde bu yöntem uzun zaman aldığı ve pahalı bir ultrasantrifüj cihazı gerektirdiği için bir modifikasyon yapılmış ve şimdi kalsiyum iyonları varlığında endoplazmik retikulum (ER) fragmentlerinin müteakif santrüfjüne dayanan ve düşük devir ve az zaman gerektiren bir yöntem olan " Kalsiyum Klorür çökeltme metodu" ile mikrozomal preparatların hazırlanması tercih sebebi olmuştur (16,17,25).

Bu yöntem için gerekli solüsyonlar

% 0.9 NaCl (9 gram / L); 0.25 M sukroz (256.8 gram / 3L), 80 mM CaCl₂ (19.3 g/L), 0.15 M KCl (2.796 g/250 mL) ve 0.2 M, ve pH 7.4 fosfat tamponu. Tamponun hazırlanması için Na₂PHO₄.2H₂O (28.6 g) ve KH₂PO₄ (5.4 g) su ile 1L ye tamamlanır. Tampon solüsyonun pH'ı 7.4 olmalıdır ve pH ayarı H₃PO₄ ile, son hacme tamamlanmadan önce yapılır.

Deney hayvanlarının karaciğerleri çıkartılıp bir beher içerisinde % 0.9'luk NaCl solüsyonuna konur. Süzgeç kağıtları arasında hemen kurutulan ve kanından uzaklaştırılan karaciğer tartılıp, daha önce soğutulmuş ve içerisinde hesaplı miktarda sukroz solüsyonu bulunan bir homojenizatör kabına ince parçalara keserek mümkün olduğunca çabuk olarak aktarılır. 1 gram karaciğer için 3 mL sukroz ilave edilir. Elektrikli homojenizatörde yapılan homojenizasyonu el homojenizasyonu takip eder. Bu ilk homojenat; 10500 rpm de, nükleus, mitokondri, hücre debris ve bozulmamış hücre partiküllerini uzaklaştırmak amacıyla 30 dakika

santrüfjü edilir. Bu deneylerde santrüfjü, deneylere başlamadan en az 2 saat önce 4 °C ye soğutulmalıdır. Santrüfjüleme sonucu üstte kalan sıvı postmitokondriyel supernatant olup bu mikrozomları ve hücrenin çözünebilen fraksiyonlarını içerir. Tüpte kalan pellet ise nükleus, mitokondri, hücre debris ve bozulmamış hücre partiküllerinden ibarettir. Supernatant bir mezüre alınır ve hacmi ölçülür. 9 mL supernatant için 1 mL CaCl₂ ilave edilir ve el homojenizatörü ile iyice karıştırılır. 5 dakika ER fragmentının agregasyonu için bekletilir. Karışım 15500 rpm de 15 dakika santrüfjü edilir. Santrifuj sonunda oluşan pellet, 0.15M KCl solüsyonunda süspande edilir. KCl solüsyonunun miktarı, ilk supernatant ve kullanılan CaCl₂ solüsyonunun toplam miktarları kadardır. Bir el homojenizatöründe iyice karıştırdıktan sonra bu homojenat 15500 rpm de 15 dakika santrüfjülenir. Böylece CaCl₂ ve proteinlerin fazlası çıkartılmış olur (yıkama safhası). Santrüfjü sonrası ele geçen pellet yıkanmış mikrozomları kapsar. Bu pelletler 0.2M pH 7.4 fosfat tamponu ve gliserol ilavesi ile yine el homojenizatöründe iyice karıştırılır. Son mikrozomal solüsyonun miktarı şöyle hesaplanır. 1 gram başlangıç karaciğeri için 2 mL solüsyon gerekmektedir. Bu solüsyonun % 20 si gliserol olacak şekilde hesaplanır. Bu şekilde hazırlanan mikrozomal preparatlar 2 mL'de 1 gram orijinal karaciğer ihtiva ederler ve - 70 °C'de saklanırlar. Genellikle daha sonra kullanmak amacıyla fazla miktarda mikrozomal preparat hazırlanmasına gerek duyulduğu için antioksidan etki yapan gliserol ilave edilir. Bu madde mikrozomal enzimlerin zamanla aktivite kaybını engeller. Ayrıca bazen de 1 gr / 1mL konsantrasyonunda mikrozomal süspansiyon hazırlanarak kullanmadan evvel dilusyon yapılması da mümkündür.

Standart kofaktör karışımları

Aromatik hidroksilasyonlar, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları aşağıda bir 25 mL'lik inkübasyon erleni için standart miktarları verilmiş olan kofaktör karışımlarını gerektirirler. Bu karışım, NADPH gerektiren metabolik reaksiyonlarda bu maddeyi oluşturmak amacıyla kullanılır (16,17,26) :

NADP disodyum	- 1.57 mg	(2 µmol)
G - 6 - P disodyum	- 3.04 mg	(10 µmol)
G - 6 - P dehidrojenaz-	1.40 µL	(1ünite)
MgCl ₂ (% 50 a/a)	- 8.00 µL	(20 µmol)

Yukarıdaki maddeler yine 1 inkübasyon erleni için 2 mL fosfat tamponunda çözülerek inkübasyondan hemen hazırlanırlar. Bunlardan, bu standart karışım içerisinde bekletildiği takdirde çok çabuk deaktive olabilen G - 6 - P dehidrojenaz enzimi ise ön inkübasyondan hemen önce ko-faktör solüsyonuna ilave edilir. Tüm ko-faktörler 37°C'lik su banyosunda 5 dakika inkübe edilirler ve bu şekilde " Ön İnkübasyonla" NADPH üretimi sağlanır.

5. Biyolojik sistemle reaksiyon (Inkübasyon)

Bir inkübasyon erleni başına standart inkübasyon ortamına ilave edilecek substrat miktarı normal olarak 5 μmol ' dur (50 μL solvent içerisinde). Substartı çözmek için en ideal solvent su olduğu halde suda çözünebilirliğin mümkün olmadığı durumlarda, metanol, 2 - metoksietanol ve dimetilsulfoksit de çözücü olarak kullanılabilir. normal olarak, inkübasyon ortamına konulacak mikrozomal preparat miktarı erlen başına 1 mL ve ko-faktör solüsyonunun miktarı ise 2 mL'dir. Bu deneylerde test erlenlerinin yanında kontrol erlenleri de düzenlenir. Deneyler istatistiki hataların önlenmesi veya oluşabilecek kayıplar açısından en az ikili ve ideal olarak üçlü paralel deneylerle yürütülmelidir.

En basit bir metabolizma deneyinin protokolü, aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi düzenlenir (16,17) :

ERLERLER	SUBSTRAT	MİKROZOM	KOFAKTÖR
TEST	+	+	+
KONTROL 1	+	TAMPON	TAMPON
KONTROL 2	+	+	TAMPON
KONTROL 3	+	TAMPON	+
KONTROL 4	+	DENATÜRE*	+
KONTROL 5	-	+	+

* Mikrozomların denatürasyonu, mikrozomal preparatları kaynar su banyosunda 5 - 10 dakika tutarak sağlanır.

Kontrol denemeleri oluşan metabolitlerin enzim ve ko - faktörler gerektirip gerektirmediğini anlamak yani olayın enzimatik veya kimyasal olarak sonuçlandığını açığa çıkartmak açısından elzemdir. Bir metabolit kontrol deneyleri ile de saptanmış ise kimyasal olarak oluştuğu

belirtilir. ön inkübasyondan hemen sonra mümkün olduğu kadar çabuk bir şekilde mikrozomal preparat ve substrat, uygulanan protokola göre inkübasyon erlenlerine mikropipetler ile ilave edilir. Normal olarak, 37 °C 'lik çalkalayıcı bir su banyosunda (İnkübatör) yarım saatlik bir inkübasyona tabi tutulurlar. Çeşitli hayvan türleri arasında hatta ayrı türler arasında enzimatik farklılıklar bulunabileceğinden, deneyler farklı deney hayvanlarında tekrarlanmalıdır. Metabolitler bu şekilde kalitatif olarak saptandıktan sonra hangi hayvan türlerinde rastlandıkları tablo halinde rapor edilir.

6. Biyolojik sistemden ekstraksiyon, evaporasyon ve kromatografik ayırım

İnkübasyon sonucunda değişmeyen substrat ve metabolitlerini içeren inkübasyon erlenleri derhal bir buz paketi içerisindeki 10 mL'lik kapaklı tüplere aktarılır ve daha önce tespit edilmiş uygun ekstraksiyon solventinin ilavesiyle enzimatik reaksiyonun durması sağlanır. Daha önce belirtilen ön ekstaksiyon işlemleri takip edilerek evaporasyon işlemi sonucunda metabolik ekstakt elde edilir. Ekstarktlara uygun miktarda (genellikle TLC için 50 µL, HPLC için 200 µL) çözücü ilave ederek kromatografik sistemlere uygulanır.

7. Metabolitlerin teşhis ve identifikasyonları

Kromatografik tekniklerle analiz sonrası standart metabolitlerle metabolik reaksiyon sonrası oluşan metabolitler aynı retensiyon zamanlarını ve $R_f \times 100$ değerlerini verseler dahi bu bulgular, metabolitin identifikasyonu için tam bir kriter olamayabilir. Bu metabolit, muhtemelen standartlarla aynı kromatografik özelliği gösteren başka bir yapı da olabilir. Bu nedenle oluşan metabolitin yapısı; standart maddelerle, UV, IR, NMR, MASS değerleri ile karşılaştırılmalıdır. Ayrıca preparatif kalın tabaka kromatografisi ile metaolik ekstrakttan izole edilen veya HPLC'den piklerin geldiği and mobil fazın toplanması ile izole edilerek uygun ekstraksiyon teknikleri ile sulu mobil fazdan organik bir faza alınarak elde edilen minimum miktarlardaki metabolitler, Mass analizine gönderilerek ya da UV spektrumu alınarak standartlarla karşılaştırılabilirler. Bugün, Mass ve Uv teknikleri, kromatografik tekniklerle tek bir sistemde kombine edilmiş olup GC - MS, HPLC - MS ve HPLC - UV teknikleri halinde aynı anda ayırım ve yapı tayinine imkan veren son derece hızlı ve güvenilir yöntemler olarak metabolizma araş-

tırmalarında kullanılmaktadır (14, 16, 17, 20, 21).

8. Bilinmeyen metabolitlerin teşhisleri

Metabolik deneyler sonucunda önceden düşünülen metabolitlerin haricinde yapılar sıklıkla ortaya çıkabilir. Bu metabolitleri tayin etmenin birinci yolu bunları yeni bir varsayımla sentez etmek olduğu halde çoğu kez yukarıda anlatılan indirekt analizlerle yapıları hakkında bilgi edinmek mümkün olabilir.

9. Ara metabolitlerin inkübasyonu

Metabolik yolları ve oluşum mekanizmasını kanıtlamak için metabolitler üzerinde de metabolizma çalışmaları yapılır. Örneğin, bir hipotezde; eğer bir A substratının, bir primer B metaboliti üzerinden bir C metaboliti oluşturduğu varsayılıyor ve bu olayın mekanizması araştırılıyorsa ve eğer bu B metaboliti substrat olarak kullanılarak, inkübasyonu sonrası C metabolitini veriyorsa bu hipotez bu çalışma ile kanıtlanmış olur.

10. Kantitatif testlerle metabolitlerin miktarlarının tayini

Metabolik reaksiyon sonucu oluşacak metabolitlerin miktarlarını tayin etmek için standart metabolitlerin en az 5 farklı konsantrasyonları, ayrıca 1'er mL denatüre mikrozomal preparat, 2 mL ko-faktör solüsyonu ve internal standart solüsyonu 25 mL'lik inkübasyon erlenlerine ilave edilir. Normal inkübasyon işlemi uygulandıktan sonra, her bir erlen içeriği kapaklı ekstraksiyon tüplerine aktarılır. Ekstraksiyon ve uçurma işlemi sonrası HPLC'ye injekte edilirler. Sonuçta bir kalibrasyon grafiği düzenlenir ve bu grafik tüm metabolik deneylerde oluşan metabolitlerin miktarlarını tayin etmede kullanılır. Bundan sonra yapılan metabolizma çalışmalarında da aynı şekilde aynı miktarda internal standart, inkübasyondan hemen sonra ilave edilir. Daha sonra elde edilen pik alanları oranlarından metabolitin miktarı tayin edilir (14,15,19).

11. İlaç metabolizma çalışmalarında bazı parametreleri değiştirerek sonuçlardaki farklılığın incelenmesi :

Çeşitli faktörler ilaçların *in vitro* metabolizmasını etkiler. Bunlar tür ve cins farklılıkları, biyolojik preparatın cinsi, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, ko-faktör ve substrat konsantrasyonu, enzim (mik-

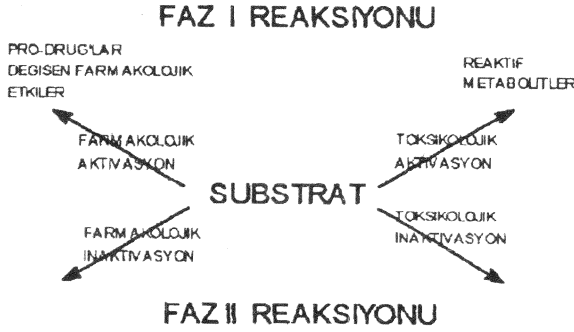
rozomal protein) konsantrasyonu ve diğer substratların ve kimyasalların varlığıdır. Bu parametreleri değiştirmek suretiyle optimum *in vitro* şartları bulmak ve çalışma altındaki özel enzimatik rekasyonun enzim kinetik sabitesini hesaplamak mümkün olur. Bulunan bu optimum koşulları kullanmak suretiyle kinetik çalışmalara geçilir.

12. Enzim indüksiyonu ve enzim inhibisyonu

İndüksiyon yapıcı ajanlar, ilgili enzimin sentez oranında bir artış, inhibitör ajanlar ise bir azalış yaparlar (16,17). Bu deneylerde substrat, ilgili enzimi indükleyen spesifik bir kimyasalla muamele edilmiş deney hayvanlarının karaciğerlerinden hazırlanmış mikrozomlarla inkübe edilirse ve metabolit seviyelerinde artma görülürse, metabolik yolun bu enzimden sorumlu olduğu söylenebilir. Örneğin Fenobarbital, 3- metilkolantren ve Araklor 1254; kilogram başına sırasıyla, 80 mg, 40 mg ve 500 mg olarak verilirler. Fenobarbital ve araklor 1254 ile deney hayvanları 5 gün muamele edilip, 5. gün karaciğer çıkartıldığı halde, bu işlem 3- metilkolantren için 48 saat sonunda yapılır. Laboratuvarda sık kullanılan inhibitörlerden SKF 525 A (2- dietilaminoetil - 2,2 - difenilvalerat HCI) ve Karbon monoksit, sitokrom P450 enziminin inhibitörü oldukları halde ; Metimazol, FMO tipi enzimlerin inhibitörüdür. DPEA (2,4 -dikloro -6 - fenilfenoksietilamin) ise hem P450 hemde FMO enziminin inhibitörüdür. İnhibitörler, reaksiyon ortamına inkobasyon esnasında katılırlır, kullanılan miktarları 10^{-3} ila 10^{-5} M kadardır (16,17).

SONUÇ

Metabolizma alanında yapılacak araştırmalardan elde edilecek bilgiler, organik moleküllerin yaşayan organizmaya ve ayrıca organizmanın maruz kaldığı organik moleküllere yaptığı değişiklikleri kavramamızı sağlayarak emin olarak kullanılacak kimyasal ilaç haricindeki diğer xenobiyotiklerin insan sağlığına karşı yaratacağı riskler de minimuma indirilecektir. Metabolizma sonunda bir kimyasalın gerek farmakolojik gerekse toksikolojik aktivasyon veya bunun zıddı olarak inaktivasyon göstermesi söz konusu olduğuna göre, ilaç maddesi olarak kullanılabilen metabolitlerin saptanması yeni ilaçların geliştirilmesine yol açabilir. (Şekil - 5). Bunun bir benzeri olarak, kendileri farmakolojik yönden aktif olmayıp, metabolitleri aktivite gösteren " pro - drug" denilen maddeler, ilaç metabolizma araştırmalarının en önemli hedefini oluştururlar. Ayrıca kimyasalların, metabolik aktivasyonla istenmeyen



Şekil - 5 : Metabolizma sonucu substratın uğrayabileceği etki değişiklikleri.

farmakolojik ve toksikolojik etkiler yapan metabolitlere dönüştüklerinin saptanması (Şekil 5) ile ya bu grup maddelerin kullanımlarının yasaklanması, istemli veya istemsiz maruziyet sözkonusu ise minimuma indirilmesi ve son olarak eğer konu, araştırma halindeki bir ilaç molekülü ise istenmeyen metabolik yolu molekül üzerinde yapılacak modifikasyon ile bloke ederek bu molekülün insan sağlığı için güvenli olarak kullanılabilmesi sağlanabilecektir (27, 28).

KAYNAKLAR

1. Beckett, A. H. : *Industrial Aspects of Biochemistry*. Fedaration of European Biochemical Societies, 693, 1974.
2. Marten, T. R. : *Chemistry in Britain*, 745 (1985).
3. Walkenstain, S. S. : *Symposium*, **61** , 1673 (1972).
4. Remmer, H. : *Ann. Rev. Pharm.*, **5**, 405 (1965).
5. Williams, R. T. : *Detoxication Mechanisms*. 2nd edn, Chapman and Hall, London, 1959.
6. Testa, B., Peter, J. : *Drug metabolism : Chemical and Biochemical Aspects*. Marcel Dekker Inc, New York, 1976; Ormstad, K., Moldens, P. : *Chemoterapia*, **4** , 343 (1985).
8. Ülgen, M., Barlow, D., Gorrod, J. W. : *Xenobiotica* (1993) in the press.
9. Ülgen, M., Gorrod, J.W. : *Drug. Metab. Drug. Interact.* (1993). in the press.
10. Low, C. M., Ülgen, M., Gorrod, J. . : *J. Pharm. Pharmacol.* (1993) in the press.
11. Gillette, J. R. : *Ad. Pharmacol.*, **4**, 219 (1966).
12. Hansch, C. : *Drug Metab. Revs.*, **1**, 1 (1972).
13. Gorrod, J. W. : *Chem. Biol. Interact.*, **7** , 289 (1973).
14. Martin, L. E., Reid, E. : *Prog. in Drug. Met.*, **6**, 197 (1981).

15. Mitchard, M. : *Drug Met. in Man.* ed. J. W. Gorrod and A. H. Beckett. Taylor and Francis, London, 175,1978.
16. Gibson, G.G., Skett, P. : *Introduction to Drug Met.* Chapman and Hall, London, 1988.
17. Mazel, P. : *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition.* R. E. Krieger Publ. Co., New York, 1979.
18. Arthur, J., de silva, F., Puglisi, C.V. :*Drug Fate Metab.*, 4, 245 (1988).
19. Tomlinson, E. ; *Pharm.J.*,**220**, 13 (1976)
20. Draffen, G. H., Gilbert, J.D., Gilbert, M.T. : *Drug Met. in Man*, ed J. W. Gorrod and A. H. Beckett. Taylor and Francis, London, 193, 1978.
21. Brealey, C. J. Henry, P. B., Strother, A. : *Met. of Xenobiotics.* ed. J. W. Gorrod, A. Oelschlager, J. Caldwell. Taylor and francis, London, 153, 1988.
22. Beckett, A. H. : *The Poisoned Patient : the role of the laboratory.* Ciba Foundation Symposium, **26**, elsevier, Amsterdam, 1974.
23. Beckett, A.H., Ali, H. M. : *J. Chorm.*, **177**, 225 (1974).
24. Brodie, B. B., Axelrod, J., Cooper, J. R., Gaudette, L., La Du, B. N., Mitoma, C., Udenfriend, S. : *Science*, **121**,603 (1955).
25. Zeigler, D. M., Poulsen, L.L.: *Methods Enzymol.*,**52**, 142 (1978).
26. Lam, S.P., Barlow, D. J., Gorrod, J.W. : *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**,373 (1989).
27. Ulgen, M.: Ph. D. thesis. Univ. of London (1992).
28. Gorrod, J. W., Ulgen, M. : *Drug. Metab. Rev.*, (1993). in the press