

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM VE MİKROZOMAL FRAKSİYON
ARACILIKLI İLAÇ METABOLİTLERİ ÜRETİMİ VE ENZİMATİK
KARAKTERİZASYONU

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Kimyager Neliye MUTLU

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hilmi ORHAN

İZMİR
2014

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM VE MİKROZOMAL FRAKSİYON
ARACILIKLI İLAÇ METABOLİTLERİ ÜRETİMİ VE ENZİMATİK
KARAKTERİZASYONU

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Kimyager Neliye MUTLU

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hilmi ORHAN

İZMİR
2014

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Hilmi ORHAN

.....

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS

.....

Üye : Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN

.....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

.....

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmalarında katkıları ve desteğinden dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Hilmi ORHAN'a çok teşekkür ediyorum. Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN'a ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS'a teşekkür ederim.

Anabilim dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma ve Ecz. Nilüfer ŞENDURAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamda yer alan açık sistem elektrokimyasal oksidasyon uygulamalarında yardımını esirgemeyen Analitik Kimya Anabilim Dalı üyelerinden Prof. Dr. Arzum ERDEM GÜRSAN ve Doç. Dr. Hakan KARADENİZ'e teşekkür ediyorum.

Ömrüm boyunca maddi-manevi hiçbir desteğini üzerimden esirgemeyen ve her daim yanımda olan aileme sonsuz teşekkürler.

Bu tez, 110S224 nolu TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

İZMİR, 2014

Neliye MUTLU

ÖZET

**ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM VE MİKROZOMAL FRAKSİYON
ARACILIKLI İLAÇ METABOLİTLERİ ÜRETİMİ VE ENZİMATİK
KARAKTERİZASYONU**

Bu tez kapsamında ileri çalışmalarda referans olarak kullanılabilir ilaç metaboliti üretme yöntemi olarak, seçilmiş olan model ilaçlara elektrokimyasal oksidasyon yöntemi uygulanmıştır. Elektrokimyasal yolla üretilen bu oksidasyon ürünlerinin biyolojik uygunluklarını araştırmak amacıyla aynı ilaç molekülleri gerekli kofaktörler ve karaciğer mikrozomları ile eşzamanlı olarak inkübe edilmiştir. Elektrokimyasal yöntem olarak denenen döngüsel voltametri yöntemi ve çevrim-içi elektrokimyasal yöntemden ikincisinin daha fazla miktarda metabolit oluşturduğu görülmüş ve çalışmalara bu yöntemle devam edilmiştir. Model ilaç molekülü olarak seçilen parasetamolün reaktif metaboliti N-asetil-*p*-benzokinonimin (NAPQI) üretimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Diğer iki model ilaç molekülü olan olanzapin ve klozapin aynı şekilde elektrokimyasal yöntemle okside edilmiş, her iki molekülün hem reaktif metabolitleri, hem de stabil metabolitleri elde edilmiştir. Literatürde daha önce tanımlanmış olan bu metabolitler karaciğer mikrozomları ile de oluşturularak biyolojik uygunlukları doğrulanmıştır. Sitokrom P450 (CYP450) aktivitesi için gerekli redükleyici kofaktör NADPH inkübasyon ortamına konmadığında oluşan metabolit miktarının çok az olmasıyla söz konusu reaksiyonları CYP450 enzimlerinin katalize ettiği gösterilmiştir. Maddelerin HPLC-UV analizlerini takiben kimyasal yapı doğrulama için LC-MS/MS tekniğine dayalı selected reaction monitoring (SRM) yöntemleri kurulmuş ve tez sonrası dönemde söz konusu ilaçları kullanan hastalarda planlanan klinik çalışmalar için hazırlıklar tamamlanmıştır.

Anahtar kelimeler: ilaç biyotransformasyonu; elektrokimyasal oksidasyon; mikrozomal inkübasyon; parasetamol; klozapin; olanzapin

ABSTRACT

**GENERATION AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF DRUG
METABOLITES BY ELECTROCHEMICAL METHOD AND MICROSOMAL
FRACTION**

In this thesis, electrochemical oxidation method was applied to model drugs in order to generate their metabolites as reference compounds for further studies. Simultaneously, biological relevancy of electrochemically generated metabolites were checked by incubating the same parent molecule with liver microsomes in the presence of required cofactors. It has been observed that the on-line electrochemical method generated more metabolites compared to cyclic voltametric method. Therefore the former was used throughout the studies. The optimum conditions for generating N-acetyl-*p*-benzoquinonimine (NAPQI), the reactive metabolite of paracetamol, were determined. The other two model drugs, olanzapine and clozapine were oxidized similarly, and both reactive and stable metabolites were obtained from both molecules. These previously identified metabolites were generated also by liver microsomes, and their biological relevancy was confirmed. The observation of dramatically diminished amount of metabolites when NADPH, the reducing factor for cytochrome P450 (CYP450) was omitted from incubation medium showed CYP450-dependency of formation of the metabolites. Following products' analyses by HPLC-UV technique, selected reaction monitoring (SRM) methods with LC-MS/MS were optimized and preparations were done for further clinical studies in post-thesis period, which were planned in patients medicated with these drugs.

Key words: Drug biotransformation; electrochemical oxidation; microsomal incubation; paracetamol; clozapine; olanzapine

İçindekiler

ÖZET	I
ABSTRACT	II
İçindekiler	III
Tablolar Dizini	VIII
Şekiller Dizini	X
Kısaltmalar Dizini	XIII
BÖLÜM	II
I.GİRİŞ ve AMAÇ	1
I.1. GENEL BİLGİLER	2
I.1.1. <i>In vitro</i> reaktif metabolit üretme sistemleri	5
I.1.1.1. Konvansiyonel Sistemler: Mikrozoimler ve S9 Fraksiyonlar	5
I.1.1.2. Hepatositler	6
I.1.1.3. Biyolojik olmayan sistem: Elektrokimya (EK)	6
I.1.1.3.1. Açık Sistem: Üçlü Elektrot Sistemi	7
I.1.1.3.1.1. Voltametri	8
I.1.1.3.1.1.1. Döngüsel Voltametri (Siklik Voltametri; SV)	8
I.1.1.3.1.2. Kapalı Sistem: Koruyucu Hücre ve Analitik Hücre (Guard Cell; Analytic Cell)	9
I.1.2. Elektrokimyasal Yöntem Kullanmanın Avantajları	10
I.1.3. PARASETAMOL (PAR)	10
I.1.4. OLANZAPİN (OLA)	11
I.1.5. KLOZAPİN (KLZ)	13
BÖLÜM II	16
II.1. MATERYAL VE YÖNTEM	16
II.1.1. MATERYAL	16
II.1.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	16

II.1.1.2. Kullanılan Materyaller	17
II.1.1.3. Kullanılan Çözeltiler	18
II.1.1.3.1. Elektrokimyasal Yöntemde Kullanılan Çözeltiler	18
II.1.1.3.2. Mikrozomal İnkübasyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	18
II.1.2. YÖNTEMLER	19
II.1.2.1. DENEYSEL YÖNTEMLER	19
II.1.2.1.1. ELEKTROKİMYASAL (EK) YÖNTEM	19
II.1.2.1.1.1. Açık Sistem: Üçlü Elektrot Sistem	19
II.1.2.1.1.2. Kapalı Sistem: Çevrim-içi Koruyucu Hücre ve Analitik Hücre	19
II.1.2.1.2. BİYOLOJİK OKSİDASYON YÖNTEMİ (Mikrozomal İnkübasyon)	20
II.1.2.2. ANALİZ YÖNTEMLERİ	20
II.1.2.2.1. PARASETAMOL ÇALIŞMALARI	20
II.1.2.2.1.1. Parasetamol Üçlü Elektrot Sistemi (Açık Sistem) Çalışmaları	20
II.1.2.2.1.2. Parasetamol Çevrim-içi Elektrokimyasal Hücre (Kapalı Sistem) Çalışmaları	22
II.1.2.2.1.2.1. Farklı voltaj potansiyellerinin NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisinin incelenmesi	22
II.1.2.2.1.2.2. Ortam pH değerinin NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisinin incelenmesi	22
II.1.2.2.1.2.3. GSH konsantrasyonunun NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisinin incelenmesi	23
II.1.2.2.1.2.4. NAPQI'ın GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması	23
II.1.2.2.2. OLANZAPİN ÇALIŞMALARI	25
II.1.2.2.2.1. Olanzapin Çevrim-içi Elektrokimyasal Hücre Çalışmaları	25
II.1.2.2.2.2. Olanzapin Sıçan Karaciğer Mikrozomlarıyla İnkübasyon Çalışmaları	27
II.1.2.2.3. KLOZAPİN ÇALIŞMALARI	31

II.1.2.2.3.1. Klozapin Çevrim-içi Elektrokimyasal Hücre Çalışmaları.....	31
II.1.2.2.3.2. Klozapin Sıçan Karaciğer Mikrozomlarıyla İnkübasyon Çalışmaları.....	34
BÖLÜM III	37
III. BULGULAR	37
III.1. PARASETAMOL ÇALIŞMA SONUÇLARI	37
III.1.1. Parasetamolün Döngüsel Voltametri (SV) Yöntemiyle Oksidasyonu	37
III.1.2. Parasetamolün Çevrim-içi EK Yöntemle Oksidasyonu.....	40
III.1.2.1. Voltaj Potansiyelinin NAPQI-SG Konjugatı Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi.....	43
III.1.2.2. Ortam pH Değerinin NAPQI-SG Konjugatı Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi.....	44
III.1.2.3. GSH Konsantrasyonunun NAPQI-SG Konjugatı Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi	45
III.1.2.4. NAPQI'ın GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması.....	47
III.2. OLANZAPİN ÇALIŞMA SONUÇLARI	48
III.2.1. Olanzapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Konjugatının Oluşturulması.....	48
III.2.2. Olanzapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması.....	51
III.2.3. Olanzapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu Yoluyla GSH Konjugatının Oluşturulması.....	54
III.2.4. Olanzapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu Yoluyla GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması.....	56
III.3. KLOZAPİN ÇALIŞMA SONUÇLARI	58
III.3.1. Klozapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Konjugatının	

Oluşturulması.....	58
III.3.2. Klozapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu	
Yoluyla GSH Konjugatının Oluşturulması	61
BÖLÜM IV	64
IV. TARTIŞMA	64
IV.1. PARASETAMOL ÇALIŞMA SONUÇLARININ	
TARTIŞMASI	64
IV.1.1. Parasetamolün SV Yöntemiyle Oksidasyonu Tartışması.64.....	
IV.1.2. Parasetamolün Çevrim-içi EK Yöntemle Oksidasyonu	
Tartışması	64
IV.1.2.1. NAPQI-SG Oluşumu Üzerine Etkili Faktörlerin	
Belirlenmesi Tartışması	65
IV.1.2.2. NAPQI'in GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle	
Konjugatının Oluşturulması Tartışması.....	65
IV.2. OLANZAPİN ÇALIŞMA SONUÇLARI TARTIŞMASI	65
IV.2.1. Olanzapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH	
Konjugatı Oluşturulması Tartışması.....	65
IV.2.2. Olanzapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Dışı	
Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması	
Tartışması	65
IV.2.3. Olanzapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu	
Yoluyla GSH Konjugatı Oluşturulması Tartışması.....	66
IV.2.4. Olanzapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu Yoluyla GSH	
Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması	
Tartışması	67
IV.3. KLOZAPİN ÇALIŞMA SONUÇLARI TARTIŞMASI	68
IV.3.1. Klozapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Konjugatı	
Oluşturulması Tartışması.....	68
IV.3.2. Klozapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu	
Yoluyla GSH Konjugatı Oluşturulması Tartışması	68
IV.4. Genel Tartışma	69

KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ.....	75

Tablolar Dizini

Tablo II.1. Açık sistem EK yönteminde NAPQI-SG konjugatı için kullanılan SRM yöntemi	22
Tablo II.2. Kapalı sistem EK yönteminde NAPQI-SG konjugatı için kullanılan SRM yöntemi	24
Tablo II.3. EK-PAR konjugatı için kullanılan bütün SRM yöntemleri	24
Tablo II.4. Parasetamol çalışmalarında kullanılan LC-MS/MS tune ayarları	24
Tablo II.5. OLA-SG-EK konjugatı için kullanılan SRM yöntemi.....	25
Tablo II.6. OLA-Nac-EK konjugatı için kullanılan SRM yöntemi	26
Tablo II.7. OLA-Cys-EK konjugatı için kullanılan SRM yöntemi.....	26
Tablo II.8. EK-OLA konjugatları için kullanılan bütün SRM yöntemleri.....	27
Tablo II.9. OLA-SG mikrozomal inkübasyonunda stabil metabolitlerin ve konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi	28
Tablo II.10. OLA-Nac mikrozomal inkübasyonunda konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi.....	29
Tablo II.11. OLA-Cys mikrozomal inkübasyonunda konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi.....	29
Tablo II.12. OLA mikrozomal inkübasyon çalışmalarında kullanılan bütün SRM yöntemleri	30
Tablo II.13. OLA çalışmalarında kullanılan LC-MS/MS tune ayarları.....	30
Tablo II.14. KLZ-SG-EK konjugatı için kullanılan SRM yöntemi	32
Tablo II.15. KLZ-SG-EK konjugasyonunda stabil metabolitlerin ve konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi	33
Tablo II.16. KLZ-SG-EK çalışmalarında kullanılan bütün SRM yöntemleri.....	34
Tablo II.17. KLZ-SG mikrozomal inkübasyonunda stabil metabolitlerin ve konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi	35
Tablo II.18. KLZ-SG mikrozomal inkübasyon çalışmalarında kullanılan bütün SRM yöntemleri	36
Tablo II.19. KLZ çalışmalarında kullanılan LC-MS/MS tune ayarları	36
Tablo III.1. OLA-SG mikrozomal inkübasyonu için yoğunlukların gösterildiği sonuç tablosu.....	66
Tablo III.2. OLA-Nac mikrozomal inkübasyonu için yoğunlukların gösterildiği sonuç tablosu.....	67

Tablo III.3. OLA-Cys mikrozomal inkübasyonu için yoğunlukların gösterildiği sonuç tablosu..... 67

Şekiller Dizini

Şekil I.1. Reaktif metabolitlerin üretim ve karakterizasyonu	5
Şekil I.2. Döngüsel voltametri aracılığıyla tersinir bir elektron transferi ile gerçekleşen reaksiyonun SV'si	9
Şekil I.3. Parasetamol metabolizması	10
Şekil I.4. Olanzapinin kimyasal yapısı	11
Şekil I.5. Olanzapin metabolitlerine ait kimyasal yapılar	12
Şekil I.6. Olanzapine ait parçalanma ürününün kütle spektrumu	12
Şekil I.7. Klozapinin kimyasal yapısı	13
Şekil I.8. Klozapin N-oksit ve N-desmetilklozapin metabolitlerine ait kimyasal yapılar	14
Şekil I.9. İnsan karaciğer mikrozoamlarıyla (HLM) KLZ'in oksidatif biyotransformasyonu	15
Şekil II.1. Kapalı sistem elektrokimya hücrelerinden analitik hücre 5010 Modeli ...	19
Şekil III.1. SV yönteminde GSH'un oksidasyondan önce ya da sonra eklenmesinin NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisi	37
Şekil III.2. SV yönteminde uygulanan voltaj potansiyelinin NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisi	38
Şekil III.3. Mikrozomal ve elektrokimyasal yolla (SV) üretilen NAPQI-SG konjugatına ait HPLC-UV kromatogramları	38
Şekil III.4. Fenobarbitalle indüklenmiş sıçan mikrozoamları aracılığı ile üretilen NAPQI-SG konjugatına ait LC-MS/MS; SRM kromatogramı ve kütle dönüşümlerinin spektrumu	39
Şekil III.5. SV yöntemiyle üretilmiş NAPQI-SG konjugatına ait LC-MS/MS; SRM kromatogramı ve izlenen kütle dönüşümlerinin spektrumu	39
Şekil III.6. 25 µM Parasetamolün EK detektörde 0,6 V uygulanarak yükseltgenip 62,5 mM GSH ile karıştırılması sonucu oluşan örneğin; inkübasyon öncesi-sonrası ve liyofilize-konsantre hallerine ait kromatogram	40
Şekil III.7. EK ve SV yöntemle oluşturulan NAPQI-SG konjugatına ait HPLC-UV pikleri	41
Şekil III.8. SV yöntem, EK yöntem ve fenobarbital-indüklenmiş sıçan mikrozoamları aracılıklı oluşturulan NAPQI-SG konjugatına ait HPLC-UV kromatogramları	41

Şekil III.9. EK yöntemde 0,6 V uygulanarak okside edilen ve GSH çözeltisi içine damlatılarak elde edilen NAPQI-SG örneğinin LC-MS/MS analizine ait kromatogram ve kütle spektrumları	42
Şekil III.10. Farklı voltaj değerlerinin NAPQI-SG oluşumu üzerine etkisini gösteren LC-MS/MS, SRM kromatogramları. A: 200 mV; B: 400 mV ; C: 600 mV; D: 800 mV; E: 1200 mV	43
Şekil III.11. Farklı ortam pH değerlerinin NAPQI-SG oluşumu üzerine etkisini gösteren total iyon kromatogramları. A: pH 6,50 B: pH 7,40 C: pH 8,50	44
Şekil III.12. Farklı GSH derişimlerinin NAPQI-SG oluşumu üzerine etkisini gösteren LC-MS/MS, SRM kromatogramları. A: 10 mM GSH; B: 25 mM GSH; C: 62,5 mM GSH; D: 100 mM GSH; E: 250 mM GSH	45
Şekil III.13. Voltaj potansiyelinin NAPQI-SG oluşumuna etkisi	46
Şekil III.14. Ortam pH'sının NAPQI-SG oluşumuna etkisi	46
Şekil III.15. GSH konsantrasyonunun NAPQI-SG oluşumuna etkisi.....	46
Şekil III.16. EK yöntemde PAR oksidasyonu ve Cys, Nac ve KCN ile reaksiyonu sonucu elde edilen örneklere ait HPLC-UV kromatogramları.....	47
Şekil III.17. NAPQI -Cys konjugatının +ESI-total iyon analizi	47
Şekil III.18. Olanzapinin EK yöntemde 0,6 V ve 1,2 V uygulanarak oksidasyonunu takiben 62,5 mM GSH ile karıştırılması sonucu oluşan örneklerin HPLC-UV kromatogramları.....	48
Şekil III.19. 195 µg olanzapin'e ait +ESI-total iyon kromatogramı ve kütle spektrumu	49
Şekil III.20. OLA-SG (600mV-20dk+azot altında yoğunlaştırma) konjugatına ait Q1MS total iyon, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu	49
Şekil III.21. OLA-SG (600mV-20dk+azot altında yoğunlaştırma) konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu.....	50
Şekil III.22. 100 µM OLA-Nac (Analitik Hücre-600mV) konjugatına ait +ESI-total iyon, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu	51
Şekil III.23. 100 µM OLA-Nac (Analitik Hücre -600mV) konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumları	52
Şekil III.24. 100 µM OLA-Cys (Analitik Hücre -600mV) konjugatına ait +ESI-total iyon, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu	53

Şekil III.25. 100 µM OLA-Cys (Analitik Hücre -600mV) konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu	53
Şekil III.26. 100 µM Ola-RLM (+NADPH) inkübasyonundaki OLA, OLA stabil metabolitleri ve OLA-SG konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu	54
Şekil III.27. 100 µM Ola-RLM (-NADPH) inkübasyonundaki OLA, OLA stabil metabolitleri ve OLA-SG konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu	55
Şekil III.28. 100 µM OLA-RLM (+NADPH) inkübasyonundaki OLA-Nac konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu.....	56
Şekil III.29. 100 µM OLA-RLM (-NADPH) inkübasyonundaki OLA-Nac konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu.....	57
Şekil III.30. 100 µM OLA-RLM (+NADPH) inkübasyonundaki OLA-Cys konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu.....	57
Şekil III.31. 100 µM OLA-RLM (-NADPH) inkübasyonundaki OLA-Cys konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu.....	58
Şekil III.32. EK yöntemde 100 µM KLZ ile oluşturulan GSH konjugatına (Analitik Hücre-400 mV-birlikte) ait SRM kromatogramları ve izlenen kütle dönüşümleri.....	59
Şekil III.33. EK yöntemde 100 µM KLZ ile oluşturulan GSH konjugatı ve stabil metabolitlere (Analitik Hücre -400mV-birlikte) ait SRM kromatogramları ve izlenen kütle dönüşümleri.....	60
Şekil III.34. 100 µM KLZ-RLM inkübasyonunun azot altında yoğunlaştırılmasıyla elde edilen örneğe ait HPLC-UV kromatogramı.....	61
Şekil III.35. KLZ-RLM inkübasyonu sonrasında (100 µM KLZ+NADPH) KLZ stabil metabolitleri ve KLZ-SG konjugatına ait SRM ve PDA kromatogramları	62
Şekil III.36. 100 µM KLZ-RLM inkübasyonundaki (-NADPH) KLZ, KLZ stabil metabolitleri ve KLZ-SG konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu	63

Kısaltmalar Dizini

CYP	Sitokrom P450
DMKLZ	Desmetilklozapin
DMO	Desmetilolanzapin
EK	Elektrokimya/Elektrokimyasal
ESI	Electrospray Ionization-Elektrosprey İyonizasyon
FB	Fenobarbital
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GSH	Glutasyon
HLM	Human Liver Microsome-İnsan Karaciğer Mikrozomu
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
İAİR	İdiyosinkratik Advers İlaç Reaksiyonları
KLZ	Klozapin
KLZ-NO	Klozapin N-oksit
LC-MS	Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi
L-Cys	L-sistein
MPO	Miyeloperoksidaz
Nac	N-asetilsistein
NAPQI	N-asetil- <i>p</i> -benzokinonimin
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OLA	Olanzapin
PAR	Parasetamol
Pd	Palladyum
PDA	Photodiode Array-Fotodiyot dizileri
RLM	Rat Liver Microsome-Sıçan Karaciğer Mikrozomu
RM	Reaktif Metabolit
SER	Düz Endoplazmik Retikulum
SRM	Selected Reaction Monitoring
SV	Siklik Voltametri
UGT	Üridin difosfoglukronozil transferaz 1A4
XIC	Ekstrakte İyon Kromatogramı

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Eczacılık Bilimleri içerisinde ilaç geliştirme çalışmalarında ilaç ya da ilaç adayının vücuda girdikten sonra oluşturacağı metabolitlerin araştırılması büyük önem taşır, çünkü hem ilaçtan beklenen farmakolojik etkiler hem de istem dışı ortaya çıkan toksikolojik etkiler çok büyük oranda metabolitlerin özelliklerine ve onların miktarlarına bağlıdır. Metabolitlerin kimyasal yapılarının kesin olarak belirlenmesinde bu metabolitlerin saf halde elde edilmeleri gerekir. Bilimsel çalışmalarda bir çok kimyasal madde ve metaboliti ticari olarak satın alınabilmesine karşın özellikle ilk kez çalışılan ve yapıları bilinmeyen metabolitlerin laboratuarda sentezlenmeleri gerekir. Kimyasal yapı aydınlatılmasında birbirini tamamlayacak şekilde en çok kullanılan iki teknik olan sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC-MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) tekniklerinin ilkinde genellikle düşük miktarlarda (ng düzeylerde) referans madde yeterli olurken ikincisi olan NMR tekniğinde yeterli tanımlayıcı sinyaller elde edebilmek için ortalama 1 mg kadar saf maddeye gereksinim vardır. Günümüzde gerek akademi, gerekse ilaç endüstrisinin araştırma laboratuvarlarında ilaç adaylarının metabolitlerini üretmede birkaç farklı yöntem kullanılır, bunlar biyolojik ve biyolojik olmayan yöntemler olarak iki ana gruba ayrılırlar. Biyolojik yöntemlerde genellikle karaciğer dokusundan elde edilen mikrozomal fraksiyon, doğrudan primer karaciğer hücre kültürü (hepatositler) ya da karaciğer doku kesitleri kullanılır. Bunun yanında insan ya da kemiricilerden saflaştırılmış enzim fraksiyonları, rekombinant teknoloji ile bakterilere ürettirilen ve saflaştırılan enzimler de kullanılabilir. Biyolojik olmayan yöntemlerin başında elektrokimyasal yolla ilaç adaylarının okside edilmeleri gelir. Bu yöntemin avantajı çok daha hızlı, kolay ve mikrozomal ya da diğer yollara göre çok daha az kompleks bir inkübasyon ortamı gerektirmesi iken dezavantajı ise bu yolla oluşan oksidasyon ürünü metabolitlerin vücutta oluşanlarla her zaman aynı olmaması, yani bu yolla üretilen metabolitlerin “biyolojik” ya da “fiziyojik uygunluk” sorunlarıdır.

Bu tez çalışmasında biyolojik olmayan yol olarak elektrokimyasal oksidasyon tekniğini kullanarak seçtiğimiz ilaçların metabolitlerinin üretilmesi ve bu metabolitlerin biyolojik uygunluklarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla parasetamol, klozapin ve olanzapin molekülleri hem elektrokimyasal yöntemle, hem de mikrozomal inkübasyonlar yoluyla metabolitlerine dönüştürülmüş, oluşan metabolitlerin kimyasal yapıları LC tandem MS tekniği ile doğrulandı ve birbirleri

ile kıyaslanmıştır. Çalışmada klozapin ve olanzapinin hem reaktif, hem de stabil metabolitleri her iki yolla da oluşturulmuştur. Parasetamolün sadece reaktif metabolitinin elde edilmesi planlanmış ve bu sonuca ulaşılmıştır.

1.1. GENEL BİLGİLER

İlaç geliştirme çalışmalarında ilacın vücuda girdikten sonra geçireceği enzimatik dönüşüm sonucu oluşturacağı metabolitlerin nitelik ve niceliklerinin belirlenmesi gerekir. Bunun hem ilaç etkinliğinin süresi, plazma pik konsantrasyonu, yarılanma süresi ve vücutta kalış süresinin belirlenmesi gibi kinetik amaçlarla yapılması gerekirken hem de ilaç etkisinden asıl sorumlu yapının (ana madde ya da metabolitler) bulunması, metabolik yolların belirlenmesi ve metabolitlerin olası toksik etkilerinin ortaya çıkarılabilmesi için dinamik amaçlarla da yapılması gerekir. İlaç adayı moleküllerin metabolik profili ve yollarını belirleyebilmek amacıyla çeşitli yöntemler vardır. Klinik öncesi faz çalışmalarında madde bir enzim kaynağı ile in vitro olarak gerekli koşullar altında inkübe edilir. İnkübasyon sonucunda oluşması muhtemel metabolitler çeşitli tekniklerle analiz edilerek yapıları belirlenmeye çalışılır (1). Enzim kaynağı olarak genellikle karaciğer dokusundan hazırlanan mikrozomal fraksiyon, S9 fraksiyonu ve sitozolik fraksiyon yanında karaciğer doku kesiti, primer hepatosit hattı ya da farklı hücre kültürleri kullanılabilir. Mikrozomal fraksiyon çok büyük oranda faz I enzimlerini içerdiğinden dolayı bu enzim kaynağının kullanılması durumunda faz I metabolitleri olan oksidasyon, redüksiyon ya da hidroliz ürünleri elde edilir. Sitosolik fraksiyon CYP450 enzimleri dışındaki oksidaz, redüktaz, esteraz ve diğer enzimleri içerir ve buna uygun metabolitleri üretir. S9 fraksiyonu ise hem mikrozomal hem de sitozolik fraksiyonu birlikte içerdiğinden dolayı faz I ve faz II metabolitleri birlikte elde edilebilir (1). Bir kimyasal molekülden oluşan metabolitlerin toksikolojik potansiyelinin ana yapıya göre artması olarak tanımlanabilecek biyoaktivasyon, büyük çoğunlukla faz I reaksiyonları sonucunda gerçekleştiği için bu çalışmalarda en çok mikrozomal fraksiyon kullanılır. Mikrozomal ya da diğer enzim kaynakları ile inkübasyonlardaki temel nokta, birim hacimdeki enzim miktarının mümkün olduğunca fazla olmasıdır. Bunun nedeni, üretilen metabolitlerin yapılarının tanımlanabilmesi için kullanılacak teknikler açısından belirli miktarların üzerinde olması gerekliliğidir. Örneğin nükleer manyetik rezonans tekniği için genellikle 1 mg/mL saf madde gerekmektedir. LC/MS için daha düşük madde yeterli olmakla

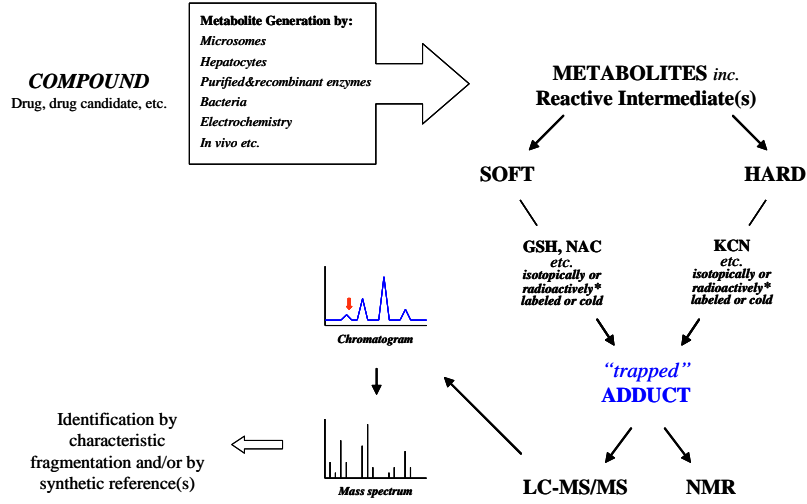
birlikte, bazı metabolitlerin doğası gereği toplam metabolitler içindeki oranlarının çok düşük olması, yani normal koşullarda çok az miktarda oluşmaları fark edilmemelerine ve gözden kaçırılmalarına neden olabilir. Bu güçlüğü aşabilmek amacıyla in vitro biyotransformasyon inkübasyonlarında ortama konan biyolojik materyal (mikrozom, sitozol, S9 fraksiyonu vb.) içinde enzim oranı olabildiğince yüksek tutulmaya çalışılır. Bunun klasik ve ekonomik yolu, bu materyallerin elde edildiği genellikle kemirici deney hayvanlarının (fare ya da sıçan) dokuları çıkarılmadan önce belirli sürelerle çeşitli enzim indükleyicilerle dozlanarak belirli enzimlerin gen ekspresyonu düzeyinde sentezlerini artırmak ve dolayısıyla dokularda enzim miktarını/oranını da artırmaktır. Bu amaçla genellikle fenobarbital ya da β -naftoflavon gibi P450 indükleyicileri kullanılır (2,3). İlaç endüstrisinde daha güçlü ve yaygın indüksiyon sağlayan poliklorlu bifenil karışımı olan Aroklor kullanılmaktadır (1).

Aroklor'un bu üstünlüğüne karşın yine de örneğin kimyasal yapı tanımlamasında NMR için gerekli en az 1 mg metabolit elde edilmesi, çok fazla miktarda mikrozom, ana molekül ve kofaktör kullanılmasını, uzun bir süreyi ve yoğun saflaştırma çalışmalarını gerektirir. Dolayısıyla hem ekonomik değildir, hem de pratik değildir. Bu nedenlerle geliştirilen alternatif yöntemler arasında bakterilere gen transferi yoluyla ya da enzim kodlayan genlerinde mutasyon yoluyla fazla miktarda metabolit üretirmek (4,5) hayvan ya da insan dokularından enzim saflaştırmak (1) ya da rekombinant teknolojilerle belirli enzimlerin üretilmesi ve saflaştırılması (1) sayılabilir.

Enzim indüksiyonu ya da yukarıdaki diğer teknikler sonucunda elde edilen biyolojik materyalin biyotransformasyon kapasitesi belirli enzimler açısından çok fazla artırılrsa da, saflaştırılmış enzimleri dışında tutarsak genel dezavantaj, istenen metabolitlerin yanında dokuda bulunan bir çok diğer maddenin analiz sırasında girişim yapması ve oluşması muhtemel metabolitlerin saptanmasını güçleştirmesi, bazen tamamen engellemesidir. Bu açıdan geliştirilen bir yöntem, CYP450 katalitik aktivitesi büyük oranda oksidasyona dayandığı için ilaç molekülünün oksidasyonunun, biyolojik bileşen bulunmayan ortamda tamamen kimyasal yolla gerçekleştirilip metabolitlerinin saf halde üretilmesidir (6,7). Bu konu özellikle son 20 yıldır çalışılmaktadır (1). Elektrokimyasal yöntemle madde oksidasyonu değişik şekillerde yapılabilmektedir, ilgili başlık altında daha fazla bilgi verilmiştir.

Elektrokimyasal yöntemle ilgili bir dezavantaj, oksidasyon ürünlerinin biyolojik ortamda oluşan ürünlerle her zaman birebir aynı olmamasıdır. Bu nedenle elektrokimyasal yöntemle üretilen ürünlerin biyolojik uygunluklarının paralel inkübasyonlarla doğrulanması gerekir. Biyolojik olarak oluştuğu doğrulanmaları tama yakın saf halde ve yüksek miktarda üretmek için EK yöntem kullanılabilir.

Bir bileşiğin biyotransformasyonu sonucunda başlıca iki farklı özellikte metabolit oluşur. Bunlar stabil metabolitler ve kimyasal açıdan reaktif metabolitlerdir (RM). Bu RM'ler kimyasal açıdan çok agresif oldukları için *in vivo* ortamda oluştuğları anda çevrelerinde bulunan diğer hücresel moleküllerle etkileşir ve onların yapılarını değiştirerek işlevlerini bozarlar. Deney tüpü içerisinde de oluştuğlarında ortamda bulunan protein ya da diğer yapılarla reaksiyona girerlerse kimyasal yapılarının belirlenmesi imkansız hale geleceğinden inkübasyon ortamına önceden eklenen ve yapısı bilinen nükleofilik maddelerle reaksiyona sokulup stabil hale getirilmeleri, yani "hapsedilmeleri" gerekir. Bu *in vitro* metabolit üretimi ve yapı belirlenmesi için gerekli olan bileşenler bir deney tüpü içinde faz 1 metabolitleri üretmeye yarayan bir sistem (mikrozom, S9, hepatosit, vb.), gerekli kofaktörler, ilaç etkin maddesi ve nükleofilik ajan olarak genellikle glutatyon (GSH) veya KCN'dir. Bu koşullarda ortamda ilaç molekülünden oluşan elektrofilik ara ürün, nükleofilik ajanla birleşir ve oluşan konjugatın kimyasal bileşimi MS ve/veya NMR teknikleri yardımı ile belirlenmeye çalışılır, bu süreç Şekil I.1'de özetlenmiştir (1).



Şekil I.1. Reaktif metabolitlerin *in vitro* üretim ve karakterizasyonu.

In vivo çalışmalarda şemadakinden farklı olarak radyoaktif işaretli ana molekül ya da hapsedici ajan kullanılır, hapsedilmiş metabolit sintilasyon sayımı gibi değişik tekniklerle analiz edilir (1).

I.1.1. In vitro reaktif metabolit üretme sistemleri

- 1) Konvansiyonel Sistemler
 - a. Mikrozomal fraksiyon
 - b. S9 Fraksiyonu
- 2) Hepatositler
- 3) Biyolojik Olmayan Sistem: Elektrokimya

I.1.1.1. Konvansiyonel Sistemler: Mikrozomlar ve S9 Fraksiyonları

Mikrozomlar, karaciğerden elde edilen CYP450 enzimlerini içeren hücrelerdir. İnsan dokusu kökenli mikrozomlarla inkübasyonları yönetmek en iyi yöntem olarak görülmektedir. Sıçanlardan elde edilen mikrozomlar ile insanlardan elde edilen mikrozomlar birbirine çok benzerdir. Bundan dolayı sıçan dokularından elde edilen mikrozomlarda, biyotransformasyon enzimlerini önceden iyi bilinen CYP450 indükleyicileri tarafından indüklemek mümkündür.

En çok kullanılan indükleyici ajan fenobarbital (FB)'dir. FB, periton içine genellikle art arda 3-4 gün, mikrozom ya da eksizyon organ içeriğinden önce verilir. Daha az kullanılan diğer ajanlar 3-metilkolanteren ve β -naftoflavon'dur (1). Mikrozomlar, sadece faz 1 metabolitleri gerektiğinde kullanılırlar. Bu *in vitro* reaksiyonların gerçekleşmesi için, NADPH gibi bir elektron kaynağının yanı sıra glukoz-6-fosfat/glukoz-6-fosfat dehidrogenaz çifti gibi NADP'nin NADPH'a

dönüşümünü sağlayarak elektronların ekonomik kullanımını sağlayan bir sistem de kullanılabilir (8).

S9 fraksiyonu, mikrozom elde edilirken düz endoplazmik retikulum (SER) parçacıkları elde edilmeden önce hücre lizatına 9.000 *xg* santrifüj uygulanmasıyla elde edilen fraksiyondur. Dolayısıyla hem mikrozomal (SER), hem de sitozolik fraksiyonu içerir. Mikrozom ve S9 fraksiyonu arasındaki fark, yapılarındaki membrana bağlı biyotransformasyon enzimlerinin içerdiği P450 enzim yüzdesinin farklılığı ve S9 fraksiyonun mikrozomal enzimler yanında çözünebilir sitozolik enzimler içermesidir.

I.1.1.2. Hepatositler

Primer kültürü yapılmış hepatositler, *in vitro* biyotransformasyon çalışmalarında kullanılır. Fizyolojik olarak zengin enzim kombinasyonlarını içerirler. Ancak mikrozomlar, S9 fraksiyonu ya da saflaştırılmış enzimlerle karşılaştırıldığında bütün hücre özelliklerinden dolayı biyolojik duruma daha yakın olmalarına karşın inkübasyon ortamında P450 aktivitesi 36 saat sonra azalır. Diğer yandan CYP2B6, 2C9, 2C19, 2E1 gibi izozimlerin aktivitesi, ilk 4. saatte yükselir. Bu olay izole hepatositlerdeki organizma içi etkileşim yetersizliğinden kaynaklanmaktadır (9).

I.1.1.3. Biyolojik olmayan sistem: Elektrokimya

Maddelerin elektriksel davranışlarını ve elektrik enerjisi ile kimyasal tepkimeler arasındaki ilişkileri inceleyen bilim dalına elektrokimya, maddelerin elektrokimyasal özelliklerini analiz amacıyla kullanan yöntemlere de elektrokimyasal yöntemler denir (10). Maddeye negatif veya pozitif potansiyel uygulandığı zaman elektron transferi maddenin redüksiyonuna ya da oksidasyonuna neden olur. Potansiyel değerler dışarıdan kontrol edilebildiği sürece, redoks işlemleri dikkatli bir şekilde seçilebilir. Bu şekilde herhangi bir bileşiğin, organik/inorganik içerikli ilaçların, biyomoleküllerin ve metabolitlerin redoks hareketlerini kontrollü çalışabilmek, elektrokimyayı çok kullanışlı bir çalışma yöntemi haline getirir (11). Dolayısıyla farmasötiklerin geliştirilme sürecinde, olası metabolitlerin erken safhada belirlenebilmesi ve tanımlanabilmesi için on-line EK/MS yöntemi oldukça uygun bir uygulamadır.

EK sonuçları insan karaciğerindeki durumla birebir örtüşmediği halde, farmasötiklerin insan vücudundaki metabolizmasına dair ilk ipuçlarını vermektedir. Tandem MS'de benzer fragmentler veren farklı izomer yapılarının oluşumu ya da

oksidasyon ürünlerinin polaritesiyle ilgili önemli bilgilere sadece EK/MS ile ulaşmak mümkün olmadığından; oksidasyon ürünlerinin doğasıyla ilgili daha fazla bilgi elde edebilmek için EK LC/MS ile birlikte kullanılmalıdır. Faz I reaksiyonu sonucu oluşan farklı oksidasyon ürünleri ve faz II GSH konjugatları EK'yle oluşturulup, LC'yle ayrılıp tandem MS'le de tanımlanmaktadır (12).

I.1.1.3.1. Açık Sistem: Üçlü Elektrot Sistemi

Ölçümler çoğunlukla ilgili bileşikler ve destekleyici elektrolit içeren solüsyona daldırılmış elektrotlardan oluşan üçlü elektrot sistem kullanılarak, elektrokimyasal hücrede yapılmaktadır. Bu üç elektrot potansiyostata bağlıdır ve sonuçlar da bilgisayara kaydedilir (13).

Üçlü elektrot sistemindeki elektrotlar:

1. Çalışma elektrotu
2. Referans elektrot
3. Yardımcı elektrot

• **Çalışma elektrodu:** Zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişen, yüzeyinde analitin yükselttiği veya indirindiği mikro elektrotlardır.

• **Referans elektrot:** Elektrokimyasal uygulamalar sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyen, sabit kalan ve çalışılan çözelti bileşimine duyarlı olan elektrotlardır.

• **Yardımcı elektrot:** Karşıt elektrot olarak da adlandırılır. Bir elektrokimyasal hücrede çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli olan potansiyel önemli bir düzeye çıkar. Ayrıca, iki elektrotlu sistemlerdeki polarlanmayan elektrot üzerinden akım geçtiği için, yüksek akımlarda bu elektrotlar da polarlanır. Bu nedenlerden dolayı çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyeli hatalı algılanır. Bu sorun sistemde üçüncü bir elektrot kullanılarak çözümlenir (14).

Bu yöntemde kullanılan teknikler lineer süpürme, difransiyel atım, siklik voltametri, kronoamperometri, kronokalorimetri ve kütle elektrolizini içermektedir. Bütün bu teknikler, bileşiklerin merkezi hakkında ve onların redoks süreci hakkında önemli bilgiler vermektedir. Fakat voltametrik ve elektroanalitik yöntemler; elektroaktif ilaçlar, onların metabolitleri ve biyomoleküllerle metabolit etkileşimleri ile ilgili çalışmalara daha uygundur (11).

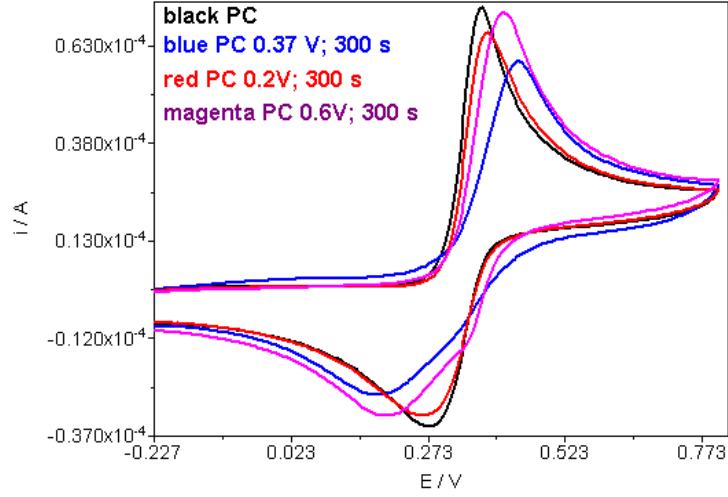
I.1.1.3.1.1. Voltametri

Bir indikatör ya da çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanarak, analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik yöntem verilen isimdir. Tam derişim polarizasyonu şartlarında bir elektrokimyasal hücrede oluşan akımın ölçülmesine dayanır (10). Uygulanan potansiyele göre, çözelti hacmi değişmeden kalırken çalışmada kullanılan analit/ilaç elektrot yüzeyinde yükseltgenir ya da indirgenir (11).

I.1.1.3.1.1.1. Döngüsel Voltametri (Siklik Voltametri; SV)

Döngüsel voltametri, elektrokimyasal redüksiyon süresince maddenin özelliklerinin ve ürün hareketlerinin çalışması için çok faydalıdır. Bu tekniğin uygulanabilirliği çoğunlukla uygulanan potansiyel seviyedeki elektroaktif bileşiklerin sayısına bağlıdır. Döngüsel voltametrideki önemli bir nokta, deneylerin oranının iyi ayarlanabilmesi ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir olmasıdır. Ayrıca kısa yarı ömürlü kimyasal yapılarla çalışma imkanı da sağlar (11). Nicel amaçla kullanımı seyrek olmakla beraber yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarının incelenmesinde, reaksiyon ara ürünlerinin gözlenmesinde ve elektrotlarda oluşan ürünlerin oluşum sonrası reaksiyonlarını yakalamada çok yaygın olarak uygulanabilmektedir. SV yönteminde uygulanan potansiyel önce bir yönde, sonra ters yönde taranırken akım ölçülür. Bir SV deneyinde tek bir tam döngü, bir yarım döngü veya birçok döngüler kullanılabilir.

Bir SV deneyinde, küçük boyutlu durgun bir elektrodun durgun bir çözeltide Şekil I.2.'de görülene benzer dalga formuna sahip bir potansiyel değişimi uygulanarak, bir akım sinyali vermesi sağlanır. Üçgen dalga formu, ileri ve bunun tersi yöndeki potansiyel taramasını temsil eder (10).



Şekil I.2. Döngüsel voltametri aracılığıyla tersinir bir elektron transferi ile gerçekleşen reaksiyonun SV'si.

I.1.1.3.2.Kapalı Sistem: Koruyucu Hücre ve Analitik Hücre (Guard Cell; Analytic Cell)

Kapalı sistem hücre çeşitleri;

- **Koruyucu Hücre (5020)**: Mobil fazdan gelebilecek olan elektroaktif kirliliklerin enjektör, kolon ve analitik hücreye gelmeden uzaklaşmasını sağlar.
- **Analitik Hücre (5010); (Stnd)**: Uzun süreli stabilite, tekrarlanabilirlik, işlemin uzun periyotlarla olmasına izin verir.
- **Analitik Hücre (5011)**: En yüksek duyarlılık, seçicilik ve stabiliteye sahiptir (15).

Koruyucu hücre ile yapılan çalışmada, elektrokimyasal oksidasyonlar **ESA Coulochem II elektrokimyasal koruyucu hücrede (Model 5020)** gerçekleşmektedir. Model 5020'de çalışma elektrodu cam karbon elektrot; yardımcı elektrot Pd (palladyum) elektrot; referans elektrot Pd/H₂ elektrottur. Bu çalışmada saptanan bütün potansiyeller için referans elektrot baz alınır. Çalışma elektrodunu korumak için hücrenin girişine sıralı PEEK filtre yerleştirilmektedir (16).

Analitik hücre ile yapılan çalışmada, elektrokimyasal oksidasyonlar **ESA Coulochem II elektrokimyasal analitik hücrede (Model 5011)** gerçekleşmektedir. Poröz grafit çalışma elektrodu, Pd yardımcı elektrot ve Pd/H₂ referans elektrot kullanılır. Hücre ESA Coulochem potentiostat (Model 5100 A, ESA Bioscience, Inc.) tarafından kontrol edilmektedir (17).

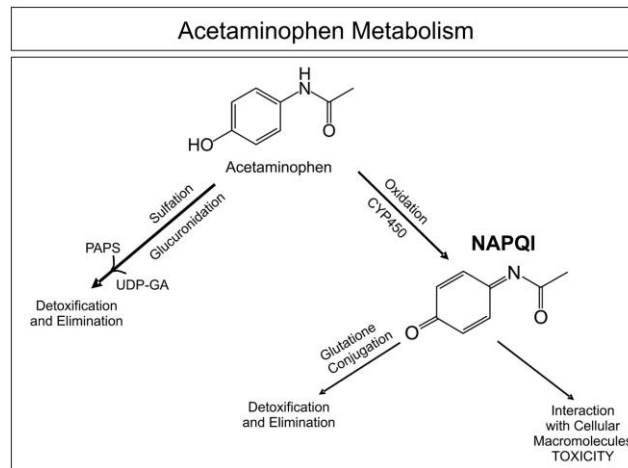
I.1.2. Elektrokimyasal Yöntem Kullanmanın Avantajları

1. Reaktif metabolitlerin üretiminde basit bir kurulumla sahip olması,
2. Tüm stabil ve kısa yarı ömürlü metabolitlerin hızlı bir şekilde üretilmesi ve doğrudan tanımlanmasına olanak sağlaması,
3. Laboratuvar hayvanları ve organ ekstraktlarına gerek olmaması, (6,7)
4. Yüksek saflıkta ve miktarda metabolit oluşumuna imkan sağlaması.(18).

I.1.3. PARASETAMOL (PAR)

Parasetamol (asetaminofen), analjezik ve antipiretik bir ilaçtır. Ateşin düşürülmesi, baş ağrısı ve diğer minör ağrıların tedavisinde kullanılır. Ayrıca, metabolit-biyomolekül etkileşimleri üzerine en çok çalışılan ilaçtır.

Parasetamolün oksidatif metabolik yolağında oluşan NAPQI'in insan karaciğerinde toksisite oluşturduğu iyi bilinmektedir. Bu metabolit normal koşullarda vücutta GSH ile konjugasyon sonucunda detoksifiye edilir. Fakat parasetamolün doz aşımı durumunda karaciğerde GSH tükenir. Parasetamol ya da metabolitin GSH veya N-asetilsistein (Nac) konjugatını belirlemek ve parasetamolün detoksifikasyon yollarını çalışmak için EK-MS ve EK-LC-MS çok kullanılmaktadır (11). Şekil I.3'te parasetamol'ün metabolizma basamakları gösterilmiştir.



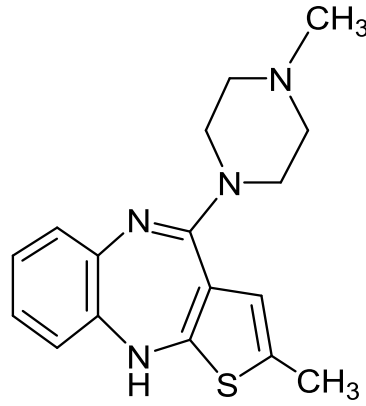
Şekil I.3. Parasetamol metabolizması.

Parasetamolün elektroaktif bir molekül olduğu bilindiğinden ve sistematik olarak elektrokimyasal oksidasyon mekanizması çalışıldığından dolayı, ilk aşamadaki metabolizma çalışmaları için on-line EK/MS'in önemli bir yöntem olduğu düşünülmüştür (12).

I.1.4.OLANZAPİN (OLA)

Şizofreni, Amerika'da popülasyonun yaklaşık %1'ini etkileyen kronik bir psikiyatrik akıl hastalığıdır (19). Dünya çapındaki psikiyatrik bozuklukların önde gelen sebepleri arasında yer alan depresif bozukluklar, kadınların %25'ini erkeklerinse %12'sini etkilemektedir (20).

İkinci jenerasyon antipsikotikler arasında yer alan olanzapin şizofreni hastalarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (21).



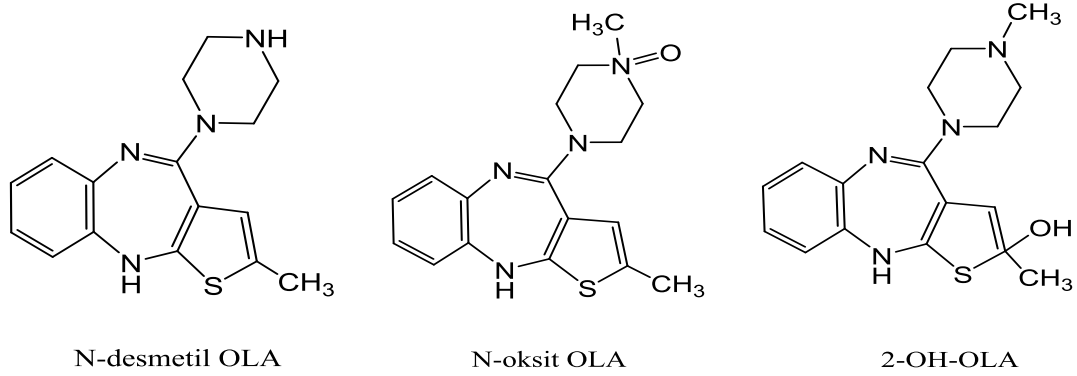
Şekil I.4. Olanzapinin kimyasal yapısı (22).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) olanzapini bipolar bozuklukların direnme gücü tedavisinde, manik ya da karışık epizodların akut tedavisinde ve şizofreni tedavisinde kullanılmak amacıyla onaylamıştır. Yeni yapılan bir çalışmaya göre, diğer atipik antipsikotiklerle kıyaslandığında OLA kullanan hastaların çeşitli metabolik bozukluklar geliştirme eğiliminde olduğu bildirildiği halde (23); ekstrapiramidal yan etkileri düşük olan bir nöroleptik olarak satılmaktadır (24).

Birinci jenerasyon antipsikotiklerle kıyaslandığında ikinci jenerasyondakiler, negatif semptomlar üzerindeki etkinlikleriyle tedaviye büyük ölçüde yanıt geliştirmişlerdir (25,26). OLA için plazmada olması gereken terapötik referans aralığı (20–80 ng/ml) olarak ileri sürülmüştür (27).

Oral uygulamayı takiben OLA'nın %57'si metabolitleri şeklinde atılır. OLA esas olarak 10-N-glukronid, 4'-N-desmetilolanzapin (DMO) ve olanzapin-N-okside metabolize olur; bu metabolizasyonda sırasıyla üridin difosfo glukronozil transferaz (UGT) 1A4, sitokrom CYP 1A2 izoenzimleri ve flavin içerikli monooksijenaz enzimleri yer alır (28).

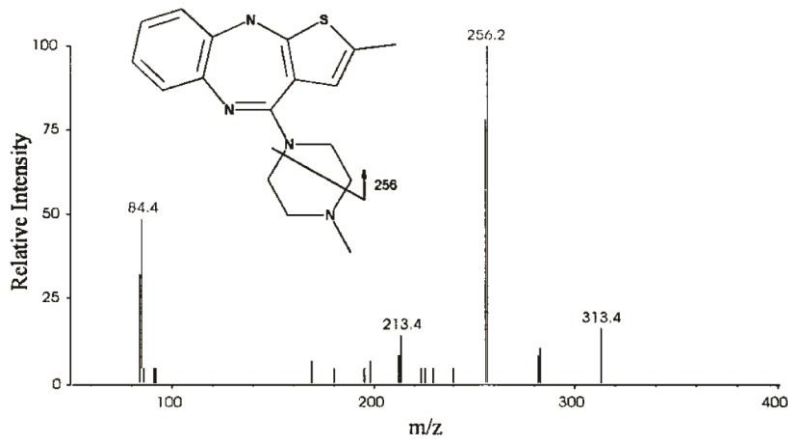
OLA biyotransformasyonu; insan plazmasında N-glukuronid, 2-hidroksi, N-oksit, N-desmetil ve 2-karboksilik asit türevlerini gösteren Kassahun ve arkadaşları, tarafından araştırılmıştır (29).



Şekil I.5. Olanzapin metabolitlerine ait kimyasal yapılar (22).

Olanzapin metabolizması insan karaciğer dokusuyla yapılan inkübasyonlarla araştırılmış ve bilinen faz 1 metabolitleri N-desmetil-, 2-hidroksimetil-, 4'N-oksidin yanı sıra yeni bir hidroksillenmiş tür saptanmıştır.

Tespit edilen faz 2 metabolitleri ise; bilinen N-10-glukuronidleri, dördüncül glukuronid ve yeni bir glukronid konjugatını içermektedir. Yapılan bu inkübasyon çalışmasıyla, ileri çalışmalar için olanzapin glukronidlerinin yeterli miktarda üretilebilmesinde insan karaciğer doku örneklerinin kullanımındaki fizibilite gösterilmiştir (22).

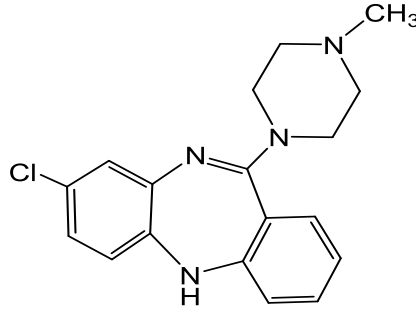


Şekil I.6.: Olanzapine ait parçalanma ürününün kütle spektrumu (22).

I.1.5.KLOZAPİN (KLZ)

Klozapin, diğer nöroleptiklere göre birkaç ekstrapiramidal advers etkiye sebep olan atipikal bir antipsikotik ilaçtır (30-32).

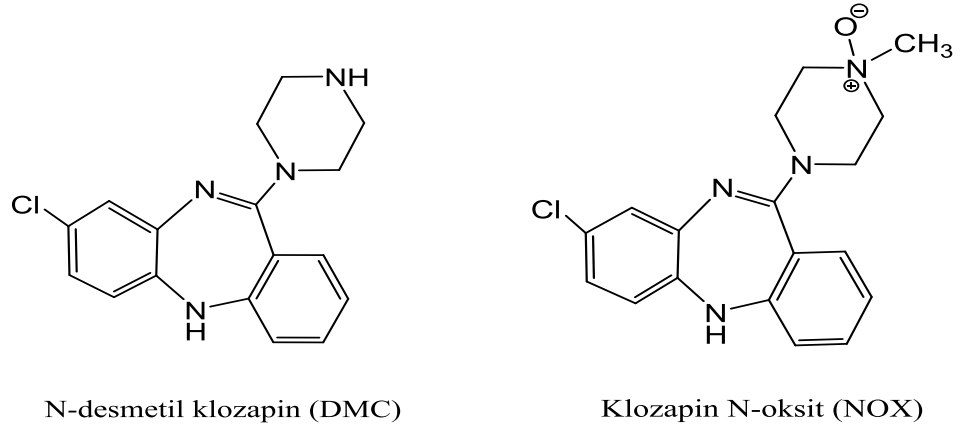
Ciddi agranülositoz riskinden dolayı, sadece diğer nöroleptik ilaçlara cevap vermeyen şizofreni hastalarına önerilir (31, 32). Agranülositozdan sonra, hastaların %37'sinde hafif derecede hepatotoksisite oluşurken %0,06'sında bu durum karaciğer yetmezliğine kadar gidebilmektedir (33).



Şekil I.7. Klozapinin kimyasal yapısı (34).

Tam mekanizması henüz bilinmemekle birlikte klozapinin reaktif metabolitlerinin karaciğerde CYP450 aracılığıyla, ve nötrofillerde ise miyeloperoksidazlar (MPO) aracılığıyla oluştuğu düşünülmektedir.(33-38).

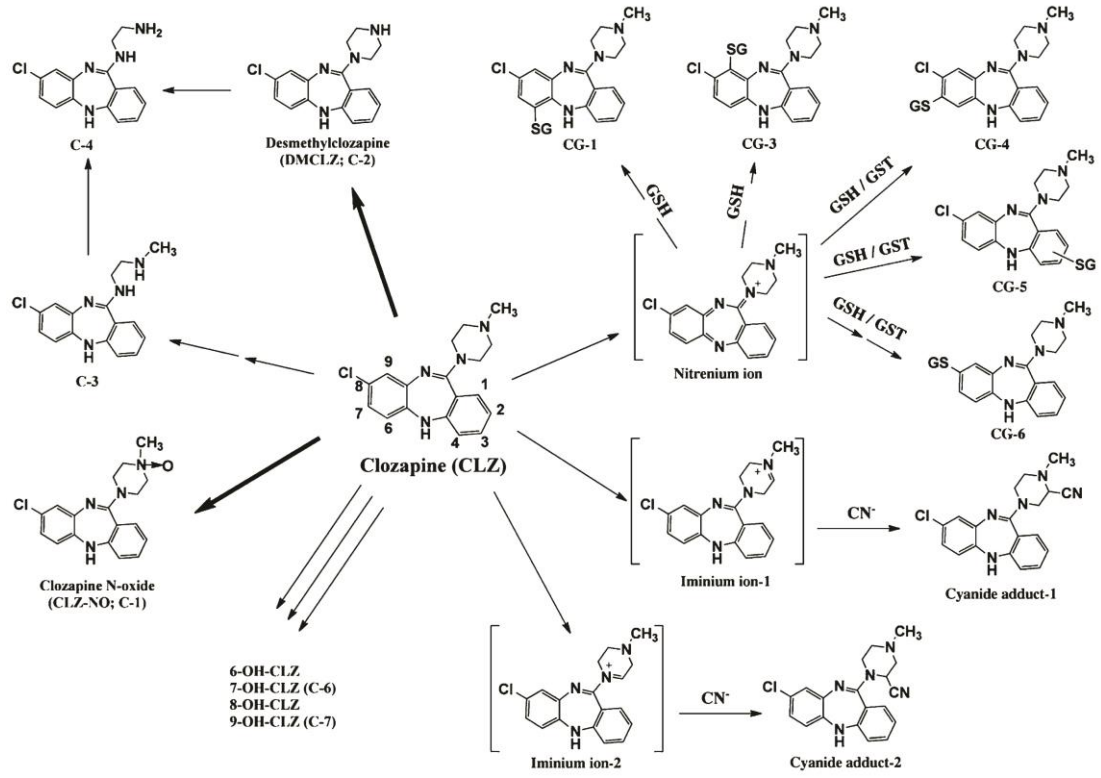
Klozapin kullanan hastalardan alınan serum ve idrar örneklerinin analiziyle ve insan karaciğer mikrozomları kullanılarak yapılan birçok in vitro çalışma sonucunda klozapinin CYP enzimleriyle yüksek oranda metabolize olarak farklı ürünlere dönüştüğü gösterilmiştir. İdrar ve serumdaki başlıca metabolitlerin N-demetilasyon, N-oksidasyon ve aromatik halka hidrosilasyonundan kaynaklandığı görülmüştür (39-41).



Şekil I.8. Klozapin N-oksit ve N-desmetilklozapin metabolitlerinin kimyasal yapıları (34).

Birçok çalışma, KLZ'nin HLM (Human Liver Microsome-insan karaciğer mikrozomu) ile reaktif nitrenyum iyonuna dönüştüğünü göstermiştir (37-45). Ayrıca, KLZ-NO, DMKLZ ve KLZ yapısındaki piperazin halkasının dehidrojenasyonu (-H) sonucu reaktif iminyum iyonları da oluşmaktadır (45-48).

Oluşan bu reaktif ara ürünlerin belirlenmesinde güçlü elektrofilik yapıları tutabilme özelliğine sahip olan GSH, CN⁻ gibi hapsedici ajanlar kullanılmaktadır (49).



Şekil I.9. İnsan karaciğer mikrozoamlarıyla (HLM) KLZ'in oksidatif biyotransformasyonu (49).

BÖLÜM II

II.1. MATERYAL VE YÖNTEM

II.1.1. MATERYAL

II.1.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde

Asetonitril (ACN)

Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)

Etanol (EtOH)

Formik Asit

G6P (Glukoz-6-fosfat)

G6PDH (Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz)

Glutatyon (GSH- İndirgenmiş Form)

Klozapin (KLZ)

L-Sistein (L-Cys)

Metanol (MeOH)

Mikrozom

NADPH

N-Asetilsistein (Nac)

Olanzapin (OLA)

Parasetamol (PAR)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)

Potasyum Siyanür (KCN)

S9 Fraksiyonu

Sitozolik Fraksiyon

Susuz Magnezyum Klorür ($MgCl_2$)

Firma Adı

Sigma 34870

AppliChem A-3006

AppliChem A-2945

Merck 100986

Sigma 27001

A-3789

G-8404

Sigma G-4251

Abdi İbrahim

Sigma C-7880

Merck 106018

Tarafımızdan hazırlandı (2012)

A-1395

Sigma A-8199

Abdi İbrahim

96/8045-9601021

AppliChem A-2946

Riedel-De Haenag-067103

Tarafımızdan hazırlandı (2012)

Tarafımızdan hazırlandı (2012)

M-8266

II.1.1.2. Kullanılan Materyaller

Makine ve Teçhizat

HPLC

LC-MS/MS

pH Metre

Santrifüj

Elektrokimyasal Detektö

Elektrokimyasal Hücreler

Vorteks

Manyetik karıştırıcı

Su Banyosu

Evaporatör

Su arıtma cihazı

Saf Su Cihazı (FABAL)

Thermo Shaker (FABAL)

Derin Dondurucu (-86°C)

Buzdolabı

Liyofilizatör (FABAL)

Ultrasonik Banyo

Hassas Terazı

Hassas Terazı (FABAL)

Buz Makinesi

Otomatik mikropipet

Çeker ocak

Firma Adı

Agilent

Thermo Scientific TSQ Quantum

Access Max

Hanna Instruments HI 221

Thermo Scientific CL31R

Multispeed Centrifuge

ESA Coulochem II

ESAAAnalytic Cell 5011 ;

ESA Guard Cell 5020

Velp Scientifica Nüve NM 110

Velp Scientifica 2x³

Velp Scientifica 100162

Wisestir MSH-20A

Nüve-BM 302

Heidolph Laborota 4000 efficient

Millipore Direct Q

ELGA PureLab Classic UV

BOECO Germany, TS-100

New Brunswick Scientific U 410

Premium

Arçelik

Labconco Free Zone 6

Elma Transsonic T460IH

Sartorius GP1200P

Denver Instrument TB 215D

Hoshizaki

Eppendorf, Gilson

Shinsaeng Fumehood

II.1.1.3. Kullanılan Çözeltiler

II.1.1.3.1. Elektrokimyasal Yöntemde Kullanılan Çözeltiler

Ortam: 100 mM Potasyum fosfat tamponu pH:7.40

25 -500 μ M PAR	(Üçlü Elektrot Sisteminde) (Elektrokimyasal Hücre Sisteminde)
25-100 μ M OLA	(Elektrokimyasal Hücre Sisteminde)
100 μ M KLZ	(Elektrokimyasal Hücre Sisteminde)
5-62.5 mM GSH	(Üçlü Elektrot Sisteminde) (Elektrokimyasal Hücre Sisteminde)
62.5 mM Nac	(Elektrokimyasal Hücre Sisteminde)
62.5 mM L-Cys	(Elektrokimyasal Hücre Sisteminde)
62.5 mM KCN	(Elektrokimyasal Hücre Sisteminde)

II.1.1.3.2. Mikrozomal İnkübasyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Ortam: 100 mM Potasyum fosfat tamponu ($MgCl_2$ içeren) pH: 7.40

İnkübasyon ortamının hacmi: 250 μ l

20-100 μ M OLA
100 μ M KLZ
5mM GSH
5mM Nac
5mM L-Cys
1 mM NADPH
1 U/mL G6PDH
1mg/mL Mikrozom
1mg/mL S9 fraksiyonu
1mg/mL Sitozolik fraksiyon

II.1.2. YÖNTEMLER

II.1.2.1. DENEYSEL YÖNTEMLER

II.1.2.1.1 ELEKTROKİMYASAL (EK) YÖNTEM

II.1.2.1.1.1. Açık Sistem: Üçlü Elektrot Sistemi

Ölçümler çoğunlukla ilgili bileşikler ve destekleyici elektrolit içeren çözeltiye daldırılmış elektrotlardan oluşan üçlü elektrot sistem kullanılarak, elektrokimyasal hücrede yapılmıştır. Bu üç elektrot potentiostata bağlıdır. Sonuçlar da bilgisayara kaydedilir (13).

Üçlü elektrot sistemindeki elektrotlar:

4. Çalışma elektrodu
5. Referans elektrot
6. Yardımcı elektrot

Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot; çalışma elektrodu olarak kalem grafit karbon (Pencil Grafit Electrode) ve yardımcı elektrot olarak platin tel kullanılmıştır.

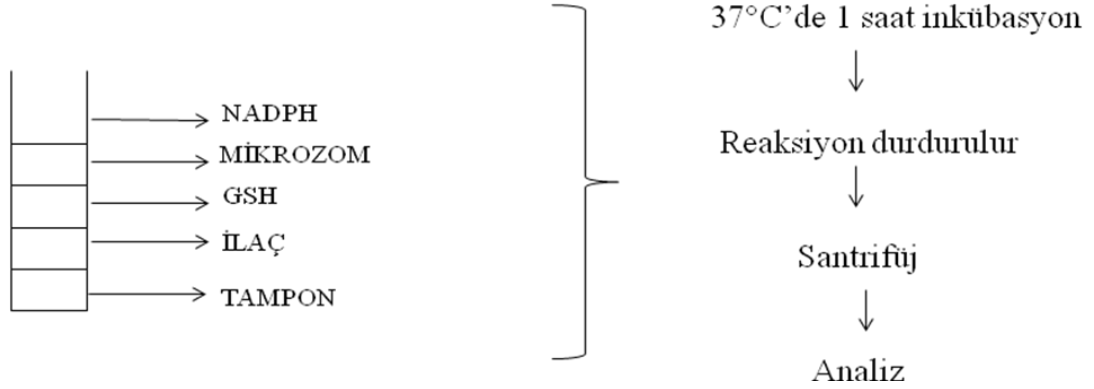
II.1.2.1.1.2. Kapalı Sistem: Çevrim-içi Koruyucu Hücre ve Analitik Hücre

Kapalı sistem adı altında elektrokimyasal hücrelerle gerçekleştirilen çalışmada, ilaç çözeltisinin hücreye girişi HPLC pompasıyla sağlanmış olup hücre çıkışından okside olan ilaç çözeltisi hapsedici ajan olarak kullandığımız GSH çözeltisi içine toplanmıştır.



Şekil II.1: Kapalı sistem elektrokimya hücrelerinden analitik hücre 5010 modeli

II.1.2.1.2. BİYOLOJİK OKSİDASYON (Mikrozomal İnkübasyon) YÖNTEMİ



Yapılan inkübasyonlar şematik olarak yukarıda gösterilmiştir. Maddelerin tüplere konuluş sırası aşağıdan yukarıya doğrudur.

II.1.2.2. ANALİZ YÖNTEMLERİ

II.1.2.2.1. PARASETAMOL ÇALIŞMALARI

II.1.2.2.1.1. Parasetamol Üçlü Elektrot Sistemi (Açık Sistem) Çalışmaları

Fosfat Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması:

100 mM 500 ml (pH: 7.40) fosfat tamponu hazırlamak için 400 ml 100 mM bazik dipotasyum fosfat (K_2HPO_4) çözeltisi ve 150 ml 100 mM asidik potasyum dihidrojen fosfat (H_2PO_4) çözeltisi karıştırıldı. Asidik olan çözelti, bazik üzerine eklenirken 80 ml'den başlanarak pH: 7.40 olana kadar devam edildi.

İlk önce süre tutulmadan PAR'ın hangi potansiyelde okside olduğunu görmek için direkt ölçüm yapılarak potansiyel uygulanmadan SV'si alınmıştır. Ölçüm sonucu optimum voltaj 0.37 V çıkınca, çözeltinin o potansiyelde yükseltgenme durumunu kontrol etmek için 0.37 V'luk potansiyelin süre tutularak uygulanmasına karar verilmiştir. Farklı potansiyelerde dört deneme yapılmıştır. Ölçümler sonunda HPLC analizi için örnekler alınmıştır.

Benzer şekilde, GSH çözeltisi ile yapılan çalışmada da ilk önce süre tutulmadan GSH'ın hangi potansiyelde okside olduğunu görmek için potansiyel uygulanmadan SV'si alınmıştır.

Ardından GSH konsantrasyonunun oluşan konjugat miktarına etkisi incelenmiştir.

50 mM PAR stok çözeltisinden 0.5 mM PAR çözeltisi ve 100 mM GSH stok çözeltisinden 3 mM GSH çözeltisi hazırlamak için gerekli hesaplamalar yapılarak deney için gereken çözeltiler hazırlanıp 0.37 V potansiyelde 300 sn denemesi yapılmıştır. HPLC analizi için örnekler alınmıştır.

Voltaj potansiyellerinin oluşan konjugat miktarına etkisi incelenmiştir:

0.5 mM PAR ve 5 mM GSH çözeltisi için 0.2, 0.37 ve 0.6 V voltaj potansiyelleri 300 sn süreyle uygulanarak denemeler yapılmıştır ve deneylerin tekrarlanabilirliği kontrol edilmiştir.

Bunun için 3, 5, 7 ve 10 mM GSH konsantrasyonlarında dublike ve triplike çalışmalar yapıp HPLC analizi yapılmıştır.

Son olarak değişen GSH konsantrasyonlarıyla voltaj potansiyeli ve uygulanan sürenin kontrolü için örnekler hazırlanmıştır:

0.5 mM PAR çözeltisi ile 3, 5, 7 ve 10 mM GSH çözeltileri ayrı ayrı 100, 200 ve 300 sn oksidasyona tabii tutularak her 100 saniyede bir örnek alınmış, en son 3 SV sonrasında da örnek alınarak HPLC ile analiz edilmiştir.

Analizi koşulları aşağıdaki gibidir;

Mobil Fazlar

Mobil Faz A: %99 d.su %1ACN %0.2 Formik asit

Mobil Faz B: %99ACN %1 d.su %0.2 Formik asit

Gradiyenti -1;

0 min → %0 B

5 min → %0 B

30 min → %100 B

35 min → %0 B

40 min → %0 B

Gradiyenti -2 ;

0 min → %0 B

3 min → %0 B

20 min → %100 B

22 min → %0 B

25 min → %0 B

Kolon-1; Waters, Symmetry Shield RP18, 3.5 µm 4.6x100 mm column

Kolon-2; Phenomenex, Inertsil, ODS-2 RP18, 5 µm 4.6x15 mm column

Enjeksiyon hacmi-1 : 100 µl

Enjeksiyon hacmi-2: 50 µl

Akış hızı: 0.7 ml/dk

UV deteksiyon: 254 nm

Kullanılan LC-MS/MS Yöntemleri

NAPQI-SG Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1

Tablo II.1. Açık sistem EK yönteminde NAPQI-SG konjugatı için kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
NAPQI-SG	457	328, 382	20

LC-MS/MS' de izlenen reaksiyonlar;

NAPQI-SG konjugatı [M+H]⁺: 457 için parçalanma ürünleri: 328 ve 382

II.1.2.2.1.2.Parasetamol Çemvim-içi Elektrokimyasal Hücre (Kapalı Sistem) Çalışmaları

II.1.2.2.1.2.1.Farklı voltaj potansiyellerinin NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisinin incelenmesi

Voltaj şiddetinin oksidatif metabolit oluşumuna etkisini incelemek amacıyla, analitik hücrede pH: 7.40'te 62.5 mM GSH ile 200, 400, 600, 800 ve 1200 mV potansiyel uygulanarak 25 µM PAR analitik hücreden geçirilmiş ve LC-MS/MS'de analiz edilmiştir.

II.1.2.2.1.2.2.Ortam pH değerinin NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisinin incelenmesi

62.5 mM GSH, pH: 6.50, 7.40 ve 8.50'te hazırlanan potasyum fosfat tamponlarında çözülmüştür. PAR çözeltisi (2 ml 25 µM) 50 µl/dk akış hızıyla pompalanarak 600 mV oksidasyon potansiyeli uygulanan analitik hücreden geçirilerek GSH çözeltisi içeren bir beher içerisinde toplanmış ve LC-MS/MS'de analiz edilmiştir.

II.1.2.2.1.2.3.GSH konsantrasyonunun NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisinin incelenmesi

Farklı GSH konsantrasyonlarının metabolit oluşumuna etkilerini incelemek amacıyla 10, 25, 62.5, 100 ve 250 mM GSH çözeltileri içerisinde analitik hücreden geçirilen PAR çözeltisi damlatılmış ve alınan örnekler LC-MS/MS'de analiz edilmiştir.

II.1.2.2.1.2.4. NAPQI'in GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması

600 mV potansiyel uygulayarak, parasetamolün GSH dışındaki nükleofilik bileşikler olan sistein (Cys) ve N-asetilsistein (Nac) ile de konjugatları oluşturuldu.

Analiz koşulları aşağıdaki gibidir;

Mobil Fazlar

Mobil Faz A: %99 d.su %1ACN %0.2 Formik asit

Mobil Faz B: %99 ACN %1 d.su %0.2 Formik asit

Gradyent Programı

0 min → %0 B

3 min → %0 B

20 min → %100 B

22 min → %0 B

25 min → %0 B

Kolon: Phenomenex, Inertsil, ODS-2 RP18, 5µm 4.6x15mm column

Enjeksiyon hacmi: 50 µl (HPLC)

Enjeksiyon hacmi: 25 µl (LC-MS/MS)

Akış hızı: 0.7 ml/dk

UV deteksiyon: 254 nm

Kullanılan LC-MS/MS Yöntemleri

NAPQI-SG Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1

NAPQI-SG konjugatı için m/z 457 olan moleküler iyonu aranmıştır.

Yöntem 2

Tablo II.2. Kapalı sistem EK yönteminde NAPQI-SG konjugatı için kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
NAPQI-SG	457	328, 382	20

NAPQI-Cys Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1

NAPQI-Cys konjugatı için m/z 271 olan moleküler iyonu taranmıştır.

Tablo II.3. EK-PAR konjugatı için kullanılan bütün SRM yöntemleri

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon enerjisi (V)
NAPQI-SG	457	382, 328	20

Kütle Spektrometresi Tune Ayarları ;

Tablo II.4. Parasetamol çalışmalarında kullanılan LC-MS/MS tune ayarları

Parametre ; (+) iyonizasyon	Total İyon Analizi (Tune 30 05 2013)	SRM Analizi (Tune 2013 03 11)
Spray Voltage	3000	3500
Vaporizer Temperature	350	350
Sheath Gas Pressure	60	60
Aux.Gas Pressure	20	12
Capillary Temperature	280	280
Capillary Offset	35	35

II.1.2.2.2.OLANZAPİN (OLA) ÇALIŞMALARI

II.1.2.2.2.1.Olanzapin Çevrim-İçi Elektrokimyasal Hücre Çalışmaları

600-1800 mV arası değişen potansiyel uygulamaları sonucunda olanzapin oksidasyonu için 600 mV'un uygulanmasına karar verilmiştir.

Analiz koşulları aşağıdaki gibidir;

Mobil Fazlar

Mobil Faz A: %99 d.su %1ACN %0.2 Formik asit

Mobil Faz B: %99ACN %1 d.su %0.2 Formik asit

Gradyent Programı

0 min → %0 B

3 min → %0 B

20 min → %100 B

22 min → %0 B

25 min → %0 B

Kolon: Phenomenex, Inertsil, ODS-2 RP18, 5 µm 4,6x15 mm column

Enjeksiyon hacmi: 50 µl (HPLC)

Enjeksiyon hacmi: 25 µl (LC-MS/MS)

Akış hızı: 0.7 ml/dk

UV deteksiyon: 254 nm (HPLC)

PDA deteksiyon: 254 nm (LC-MS/MS)

Kullanılan LC-MS/MS Yöntemleri

OLA-SG Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1

Tablo II.5. OLA-SG-EK konjugatı için kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
OLA-SG	618	489, 543	31

LC-MS/MS' de izlenen reaksiyonlar;

OLA-SG konjugatı $[M+H]^+$: 618 için parçalanma ürünleri: 489 ve 543

Yöntem 2

OLA-SG konjugatı için m/z 618 olan moleküler iyonu taranmıştır.

OLA-Nac Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1

OLA-Nac m/z 474 olan moleküler iyonu taranmıştır.

Yöntem 2

Tablo II.6. OLA-Nac-EK konjugatı için kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
OLA-Nac	474	84, 245, 254, 288 314, 345	31

LC-MS/MS' de izlenen reaksiyonlar (50)

OLA-Nac konjugatı $[M+H]^+$: 474 için parçalanma ürünleri: 84, 245, 254, 288, 314, 345

OLA-Cys. Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1

OLA-Cys konjugatı m/z 432 olan moleküler iyonu taranmıştır

Yöntem 2

Tablo II.7. OLA-Cys-EK konjugatı için kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
OLA-Cys	432	311, 343, 375	31

LC-MS/MS' de izlenen reaksiyonlar;

OLA-Cys konjugatı $[M+H]^+$: 432 için parçalanma ürünleri: 311, 343, 375
(Hipotetik olarak belirlediğimiz fragment

Tablo II.8. EK-OLA konjugatları için kullanılan bütün SRM yöntemleri

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon enerjisi (V)
OLA-SG	618	489, 543	31
OLA-Nac	474	84, 245, 254, 288, 314, 345	31
OLA-Cys	432	311, 343, 375	31

II.1.2.2.2. Olanzapin Sıçan Karaciğer Mikrozomlarıyla (RLM) İnkübasyon Çalışmaları

Çalışmalarımız 250 µl'lik inkübasyon hacminde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonlar genellikle Aro ile indüklenmiş sıçan karaciğer mikrozomlarıyla yapılmıştır.

Analiz koşulları aşağıdaki gibidir;

Mobil Fazlar

Mobil Faz A: %99 d.su %1 ACN %0.2 Formik asit

Mobil Faz B: %99 ACN %1 d.su %0.2 Formik asit

Gradyent Programı

0 min → %0 B

3 min → %0 B

20 min → %100 B

22 min → %0 B

25 min → %0 B

Kolon: Phenomenex, Inertsil, ODS-2 RP18, 5 µm 4,6x15 mm column

Enjeksiyon hacmi: 50 µl (HPLC)

Enjeksiyon hacmi: 25 µl (LC-MS/MS)

Akış hızı: 0.7 ml/dk

UV deteksiyon: 254 nm (HPLC)

PDA deteksiyon: 254 nm (LC-MS/MS)

KULLANILAN LC-MS/MS YÖNTEMLERİ

OLA-SG Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1 : Bu yöntemde full ve SRM analizleri aynı anda izlenmiştir. Bunun için yöntem kurulurken 2 tane scan event penceresi açılıp birine total iyon analizi koşulları girilirken diğerine de SRM koşulları girilmiştir. Total iyon ve SRM için koşullar aşağıdaki gibidir.

Tablo II.9: OLA-SG mikrozomal inkübasyonunda stabil metabolitlerin ve konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
OLA	313	256	31
N-desmetil OLA	299	198	31
2-OH-OLA	329	272	31
N-oksit-OLA	329	213	31
10-N-glukuronid	489	355	31
OLA-SG	618	489	31

LC-MS/MS’de izlenen reaksiyonlar (30)

OLA [M+H] ⁺ :	313→ 256.2
N-desmetil-OLA [M+H] ⁺ :	299→ 198.2
2-OH-OLA [M+H] ⁺ :	329→ 272.2
N-oksit-OLA [M+H] ⁺ :	329→ 213.2
10-N-glukuronid-OLA [M+H] ⁺ :	489→ 355.12
OLA-SG [M+H] ⁺ :	618→ 489
Total İyon Analizi :	[100.000-700.000 Da]

OLA-Nac Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1

Tablo II.10. OLA-Nac mikrozomal inkübasyonunda konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
OLA-Nac	474	254	31
OLA-Nac	474	288	31

LC-MS/MS' de izlenen reaksiyonlar (50)

OLA-Nac [M+H]⁺: 474 → 254

OLA-Nac [M+H]⁺: 474 → 288

OLA-Cys. Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1

Tablo II.11. OLA-Cys mikrozomal inkübasyonunda konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
OLA-Cys	432	311	31
OLA-Cys	432	375	31

LC-MS/MS' de izlenen reaksiyonlar;

OLA-Cys [M+H]⁺: 432 → 311

OLA-Cys [M+H]⁺: 432 → 375

Tablo II.12. OLA mikrozomal inkübasyon çalışmalarında kullanılan bütün SRM yöntemleri

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
OLA	313	256	31
N-desmetil OLA	299	198	31
2-OH-OLA	329	272	31
N-oksit-OLA	329	213	31
10-N-glukuronid	489	355	31
OLA-SG	618	489	31
OLA-Nac	474	254	31
OLA-Nac	474	288	31
OLA-Cys	432	311	31
OLA-Cys	432	375	31

Kütle Spektrometresi Tune Ayarları;

Tablo II.13. OLA çalışmalarında kullanılan LC-MS/MS tune ayarları

Parametre; (+) iyonizasyon	Total İyon Analizi (Tune_30 05 2013)	SRM Analizi (Tune_2013 03 11)
Spray Voltage	3000	3500
Vaporizer Temperature	350	350
Sheath Gas Pressure	60	60
Aux.Gas Pressure	20	12
Capillary Temperature	280	280
Capillary Offset	35	35

II.1.2.2.3. KLOZAPİN (KLZ) ÇALIŞMALARI

II.1.2.2.3.1. Klozapin Çevrim-içi Elektrokimyasal Hücre Çalışmaları

Kapalı sistemle gerçekleştirilen KLZ çalışmalarımızda ilacın sisteme verilışı HPLC pompasıyla gerçekleştirilmiştir.

Literatür araştırmaları sonucunda 400 mV (51) ve 600 mV (17) potansiyel uygulanmıştır. Metabolit çok reaktif olduğu için, diğer kapalı sistem çalışmalarından farklı olarak ilaç ve GSH analitik hücreden birlikte geçirilmiştir.

Analiz koşulları aşağıdaki gibidir;

Mobil Fazlar

Mobil Faz A: %99 d.su %1ACN %0.2 Formik asit

Mobil Faz B: %99 ACN %1 d.su %0.2 Formik asit

Gradyent Programı:

0 min → %0 B

3 min → %0 B

20 min → %100 B

22 min → %0 B

25 min → %0

Kolon: Phenomenex, Inertsil, ODS-2 RP18, 5 µm 4,6x15 mm column

Enjeksiyon hacmi: 25 µl (LC-MS/MS)

Akış hızı: 0.7 ml/dk

PDA deteksiyon: 254 nm (LC-MS/MS)

Kullanılan LC-MS/MS Yöntemleri

KLZ-SG Konjugatının Analizi İçin;

Yöntem 1

Tablo II.14. KLZ-SG-EK konjugatı için kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonlaşma Enerjisi (V)
KLZ	328	271	39
KLZ-SG	632	614	40
KLZ-SG	632	575	40
KLZ-SG	632	503	40
KLZ-SG	632	446	40
KLZ-SG	632	359	40
KLZ-SG	632	302	40

Yöntem 1 için LC-MS/MS' de izlenen reaksiyonlar (17)

KLZ [M+H]⁺: 328 → 271

KLZ-SG [M+H]⁺: 632 → 614

KLZ-SG [M+H]⁺: 632 → 575

KLZ-SG [M+H]⁺: 632 → 503

KLZ-SG [M+H]⁺: 632 → 446

KLZ-SG [M+H]⁺: 632 → 359

KLZ-SG [M+H]⁺: 632 → 302

Yöntem 2: Bu yöntemde total iyon analizi ve SRM yöntemleri aynı anda izlenmiştir. Bunun için yöntem kurulurken 2 tane scan event penceresi açılıp birine total iyon analiz koşulları girilirken diğerine de SRM koşulları girilmiştir. Analiz koşulları aşağıdaki gibidir.

Tablo II.15. KLZ-SG-EK çalışmasında stabil metabolitlerin ve konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünleri (m/z)	İyonlaşma Enerjisi (V)
KLZ	328	271	39
Nor-KLZ	313	192	52
Nor-KLZ	313	270	52
KLZ N-oksit	343	192	55
KLZ N-oksit	343	256	55
KLZ-SG	632	503	40
KLZ-SG	632	302	40

Yöntem 2 için LC-MS/MS' de izlenen reaksiyonlar

KLZ [M+H] ⁺ :	328→271
Nor-KLZ [M+H] ⁺ :	313→192
Nor-KLZ [M+H] ⁺ :	313→270
KLZ-N-oksit [M+H] ⁺ :	343→192
KLZ-N-oksit [M+H] ⁺ :	343→256
KLZ-SG [M+H] ⁺ :	632→503
KLZ-SG [M+H] ⁺ :	632→302
Total İyon Analizi:	[100.000-700.000 Da]

Tablo II.16. KLZ-SG-EK çalışmalarında kullanılan bütün SRM yöntemleri

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
KLZ	328	271	39
Nor-KLZ	313	192	52
Nor-KLZ	313	270	52
KLZ-N-oksit	343	192	55
KLZ-N-oksit	343	256	55
KLZ-SG	632	503	40
KLZ-SG	632	302	40
KLZ-SG	632	614	40
KLZ-SG	632	575	40
KLZ-SG	632	446	40
KLZ-SG	632	359	40

II.1.2.2.3.2. Klozapin Sıçan Karaciğer Mikrozoamlarıyla İnkübasyon Çalışmaları

Çalışmalarımız 250 µl'lik inkübasyon hacminde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonlar genellikle Aro ile indüklenmiş sıçan karaciğer mikrozoamlarıyla yapılmıştır.

Analiz koşulları aşağıdaki gibidir;

Mobil Fazlar

Mobil Faz A: %99 d.su %1 ACN %0.2 Formik asit

Mobil Faz B: %99 ACN %1 d.su %0.2 Formik asit

Gradyent Programı

0 min → %0 B

3 min → %0 B

20 min → %100 B

22 min → %0 B

25 min → %0 B

Kolon: Phenomenex, Inertsil, ODS-2 RP18, 5 µm 4,6x15 mm column

Enjeksiyon hacmi: 50 µl (HPLC)

Enjeksiyon hacmi: 25 µl (LC/MS-MS)

Akış hızı: 0.7 ml/dk

UV deteksiyon: 254 nm

PDA deteksiyon: 254 nm

Kullanılan LC-MS/MS Yöntemleri

KLZ-SG Konjugatının Analizi İçin:

Yöntem 1: Bu yöntemde total iyon analizi ve SRM yöntemleri aynı anda izlenmiştir. Bunun için yöntem kurulurken 2 tane scan event penceresi açılıp birine Total iyon analiz koşulları girilirken diğerine de SRM koşulları girilmiştir.

Analiz koşullar aşağıdaki gibidir.

Tablo II.17. KLZ-SG mikrozomal inkübasyonunda stabil metabolitlerin ve konjugat ürününün saptanmasında kullanılan SRM yöntemi

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü(m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
KLZ	328	271	39
Nor-KLZ	313	192	52
Nor-KLZ	313	270	52
KLZ N-oksit	343	192	55
KLZ N-oksit	343	256	55
KLZ-SG	632	503	40
KLZ-SG	632	302	40

LC-MS/MS' de izlenen reaksiyonlar

KLZ [M+H]⁺: 328→ 271

Nor-KLZ [M+H]⁺: 313→ 192

Nor-KLZ [M+H]⁺: 313→ 270

KLZ-N-oksit [M+H]⁺: 343→ 192

KLZ-N-oksit [M+H]⁺: 343→ 256

KLZ-SG [M+H]⁺: 632→ 503

KLZ-SG [M+H]⁺: 632→ 302
Total İyon Analizi : [100.000-700.000 Da]

Tablo II.18. KLZ-SG mikrozomal inkübasyon çalışmalarında kullanılan bütün SRM yöntemleri

Madde	Prekürsör (m/z)	Parçalanma Ürünü (m/z)	İyonizasyon Enerjisi (V)
KLZ	328	271	39
Nor-KLZ	313	192	52
Nor-KLZ	313	270	52
KLZ-N-oksit	343	192	55
KLZ-N-oksit	343	256	55
KLZ-SG	632	503	40
KLZ-SG	632	302	40

Kütle Spektrometresi Tune Ayarları;

Tablo II.19. KLZ çalışmalarında kullanılan LC-MS/MS tune ayarları

Parametre; (+) iyonizasyon	Total İyon Analizi (Tune_30 05 2013)	SRM Analizi (Tune_2013 03 11)
Spray Voltage	3000	3500
Vaporizer Temperature	350	350
Sheath Gas Pressure	60	60
Aux.Gas Pressure	20	12
Capillary Temperature	280	280
Capillary Offset	35	35

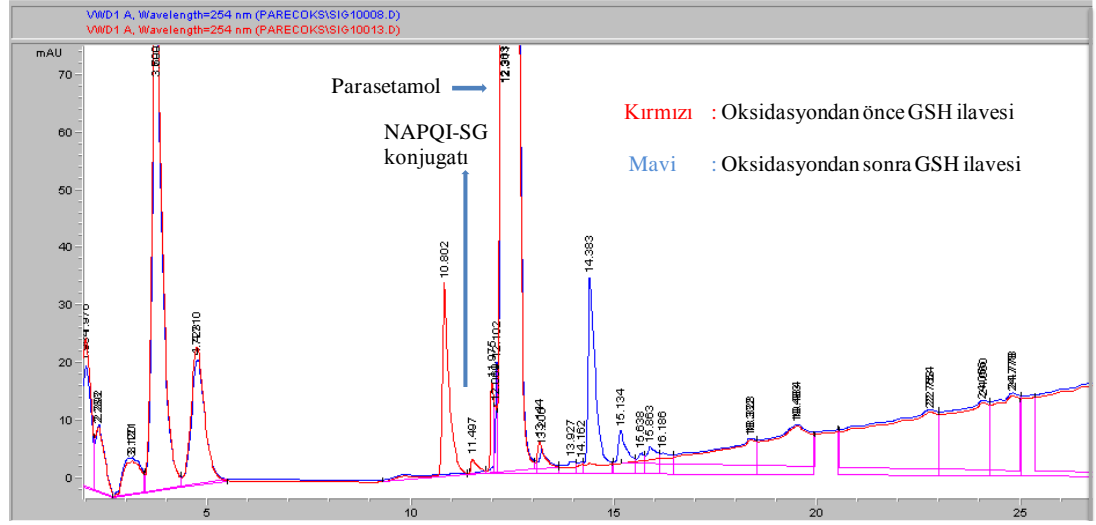
BÖLÜM III

III. BULGULAR

III.1. PARASETAMOL ÇALIŞMA SONUÇLARI

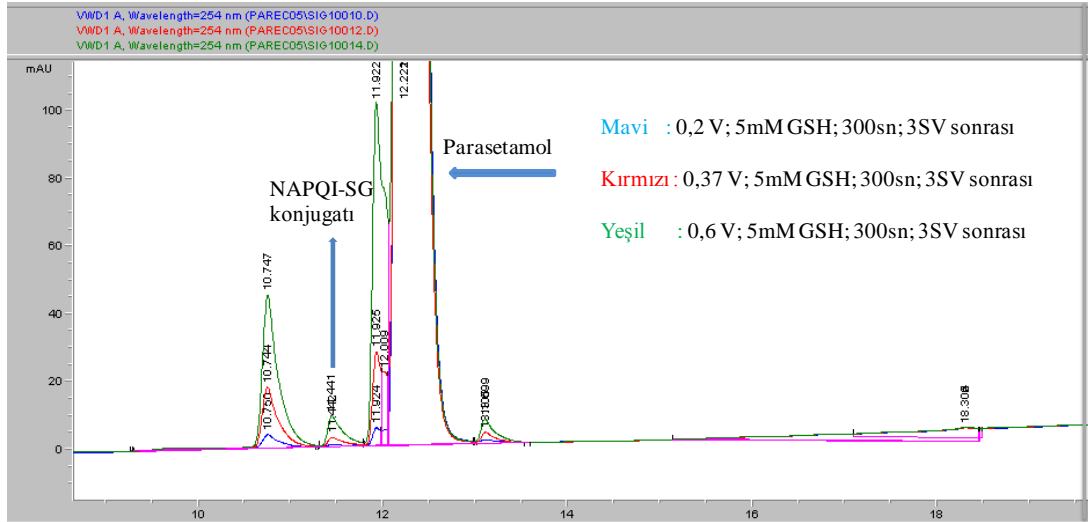
III.1.1. Parasetamolün Döngüsel Voltametri (SV) Yöntemiyle Oksidasyonu

Bu çalışmalarda SV yönteminde bazı değişkenlerin NAPQI-SG konjugat oluşumuna etkisi incelenmiştir. Öncelikle GSH ortamına PAR oksidasyonundan önce ve sonra eklenmiştir. GSH önce eklendiğinde yüksek miktarda konjugat oluşumu gözlenmiş, ancak sonra eklendiğinde çok düşük miktarda oluşmuştur, sonuçlar Şekil III.1'dedir.



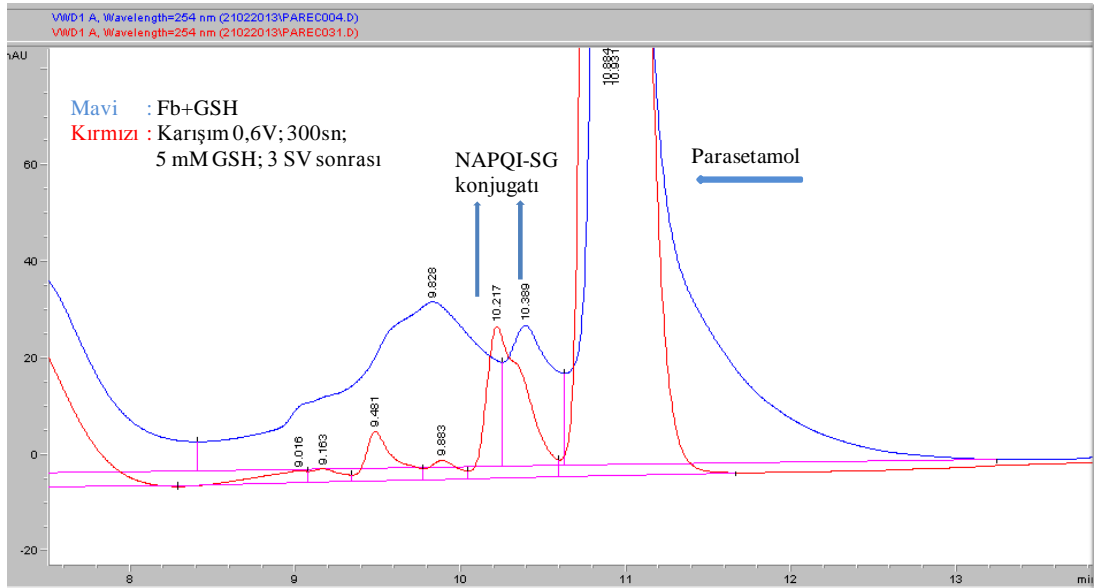
Şekil III.1. SV yönteminde GSH'un oksidasyondan önce ya da sonra eklenmesinin NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisi (0.37 V).

Ardından PAR çözeltisine uygulanacak voltaj potansiyelinin etkisi araştırılmış ve 0.2, 0.37 ve 0.6 V uygulanmıştır. Şekil III.2'de görüldüğü üzere en yüksek konjugat oluşumu, 0.6 V uygulandığında elde edilmiştir.



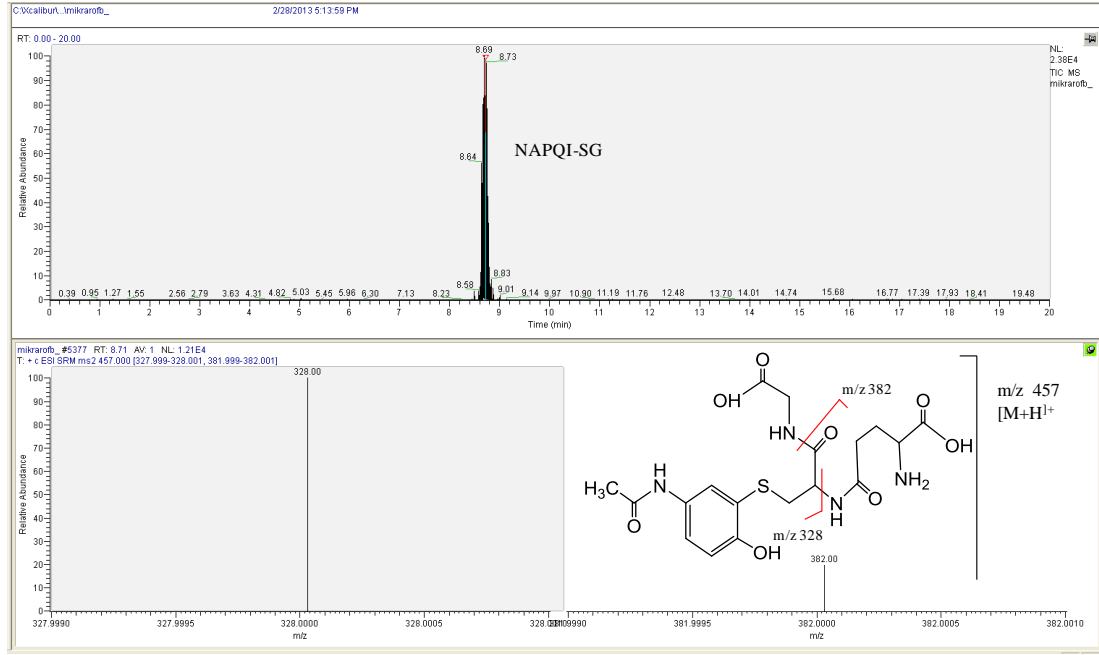
Şekil III.2.SV yönteminde uygulanan voltaj potansiyelinin NAPQI-SG konjugatı oluşumuna etkisi.

Daha sonra biyolojik yöntemle (mikrozomal inkübasyon) ve SV yöntemle üretilen konjugat miktarı kıyaslanmış, SV yönteminin bir üstünlük sağlamadığı gözlenmiştir (Şekil III.3).

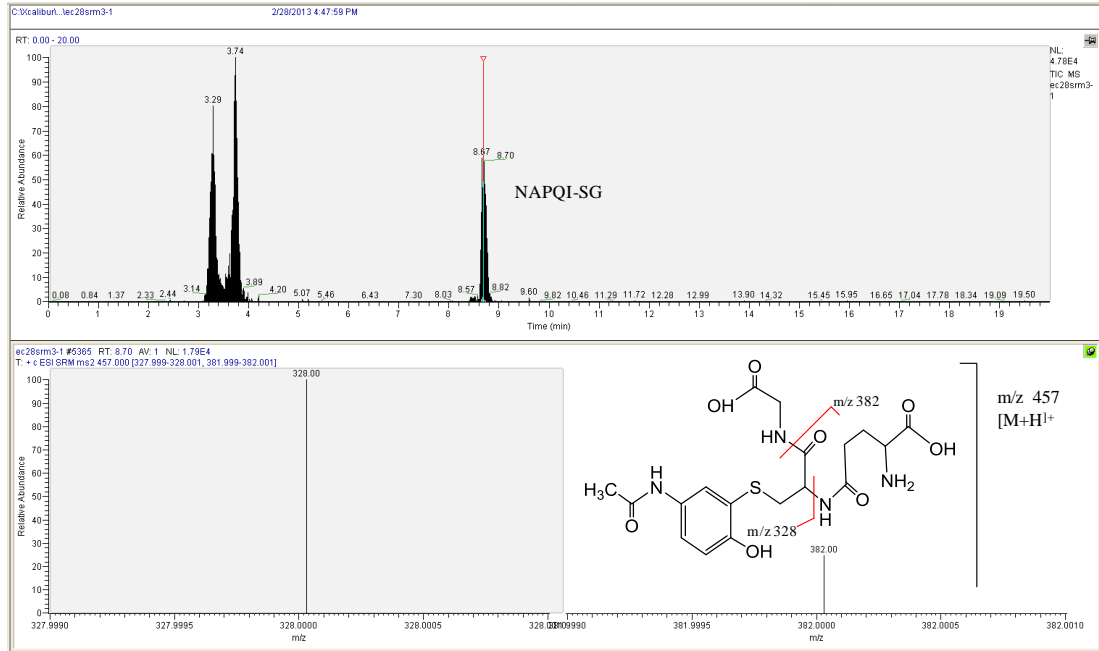


Şekil III.3. Mikrozomal ve elektrokimyasal yolla (SV) üretilen NAPQI-SG konjugatına ait HPLC-UV kromatogramları (254 nm). 0.5 mM parasetamol çözeltisi+5mM GSH, SV yöntemde 0.6 V, 300 sn; 3SV

Şekil III.4 ve III.5 her iki yolla üretilen konjugatların LC-MS/MS SRM analizine ait kromatogram ve kütle spektrumlarını göstermektedir.



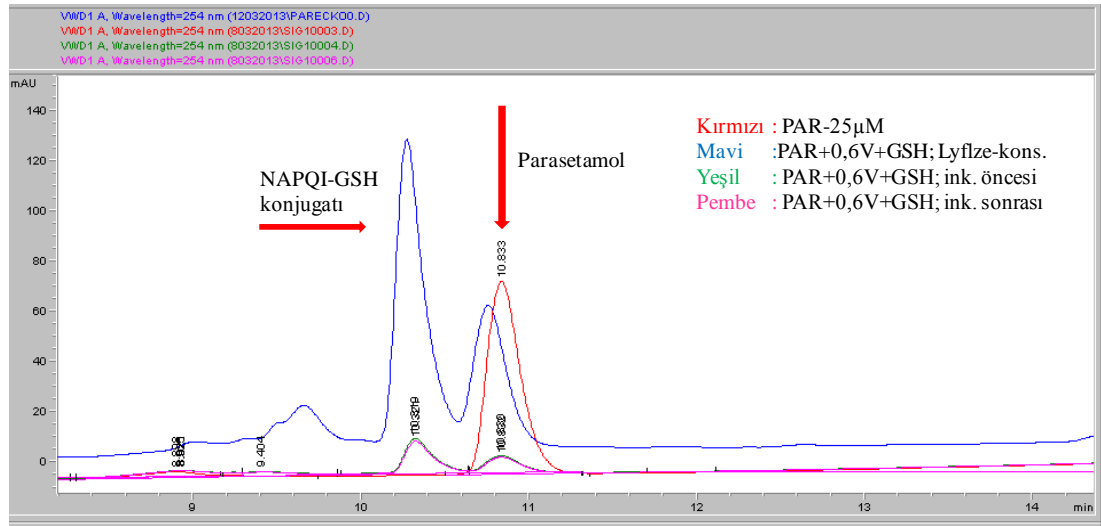
Şekil III.4. Fenobarbitalle indüklenmiş sıçan mikrozomları aracılığı ile üretilen NAPQI-SG konjugatına ait LC-MS/MS, SRM kromatogramı ve izlenen kütle dönüşümleri (m/z 457 [M+H]⁺; m/z 328 ve 382).



Şekil III.5. SV yöntemiyle üretilmiş NAPQI-SG konjugatına ait LC-MS/MS; SRM kromatogramı ve izlenen kütle dönüşümlerinin spektrumu (m/z 457 [M+H]⁺; m/z 328, 382). 0.5 mM parasetamol + 5mM GSH (0.60 V; 300 sn; 3 SV sonrası).

III.1.2.Parasetamolün Çevrim-içi EK Yöntemle Oksidasyonu

SV yönteminde mikrozomal yolla üretilen konjugat miktarına göre bir üstünlük sağlanamadığı için elektrokimyasal yol olarak ikinci bir yöntem denenmiştir. Bu yöntem, kapalı sistem olarak adlandırılan ve maddelerin redoks potansiyellerine göre hem nitel, hem de nicel analizin yapılabildiği HPLC-elektrokimyasal detektörün (EK) kullanıldığı yöntemdir. Detektörün HPLC elüentine oksidasyon uygulanan guard hücresi aracılığı ile sürekli bir voltaj potansiyeli uygulamak mümkündür. Kurduğumuz yöntemde guard hücre içerisinde geçirilen PAR çözeltisine kontrollü bir şekilde 0.6 V potansiyel uygulanmış, hücreden çıkan ve oksidasyon ürün(ler)ini taşıyan elüent, GSH içeren çözelti içine damlatılarak oluşması muhtemel elektrofilik metabolitlerin GSH ile konjuge olması sağlanmıştır. Şekil III.6, 0.6 V potansiyel uygulanmış ve GSH çözeltisi içine damlatılmış PAR çözeltisine ait sonuçları göstermektedir.

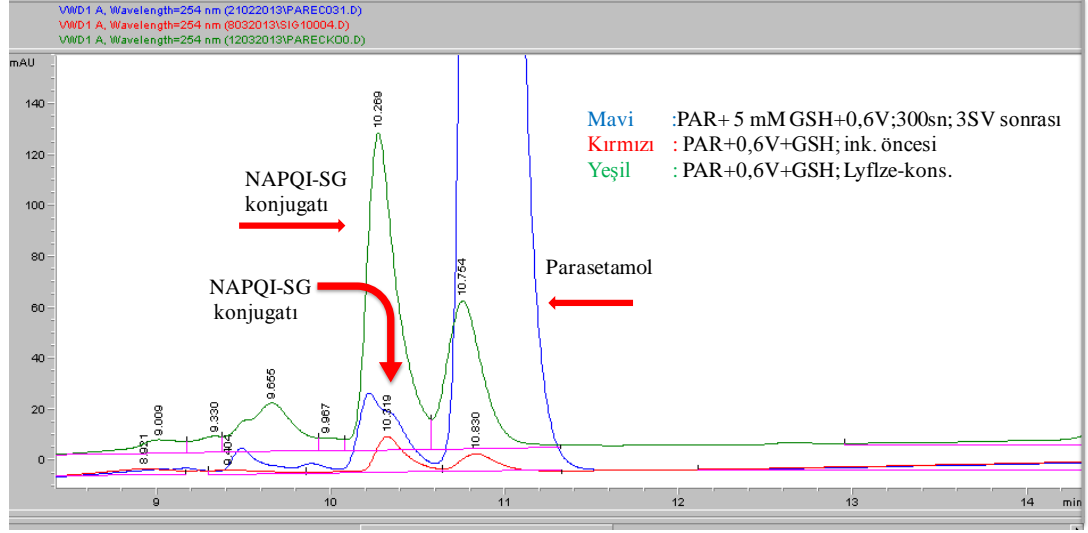


Şekil III.6. 25 µM Parasetamolün EK detektörde 0.6 V uygulanarak yükseltgenip 62.5 mM GSH ile karıştırılması sonucu oluşan örneğin; inkübasyon öncesi-sonrası ve liyofilize-konsantre hallerine ait kromatogram

GSH çözeltisi içine damlatılan elüent hemen (yeşil iz) ve 37°C'de 10 dk inkübasyon sonrasında (pembe iz) HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Her iki NAPQI-SG konjugatına ait pik alanlarının eşit olması, ortamda oluşan NAPQI'nın GSH ile inkübasyon gerektirmeden anında konjuge olduğunu göstermektedir.

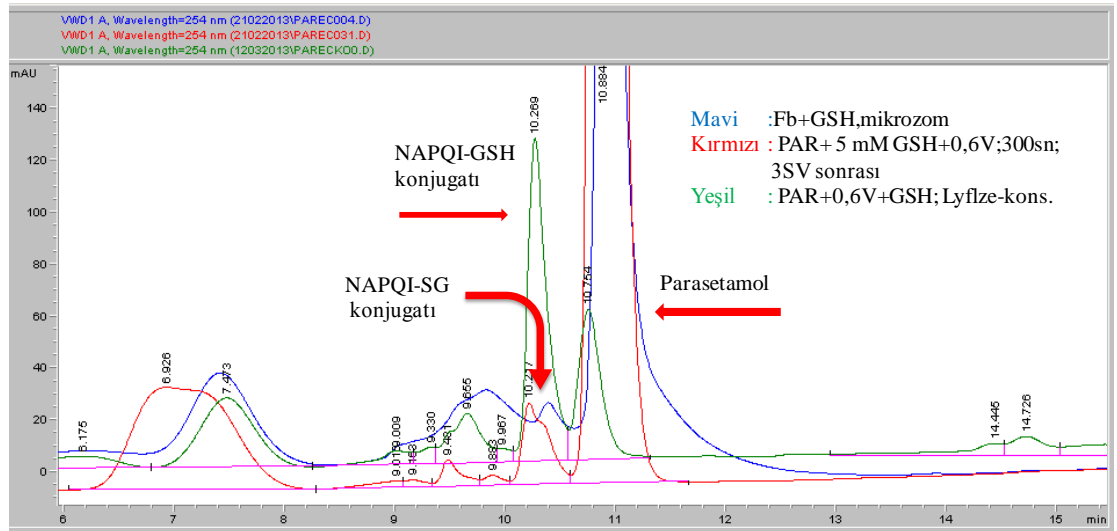
Şekil III.7, EK detektör yöntemi ve SV yönteminin kıyaslamasını göstermektedir. EK detektörde 0.6 V potansiyel uygulanan 25 µM PAR çözeltisinin

62.5 mM GSH çözeltisi içine damlatılmasıyla oluşturulan ve liyofilize edilen konjugat piki (yeşil iz), SV yönteminde ise 0.6 V potansiyel uygulanan 500 µM PAR çözeltisinin 5 mM GSH ile birlikte okside edilmesi sonucu oluşan konjugat pikine ait kromatogram görülmektedir (mavi iz).

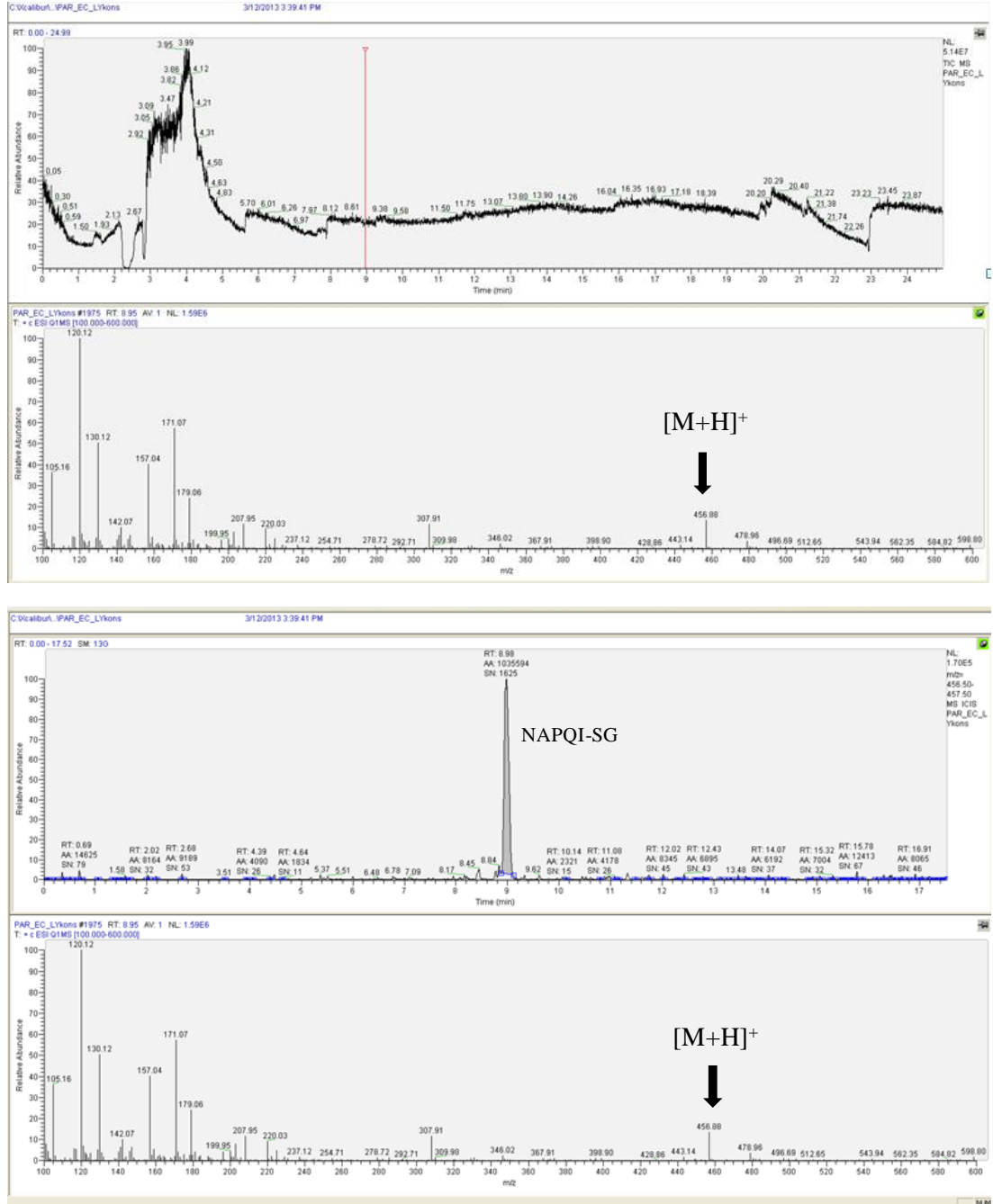


Şekil III.7. EK ve SV yöntemle oluşturulan NAPQI-SG konjugatına ait HPLC-UV pikleri

Her iki yöntemde PAR ve GSH konsantrasyonlarının farklı olmasının nedeni, 2 ayrı yöntemde konjugat oluşumu açısından daha önce belirlenen optimum koşullar nedeniyledir. Şekil III.8’de ise EK, SV ve mikrozomal inkübasyon sonucu oluşan konjugat pikleri gösterilmiştir.



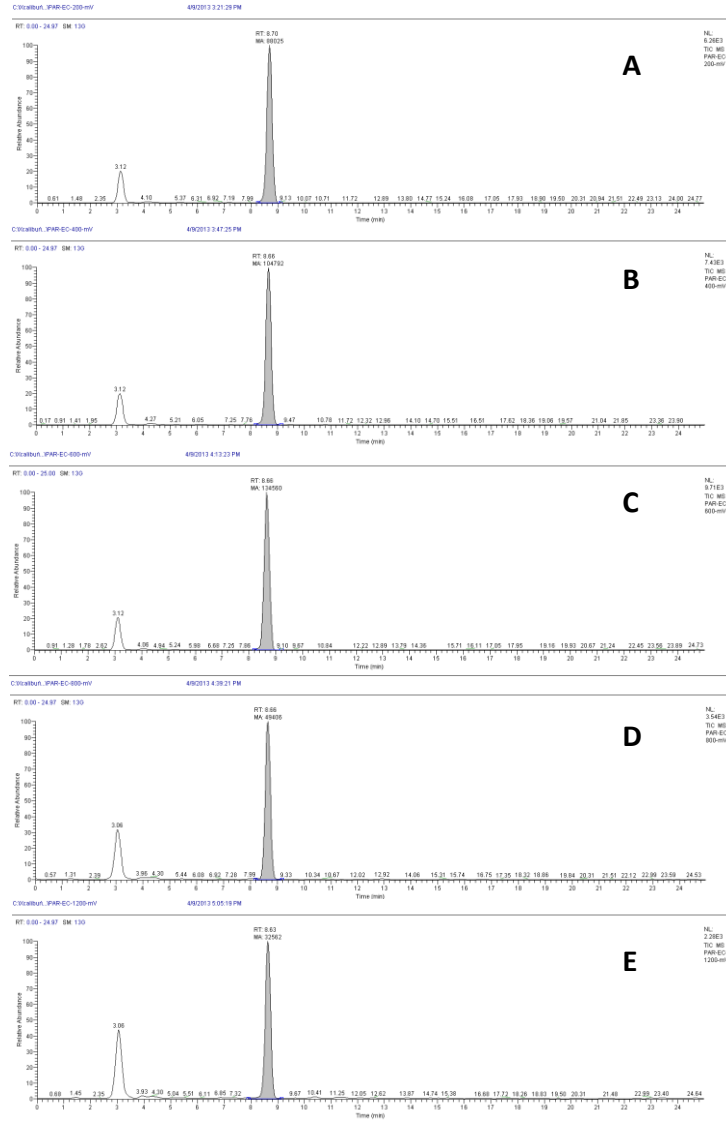
Şekil III.8. SV yöntem, EK yöntem ve fenobarbital-indüklenmiş sıçan mikrozomları aracılığıyla oluşturulan NAPQI-SG konjugatına ait HPLC-UV kromatogramları. Her üç örnek, analiz öncesi liyofilize edilerek konsantre edilmiştir.



Şekil III.9. EK yöntemde 0.6 V uygulanarak okside edilen ve GSH çözeltisi içine damlatılarak elde edilen NAPQI-SG örneğinin LC-MS/MS analizine ait kromatogram ve kütle spektrumları. Üstteki kromatogramda konjugat piki gözlenmemesine karşın pozitif ESI'da konjugatın moleküler iyonu olan m/z 457 ($[M+H]^+$), 8.95. dakikada belirlenmiştir. Bu moleküler iyonun ekstrakte edilmesi sonucu aşağıdaki ekstrakte iyon kromatogramı (XIC) kromatogramı ve konjugatın hem piki, hem de Q1MS spektrumu elde edilmiştir.

III.1.2.1. Voltaj Potansiyelinin NAPQI-SG Konjugatı Oluşumuna Etkisinin İncellenmesi

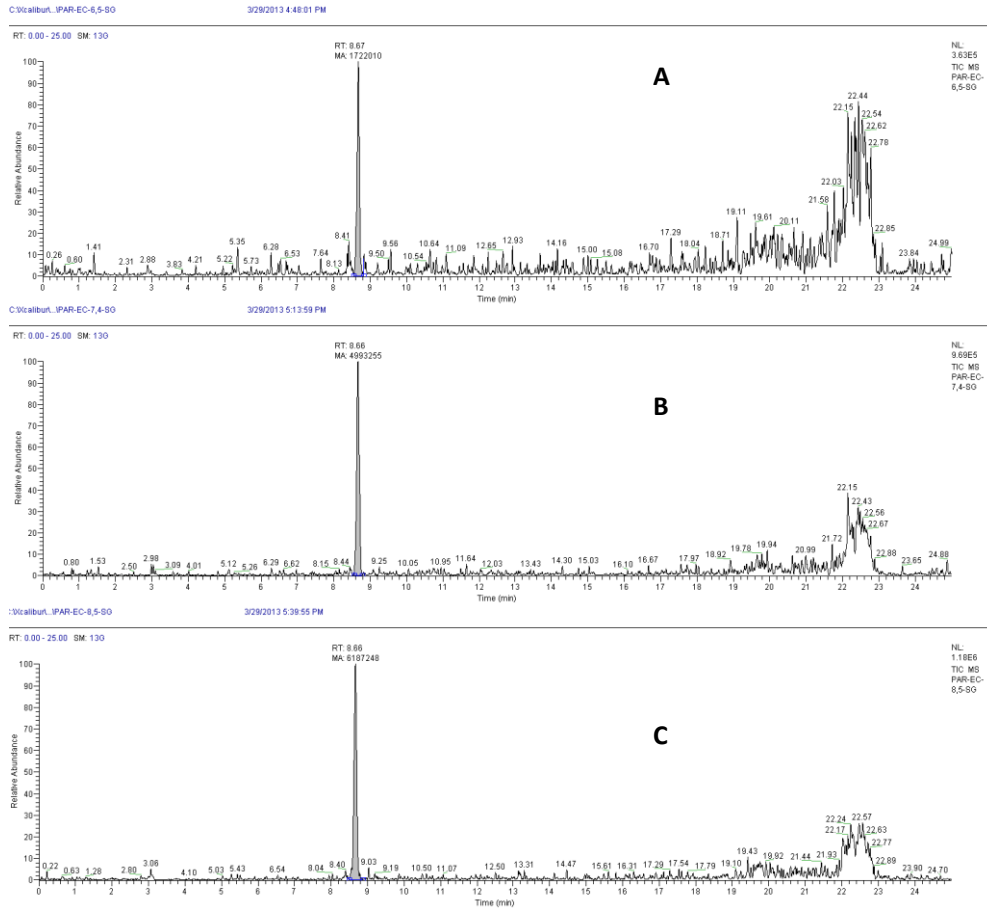
600 mV ile yapılan çalışmadaki konjugat oluşumu LC tandem MS cihazında seçilmiş SRM analiz tekniğiyle incelenmiş ve konjugat oluşumu alıkonma zamanı 8.66 dk.'da olan ve pozitif ESI'da moleküler iyonu ($[M+H]^+$) olan parasetamol piki gözlenmiştir (Şekil III.10).



Şekil III.10. Voltaj potansiyelinin NAPQI-SG oluşumu üzerine etkisini gösteren LC-MS/MS, SRM kromatogramları. A: 200 mV; B: 400 mV; C: 600 mV; D: 800 mV; E: 1200 mV.

III.1.2.2. Ortam pH Değerinin NAPQI-SG Konjugatı Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi

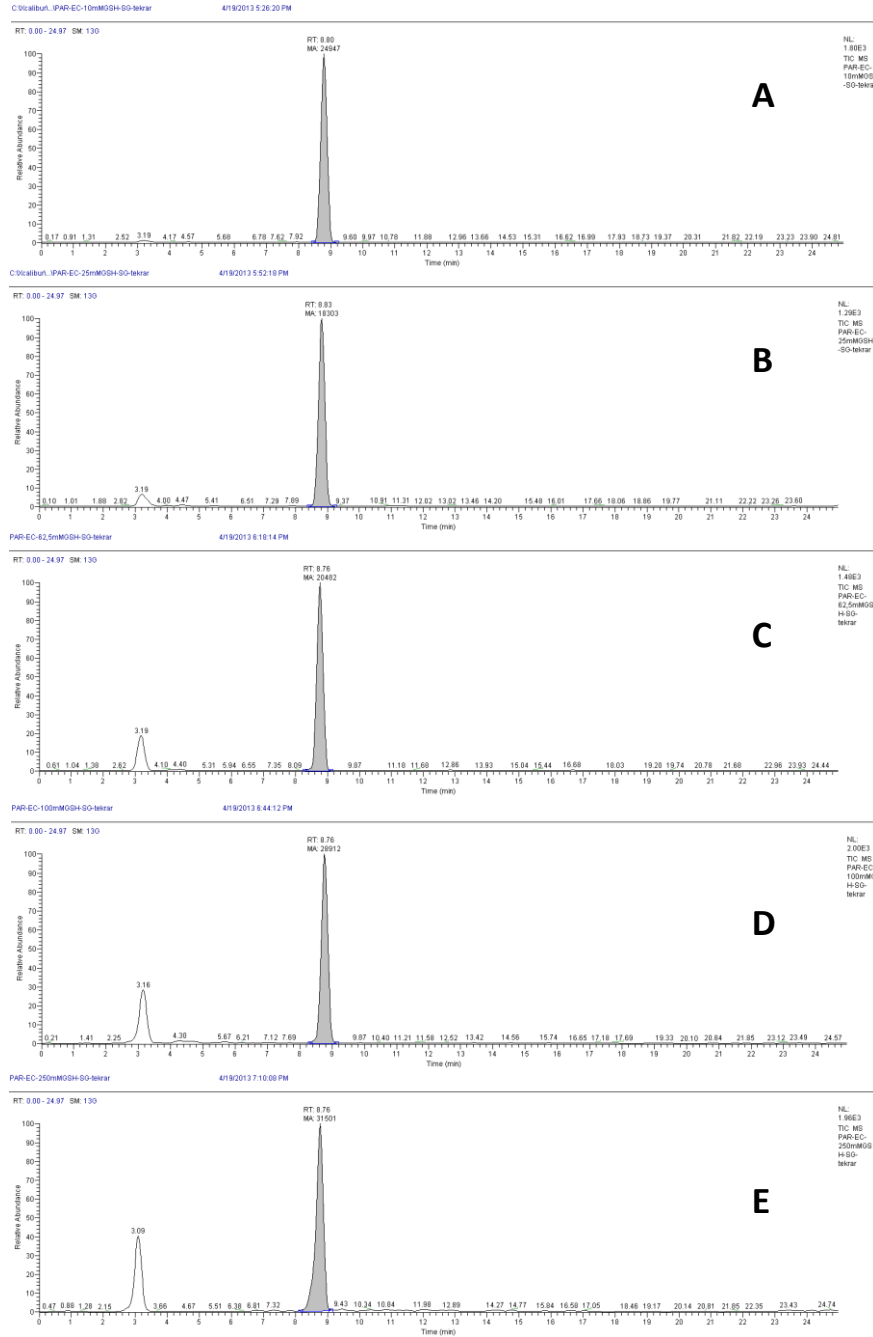
pH 8.5 ile yapılan çalışmadaki konjugat oluşumu LC tandem MS cihazında seçilmiş full analiz tekniğiyle incelenmiş ve konjugat oluşumu alıkonma zamanı 8,66 dk.'da olan ve pozitif ESI'da moleküler iyonu ($[M+H]^+$) m/z 456,78 gözlenmiştir (Şekil III.11). MS2 analizinde bu moleküler iyonun ürünleri olan iyonlar araştırılmış, GSH konjugatlarının karakteristik fragmentleri olan m/z 129 nötral kopma (piroglutamik asit) ve m/z 75 kopması sonucu oluşan sırasıyla 382 ve 328 kütleli iyonlar, ürün iyonlar (product ion) olarak seçilmiştir.



Şekil III.11. Ortam pH değerinin NAPQI-SG oluşumu üzerine etkisini gösteren total iyon kromatogramları. A: pH 6.50; B: pH 7.40; C: pH 8.50.

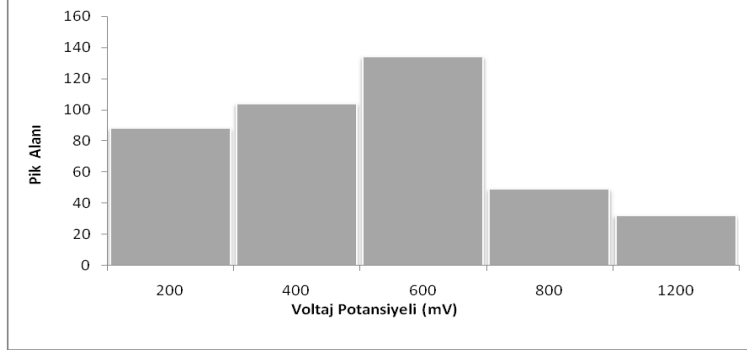
III.1.2.3. GSH Konsantrasyonunun NAPQI-SG Konjugatı Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi

250 mM GSH konsantrasyonu ile yapılan çalışmadaki konjugat oluşumu LC tandem MS cihazında seçilmiş SRM analiz tekniğiyle incelenmiş ve konjugat oluşumu alıkonma zamanı 8.76 dk.'da olan ve pozitif ESI'da moleküler iyonu ($[M+H]^+$) olan parasetamol piki gözlenmiştir (Şekil III.12).

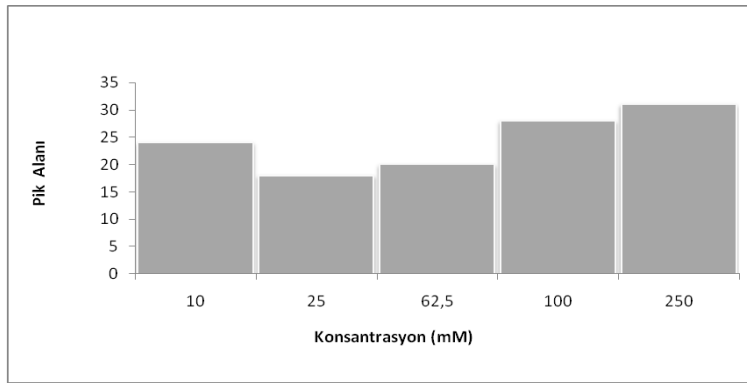


Şekil III.12. GSH konsantrasyonunun NAPQI-SG oluşumu üzerine etkisini gösteren LC-MS/MS, SRM kromatogramları. **A:** 10mM GSH; **B:** 25 mM GSH; **C:** 62.5 mM GSH; **D:** 100 mM GSH; **E:** 250 mM GSH

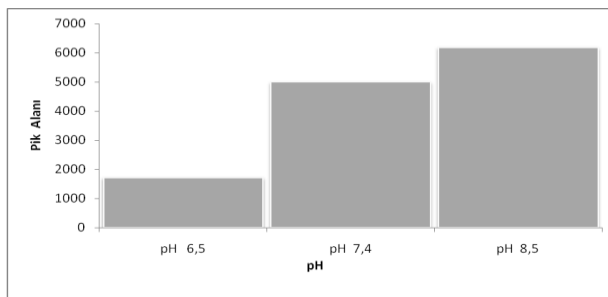
Reaksiyon ortamı pH değeri, GSH konsantrasyonu ve uygulanan voltaj değerinin NAPQI-SG oluşumu üzerine etkileri, Şekil III.13-15 arasında karşılaştırmalı olarak çubuk grafik şeklinde gösterilmiştir.



Şekil III.13. Voltaj potansiyelinin NAPQI-SG oluşumuna etkisi



Şekil III.14. GSH konsantrasyonunun NAPQI-SG oluşumuna etkisi

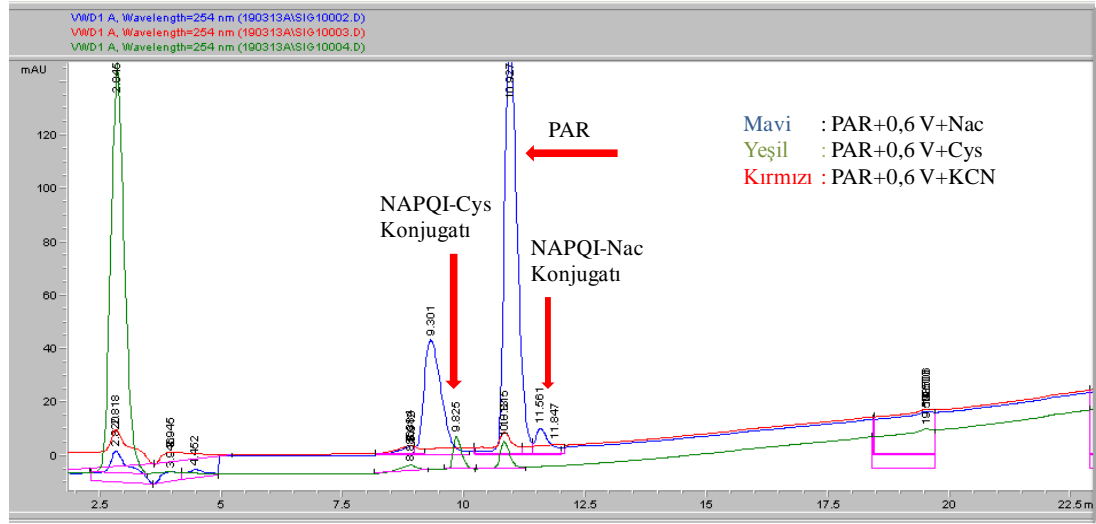


Şekil III.15. Ortam pH'sının NAPQI-SG oluşumuna etkisi

En yüksek NAPQI-SG konjugat oluşumu 0.6 V potansiyel, 250 mM GSH ve pH 8.50'de gözlenmiştir.

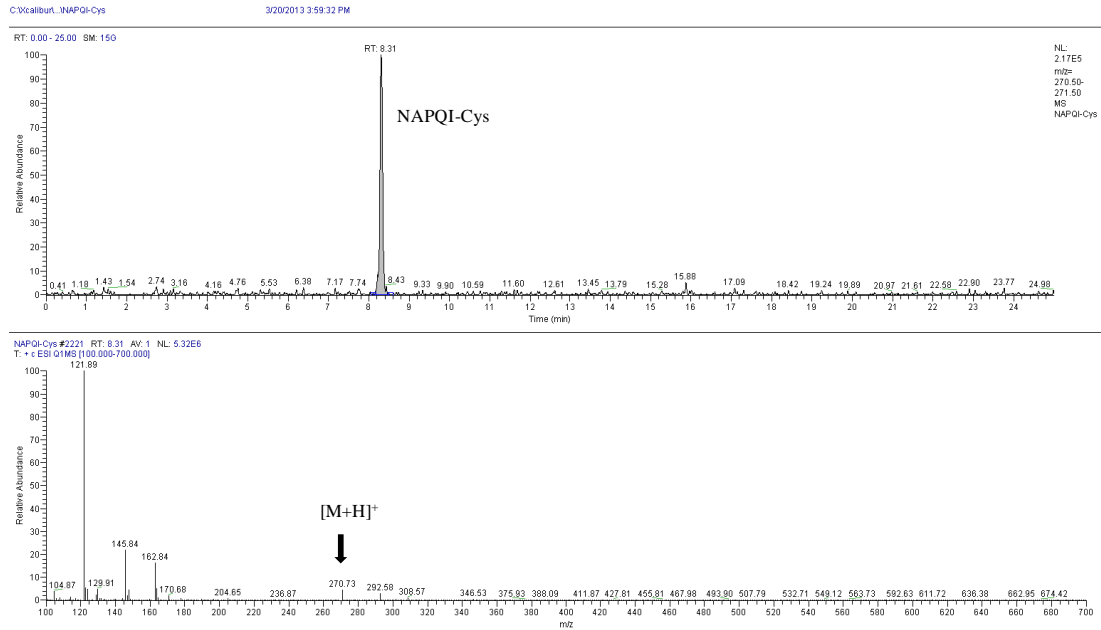
III.1.3. NAPQI'in GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması

NAPQI'in diğer nükleofilik bileşikler olarak seçilen Cys, Nac ve KCN ile reaksiyon verip vermediğini araştırmak üzere EC yöntem uygulanmış, Cys ve Nac konjugatları oluşurken KCN ile herhangi bir konjugat oluşumu gözlenmemiştir (Şekil III.16).



Şekil III.16. EC yöntemde PAR oksidasyonu ve Cys, Nac ve KCN ile reaksiyonu sonucu elde edilen örneklere ait HPLC-UV (254 nm) kromatogramları.

Şekil III.17, NAPQI-Cys konjugatının LC-MS/MS analiz sonucunu göstermektedir.

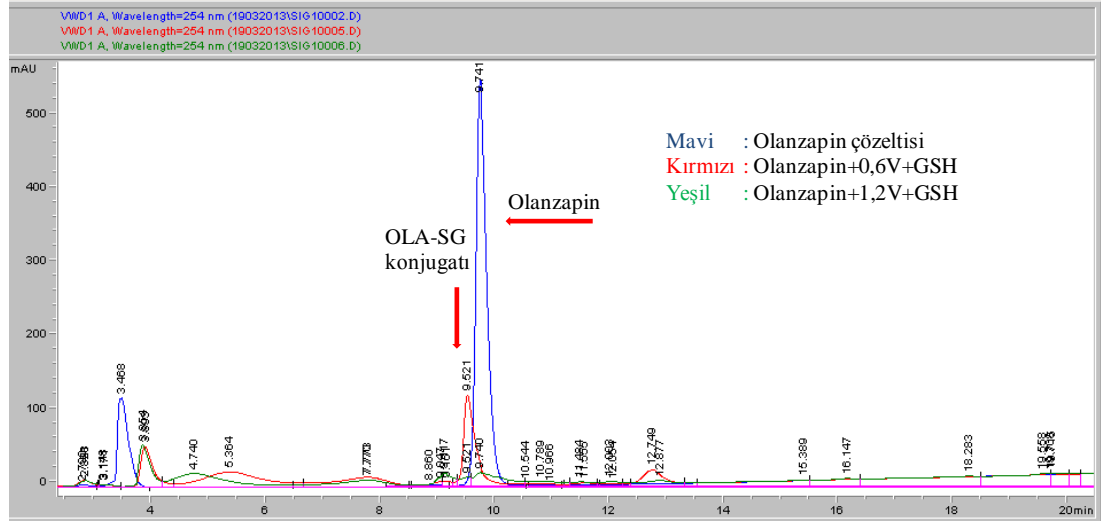


Şekil III.17. NAPQI-Cys konjugatının +ESI-total iyon analizi. m/z 271 (270.73 , $[M+H]^+$)

III.2.OLANZAPİN ÇALIŞMA SONUÇLARI

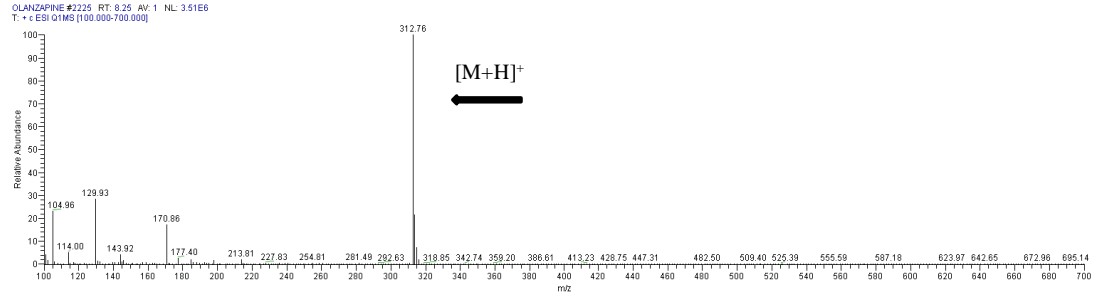
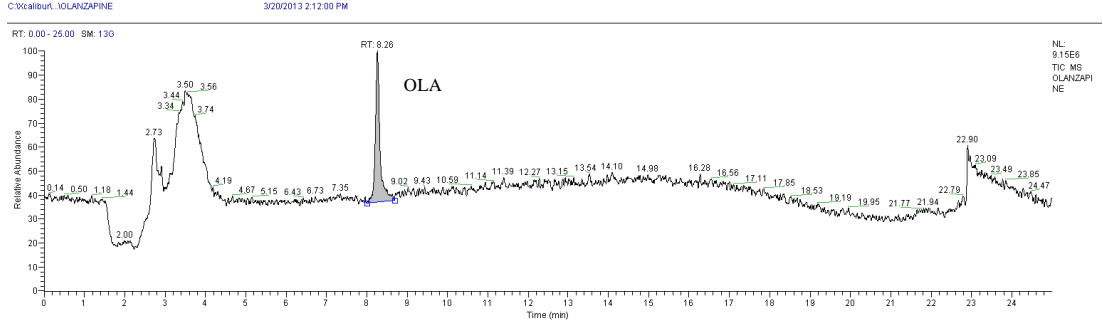
III.2.1. Olanzapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Konjugatının Oluşturulması

Olanzapinin (OLA) oksidasyon sonucu GSH ile konjugat oluşturabilecek metabolitlerini araştırmak üzere 25 µM OLA EC yöntemde 0.6 ve 1.2 V uygulaması ile okside edildi ve 62.5 mM GSH içeren çözelti içine toplandı. Şekil III.18, bu deneylerin HPLC-UV analizi sonuçlarını göstermektedir.



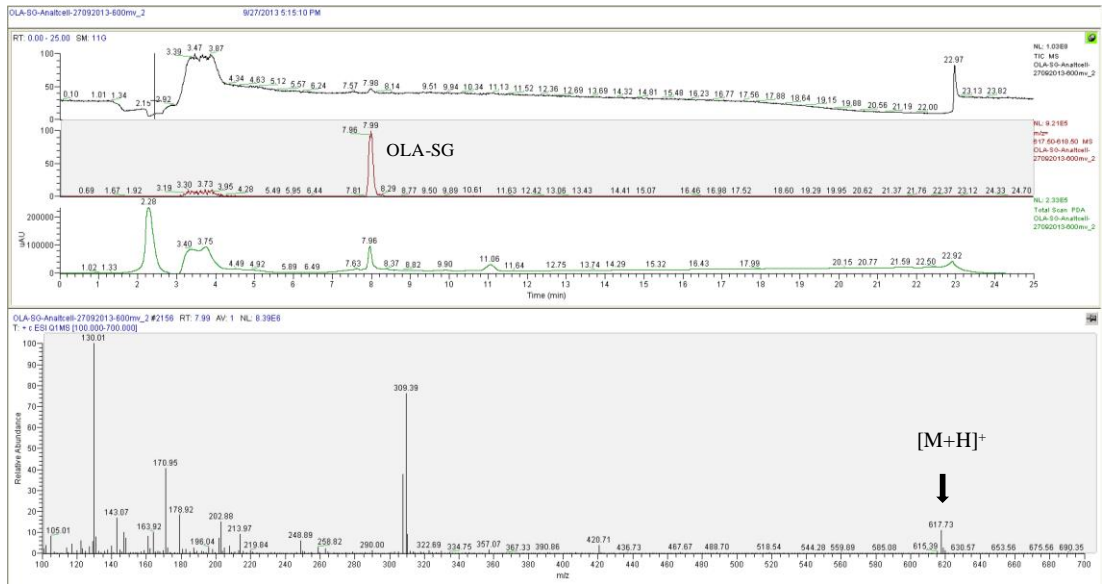
Şekil III.18. Olanzapinin EC yöntemde 0.6 V ve 1.2 V uygulanarak oksidasyonunu takiben 62.5 mM GSH ile karıştırılması sonucu oluşan örneklerin HPLC-UV analizi (254 nm) kromatogramları.

Kırmızı iz ile gösterilen 0.6 V uygulanmış OLA örneğinde 9.5 ve 12.7. dk.'larda, mavi iz ile gösterilen okside edilmemiş OLA çözeltisine ait kromatogramda olmayan 2 pik gözlenmiştir. Buna karşın 1.2 V uygulanan örnekte herhangi bir pik gözlenmemiştir. HPLC sonuçlarına göre OLA'nın %100 okside olduğu görülmektedir. OLA piki tamamen yok olmuş, onun hemen 0.5 dk. öncesinde de konjugata ait olduğu düşünülen bir pik gözlenmiştir (Şekil III.18). Aynı örneklerin +ESI-full MS analizinde öncelikle okside olmamış OLA analiz edilmiş ve Şekil III.19'daki kromatogram, OLA'ye ait moleküler iyon olan m/z 313 ($[M+H]^+$) ve fragmentleri gözlenmiştir.



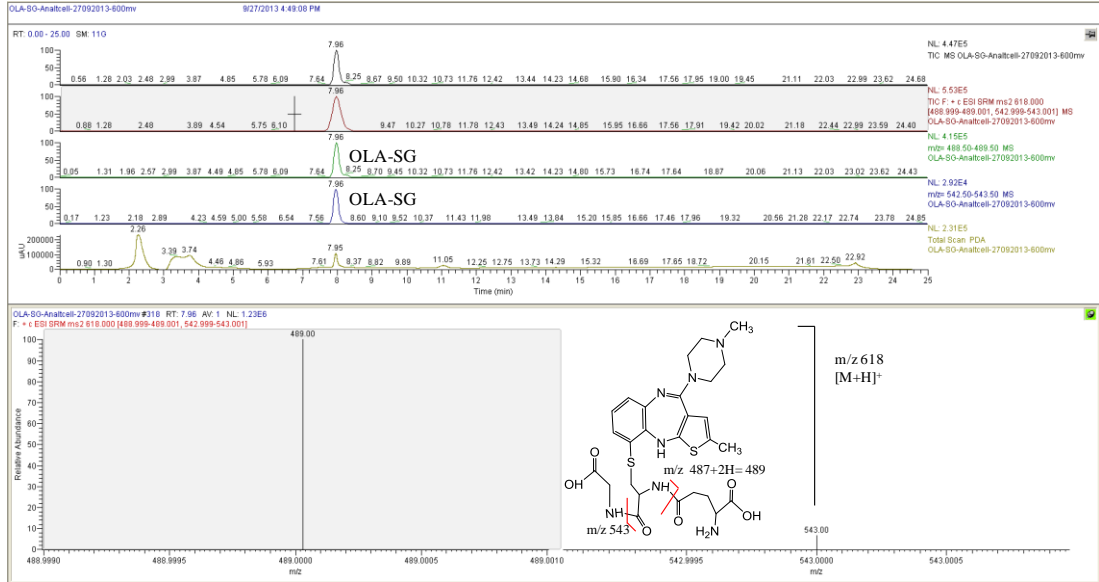
Şekil III.19. 195 µg olanzapin'e ait +ESI-total iyon kromatogram ve kütle spektrumu. Gözlenen kütleler; $[M+H]^+ = m/z$ 312.76.

Ardından 0.6 ve 1.2 V uygulama sonucu okside edilen örnekler +ESI-MS'de analiz edilmiş ve HPLC analizini destekler şekilde 0.6 V ile okside edilen örnekte OLA-SG konjugatının kütlesi ile uyumlu pik gözlenmiştir (Şekil III.20).



Şekil III.20. OLA-SG (600 mV-20dk+azot altında yoğunlaştırma) konjugatına ait Q1 MS total iyon, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu. Beklenen $[M+H]^+$ m/z olan 618 (617.73) gözlenmiştir.

Ardından hassasiyeti artırmak amacıyla OLA-SG konjugatı için SRM yöntemi kurulmuş ve OLA'in oksidasyonu sonucu elde edilen konjugat analiz edilmiştir, şekil III.21 total iyon kromatogramı, aranan kütle dönüşümleri olan m/z 618; m/z 489 ve m/z 543 SRM kromatogramları ve PDA (photodiode array) kromatogramını, ayrıca m/z 489 kütle spektrumunu göstermektedir.

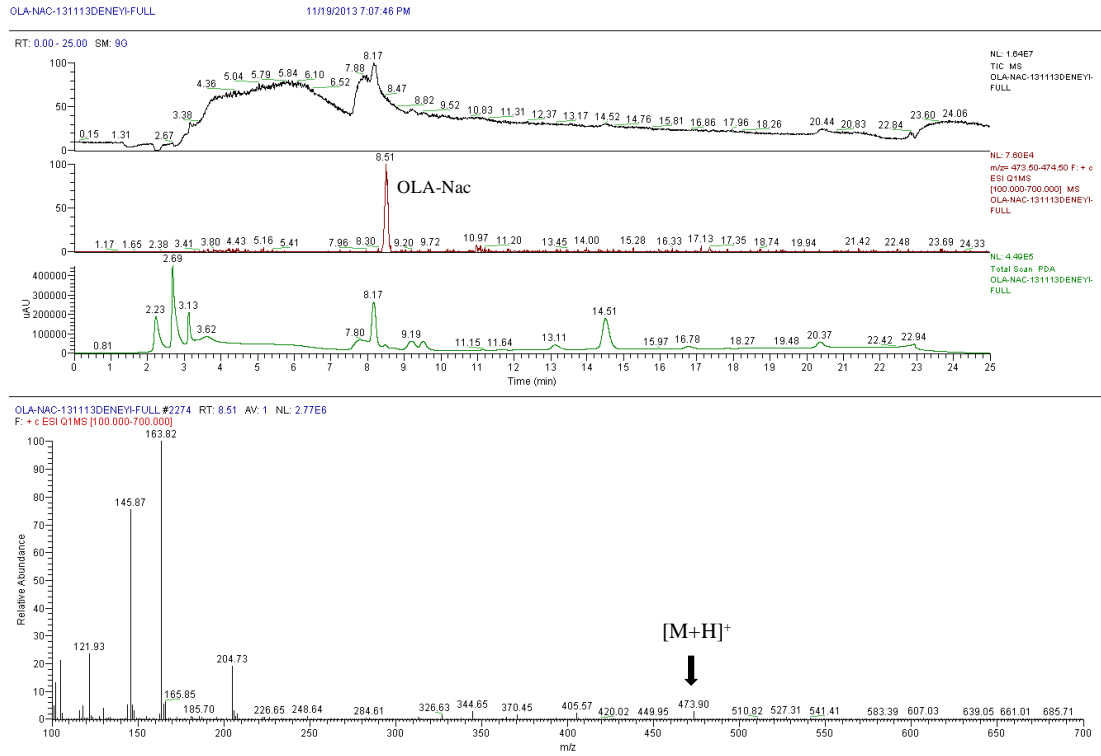


Şekil III.21. OLA-SG (600mV-20dk+azot) konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu. [OLA-SG Rt:7.96 [M+H]⁺: 618→489, 543]

III.2.2. Olanzapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması

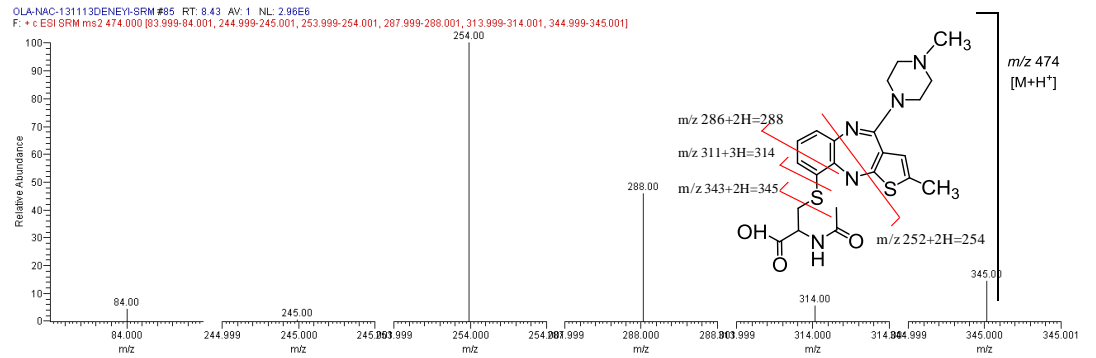
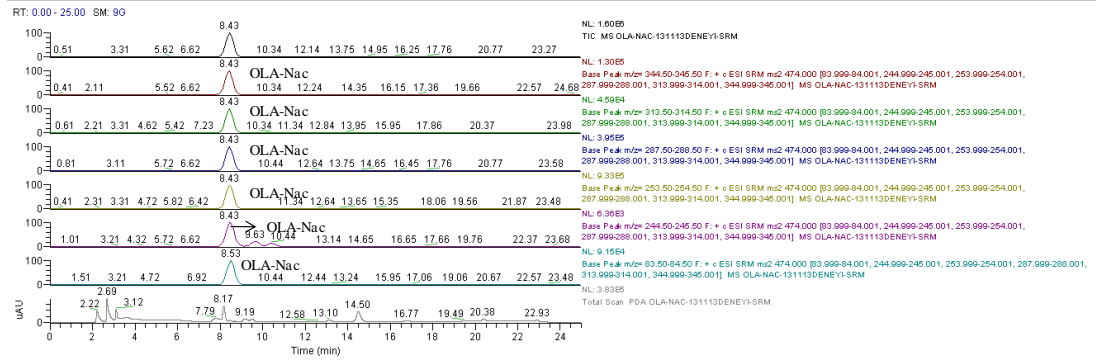
GSH'un yanı sıra OLA'in -Nac ve -Cys konjugatları da oluşturulmuş ve analiz edilmiştir (Şekil III.22, Şekil III.23 ve Şekil III.24).

OLA-Nac-EK Konjugatı



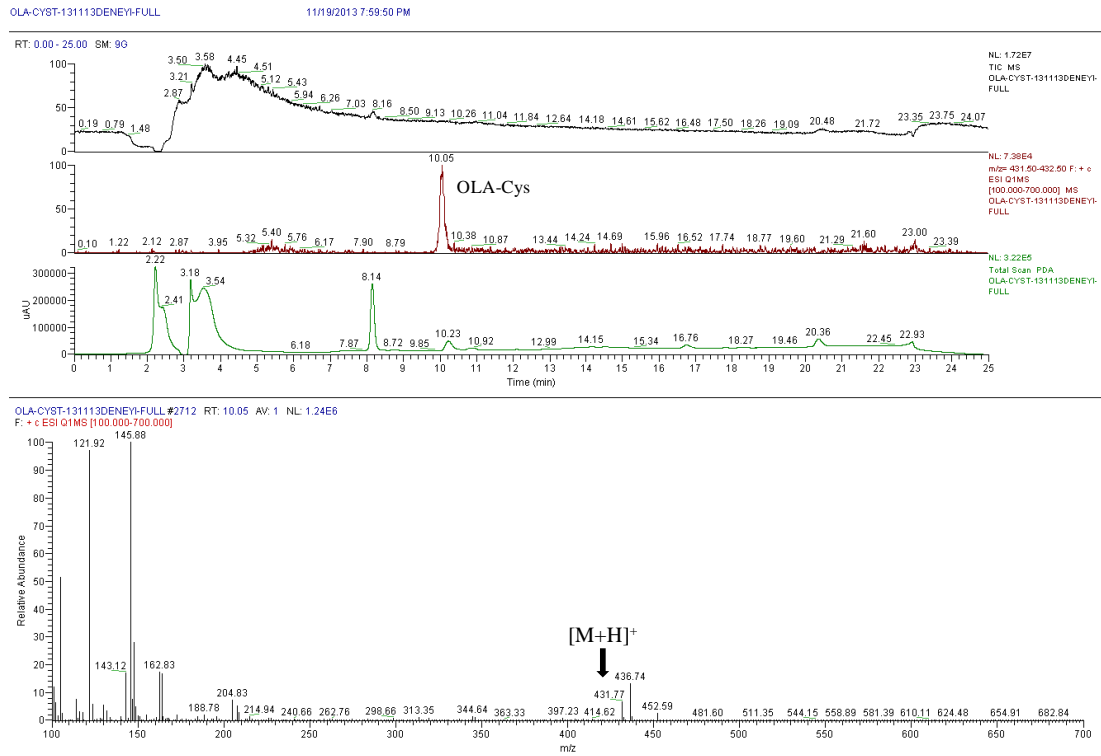
Şekil III.22. 100 µM OLA-Nac (Analitik Hücre-600mV) konjugatına ait +ESI-total iyon, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu. [OLA-Nac [M+H]⁺: 474]

GSH konjugatına benzer şekilde Nac konjugatı için de ileri çalışmalarda uygulanmak amacıyla SRM yöntemi kurulmuş ve aşağıdaki kromatogramlar ve kütle spektrumları elde edilmiştir (Şekil III.23)

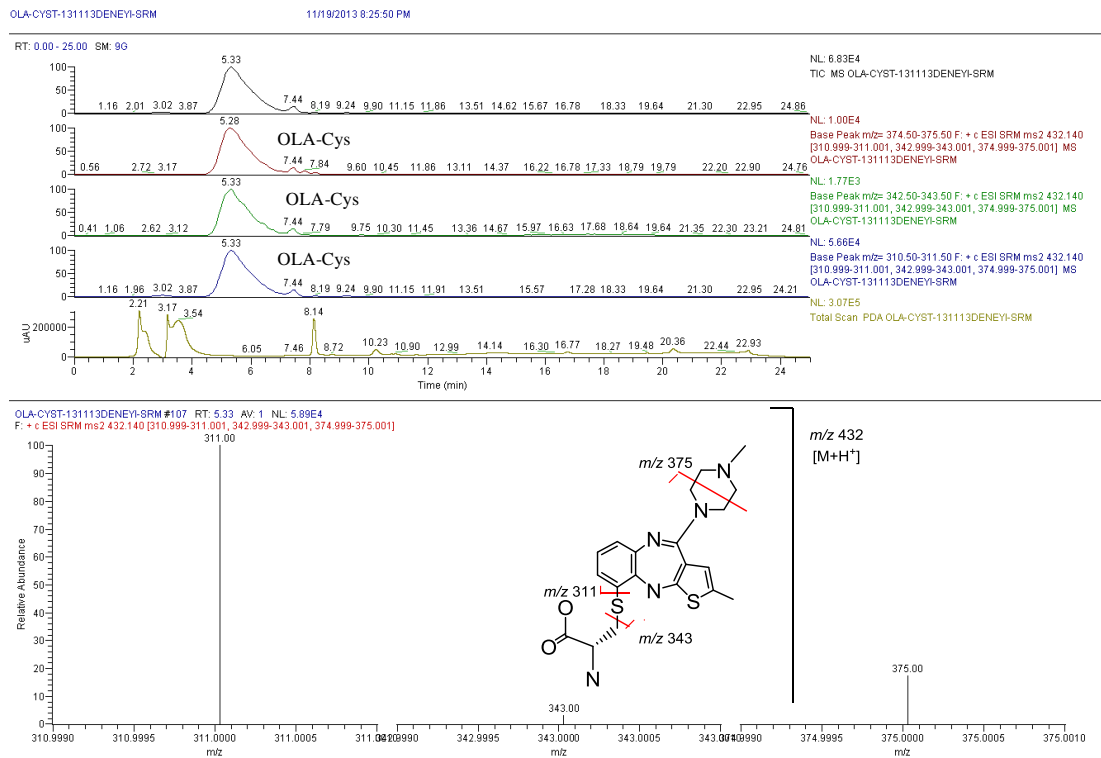


Şekil III.23. 100 µM OLA-Nac (Analitik Hücre-600mV) konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumları. [OLA-NAC [M+H]⁺: 474→345, 314, 288, 254, 245, 84].

OLA-Cys-EK Konjugatı



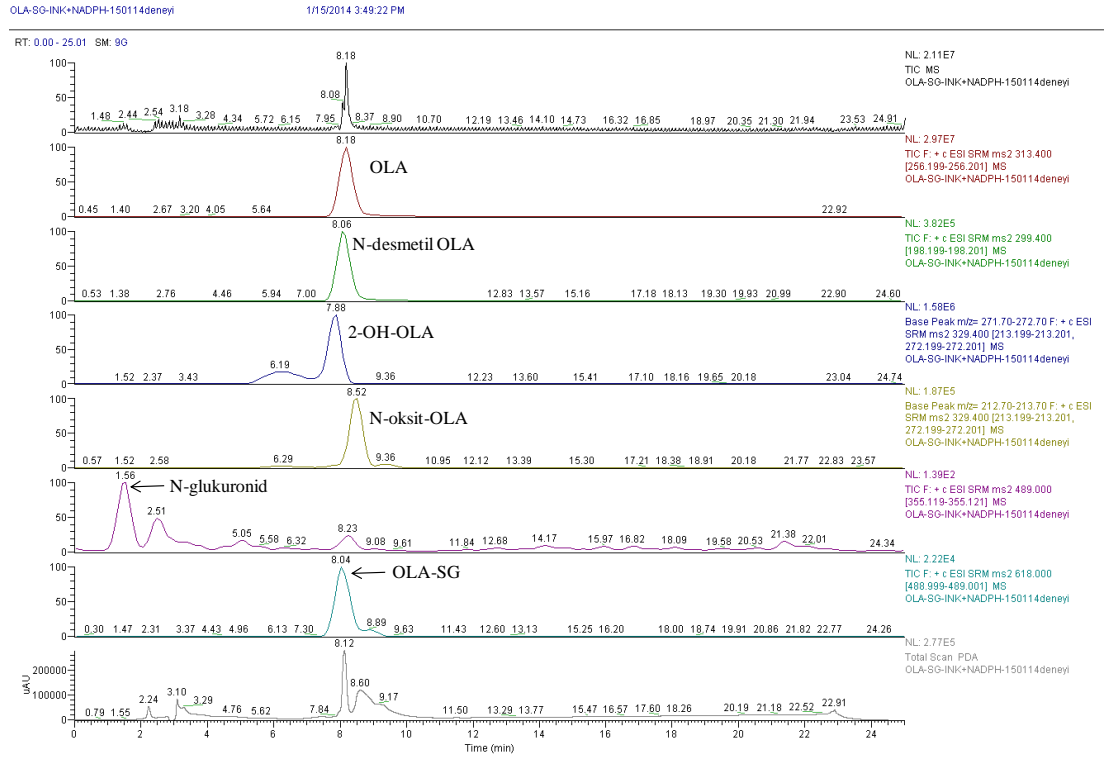
Şekil III.24. 100 μ M OLA-Cys (Analitik Hücre -600mV) konjugatına ait +ESI-total iyon, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu [OLA-Cys $[M+H]^+$: 432].



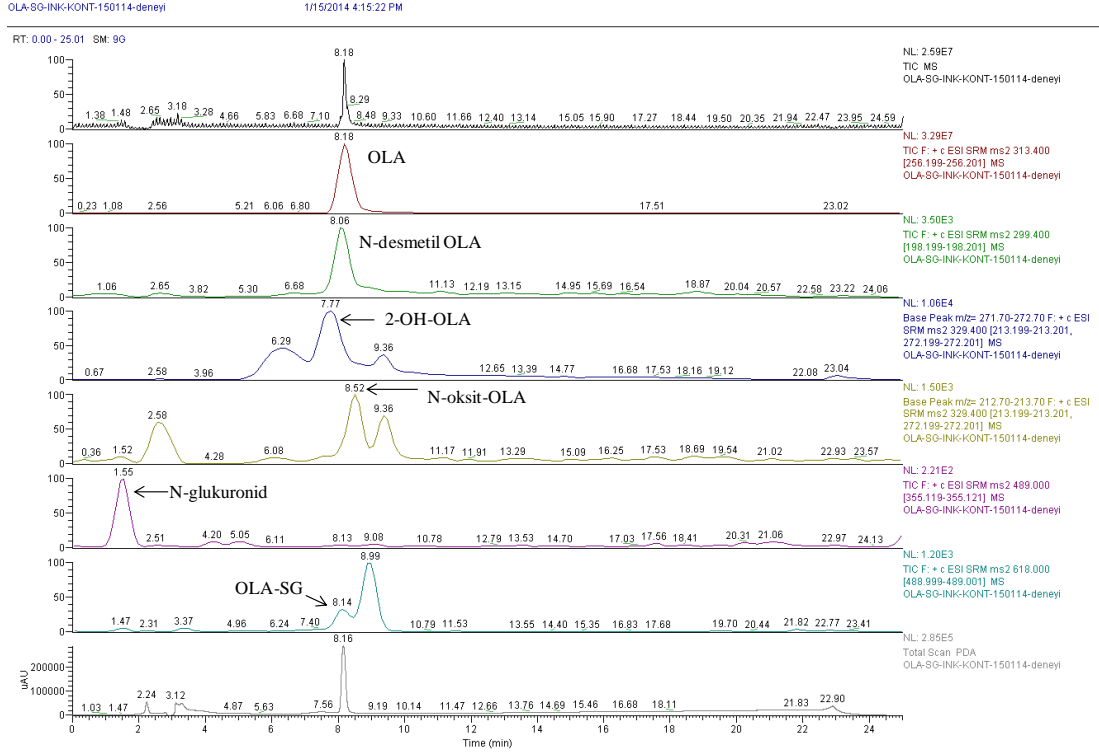
Şekil III.25. 100 μ M OLA-Cys (Analitik Hücre -600 mV) konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu [OLA-Cys $[M+H]^+$: 432,14 \rightarrow 375, 343, 311].

III.2.3. Olanzapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu Yoluyla GSH Konjugatının Oluşturulması

OLA, ARO ile indüklenmiş sıçan karaciğer mikrozomlarıyla inkübe edilerek GSH konjugatının yanında literatürde bilinen metabolitlerinin oluşumu analiz edilmiştir. Şekil III.26 ortama NADPH eklendiğinde, şekil III.27 ise NADPH eklenmediği durumdaki kütle dönüşümü kromatogramlarını göstermektedir. NADPH olmayan ortamda daha düşük düzeyde olmasına karşın GSH konjugatı dahil tüm metabolitlerin oluştuğu gözlenmiştir.



Şekil III.26. 100 µM OLA-RLM (+NADPH) inkübasyonundaki OLA, OLA stabil metabolitleri ve OLA-SG konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu. OLA $[M+H]^+$: 313.4→256.2 , Rt:8.18; N-desmetil-OLA $[M+H]^+$: 299.4→198.2 Rt:8.06; 2-OH-OLA $[M+H]^+$: 329.4→272.2, Rt:7.88; N-oxide-OLA; $[M+H]^+$: 329.4→213.2, Rt:8.52; 10-N-glucuronide-OLA $[M+H]^+$: 489→355.12, Rt:1.56/2.51 (?); OLA-SG $[M+H]^+$: 618→489, Rt:8.04

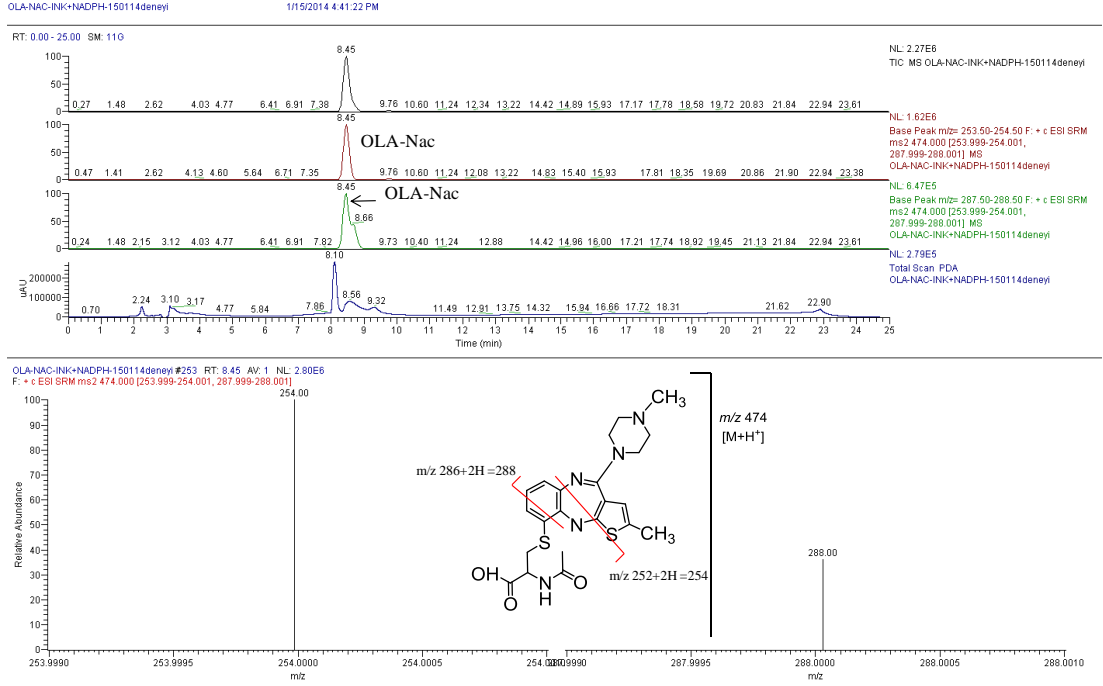


Şekil III.27. 100 µM OLA-RLM (-NADPH) inkübasyonundaki OLA, OLA stabil metabolitleri ve OLA-SG konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu OLA $[M+H]^+$: 313.4→256.2, Rt:8.18; N-desmetil-OLA $[M+H]^+$: 299.4→198.2 Rt:8.06; 2-OH-OLA $[M+H]^+$: 329.4→272.2, Rt:7.88; N-oxide-OLA $[M+H]^+$: 329.4→213.2, Rt:8.52; 10-N-glucuronide-OLA $[M+H]^+$: 489→355.12, Rt:1.56; OLA-SG $[M+H]^+$: 618→489, Rt:8.04

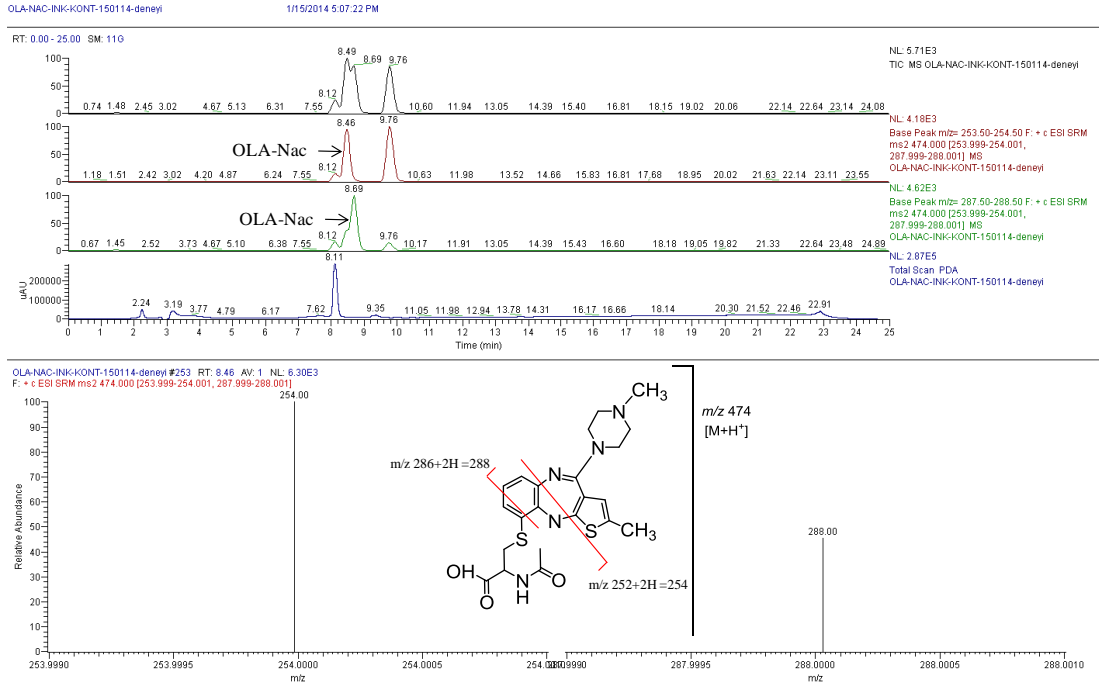
III.2.4. Olanzapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu Yoluyla GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması

OLA-Nac- Mikrozomal İnkübasyonu

Şekil III.28, OLA reaktif metabolitinin -Nac konjugatını göstermektedir.

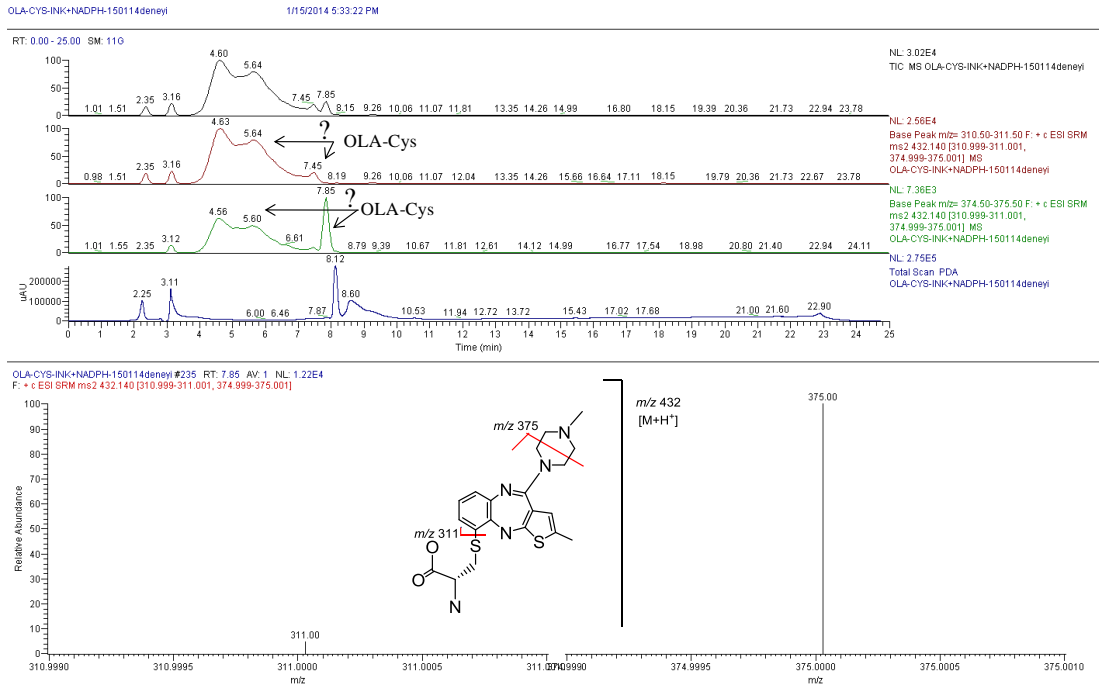


Şekil III.28. 100 μ M OLA-RLM (+NADPH) inkübasyonundaki OLA-Nac konjugatına ait SRM ve PDA kromatogramları ve kütle spektrumu. OLA-Nac [M+H]⁺: 474 \rightarrow 254, Rt:8.45; OLA-Nac [M+H]⁺: 474 \rightarrow 288, Rt:8.45

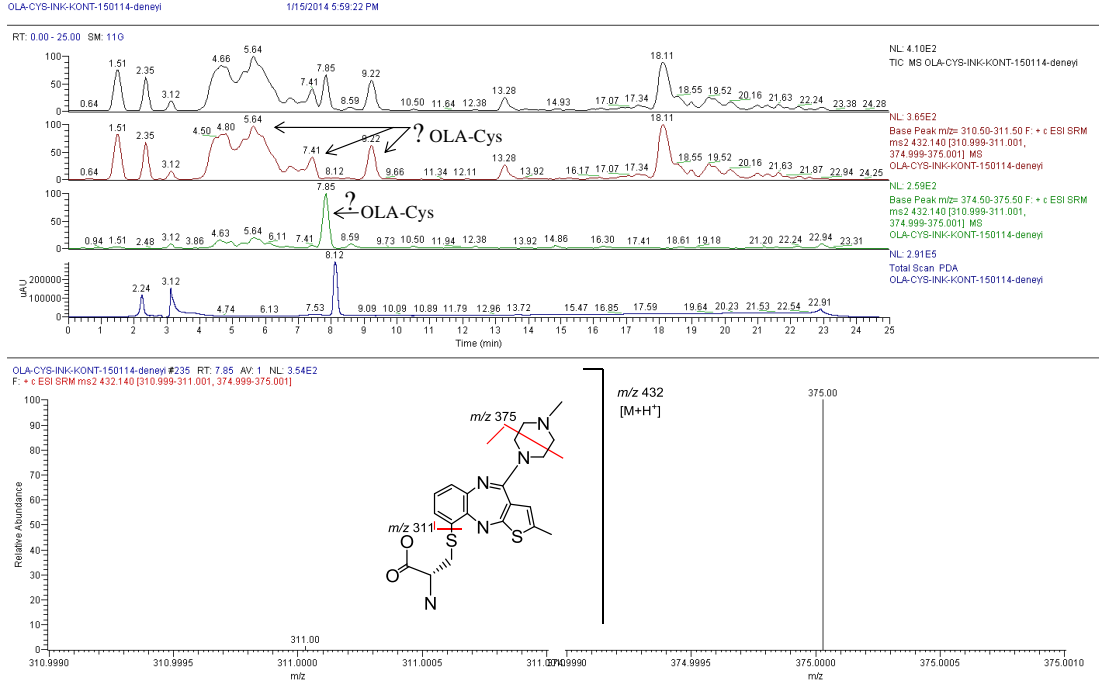


Şekil III.29. 100 μ M OLA-RLM (-NADPH) inkübasyonundaki OLA-Nac konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu. OLA-Nac [M+H]⁺: 474→254, Rt:8.46; OLA-Nac [M+H]⁺: 474→288, Rt:8.69.

OLA-Cys-Mikrozomal İnkübasyonu



Şekil III.30. 100 μ M OLA-RLM (+NADPH) inkübasyonundaki OLA-Cys konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu. OLA-Cys [M+H]⁺: 432.14→311, Rt:4.63; 5.64; 7.45 (?); OLA-Cys [M+H]⁺: 432.14→375, Rt:4.56; 5.60; 7.85 (?)

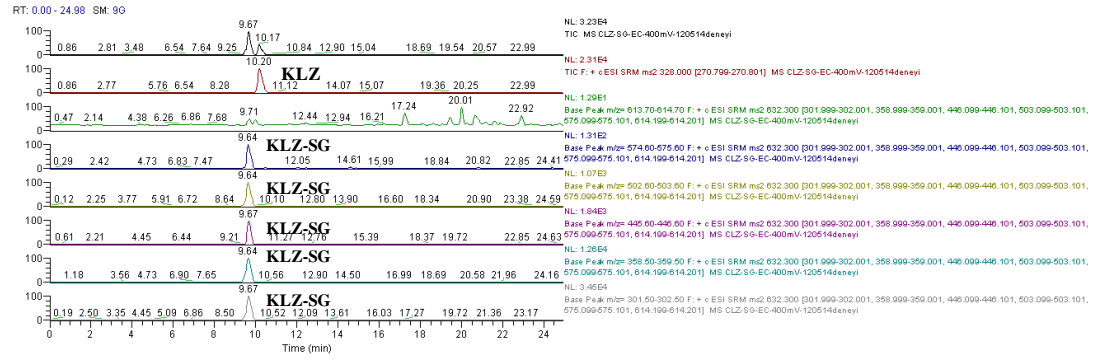


Şekil III.31. 100µM OLA-RLM (-NADPH) inkübasyonundaki OLA-Cys konjugatına ait SRM ve PDA kromatogramları ve kütle spektrumu. OLA-Cys [M+H]⁺: 432.14→311, Rt:4.80; 5.64; 7.41 (?); OLA-Cys [M+H]⁺: 432.14→375, Rt:7.85 (?)

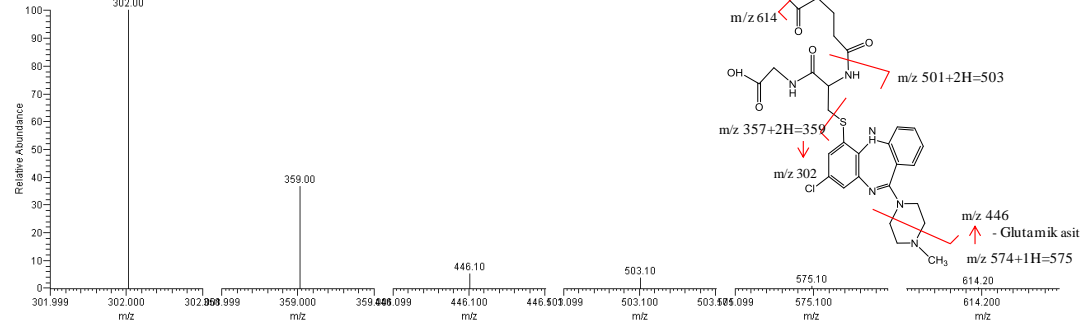
III.3. KLOZAPİN ÇALIŞMA SONUÇLARI

III.3.1. Klozapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Konjugatının Oluşturulması

Klozapin (KLZ), EK yöntemde 400 ve 600 mV uygulama yapılarak okside edilmiş ve ürün oluşumu incelenmiştir. Aşağıda ŞekilIII.32 ve 33'de 400 mV uygulama sonuçları verilmiştir, 600 mV'da metabolitler oluşmasına karşın çok daha düşük düzeyde kaldığından dolayı sonuçlar gösterilmemiştir.

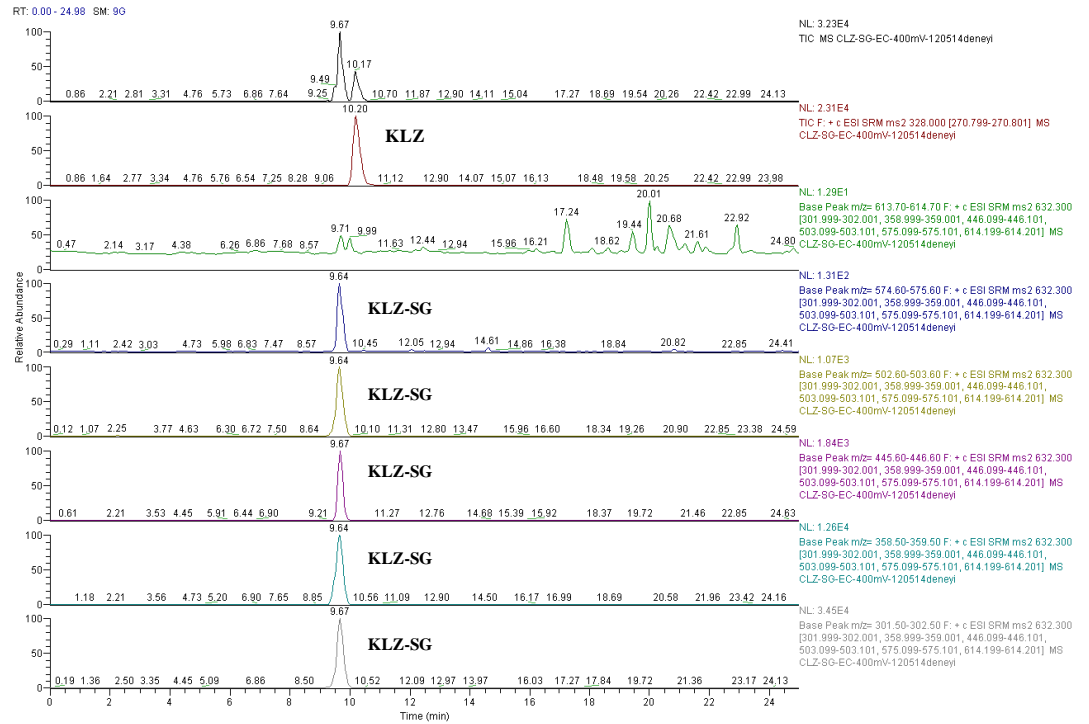


CLZ-SG-EC-400mV-120514deneyi #544 RT: 9.64 Av: 1 NL: 5.03E4
F: + c ESI SRM ms2 632.300 [301.999-302.001, 358.999-359.001, 446.099-446.101, 503.099-503.101, 575.099-575.101, 614.199-614.201]

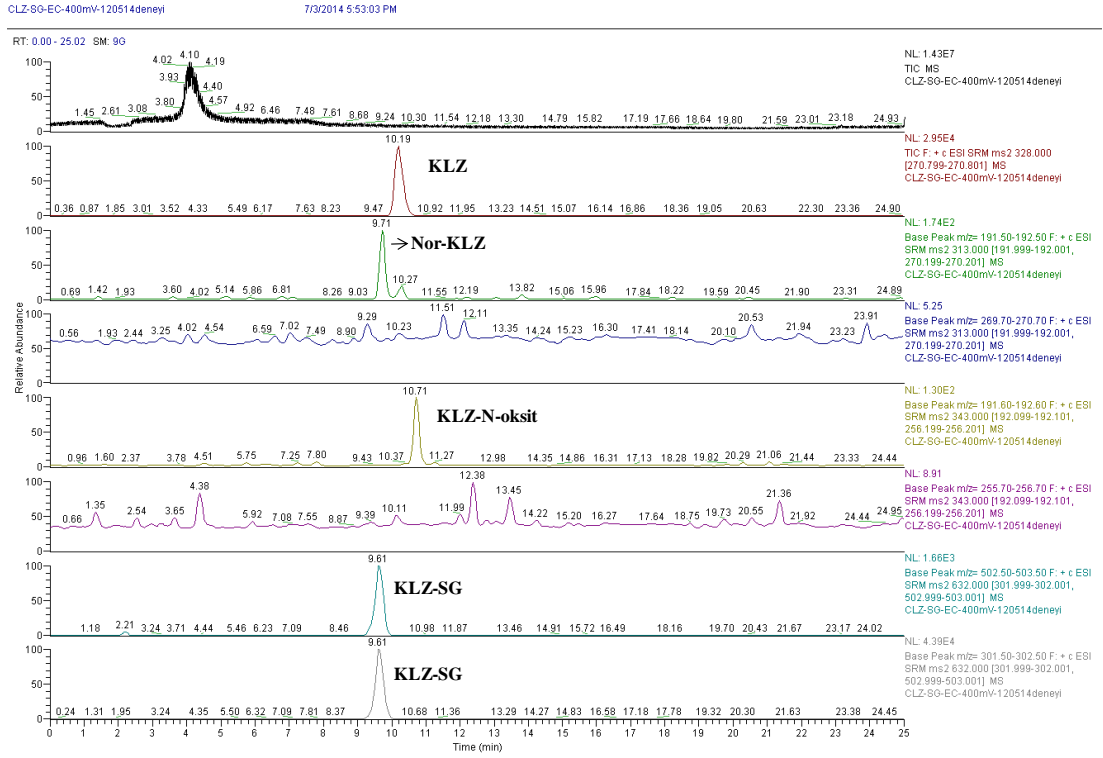


CLZ-SG-EC-400mV-120514deneyi

7/2/2014 7:52:35 PM

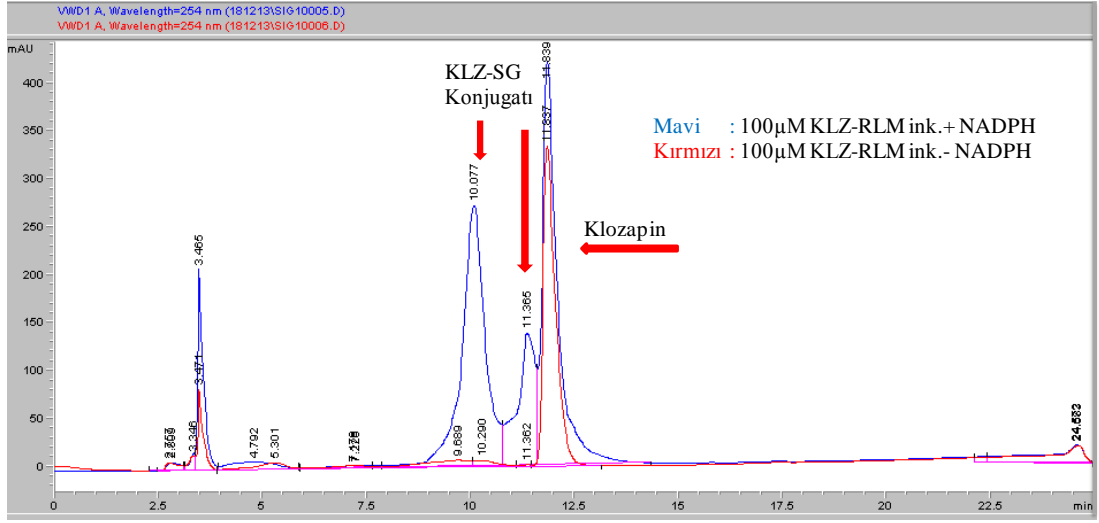


Şekil III.32. EK yöntemde 100 μ M KLZ ile oluşturulan GSH konjugatına (Analitik Hücre-400mV-birlikte) ait SRM kromatogramları ve izlenen kütle dönüşümleri. Alttağı şekilde piklerin büyütülmüş şekli gösterilmiştir. $[M+H]^+$: 328 \rightarrow 270.8; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632.3 \rightarrow 614.2; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632.3 \rightarrow 575.1; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632.3 \rightarrow 503.1; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632.3 \rightarrow 446.1; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632.3 \rightarrow 359.0; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632.3 \rightarrow 302

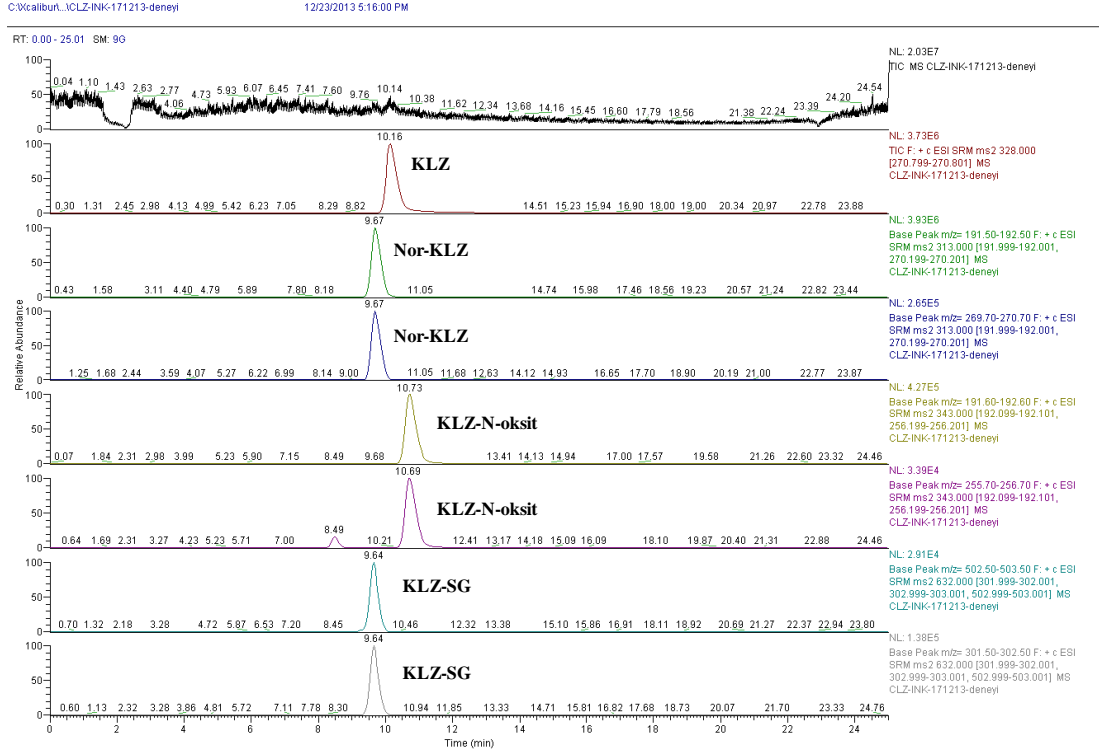


Şekil III.33. EC yöntemde 100 µMK ile oluşturulan GSH konjugatı ve stabil metabolitlere (Analitik Hücre-400mV-birlikte) ait SRM kromatogramları ve izlenen kütle dönüşümleri. KLZ $[M+H]^+$: 328→270.8; Nor-KLZ $[M+H]^+$: 313→192; Nor-KLZ $[M+H]^+$: 313→270.2; KLZ-N-oxide $[M+H]^+$: 343→192.1; KCLZ-N-oxide $[M+H]^+$: 343→256.2; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632→503; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632→302.

III.3.2. Klozapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu Yoluyla GSH Konjugatının Oluşturulması

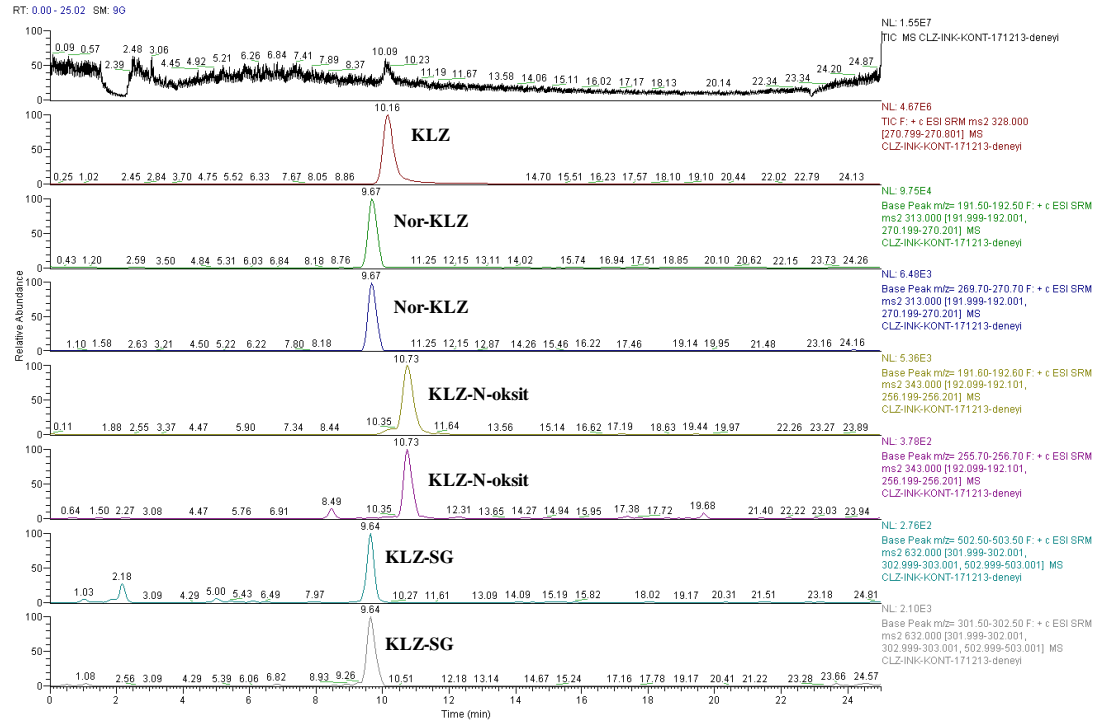


Şekil III.34. 100 µM KLZ-RLM inkübasyonunun azot altında yoğunlaştırılmasıyla elde edilen örneğe ait HPLC-UV kromatogramı (254 nm). Mavi iz: 100 µM KLZ-RLM inkübasyonu+NADPH. Kırmızı iz: 100 µM KLZ-RLM inkübasyonu-NADPH



Şekil III.35. KLZ-RLM inkübasyonu sonrasında (100 µM KLZ+NADPH) KLZ stabil metabolitleri ve KLZ-SG konjugatına ait SRM ve PDA kromatogramları. KLZ $[M+H]^+$: 328→270.8, Rt:10.16; Nor-KLZ $[M+H]^+$: 313→192, Rt:9.71; Nor-KLZ $[M+H]^+$: 313→270.2, Rt:9.71; KLZ-N-oksit $[M+H]^+$: 343→192.1, Rt:10.73; KLZ-N-oksit $[M+H]^+$: 343→256.2, Rt:70.73; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632→503, Rt:9.64; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632→302, Rt:9.64.

Ortama NADPH eklenmediğinde de aynı metabolitlerin oluşumu gözlenmiştir, ancak çok daha düşük düzeyde kalmıştır (Şekil III.36).



Şekil III.36. 100 μ M KLZ-RLM inkübasyonundaki (-NADPH) KLZ, KLZ stabil metabolitleri ve KLZ-SG konjugatına ait SRM, PDA kromatogramları ve kütle spektrumu. KLZ $[M+H]^+$: 328 \rightarrow 270.8, Rt:10.16; Nor-KLZ $[M+H]^+$: 313 \rightarrow 192, Rt:9.71; Nor-KLZ $[M+H]^+$: 313 \rightarrow 270.2, Rt:9.71; KLZ-N-oxide $[M+H]^+$: 343 \rightarrow 192.1, Rt:10.73; KLZ-N-oxide $[M+H]^+$: 343 \rightarrow 256.2, Rt:70.73; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632 \rightarrow 503, Rt:9.64; KLZ-SG $[M+H]^+$: 632 \rightarrow 302, Rt:9.64.

BÖLÜM IV

IV.TARTIŞMA

IV.1. PARASETAMOL ÇALIŞMA SONUÇLARININ TARTIŞMASI

IV.1.1. Parasetamolün SV Yöntemiyle Oksidasyonu Tartışması

Yapmış olduğumuz açık ortam oksidasyon çalışmalarında öncelikle PAR'ın laboratuvarımız koşullarındaki oksidasyon potansiyeli belirlendi ve sonuç olarak 0.37 V bulundu. Yapılan literatür araştırmalarına göre Parasetamol 0.6 V da okside olurken çalışmamızda bu değer 0.37 V olarak belirlenmesinin sebebi, kullanılan referans ve çalışma elektrotlarının farklı olması olabilir, çalışmalarımızda Referans Elektrot olarak Glassy Carbon, çalışma elektrodu olarak ise Pencil Grafit Elektrot kullanılmıştır. PAR+GSH'un birlikte okside edilmesine karar verildikten sonra bu yöntem için tekrar optimum oksidasyon potansiyeli araştırıldı ve 0.6V olarak belirlendi.

En yüksek miktarda GSH konjugatı oluşumu, GSH ve parasetamolün birlikte okside edildiği örnekte saptanmıştır. GSH'ın sonra ilave edildiği, aynı miktarda potansiyel uygulanmış örneğe göre fark yaklaşık 350 kattır (Şekil III.1).

Yapılan LC-MS/MS analizi sonuçlarına göre enzimlerle ve elektrokimyasal yolla elde edilen konjugatın aynı olduğu görülmüştür ($t_{EC}=8.70$; $t_{MİK}=8.71$); (Şekil III.4 ve 5). Ancak SV yöntemle oluşturulan konjugat miktarı enzimatik ve EK yöntemle oluşturulanın altında kaldığı için kullanılmasının yararı olmadığına karar verildi.

IV.1.2. Parasetamolün Çevrim-içi EK Yöntemle Oksidasyonu Tartışması

Sonuçlar EK detektörü (Koruyucu hücre-Guard Cell) ile yapılan oksidasyon çalışmalarının siklik voltametriye göre 5.8 kat daha fazla ürün oluşturduğunu göstermektedir.

Enzimlerle elde edilen konjugat miktarıyla bir kıyaslama yapmak gerekirse, EK yöntemle yapılan oksidasyon sonucunda oluşturulan konjugat enzimlerle elde edilenin yaklaşık 6 katı kadardır (Şekil III.7). EK yöntemin biyolojik yöntem olan mikrozomal inkübasyona göre 6 kat daha fazla konjugat oluşturmasının yanında en az onun kadar önemli bir diğer üstünlüğü, reaksiyon ortamında GSH ve ana ilaç molekülü dışında hiçbir kimyasal içermemesidir. Bu da daha sonra konjugat saflaştırması açısından büyük kolaylık sağlamaktadır.

IV.1.2.1. NAPQI-SG Oluşumu Üzerine Etkili Faktörlerin Belirlenmesi Tartışması

Her reaktif/elektrofilik metabolitin fizikokimyasala ve elektronik özelliklerinden dolayı kendine özgü bir reaksiyon kinetiği vardır. NAPQI da, 600 mV oksidasyon potansiyeli, pH 8.50 ve 250 mM GSH varlığında en yüksek oranda konjugat oluşturmaktadır.

IV.1.2.2. NAPQI'in GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması Tartışması

NAPQI'in Cys ve Nac konjugatları hem EK, hem de mikrozomal yolla üretilmiş ve sonraki çalışmalar için referans madde olarak saflaştırılmaları mümkün olmuştur.

IV.2. OLANZAPİN ÇALIŞMA SONUÇLARI TARTIŞMASI

IV.2.1. Olanzapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Konjugatı Oluşturulması Tartışması

Yapılan çalışmalarda olanzapinin 0.6 V da okside olup OLA-SG konjugatını oluşturduğu gözlenmiştir. SRM yöntemiyle OLA-SG $[M+H]^+$: 618→ 489 ve 543 dönüşümleri izlenmiş ve 489 kütleli parçalanma ürününün 543'e göre daha fazla oluştuğu görülmüştür (618→ 489 → 4.15 xE⁵; 618 → 543 → 2.92 xE⁴). EK ile mikrozomal inkübasyon kıyaslandığında EK'nın yaklaşık 9,8 kat daha yüksek sonuç verdiği görülmektedir (EK'deki konjugat sinyali 5,53 xE⁵ (SRM) iken mikrozomal inkübasyondaki konjugat sinyali 5.59xE⁴ (SRM) düzeyindedir-Mikrozomal inkübasyondaki analiz koşulları EK ile aynıdır).

IV.2.2. Olanzapinin Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması Tartışması

OLA-Nac-EK-Konjugatı

Yapılan çalışmalar sonucunda OLA-Nac konjugat ürünü EK yöntemle oluşturulabilmiştir. Şekil III.22.'de ilgili konjugat ürününün moleküler iyonu m/z 474, 8.51.dk.'da görülmektedir. Şekil III.23'te ise yine aynı OLA-Nac konjugatının LC-MS/MS, SRM kromatogramı ve kütle spektrumu görülmektedir. Analiz sonuçlarına bakıldığında beklenen tüm fragmentlerin çok net bir şekilde oluştuğunu görüyoruz. 5 fragment arasından en yüksek oranda m/z 254 ve m/z 288 oluşmuştur.

OLA-Cys-EK-Konjugatı

Yapılan çalışmalar sonucunda OLA-Cys konjugat ürünü EK yöntemle oluşturulmaya çalışılmıştır. Şekil III.24.'te ilgili konjugat ürününün moleküler iyonu m/z 432 10.05.dk.'da görülmektedir. Şekil III.25'te ise yine aynı OLA-Cys konjugatının LC-MS/MS, SRM kromatogramı ve kütle spektrumu görülmektedir. Analiz sonuçlarına bakıldığında SRM analizinde 5.33.dk.'larda pikler gözlenmiş fakat inkübasyon çalışmasında 7.45-7.85.dk.'larda da pikler gözlemediğinden OLA-Cys konjugatının tam olarak oluştuğundan emin olunamamıştır.

IV.2.3. Olanzapinin Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu Yoluyla GSH Konjugatı Oluşturulması Tartışması

OLA sıçan karaciğer mikrozomları ile inkübe edilerek olası reaktif ve bilinen stabil metabolitleri analiz edilmiştir. İnkübasyon ortamına redükleyici kofaktör NADPH eklenmediği kontrol inkübasyonunda –SG konjugatı ve diğer stabil metabolitler, NADPH varlığında oluşan miktarlara göre çok daha az (10-100 kat) olmakla birlikte yine de oluşmuştur, tablo sinyal yoğunluklarını göstermektedir.

Tablo III.1. OLA-SG mikrozomal inkübasyonu için yoğunlukların gösterildiği sonuç tablosu

OLA Metabolit	Metabolit sinyali	Metabolit sinyali
	+NADPH	-NADPH
OLA	2.97 E7	3.29 E7
N-Desmetil OLA	3.82 E5	3.50 E3
2-OH-OLA	1.58 E6	1.06 E4
N-Oxide-OLA	1.87 E5	1.50 E3
N-Glukronid	1.39 E2	-
OLA-SG	2.22 E4	1.20 E3

İlginç bir şekilde NADPH eklenmeyen inkübasyonlarda N-glukronid konjugatı oluşmamıştır.

IV.2.4. Olanzapinin Sıçan Karaciğer Mikrozoal İnkübasyonu Yoluyla GSH Dışı Nükleofilik Bileşiklerle Konjugatının Oluşturulması Tartışması

OLA-Nac konjugatı full analizde 8.51 de pik vermiş fakat PDA'da aynı oranda pik görülmemiştir. Ayrıca srm analizinde de 8.43 ve 8.53 lerde pikler gözlenmiştir.

OLA-Nac-Mikrozoal İnkübasyonu

OLA-Nac-İNK için daha önceki verilere dayanarak en yüksek oranda oluşan iki fragmentin kullanıldığı bir SRM yöntemi kuruldu ve 8.45. dakikada pikler gözlemlendi. (Şekil III.23), 254 kütleli fragment daha yüksek oranda oluşmuştur.

Tablo III.2. OLA-Nac mikrozoal inkübasyonu için yoğunlukların gösterildiği sonuç tablosu

Kütle Dönüşümü (m/z)	Metabolit sinyali +NADPH	Metabolit sinyali -NADPH
474→254	1.62 E6	4.18 E3
474→288	6.47 E5	4.62 E3

OLA-Cys-Mikrozoal İnkübasyonu

OLA-Cys-İNK için daha önceki verilere (EK analiz sonuçlarına) dayanarak en yüksek oranda oluşan iki fragmentin kullanıldığı bir SRM yöntemi kuruldu ve 311 kütleli fragmentin daha yüksek oranda oluştuğu görüldü (Şekil III.25).

Tablo III.3. OLA-Cys mikrozoal inkübasyonu için yoğunlukların gösterildiği sonuç tablosu

Kütle Dönüşümü (m/z)	Metabolit sinyali +NADPH	Metabolit sinyali -NADPH
432.14→311	2.56 E4	3.65 E2
432.14→375	7.36 E3	2.59 E2

Yapılan SRM analizi sonucundaki piklerin ayrımının çok net olmadığı görülmüş ve bu nedenle OLA-Cys konjugasyon ürünün frgmentleri hakkında çok net bir sonuca varılamamıştır. Kontrol amacıyla yapılan -NADPH çalışmasında da yoğunluklar azalmış ve farklı yerlerde pikler gözlenmiştir.

IV.3. KLOZAPİN ÇALIŞMA SONUÇLARI TARTIŞMASI

IV.3.1. KLZ'in Çevrim-içi EK Yöntemle GSH Konjugatı Oluşturulması Tartışması

KLZ elektrokimyasal oksidasyonu için 400 ve 600 mV denenmiş ve aşağıdaki kütle dönüşümleri LC-MS/MS ile araştırılmıştır:

KLZ $[M+H]^+$: 328→270,8

KLZ-SG $[M+H]^+$: 632→614, 575, 503, 446, 359, 302.

Elde edilen LC-MS/MS analizi sonucunda 400 mV'da 614 dönüşümü dışındaki tüm dönüşümler net bir şekilde gözlenmiştir.

Aynı örnekte KLZ stabil metabolitleri de araştırılmış, yine KLZ-n-oksit ve nor-KLZ stabil metabolitlerine ait fragmentler gözlenmiştir.

KLZ $[M+H]^+$: 328→270.8

KLZ-SG $[M+H]^+$: 632→503, 302

KLZ-N-oksit $[M+H]^+$: 343→192, 256

Nor-KLZ $[M+H]^+$: 313→192, 270

Aynı çalışma 600 mV'da da yapılmış ancak 400mV'a göre yarısı kadar metabolit oluşumu gözlenmiştir.

IV.3.2. KLZ Sıçan Karaciğer Mikrozomal İnkübasyonu Yoluyla GSH Konjugatı Oluşturulması Tartışması

KLZ sıçan karaciğer mikrozomları ile inkübe edilerek olası reaktif ve bilinen stabil metabolitleri analiz edilmiştir. Ayrıca OLA'da olduğu gibi NADPH'ın reaksiyon üzerindeki etkisi de incelenmiştir. EC yöntemle oluşturulan metabolitler için izlenen kütle dönüşümleri, LC-MS/MS analizinde mikrozomal inkübasyonlar için de izlenmiştir.

HPLC sonuçlarına göre ortamda NADPH olduğunda 10.07 ve 11.36.dk'larda gelen pikler -NADPH durumunda gözlenmemiştir, 11.8.dk'da gözlenen pikin ise KLZ'e ait olduğu düşünülmektedir.

Yapılan LC-MS/MS analiz sonuçlarına göre KLZ-SG+NADPH ve KLZ-SG-NADPH analizinde metabolit miktarları OLA için olduğu gibi yaklaşık 100 kat düşüktür.

Mikrozomal ve EK olarak oluşturulan KLZ-SG konjugasyon ürünleri kıyaslandığında mikrozomlarla elde edilen konjugasyon ürünlerinin daha yüksek oranda olduğu görülmüştür.

IV.4. Genel Tartışma

Tez çalışmasına konu olan parasetamol, olanzapin ve klozapin’le yapılan bu çalışmalar sonucunda, *in vitro* klinik öncesi ilaç geliştirme çalışmalarından “reaktif metabolit oluşumu taraması” için test ve analiz yöntemleri kurulmuştur. Tezin ana konusunu oluşturan elektrokimyasal yolla metabolit üretimi düzeneği laboratuvar koşullarımıza uyarlanmış, bu yolla üretilen metabolitlerin çalışılan 3 ilaç için biyolojik uygunluğu, yani elektrokimyasal yolla oluşturulan metabolitlerin vücutta oluşanlarla aynı olduğu gösterilmiştir. Böylece elektrokimyasal yolla saf olarak oluşturulabilen bu metabolitlerin gerektiğinde referans madde olarak yüksek miktarda üretilebilmelerinin hazırlıkları yapılmıştır.

İlaç ana molekülleri ve metabolitlerinin LC-MS/MS tekniği kullanılarak hassas, seçici ve doğru analizleri için SRM yöntemleri kurulmuş, tez sonrası için planlanan ve bu ilaçları kullanan hastaları kapsayacak ilaç biyotransformasyonu ve klinik toksisite ilişkisi çalışmalarının hazırlıkları yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Orhan H, Vermeulen NPE. Conventional and Novel Approaches in Generating and Characterization of Reactive Intermediates from Drugs/Drug Candidate. *Curr Drug Metab* 2011;12:383-394.
2. Phenobarbital and its sodium salt. IARC Summary & Evaluation, Volume 79, 2001: p. 161.
3. Fry JR, Garle MJ, Lal K. Differentiation of cytochrome P-450 inducers on the basis of 7-alkoxycoumarin O-dealkylase activities. *Xenobiotica* 1992; 2(2): 211-215.
4. Orhan H, Vermeulen NP, Sahin G, Commandeur JN. Characterisation of thioether compounds formed from potentially nephrotoxic alkaline degradation products of enflurane. *Anesthesiology* 2001;95(1):165-175.
5. de Rooij BM, Boogaard PJ, Commandeur JN, van Sittert NJ, Vermeulen NP. Allylmercapturic acid as urinary biomarker of human exposure to allyl chloride. *Occup Environ Med* 1997;54(9):653-661.
6. Lohmann W, Karst U. Electrochemistry meets enzymes: instrumental on-line simulation of oxidative and conjugative metabolism reactions of toremifene. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394(5):1341-1348.
7. Lohmann W, Karst U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: Strategies, advantages and limitations. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391:79-96.
8. Alderson NL, Walla MD, Hama H. A novel method for the measurement of in vitro fatty acid 2-hydroxylase activity by gas chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res* 2005;46(7): 1569-1575.
9. Tolando R, Heyward S, Chesebrough M, Lee JY, Moeller T. Time-dependent changes in enzymatic phase I and phase II activities in plated human hepatocytes. *Drug Metab Rev* 2010;42(1):323.
10. Ertaş FN, Tural H, Gökçel İ. Enstrümental Analiz 1 Elektroanalitik Yöntemler. 3.Baskı. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Yayın No: 186; 121-124

11. Alvarez-Lueje A, Perez M, Zapata C. Electrochemical Methods for the In Vitro Assessment of Drug Metabolism. In: Dr. James Paxton, editor. Topics on Drug Metabolism. 2012:222-246. ISBN: 978-953-51-0099-7.
12. Lohmann W, Karst U. Simulation of the detoxification of paracetamol using on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2006;386(6):1701-1708.
13. Brett AM1, Grazina MM, Macedo TR, Oliveira C, Raimundo D. A study of the electrochemical oxidation of Navelbine. *J Pharmaceut Biomed* 1993;11(3):203-6.
14. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods*. Newyork: Wiley; 2001.
15. ESA Coulochem II Operating Manual, 1997.
16. Lohmann W, Karst U. Generation and identification of reactive metabolites by electrochemistry and immobilized enzymes coupled on-line to liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 2007;79(17):6831-6839.
17. Madsen KG, Olsen J, Skonberg C, Hansen SH, Jurva U. Development and Evaluation of an Electrochemical Method for Studying Reactive Phase-I Metabolites: Correlation to in Vitro Drug Metabolism. *Chem Res Toxicol* 2007; 20:821-831.
18. Permentier HP, lohman BAP, Bischoff R. Electrochemistry-mass spectrometry in drug metabolism and protein research. *Med Chem* 2008;8(1):46-56.
19. Freedman R. Schizophrenia. *New Engl J Med* 2003;349(18):1738-49.
20. Gelenberg AJ. The prevalence and impact of depression. *J Clin Psychiat* 2010; 71(3):e06.
21. Ansermota N, Brawand-Ameya M, Kottelata A, Eap CB. Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr A* 2013;1292:160–172.
22. Murphy AT, Lake BG, Bernstein JR, Franklin RB, Gillespie TA. Characterization of Olanzapine (LY170053) in Human Liver Slices by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom* 1998;33:1237-1245.
23. Komossa K, Rummel-Kluge C, Hunger H, Schmid F, Schwarz S, et al. Olanzapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Db Syst Rev* 2010;3:CD006654.

24. Bymaster F, Perry KW, Nelson DL, Wong DT, Rasmussen K, et al. Olanzapine: a basic science update. *Brit J Psychiat Suppl*, 1999;37:36–40.
25. Lehman AF, Lieberman JA, Dixon LB, McGlashan TH, Miller AL, Perkins DO, et al. Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition. *Am J Psychiat* 2004; 161-2:1-56.
26. Jones PB, Barnes TR, Davies L, Dunn G, Lloyd H, Hayhurst KP et al. Randomized controlled trial of the effect on Quality of Life of second- vs first-generation antipsychotic drugs in schizophrenia: Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study (CUtLASS 1). *Arch Gen Psychiat* 2006;63(10):1079-87.
27. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K. et al. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011;44(6):195-235.
28. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. *Clin Pharmacokinet* 1999;37: 177–193.
29. Kassahun K, Mattiuz E, Nyhart E, Obermeyer B, Gillespie T, Murphy A et al. Disposition and biotransformation of the antipsychotic agent olanzapine in humans. *Drug Metab Dispos* 1997;25(1):81-93.
30. Safferman A, Lieberman JA, Kane JM, Szymanski S, and Kinon B. Update on the clinical efficacy and side effects of clozapine. *Schizophrenia Bull* 1991;17(2):247–261.
31. Buchanan RW .Clozapine: efficacy and safety. *Schizophrenia Bull* 1995;21:579–591.
32. Wagstaff AJ and Perry CM. Clozapine: in prevention of suicide in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *CNS Drugs* 2003;17:273–280.
33. Hummer M, Kurz M, Kurzthaler I, Oberbauer H, Miller C, and Fleischhacker WW. Hepatotoxicity of clozapine. *J Clin Psychopharm* 1997;17:314–317.
34. Mercolini L, Bugamelli F, Kenndler E, Boncompagni G, Franchini L, Raggi M. A. Simultaneous determination of the antipsychotic drugs levomepromazine and clozapine and their main metabolites in human plasma by a HPLC-UV method with solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 2007;846:273–280.

35. Fischer V, Haar JA, Greiner L, Lloyd RV, and Mason RP. Possible role of free radical formation in clozapine (clozaril)-induced agranulocytosis. *Mol Pharmacol* 1991;40:846–853.
36. Liu ZC, Uetrecht JP. Clozapine is oxidized by activated human neutrophils to a reactive nitrenium ion that irreversibly binds to the cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:1476–1483.
37. Maggs JL, Williams D, Pirmohamed M, and Park BK. The metabolic formation of reactive intermediates from clozapine, a drug associated with agranulocytosis in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:1463–1475.
38. Pirmohamed M, Williams D, Madden S, Templeton E, and Park BK. Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:984–990.
39. Centorrino F, Baldessarini RJ, Kando JC, Frankenburg FR, Volpicelli SA, and Flood JG. Clozapine and metabolites: concentrations in serum and clinical findings during treatment of chronically psychotic patients. *J Clin Psychopharm* 1994;14:119–125.
40. Dain JG, Nicoletti J, and Ballard F. Biotransformation of clozapine in humans. *Drug Metab Dispos* 1997;25:603–609.
41. Schaber G, Wiatr G, Wachsmuth H, Dachtler M, Albert K, Gaertner I, and Breyer-Pfaff U. Isolation and identification of clozapine metabolites in patient urine. *Drug Metab Dispos* 2001;29: 923–931.
42. Damsten MCA, van Vugt-Lussenburg BMA, Zeldenthuis T, de Vlieger JS, Commandeur JNM, and Vermeulen NPE. Application of drug metabolising mutants of cytochrome P450 BM3 (CYP102A1) as biocatalysts for the generation of reactive metabolites. *Chem-Biol Interact* 2008;171:96–107.
43. Wen B, Ma L, Nelson SD, and Zhu M. High-throughput screening and characterization of reactive metabolites using polarity switching of hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Anal Chem* 2008;80:1788–1799.
44. Dragovic S, Boerma JS, van Bergen L, Vermeulen NPE, and Commandeur JNM. Role of human glutathione S-transferases in the inactivation of reactive metabolites of clozapine. *Chem Res Toxicol* 2010;23:1467–1476.
45. Barbara JE and Castro-Perez JM. High-resolution chromatography/time-of-flight MS/MS with in silico data mining is an information-rich approach to reactive metabolite screening. *Rapid Commun Mass Sp* 2011;25:3029–3040.

46. Rousu T, Pelkonen O, Tolonen A. Rapid detection and characterization of reactive drug metabolites in vitro using several isotope-labeled trapping agents and ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 2009;23:843–855.
47. Argoti D, Liang L, Conteh A, Chen L, Bershas D, Yu CP et al. Cyanide trapping of iminium ion reactive intermediates followed by detection and structure identification using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Chem Res Toxicol* 2005;18:1537–1544.
48. Li F, Lu J, and Ma X. Profiling the reactive metabolites of xenobiotics using metabolomic technologies. *Chem Res Toxicol* 2011;24:744–751.
49. Dragovic S, Gunness P, Ingelman-Sundberg M, Vermeulen NPE, Commandeur JNM. Characterization of Human Cytochrome P450s Involved in the Bioactivation of Clozapine. *Drug Metab Dispos* 2013;41:651–658.
50. Gardner I, Zahid N, Maccrimmon D, Uetrcht J. A comparison of the Oxidation of Clozapine and Olanzapine to Reactive Metabolites and the Toxicity of these Metabolites to Human Leukocytes. *Mol Pharmacol* 1998;53:991-998.
51. Leeuwen van SM, Blankert B, Kauffmann JM, Karst U. Prediction of clozapine metabolism by on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2005382:742-750.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kırcaali’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Bursa’da tamamladım.2007 yılında Bursa Erkek Lisesi (Süper Lise-Fen Bilimleri)’den mezun oldum ve aynı yıl Dumlupınar Üniversitesi Fen/Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’de başladığım lisans eğitimimi yatay geçiş sonucu geldiğim Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’de tamamlayarak, Temmuz 2012 de mezun oldum. Hemen ardından Eylül 2012’de Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım.