

## Derleme

**İlaç Metabolizması ve Farmasötik Kimyada Önemi****Drug Metabolism and Its Importance in Pharmaceutical Chemistry**Zeynep Özdemir<sup>1</sup>, Arzu Karakurt<sup>1</sup><sup>1</sup>İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye.**Özet**

İlaçların, organizmadaki enzimlerin etkisiyle kimyasal değişikliğe uğrayarak genellikle daha polar yeni bileşiklere dönüşmesine biyotransformasyon ya da metabolizma denir. Metabolizma sonucu, vücuda alınan ilaç ve diğer yabancı maddeler daha az toksik bir şekle dönüştürülür ve polar hale getirilerek en kısa sürede vücuttan atılır. Ayrıca bazı ilaçların etkileri, metabolizma sonucu oluşan metabolitlerinin farmakolojik etkileri nedeniyle görülmektedir. Bir ilacın piyasaya girebilmesi için metabolitlerinin izole edilmesi ve toksik olup olmadıklarının mutlaka araştırılması gerekmektedir. İlaç tasarımında, daha etkin, toksisitesi azaltılmış, daha güvenli bileşiklere veya dağılım, absorpsiyon sorunları düzeltilmiş ilaçlara ulaşmak için önemli ipuçları sağlaması ilaç metabolizması çalışmalarını güncel kılmaktadır. Bu derleme ile metabolizma kavramına değinilmiş, metabolizmanın önemi vurgulanmış ve ilaç metabolizması çalışmalarından örnekler verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İlaç Metabolizması, Biyotransformasyon, Metabolit, Ön İlaç, CYP-450.

**Abstract**

Being modified of drugs to generally more polar new compounds by chemical transformation via enzymes which are in organism is called biotransformation or metabolism. By metabolism, drugs and other foreign substances which are taken into body are converted to less toxic form and excreted from the body as soon as possible by making polar. Otherwise, the effects of some drugs are seen due to the pharmacological effects of their metabolites which are formed by metabolism. Isolation of metabolites and to investigate whether they are toxic or not is necessary in order to enter the market of a drug. In drug design, providing important clues to reach compounds which are more efficient, reduced toxicity, safer or drugs whose dispersion and absorption problems are eliminated makes drug metabolism studies current. In this review, it is referred to the concept of metabolism, is emphasized the importance of metabolism and examples of drug metabolism studies are given.

**Keywords:** Drug Metabolism, Biotransformation, Metabolite, Pro-Drug, CYP-450.

**Giriş**

İlaçların vücuda uygulandıkları andan itibaren çeşitli enzimlerin etkisiyle kimyasal değişikliklere uğraması, ilacın metabolize edilmesi veya biyotransformasyon olarak adlandırılır (1). Metabolizma reaksiyonları sonucu ilacın yapısında meydana gelen kimyasal değişikliklerle, ilacın fizikokimyasal özellikleri, farmakolojik aktivitesi, etki süresi ve toksisitesinde farklılaşma meydana gelebilir. Metabolizma çalışmaları, daha etkili, toksisitesi az ve güvenilirliği yüksek bileşiklere ulaşmada önemli bilgiler verdiğinden, ilaç geliştirme açısından büyük önem taşımaktadır (2).

Metabolizma reaksiyonları sonucu oluşan bileşiklere metabolit denir. Metabolizma sonucu genellikle ilaçların toksisitesi azalır (detoksifikasyon) ve ayrıca bileşiğin suda çözünür halde organizmadan atılımı kolaylaştırır. Çünkü meydana gelen metabolitler genellikle ilaç molekülünden daha polardır. Nonpolar bileşiklerin yağ/su partiyon katsayıları yüksek olduğundan vücutta kalış süreleri daha uzundur. Bu durum bileşiklerin böbrek tubuluslarından

geçerken tekrar plazmaya difüze olmasına ve vücutta kalış süresinin uzamasına neden olmaktadır. Metabolizma reaksiyonları ile lipofilik bileşikler daha polar bir yapıya dönüştürülmekte ve kolayca atılmaktadır (2, 3).

İlaç metabolizma reaksiyonları her zaman detoksifikasyon sağlamaz. Bazen metabolizma sonucu daha etkili ve/veya daha toksik bileşikler oluşabilmektedir (Tablo 1, 2) (1-3).

Bazı ilaçların biyolojik aktivitesi metabolitlerinde de görülebilmektedir. Bu metabolitlere aktif metabolit adı verilir. Aktif metabolitler bazen değişik etkiye sahip bir yapıya dönüşebilmektedir. Kendileri aktif olmayıp biyolojik ortamda aktif metabolite dönüşen ilaçlar da mevcuttur. Prontosil, kloro guanid, klormezanon ve kloramfenikol palmitat bu ilaçlara örnek olarak gösterilebilir (Şekil 1.).

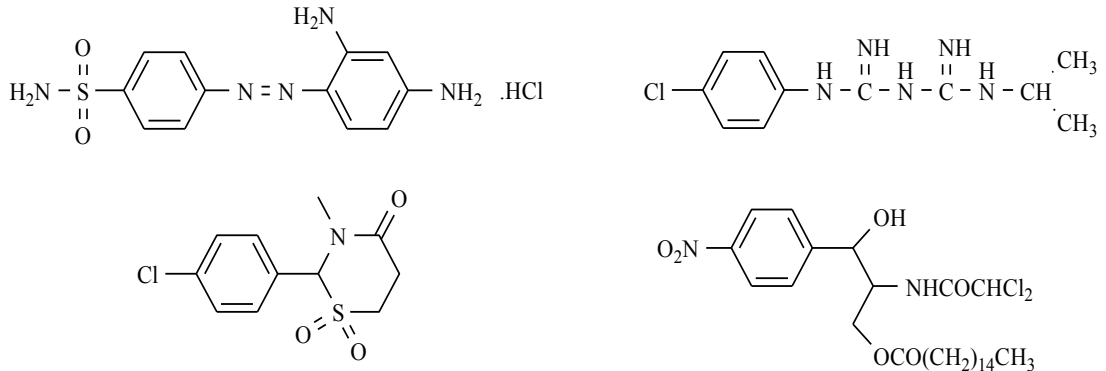
Ön ilaç olarak bilinen bu ilaçlar bazı durumlarda ilacın acı tat, zayıf absorpsiyon, zayıf çözünürlük ve enjeksiyon yerinde iritasyon gibi yan etkilerini ortadan kaldırmak amacı ile hazırlanmaktadır (3, 4).

**Tablo 1.** Metabolizma sonucu aktivitesi değişen ilaçlara örnekler (1).

	İlaç	Aktif Metaboliti
<b>Ön İlaçlar</b>	Amitriptilin	Nortriptilin
	Bakampisilin	Ampisilin
	Enalapril	Enalaprilat
	Kandesartan sileksetil	Kandesartan
	Klofibrat	Klofibrat asit
	Kloralhidrat	Trikloretanol
	Kortizon, prednizon	Hidrokortizon, prednizolon
	L-Dopa	Dopamin
	Lovastatin	Mevenolinik asit
	Midodrin	Desglimidodrin
	Molsidomin	Linsidomin
	Progabid	GABA
	Proguanil	Sikloguanil
	Salsalat	Salisilik asit
	Sefuroksim aksetil	Sefuroksim
	Siklofosfamid	4-Hidroksisiklofosfamid
	Sulindak	Sulindak sülfür
	Terizidon	Sikloserin
Vitamin D <sub>3</sub>	1,25-Dihidroksikolekalsiferol	
Zorubisin	Daunorubisin	
<b>Kendisi ve metaboliti aktif olan olan ilaçlar</b>	Asetilsalisilik asit	Salisilik asit
	Diazepam	Nordiazepam, Oksazepam
	Dijitoksin	Digoksin
	Fenilbütazon	Oksifenbütazon
	Hidroksizin	Setirizin
	İmipramin	Dezipramin
	Klorpromazin	7-Hidroksiklorpromazin
	Kodein	Morfin
	Lidokain	Deetillidokain
	Meperidin	Normeperidin
	Parekoksib	Valdekoksib
	Prednimustin	Klorambusil ve prednizolon
	Prokainamid	N-Asetilprokainamid
	Sultamisilin	Ampisilin ve sulbaktam
	Valasiklovir	Asiklovir
	<b>Metaboliti aktif olmayan ilaçlar</b>	İlaçların çoğu
Ester yapısındaki ilaçların çoğu		Hidrolyz metabolitleri
Fenitoin		p-Hidroksidifenil hidantoin
Barbitüratlar		Yan zincirden oksitlenmiş metabolitler

**Tablo 2.** Metabolizma sonucu oluşan toksik etki ve toksik metabolitler (1).

İlaç	Toksik Metabolit	Toksik Etki
Asetaminofen	N-Asetil-p-benzokininimin (NAPQ)	Hepatotoksisite
Dapson	N-Hidroksidapson	Methemoglobinemi
Glutetimid	4-Hidroksiglutetimid	Koma (aşırı dozda)
İzoniazid	Monoasetilhidrazin	Hepatit
Kloroform	Fosgen	Hepatotoksisite, nefrotoksisite
Kloramfenikol	Nitrozo	Hemotoksisite
Lidokain	Glisilheksilidid	Mental depresyon, başağrısı
Metoksifluran	Florür	Nefrotoksisite
Metilalkol	Formaldehit+formik asit	Körlük ve asidoz



**Şekil 1.** Ön ilaç olarak etki gösteren prontosil, klorguanid, klormezanon ve kloramfenikol palmitat moleküllerinin formülleri

## Metabolik Enzimler

İlaçların biyotransformasyonunda en önemli organ karaciğerdir, fakat gastrointestinal kanal, akciğerler, deri, böbrekler gibi birçok organda da metabolizma olayı gerçekleşmektedir. Bir ilaç oral yolla alındıktan sonra, sistemik dolaşıma ulaşmadan önce, dozun önemli bir kısmı bağırsak epitelinde veya karaciğerde metabolize olup etkisiz hale gelebilmektedir. İlk-geçiş metabolizması olarak bilinen bu fizyolojik olay sonucu yüksek oranda metabolize olan ilaçların biyoyararlanımları önemli ölçüde azalmaktadır.

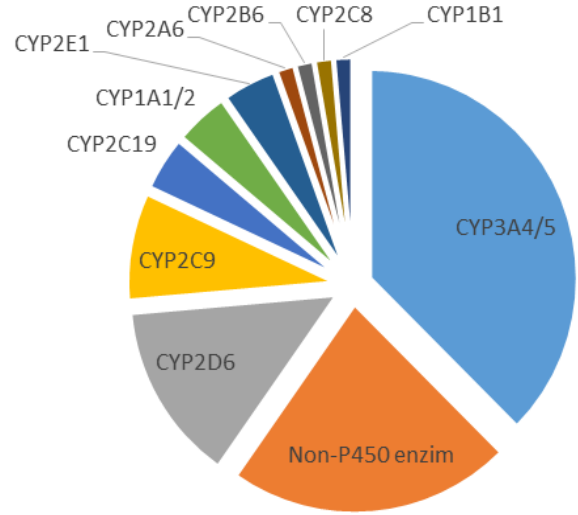
Karaciğer enzimleriyle metabolize olan ilaçlarda aktivite kaybına neden olan bu etkiden kurtulmak için oral doz artırılır veya ilacın verilme yolu değiştirilir. Anjina pektorisinde kullanılan nitrogliserinin sublingual yolla, migren ağrılarında kullanılan ergotaminin ise rektal yolla verilmesi ilk-geçiş metabolizmasının engellenmesi için verilme yolunun değiştirilmesine örnek olarak verilebilir. Bazı durumlarda ise, ilk-geçiş etkisini minimuma indirmek için ilaç molekülünün yapısında değişiklikler yapılmaktadır. Örneğin, lipofilik  $\beta$ -blokörler, büyük oranda ilk geçiş etkisine uğrarlarken, hidrofilikler uğramaz (2, 4).

Karaciğer dokusunun biyotransformasyon açısından en önemli bölgesi, endoplazmik retikulumun mikrozomal fraksiyonudur (2).

Endoplazmik retikulumda Faz I tepkimesi ile metabolize olan ilaçlar aynı yerde ya da aynı hücrenin sitosol kısmında ard arda konjuge edilir. Bu tepkimeler sitokrom P450 izoformları (CYPler) ve birçok transferaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. İlaçların çoğunun metabolizmasından sorumlu olan CYP enzimleri metabolizma enzimleri arasında en çok araştırılmış olan gruptur (4).

CYP'ler, polipeptit zincire kovalan olmayan şekilde bağlanan HEM protein molekülü içeren enzim süper ailesidir. Memelilerde bulunan CYP enzimleri ile gerçekleştirilen farklı reaksiyonlar arasında N-dealkilasyon, O-dealkilasyon, aromatik hidroksilasyon, N-oksidasyon, S-oksidasyon, deaminasyon ve dehalojenasyon vardır. İnsanlarda 50'den fazla CYP enzimi tanımlanmıştır ve bu enzimler besin ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında, steroidler gibi endojen bileşiklerin sentezinde, kolesterol yıkımının yan ürünü olan safra asitlerinin metabolizmasında da rol oynamaktadır. İnsanlarda metabolizma tepkimelerinde rol oynayan en önemli CYP alt izozimleri: CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6,

2E1, 3A4, 3A5'tir. İlaçların metabolizmasında en aktif CYP enzimleri CYP2C, CYP2D ve CYP3A alt ailelerinde bulunmaktadır. Klinikte kullanılan ilaçların % 50'sinin metabolizmasında ise CYP3A4 enzimi görev almaktadır (Şekil 2.) (4, 5).



Şekil 2. İlaç metabolizmasında görevli enzimler (6).

CYP enzimlerinin dışında; monoamin oksidaz (MAO), flavin monooksijenaz (FMO), aldehit dehidrojenaz (ALDH), alkol dehidrojenaz (ADH) gibi başka pek çok enzim de ilaç metabolizmasında görev almaktadır (5).

İlaçların çoğu oral yolla alındığından, karaciğerden sonraki en önemli metabolizma yeri gastrointestinal kanaldır. Bazı ilaçlar midede, düşük pH ve pepsin gibi proteolitik enzimlerin etkisiyle parçalanmaktadır. Oral yolla alınan penisilin buna bir örnektir. Ester yapısı içeren ilaçlar da, bağırsaklarda bulunan esteraz ve lipaz enzimleri ile hidrolize uğramaktadırlar (2).

## Metabolizma Reaksiyonları

Metabolizma reaksiyonları ilaçta oluşan kimyasal değişmelere göre iki büyük gruba ayrılır. Birinci grup oksidatif, redüktif ve hidrolitik reaksiyonları kapsayan Faz I reaksiyonları, ikincisi ise enzimatik sentezle ilaçlara genellikle polar yapıların bağlandığı Faz II (konjugasyon) reaksiyonlarıdır (Tablo 3, 4) (3).

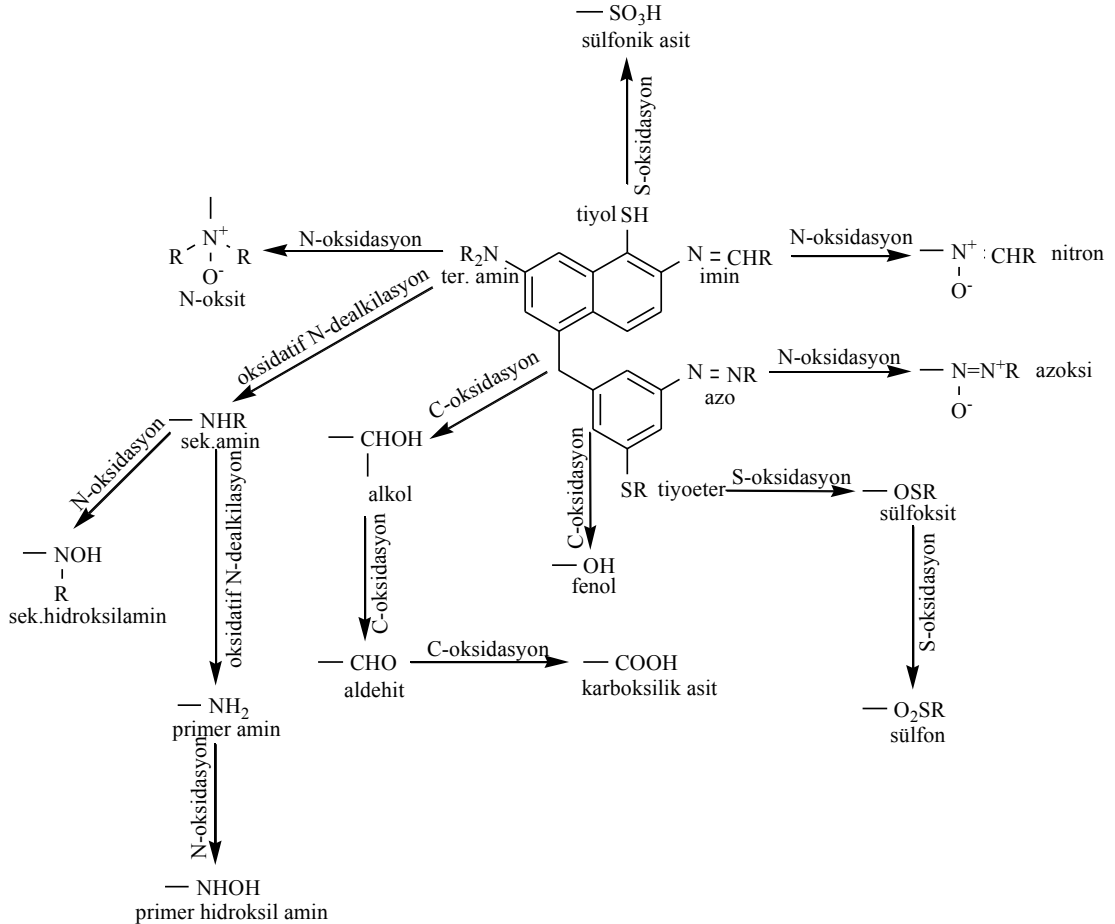
Faz I reaksiyonları ile moleküle -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH gibi polar fonksiyonel gruplar eklenerek, molekül daha polar hale getirilir ve molekülün vücuttan atılımı kolaylaştırılır. Faz I reaksiyonları sonucu oluşan metabolitler genellikle Faz II reaksiyonlarının substratlarıdır (Şekil 3-6) (2, 3).

Tablo 3. Faz I Reaksiyonları (2, 3).

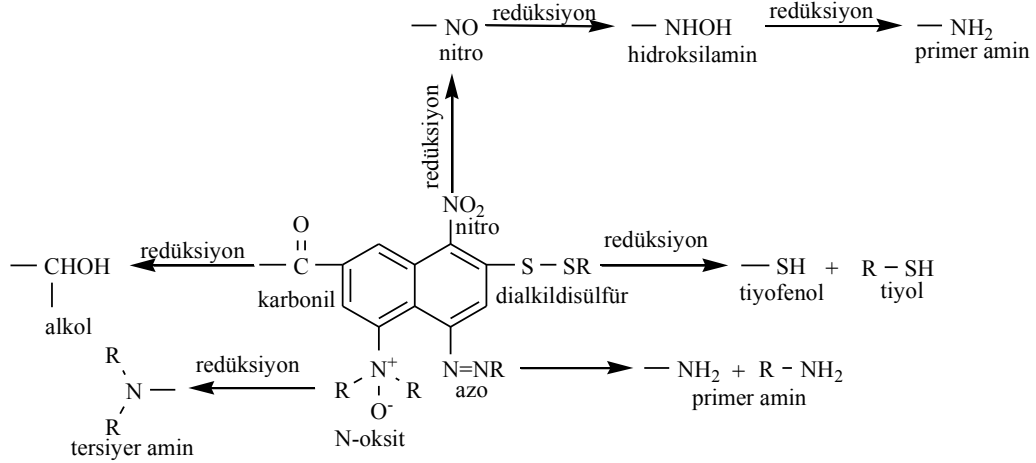
Faz I Reaksiyonları	
<b>Oksidatif reaksiyonlar</b>	Aromatik oksidasyon (Aromatik hidroksilasyon)
	Alken epoksidasyonu
	Alifatik ve alisiklik karbon atomlarının oksidasyonu
	Bir sp <sup>2</sup> merkeze komşu karbonların oksidasyonu (Benzilik, alililik ve karbonil veya imine α-konumunda bulunan karbon atomlarının oksidasyonu)
	Karbon-azot sistemlerinin oksidasyonu (Oksidatif N-dealkilasyon, oksidatif deaminasyon, N-oksit oluşumu, N-hidroksilasyon)
	Karbon-oksijen sistemlerinin oksidasyonu (Oksidatif O-dealkilasyon)
	Karbon-kükürt sistemlerinin oksidasyonu (Oksidatif S-dealkilasyon, S-oksidasyon, desülfürasyon)
	Alkol ve aldehit oksidasyonu
	Diğer oksidatif reaksiyonlar (Oksidatif dehalojenasyon, oksidatif aromatzasyon, arenollerin kinona oksidasyonu)
<b>Redüktif reaksiyonlar</b>	Karbonil (aldehit, keton) redüksiyonu
	Nitro redüksiyonu
	Azo redüksiyonu
	Diğer redüksiyonlar (Tersiyer amin N-oksit redüksiyonu, redüktif dehalojenasyon, disülfid ve sülfoksit redüksiyonu)
<b>Hidrolitik reaksiyonlar</b>	Esterlerin ve amitlerin hidrolizi

Tablo 4. Faz II Reaksiyonları (2, 3).

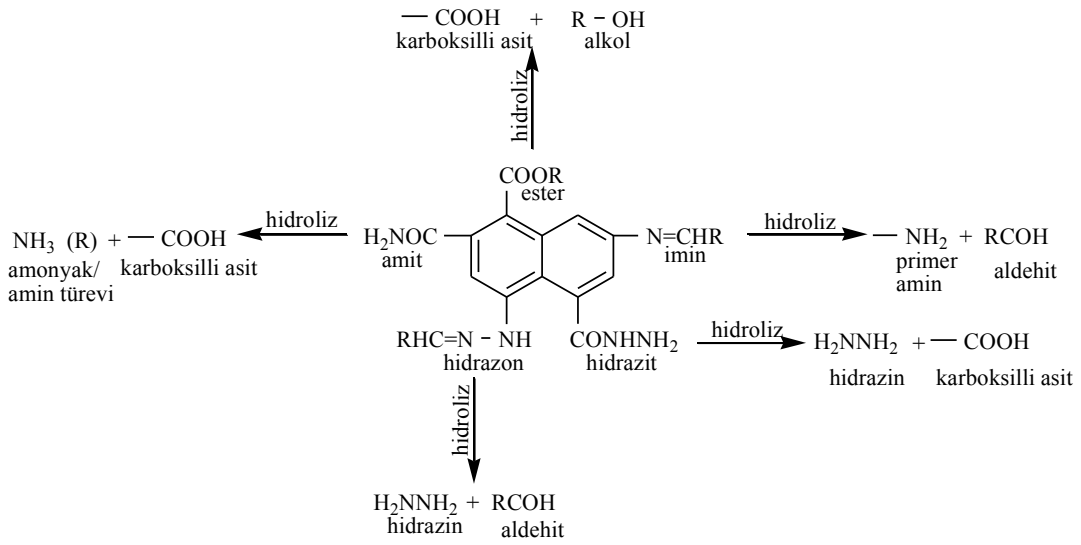
Faz II Reaksiyonları
Glükuronik asit konjüasyonu (glükuronidasyon)
Sülfat konjüasyonu (sülfatasyon)
Amino asit (glisin, glutamin ve diğer) konjüasyonu
Glutatiyon konjüasyonu
Asetilasyon
Metilasyon



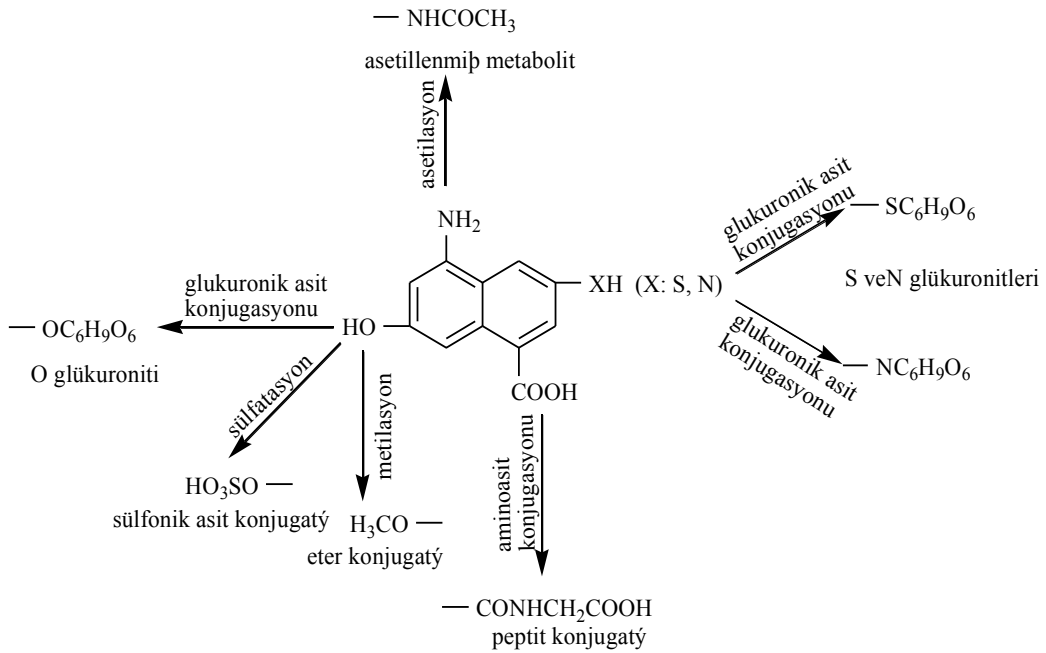
Şekil 3. Başlıca metabolik oksidasyon reaksiyonları (7).



Şekil 4. Başlıca metabolik redüksiyon reaksiyonları (7).



Şekil 5. Başlıca metabolik hidroliz reaksiyonları (7).



Şekil 6. Başlıca Faz II metabolizma reaksiyonları (7).

Faz II reaksiyonlarıyla ilaç molekülleri inaktif hale gelir ve idrar veya safra ile atılabilen, suda çözünür metabolitler haline dönüştürülürler (Tablo 5) (2, 3).

**Tablo 5.** Faz I ve Faz II reaksiyonları sonucu ilaçların atılımı (2).

İlacın Emilimi	Faz I Reaksiyonları	Faz II Reaksiyonları	İlacın Atılımı
İlaç	-	-	Değişmemiş ilaç
İlaç	Metabolit	-	Faz I metaboliti
İlaç	Metabolit	Metabolit	Faz II metaboliti
İlaç	-	Metabolit	İlacın konjugatı
<b>Lipofilik</b> →			<b>Hidrofilik</b>

### İlaç Metabolizmasını Etkileyen Faktörler

Bazı kimyasal bileşikler enzimlere dönüşümlü olarak bağlanıp enzimin yapısını bozabilirler. Yaş, cinsiyet, genetik özellikler, beslenme, enterohepatik sirkülasyon, intestinal flora gibi çeşitli fizyolojik faktörler ve karaciğer, böbrek ya da kalp hastalıkları gibi patolojik durumlar da enzim sisteminin etkinliğini değiştirerek metabolizma hızında artma ya da azalmaya neden olabilmektedir. Örneğin; ilaçlar genel olarak fetüste, yeni doğanlarda, yaşlılarda ve hayvanlarda yetişkin insanlara göre daha yavaş metabolize edilir. İlaçların metabolizmasından sorumlu enzimlerin sentezindeki hormonal etkenler kadın ve erkeklerde metabolizma hızının farklı olmasına neden olmaktadır (8). Cinsiyet farkının metabolizma üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, CYP3A4 enzim aktivitesinin kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğu bildirilirken, aksine CYP2C16, CYP2D6, CYP2E1 ve CYP1A2 enzimlerinin aktivitesinin erkeklerde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (9, 10). N-asetiltransferaz enziminin karaciğer hücrelerindeki miktarı yavaş asetilleyciler olarak bilinen bazı kişilerde genetik polimorfizm nedeniyle azalmıştır (3, 11).

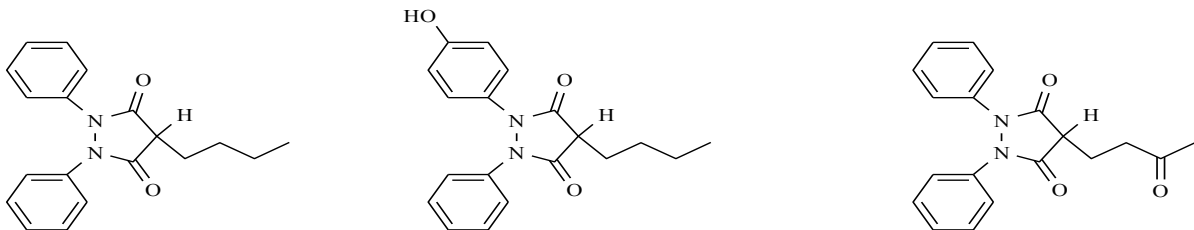
Bazı kimyasal bileşikler, karaciğer mikrozomal enzimlerinin aktivitesini stimüle ederek metabolizma hızını artırır. İndüksiyonla enzim sentezi arttığından enzim substratını daha hızlı metabolize etmekte ve böylece ilaç yeterli konsantrasyona ulaşamadığı için etkisini gösterememektedir. Diğer taraftan zararlı çevre kimyasalları hızlı metabolize edileceklerinden toksik etkileri azalacaktır. Fenobarbital,  $\beta$ -naftoflavon, klorlu bifenil karışımı, kanserojen etkiye sahip bir polisiklik aromatik hidrokarbon

olan 3-metilkolantren gibi kimyasallar, indol türevi bileşikler içeren gıdalar (lahana gibi), sigara dumanı, egzoz gazları, insektisitler, kronik alkol tüketimi enzimleri indükleyen etkenlere örnek olarak verilebilir. Bazı ksenobiyotikler ise enzim inhibisyonu yaparak ilaç metabolizmasını yavaşlatıp organizmada ilaç birikmesine ve dolayısıyla da intoksikasyona neden olmaktadır. Enzim inhibisyonu yapan ilaçlara kloramfenikol, simetid, kumarin türevleri, eritromisin, oral kontraseptifler, disülfiram, izoniyazid örnek verilebilir (1, 3, 5).

### İlaç Metabolizasyonunun İlaç Aktivitesine Etkisi ve Yeni İlaç Geliştirmede Önemi

İlaç metabolizması eskiden sadece detoksifikasyon olarak kabul ediliyor, metabolitler ise tedavi açısından önemsiz görülüyordu. Metabolizma çalışmalarının gelişmesiyle metabolitlerin aktif ya da inaktif oldukları belirlenmiştir. Ayrıca metabolizma çalışmaları sonucu ilaçların daha toksik metabolitlere dönüşebileceği de anlaşılmıştır (3).

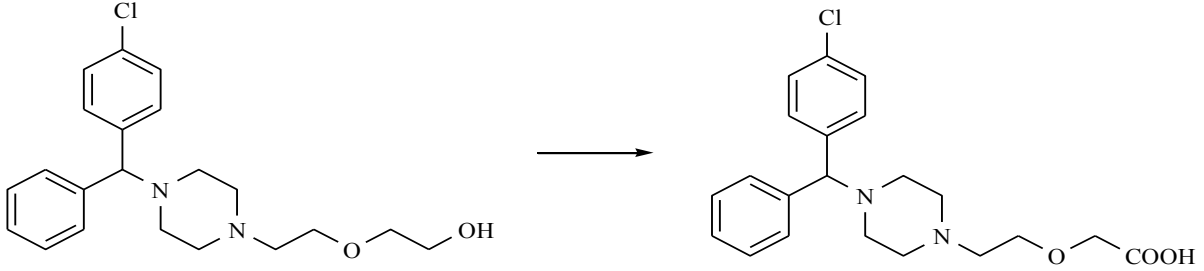
Bazı ilaçların etkilerinin, metabolitlerinin farmakolojik etkilerine bağlı olduğu bildirilmektedir. Metabolizma çalışmalarıyla, metabolitlerin etkileri belirlendikten sonra, metabolitler sentetik yolla üretilerek daha etkin moleküller geliştirilmiştir. Fenilbütazonun aromatik hidroksilasyonu ile oluşan hidroksifenilbütazon (oksifenbütazon) ve alifatik hidroksilasyon ve bunu takiben oksidasyonla oluşan kebuzon, bugün sentetik yollarla elde edilen ve etki yönünden fenilbütazon kadar etkili olan iki ilaçtır (Şekil 7.) (2).



**Şekil 7.** Fenilbutazon, oksifenbutazon, kebuzon moleküllerinin formülleri

Klinikte kullanılan bazı etken maddelerin kendilerinin yanısıra metabolitinin de etkili olduğu ve bu metabolitlerin de ilaç olarak ruhsat aldığı moleküller bulunmaktadır. Örneğin antialerjik bir ilaç olan hidroksizin molekülü yanısıra yine antialerjik etki gösteren ve onun metaboliti olan setirizin bu duruma örnek olarak verilebilir (Şekil 8.). Hidroksizin molekülünün metabolizması sonucu aktif setrizin molekülünün

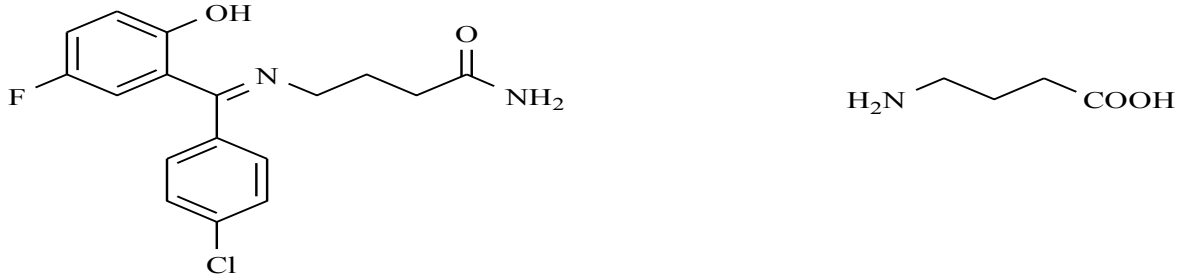
elde edilmesinin yanısıra, ayrıca 1. kuşak antihistaminikler grubunda yer alan hidrosizinin lipofilik yapısı nedeniyle karşılaşılan sedatif yan etki sorunu, metabolik oksidasyonla dönüştüğü karboksilli asit grubu taşıyan ve daha polar olan, bu nedenle kan beyin engelini geçemeyen 2. kuşak antihistaminik setirizinin oluşmasıyla giderilmiştir (2, 12).



Şekil 8. Hidroksizin ve majör metaboliti setirizin formülleri

Metabolizma sonucu aktif moleküllerin açığa çıkarak etki gösterdiği, molekülün geri kalan bölümünün taşıyıcı olarak rol oynadığı hedeflendirilen ilaçlar da bulunmaktadır.

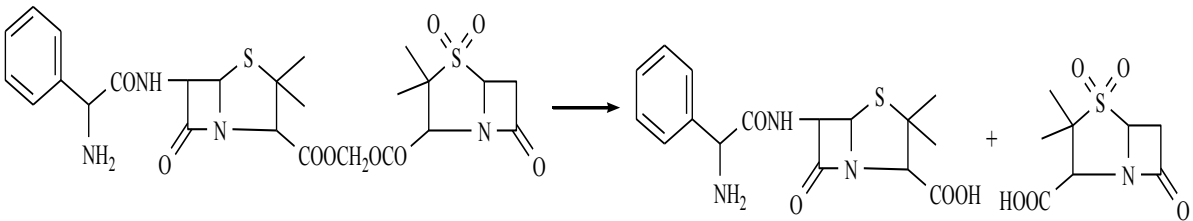
Kan-beyin engelini aşmak üzere çeşitli lipofilik taşıyıcı grupların GABA molekülüne bağlanmasıyla elde edilen progabid bu duruma örnek olarak verilebilir (Şekil 9.) (13-15).



Şekil 9. Progabid ve GABA'nın formülleri

Hibrit moleküller de metabolizma çalışmalarına dayanarak elde edilen ön ilaçlardır. Buna örnek olarak verilebilecek sultamisilin, ampisilinin (antibakteriyel) sulbaktamla (laktamaz inhibitörü) biester oluşturması ile elde edilmiştir (Şekil 10.). Bu iki molekülün absorpsiyon kinetikleri ve ilk geçiş etkileri farklı olduğu için

ampisilin ve sulbaktam'ın eşit oranda fiziksel karışımıyla yapılan farmasötik şekli istenen etkiyi sağlayamamaktadır. Hibrit molekül olan sultamisilin oral alındığında mide, duodenum ve üst intestinumdan tam absorbe olduktan sonra kanda esterazlarla hızlı bir şekilde hidroliz olur ve sulbaktam ile ampisiline dönüşür (16).



Şekil 10. Sultamisilin, ampisilin ve sulbaktamın formülleri

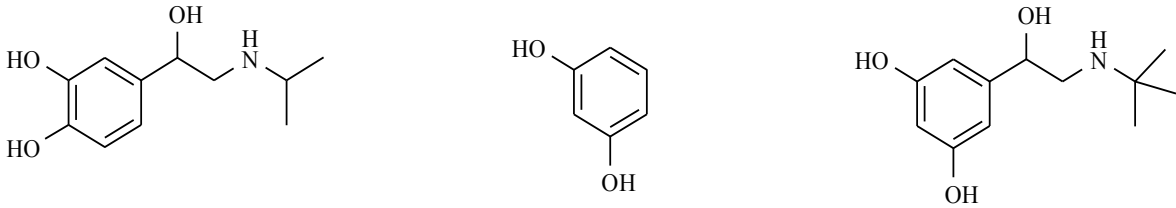
İlaçların metabolizma reaksiyonları düşünülerek etki süresi daha uzun yeni moleküllerin geliştirilmesi metabolizma çalışmalarının ilaç geliştirme sürecindeki önemine başka bir örnektir. İzoproterenol, hem

$\beta_1$ - hem de  $\beta_2$ -reseptörleri uyarır;  $\beta_1$ -reseptörle etkileşme sonucu kardiyak stimulan yan etkiler ortaya çıkmakta, kötü bir absorpsiyon profili sergilemekte, uygulama yolundan bağımsız olarak çok kısa etki süresi göstermektedir.

Bileşiğin absorpsiyonunun düşük ve etki süresinin kısa olmasının nedeni, halkada birbirine göre 1, 2 numaralarda konumlanmış kateşol hidroksillerinin hızlı bir şekilde sülfat ve glukuronat konjugatlarına metabolize olması ve COMT aracılığı ile metillenmesidir (2).

İzoproterenolun  $\beta$ -reseptör seçiciliğinin olmaması ve hızla metabolize oluşu, seçici  $\beta_2$ -adrenoseptör stimulanların geliştirilmesine yol açmıştır. Seçici ilaçların geliştirilmesi kateşol

yerine hidroksil gruplarının 1, 3 numaralarda konumlandığı rezorsinol yapısı kullanılmıştır. Rezorsinol COMT için uygun bir substrat olmadığından kateşol içeren türevlere kıyasla daha iyi absorplanırlar ve etki süreleri de daha uzundur. Terbutalin oral yolla verildiğinde aktif ve uygun bir etki süresine sahiptir, ayrıca COMT ile metabolize olmaz (2). İzoproterenol, rezorsinol ve terbütalinin kimyasal formülleri Şekil 11.' de verilmiştir.



Şekil 11. İzoproterenol, rezorsinol ve terbütalinin formülleri

Bu sebeplerle ilaç geliştirme sürecinin başarısı için, ilacın organizmadaki etkinliği ve güvenilirliğinin belirlenmesinde önemli olan metabolizma çalışmaları gereklidir. Bu çalışmalar sonucu yeni bir ilaç adayının ne şekilde ve hangi enzimler yoluyla metabolize olduğunun belirlenmesi gereklidir. Bu bilgiyle bileşiğin ilaç-ilaç etkileşimlerine neden olup olmayacağı tahmini de yapılabilmektedir. Enzim indüksiyonu veya enzim inhibisyonu yapan ilaçlar beraberinde alınan diğer ilaçların metabolizmasını etkileyerek ilacın hızlı bir şekilde atılmasına ve dolayısıyla etki gösterememesine veya metabolizmasını yavaşlatıp kan konsantrasyonunu yükselterek toksik doza ulaşmasına neden olabilir. Ayrıca genetik polimorfizmlere bağlı bireylerarası metabolizma duyarlılığının farklılığı da bu sayede belirlenebilmektedir (4). İzoniazid ve diğer bazı ilaçların yavaş asetilasyonu bu duruma örnek verilebilir. İzoniazid, hidralazin, prokainamid, fenelzin, sülfonamidler karaciğerde N-asetiltransferaz 2 (NAT-2) enzimi tarafından asetillenmek suretiyle inaktive edilirler. Yavaş asetilleyiciler olarak bilinen bazı kişilerde genetik polimorfizm nedeniyle karaciğer hücrelerinde enzimin miktarı azalmıştır (17).

#### İlaç Metabolizması Çalışmalarında Yöntem

Metabolizma çalışmaları ilacın güvenilirliğinin saptanması açısından oldukça önemlidir. Bir ilacın piyasa sürülebilmesi için mutlaka metabolitlerinin izole edilmesi ve toksik olmadıklarının belirlenmesi gerekmektedir.

Literatürde ilaç metabolizma çalışmalarının *in vitro* ve *in vivo* tekniklerle yapıldığı görülmektedir. *In vivo* çalışmalar deney hayvanlarında yapıldığından insana uygulanabilirliği kullanılan deney hayvanına

bağlıdır. Fareler, metabolizma yolları insana yakın olduğu için, metabolizma çalışmalarında en çok kullanılan deney hayvanlarıdır (3).

#### 1. *In vitro* Metabolizma Çalışmaları

Metabolik yolların karmaşık olması ve metabolitlerin birkaç reaksiyon sonucu atılabilir ürüne dönüşmeleri durumunda, metabolitlerin idrar gibi atılım ürünlerinden saptanması çoğu zaman mümkün olmamakta ve dolayısıyla *in vivo* çalışmalarla, metabolizmanın ilk ürünleri olan primer metabolitler tespit edilememektedir. Bu nedenle metabolitleri tanımlamak ve metabolitlerin oluşumundan sorumlu enzimleri belirlemek için *in vivo* deneylerden önce *in vitro* deneyler yapılmaktadır (Şekil 12.) (18).

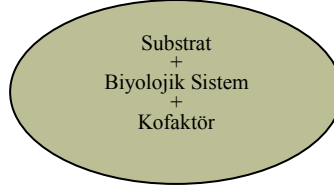
İlaç ve metabolitlerin metabolizma deneyi sonrası tanımlanabilmesi için sulu fazdan organik faza çekilmesi gerekmektedir. Biyolojik örneklerden ilaç ve metabolitlerin ayırımında, sıvı-sıvı ekstraksiyonu veya sıvı-katı ekstraksiyonu kullanılır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonda; ilaç ve metabolitlerin nötral, asidik ya da bazik olabilmesi nedeniyle ilgili metabolitin sulu sistemden organik faza geçişini kolaylaştırmak için ortamın pH'sı değiştirilmektedir. Polar özelliğe sahip metabolitlerin, metabolize olmayan ilaçla birlikte sulu fazdaki çözünürlüğünün azaltılmasını ve suda çözünürlüğü yüksek olan metabolitlerin de organik faza geçmesini sağlamak amacıyla ekstraksiyon yapılmadan önce inkübasyon ortamına sodyum klorür ilave edilmektedir. Ekstraksiyon çözücüsünün seçiminde ekstraksiyon çözücüsünün saflık derecesi, ekstraksiyon gücü, toksisitesi ve ekstre edilecek bileşiğin çözücü içerisindeki stabilitesi göz önüne alınmalıdır (18).



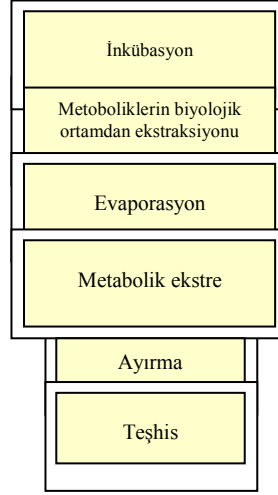
**Ön işlemler:**



**Deney ortamı:**



**Deneysel çalışmalar:**



Şekil 12. *In vitro* ilaç metabolizması çalışmalarında izlenecek safhalar (10).

**1.1. Mikrozoal Preparatın Hazırlanması ve Standart Ko-Faktör Karışımları**

Steroidler, yağ asitleri ve ksenobiyotiklerin metabolizasyonlarında en önemli enzimler olan sitokrom P-450 izoenzimleri ve mikrozoal flavin monooksijenazlar (MFMO), etki göstermesi için indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), moleküler oksijen ve magnezyum iyonuna ihtiyaç duymaktadırlar. NADPH mikrozoalarda bulunmakta ve oksijen ile aktif bir oksijen ara ürünü yaparak, bu ara ürünü substrata transfer eden bir komponenti indirgemektedir. Bu sisteme karma fonksiyonlu oksidaz (MFO) denir. Bu reaksiyonda bir oksijen atomu substrata giderken, diğer oksijen atom da suya gider. Bu nedenle NADPH inkübasyon ortamına direkt olarak ilave edilmekte ya da çok pahalı olduğundan kimyasal olarak da sentezlenmektedir (7, 19).

**1.2. Karaciğer Mikrozoal Preparatının Hazırlanması**

Karaciğer metabolizmadan sorumlu enzimlerin en yoğun olarak bulunduğu organdır. Bu nedenle mikrozoal preparatlar sıçan, kobay, tavşan, maymun veya domuz gibi deney hayvanlarının karaciğerinden hazırlanmaktadır. Deneyde kullanılacak hayvanlar, santrifüj sırasında

mikrozoaların kaybolmaması için, 24 saat aç bırakılmakta ve glikojen seviyeleri azaltılıp hayvanlara yalnızca su verilmektedir. Karaciğer çıkartıldıktan sonra bütün işlemler soğuk ortamda yapılır. Mikrozoal preparatın hazırlanmasında kalsiyum klorürle çöktürme işlemi uygulanmaktadır. Bu yöntemde endoplazmik retikulum fragmentleri sırayla santrifüjlenmektedir (7, 19).

**1.3. İnkübasyon**

İnkübasyon, substratın (metabolitleri araştırılacak ilacın) ko-faktörler varlığında, mikrozoal preparatla vücut sıcaklığında (37°C) reaksiyonudur. İnkübasyon ortamına ilave edilecek substrat miktarı genellikle bir inkübasyon tüpü başına 2-5 µmol/50 µl'dir. Substratı çözmek için su, metanol, 2-metoksietanol veya dimetilsülfoksit kullanılmaktadır.

Denatüre mikrozoaların kullanıldığı veya ko-faktörlerin ilave edilmediği kontrol tüpleri de hazırlanmaktadır. Böylece kontrol deneyleri ile yapılan inkübasyonda metabolitlerin enzimatik ya da kimyasal olarak oluştuğu belirlenmektedir. Deneyler meydana gelebilecek kayıpları ve istatistiksel hataları önlemek için en az ikili ya

da üçlü paraleller halinde yürütülmektedir. Bütün reaksiyon şartları önceden belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra substrat 37 °C'lık çalkalayıcı su banyosunda genellikle yarım saatlik bir inkübasyona tabi tutulur. İnkübasyondan sonra substrat ve metabolitler, biyolojik sistemden organik çözücüye ekstraksiyon ile çekilir ve kromatografik yöntemlerle ayırım sağlanır (7, 19).

#### 1.4. Biyolojik Sistemden Ekstraksiyon ve Buharlaştırma

DeneySEL çalışmalarından önce belirlenen ekstraksiyon çözücüsünün ilavesiyle enzimatik reaksiyon durdurulur. Değişmeden kalan substrat, metabolitler ve organik fazın karışımını içeren tüpler karıştırılır. Tüp içerikleri santrifüjlenip organik fazlar toplanır ve bu işlem iki kez yapılır. Birleştirilen organik fazlar düşük sıcaklıktaki su banyosunda ya da azot gazı altında uçurularak metabolik ekstratlar elde edilir. Metabolitler, metabolik ekstratların kromatografik sistemlere uygulanması ve standartları ile karşılaştırılmasıyla tayin edilirler (7, 19).

#### İlaç Metabolizması Çalışmalarına Örnekler

İlaç metabolitlerinin ayrılması ve yapılarının aydınlatılmasında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), kütle spektroskopisi (MS), kapiller elektroforez ve çeşitli elektroanalitik yöntemler kullanılmaktadır (20-23).

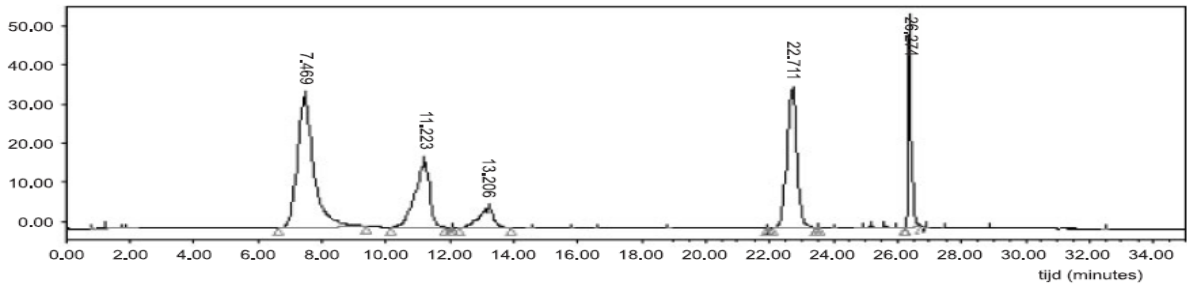
İlaç metaboliti tayini yöntemlerinden biri, ilaç molekülüne radyoaktif ya da stabil izotoplarının eklenmesi ve vücuda verilen işaretli ilacın daha sonra insan ya da hayvandan alınan fizyolojik örneklerde kromatografik yöntemlerle tayini esasına dayanmaktadır. Seçilen fraksiyon daha sonra kütle spektroskopisi ile aydınlatılmaktadır. Ardarda kütle spektroskopisi (MS/MS) tekniğiyle de daha kısa sürede ve daha az örnekle çalışılarak metabolitlerin daha iyi teşhisi sağlanabilmektedir (24, 25). Schaut ve arkadaşlarının (26) yapmış olduğu bir çalışmada,

*Penicillium verrucosum* ve *Aspergillus ochraceus* tarafından üretilen okratoksin A ve onun metabolitleri olan okratoksin alfa (OT $\alpha$ ), 10-hidroksiokratoksin A (10-OHOTA), 4R-hidroksiokratoksin A (4R-OHOTA) ve okratoksin A'nın etil esterinin (OTC) *in vitro* tayini, HPLC ve LC-MS/MS teknikleri kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 13.).

Barrera ve diğerlerinin (27) yaptığı bir çalışmada, triklabendazolün metabolitlerinin, donafloksasin ve moksidektinin süte geçişi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Triklabendazol metabolitleri, meme bezi alveoler epitel hücre membranında lokalize olan ve ilaçların kandan süte transferinden sorumlu en önemli aktif transport proteinlerinden ABCG2 proteinini (ya da Breast Cancer Resistant Protein (Bcrp)) inhibe ederek ilaç moleküllerinin süte geçen miktarını etkilemektedir. Bu çalışmada HPLC tekniği ile plazmada triklabendazolün ana metabolitleri olan triklabendazol sülfoksit ve triklabendazol sülfon belirlenmiş, donafloksasin ve moksidektinin plazma ve sütteki konsantrasyonları ölçülerek, metabolitlerin süte geçişteki etkisi incelenmiştir.

Oruç ve diğerleri, HPLC yöntemiyle okul öncesi çocukların idrarında kotinin miktarını tayin etmişlerdir (28). Kotinin, nikotin alım düzeyinin belirlenmesinde kullanılan bir metabolittir. Bu çalışmada araştırmacılar, çevresel sigara dumanına maruz kalmış 3-6 yaş arası çocukların idrarındaki kotinin konsantrasyonunu belirlemek için DAD dedektörün kullanıldığı HPLC metodu uygulamışlardır. Yöntemde sabit faz olarak Chromasil C-18 kolon, hareketli faz olarak ise fosfat tamponu ve asetonitrilden (83:17) oluşan çözücü karışımı izokratik olarak kullanılmış, akış hızı ise 0.7 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Analiz 260 nm'de yapılmış ve toplam analiz süresi 15 dk olarak belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada N-1'-benzilnornikotin, N-1'-(p-klorobenzil)nornikotin, N-1'-benzoilnornikotin ve N-1'-(p-klorobenzoil)



Şekil 13. HPLC-FLD kromatogramı: sırasıyla OT $\alpha$  (7.469), 10-OHOTA (11.223), 4R-OHOTA (13.206), OTA (22.711) ve OTC (26.374)'nin retensiyon zamanları (dk.) (26).

nornikotinin *in vitro* metabolizma çalışmaları kofaktör olan NADPH ile desteklenmiş karaciğer mikrozomal preparatları kullanılarak yapılmıştır. Substratlar ve en fazla oluşan metabolitleri sentezlenmiş, yapıları spektral yöntemlerle aydınlatılmış ve HPLC yöntemiyle, sabit faz olarak C-18 kolon, hareketli faz olarak ise fosfat tamponu-asetonitril karışımı kullanılarak ayırımları yapılmıştır. Substrat ve metabolitler biyolojik ortamdan diklorometan ile ekstre edilmiştir. Metabolitler retensiyon zamanları kıyaslanarak ve standartlarının UV spektrumları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda N-alkilnornikotin substratlarından nornikotin ve ilgili aldehitlerin oluşmasında oksidatif dealkilasyonun ana yol olduğu görülmüştür. Ayrıca N-1'-(p-klorobenzil)nornikotinden laktam ve aldehit metabolitleri, N-açıl nornikotinlerden ise hidroliz ile nornikotin metaboliti oluştuğu belirlenmiştir (29).

İlaçlar, gıda boyaları, içecekler, kozmetikler, tekstil ürünleri ve daha pek çok alanda kullanılan kimyasalların yapısında yer alan azo bileşikleri uğradıkları enzimatik veya kimyasal oksidatif ve redüktif reaksiyonlar sonucu insan sağlığını tehdit eden metabolitler oluşturmaktadır. Azo bileşiklerinin metabolizmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada etil 4-((2-hidroksi-1-naftil)azo)benzoat bileşiğinin *in vivo* ve *in vitro* metabolitleri araştırılmıştır. *In vitro* biyotransformasyon çalışmalarında kofaktör olarak NADPH'ın ilave edildiği rat karaciğer mikrozomal preparatları kullanılmıştır. Bu çalışmada yapısı aydınlatılmamış üç metabolit elde edilmiştir. *In vivo* metabolizma çalışmasında da substratın konsantrasyon çözeltisi dişi ratlara oral olarak verilmiş ve uygulamadan sonra belli aralıklarla ratlardan kan örnekleri alınmıştır. Plazma proteinleri soğuk asetonitril ile çöktürülüp santrifüjlenerek plazma örnekleri elde edilmiş ve HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda değişmemiş substrat ile onun redüksiyon ve asetilasyon ürünleri gözlenmiş, bileşiğin ester kısmından hidroliz olduğu metabolitlere rastlanmamıştır (30).

Başka bir çalışmada çeşitli ilaçların yapısında bulunan amin ve iminlerin sekonder oksidasyon metaboliti olan, antioksidan özellikteki nitronların metabolizma çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada  $\alpha$ -fenil-N-*tert*-bütilnitron (PTBN),  $\alpha$ -(2,6-diklorofenil)-N-fenilnitron (DCPPN) ve  $\alpha$ -fenil-N-adamantanilnitron (PADN) olmak üzere üç farklı  $\alpha$ -fenil-N-süstitüe nitron kullanılmış

ve üçünün de aldehit yapısı taşıyan metabolitleri elde edilmiştir. Ayrıca PTNB substratının diğerlerinden farklı olarak amid yapıdaki metaboliti de oluşmuştur (31).

## Sonuç

Metabolizma çalışmaları sonucu ilacın vücuttaki akıbeti anlaşılıp, metabolitlerin aktif, toksik olup olmadıkları belirlenebilmektedir.

Metabolitlerden yola çıkılarak ilaçlarda görülen bazı absorpsiyon, çözünürlük, kısa etki süresi, stabilite, yan etki, toksisite gibi sorunlar çözülebilir yeni ilaç geliştirmede metabolizma çalışmalarından yararlanılabilir.

İlacın metabolizma yollarının belirlenmesi, enfeksiyon hastalıkları ve kanser kemoterapisi gibi çoklu ilaç direncinin geliştiği durumlara da katkı sağladığından tedavi açısından önemlidir, çünkü tedavide kullanılan bir ilaç başka bir ilacın metabolizmasından sorumlu enzimin inhibitörü veya substratı olabilmektedir. Bu da tehlikeli ilaç etkileşimlerinin yaygın bir nedenidir.

## Kaynaklar

1. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 2009. Cilt 1, pp. 40-52. Pelikan Yayıncılık Ltd. Lt., Ankara
2. Akgün H, Balkan A, Bilgin AA, Çalış Ü, Gökhan N, Dalkara S, Erdoğan H, Erol DD, Ertan M, Özkanlı F, Palaska E, Saraç S, Şafak C, Tozkoparan B. Farmasötik Kimya 2004. pp. 109-148. Hacettepe Yayınları, Ankara.
3. Rollas S. İlaç Metabolizması (Biyotransformasyon) 1992. Marmara Üniversitesi Yayın No: 525, Eczacılık Fakültesi Yayın No: 10, İstanbul.
4. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman&Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli 2009. pp. 71-93. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
5. Parkinson A. Biotransformation of Xenobiotics 2001. Chapter 6. McGraw-Hill.
6. Kaymaz S. İndol-3-karbinol'ün *in vitro* mikrozomal metabolik reaksiyonlarının incelenmesi 2006. Yüksek lisans tezi. Marmara Üniversitesi, İstanbul.
7. Black JL, O'Kane DJ, Mrazek DA. The impact of CYP allelic variation on antidepressant metabolism: a review. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2007; 3(1): 21-31.
8. Yang L, Li Y, Hong H, Chang CW, Guo LW, Lyn-Cook B, Shi L, Ning B. Sex Differences in the Expression of Drug-Metabolizing and Transporter Genes in Human Liver. J Drug Metab Toxicol 2012; 3(3): e111.
9. Sun J, Schnackenberg LK, Holland RD, Schmitt TC, Cantor GH. Metabonomics evaluation of urine from rats given acute and chronic doses of

- acetaminophen using NMR and UPLC/MS. J. Chromatogr B. *Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 871: 328-40.
10. Plumb RS, Granger JH, Stumpf CL, Johnson KA, Smith BW. A rapid screening approach to metabonomics using UPLC and oa-TOF mass spectrometry: application to age, gender and diurnal variation in normal/Zucker obese rats and black, white and nude mice. *Analyst* 2005; 130: 844-49.
  11. Drug metabolism. [http://en.wikipedia.org/wiki/Drug\\_metabolism](http://en.wikipedia.org/wiki/Drug_metabolism). (Son erişim tarihi: 13.06.2014)
  12. Fura A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. *Drug Disc Today* 2006; 11: 133-142.
  13. Kaplan JP, Raizon BM. New Anticonvulsants: Schiff Bases of-aminobutyric Acid and gamma-aminobutyramide. *J Med Chem* 1980; 23: 702-04.
  14. Johno I, Kudwick BT, Levy RH. Pharmacokinetic Profile of Progabide, a New gamma -Aminobutyric Acid-Mimetic Drug, in Rhesus Monkey. *J Pharm Sci* 1982; 71: 633-6.
  15. Bergmann KJ. Progabide: A New GABA-Mimetic Agents in Clinical Use *Clin Neuropharmacol* 1985; 8: 13-26.
  16. Das N, Dhanawat M, Dash B, Nagarwal RC, Shrivastava SK. Codrug: An efficient approach for drug optimization. *Eur J Pharm Sci* 2010; 41: 571-588.
  17. Aynacıoğlu AŞ. Psikiyatrik Hastalıkların İlaçlarla Tedavisinde Farmakogenetiğin Önemi. *Klinik Psikiyatri* 2001; 4: 249-52.
  18. Ülgen M. *In vitro* oksidatif mikrozomal 1. faz ilaç metabolizması teknikleri. *J Pharm Univ Marm* 1993; 9: 165.
  19. Çakmak A. Bazı substitüe alifatik-aromatik amidlerin ve hidroksumik asitlerin *in vitro* mikrozomal metabolizmaları 2007. Yüksek lisans tezi. Marmara Üniversitesi, İstanbul.
  20. Blake TJ. Structure elucidation of drug metabolites using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1987; 394(1): 171-81.
  21. Heitmeier S, Blaschke G. Direct determination of drug metabolites in body fluids by capillary electrophoresis, e.g. non-opioid analgetics. *Pharmazie* 1996; 25(5): 276.
  22. Tozuka Z, Kaneko H, Shiraga T, Beppu M, Niwa, T, Kawamura A, Kagayama A. New SRM Data Dependent Exclusion (MS)<sup>n</sup> Measurement for Structural Determination of Drug Metabolites Using LC/ ESI/ Ion Trap MS. *Drug Metab Pharmacokin* 2003; 18 (6): 390-403.
  23. Ülgen M. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisinin İlaç Metabolizması Çalışmalarına Uygulanması, HPLC Tekniği ve Uygulamaları Kursu, 11-15 Haziran 2007, Malatya.
  24. Lee MS, Yost RA, Perchalski RJ. Chapter 30. Tandem Mass Spectrometry for the Identification of Drug Metabolites. *Ann Rep Med Chem* 1986; 21: 313-21.
  25. Grunwald H, Hargreaves P, Gebhardt K, Klauer D, Serafyn A, Hoffmann AS, Schleimer M, Schlotterbeck G, Wind M. Experiments for a systematic comparison between stable-isotope-(deuterium) labeling and radio-(<sup>14</sup>C) labeling for the elucidation of the *in vitro* metabolic pattern of pharmaceutical drugs. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 85: 138-44.
  26. Schaut A, De Saeger S, Sergent T, Schneider YJ, Larondelle Y, Pussemier L, Blank R, Van Peteghem C. Chromatographic methods for biotransformation studies of ochratoxin A *Biomed Chromatogr* 2008; 22: 1013-20.
  27. Barrera B, Lobato LG, Otero JA, Real R, Prieto JG, Álvarez AI, Merino G. Effects of triclabendazole on secretion of danofloxacin and moxidectin into the milk of sheep: Role of triclabendazole metabolites as inhibitors of the ruminant ABCG2 transporter. *Vet. 2013*; <http://dx.doi.org/j.tvj.2013.07.033>
  28. Oruç EE, Koçyiğit-Kaymakcioglu B, Yılmaz-Demircan F, Gürbüz Y, Kalaca S, Küçükgülzel SG, Ülgen M, Rollas S. An high-performance liquid chromatographic method for the quantification of cotinine in the urine of preschool children. *Pharmazie* 2006; 61(10): 823-27.
  29. Yılmaz F, Aricioğlu-Kartal F, Ülgen M, Gorrod JW. *In vitro* microsomal metabolism of N-benzyl and N-benzoylnornicotine derivatives by rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 2004; 29(4): 249-56.
  30. Bekce B, Sener G, Oktav M, Ülgen M, Rollas S. *In vitro* and *in vivo* metabolism of ethyl 4-((2-hydroxy-1-naphthyl)azo)benzoate. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 2005; 30(1-2): 91-7.
  31. Bulut G, Oktav M, Ülgen M. The stability studies and *in vitro* hepatic microsomal metabolism of some  $\alpha$ -phenyl-N-substituted nitrones in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 2004; 29(4): 237-48.

**Sorumlu Yazar:**

**Zeynep ÖZDEMİR**

İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 44280  
MALATYA, TÜRKİYE.

E-mail: zpozdmr@gmail.com