



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NİKOTİN ARA METABOLİTLERİNİN ve NİKOTİN
ANALOGLARININ SENTEZ, ANALİZ ve METABOLİZMALARI**

118000

FEYZA YILMAZ
DOKTORA TEZİ

118000

FARMASÖTİK KİMYA
ANABİLİM DALI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mert ÜLGEN

İSTANBUL - 2002

Çalışmalarım sırasında bilgi ve desteğinden yararlandığım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mert ÜLGEN'e, kıymetli fikir ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sevim ROLLAS'a, tezimin hazırlanması sırasında maddi ve manevi her türlü desteğini veren sevgili aileme sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	4
3. GİRİŞ ve AMAÇ	7
4. GENEL BİLGİLER.....	11
4.1 İlaç Metabolizması İle İlgili Genel Bilgiler.....	11
4.1.1 İlaç Metabolizması Çalışmalarının Gelişimi.....	11
4.1.2 İlaç Metabolizması Reaksiyonları ve Enzimleri	11
4.1.2.1 Faz I Reaksiyonları	12
4.1.2.2 Faz II Reaksiyonları.....	15
4.1.3 İlaç Metabolizmasının Tıbbi Açıdan Önemi.....	17
4.1.3.1 Farmakolojik Aktivasyon Yönünden İnceleme	17
4.1.3.2 Toksikolojik Aktivasyon Yönünden İnceleme	17
4.1.3.3 Detoksikasyon Yönünden İnceleme	17
4.1.4 İlaç Metabolizmasını Etkileyen Faktörler.....	18
4.1.4.1 Endojen Faktörler	18
(i) Fizyolojik faktörler	18
(ii) Patolojik faktörler	19
(iii) Genetik faktörler	19
4.1.4.2 Eksojen Faktörler.....	20
(i) Enzim indüksiyonu	21
(ii) Enzim inhibisyonu	22
(iii) Enzim aktivasyonu.....	22
4.1.5 İlaç Metabolizması Çalışmalarında Kullanılan Teknikler	22
4.1.5.1 <i>İn vitro</i> Çalışmalar	23
4.1.5.2 <i>İn vivo</i> Çalışmalar	23
4.1.5.3 Klinik Düzeyde Yapılan Metabolizma Çalışmaları.....	24
4.2 Tütün Alkaloidleri ve Diğer Tütün Kimyasalları	24
4.2.1 Major Tütün Alkaloidi Nikotin Keşfi	24

4.2.2	Nikotinin Kimyasal Özellikleri.....	25
4.2.3	Minör Tütün Alkaloidleri ve Kimyasal Özellikleri.....	26
4.2.4	Nikotin ve Benzeri Alkaloidlerin Bitkilerde Biyosentezi ve Metabolizması.....	27
4.2.5	Tütün Kullanımı Sırasında Oluşan Kimyasallar.....	29
	(i) Açillenmiş ve okside olmuş piridin alkaloidleri	29
	(ii) Tütünde bulunan nitrozaminler.....	30
4.3	Nikotinin Genel Farmakokinetiği ve Metabolizması.....	32
4.3.1	Nikotinin Farmakokinetiğine Genel Bakış	32
4.3.1.1	Nikotinin Absorbsiyonu.....	32
4.3.1.2	Nikotinin Dağılımı.....	32
4.3.1.3	Nikotinin Atılımı.....	33
4.3.1.4	Nikotinin Fizyolojik Etkileri.....	34
4.3.2	Nikotinin Metabolizması.....	35
4.3.2.1	Nikotinin <i>In vivo</i> Metabolizması	36
4.3.2.2	Nikotinin <i>In vitro</i> Metabolizması	42
	4.3.2.2.1 Karaciğer Dokusu İle Metabolizması	42
	4.3.2.2.2 Ekstrahepatik Dokularda Metabolizması.....	44
	(i) Akciğer dokusu ile metabolizması.....	45
	(ii) Beyin dokusu ile metabolizması	46
	(iii) Diğer ekstrahepatik dokulardaki metabolizması	48
4.3.2.3	Nikotin ve Kotininin Nikotinamid Nükleotid Türevleri	49
4.3.2.4	Nikotin Metabolizmasında Rol Oynayan Reaktif Ara Ürünler	50
4.3.3	Major Nikotin Metabolitlerinin Metabolizması.....	52
4.3.3.1	Nornikotinin Metabolizması	52
4.3.3.2	Kotininin Metabolizması.....	54
4.3.3.3	Norkotinin Metabolizması	58
4.3.4	Minör Nikotin Metabolitlerinin Metabolizması.....	59
4.3.4.1	4-(3-Piridil)-4-oksobutiramidin Metabolizması.....	59
4.3.4.2	4-(3-Piridil)-4-okso-N-metil butiramidin Metabolizması.....	60

4.3.5	Nikotin Alkaloidlerinin Farmakolojik ve Toksikolojik Açından İncelenmesi	60
4.4	Nikotin Metabolizmasında Enzimoloji.....	60
4.4.1	Nikotin Metabolizmasında Sitokrom P450 Enziminin Rolü	62
4.4.1.1	Kotinin Oluşum Mekanizması	63
4.4.2	Nikotin Metabolizmasında Flavın İçeren Monooksijenazlar (FMO)'ın Rolü	65
4.4.3	Nikotin ve Diğer Tütün Alkaloidlerinin Sitokrom P-450 ve FMO Tarafından Ekstrahepatik Metabolizması	65
4.4.4	Nikotin Metabolizmasında Enzim İndükleyici ve İnhibe Edici Ajanların Rolü.....	68
4.5	Nikotin ve Metabolitlerinin Genel Analiz Yöntemleri.....	70
4.5.1	Nikotin ve Metabolitlerinin Biyolojik Sıvılarda Tayini	70
4.5.1.1	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	73
4.5.1.2	Gaz Kromatografisi (GC)	73
4.5.1.3	Gaz Kromatografisi-Mass Spektrometrisi (GC-MS).....	76
4.5.1.4	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Mass Spektrometresi (LC-MS)	76
4.5.2	İnsan Organizmasında Nikotin ve Metabolitlerinin Tayini İçin Kullanılan Yeni Yöntemler.....	78
5.	GEREÇ ve YÖNTEM	80
5.1	Araç ve Gereçler	80
5.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	80
5.1.2	Kullanılan Elektronik Cihazlar	81
5.2	Yöntemler	82
5.2.1	Tersiyer Aminlerin (I ve II) Sentezi	82
5.2.2	Amidlerin (I a ve II a) Sentezi	82
5.2.3	Laktamların (I b ve II b) Sentezi.....	83
5.2.4	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	83
5.2.5	Preparatif Kalın Tabaka Kromatografisi (KTK).....	84
5.2.6	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	85
5.2.7	Karaciğer Mikrozomal Preparatının Hazırlanması	89

5.2.7.1	Mikrozomların Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler	89
5.2.7.2	Deney Hayvanları	89
5.2.7.3	Mikrozomal Süspansiyonun Hazırlanması	89
5.2.8	Beyin Homojenatının Hazırlanması	91
5.2.9	Enzim Kaynaklarının Fenobarbitalle İndüksiyonu	91
5.2.10	İnkübasyon	92
5.2.10.1	Standart Kofaktör Karışımları	92
5.2.10.2	Standart İnkübasyon Prosedürü	92
5.2.11	Ekstraksiyon	94
5.2.12	İnkübasyon Sonrası Elde Edilen Metabolik Ekstrelerin Kromatografik Sistemlere Uygulanması	94
5.2.13	Metabolik Ekstrelerde Substrat ve Metabolitlerinin Miktar Tayini	95
5.2.13.1	Standartların Hazırlanması	95
5.2.13.2	Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması	95
5.2.13.3	Doğruluk Testleri	96
5.2.13.4	Hesaplama Yöntemi	96
6.	BULGULAR	97
6.1	Sentezlenen Maddelerin Karakterizasyonu	97
6.1.1	Tersiyer Aminler	97
6.1.1.1	N-1'-Benzilnornikotin (I)	97
6.1.1.2	N-1'-(p-Klorobenzil)nornikotin (II)	99
6.1.2	Amidler	101
6.1.2.1	N-1'-Benzoilnornikotin (Ia)	101
6.1.2.2	N-1'-(p-Klorobenzil)nornikotin (IIa)	103
6.1.3	Laktamlar	105
6.1.3.1	N-1'-Benzilnorkotinin (Ib)	105
6.1.3.2	N-1'-(p-Klorobenzil)norkotinin (IIb)	106
6.2	Substratların Beyin Homojenatı İle Yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Bulgular	108
6.2.1	Nornikotinin Metabolizması İle İlgili HPLC ve TLC Bulguları	110
6.2.2	Kotininin Metabolizması İle İlgili HPLC ve İTK Bulguları	113
6.2.3	Norkotininin Metabolizması İle İlgili HPLC ve İTK Bulguları	118

6.3 Substratların Karaciğer Mikrozomları İle Yapılan Metabolizmasından	
Elde Edilen Bulgular	122
6.3.1 Nornikotinin Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları	123
6.3.1.1 Mikrozomal Ekstrelerde Nornikotin ve Olası	
Metabolitlerinin Miktar Tayini İle İlgili Bulgular	130
6.3.2 Kotininin Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları	135
6.3.2.1 Mikrozomal Ekstrelerde Kotinin ve Olası	
Metabolitlerinin Miktar Tayini İle İlgili Bulgular	139
6.3.3 Norkotininin Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları	145
6.4 Sentezlenen Substratların Karaciğer Mikrozomları İle Yapılan	
Metabolizmasından Elde Edilen Bulgular	149
6.4.1 N-1'-Benzilnornikotin (I) ve N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin	
(II)'in Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları	149
6.4.2 N-1'-Benzoilnornikotin (Ia) ve N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin	
(IIa)'in Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları	154
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	158
7.1 Araştırmamızda Kullanılan Substratlar ve Olası Metabolitlerinin Sentezi	
ve Karakterizasyonu	158
7.1.1 Tersiyer Aminler	158
7.1.2 Amidler ve Laktamlar	165
7.2 Substrat ve Metabolitlerin Kromatografik Analizleri	170
7.2.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	170
7.2.2 İnce Tabaka Kromatografisi	174
7.3 Biyolojik Sistemin Hazırlanması ve İnkübasyonlar	177
7.4 Ekstraksiyon	179
7.5 Substratların Beyin Homojenatıyla yapılan Metabolizmasından Elde	
Edilen Sonuçlar	180
7.5.1 Nornikotinin Metabolizması	180
7.5.2 Kotininin Metabolizması	182
7.5.3 Norkotininin Metabolizması	183
7.6 Substratların Karaciğer Mikrozomlarıyla Yapılan Metabolizmasından	
Elde Edilen Sonuçlar	184

7.6.1	Nornikotinin Metabolizması	185
7.6.1.1	Nornikotin ve Olası Metabolitlerinin Miktar Tayini	185
7.6.2	Kotinin Metabolizması.....	186
7.6.2.1	Kotinin ve Olası Metabolitlerinin Miktar Tayini.....	188
7.6.3	Norkotinin Metabolizması	189
7.6.4	Nornikotin Türevi Substratların Karaciğer Mikrozoamlarıyla Yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Sonuçlar	190
7.6.4.1	N-1'-benzilnornikotin (I)'in Metabolizması	190
7.6.4.2	N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin (II)'in Metabolizması	191
7.6.4.3	N-1'-benzoilnornikotin (Ia)'in Metabolizması	192
7.6.4.4	N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (IIa)'in Metabolizması	193
7.7.1	Beyin Homojenatı İle Yapılan Metabolik Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi	193
7.7.2	Karaciğer Mikrozoamları İle Yapılan Metabolik Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi.....	198
7.7.3	Nikotinamid Oluşumu İle İlgili Sonuçların Değerlendirilmesi.....	203
7.7.4	Nornikotin Türevi Substratların Karaciğer Mikrozoamlarıyla Yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi.....	205
8.	KAYNAKLAR	212
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	238

KISALTMALAR ve SİMGELER

asim.	: Asimetrik
E.I.	: Elektron impact
e.n.	: Erime noktası
F ₂₅₄	: 254 nm’de floresans gösteren silikajel
GC	: Gaz kromatografisi
HPLC	: High pressure liquid chromatography (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)
IR	: Infrared
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
KTK	: Kalın tabaka kromatografisi
LC	: Sıvı kromatografisi
Log P	: Partisyon katsayısı
MS	: Kütle spektrometrisi
NADPH	: Redüklenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
R _f	: Retensiyon faktörü
R _t	: Retensiyon zamanı
sim.	: Simetrik
Sit P450	: Sitokrom P450
UV	: Ultraviyole
$\nu_{maks.}$	: Maksimum absorpsiyon gösteren dalga sayısı
$\lambda_{maks.}$	: Maksimum absorpsiyon gösteren dalga boyu
ϵ	: Maksimum absorpsiyon gösteren dalga boyundaki molar absorptivite katsayısı
I	: N-1’-benzilnornikotin
Ia	: N-1’-benzoilnornikotin
Ib	: N-1’-benzilnorkotinin
II	: N-1’-(p-klorobenzil) nornikotin
IIa	: N-1’-(p-klorobenzoil) nornikotin
IIb	: N-1’-(p-klorobenzil) norkotinin

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1. N-1'-benzilnornikotin (I)'in IR spektrumu	98
Şekil 2. N-1'-benzilnornikotin (I)'in kütle spektrumu	98
Şekil 3. N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin (II)'nin IR spektrumu	100
Şekil 4. N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin (II)'nin kütle spektrumu	100
Şekil 5. N-1'-benzoilnornikotin (Ia)'nın IR spektrumu	102
Şekil 6. N-1'-benzoilnornikotin (Ia)'nın kütle spektrumu	102
Şekil 7. N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (IIa)'nın IR spektrumu	104
Şekil 8. N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (IIa)'nın kütle spektrumu	104
Şekil 9. N-1'-benzilnorkotinin (Ib)'nin IR spektrumu	106
Şekil 10. N-1'-(p-klorobenzil) norkotinin (IIb)'nin IR spektrumu	107
Şekil 11. Nornikotinin sıçan beyin homojenatı ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	110
Şekil 12. Substrat olarak nornikotinin kullanıldığı beyin homojenatı karışımlarına ait İTK kromatogramları.....	113
Şekil 13. Kotininin sıçan beyin homojenatı ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	114
Şekil 14. Substrat olarak kotininin kullanıldığı beyin homojenatı karışımlarına ait İTK kromatogramları.....	118
Şekil 15. Norkotininin sıçan beyin homojenatı ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	119
Şekil 16. Substrat olarak norkotininin kullanıldığı beyin homojenatı karışımlarına ait İTK kromatogramları.....	122
Şekil 17. Nornikotinin sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	124
Şekil 18. Nornikotinin sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen metabolik ekstrelerin diode-array detektör bağlı HPLC sistemi ile elde edilen kromatogramları.....	127
Şekil 19. Nornikotin setine ait bileşiklerin miktar tayininde kullanılan kalibrasyon eğrileri.....	131

Şekil 20. Nornikotin setine ait bileşiklerin miktar tayini çalışmasından elde edilen HPLC kromatogramları	133
Şekil 21. Kotininin sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	135
Şekil 22. Kotinin metabolik ekstrelerinin B ₅ HPLC programı ile elde edilen kromatogramları	138
Şekil 23. Kotinin setine ait bileşiklerin miktar tayininde kullanılan kalibrasyon eğrileri.....	141
Şekil 24. Kotinin setine ait bileşiklerin miktar tayini çalışmasından elde edilen HPLC kromatogramları	143
Şekil 25. Norkotininin sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	146
Şekil 26. N-1'-benzilnornikotinin (I) sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	150
Şekil 27. N-1'-(p-klorobenzil) nornikotinin (II) sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	152
Şekil 28. N-1'-Benzoilnornikotinin (Ia) sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	155
Şekil 29. N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotinin (IIa) sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları	157

TABLoların LİSTESİ

Tablo 4.1	Faz I reaksiyonları ve enzimleri.....	12
Tablo 4.2	Faz II reaksiyonları ve enzimleri	16
Tablo 4.3	İnsan vücut sıvılarında nikotin ve metabolitlerinin tanınmasında kullanılan HPLC yöntemleri.....	74
Tablo 4.4	İnsan vücut sıvılarında nikotin ve metabolitlerinin tanınmasında kullanılan GC-MS yöntemleri	75
Tablo 4.5	İnsan vücut sıvılarında nikotin ve metabolitlerinin tanınmasında kullanılan LC-MS yöntemleri.....	77
Tablo 5.1	İTK analizlerinde kullanılan belirteçler.....	84
Tablo 5.2	HPLC analizlerinde kullanılan kolonlar ve özellikleri	86
Tablo 5.3	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde kullanılan mobil fazlar	87
Tablo 5.4	Kotinin ve olası metabolitlerin ayırımı için denenen bazı isokratik HPLC sistemleri.....	87
Tablo 5.5	Kotinin ve olası metabolitlerin ayırımı için denenen gradient HPLC sistemleri.....	88
Tablo 5.6.	Sentezlenen substratlar ve olası metabolitlerinin ayırımı için kullanılan HPLC sistemleri.....	88
Tablo 5.7	Oksidatif mikrozomal metabolizma reaksiyonlarında kullanılan standart kofaktör karışımın içeriği ve miktarları	92
Tablo 5.8	<i>İn vitro</i> metabolizma deneylerinde test ve kontrol inkübasyon erlenlerinin genel içeriklerini gösteren protokol.....	94
Tablo 6.1	Beyin homojenatı ile yapılan <i>in vitro</i> metabolizma deneylerinde kullanılan test ve kontrol inkübasyon erlenlerinin içeriklerini gösteren deney protokolü	108
Tablo 6.2	Nornikotin, Kotinin ve Norkotinin substratları ve olası metabolitlerinin S ₁ HPLC programında elde edilen tutulma zamanları ...	109
Tablo 6.3	Substratlar ve olası metabolitlerinin İTK ile elde edilen R _{fx} 100 değerleri	109

Tablo 6.4	Karaciğer mikrozomları ile yapılan <i>in vitro</i> metabolizma deneylerinde kullanılan test ve kontrol inkübasyon erlenlerinin içeriklerini gösteren deney protokolü	122
Tablo 6.5	Nornikotin, kotinin ve norkotinin substratları ve olası metabolitlerinin S ₁ , S ₂ ve S ₃ HPLC programlarında elde edilen tutulma zamanları.....	123
Tablo 6.6	Nornikotin setine ait bileşiklerin linearitesi.....	130
Tablo 6.7	Nornikotin setine ait bileşiklerin tayininde metod performansı	132
Tablo 6.8	Kotinin setine ait bileşiklerin lineariteleri	139
Tablo 6.9	Kotinin setine ait bileşiklerin tayininde metod performansı.....	142
Tablo 6.10	Bileşik I; II; Ia; IIa ve olası metabolitlerinin S ₄ , S ₅ , S ₆ ve S ₇ HPLC programlarında elde edilen tutulma zamanları	149



1. ÖZET

Nikotin, tütün ürünlerinde en yüksek miktarda bulunan ve farmakolojik olarak en güçlü bir alkaloiddir. Nikotin metabolizması çok geniş kapsamda çalışılmış olmasına rağmen nikotin metabolitleri ve ara ürünlerinin *in vitro* metabolizması hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

Bu çalışmada ilk amaç nornikotin, kotinin ve norkotininin yani minör tütün alkaloidleri ya da nikotin metabolitleri olarak isimlendirilen bileşiklerin metabolik akibetlerini araştırmaktır.

İlgili substratlar ve olası metabolitlerinin ayrımı, teşhisi ve miktar tayini için hassas ve spesifik yöntemler geliştirildi. Hazır ve sentezlenmiş bileşikler UV- visible spektroskopi (UV), infrared spektroskopi (IR), mass spektrometresi (MS), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisine bağlanan UV spektroskopisi (HPLC-UV) gibi çeşitli yöntemlerle ayrıldı ve yapıları aydınlatıldı. Enzim kaynağı olarak sıçandan elde edilen beyin homojenatı ve karaciğer mikrozomları kullanıldı ve bulgular NADPH ile kuvvetlendirilmiş kontrol ve fenobarbitalle indüklenmiş olmak üzere iki ayrı grup olarak sunuldu. Substrat ve metabolitlerinin biyolojik ortamdan ayrımı sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile yapıldı. Bileşiklerin miktar tayini HPLC ile gerçekleştirildi.

Enzim kaynağı olarak sıçan beyin homojenatı ile nornikotin, kotinin ve norkotinin inkübe edildiğinde kendilerine karşılık gelen metabolitlerinin oluşmadığı görüldü. Bu inkübatlarda yalnızca nikotinamid tayin edildi.

Sıçan karaciğer mikrozomları ile nornikotinin metabolizmasında karşılık gelen laktam metaboliti norkotinin ve nikotinamid tespit edildi. Norkotinin metabolitinin miktarı fenobarbitalle indüklenmiş sıçan karaciğeri mikrozomları ile 127 nmol/mL, kontrol karaciğeri mikrozomları ile 80 nmol/mL olarak tayin edildi.

Kotininin metabolizması ile 5'-hidroksikotinin metaboliti ve nikotinamid tespit edildi. Metabolik deneylerde 3'-hidroksikotinin ve norkotinin metabolitleri gözlenmedi.

Fenobarbitalle indüklenmiş ve indüklenmemiş sıçan karaciğeri mikrozomları ile 5'-hidroksikotinin miktarı sırasıyla 28 ve 16 nmol/mL bulunmuştur. Bu durum metabolitin fenobarbitalle indüklenabilen sitokrom P450 izoenzimleri aracılığıyla oluşturulduğunu göstermektedir. Norkotinin inkübatlarında karşılık gelen ketoamid metaboliti olan 4-(3-piridil)-4-oksobutiramid tayin edilemedi. Mikrozomlarla birlikte kofaktör karışımı kullanıldığında mikrozomal inkübatlarda nikotinamidin oluşumu gözlemlendi. Bununla birlikte kofaktör karışımı yerine tampon çözelti içeren kontrol deneylerinde nikotinamid oluşumu görülmedi.

N-1'-benzilnornikotin (I) ve N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin (II)'in *in vitro* mikrozomal metabolizması substratların kendilerine karşılık gelen aldehit, amid ve laktam metabolitlerini oluşturup oluşturmayacağını tayin etmek için araştırıldı. Tersiyer aminlere ek olarak N-1'-benzoilnornikotin (Ia) ve N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (IIa) olarak isimlendirilen amidlerin *in vitro* mikrozomal metabolizması çalışıldı.

Tersiyer aminlerin karşılık gelen dealkilasyon ürünleri olan aldehit ve nornikotini oluşturduğu saptandı. N-1'-benzilnornikotin (I) substratı ile amid ve laktam metaboliti oluşumu gözlenmezken diğer tersiyer aminin (II) karşılık gelen amid ve laktama dönüştüğü görüldü. Amid substratlarının sıçan karaciğeri mikrozomları ile

nornikotine hidroliz olduğu tespit edildi. Sonuçlar, metabolik yolların mekanizmaları ve metabolitlerin olası toksik etkileri kapsamında tartışıldı.



2. SUMMARY

Synthesis, analysis and metabolism of nicotine metabolites and nicotine analogues

Nicotine is the most abundant and pharmacologically potent alkaloid present in tobacco products. Although nicotine metabolism has been studied in detail, less information on the *in vitro* metabolism of nicotine metabolites and its intermediates is available.

In this study, the first aim is to investigate the metabolic fates of nornicotine, cotinine and norcotinine, minor tobacco alkaloids or nicotine metabolites.

The sensitive and specific methods for the separation, identification and quantitation of the related substrates and their potential metabolites were developed. These compounds were separated and characterised by several methods, including UV-visible spectroscopy (UV), infrared spectroscopy (IR), mass spectrometry (MS), high performance liquid chromatography (HPLC) and high performance liquid chromatography coupled to UV-spectroscopy (HPLC-UV). Brain homogenate and hepatic microsomes obtained from rats were used as enzyme sources and the findings have been reported as two different groups by using control and induced with phenobarbitone fortified with NADPH. Separation of substrates and their metabolites from biological media was achieved by liquid-liquid extraction. Quantitation of these compounds was carried out by HPLC.

Nornicotine, cotinine and norcotinine failed to produce the corresponding metabolites when they were incubated with rat brain homogenate as an enzyme source. Only nicotinamide was detected in these incubates.

Following nornicotine metabolism, two compounds i.e. the corresponding lactam metabolite of norcotinine and nicotinamide were detected with rat hepatic microsomes. The amount of norcotinine metabolite was detected as 127 nmol/mL using phenobarbitone induced rat microsomes and 80 nmol/mL with controls.

Following the metabolism of cotinine, 5'-hydroxycotinine metabolite and nicotinamide were detected. No 3'-hydroxycotinine and norcotinine metabolites were observed in the metabolic experiments. The amount of 5'-hydroxycotinine was 28 and 16 nmol/mL by phenobarbitone induced and noninduced rat microsomes, respectively.

It indicates that the metabolite is formed via a phenobarbitone inducible isozyme of CYP450. In the norcotinine incubates, the corresponding ketoamide metabolite, 4-(3-pyridyl)-4-oxobutyramide was not detected. The formation of nicotinamide was observed in microsomal incubates when the cofactor mixture was used together with microsomes. However, there was no nicotinamide formation in the control experiments containing buffer solution instead of cofactor mixture.

The *in vitro* microsomal metabolism of N-1'-benzyl nornicotine (I) and N-1'-(p-chlorobenzyl) nornicotine (II) was carried out to establish if the substrates produce the corresponding aldehyde, amide and lactam as metabolites. In addition to tertiary amines, the *in vitro* microsomal metabolism of amides which was named as N-1'-benzoyl nornicotine (Ia) and N-1'-(p-chlorobenzoyl) nornicotine (IIa) was studied. The tertiary amines produced corresponding dealkylation products i.e. the corresponding aldehyde and nornicotine. No amide and lactam metabolite were observed with N-1'-benzyl nornicotine (I) as a substrate. However, the other tertiary amine (II) produced the corresponding amide and lactam. The amide substrate was hydrolysed by rat hepatic

microsomes to nornicotine. The results were discussed in relation to the possible mechanism of metabolic pathways and the possible toxic effects of metabolites.



3. GİRİŞ ve AMAÇ

Nicotiana türlerinde keşfedildiği günden günümüze kadar insanlık tarihinde önemli bir yer edinmiş olan nikotin, aynı zamanda bilimsel olarak sayısız araştırmanın konusu olmuştur. Bir eğlence aracı olarak kullanılmaya başlanması ancak zamanla kullananlarda bağımlılık meydana getirmesi ve bunun sonucu olarak da sağlık üzerinde meydana getirdiği son derece olumsuz ve zararlı etkileri hakkındaki sorular halen araştırmalar devam etmesine rağmen tam netlik kazanabilmiş değildir.

Sitokrom P450 enzimi taşıyan ekstrahepatik dokulardan beyin, ksenobiyotiklerin metabolizmasının en az araştırıldığı dokulardan biridir.

Beyin dokusu, taşıdığı sitokrom P450 ve flavin içeren monooksijenaz enzimleriyle ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin çoğunu metabolize edebilme yeteneğine sahiptir. Böylece de kan dolaşımı aracılığıyla beyne giren lipofilik karakterdeki bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlayabilir. Bununla birlikte P450 enziminin daha çok sinirlerde bulunması, burada hayati önem taşıyan ve rejenerasyon kabiliyeti yüksek olmayan hücrelerin biyoaktivasyonla zarar görmesine sebep olabilecektir (260).

Nikotinin deney hayvanlarına periferal verilmesinden sonra beyinde nornikotin, norkotinin ve kotinin metabolitlerinin varlığı tespit edilmiştir (60).

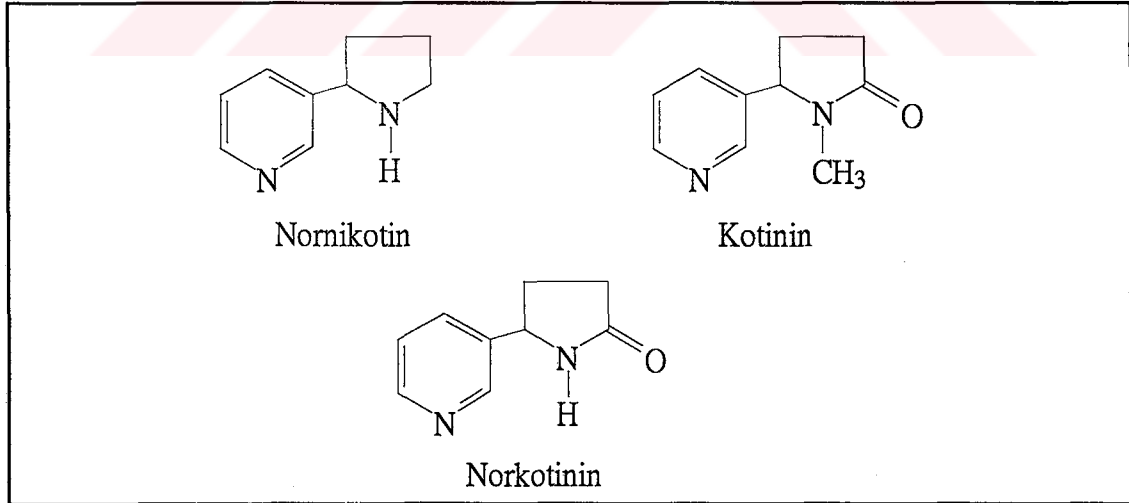
Nikotin metabolitlerinin nörokimyasal özelliğe sahip ve farmakolojik olarak da aktif olduğu bu konuda yapılan çok sayıda araştırmanın bir sonucudur. Özellikle nornikotinin, nikotinle oluşan fizyolojik cevaplarda önemli bir rol üstlendiği gözlenmiştir (19).

Periferal nikotin metabolitlerinin yapılarının aydınlatılması ve miktar tayini ile ilgili çok araştırma olmasına rağmen beyinde nikotin metabolizması ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Nikotinle oluşan santral sinir sistemi etkilerinin yalnızca nikotine atfedilemeyeceği, nikotin metabolitlerinin etkisi ile kısmen dahi olsa

sonuçlanabileceğinden dolayı, kronik nikotin alınımından sonra beyinde farmakolojik olarak aktif nikotin metabolitlerinin olası birikiminin toksik sonuçlara yol açabilmesi muhtemeldir. Bu nedenle nikotin ara metabolitlerinden nornikotin, norkotinin ve kotininin sıçan beyin homojenatı ile *in vitro* inkübasyonunu yapmak ve deney hayvanlarının fenobarbitalle muamelesi halinde substratların metabolik yollarını açığa çıkartmak araştırmamızın kapsamına alınmıştır.

Nikotin ve metabolitlerin insan ve deney hayvanlarında *in vivo* metabolizmasının araştırıldığı çok sayıda kaynak bulunmasına rağmen (216), ara metabolitlerin *in vitro* metabolik yollarının tespiti ve miktar tayinleri ile ilgili sınırlı sayıda bulgu mevcuttur.

Bu nedenle yine aynı nikotin ara metabolitlerinin (nornikotin, kotinin ve norkotinin) fenobarbitalle indüklenmiş ve indüklenmemiş sıçan karaciğer mikrozomlarını enzim kaynağı olarak kullanarak inkübasyonlarını yapmak ve bulunan metabolitlerin oluşumunda rol oynayan enzimatik sistemi araştırmak ve miktarlarını tayin etmek suretiyle karşılaştırmalarını sağlamak araştırmamızın hedef konularını oluşturmuştur.

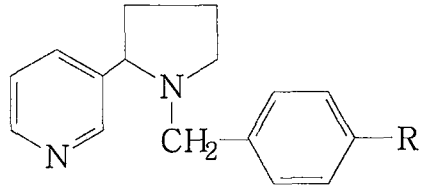


Sıçan beyin homojenatı ve karaciğer mikrozomlarını kullanarak kalitatif ve kantitatif metabolizması araştırılan nikotin ara metabolitleri

Nikotin ve metabolitlerinden nikotinamid nükleotid analoglarının oluşumunun bazı toksik olayların mekanizmasında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (283). Bu nedenle karaciğer ve beyin dokusu ile yapılan inkübasyonlarda nikotinamid metabolitinin oluşup oluşmadığı ve oluşumu halinde mekanizmasının tayini de incelenmiştir.

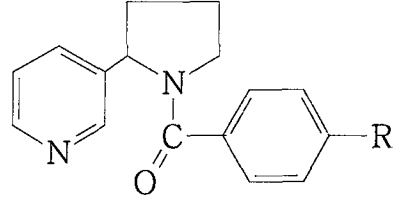
Tütün ürünlerinde en yüksek miktarda tespit edilmiş ve farmakolojik olarak da en güçlü bulunan alkaloid nikotin olmakla birlikte kompleks yapıdaki tütün alkaloidlerinden yalnızca bir tanesidir. Bağımlılarda tütün ürünlerinin kullanılması sonucu ortaya çıkan klinik tablo düşünüldüğünde bitki ekstraktlarından toplam 2200 bileşiğin izolasyonunun yapıldığı ve bunlardan şimdiye kadar yaklaşık yalnızca 500 tanesinin yapısının aydınlatıldığı üzerinde durulmasını gerektiren bir önem taşımaktadır. Bu nedenle araştırmamızın bir bölümünde önemli bir tütün alkaloidi ve aynı zamanda nikotin metaboliti olan nornikotin pirolidin halkasındaki azotun süstitüsüyonu ile oluşan N-1'-benzil ve N-1'-(p-kloro benzil) nornikotin de tütün içeriğinde bulunması olasılığı gözönüne alınarak tersiyer amin yapısındaki bu substratların metabolizması incelenmiştir. Nornikotin türevi olan benzilik tersiyer aminlerin metabolizması hakkında mevcut bilgi bulunmamakla birlikte son yıllarda yapılan bazı araştırmalar metabolizması incelenen sekonder ve tersiyer benzilik aminlerden kendilerine karşılık gelen amid ve laktam metabolitlerinin oluşumunu göstermektedir (108,313). Klinikte kullanılan ilaçların bir kısmının yapısı olan alisiklik aminlerin metabolizmasının araştırılması için elektrofilik araürünler olan iminyum iyonlarına dönüştürülebilecekleri ve sonra da kendilerine karşılık gelen amidlere okside olarak detoksikasyona uğradıkları esasına dayanan kaynaklar mevcuttur (116,239).

Bu verilere dayanarak benzilik tersiyer amin substratlarının olası metabolitlerinden olan ve aynı zamanda tütün içeriğinde olup, toksik oldukları tayin edilmiş N-açilnornikotin (172) yapısında olan N-1'-benzoil ve N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin de metabolik yollarının açığa çıkartılması araştırmamızın hedef konuları arasında yerini almıştır.



R=H -----> N-1'-benzyl nornikotin

R= Cl -----> N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin



R=H -----> N-1'-benzoil nornikotin

R= Cl -----> N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin

Sıçan karaciğer mikrozomları ile metabolizması araştırılan nornikotin türevi substratların yapısı

4. GENEL BİLGİLER

4.1 İlaç Metabolizması İle İlgili Genel Bilgiler

4.1.1 İlaç Metabolizması Çalışmalarının Gelişimi

İlaçların metabolizması ile ilgili yaygın çalışmalar "İlaçların Detoksifikasyonu" başlığı altında yazar Williams tarafından başlatılmıştır.

Yirminci yüzyılın ilk yarısından önce, vücuttaki ksenobiyotik (Yunancada xeno=yabancı, bio=yaşam) lerin organizmadaki akibetleri hakkındaki araştırmalar oldukça sınırlı olup yeterli teknoloji mevcut değildi. Ancak yirminci yüzyılın ortalarında ilaçların sentezi, üretimindeki artış, ilaçların inaktivasyon yollarının ve atılımlarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymuş ve dolayısıyla biyolojik sıvılarda ve dokularda substrat ve metabolitlerinin ayrımı ve miktar tayini yapılmaya başlanmıştır.

Organizmaya alınan yabancı maddeler üzerindeki kimyasal değişimler, biyolojik araştırmalar yapan çevrelerce "İlaç Metabolizması" disiplini altında isimlendirilmiştir.

4.1.2 İlaç Metabolizması Reaksiyonları ve Enzimleri

Vücuda alınan bir ilaç (ve diğer ksenobiyotikler), Faz I (fonksiyonalizasyon) ve Faz II (konjugasyon) reaksiyonları altında isimlendirilen metabolik reaksiyonlardan sonra atılır.

Genel bir deyimle, Faz I reaksiyonları oksidasyon, redüksiyon ve hidrolizi; Faz II reaksiyonları ise konjugasyon reaksiyonlarını içerir. Bir ksenobiyotiğin, Faz I reaksiyonuna uğramadan konjugasyonu söz konusu olabilirse de (Örn: parasetamol), genellikle çok sayıda bileşik önce Faz I sonra Faz II metabolizmasına uğrar.

4.1.2.1 Faz I Reaksiyonları

Faz I reaksiyonları ile yapıya hidroksil (-OH), amino (-NH₂), tiyol (-SH) ve karboksilli asit (-COOH) gibi polar fonksiyonel gruplar bağlanır. Bu reaksiyonlarla ilgili çalışmaların kapsamlı kaynakları mevcuttur (133,303). Faz I reaksiyonlarının ve ilgili enzimlerinin özetle belirtildiği liste Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Faz I Reaksiyonları ve Enzimleri

Reaksiyon Tipi	Enzim
Oksidasyon Reaksiyonları	
Aromatik hidroksilasyon	MFO
Alifatik hidroksilasyon	
Alisiklik hidroksilasyon	
Karbon-karbon çifte bağ epoksidasyon	
Aldehid oksidasyonu	
N-hidroksilasyon	MFO
N-oksidasyon	
Oksidatif deaminasyon	
N-dealkilasyon	
O-dealkilasyon	
S-dealkilasyon	MFO + Çözünebilir fraksiyon
S-oksidasyon	MFO / FMO
Desülfürasyon	MFO
Oksidatif dehalojenasyon	
Redüksiyon Reaksiyonları	
Aldehid grubunun redüksiyonu	Aldehid redüktaz
Keton grubunun redüksiyonu	Keton redüktaz
Azo redüksiyonu	NADPH'a bağlı azo redüktaz
Nitro redüksiyonu	Nitro redüktaz
N-oksit redüksiyonu	Mikrozomal nitro redüktaz Sitosolik nitro redüktaz
Nitroso redüksiyonu	Sitokrom P450
Hidroliz Reaksiyonları	
Esterlerin hidrolizi	Esterazlar
Amitlerin hidrolizi	Esterazlar Amidazlar
Epoksitlerin hidratasyonu	Epoksit hidrataz

Mikrozomal oksidasyonda

1. Substratın sit P450'ye bağlanması
2. Kandaki demirin redüksiyonu ($\text{Fe}^{+3}\text{-RH} \rightarrow \text{Fe}^{+2}\text{-RH}$)
3. Oksijenin Sit P450'ye bağlanması
4. Kompleksin oksidasyonu
5. Süperoksitin hidroperoksite redüksiyonu ($\text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2^{-2}$)
6. Okside olmuş substratın serbestleşmesi ve suyun oluşumu söz konusudur.

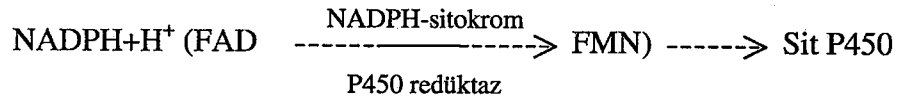
MFO (Karma Fonksiyon Oksidaz) Sisteminin Komponentleri

1. Sitokrom P450

Sitokrom P450 familyası, endoplazmik retikulum membranında bulunan oldukça kalabalık bir enzim ailesidir (222). Molekül ağırlığı her bir monomerinde 45.000-55.000 olan bu izoenzimler çoğu ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasından sorumludurlar. Bazı faktörler tarafından organizmadaki seviyeleri etkilenmektedir (Bkz. Bölüm 4.1.4).

2. NADPH-sitokrom P450 redüktaz

NADPH-sitokrom C redüktaz olarak da bilinen bu enzimin görevi $\text{NADPH}+\text{H}^+$ tarafından sağlanan redükleyici kısmı sitokrom P450'ye aktarmaktır.



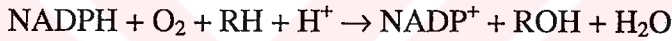
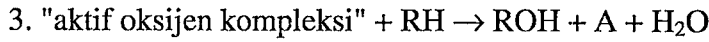
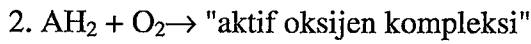
(FAD: Flavin adenin dinükleotid; FMN: Flavin mononükleotid)

3. Lipid

MFO sistemi aktivitesi ısıya dayanıklı bir lipid komponent olan fosfatidilkoline ihtiyaç duyar. Bu bağlamda bu model yani lipid enzimlerin içine nüfuz ettiği endoplazmik retikulum yapısının en önemli bölümüdür.

Çok sayıda ksenobiyotik ve steroid hormonların memeli karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunan enzimler tarafından oksidasyona uğradığı uzun bir süredir bilinmektedir.

Pek çok substratın metabolizmasını seçici olmaksızın katalizleyen bu enzim sistemi, ancak NADPH, moleküler oksijen ve magnezyum iyonları (Mg^{+2}) varlığında görevini yapabilir. Oksijenin bir molekülü substratın oksidasyonunu sağlarken, diğeri suyu oluşturur. Tüm reaksiyon şu şekilde formülize edilebilmektedir.



Burada, A mikrozomal komponentin okside olmuş şekli iken, AH_2 redüklenmiş şekli; RH substrat, ROH ise okside olmuş substratı simgelemektedir.

Bu formülde ilgisi bulunan enzimler; genellikle A olarak düşünülen sitokrom P450 (sit P450), NADPH'ın oksidasyonunda görev yapan (ve ayrıca P450 enziminin okside olmuş şeklini redükleyen) flavin içeren enzim NADPH sitokrom P450 redüktaz (ya da diğeri bir deyişle NADPH-sitokrom c redüktaz) 'dır.

MFMO (Mikrozomal Flavın İçeren Monooksijaz)

Molekül ağırlığı 65000 olan bu polimerik protein her protein monomerde bir mol FAD taşır ve başlıca karaciğer mikrozomal fraksiyonunda yer alır. MFMO, çok sayıda eksojen kaynaklı bileşiğin N ve S oksidasyonunu sağlar (tersiyer ve sekonder aminlerin ve hidroksilaminlerin N-oksidasyonu, tiyoamidlerin, tiyotürelerin, tiyollerin S-oksidasyonu gibi). Sit P450 kadar güçlü okside edici ajan olmayan bu enzimin aktivitesi; enzime NADPH'ın bağlanması, ardından oksijenin bağlanması, son olarak da substratın bağlanması şeklinde gerçekleşir.

Faz I Oksidasyonunda Rol Oynayan Diğer Enzim Sistemleri

Faz I oksidasyonunda aracılık eden enzim sistemlerinden bazıları da şunlardır:

- Prostaglandin sentetaz,
- Monooksijenazlar,
- Alkol dehidrojenazlar,
- Aldehid dehidrojenazlar,
- Ksantin oksidaz,
- Peroksidazlar.

Redüksiyonda Rol Oynayan Enzimler

Oksidatif reaksiyonlara ilaveten MFO sistemi, hücrede nitro, nitroso, hidroksilamin, azo, tersiyer amin N-oksit gibi grupların redüksiyonunu sağlarlar. Oksidasyon ve redüksiyona uğrayabilen substratların farmakolojik ve toksikolojik özellikleri bu metabolik yollar arasındaki dengeye bağlıdır.

4.1.2.2 Faz II Reaksiyonları

Faz II reaksiyonları ilaç ya da metabolitlerinin endojen substratlarla, transferaz enzimleri katalizörlüğünde biyokimyasal reaksiyona girdikleri metabolizma yoludur. Konjugasyon, hidroksil (-OH), amino (-NH₂), tiyol (-SH), karboksilli asit (-COOH), sülfonamid (-SO₂NH₂) gibi fonksiyonel gruplar üzerinden yürür.

Faz II enzimleri, Faz I reaksiyonları sonucu substrata bağlanan ya da önceden yapıda varolan polar grupları suda çözünebilen endojen kaynaklı maddelere bağlamak üzere kullanılır.

Kofaktör adı verilen bu endojen maddeler;

- Üridin difosfat glukuronik asit (UDPGA),
- 3'-Fosfoadenozin-5'-fosfosülfat (PAPS),
- Glutatyon (GSH),

- S-Adenosil metiyonin (SAM),
- Asetil koenzim A (AcCoA).

Bu kofaktörler büyük molekül ağırlığına sahip olmakla birlikte onları kuvvetli elektrofilik yapan iyonik ya da polar gruplara sahiplerdir.

Faz II reaksiyonlarının, enzimleri ve kofaktörlerinin özetle belirtildiği liste tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4.2 Faz II Reaksiyonları ve Enzimleri

Reaksiyon	Fonksiyonel Gruplar	Enzim	Kofaktör
Glukronidasyon	- OH - COOH - NH ₂ - CONH ₂ - SH	UDP Glukuronil transferaz	UDPGA
Sülfatasyon	- OH - NH ₂ - SO ₂ NH ₂	Sülfotransferaz	PAPS
Aminoasit Konjugasyonu	- COOH	Açiltransferaz	Açıl CoA
Glutasyon Konjugasyonu	- NO ₂ - Epoksit - Organik halojenürler	Glutasyon-S-transferaz	GSH
Merkaptirik Asit Konjugasyonu	- Glutasyon konjugatları	Glutasyonaz peptidaz N-Asetilaz	AcCoA
Asetilasyon	- OH - SO ₂ NH ₂ - NH ₂	Asetiltransferaz	AcCoA
Metilasyon	- OH - SH - NH ₂	Metiltransferaz	SAM

4.1.3 İlaç Metabolizmasının Tıbbi Açıdan Önemi

4.1.3.1 Farmakolojik Aktivasyon Yönünden İnceleme

Organizmaya alınan bazı ilaçlar vücutta kendiliğinden ya da enzimatik biyotransformasyonla, etkisi ana bileşiğe göre daha fazla olan farmakolojik aktif ya da daha çok aktif metabolitine dönüşen inaktif "prodrug=ön ilaç" özelliği gösterebilir.

İlaç metabolizmasının ön ilaçlar için bir aktivasyon görevi yaptığı şu örneklerle özetlenebilir:

- Prontosil → Sülfanilamid
- Pirimidon → Fenobarbital
- Klindamisin palmitat → Klindamisin

4.1.3.2 Toksikolojik Aktivasyon Yönünden İnceleme

İlaçların metabolizmasında, çok sayıda substrat enzimatik reaksiyonlarla ana bileşikten daha az biyolojik aktivite gösteren metabolitlerine dönüşürken, bu reaksiyonlar bazen toksik metabolitlerin oluşumu şeklinde de sonuçlanabilir. Metanolün, oksidasyonla formaldehid ve formik asite dönüşümü; sülfonamidlerin böbreklere toksik asetillenmiş metabolitlerine dönüşümü gibi...

4.1.3.3 Detoksikasyon Yönünden İnceleme

İlaçların çoğu, kimyasal yapısı enzimatik reaksiyonlarla değişmiş olduğu için, ilgili reseptör tarafından tanınamayan inaktif bileşikler haline geçerler. Bu nedenledir ki, ilaç metabolizmasının bir diğer isimlendirilme şekli de "ilaçların detoksikasyonu"dur.

Vücuttaki enzimatik sistemlerle lipidlerde çözünebilen ilaçlar ve diğer ksenobiyotikler, atılımlarını kolaylaştıran daha polar bileşiklerine dönüşürler. Hidrofilik fonksiyonel grupların katımı konjugasyonu ile istenilen polarite sağlanmış olur. Yeterli bir metabolik reaksiyon mekanizmasının var olmaması halinde, bir ilacın etkisi,

metabolize olmadıkça vücuttan atılımı kolay olamayacağı için akıllara sığamayacak kadar uzun bir süre devam edebilmesi mümkündür.

Dolayısıyla bir ilacın farmakolojik cevabı, organizmanın onu metabolize etme yeteneği ve oluşan metabolik ürünlerin atılım sistemleri ile yakından ilgilidir. Bazı ilaçlar yalnızca bir faz metabolik reaksiyonlarla metabolize olurken (parasetamol→Faz II), bazıları her iki yolu da kullanabilir (propranolol→Faz I ve Faz II).

4.1.4 İlaç Metabolizmasını Etkileyen Faktörler

İlaç metabolizmasını etkileyen faktörler endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Endojen faktörler fizyolojik, patolojik ve genetik faktörleri içine alırken, eksojen faktörler dış çevre ile ilgili özelliklerden etkilenir.

4.1.4.1 Endojen Faktörler

(i) Fizyolojik Faktörler

Beslenme, yaş, hormon, hamilelik gibi faktörler enzim sisteminin etkinliği üzerinde değişiklik yapabilir ve metabolizma hızını etkileyebilirler (155,156,297).

İnsanlarda ve hayvanlardaki beslenme şekilleri ksenobiyotikleri metabolize eden enzimlerin aktivitesini değiştirebilmektedir. Lipidlerden yoksun bir beslenme şeklinde karaciğer karma fonksiyonlu oksidazlarının aktivitesi azalırken tersi bir durumda enzim aktivitesinin artmasıyla birlikte göğüs kanseri ve kolon kanseri riski artmaktadır.

Yeni doğanlar, yetişkin ve yaşlılarda da enzim seviyeleri farklılıklar göstermektedir.

Aç bırakılmış sıçanların karaciğer mikrozomlarında fenobarbital ve 3-metilkolantrenle indüklenebilenler de dahil olmak üzere 12 farklı sitokrom P450 enzimi

üzerinde yapılan incelemelerle açlığın bu enzim seviyelerini değiştirdiği, dolayısıyla metabolik aktivitede de değişiklik meydana geldiği sonucuna varılmıştır (138).

Erkek sıçanda sitokrom P450 enzimi formlarının her birinin artan yaşla birlikte değiştiği, yaş arttıkça giderek dişiye yaklaşan değerler bulunduğu kaydedilmektedir (137,152).

(ii) Patolojik Faktörler

Sitokrom P450 enzimlerinin eksikliği ya da fazlalığı çok farklı sonuçlara sebep olabilmektedir. P45021A2 eksikliğinden “tuz atma sendromu”, 2D6'nın eksikliğinden ise periferik nefropati oluşumu gözlenmiştir (118).

Özellikle karaciğer ve böbrek hastalıklarından ksenobiyotik metabolizması etkilenebilmektedir.

Siroz gibi sitokrom P450 ve flavin içeren monooksijenaz seviyelerinin azaldığı hastalıklarda kotinin ve nikotin-1'-N-oksid metabolitlerinin oluşumu da azalmaktadır. (213).

(iii) Genetik Faktörler

İlaç metabolizmasını etkileyen genetik faktörler kapsamında cinsiyet, tür ve soy farklılıkları yer alır.

İlaç metabolize eden enzim sistemlerinde cinsiyet farklılıkları organizmadaki hem genetik kontrolü hem de hormonal etkileri içerir.

İmaoka ve ark. (137), sitokrom P450 izoenzimlerinin dişi ve erkek sıçanlarda bulunma düzeylerinin yaşa da bağlı olarak farklı olduğunu; sit P4502A2, 2C11, 4A2 yalnızca erkek sıçanlarda 104 haftalığa kadar bulunurken, bundan sonra dişiye özel P4502C12 enziminin gözlemlendiği kaydedilmektedir. Söz konusu durumdan cinsiyet hormonlarının sorumlu olduğu öne sürülür (154).

Farklı cinsiyetteki sıçanlarda, metabolik reaksiyonlardaki farklılıklardan sorumlu enzimlerden birinin sitokrom b₅ olduğu bulunmuştur (153).

Tür farklılıkları hem Faz I hem de Faz II metabolizmasında meydana gelebilir veya kalitatif (metabolik yollarda farklılık) ya da kantitatif (metabolik yol aynı ancak metabolizma oranlarında farklılık) olabilmektedir. Bu durum, enzim ya da doğal inhibitör ve aktivatörlerin miktarı ya da yapısındaki farklılıklardan; kofaktör miktarlarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Soy farklılıkları da kalitatif ya da kantitatif olabilir. Örneğin; farklı soydan gelen fareler heksobarbitalin etkisi süresince önemli farklılıklar gösterirken bunların içinde bir soy grubu vardır ki, bu grubun cevabı tek bir doğrultudadır.

Kedilerde glukroniltransferaz enzimi eksikliğinden dolayı fenolik ksenobiyotikler sülfat konjugasyonu şeklinde metabolize olurlar.

Araklorla indüklenmiş sıçanlarda nikotinin, cis-nikotin-1'-N-oksit metaboliti erkek sıçanların idrarında dışidekinden daha çok; kotinin ise dişi sıçanında erkekinkinden çok daha fazla bulunmuştur (275).

4.1.4.2 Eksojen Faktörler

Eksojen, diğer bir deyimle çevresel faktörler stres, radyasyon, ksenobiyotikler tarafından enzim indüksiyonu, inhibisyonu ve aktivasyonu gibi parametrelerden etkilenir.

Ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktivitesini indükleyen ya da inhibe eden maddeler, bu tür bileşiklerin toksisitesinde çok önemli rol oynamaktadır. İlaçlar, çevre kirliliği, doğal ürünler ve pestisitler bunlara örnek olarak verilebilir.

Enzim indüksiyonu, indüklenmemiş organizmaya (kontrol) oranla enzim aktivitesinde ya da sentezinde bir artışı; enzim inhibisyonu ise enzim aktivitesinde ya da sentezinde bir azalmayı ifade etmektedir.

Enzim aktivasyonu, enzimin aktivitesinde artma ile sonuçlanan bir enzimin *in vitro* aktivasyonunu tanımlar.

(i) Enzim İndüksiyonu

Ksenobiyotiklerin metabolizmasını sağlayan enzimlerin indüksiyonu, insanları da içeren pek çok türde incelenmiştir (165,268).

Karaciğer mikrozomal enzimleri indüklenbilme özelliğine sahip oldukları için, bazı kimyasallar organizma ya da doku ile reaksiyonları sonrası bu enzimlerin aktivitesini stimüle ederek metabolizma hızını arttıırırlar.

Fenobarbital (267), 3-metilkolantren (139); β -naftoflavon ve Araklor 1254 (165) mikrozomal enzimleri indükleyen ajanlar arasında yer almaktadır.

Enzim indükleyiciler, organizmada morfolojik ve biyokimyasal değişimlere sebep olurlar. Örneğin; karaciğer ağırlığında %40'lık bir artışla birlikte gram karaciğer başına düşen mikrozomal protein miktarında da artma gözlenir.

Enzim indükleyiciler

- Protein sentezi üzerine etki ederek,
- Gen fonksiyonlarını düzenleyicilerle etkileşerek,
- Mikrozomal proteinlerin aktivitesini etkileyerek,
- RNA metabolizması ile etkışerek indüksiyon mekanizmasını harekete geçirirler.

(ii) Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibisyonu yapan ajanlar, ilaçların metabolizmasını yavaşlatırlar ve organizmada ilaç birikmesine sonuçta da toksikolojik açıdan önemli olabilecek olaylara neden olurlar.

İlaçları metabolize eden enzim sistemlerinin inhibisyonu çeşitli yollarla meydana gelebilir:

- Beslenme, hormonlar gibi endojen faktörler tarafından fizyolojik parametrelerin değişimi,
- Etionin, aktinomisin gibi ajanlar tarafından protein sentezinin inhibisyonu,
- Kan biyosenteziyle ilgili enzimlerle etkileşim,
- Enzimin aktif konumu ile direkt etkileşim ya da ilaç metabolize edici enzim sisteminin yarışmalı inhibisyon (örn; SKF 525-A) (111); yarışmasız inhibisyon; serbest radikaller ya da reaktif ara ürünler (örn; karbon tetraklorür) gibi etkenler nedeniyle inaktivasyonu.

(iii) Enzim Aktivasyonu

Enzim aktivasyonu hem *in vivo* hem de *in vitro* olabilir. Bir aktivatörün düzenleyici bir konuma bağlanması, bu noktada diğer bir substrat için katalitik konumun afinitesini değiştirmesi söz konusu olabilmektedir. N-Oktilamin, flavin içeren monooksijenaz sistemin aktivatörlerinden biridir (111).

4.1.5 İlaç Metabolizması Çalışmalarında Kullanılan Teknikler

Sentezlenen bir ilaç maddesi ya da model bileşiğin terapötik etkisi ve potansiyel toksisitesinin incelenmesi, insanda klinik güvenliği sağlamak amacıyla öncelikle memeli türlerinde incelenmektedir.

Metabolizma yollarının tayini için çalışmalar başlangıçta *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılmaktadır. İlaç piyasaya sunulmadan önce ilacın vücuttaki farmakokinetiği ise klinik düzeyde yapılan metabolizma çalışmaları ile incelenir.

4.1.5.1 *In vitro* Çalışmalar

In vitro çalışmaların yapılmasının önemli birkaç nedeni vardır. Bunlar kısaca şöyle sıralanabilir:

- İlaç metabolizması reaksiyonlarının hangi dokularda meydana geldiğinin açıklanması,
- Metabolizma yollarının aydınlatılması,
- Metabolizma reaksiyonlarını katalizleyen enzim sistemlerinin tayini,
- Enzim aktivitesini kontrol eden mekanizmaların açığa çıkartılması.

In vitro yöntemle çalışılırken;

- Organ perfüzyonu,
- Doku hücreleri,
- İzole edilmiş hücreler,
- Doku kültürleri,
- Doku homojenatları,
- Hücre altı fraksiyonlar,
- Saflaştırılmış enzimler kullanılabilir.

4.1.5.2 *In vivo* Çalışmalar

Bir ilaç ya da model bileşiğin metabolizması hakkında daha fazla bilgi *in vitro* çalışma yöntemi ile elde edilebilmesine rağmen, substratın tüm vücuttaki metabolik profili hakkında tam bir bulgu elde edilemez. *In vivo* teknikte memeliler kullanılır çünkü, memeli olmayan türlere göre insan organizması için daha uygun bir model görevini üstlenebilirler.

In vivo çalışma tekniği kullanılırken;

- Deney hayvanının seçimi,
- Uygun ilaç dozunun seçimi,
- İlacın veriliş yolunun seçimi,
- Kan, idrar gibi biyolojik örneğin analizi,
- Tür ve cinsiyet seçimi,
- Sonuçların insan üzerindeki sonuçlarla korelasyonu önem taşımaktadır.

4.1.5.3 Klinik Düzeyde Yapılan Metabolizma Çalışmaları

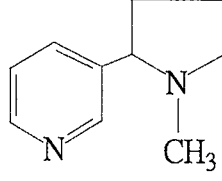
Bu alanda yapılan klinik çalışmalar dört fazda incelenmektedir. Bunlardan birincisi olan Faz I klinik çalışmaları, sağlıklı ve gönüllü olan bireylere kontrol altında ilacın verilmesini; Faz II klinik çalışmaları gönüllü hastaların küçük bir grubunda; Faz III klinik çalışmaları, hastaların büyük bir grubunda ilacın uygulanmasını; Faz IV ise ilacın satılmaya başlanmasından sonra elde edilen klinik bulguları içermektedir.

4.2 Tütün Alkaloidleri ve Diğer Tütün Kimyasalları

4.2.1 Major Tütün Alkaloidi Nikotinin Keşfi

“Nikotin” alkaloidi terimi 1773 yılında İsveçli botanist Linnaeus tarafından tayin edilen “nicotiana”dan türetilmiştir. Araştırmacı Linnaeus, Fransız Büyükelçisi Jean Nicot'un, annesi Fransa Kraliçesi Catherine de Medici'ye hediye etmek üzere bitkinin tohumlarını ektirmesi üzerine bu terimi kullanmıştır. Bitkinin kurutulmuş yaprakları “tabacum” şeklinde isimlendirilmiş olup Hindistan, İspanya, Portekiz ve Fransa yerlileri tarafından kullanılmaya başlanmış ve sonuçta tütün kullanımı ve bağımlılığı çok kısa bir süre içinde tüm dünyaya yayılmıştır (53).

Nikotin, *Nicotiana tabacum* ve *Nicotiana rustica* yaprakları ve diğer bölümlerinde %0-10 konsantrasyonda bulunmaktadır. Tütündeki nikotin yüzdesi türe ve kültürel özelliklere hassastır, *Nicotiana*'nın diğer türleri ve diğer Solanaceae bitkilerinde daha düşük konsantrasyonlarda bulunur.



Nikotin ($C_{10}H_{14}N_2$)

(S)-3-(1-metil-2-pirolidinil) piridin
1-metil-2-(3-piridil) pirolidin

4.2.2 Nikotin Kimyasal Özellikleri

İlk kez 1829 yılında izole edilen nikotinden hemen sonra bitkiden diğer alkaloidlerin de izolasyonu yapılmıştır. Bunlar arasında anabasin, anatabin, isonikotein, 1-N-metilanabasin, 1-N-metilanatabin, nikotellin, nikotimin, nikotein, nikotrin ve nornikotin yer almaktadır.

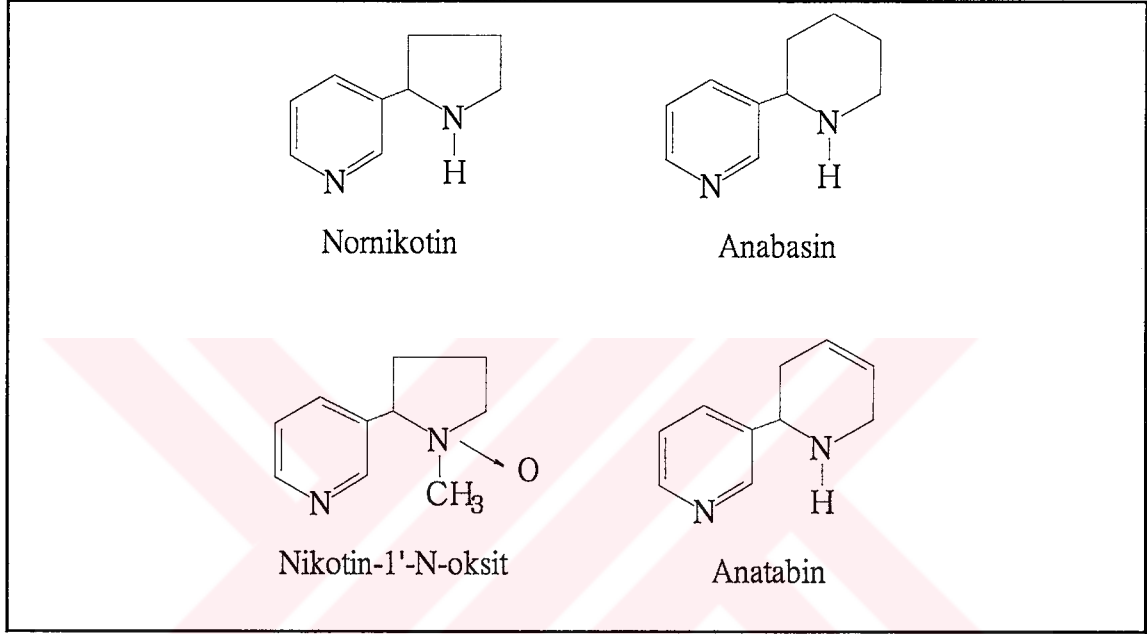
Bir sigaranın yanmakta olan kısmı, solunarak içe çekildikçe 800-900°C'lik bir sıcaklığa ulaşır. Yüksek sıcaklıklarda piroliz meydana gelir ve nikotin gibi uçucu yapılar buharlaşır. Yapısında karsinojenleri de içeren bu piroliz ürünleri arasında nikotinden başka, piridin, 3 ve/veya 4-metilpiridin, 2-siyanopiridin, kinolin, isokinolin, benzen, pirol, toluen, benzonitril, indol, inden, naftalen, antrasen ve fenantren bulunmaktadır (130,150).

Nikotin, uçucu, yağimsı sıvı, saf olduğunda renksiz ancak oksidasyonla sarımsı bir renge sahip olan, nem çekici, ışık ve havanın etkisiyle kahverengiye dönen çok bazik karakterde bir alkaloiddir.

Nicotiana bitkisinin yapraklarında biriken miktarlarına göre nikotinden başka nornikotin, anabasin ve anatabin de major tütün alkaloidleri arasındadır. Bunlardan nornikotin türlerin %30-40'ında bulunurken, anabasin Nicotiana aculis, N. solanifolia

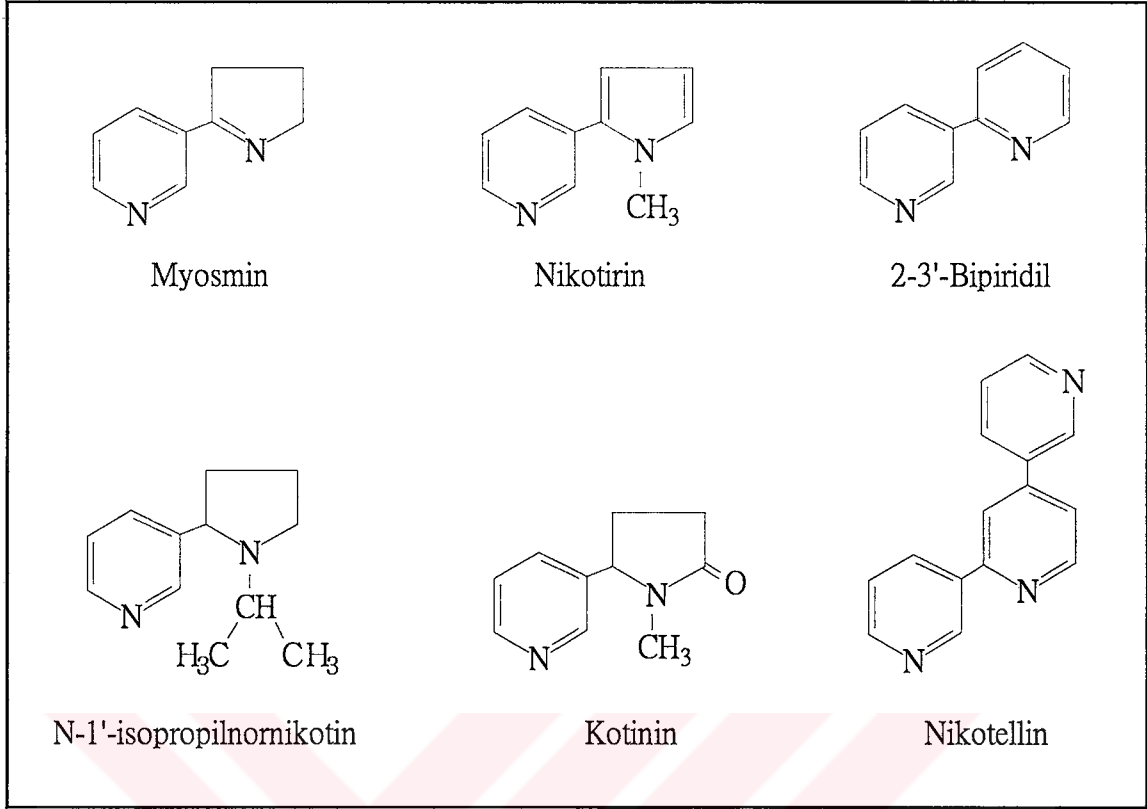
gibi türlerde major alkaloiddir. Anatabin ise hiçbir türde major değildir ancak, *N. glauca*, *N. glauca*, *N. glauca* gibi türlerde kısmen daha yüksek bir yüzdeye sahiptir.

Nikotin-1'-N-oksit de tütün içeriğinde bulunur ancak, bu yapının tütün yapraklarının kurutulması veya işlenmesi sırasında S-(-)-nikotin havayla oksidasyonundan meydana geldiği düşünülmektedir.



4.2.3 Minör Tütün Alkaloidleri ve Kimyasal Özellikleri

Tütün yapraklarında, major alkaloidlerin türevi olan çok sayıda minör alkaloid de bulunmaktadır. Bu alkaloidlerin çoğu 50 µg/g'dan daha az olup nanogram miktarlarındadır. Major alkaloidlerin metabolik ürünleri olabilecekleri gibi tütünden izolasyon sırasında da meydana gelebilen yan ürünler olarak da karşımıza çıkabilirler.

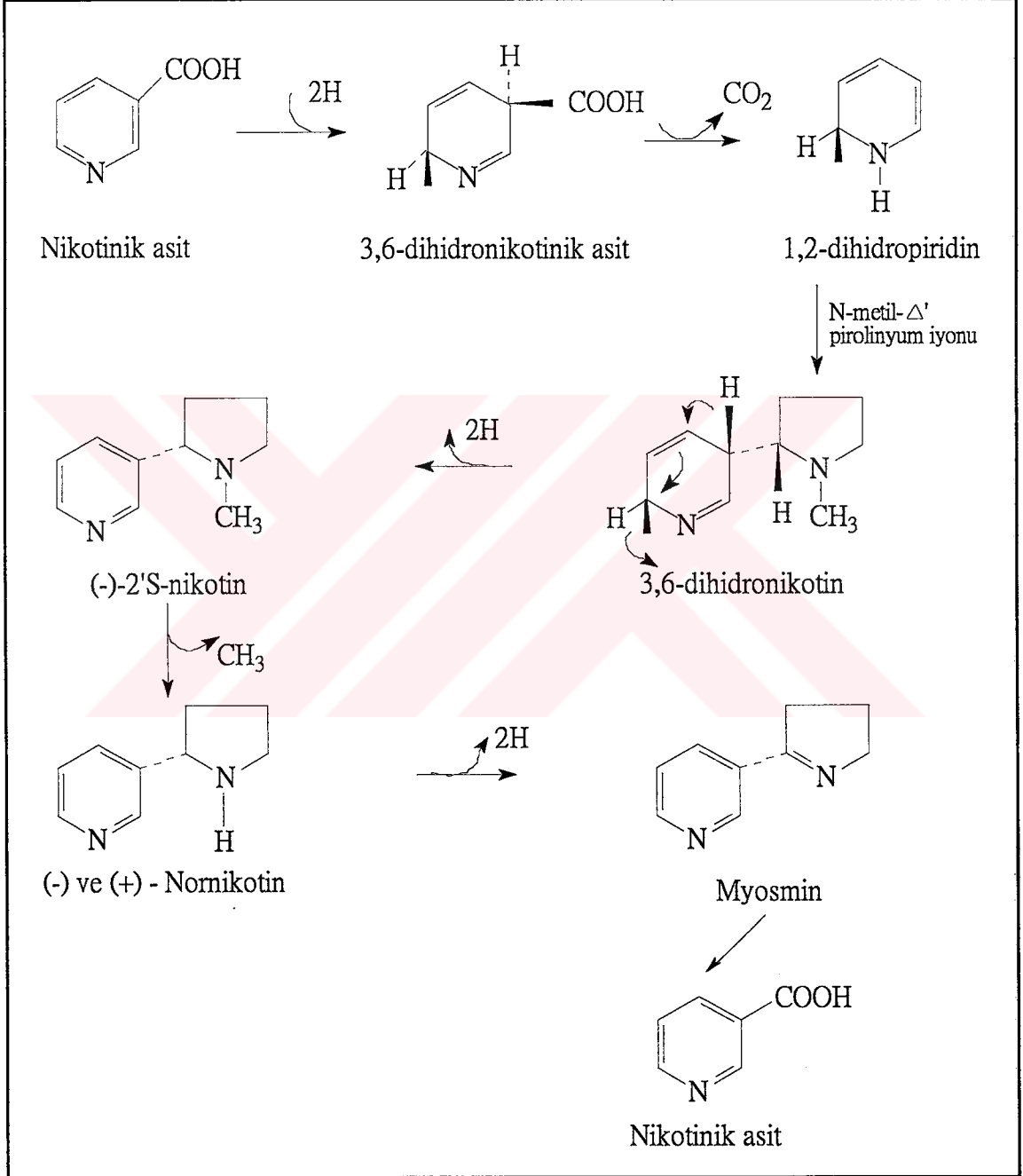


4.2.4 Nikotin ve Benzeri Alkaloidlerin Bitkilerde Biyosentezi ve Metabolizması

Saunders ve Blume (271), *nicotiana tabaccum* bitkisinin hem taze yeşil dokusu hem de kurutulmuş tütün liflerinden nikotin, nornikotin, anabasin ve anatabinin ayırımı gerçekleştirmişlerdir. *Nicotiana glauca* bitkisinin kök kültürlerinde ise radyoaktif işaretlenmiş nikotinden nornikotin ve kotinin oluşumu tespit edilmiştir (34).

Nicotiana glutinosa yaprakları üzerine yapılan bir araştırma nornikotin niktinden geriye dönüşümsüz olarak oluşabildiğini göstermektedir (79). Leete ve Chedekel (175) *Nicotiana glauca*'da radyoaktif nikotinden nornikotin ve miyosminin oluşumunu ve bunun da nikotinik asit oluşumunda prekürsör olduğunu vurgulamaktadırlar. Nikotin, nornikotin, anabasin ve anatabinin piridin halkası nikotinik asitten oluşur (80). Kinolinik asit, piridin halkası ile birleşen nikotinik asitin etkili bir ara prekürsörüdür (335).

Friensen ve Leete (101), nicotiana türlerinde nikotinik asitten oluşan dihidronikotinik asitin dekarboksilasyon ürünü 1,2-dihidropiridin, N-metil- Δ' -pirolinyum iyonu ile reaksiyona girerek 3,6-dihidronikotini oluşturması ve bunun da redüksiyonu ile (-)-2'S-nikotin sentezlendiğini öne sürmektedirler.



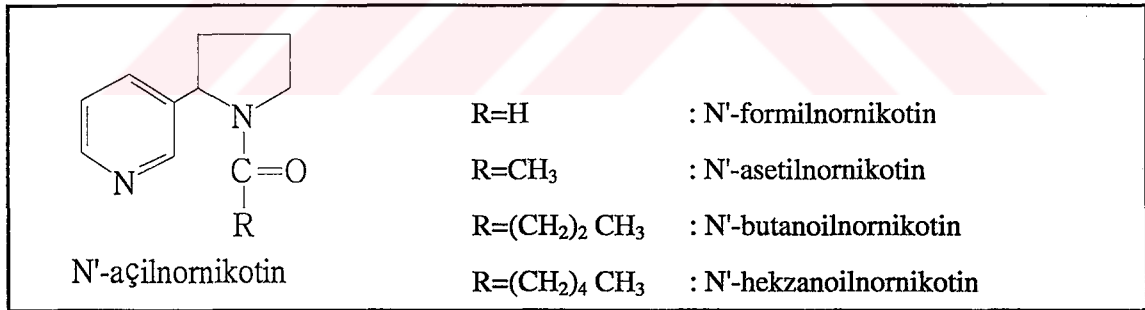
Nikotinik asit ve N-metil- Δ' -pirolinyum iyonundan (-)-2'S-nikotin, nornikotin ve myosmin alkaloidlerinin bitkide biosentezi

Frankenburg ve Gottscho (99) araştırmalarında tütünün fermentasyonu süresince nikotin miktarında meydana gelen azalmanın fermente olmuş yapraklarda nikotin-1-N-oksit oluşumundan kaynaklandığını saptamışlardır. Nikotin içeren bir ortamın toprak bakterisi kullanılarak yapılan mikrobiyal bozunması ile nikotin-1'-N-oksiti oluşturup sonra da pseudoksinikotine dönüştüğü gözlenmiştir (320).

4.2.5 Tütün Kullanımı Sırasında Oluşan Kimyasallar

(i) Açılennmiş ve okside olmuş piridin alkaloidleri

Tütün içeriğinde bulunan nornikotin, anatabin ve anabasinin bazı açıl türevleri tütüne lezzet vermekte olup, hem yeşil bitkilerde hem de kurutulmuş tütün tabakalarında nornikotin ve anatabinin N'-açıl türevlerine rastlanmaktadır. N'-formilnornikotin başta olmak üzere N'-(n-oktanoil) nornikotin, N'-(n-hekzanoil) nornikotin, N'-formilanatabin, N'-asetilnornikotin bu kimyasallara örnek olarak verilebilir (87). Genellikle, açılennmiş alkaloidlerin seviyesi, tütünün sekonder alkaloid içeriğinin konsantrasyonu ile paralellik gösterir (44).



N'-açılennornikotinlerin nikotinden 1000 kat daha güçlü toksik olduğu ve toksisitenin açıl zincirinin uzunluğuyla arttığı vurgulanmaktadır (172).

Tütünde iki major okside olmuş alkaloid kotinin ve 2,3'-bipiridildir. Kotinin, nikotinin enzimatik ya da otooksidasyonu ile oluşurken, 2,3'-bipiridil ise anatabinin oksidasyonu ile meydana gelir.

Yeşil bitkilerde düşük miktardaki kotininin muhtemelen otooksidasyondan ziyade enzimatik yolla oluştuğu düşünülmektedir.

2,3'-Bipiridil ilk kez Frankenburg ve ark. (100) tarafından 3-asetilpiridin fermentasyon ürünü olarak bulunmuştur.

Tütündeki diğer okside olmuş alkaloidler nikotirin, 3-asetilpiridin, nikotinik asit, nikotinamid ve nikotin N-oksidlerdir.

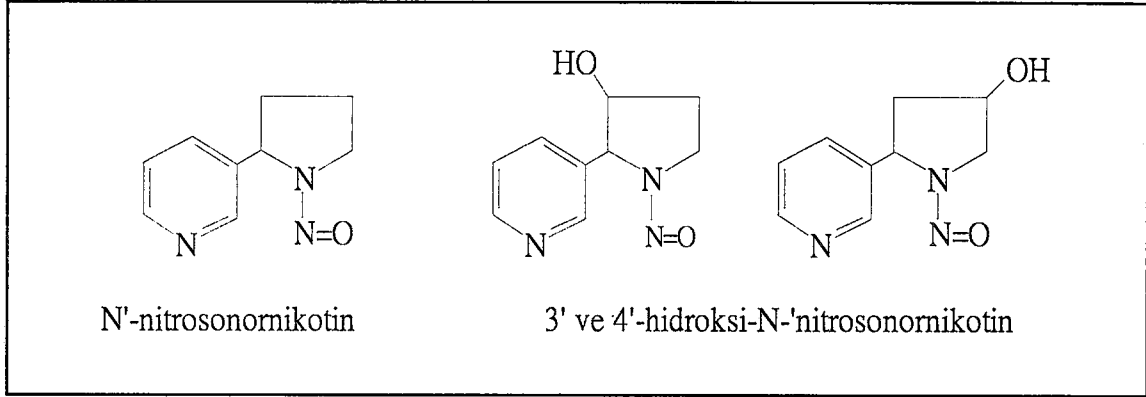
(ii) Tütünde bulunan nitrözaminler

Tütün dumanının ana karsinojenlerinin yapısı henüz tamamen aydınlatılamamakla birlikte nikotin türevi olan tütün spesifik nitrözaminlerinin önemi nikotinin hem hepatik hem de ekstrahepatik dokulardaki metabolizmasında büyüktür (258).

Nikotin ve benzeri tütün alkaloidlerinden oluşan spesifik nitrözaminleri laboratuvar hayvanlarında güçlü karsinojen olarak bulunmuş olup bu bileşiklerin özellikle tütün dumanı inhale eden kişilerde ağız kanserine yol açtığı çeşitli araştırmalarla ispatlanmıştır (126). Özellikle farelerde akciğer tümörü oluşturan (39) N'-nitrosonornikotin ve 4-(metilnitrözamino)-1-(3-piridil)-1-butanonun (NNK) kantitatif olarak en yaygın burun kanserine yol açtığı, sıçanlarda ağız boşluğuna uygulandıklarında ağız tümörlerini indükledikleri; bunların yanında yemek borusu, burun boşluğu, pankreasın tütünle ilgili kanserlerinin etiyolojisinde rol oynayabilecekleri kaydedilmektedir (126).

Tütün kullanan bireyler, yanmamış tütünde ve tütün dumanında bulunan N'-nitrosonornikotine maruz kalırlar. Bu yapı, sıçan, hamster ve fare türlerinde tümöre sebep olduğundan dolayı metabolizması büyük ölçüde önem taşımaktadır (48). Tütün içimi sırasında nikotinin nitrosolanmasıyla meydana gelen ve prokarsinojen olan 4-(metilnitrözamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK), insanda aktif biçimine enzimatik olarak dönüşümünü sağlayan sit P450D6 enzimidir (57). NNK'nın hamster akciğerinde

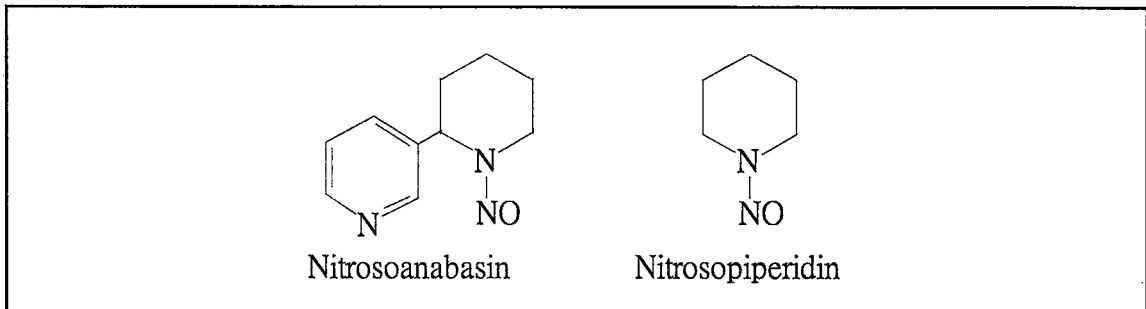
nikotinik kolinerjik reseptörlere nikotinden daha fazla ilgi gösterdiği tespit edilmiştir (277).



Hecht ve ark. (125), Araklor 1254 ile muamele edilmiş F-344 sıçanlardan elde edilen karaciğer mikrozomlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında N'-nitrosonornikotinden, N'-nitrosonornikotin-1-N-oksitin yüksek miktarda oluştuğunu bunu takiben az miktarlarda da 3'-hidroksi ve 4'-hidroksi-N'-nitrosonornikotin oluşumunu kaydetmişlerdir.

Tütün dumanında teorik olarak oluşabildiği düşünülen nitrosoanabasin ile bilinen karsinojen nitrosopiperidinin karaciğer ve yemek borusu tümörlerini indüklediği kaydedilmiştir. Nitrosopiperidinin toksisitesi sıçanlarda kısa bir süre içinde ölüme yol açmıştır (40).

Farelerde bu nitrözaminlere karşı alkil izotiyosiyanatlar inhibitör etki göstermekte olup, inhibitör potansiyelinin alkil zincirinin artmasıyla birlikte 6-fenilhekzil izotiyosiyanatla en yüksek konsantrasyonda bulunduğu gözlenmiştir (124).



4.3 Nikotinin Genel Farmakokinetiği ve Metabolizması

4.3.1 Nikotinin Farmakokinetiğine Genel Bakış

Tütün ürünlerinde doğal olarak yalnızca S-(-)-nikotin bulunmaktadır. Ancak tütünün yanması sırasında S-(-) enantiyomerinin piroliz reaksiyonuyla R-enantiyomerine dönüştüğü ve bundan dolayı tütün bağımlılarında kullanım süresince daha toksik olan R-(+)-nikotinin oluştuğu düşünülmektedir (65).

4.3.1.1 Nikotinin Absorbsiyonu

İyonize olmamış baz haldeki nikotin, yağda çözünüp, hücre membranlarından kolaylıkla geçebilir. Absorbsiyon en hızlı akciğerden olmakla birlikte ayrıca deriden, mide-barsak, yanak ve burun mukozası ve böbrek tübüllerinden de gerçekleşmektedir. İn hale edilen tütün dumanı hızla absorbe edilirken tam inhale edilmeyen bir kısmı çok az oranda absorblanır ve daha çok ağızda kalır. Nikotinin absorpsiyonunu konu alan çok sayıda çalışmanın sonuçları pH'ın önemli bir faktör olduğunu vurgular. Vücudun farklı bölgeleri ve dokularındaki mukoz yapıların pH'ındaki farklılıklardan dolayı nikotin absorpsiyonunda önem taşır.

Tütün kullanımı sırasında absorbe edilen nikotinin gerçek miktarı; tütünün cinsi, içeriğindeki nikotin ve nem miktarı, tütün partiküllerinin şekli ve konfigürasyonu, tütün içimi ile ilgili bireysel farklılıklar (259), tütün ve mukoz membranlar arasındaki ilişkinin süresi gibi birtakım faktörlere bağlı olarak değişir (169).

4.3.1.2 Nikotinin Dağılımı

Absorblanan nikotinin kan seviyeleri çok hızlı bir şekilde azalır. Plazmadaki bu hızlı azalma, dokulara çok geniş bir şekilde dağıldığına işarettir. Çok sayıda bazik ilaç gibi nikotinin hemen hemen tüm dokulara çok iyi dağıldığı gözlenir. Sıçanlara intravenöz uygulanan nikotin, 30-60 dak. içinde karaciğer, beyin, akciğer, kalp, ince barsak duvarı, dalak, iskelet kası ve böbrekte plazmadakinin 2-15 katı

konsantrasyonlarda bulunmuştur (295,333). Erkek albino farelerde intravenöz verilen nikotin kan, beyin ve karaciğere 1., 2.5, 5. dakikalardan itibaren dağılımı ve kotinin metabolitinin oluşumu gözlenmiştir (296).

Düşük dozlarda dahi dokularda hızlı ve iyi bir dağılıma sahip olan nikotin farklı hayvan türlerinde farklı bir dağılım gösterdiği kaydedilmektedir (140,307).

4.3.1.3 Nikotin Atılımı

Farklı türler üzerinde yapılan bir araştırmada, nikotin eliminasyonunun en hızlı kedilerde gerçekleştiği, bunu fare ve tavşanların izlediği (170), en yavaş da köpeklerde olduğu kaydedilmektedir (94).

Nikotin atılımı radyoaktif işaretlenmiş preparatlar da dahil olmak üzere insanlarda ve çok sayıda türde incelenmiştir (155,194,292).

İnsanlarda ve diğer memelilerde nikotin atılımı başlıca böbrekte gerçekleşir (102). Ancak absorpsiyonunda olduğu gibi atılımında da pH'nın önemi büyüktür. İdrar pH'ı alkali iken böbrek tübülllerinden hızlı bir şekilde geri absorblanan nikotin, asidik pH'da dozun yaklaşık %23'ü metabolize olamadan geri kazanılmaktadır (169).

Salyanın nikotin atılımında önemi büyüktür, daha az oranda olmak üzere ter, süt, safra, mide suyu ve feçesle de atılım gerçekleşmektedir.

İnsanlarda ve bazı deney hayvanlarında major metabolit kotinin oluşumunun yarılanma ömründe ya da eliminasyonunun yarılanma ömründe doza bağlı farklılıklar gözlenmemektedir. Dolayısıyla, nikotin ve metabolitlerinin idrarla atılımı dozdan bağımsızdır (22,209).

Nikotin ve kotinin aynı karaciğer enzimleriyle metabolize olduğu için kotininin nikotin metabolizmasını inhibe ettiği düşünülmüş ancak tütün içenlerde ve içmeyenlerde kotininin aynı farmakokinetiğe sahip olduğu, dolayısıyla da tütün

içenlerde gözlenen daha düşük nikotin atılımından kotininin sorumlu olmadığı sonucuna varılmıştır (338).

4.3.1.4 Nikotinin Fizyolojik Etkileri

Tütünün sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinin sonuçları olarak karşımıza çıkan tabloda, özellikle koroner kalp hastalıkları, miyokard enfarktüsü, anjina pectoris, ateroskleroz gibi kardiyovasküler sistem hastalıkları, akciğer, gırtlak, ağız boşluğu, idrar torbası kanserleri (38), kronik bronşit gibi solunum sistemi hastalıkları ve gebelikle ilgili olumsuz etkileri bulunmaktadır (53).

Uzun süreli tütün kullanımı yalnızca çeşitli kimyasalların metabolik yollarını değiştirmez ayrıca, ilaç absorpsiyonu, dağılımı ve atılımı gibi diğer fonksiyonlarda da değişim meydana getirir (162).

Sağlıklı bireylere nikotinin infüzyonla verilmesi, kalp hızı ve kan basıncında artmaya ve parmak uçlarında deri sıcaklığının azalmasına neden olur (24,171). Kalp hızı üzerine etki köpeklerde normikotin stereoisomerleri ile de görülmüştür (263). Nikotinin etkilerine karşı gelişen toleransın geçici olduğu, bir gece için tütünün bırakılmasından sonra kanda yüksek miktarda nikotin varlığı kaydedilmiştir. Kardiyovasküler sistemin cevabı bir haftalık aradan sonra bir geceye oranla daha fazla bulunmuş olup, bu durumun tolerans kaybıyla orantılı olduğu gözlenmiştir (174). Bununla birlikte sigara içiminden sonra nikotinden 30 kat daha çok vücutta bulunan kotinin nikotinin kardiyovasküler sisteme etkilerini azaltır (50).

Nikotin asetilkolinesteraz aktivitesine sahip olduğu için asetilkolin sentezini engellemektedir. Serumda kolesterol ve lipoproteinlerin seviyesi, içmeyenlere göre içenlerde biraz daha fazladır (171).

Nikotinin farklı analoglarının sentezlenip farmakolojik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarında Damaj ve ark. (72) optimum aktivitenin pirolidin halkası ile ilgili

olduğunu ve halka bölünmesi ile oluşan açık zincir yapılarda farmakolojik etkinin önemli ölçüde azaldığını göstermektedir.

Sağlık üzerindeki tartışılmaz zararları bilinmesine rağmen (327) tütün içenlerin bu alışkanlıklarından vazgeçememesi, nikotin bağımlılığından kaynaklanır. Günümüzde sigaranın bırakılması ve yoksunluk sendromunun ortadan kaldırılabilmesi için kullanılan nikotin sakızı, transdermal nikotin tabletleri, burun spreyleri de busipron gibi seratonerjik ajanlar ve bupropion gibi antidepresanlar yani farmakoterapi kadar gündemdedir (265).

Parkinson Hastalığı ve Nikotin

Tütün bağımlılığı ve Parkinson hastalığı arasında negatif bir ilişki olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir. Nikotin beyin dokusundan dopamin içeren biyojenik aminleri serbestleştirir. Antiparkinson ilaçlar, parkinsonlu hastalarda boşalan beyin dopaminini yerine koyma ya da beyinde dopaminerjik aktivitenin artırılması mekanizmaları ile aktivite gösterir (53). Nikotinin beyinde hipotalamus bölgesinde bir nörofarmakolojik etkiye bağlı olarak etki gösterebileceği kabul edilebilir olmakla birlikte tütün kullanımı sırasında oluşan konsantrasyonlarda Parkinson hastalığının gelişiminde önleyici bir role sahip olduğu düşünülmektedir.

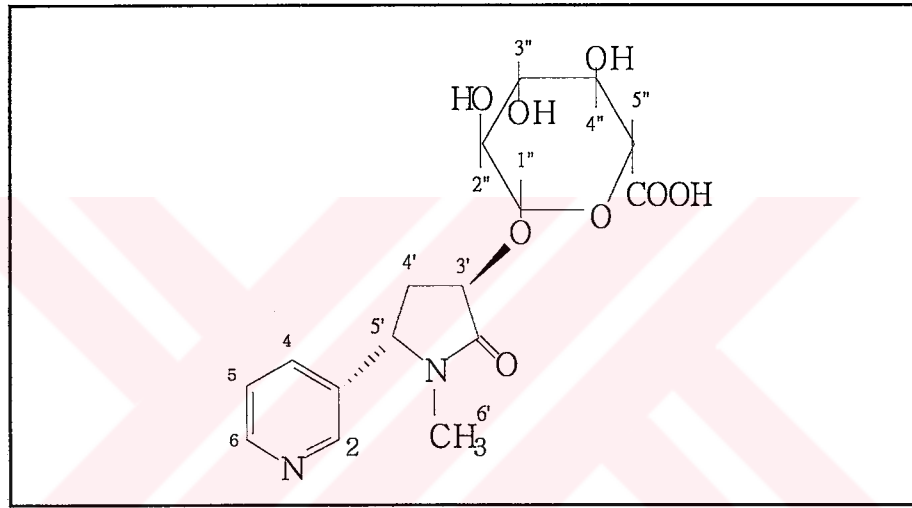
4.3.2. Nikotinin Metabolizması

Nikotinin metabolizması ile ilgili son 20-25 yıldır yapılan araştırmalarda enzim saflaştırılması ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi gibi teknikler ön planda yerini almıştır. *In vivo* deneylerle çok sayıda nikotin metabolitinin miktarları tayin edilmiş, *in vitro* deneylerle de N ve C-oksidasyon yolları açıklanmıştır. Memelilerde nikotin metabolizmasının kapsamlı olarak ele alındığı kaynaklar bulunmaktadır (216).

4.3.2.1 Nikotin *İn vivo* Metabolizması

Nikotin *in vivo* metabolizması, başta insanlar olmak üzere çok sayıda türde incelenmiştir (203,204).

Tütün içenlerin idrarından alınan örneklerin analizleri sonucu kotinin, nikotin-1'-N-oksit, nornikotin ve N-metilnikotinyum iyonları ile birlikte trans-3'-hidroksikotinin metabolitinin varlığı da bulunmuş olup kotininden sonra nikotin ikinci major metaboliti olarak gözlenmiştir (224,226) ve yapısı GC-MS ile aydınlatılmıştır (318).



Nikotin Faz II metabolitlerinden trans-3'-hidroksikotinin-O- β -D-glukronitin yapısı

Trans izomerin %95-98 oranda daha fazla oluştuğu gözlenmiştir (143,317). Her ne kadar literatürde bazı tartışmalar devam etse de (164) kantitatif çalışmalar kotininden önce vücuttan elimine edilen bu metabolitin miktarı kotinininkinden de yüksek olduğunu göstermektedir (241). S-(-)-Nikotin sığan ve hamstere intravenöz verilmesinden sonra idrarda cis-3'-hidroksikotinin metabolitine rastlanmıştır (317). 4-(3-Piridil)-4-oksobutirik asit, (-)-nikotin sığan, köpek ve tavşanlarda, 4-(3-piridil)-4-hidroksibutirik asite dönüşen bir ara metabolit olarak bulunmuştur (49,196).

Tavşanlara nikotin intravenöz verilmesini takiben karaciğer, böbrek ve idrar ekstralarında nornikotin, kotinin, norkotinin ve nikotin-1'-N-oksit metabolitlerinin

oluşumu gözlenmiştir (244). Norkotinin metaboliti tavşanlarda nornikotinden meydana gelmektedir (246).

Radyoaktif nikotin köpek idrarından izole edilen metabolitleri kotinin, 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid (202) ve 4-metilamino-4-(3-piridil) butirik asittir (242).

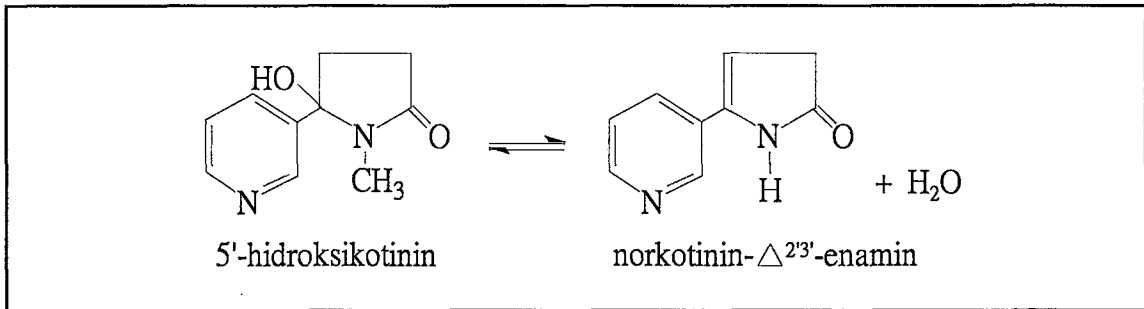
Sıçan ve köpeklerde nikotin ve kotininin metabolitlerinden biri norkotinin (202). Farklı preparatlarla nikotin insan vücuduna alınımından sonra idrarda norkotinin metaboliti bulunmuş olmasına rağmen (37), kotinin alınımından sonra insanda norkotinin oluşumuna rastlanmamıştır (36).

3-Piridilasetik asit, (-)-nikotin köpeklerde tayin edilen idrar metabolitidir. Bu metabolitin prekürsörü 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramidden meydana gelen 4-(3-piridil)-4-oksobutirik asittir (194,200).

Tütün kullananların idrarında bulunan 3-piridilkarbinol metabolitinin oluşumu HPLC ve GC-MS ile ispatlanmıştır (249).

Kyerematen ve ark. (167), sıçan idrarından 12 farklı nikotin metaboliti izole etmişlerdir.

Erkek tütün bağımlılarında ^{14}C -nikotinden idrarda oluşan metabolitlerden 3'-hidroksikotinin glukronit ve norkotinin $\Delta^{2'-3'}$ -enamin metabolitlerinin oluşumu HPLC-MS ile ispatlanmış ve kotininden daha uzun süre organizmada kaldıkları gözlenmiştir (163,274).

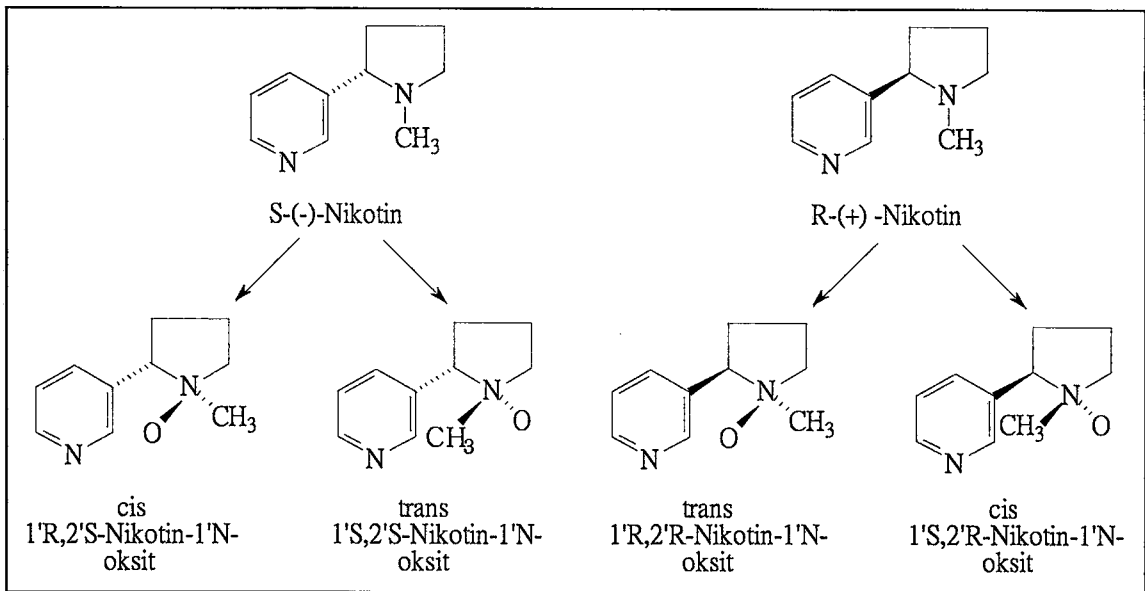


Kobaylarda nikotin idrar metaboliti N-metilnikotinyum iyonunun stereospesifik olarak nikotin yalnızca R-(+)-izomeri ile oluşumu (62,64,235) HPLC analizleri ile kantitatif olarak tayin edilirken (62), tavşanda R-(+)-nikotin her iki azotundan metillendiği ancak S-(-)-nikotinde yalnızca piridin azotundan bu reaksiyonun gerçekleştiği gözlenmiştir (74,75).

Kobaylarda N-metilnikotinyum iyonlarının yanısıra bu metabolitlerin N-oksit türevlerinin oluşumu da tespit edilmiştir (255).

N-Oksidasyon reaksiyonları nikotin ve metabolitlerinin metabolizmasında önemli bir yer tutmaktadır. Her bir nikotin enantiyomerine ait beş N-oksit yapısı mevcuttur. Bu N-oksitler S-(-)-nikotinden sentezlenmiş olup *Nicotiana tabaccum*, *Nicotiana affinis* ve *Nicotiana sylvestris*in kök, gövde ve yapraklarının ekstrelerinden de cis ve trans nikotin-1'-N-oksit izole edilmiştir (253).

Nikotin, nikotin-N-oksit izomerlerine okside olabilen iki azot merkezine sahiptir. Ancak, biyolojik sistemlerde metabolik oksidasyon en çok alisiklik pirolidin azotunda meydana gelmektedir (244). Nikotin 1'-N-konumunda oksidasyon, 1'R ve 1'S olmak üzere iki farklı şekilde meydana gelebilir. Böylelikle her bir nikotin enantiyomeri için iki farklı diastereoizomer söz konusudur (74).



Nikotin enantiyomerlerin N-oksidasyonu

İnsanda nikotin-1'-N-oksitin her iki stereoizomeri de oluşmaktadır (30). Türler arasında cis/trans oranı büyük farklılıklar göstermektedir. İnsanda nikotinden oluşan idrar metaboliti trans nikotin-1'-N-oksitin -cis diastereoizomerine baskın olduğu gözlenmiştir (18).

Nikotinin, radyoaktif işaretlenip kedilere uygulanması ile nikotin-1'-N-oksit metabolitinin gözlenmesinin yanısıra (309); farelere intraperitoneal enjeksiyonundan sonra doku homojenatlarından cis ve trans-nikotin-1'-N-oksit metabolitleri izole edilmiştir (304).

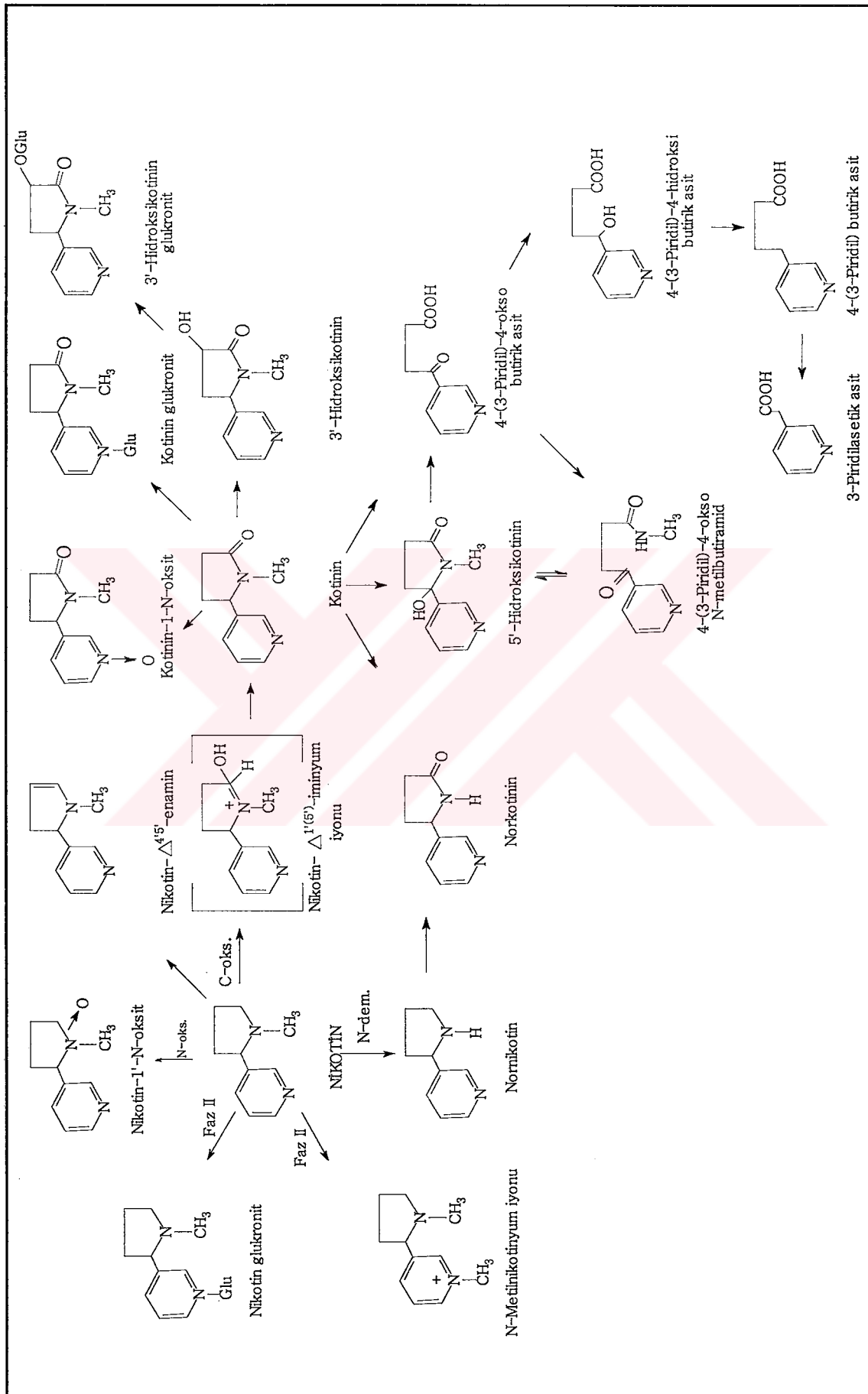
(S)-Nikotinin oral, intravenöz ve transdermal alınımından sonra 1'-N-oksidasyonunun stereoselektifliğinin araştırıldığı bir çalışmada Park ve ark. (247), insanlarda hem *in vivo* hem *in vitro* yalnızca trans-(S)-nikotin-1'-N-oksit oluştuğunu bulmuşlardır.

S-(-) ve R-(+)-Nikotinin kobay ve sıçanlarda gözlenen idrar metabolitlerinden nikotin-1'-N-oksit, hamster ve tavşanlarda oluşmamaktadır (234).

Nikotinin sıçanlarda tayin edilen *in vivo* metabolitleri arasında kotinin-N-oksit de yer almaktadır (167).

Nikotinin N-oksidasyonu iki ana nedenle biyolojik önem taşır. Birincisi, bu N-oksitlerin tütün spesifik karsinojenlerini oluşturmak üzere nitrosolanması, diğeri de nikotine geri redüksiyonlarıdır. Bu redüksiyonun, tütün alışkanlığını engellemede kullanılabilecek bir nikotin deposu oluşturmada önemli olabileceği düşünülmektedir (169).

Nikotin-1'-N-oksit, hepatik ve ekstrahepatik sistemler (70,71), insanlarda mide-barsak kanalındaki bakteriler (17,266) tarafından nikotine redüklenmektedir. Sıçanlar üzerinde araştırılan dokuların içinde redüksiyon en çok karaciğerde, ekstrahepatik dokularda da en çok ince barsaklarda, sonra böbrek, kalp, akciğer ve dalakta meydana gelmiştir (69,71).



Nikotinin memelilerde tespit edilmiş Faz I ve Faz II metabolitleri

S-(-)-Nikotin-1'-N-oksitin, S-(-)-nikotine sıçan karaciğerinde redüksiyonundan sorumlu enzimin sitosolik bir enzim olan aldehid oksidaz olduğu kaydedilmektedir (300).

Sıçanlara oral yolla verilen cis ve trans-nikotin-1'-N-oksitlerin metabolizmasının araştırıldığı bir çalışmada N-oksitlerin nikotine redüklendiği trans izomerde bu reaksiyonun daha yüksek oranda meydana geldiği kaydedilmektedir (282).

Çok sayıda ilaç ve ksenobiyotikte olduğu gibi, nikotinin metabolizması da pek çok faktörden etkilenmektedir (316). Nikotinin sıçanlarda metabolizması ve dağılımı konusunda tür ve cinsiyet farklılıkları gözlenmiştir. Kotinin metabolitinin plazma seviyeleri dişi türlere göre erkeklerde daha fazla bulunmuş olup (166); 3'-hidroksikotinin metabolitinin dişi türlerde, nikotin-1'-N-oksitin ise erkeklerde daha çok olduğu kaydedilmiştir (234).

İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda erkeklerin nikotini dişilere göre daha hızlı metabolize ettiği (21), ancak idrarda kotinin/nikotin-1'-N-oksit metabolitlerinin oranında cinsiyet farkı bulunmadığı ancak atılan kotinin miktarının yaşlılarda azaldığı kaydedilmiştir (155).

Nikotin ve kotininin plazma seviyelerinde, bireysel farmakokinetiğin farklı olmasından kaynaklanan tablolar elde edilmiştir (23,26).

(R)-Nikotin köpeklerde (S)-nikotinden çok az daha hızlı metabolize edilmesine rağmen, tavşanlarda hem R hem de S-nikotinin hızlıca metabolize edildiği ve benzer dağılım gösterdiği bulunmuştur (141).

Nikotinin metabolizmasında bireyler arası farklılıkların bu metabolik reaksiyonların toksisitesinde önemli olabileceği, tütün bağımlısı olan mesane kanserli bireylerle ilgili çalışmalarla da doğrulanmaktadır (11,113).

4.3.2.2 Nikotinin *İn vitro* Metabolizması

4.3.2.2.1 Karaciğer Dokusu ile Metabolizması

Farklı türler üzerinde yapılan araştırmalar nikotin metabolitlerinin oluşumundaki farklılıklara işaret etmektedir. Hamster karaciğer homojenatı ile kotinin oluşumunun sıçandakine oranla 6-10 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (122). Yalnızca türler değil, aynı türün farklı yaş gruplarında da karaciğerin biyotransformasyon yeteneği değişkenlik göstermektedir. ¹⁴C-Nikotinden kotinin metaboliti oluşumu en yüksek 4 haftalık farede gözlenirken, fetal karaciğerde metabolit fetal yaşamın sonunda saptanmış olup doğumdan sonra artmıştır. (298).

Kobay ve hamster hepatositleriyle nikotinin metabolik profilinde benzerliklerin olduğu, ancak metabolit miktarlarının fare, sıçan ve insan hepatositlerinden önemli ölçüde fazla olduğu kaydedilmektedir (165).

Stålhandske (295), fare karaciğer homojenatı ile nikotinin, kotinin, 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid ve hidrosikotinine metabolize olduğunu kaydetmektedir.

Nikotinin tavşan karaciğer mikrozomları ile inkübasyonu sonucu, kotinin (134,135); nornikotin ve formaldehid metabolitlerinin oluşumu gözlenirken (245), karaciğer süpernatantı ile norkotinin, kotinin ve 3-piridilasetik asit metabolitleri de saptanmıştır (246).

Nikotinden sıçan ve fare hepatositleri ile 5'-hidroksinorkotinin, kotinin, nornikotin ve nikotin-1'-N-oksit metabolitlerinin oluşumu kaydedilmiş, ancak metabolit miktarlarının az oranda olduğu gözlenmiştir. Hamster hepatositlerinde bunlara ek olarak kotinin-N-oksit, 3-hidroksikotinin ve 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid metabolitleri de oluşmaktadır (165).

Fenobarbital verilmiş sıçanların karaciğerinde nikotin -1'-N-oksit metabolitinin oluşumu azalırken, kotininde N-oksidasyona oranla C-oksidasyonda artış meydana gelmiştir. Halbuki enzim indüksiyonu yapılmayan sıçanların karaciğerinde N-oksidasyonun C-oksidasyondan daha çok meydana geldiği gözlenmiştir (97).

Kobay hepatositleri ile nikotin enantiyomerlerinin metabolizmasında stereoselektivite gözlenmiştir. S-(-)-nikotinin daha çok kotinine; R-(+)-nikotinin ise daha çok N-okside metabolize olduğu kaydedilmektedir (61).

Yine aynı çalışmalarında Crooks ve ark. (61), R-(+)-nikotinden trans-nikotin-1'-N-oksitin; S-(-)-nikotinden cis-nikotin-1'-N-oksitin daha yüksek oranda oluştuğunu bulmuşlardır. Bu oksidasyon reaksiyonu domuz türlerinde mikrozomal flavin içeren monooksijenazlar tarafından katalize edilirken (74), insanlarda ise FMO 3 enzimi ile gerçekleşmektedir (247).

Kobayların fenobarbitalle muamele edilmesi sonrasında karaciğerde artan sitokrom P450 aktivitesi ile nikotinin oksidasyon metabolitlerinde artış gözlenmiştir (220).

Biyopsi ile alınan insan karaciğerinde nikotinden yalnızca kotinin ve nikotin-1'-N-oksit metabolitlerinin oluşumu gözlenirken (165), *in vivo* koşullara yakın şartlarda, nikotinden C-oksidasyonla oluşan kotininin major metabolit olduğu bulunmuştur (27).

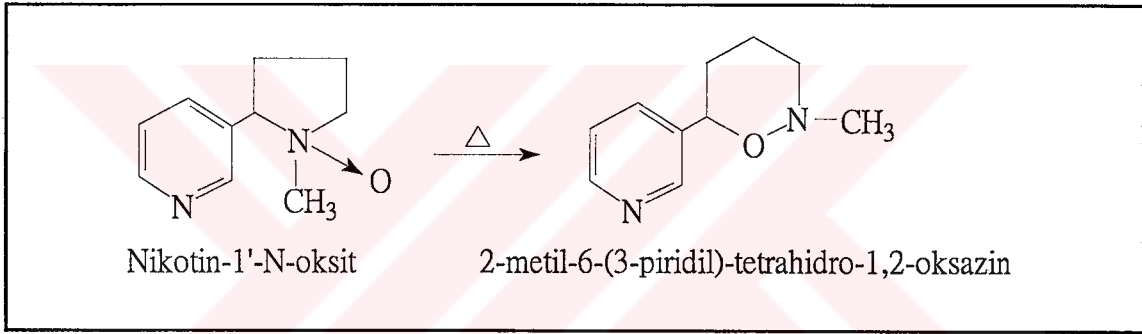
Hamster karaciğeri hücre alt fraksiyonları ile nikotinden meydana gelen nikotin-1'-N-oksitin kotininden çok daha yüksek oranda oluşabileceği ancak nornikotinin çok az oranda oluştuğu kaydedilmektedir (191).

Kobay ve tavşan karaciğeri ile nikotin-1'-N-oksitin her bir izomeri benzer miktarlarda oluşurken, fare ve hamster karaciğeri ile levo-rotator nikotin-1'-N-oksitin daha fazla oranda oluştuğu bulunmuştur (30).

Kobay karaciğeri ile radyoaktif nikotin kotinin ve nikotin-1'-N-oksit metabolize olduğu saptanmıştır (217).

(1'S, 2'S)- Nikotin-1'-N-oksitten kimyasal reaksiyon ile L-tartarik asit varlığında ferrik nitrattan nornikotin, nikotin, kotinin ve pek çok piridin türevi bileşik elde edilmiştir (151).

Nikotin-1'-N-oksit, vakumda piroliz edildiğinde 2-metil-6-(3-piridil)-tetrahidro-1,2-oksazin bileşiğini oluşturmak üzere yer değiştirme reaksiyonuna uğrar (262); bu reaksiyondan biyolojik örneklerden ekstraksiyonu zor olan nikotin-1'-N-oksitin idrardan tayininde yararlanılmıştır (142).



Nikotin-1'-N-oksitin Meisenheimer reaksiyonu

4.3.2.2 Ekstrahepatik Dokularda Metabolizması

Ksenobiyotiklerin metabolizmasında en önemli enzim kaynağı olarak karaciğer bilinmekle birlikte vücuttaki her doku en azından bazı eksojen maddeleri metabolize edici birtakım enzimlere sahiptir.

Mide-barsak kanalı, burada absorbe edilen bileşiklerin ilk geçiş olayında önemli derecede rol oynarken, burun mukozası ve akciğerleri de içeren solunum sistemi inhalasyonla vücuda giren bileşiklerin ilk uğrak yeridir.

Böbrek, yüksek düzeyde olmasa da, metabolize edici enzim sistemleri taşıyan ve vücuttan uzaklaştırılacak metabolitlerin geçtiği bir organ; deri de ksenobiyotikleri metabolize eden enzimleri yapısında bulunduran bir organdır.

Kısacası; ilaçlar, karsinojenler ve toksik maddelerle birlikte tüm ksenobiyotiklerin metabolik aktivasyonunda bu dokulardaki ilgili enzimler önemli rol oynayabilmektedir.

Nikotin ve metabolitlerinin ekstrahepatik dokulardaki metabolizması ile ilgili çok fazla sayıda çalışma bulunmamakla birlikte, kendi enzimlerini taşıyan bu dokularda nikotinin metabolik yollarının ve ilgili enzimlerin dokulardaki lokalizasyonunun araştırılması önemlidir. Bu bölümde, nikotin ve metabolitlerinin ekstrahepatik dokularda metabolizması üç ayrı kısımda incelenmiştir.

(i) Akciğer dokusu ile metabolizması

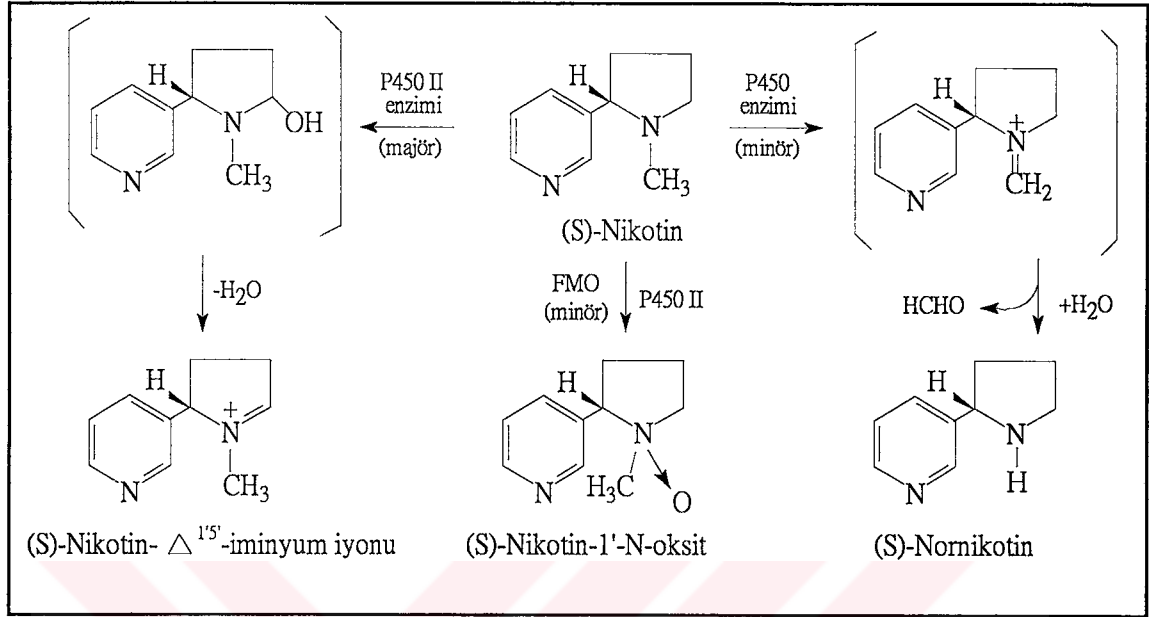
Akciğer dokusu, çok sayıda hücre tipi içeren kompleks bir doku olup, bu hücrelerin de kompleks bir yapısı vardır.

Bu dokudan izole edilen akciğer enzimleri arasında karaciğerde bulunan konsantrasyonunun %10'u oranında sitokrom P450, NADPH-sitokrom P450 redüktaz, flavin içeren monooksijenaz, sitosolik enzimlerden glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz yer almaktadır (117).

Sıçanlarda nikotinin metabolizması ve kotinin oluşumunun önemli bir bölümünün ekstrahepatik dokularda meydana geldiği bulunmuştur. Major metabolit kotininin konsantrasyon-zaman profili izole edilen karaciğer ve akciğerde hemen hemen aynı bulunmuştur (98).

İzole edilmiş tavşan akciğeri ile de nikotinden, kotinin ve nikotin-1'-N-oksit metabolitlerinin oluştuğu bulunurken (193), 3'-hidroksikotinin, kotinin-1-N-oksit ve az

miktarlarda da nornikotin, norkotinin, 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid metabolitlerinin varlığı da tayin edilmiştir (2).



Tavşan akciğer mikrozomları ile (S)-nikotinin genel oksidasyonu

(ii) Beyin dokusu ile metabolizması

Beynin nikotine karşı hassasiyetinde yaşa bağlı olarak değişimler gözlenir. (297).

Nikotin ve nornikotin (1) stereoizomerleri sıçan beyinde bölgesel dağılım farkı göstermektedir. (-) -Nikotinin beyne affinitesi (55,293) ve konsantrasyonu (+)-nikotininkinden daha yüksek bulunmuştur (183).

[14 C]-Nikotinin kedi beyinde çok hızlı bir şekilde biriktiği ve uygulamadan 15 dak. sonra dahi hala subtratın varlığının kaydedildiği bildirilmektedir (309).

Pentobarbital verilen köpeklerde nikotinin intravenöz uygulanmasından sonra santral sinir sisteminde nikotin konsantrasyonunun azaldığı gözlenmiştir (307).

Nikotinin intraperitoneal olarak farelere enjeksiyonunu takiben karaciğerle beraber beyinde de çok kısa sürede dağılması ile birlikte fenobarbital verilmesinden sonra beyindeki konsantrasyonlarda önemli ölçüde azalma kaydedilmiştir. Ancak intravenöz uygulamadan sonra beyinde nikotin seviyelerinde azalma olmaması nikotinin bu organa yüksek ilgisinden dolayı hızlıca geçişini gösterebilmektedir (296).

Crooks ve ark. (60) $(\pm)$ -[2'- ^{14}C] nikotinin subkutan yoldan verildiği sıçanlarda, beyinde başlıca kotinin, nornikotin ve norkotinin metabolitlerinin oluşum mekanizmasını araştırdıklarında, kan beyin engelini aşabilen ve santral sinir sisteminde bulunabilen kotininin beyinde metabolize olamadığı, dolayısıyla da beyinde bulunan norkotininin, kotininin N-demetilasyonu ile değil, başlangıçta oluşan nornikotinin 5'-karbon atomu oksidasyonundan meydana geldiği sonucuna varmışlardır.

Kobay ve sıçan beyin homojenatlarının 37°C'de, nikotinle inkübasyonu sonucu kotinin metabolitinin oluştuğu ve metabolit miktarının fenobarbital verilmiş hayvanların beyinde 5 kat arttığı gözlenmiştir (145).

Nikotin, ganglionik tip nikotinik reseptörler aracılığıyla etki göstererek fare beyindeki kapiller dolaşımında reaktif oksijen radikali oluşumuna ve dolayısıyla da doku hasarına neden olur (337).

Akut periferik nikotin verilen sıçanların beyinde nornikotinin nörofarmakolojik aktivite gösterebilecek konsantrasyonlarda bulunduğu (58,59), dolayısıyla kronik nikotin verilmesi halinde beyinde birikebileceği, ancak kotininin beyindeki konsantrasyonlarının benzeri bir etkiye yol açmayabileceği vurgulanmaktadır (104).

Sıçan beyini sitokrom P450 enzimlerinden P4502B1 ve 2B2, P4501A1 ve 1A2, P4502E1, fenobarbital, 3-metilkolantren, etanol gibi ajanlar tarafından indüklenmektedir. Kronik olarak vücuda alınan nikotin, beyindeki P450 enzimlerinin seviyelerini değiştirmektedir. Dolayısıyla, kronik nikotin alınımı, santral sinir sistemini etkileyen ilaçların beyinde dağılımını ve farmakodinamik etkilerini değiştirebilir ayrıca,

nikotinin kendi metabolizması da beyinde artabilir. Çünkü beyinde bazı P450 enzimlerinin nikotinle artması, nikotinin kronik alınımına bağlı olarak beyindeki metabolizmasında artmaya neden olabilmektedir (8).

Beyindeki aktivasyon oranı karaciğerdekine oranla az olmakla birlikte, beyindeki farklı bölgelerin değişen oranlarda Sit P450 enzimi taşıdığı (28) ve substrat metabolizmasında farklı kapasitelere sahip olduğu kaydedilmektedir (294).

Radyoaktif nikotinin fare ve kedilere intravenöz enjeksiyonundan sonra beyinde metabolit olarak kotinin varlığı tespit edilmiştir (10).

Benzer bir çalışmada Schmitterlöw ve ark. (276) karaciğer ve böbrek dokularıyla birlikte fare beyinde de kotinin metabolitinin oluşumunu kaydetmişlerdir.

Alzheimer hastalığının yaşlılarda görülen bir tipinde beyinde çok sayıda transmitter değişimi olmakta ve bu hastalık tipi histopatolojik bulgularla karakterize edilmektedir. İnsan beyinde yaygın olarak dağılmış bulunan nikotinik reseptörlerin alt tiplerine yüksek ilgi Alzheimer hastalığının bu çeşidinde azalmaktadır. Nikotinik reseptörlerin ilgisini düşürerek bu hızlı hassasiyet ortadan kaldırılıp nikotinik reseptörler asetilkolinin serbestleşmesini etkileyebilmektedir. Nikotin, beyindeki asetilkolin reseptörlerinin bir alt sınıfını uyarır ve bu nedenle de  nbeyindeki kolinerjik sinirlerin dejenarasyonuna yol açan bu hastalığın tedavisinde önemli bir değer taşıyabileceği  ne sürülmektedir (232). Ancak bu hastalığın belirtilerini düzeltmek için nikotin gibi potansiyel terapötik ajanların etkili olabilecek optimum dozlarda alınması gerekliliği vurgulanmaktadır (82).

(iii) Diğer ekstrahepatik dokulardaki metabolizması

Uzun yıllar öncesine dayanan çok sayıda çalışma insan organizması da dahil olmak üzere çeşitli türlerin böbrek, akciğer gibi dokularından izole edilen mikrozomlarının nikotini metabolize edebileceğini göstermektedir (31,128,193).

(-)-Nikotinin kobay böbreği ve akciğerinde az miktarda kotinin ve nikotin-1'-N-oksit metabolitlerini oluşturduğu ancak kalp; dalak veya kanda hemen hemen bu metabolitlerin hiçbirine rastlanmadığı gözlenmiştir (30).

4.3.2.3 Nikotin ve Kotininin Nikotinamid Nükleotid Türevleri

Nikotinin toksisitesine neden olan moleküler olaylar üzerindeki araştırmalar halen devam etmekte olup, nikotin ve metabolitlerinin nükleotid analoglarının bu konuda rol oynadığı düşünülmektedir.

Nikotin ya da kotininin tavşan karaciğer mikrozomları ile trifosfopiridin (TPN) varlığında yapılan inkübasyonundan nikotin ve kotinin nikotinamid nükleotid analoglarının oluşumu gözlenmiştir (285).

Fiziksel, kimyasal ve immünolojik bulgular, TPN'nin nikotinamid parçasının bu analogdaki nikotinle yer değiştirdiğini göstermektedir.

Tütün dumanı içeriğinin GLC ve MS analizleri sonucu izole edilen pek çok alkaloidle birlikte nikotinamidin de yapısı aydınlatılmış (43) ve metabolizması araştırılmıştır (288).

Nikotin-TPN konjugatı, karaciğer mikrozomal preparatı yerine domuz beyini veya sığır dalağı DPNaz'ı taşıyan inkübasyon karışımlarından da izole edilmiştir. Bu konjugatların, çok sayıda doku ve serumda var olan (233) ve yapısında piridin taşıyan bileşiklerin DPN ve TPN'lerindeki nikotinamid parçalarının değişimini sağlayabilen DPNaz'ın etkisi aracılığıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Nikotin-TPN'nin TPN'ye bağlı reaksiyonlarda TPN ile yer değiştirmede ancak, TPN'ye bağlı iki enzim olan glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ya da glutamat dehidrojenaza karşı yarışmalı inhibisyon gösterdiği bulunmuştur.

Nikotin ve kotininin TPN ve DPN konjugatları, karaciğer mikrozomları varlığında kendilerine karşılık gelen mononükleotidlerine metabolize olmaktadır

(283). TPN konjugatlarının enzimatik hidrolizi ile meydana gelen nikotin ve kotinin mononükleotidin karaciğer ve akciğer gibi dokularda birikiminin, nikotinin geniş metabolik perspektifinde çok önemli bir yere sahip olmasa da potansiyel olarak dikkatlerin yoğunlaştırılması gerektiği vurgulanmaktadır.

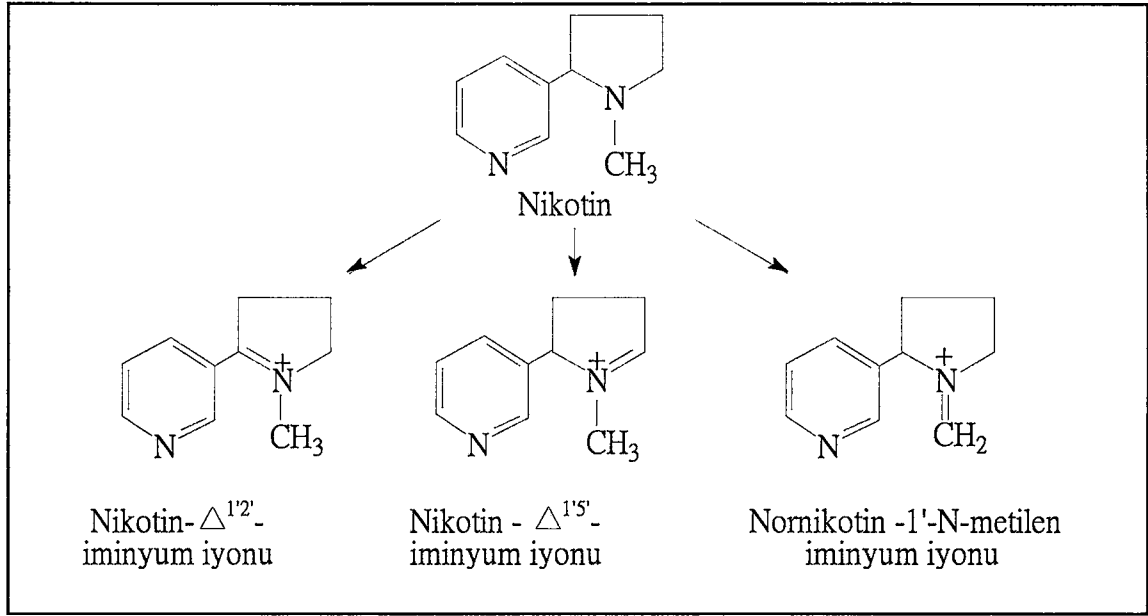
4.3.2.4 Nikotin Metabolizmasında Rol Oynayan Reaktif Ara Ürünler

Nikotinin metabolizması süresince oluşan reaktif ara ürünlerin karaciğer ve akciğer makromoleküllerine kovalent bağlarla bağlandığı bilinmektedir. Bu makromoleküllerin metabolizmaya bağlı alkilasyonu tütün ürünlerine uzun süreli maruz kalanlarda irreversibl lezyonlara sebep olabilmektedir.

Nikotinin oksidasyonu yıllardan beri sentetik ve mikrobiyolojik çok sayıda modelde çalışılmış ve nikotinin sitokrom P450 enzimi ile katalizlenen reaksiyonunda nikotin- $\Delta^{1',5'}$ iminyum iyonunun oluşumu saptanmıştır (42,211). Bu ara ürün tavşan karaciğeri supernatantının nikotin ile inkübasyonunu takiben 5'-hidroksinikotinden su çıkması sonucu oluşmaktadır.

İminyum iyonlarının kendilerine karşılık gelen laktamlara metabolize olan, bazı doymuş N-heterosiklik ksenobiyotiklerin metabolizmasında ana ara ürünler olduğu düşünülmektedir (41).

Nikotinden oluşan reaktif iminyum iyonları, çok farklı kimyasal aktiviteye sahip olarak nikotinde bulunmayan nükleofillere karşı kimyasal bir affinite göstermeleri ve taşıdıkları pozitif yükten dolayı nikotinik reseptörlere bağlanabilmelerinden dolayı önemlidir (211).



Sitokrom P450 enzimine elektron transferi ile oluşan nikotin iminyum iyonları

Carlson ve ark. (47) $\Delta^{15'}$ -nikotinyum iyonunun oluşumunda (S)-nikotin 5' α -karbon oksidasyonun, tersiyer aminlerin P-450 tarafından katalizlenen oksidasyonları için kabul edilen tek elektron transferinden ziyade bir hidrojen atomu kaybı ile oluşan bir reaksiyon olduğunu öne sürmüşlerdir.

Tavşanda nikotin- $\Delta^{15'}$ -iminium iyonunun oluşumu karaciğer ve akciğerle hazırlanan inkübasyon karışımlarında benzer miktarlardayken, böbrek dokusunda da çok daha az miktarda bulunmuştur (239).

Nguyen ve ark. (230), NADPH, $MgCl_2$ ve NaCN içeren tavşan karaciğeri süpernatant fraksiyonuyla nikotinink inkübasyonunu yaptıkları çalışmalarını sunucu inkübatlarda kotinin ile birlikte iki izomerik siyanonikotin türevi olan 5'-siyanonikotin ve N-(siyanometil) nornikotin oluşumuna rastlamışlardır.

Nikotin iminyum iyonlarının oluşumunun farklı deney hayvanlarının mikrozomlarında siyanür iyonu katımı ile araştırıldığı çalışmalarında Gorrod ve ark. (116), siyanür iyonları tarafından yakalanan reaktif ürünlerin en çok maymun sonra sırasıyla tavşan, kobay, köpek, hamster ve sıçan karaciğer mikrozomlarında meydana geldiğini bulmuşlardır.

Benzer bir çalışmada Gorrod ve Sai (114) nornikotin ve anabasinin, tavşan karaciğeri mikrozomları ile siyanür iyonları varlığında 1'-N-siyanometil bileşiklerine dönüştüğünü bulmuşlardır.

Siyanür iyonları aldehid oksidazı bloke etmekte olup, N-(siyanometil) nornikotin N-C bağı bölünmesi olmaksızın nikotinin N-demetilasyonu süresince oluşmaktadır (231).

Tütünde bulunan, 1'-N-metilanabasin ve myosmin gibi alkaloidlerin de siyanür veya diğer nükleofillerle reaksiyona girebilen reaktif ürünlere dönüştüğü, özellikle 1'-N-metilanabasinde yüksek düzeyde iminyum iyonu olduğu gözlenmiştir. Bu oluşumdan dolayı, iminyum iyonları aracılığıyla tütün tarafından Alzheimer hastalığına karşı kazanılmış bir etki söz konusu olduğunda, 1'-N-metilanabasin yapısı üzerinde araştırmaların yoğunlaştırılması ve hastalığın önlenmesi için uygun bir ilaç geliştirilmesinin mümkün olabileceği söylenmektedir (4).

4.3.3 Major Nikotin Metabolitlerinin Metabolizması

Nikotin, tütün ürünlerinde bulunan en yüksek miktarda ve farmakolojik etkili alkaloid olmakla birlikte, kompleks bir karışım halindeki tütün alkaloidlerinden yalnızca biridir. Nikotinin major metabolitleri ve aynı zamanda birer tütün alkaloidi olan nornikotin, kotinin, norkotinin ve diğer alkaloidlerin metabolizması da (19) nikotin kadar önem taşımaktadır.

4.3.3.1 Nornikotinin Metabolizması

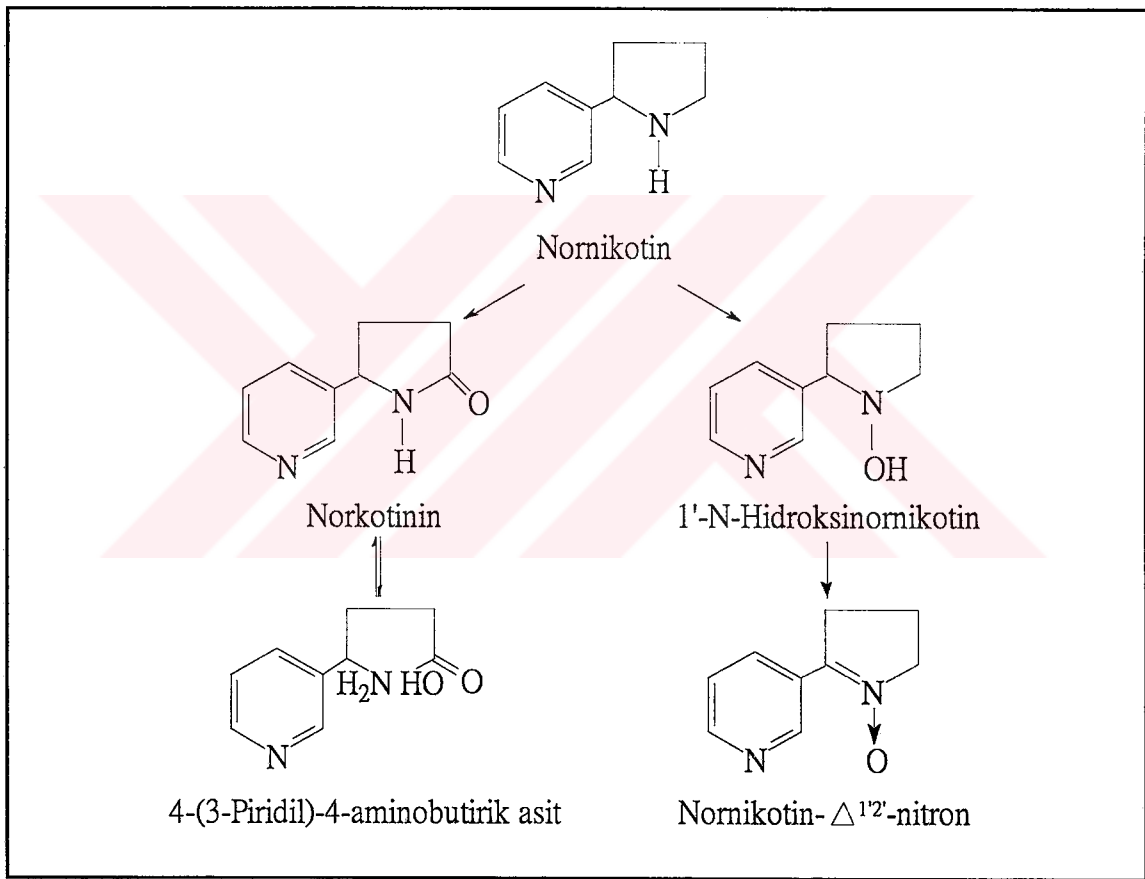
Nikotinin metaboliti ve bir tütün alkaloidi olan nornikotinin tütün bağımlılığında önemli bir katkısı bulunduğu saptanmıştır (15).

Köpekte öldürücü dozu 4 mg/kg olan nornikotin, alınımından sonra 16 saat içinde idrarla atılmaktadır (136) ve (-)-nornikotinin köpektaki idrar metabolitleri

norkotinin ve sulu fazda norkotinine laktamize olan 4-(3-piridil)-4-aminobutirik asittir (319).

Papadopoulos (246), tavşanda nornikotinin hem *in vivo* hem de *in vitro* karaciğer mikrozomları ile metaboliti olarak norkotinin oluştuğunu göstermiştir.

(S)-Nornikotin, karaciğer mikrozomları kullanılarak araştırılan türlerden fare, hamster, kobayda norkotinine metabolize olmuş; deney hayvanlarının tümünde de nornikotin-1'- Δ -nitron metabolitine rastlanmıştır (3).



Nornikotinin genel metabolik yolları

4.3.3.2 Kotininin Metabolizması

Nikotin major metabolitlerinden biri olan kotininin, gerek bağımlılarda, gerekse pasif tütün dumanına maruz kalanlarda ilgili araştırmalarda kantitatif bir belirleyici olarak kullanıldığı gösterilmiştir (149).

Radyoaktif kotininin fareye intravenöz uygulanmasından sonra, safra kesesi, böbrekler, salgı bezleri, mide ve barsaklarda yüksek konsantrasyonlarda dağılım gösterdiği bulunmuştur (35).

Plazma ve tükürük bezlerinde kotinin konsantrasyonları zıt faz sıvı kromatografisi ile tayin edilmiştir (181,250).

(-)-Kotininin insanlarda idrar metaboliti olarak hidroksikotinin ve 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid metabolitleri tespit edilmiş olmasına rağmen, köpekte (201) rastlanan (-)-norkotinin metaboliti insanda gözlenmemiştir (36,279). Buna karşılık aynı substratın insan, köpek ve sıçanlardaki idrar metabolitlerinden biri de 3-piridilasetik asittir (195).

Benowitz ve Jacob (23); tütünden nikotin günlük alınının indikatörü olarak plazmadaki kotinin seviyelerinin kantitatif perspektifinden yararlanılabileceğini ortaya koymuşlardır. Ancak sıçandaki metaboliti olan 5'-hidroksinorkotininin daha uzun yarılanma ömrüne sahip olmasından dolayı, düşük konsantrasyonlarda kotininin yerine bu amaçla tercih edilebileceği sunulmuştur (168).

Kotininin insanda P4502A6 enzimi tarafından aktive edilen trans-3'-hidroksikotinine metabolizması major bir metabolik yoldur (215).

Major metabolitlere göre daha polar olan kotinin-N-oksit metabolitinin yapısı aydınlatılmış (66) ve oluşum miktarı bakımından nikotin -1'-N-oksitten sonra geldiği bulunmuştur (290).

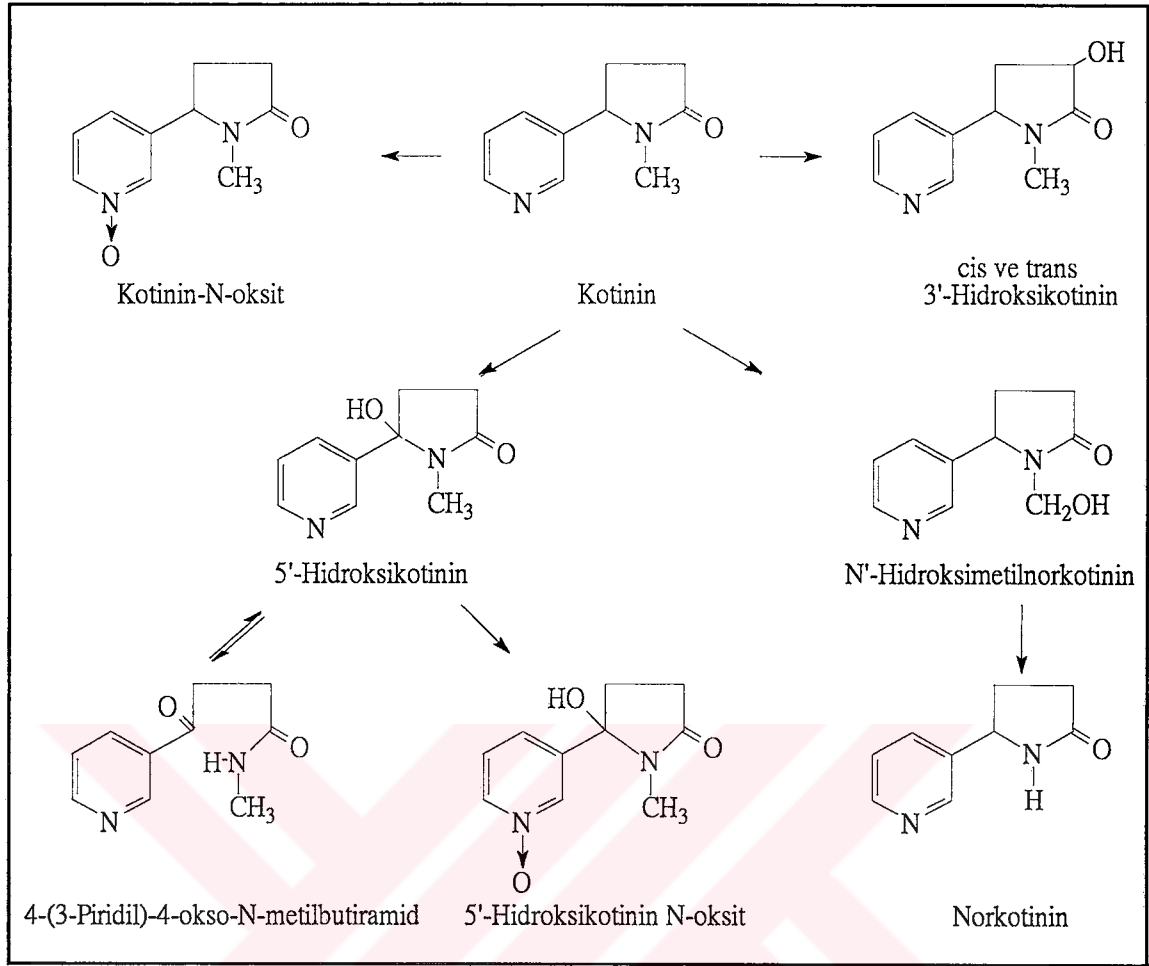
İnsanda en önemli idrar metabolitlerinden biri N-metilkotininyum iyonu (199) diğeri kotinin-N-glukuronittir (46).

Kotininin, maymunlardaki major *in vivo* metaboliti olarak trans-3'-hidroksikotinin oluşumu gözlenmiştir (67,68).

Rhesus maymuna (S)-kotinin verilmesinden sonra idrar örneğinin analizi, 5 numaralı karbon atomunda meydana gelen hidroksilasyonun hidroksilaktam 5'-hidroksikotinin ile ketoamid 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramidin tautomerik bir karışımını oluşturduğu NMR ve MS spektrumlarından faydalanılarak saptanmıştır. Açık halka ketoamid tautomer ile hidroksilaktamın dengesi NMR ile kontrol edilmiş ve döterolanmış kloroformda bu dönüşümün yavaş, ancak suda hızlı olarak gerçekleştiği, her iki çözücüde de dengede olan karışımın siklik tautomerin %80'inden daha fazla oranda meydana geldiği kaydedilmiştir (229).

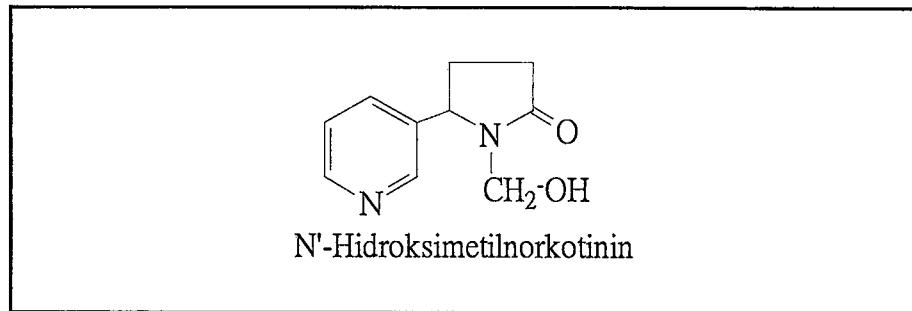
S-(-)-Kotininin kobay idrarından izole edilen *in vivo* metabolitlerinden 3'-hidroksikotininin kotinin-N-oksitten daha yüksek oranda oluştuğu tespit edilmiştir (63).

Farede ise kotininin major idrar metabolitleri olarak norkotinin, hidroksikotinin ve 3-piridilasetik asit oluşumu gözlenmiştir (35).



Kotininin genel metabolizması

Kotininin *in vitro* metabolizması ile ilgili araştırmalar süresince hamster karaciğer mikrozomları ile inkübasyonunda yeni bir primer metaboliti olan N'-hidroksi-metilnorkotininin yapısı GC-MS ile aydınlatılmıştır (177).



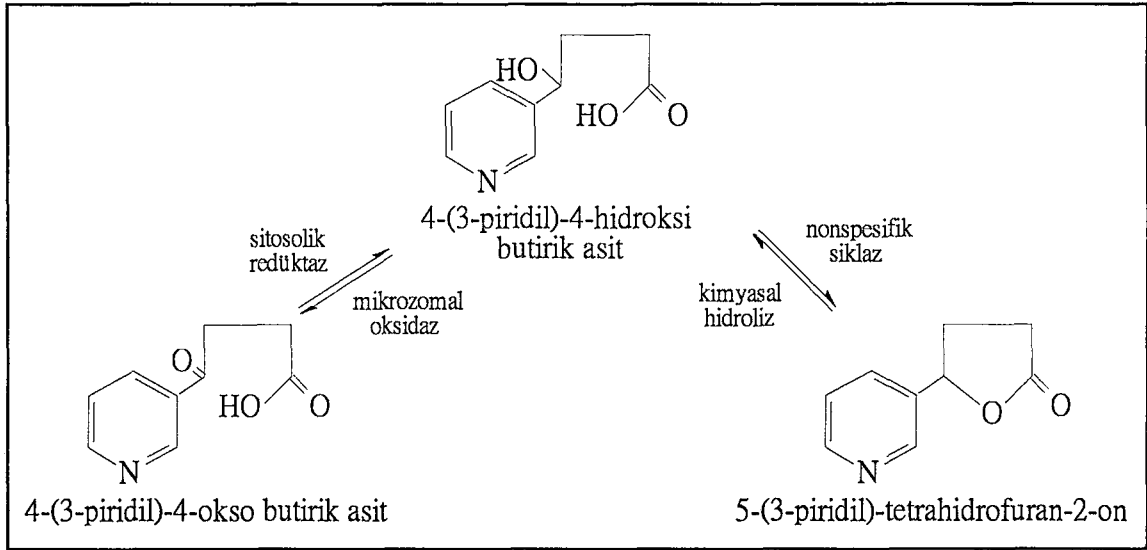
Fenobarbital verilmiş farelerde, kotininden metabolitlerinin oluşumunda önemli artışlar kaydedilmiş olup (97), fare karaciğeri homojenatı ile kotininden hidroksikotinin, 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid ve/veya norkotinin metabolitlerinin oluştuğu tespit edilmiştir (295).

(S)-Kotinin-N-oksitin tavşan ve köpeklerdeki idrar metabolitleri olarak başlıca (S)-kotinin ile birlikte (S)-norkotinin, hidroksikotinin ve 5'-hidroksikotinin tayin edilmiştir. Bazı piridin N-oksitleri kendilerine karşılık gelen aminlere redükleyen E.kolinin, (S)-kotinin-N-oksitin, (S)-kotinine redüksiyonunda karaciğer enzimleri kadar rol oynayabileceği gözlenmiştir (336).

Kobay karaciğer mikrozomlarının enzim kaynağı olarak kullanıldığı araştırmalarında Li ve ark. (178), kotininin, 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid ve 3'-hidroksikotinine metabolize olduğunu bulmuşlardır.

(-)-Kotininin köpek ve sıçandan izole edilen metabolitlerinden biri de 4-(3-piridil)-4-oksobutirik asittir. Bu metabolit sıçanlarda 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid substratından da oluşmaktadır (278). McKennis ve ark. (198), köpek idrarında görülen 4-(3-piridil)-4-metilaminobutirik asit metabolitinin fizyolojik koşullarda kendiliğinden laktam kotinine dönüştüğünü öne sürmüşlerdir.

Sai ve Gorrod (269), 4-(3-piridil)-4-okso-butirik asiti substrat, tavşan, sıçan, kobay ve hamster karaciğer mikrozomlarını enzim kaynağı olarak kullandıkları çalışmalarında hiç bir metabolit oluşumunu gözlememişler ancak, aynı substratı farklı deney hayvanlarının 10000 g ve 27000 g çözünebilen karaciğer hücresi fraksiyonlarıyla inkübe ettiklerinde 4-(3-piridil)-4-hidroksibutirik asit ve 5-(3-piridil)-tetrahidrofuran-2-on metabolitlerinin varlığını kaydetmişlerdir. Tavşan ve hamsterde daha yüksek oranda gerçekleşen bu reaksiyonun tam tersi olan oksidasyon da mümkündür.



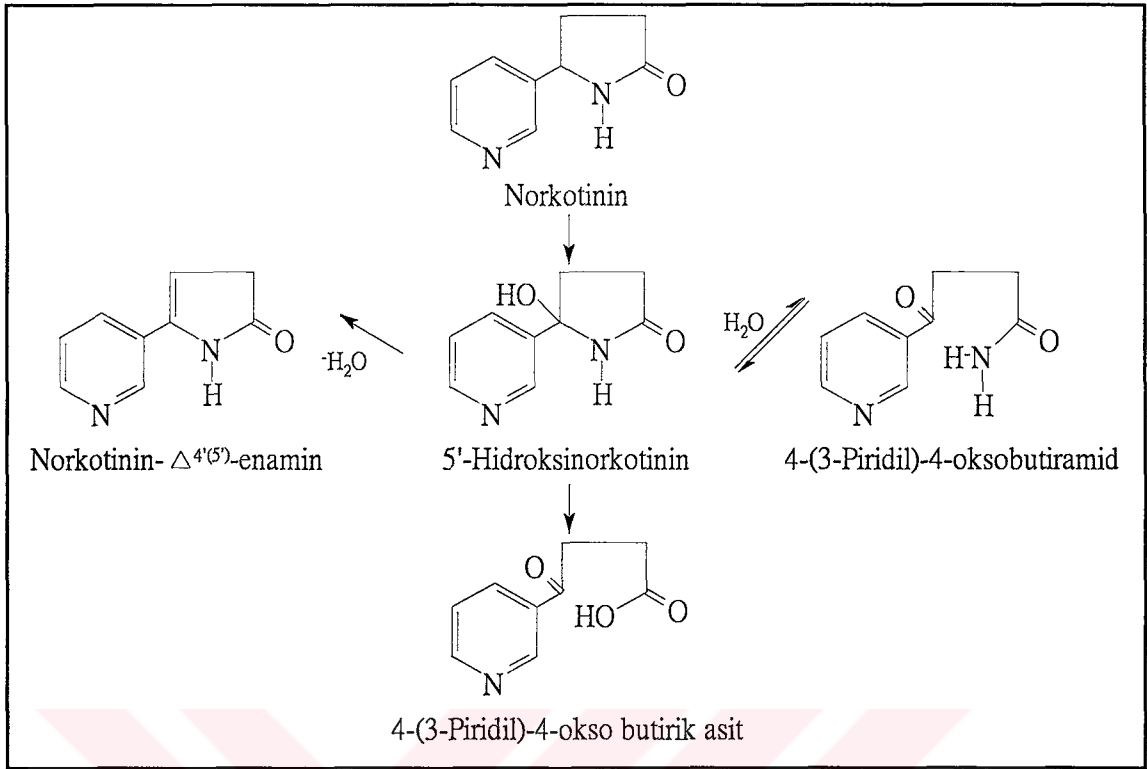
Nikotin asit metabolitlerinin birbirine dönüşümü

4.3.3.3 Norkotinin Metabolizması

Schwartz ve McKennis (279), oral intubasyonla verdikleri erkek albino sıçanların idrarında (-)-norkotininin metabolizmasını araştırmışlar ve sıçanda kotininden oluştuğu daha önce gösterilmiş olan ve daha sonra ketoasit yapısındaki 4-(3-piridil)-4-oksobutirik asite metabolize olan 4-(3-piridil)-4-oksobutiramid ara ürününün varlığını bulmuşlardır.

Köpek ve sıçan idrarında (-)-norkotinin idrar metabolitleri olarak 4-(3-piridil)-4-oksobutirik asit ve 4-(3-piridil)-4-hidroksibutirik asit elde edilmiştir (196).

Sıçan mikrozomları kullanılarak norkotinin metabolizmasının araştırıldığı çalışmalarında Eldirdiri ve ark. (90), ketoamid olan 4-(3-piridil)-4-oksobutiramid ve nikotinamid metabolitlerinin oluşumunu gözlemlemişlerdir. Ketoamid metabolitinin miktarı fenobarbitalle indüklenmiş sıçan mikrozomları kullanıldığında artmıştır.



Norkotininin genel metabolizması

4.3.4 Minör Nikotin Metabolitlerinin Metabolizması

4.3.4.1 4-(3-Piridil)-4-oksobutiramidin Metabolizması

4-(3-Piridil)-4-oksobutiramidin sıçan karaciğeri mikrozomları kullanılarak araştırılan metabolizmasında asit yapıya sahip 4-(3-piridil)-4-oksobutirik asit ve nikotinamid oluştuğu tayin edilmiştir (90).

Nikotinamid oluşumunun enzime bağlı olduğu, ısıyla denatüre edilen mikrozomlarla hiçbir metabolit gözlenememesine dayandırılmıştır.

4.3.4.2 4-(3-Piridil)-4-okso-N-metil butiramidin Metabolizması

Sıçanda bu ketoamidin idrar analizleri sonucu 4-(3-piridil)-4-oksobutirik aside metabolize olduğu bulgusu, (-)-nikotinden 3-piridilasetik asit oluşumunda bu yapının bir ara ürün olabileceği konusunda önemli bir kanıttır (278).

4.3.5 Nikotin Alkaloidlerinin Farmakolojik ve Toksikolojik Açıdan İncelenmesi

Radyoaktif nikotinin tavşan karaciğer mikrozomları ile inkübe edilmesi sonucu mikrozomal makromoleküllere kovalent bağlarla bağlanan metabolitlerin oluşumu tayin edilmiştir, bu durum uzun süre sigara içen kişilerde rastlanan irreversibl birtakım lezyonların oluşumunda rol oynayabilmektedir. SKF 525-A ve n-oktilamin gibi ajanlar bu bağlanmayı metabolizmayla birlikte inhibe ederken, fenobarbital iki durumu da indüklemiştir (289).

4.4 Nikotin Metabolizmasında Enzimoloji

Sitokrom P450, karma fonksiyon oksijenaz sisteminin bir bölümü olan hemoproteinlerin bir ailesidir.

Karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda çok yüksek bir oranda ve ayrıca hepatosit çekirdeği ve ekstrahepatik dokularda da bulunmaktadır (9).

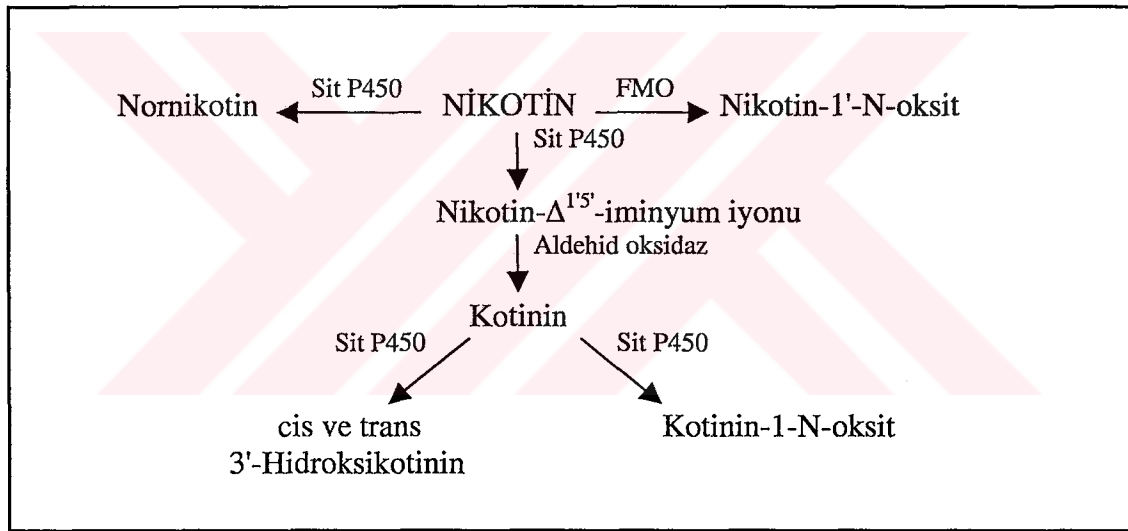
Karaciğer, uzun süreli karsinojenik çalışmalar için en iyi hedef organdır. Bu özelliği ile de hem mekanik araştırmalara hem de risk tayinine imkan tanır (273).

Eksojen ve endojen kaynaklı bileşenlerin oksidatif metabolizmasında önemli bir rol oynayan sitokrom P450 süper familyası her biri tek bir protein üreten 150'den çok gene sahiptir. Son yıllarda 27 familyaya bölünen bu süper familyanın (Örn; P4501) 10 tanesi memelilerde bulunmuş olup familyaların her biri de alt familyalara

bölünmüştür (Örn; P4501A), bu grubu takip eden tek genler de yine sayılarla ifade edilmiştir (Örn; P4501A1) (222).

Sitokrom P450 ve çeşitli ilaç metabolize edici karaciğer enzimlerinin prototipik indükleyicisi olan fenobarbitalin sıçanda P4502B geni alt familyasını aktive ettiği gözlenmiştir (324).

Farklı doku ve hücre düzeylerinde yapılan hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, özellikle idrar metabolitlerinden elde edilen bulgular, nikotin Faz I metabolizmasında başlıca iki mikrozomal monooksijenaz sisteminin rol oynadığını göstermektedir. Bunlardan ilki sitokrom P450 monooksijenaz diğeri de flavin içeren monooksijenazdır.



Nikotin major metabolitlerinin oluşumunda rol oynayan enzimler

Dış dünya ile insan vücudu arasındaki metabolik sınırı oluşturan sitokrom P450 enziminin farklılıklar göstermesi bazı 'idiyosenkratik' ilaç reaksiyonlarını açıklayabilmektedir. P450 profilindeki bireyler arası farklılıkların bazı hastalıklara karşı gözlenen eğilim farkını kısmen aydınatabileceği düşünülmektedir (321).

Organik bileşiklerdeki azot, azotun pKa'sına göre iki farklı şekilde okside olmaktadır. Düşük pKa'ya sahip azotlu bileşiklerin sitokrom P450 enzimi ile, daha

yüksek pKa'ya sahip olanların ise flavin adenin nükleotide bağlı bir enzim sistemi ile oksidasyona uğradığı öne sürülmüştür (110).

4.4.1 Nikotin Metabolizmasında Sitokrom P450 Enziminin Rolü

(S)-Nikotin ve sitokrom P450 arasındaki kuvvetli kompleksin, nikotinin α -karbon oksidasyonunu bölgesel ve stereokimyasal olarak kontrol eden en önemli parametre olduğu, farklı sitokrom P450 model sistemleri kullanılarak bulunmuştur (251).

Saflaştırma tekniklerindeki gelişmeler de fenobarbitalle indüklenebilen sitokrom P450 enzimlerinin çeşitli kollara ayrılabilmesini gösterir (268).

İnsanda kotininin P450A6 enzimi ile trans-3'-hidroksikotinine metabolize olduğu (215) ve son yıllarda yapılan bir çalışma ile (212) bu enzimin kotininden 5'-hidroksikotin ve norkotin oluşumunu da katalizlediği bulunmuştur (217).

P450D6 enziminin ise, insanda nikotin ve kotinin metabolizmasında major bir rol oynamadığı öne sürülmekte (25,208), sıçan karaciğerinde ise kotinin oluşumundan sorumlu enzimin P450B1 olduğu kaydedilmektedir (120).

P450B6 enzimine benzer şekilde, P450A6 enzimi de insan ve fare karaciğerinde oldukça farklı düzeylerde kaydedilmektedir (96).

Erkek sıçanlarda nikotin oksidasyonunda rol oynayan major sitokrom P450 izoenzimi P450C11'dir (221,325).

Tavşan karaciğerinden saflaştırılmış P450 enzimleri içinde, nikotinden 5'-oksidasyon ve N-metilhidroksilasyon metabolitleri en çok P4502 ve 3B enzimleri ile oluşmaktadır (190).

Hamster karaciğer mikrozomlarında kotininin, trans-3'-hidroksikotinin, 5'-hidroksikotinin ve N-(hidroksimetil) norkotinine dönüşümünün insanda P4502A6'ya benzeyen P4502A8 ile gerçekleştiği bulunmuştur (212).

P4502A6 enzimi, tütün yapısındaki karsinojenik nitrozaminlerin metabolik aktivasyonunda da rol oynamaktadır. Bundan dolayı, bu nitrozaminlerin genotoksik metabolitlerinin oluşumu azalmış bir P4502A6 aktivitesi ile azalabilir ise bunun da bu mekanizma ile oluşan akciğer kanseri riskini azaltabileceği vurgulanmaktadır (180).

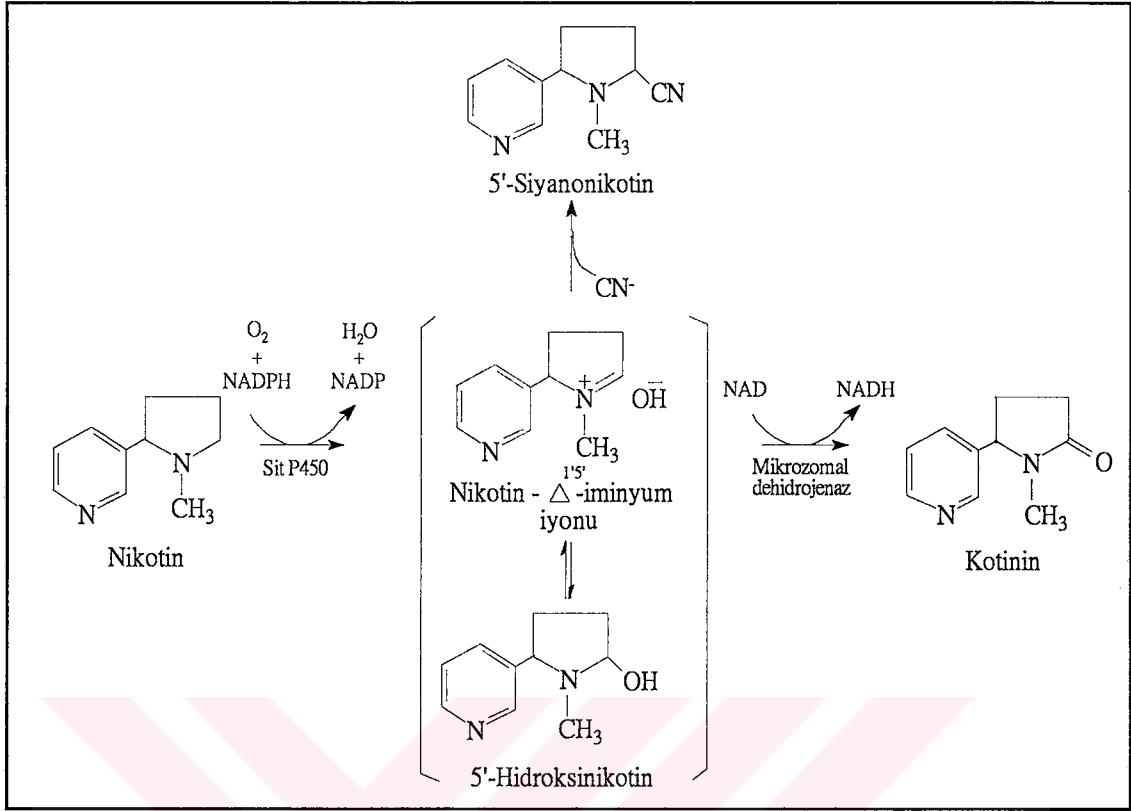
4.4.1.1 Kotinin Oluşum Mekanizması

İnsanda nikotinin C-oksidasyonunu yani, nikotin- $\Delta^{1(5)}$ -iminyum iyonuna dönüşümünü sağlayan P-450 enzimleri içinde en yüksek aktiviteye P4502B6 enziminin sahip olduğu, 2C9 ve 2E1 formları ile az oranda aktivite elde edilirken; 2A6,2C8,2F1 gibi formları ile bu oranın daha da azaldığı kaydedilmektedir (192,208,214). Nikotin N-oksit oluşumu ise bu enzimlerin hiçbiri ile gözlenememiştir (95).

İnsan, fare, sıçan, hamster, tavşan ve kobay fetüsünden hazırlanan karaciğer mikrozomları ile nikotin- Δ^{15} -iminyum iyonunun aldehid oksidazlar aracılığıyla kotinine metabolize olduğu bulunmuştur (127).

Nikotin- Δ^{15} -iminyum iyonunun kobay ve sıçanlara intraperitoneal enjeksiyonundan sonra idrarda kotinin ve nikotin 1'-N-oksit metabolitleri bulunmuştur (112).

Nikotin- Δ^{15} -iminyum iyonunun azot varlığında yapılan inkübasyonu ile kotinine bağlanan oksijenin sudan kaynaklandığı gözlenmiştir (112).



Nikotinden metabolik yolla kotinin oluşumu

Nikotin- $\Delta^{15'}$ -iminyum iyonu moleküler özellikleri bakımından aldehid oksidaz enzimine çok güçlü ilgi göstermektedir (41). Ancak Obach ve Vunakis (238), nikotin- $\Delta^{15'}$ -iminyum iyonundan kotinin oluşumunda sitosolik aldehid oksidazlardan başka, mikrozomal fraksiyonla katalizlenen ve özellikle NAD, çok az da NADP gerektiren, oksijen kaynağı olarak da suyun kullanıldığı ikinci bir yolun varlığını tavşan karaciğeri mikrozomlarını kullanarak açıklamışlardır.

Kotinin oluşumunda insan karaciğeri mikrozomal preparatının enzim kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalarında Peterson ve ark. (252), iminyum iyonunun oluşumunun stereoselektif olduğunu gözlemlemişlerdir.

4.4.2 Nikotin Metabolizmasında Flavın İçeren Monooksijenazlar (FMO)'ın Rolü

Mikrozomal flavın içeren monooksijenazlar (FMO) ok sayıda ilaç ve ksenobiyotiğın NADPH'a bağlı metabolizmasını katalizerler. FMO enzimleri sıçan, fare, tavşan karaciğeri, fare ve tavşan akciğeri (88,173) domuz, köpek karaciğeri ve akciğeri (76), fare böbreği (315), kobay ve hamster karaciğeri, akciğeri ve böbreğinden (310) elde edilen mikrozomal preparatlardan saflaştırılmıştır. Substrat affinitesi, immünolojik reaksiyonlar ve diğer fiziksel özelliklerde de gözlenen farklılıklar bu enzimin dokular arasında farklılıklar gösterdiğine işaret etmektedir.

Tavşan akciğer mikrozomlarından izole edilen flavın içeren monooksijenazın alkilamin substratlarının N-oksitlere oksidasyonunu katalizlediği tayin edilmiştir (257).

4.4.3 Nikotin ve Diğer Tütün Alkaloidlerinin Sitokrom P-450 ve FMO Tarafından Ekstrahepatik Metabolizması

Ksenobiyotiklerin metabolizmasında en önemli organ karaciğer olarak bilinmekle birlikte, vücuttaki her doku, kısmen dahi olsa en azından bazı eksojen maddeleri metabolize edici enzim sistemlerine sahiptir.

İnsanda akciğer dokusunda lokalize olan sitokrom P450 enzimlerinin aydınlatılması zor bir işlemdir. Çünkü hasta ve nekrotik insan akciğeri çok daha kolay elde edilebilirken, enzim düzeyleri bu hastalıktan etkilenir. Bu nedenle de doku, otopsiden ziyade cerrahi ya da biyopsi ile elde edilebilir. İmmünokimyasal yöntemlerle direkt olarak tanımlanan başlıca enzim insan akciğerinde sit P4501A1'dir (328).

İnsanda sit P4502F1, 4B1 akciğerden, 1A1 ise diğer ekstrahepatik dokulardan izole edilmiş enzimler arasındadır (118).

İnsan ve tavşan veya sıçan akciğeri arasındaki en önemli fark sitokrom P450'nin spesifik içeriğindeki değişmez farklılıklardır. İnsan akciğeri çok düşük

seviyelerde sitokrom P450 içermesine rağmen, P450 ile gerçekleşen metabolik reaksiyonların çoğu hem erişkin hem de yeni doğan insan akciğerinde gözlenmektedir (328). Tütün içimiyle spesifik P4501 ile gerçekleşen metabolik aktivite indüklenebilmektedir (328).

Tavşan akciğer mikrozomlarında sit P4502B1, sit P4504B1 ve daha az seviyelerde de sit P4501A1 enzimlerinin varlığı bulunmuştur (328).

Tavşan akciğeri sitokrom P4502 ve 5 enzimlerinden yalnızca P450 2, (S)-nikotinden iminyum iyonu ve çok az miktarlarda da nornikotin ve (S)-nikotin-1'-N-oksit metabolitlerinin oluşumunda aktif bulunurken flavin içeren monoksijenazlar (S)-nikotin metabolizmasında zayıf bir rolü üstlenmektedir (331).

Böbrekte P450'nin immünohistokimyası hakkında kesin olarak, hayvanların vasküler endotel hücrelerinde polisiklik aromatik hidrokarbonlarla indüklenebilen P450 ve böbrek epitel dokuları arasında varolan ve/veya indüklenebilen P450 formlarının proksimal tübüllerde göze çarpacak kadar çok bulunduğu kaydedilmektedir (9).

Çeşitli memeli türlerinin burun mukozasında P450 enzimlerinin düzeyleri karaciğerdekinin %8-41'i oranında değişmektedir. Çok sayıda ksenobiyotiğe karşı burundaki P450 aktivitesi, karaciğerdeki aktiviteye oranla çok daha yüksek bulunmuştur. Bilinen burun karsinojenlerinden heksametil fosforamid yüksek oranlarda metabolize edilmektedir (84,334).

Tavşan burun mukozasının mikrozomal fraksiyonu birbirinden farklı iki sit P450 izoenzimi içermektedir: P450NMa ve P450NMb. Bunlardan P450NMa enzimi, nikotinin metabolizmasında hem C-oksidasyonda hem de N-oksidasyonda önemli ölçüde aktivite göstermektedir (85).

Williams ve ark. (330), tavşan burun mikrozomlarından saflaştırılan P450NMa enzimi tarafından (S)-nikotinin, (S)-nikotin- $\Delta^{1,5'}$ -iminyum iyonu, nornikotin ve (S)-nikotin-1'-N-N'oksite metabolize olduğunu bulmuşlardır.

Tavşan P450NMa enzimine insanda karşılık gelen 2A3 ve 2A4 toksik ve mutajenik metabolitleri aktive edebilmekte ve böylece de yüksek seviyelerde bulunan 2A3 enzimi insan burun karsinojenleri için risk faktörü oluşturabilmektedir (334).

Sıçanda var olan sitokrom P450 enzimlerinden biri de yemek borusunda bulunan ve bazı nitroso bileşiklerinin aktivasyonunda rol oynayan P4502A3'tür (109).

Sitokrom P450 enziminin katalizlediği biyotransformasyon reaksiyonları toksinlere ve karsinojenlere karşı ilk savunma merkezi olabilen ince barsakta da meydana gelmektedir. Watkins ve ark. (322), insan ve sıçanların ince barsak mukozasında karaciğerdeki sitokrom P450'lere yapısal, immünokimyasal ve de fonksiyonel bakımdan benzeyen sitokrom P450 enzimlerinin varlığını gözlemişlerdir.

Ekstrahepatik dokulardan beyinde metabolizma, özellikle farmakolojik ve toksikolojik sonuçları bakımından büyük önem taşır (207). Ksenobiyotiklerin çoğu, biyoaktivasyona uğradıkları takdirde beyinde potansiyel toksisite gösterebilmektedirler.

Beyin, kan-beyin engelini oluşturan endotelial hücreler arasındaki sıkı bağlantılarla kan yoluyla taşınan kimyasallardan korunmasına rağmen, lipofilik özellik gösteren bazı ksenobiyotikler beyin kılcallarının endotelial hücreleri aracılığıyla yayılarak beyne geçebilirler. Sıçan beyini, sitokrom P450 dağılımında farklılıklar göstermektedir. P4502B1, 2B2, 1A1, 1A2 ve 2E1 gibi yapısı aydınlatılmış karaciğer enzimleri ile immünolojik benzerlikler taşıyan P450 çeşitleri bulunur (260).

Deney hayvanlarının beynindeki P450 seviyeleri karşılık gelen karaciğer seviyelerinin %4-10'u kadardır. Otopsi ile elde edilen insan beyinde P450 miktarı 30-170 pmol/mg protein iken fare ve sıçan beyinde ise sırayla 40-100 pmol/mg protein olarak bulunmuştur (28).

Hem insan hem de sıçan beyinde mikrozomal ve mitokondriyal P450 sistemlerinin yanında, model substratları ve psikoaktif ilaçları N- ve S-oksidasyon

metabolitlerine dönüştürebilen flavin içeren monooksijenazların varlığı bulunmuştur (260,261).

Nikotin, beyinde P450 ve bazı monooksijenaz aktivitelerinin seçici indüksiyonuna yol açmaktadır (260).

4.4.4 Nikotin Metabolizmasında Enzim İndükleyici ve İnhibe Edici Ajanların Rolü

Sitokrom P450 ailesindeki pek çok izoenzim, genellikle bu enzimlere çoğu substrat olan ilaçlar, ksenobiyotikler ve karsinojenler tarafından indüklenmektedir (268).

Yalnızca ilaçlar değil, etanol, çeşitli yiyecekler ve sigara içilmesi de bazı P450 enzimlerinin indükleyicisi olabilmektedir (118).

Fenobarbital, insanda ve çok sayıda deney hayvanında nikotinin metabolik yollarını ve bu yollar üzerinde indükleyici ajanların etkisini araştırmada en çok kullanılan ilaçtır.

Fenobarbital verilmiş sıçanlarda major metabolit kotininin 8 kat artmasıyla birlikte nikotin eliminasyonunda önemli artışlar gözlenmiş, ancak sitokrom P448'in indükleyici ajanı 5,6-benzoflavon ile böyle bir artış kaydedilmemiştir (267).

Aynı indükleyici ajanların etkisiyle akciğerdeki nikotin oksidasyonu, fenobarbitalle karaciğerdekine oranla daha az indüklenmiştir (98).

3-Metilkolantren ya da β -naftoflavon verilen sıçanların karaciğerinde nikotin oksidasyonunda herhangi bir spesifik değişim gözlenmemiştir (218).

Fenobarbital verilmiş tavşanlarda nikotinin 5'-hidroksilasyon ve N-metilhidroksilasyon metabolitinin oluşumunun iki kat arttığı, N-oksidasyon

metabolitinin ise %30 azaldığı kaydedilirken (190), sıçanlarda ise idrarda en yüksek konsantrasyonda tayin edilen metabolitin 3'-hidroksikotinin, en düşük konsantrasyondaki metabolitin de kotinin N-oksit olduğu gözlenmiştir (97).

Kobaylarda nikotinden oluşan kotinin, kotinin-N-oksit, norkotinin, 3'-hidroksikotinin ve glukronit konjugatı ve norkotinin- $\Delta^{2,3}$ '-enaminin miktarı fenobarbital ile artmış, nornikotin ve nikotin-1'-N-oksit miktarında değişim gözlenmemiştir (280).

Erkek ve dişi sıçan hepatositleri fenobarbitalle indüklendiğinde kotinin ve nornikotin metabolitlerinde artış gözlenmiş ancak nikotin-1'-N-oksitte bu artış gözlenememiştir (165).

Kobay hepatositleri ile 3'-hidroksikotinin, kotinin ve nornikotin oluşumu fenobarbitalle indüklenirken; farelerde bu indüksiyon β -naftoflavon ile gerçekleşmiştir (165).

Araclor 1254 ile indüklenmiş sıçanlarda nikotinin major idrar metaboliti 3'-hidroksikotinin iken, kontrol grubunda cis-nikotin-1'-N-oksit major idrar metaboliti olarak tayin edilmiştir (275).

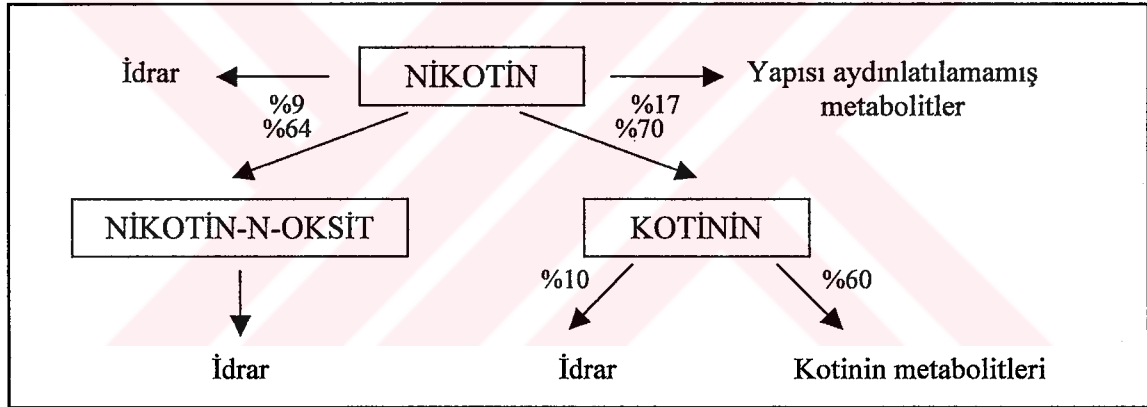
İnsanlarda P450 enzimlerinin bazısının inhibisyonu da söz konusu olabilmektedir. Örneğin; greyfurt suyu P4503A4 substratlarının oksidasyonunu inhibe edebilmektedir. Bunun sebebi olarak da mide-barsakta meyvedan oluşan bir flavonoid türü gösterilmektedir (118).

4.5 Nikotin ve Metabolitlerinin Genel Analiz Yöntemleri

4.5.1 Nikotin ve Metabolitlerinin Biyolojik Sıvılarda Tayini

Tütün ürünlerinin kullanımı ya da çevrede bulunan dumana maruz kalınması ile nikotin varlığı vücut sıvılarında nikotin ve kotinin ölçümü ile tayin edilebilmektedir. Nikotine ait en sağlıklı bilgi metabolik sonuçlardan elde edilebilir.

Son yıllarda, tütün ürünlerini kullananlarda metabolizmanın hızı, metabolitlerin yapısının aydınlatılması, metabolitlerin miktar tayini, idrarla atılım profillerinin açıklanması gibi konularda çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bütün bu araştırmalar farklı vücut sıvılarında nikotin ve metabolitlerinin miktar tayini için hassas ve güvenilir yöntemler sunmaktadır.

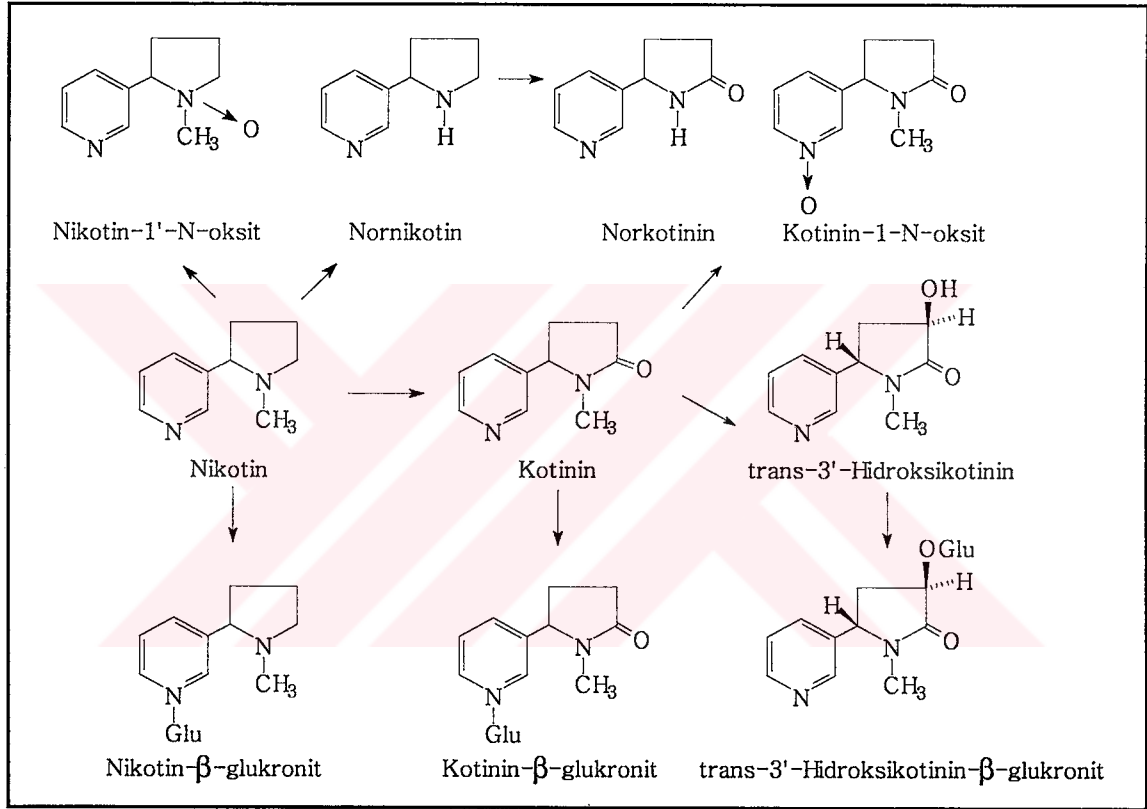


Tütün içenlerde nikotin kuantitatif metabolik yolları (141).

Nikotin ve metabolitlerinin analizinde hem immünolojik (186) hem de kromatografik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Nonpolar özellikteki nikotin metabolitlerinin kromatografik analizi için genellikle azot-fosfor (NPD) ya da mass spektrometrik (MS) detektör gibi seçici detektörle yüksek çözünürlüklü gaz kromatografisi (HRGC) kullanılmaktadır (131,141,159,227).

Polar nikotin metabolitleri, konjugatlar ve katerner metabolitler ise ya gaz kromatografisi ile analizden önce uçucu türevlerine dönüştürülür ya da UV (184) radyometrik ya da MS detektörü HPLC ile analiz edilir (188,189,341).

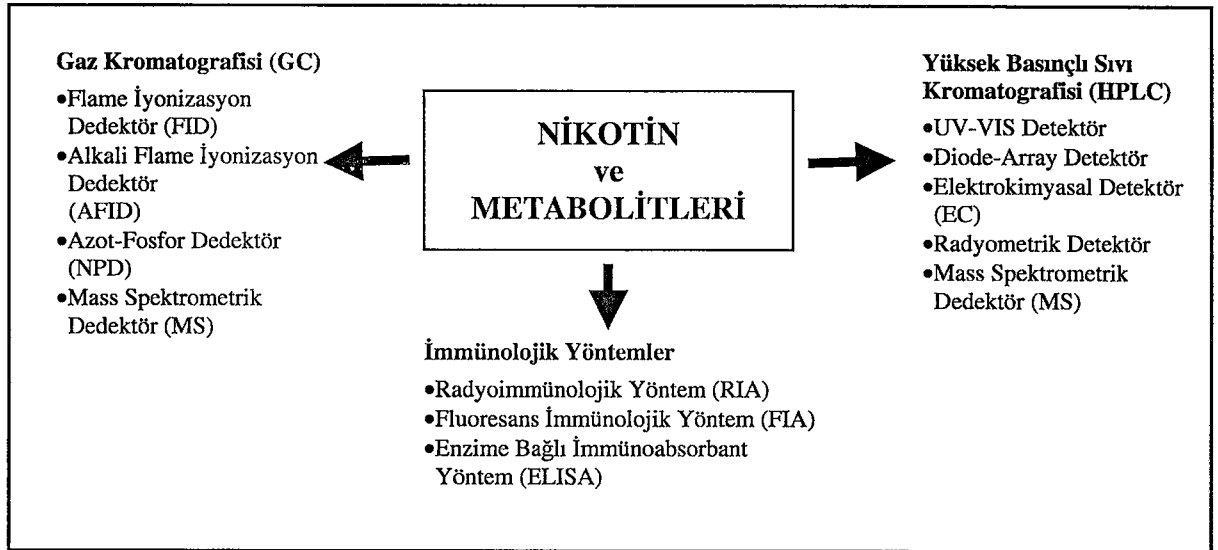
Farklı türdeki deney hayvanlarının idrarından nikotinün 12 metabolitinin ayrımı sağlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, insanda intravenöz yoldan verilen nikotinün ve tütün bağımlılarında başlıca idrar metabolitlerinin kotinin, trans-3'-hidroksikotinin, nikotin, kotinin ve 3'-hidroksikotinin glukronik asit türevleri, nikotin-1'-N-oksit, kotinin-1-N-oksit, norkotinin ve N-metilnikotinyum iyonları olduğunu göstermektedir.



Nikotinün major Faz I ve Faz II metabolitleri

FDA tarafından sigarayı bırakma tedavisinde farmakolojik bir ajan olarak kullanılması onaylanan nikotinün bugün mevcut farmasötik preparatlardaki miktar tayini de bahsedilen analitik yöntemlerle yapılmaktadır (77).

Son yıllarda nikotinün plazmadaki femtogram seviyelerindeki miktarları dahi geliştirilen yeni kombine analiz teknikleri ile başarılabilmektedir (54).



Nikotin ve metabolitlerinin vücut sıvılarında tayini için kullanılan teknikler

Özellikle *in vitro* araştırmalarda kullanılan analitik yöntemlerin çoğu biyolojik materyalden nikotin ve metabolitlerinin hızlı bir analizini yapmak amacıyla geliştirilmiştir. Önceki yıllarda nikotin ve metabolitlerinin birbirinden ayırımı ve teşhisi için kağıt kromatografisi (103,197,245) ve ince tabaka kromatografisi (14,92,123,129,270,326) ve renk reaktifleri (73,86) kullanılmıştır.

HPLC Diode-array UV detektör sistemli bir ayırma tekniğinden klinik ve toksikolojik araştırmalarda yararlanılmakta olup, nikotin ve metabolitlerinin teşhisinde de sıklıkla kullanılmaktadır (91).

Teknolojik gelişmelerle birlikte yüksek ayırma gücüne sahip bu cihazların nikotin ve metabolitlerinin teşhisi ve miktar tayininde kullanılmasının yanı sıra yukarıda bahsedilen yöntemlere göre daha eski olan ince tabaka kromatografisine son yıllarda farklı teknikler ilave edilerek aynı amaçla kullanılmaktadır. Plazmadan ekstre edilen nikotinin, nikotinik aside oksidasyonu esasına dayanan İTK-densitometre ile tayin (179) ve klasik İTK ile HPLC'nın avantajlarını beraberinde taşıyan OPTLC (yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi) (256) kullanılmakta olan yöntemlere örnektir.

4.5.1.1 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Nikotin ve kotininin biyolojik sıvılarda tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisine göre çok önemli bir üstünlüğe sahip değildir. Ancak polar ve nonpolar özellikteki bileşiklerin ayırımı, ısıyla bozulma olasılığı yüksek olan yapıların, bozunma olmaksızın tayini gibi avantajlarından dolayı gaz kromatografisine kıyasla tercih edilebilmektedir.

Nikotin ve kotinin için yaklaşık son 20 yıldan bu yana pek çok HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen ilk yöntemlerde nikotin ve kotininin ayırımı normal faz sıvı kromatografisi ile yapılmış (323) olmakla birlikte bugün, araştırmaların çoğu zıt faz kromatografik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Bkz. Tablo 4.3) (52,340).

İnkübasyon karışımlarından bileşiklerin izolasyonu genellikle sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile yapılmıştır. HPLC ile farklı polaritedeki nikotin metabolitlerinin kısa bir sürede ayırımı mümkün olabilir. Kyerematen ve ark. (167), sıçan plazma ve idrarından nikotin ve 12 metabolitin izolasyonunu sağlamışlardır. Üçlü gradient solvent sistemleri ile de nikotinin hem Faz I hem de Faz II daha çok sayıda metaboliti teşhis edilebilmektedir.

4.5.1.2 Gaz Kromatografisi (GC)

Gelişen kromatografik kolon teknolojisi, detektör hassasiyetindeki son gelişmeler, daha gelişmiş cihazların kullanımı ile birleştiğinde, nikotin ve metabolitlerinin gaz kromatografisi ile tayininde önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. Isının programlanabilirliği ve azota hassas detektör seçimi ile plazma, tükürük ve idrarda nikotin ve kotinin tayin sınırı çok daha düşük konsantrasyonlarda başarılabilmektedir (Bkz. Tablo 4.4).

Tablo 4.3 İnsan Vücut Sıvılarında Nikotin ve Metabolitlerinin Tanınmasında Kullanılan HPLC Yöntemleri

Tayin	Analit	Biyolojik Örnek	Kolon	Mobil Faz (İsokratik/Gradient)	İnternal Standart	λ , nm	Geri Kazanım (%)	Linearity	Kaynak
HPLC	•Nikotin •Kotinin	İdrar	Micropak SI-10	Etil asetat: propan 2-ol: amonyak (80:3:0.4, v/v)	Demetilmipramin	260	98-104	0.6-60 μ mol/L	323
	•Nikotin •Kotinin	İdrar	Nucleosil Si 50	Diklorometan: diisopropileter: metanol: amonyak (%25) (62:30:7.9:0.1, v/v)	Amfetamin	260	94 51	0.1-10 μ g/mL	132
	•Nikotin •Kotinin	İdrar	İnertsil ODS-3	Asetonitril: metanol: fosfat tamponu (90:30:880, v/v), 0.3mM sodyum oktan sülfonat, pH=4.8	2-Fenilimidazol	260	47-86 92-100	50-5000 ng/mL	240
	•Nikotin •Kotinin	İdrar	μ -Bondapak C ₁₈	Su: metanol (1:2, v/v), 0.02M pentansülfonik asit	–	546	91-96 84-91	0-20 μ g/mL	16
	•Nikotin •Kotinin	İdrar	Nova-Pak C ₁₈	Su: metanol (3.5:5.5, v/v) 20mM pentansülfonik asit	–	546	73-115 75-94	57-570 nmol/L	248
	•Nikotin •Kotinin	Plazma	ODS Hypersil	Sirrat tamponu: fosfat tamponu: Asetonitril (95:5, v/v) 1mmol sodyum heptansülfonat, pH=6.1	2-Fenilimidazol	256	95-98	0-700 μ g/L	121
	•Nikotin •Kotinin •Trans-3'-hidroksikotinin	İdrar	Spherisorb OS-2	Metanol: 0.005M 1-Heptan sülfonik asit (40:60, v/v) Metanol %1-60'a %2-90'a (gradient)	N-asetil normikotin	530	–	0-2000 ng/mL	210
	•Kotinin •Trans-3'-hidroksikotinin	Plazma	μ -Bondapak C ₁₈	Su: metanol: 0.1 CH ₃ COONa: Asetonitril (67:24:5.6:5.2, v/v) pH=4.3	N-etilnorkotinin	254	88-90 50-55	5-500 ng/mL	254
	•Nikotin (I) •Kotinin (II) •Trans-3'-hidroksikotinin (III) •Nikotin-1'-N-oksit (IV) •3-Pridilkarbinol (V)	İdrar	μ -Bondapak C ₁₈	Asetonitril: metanol: 0.025M potasyum dihidrojenfosfat (9:3:88, v/v) 0.01M sodyum oktansülfonat	Norefedrin	260	65 (I ve III) 70 (II) 60 (IV) 55 (V)	100-2000 ng/mL	264
	•Nikotin •Kotinin •Trans-3'-hidroksikotinin	Plazma	LC ₈ DB	Asetonitril: su (80:9, v/v), %0.5 TEA, 670 mg sodyum heptansülfonat	N-etilnorkotinin	254	95 90 50-55	10-500 ng/mL (nikotin); 5-500 ng/ml (metabolitler)	243

Tablo 4.4 İnsan Vücut Sıvılarında Nikotin ve Metabolitlerinin Tanınmasında Kullanılan GC-MS Yöntemleri

Tayin	Analit	Biyolojik Örnek	İnternal Standart	Örnek Hazırlama	Geri Kazanım (%)	Linearite	Kaynak
GC-FID	•Nikotin •Kotinin	İdrar	Klorfentermin, lidokain	sıvı-sıvı ekstr.	>95-100	0.2-10 µg/mL	20
GC-NPD	•Nikotin •Kotinin	Plazma, İdrar	N-etilnornikotin N-(2-metoksietil)- norkotinin	sıvı-sıvı ekstr.	-	0-100 ng/mL 0-1000 ng/mL	146
GC-NPD	•Nikotin •Kotinin	Plazma	Ketamin HCl	sıvı-sıvı ekstr.	70, 95	2-50 ng/mL 50-500 ng/mL	158
GC-FID	•Nikotin •Kotinin •Nikotin-1'-N-oksit •Kotinin-1-N-oksit	Plazma, İdrar	Kinolin, lidokain, fendimetrazin	kati faz kolon kromatografisi	>85,60 (idrar) 80, 30 (plazma)	0-15 µg/mL (idrar) 0-250 ng/mL (plazma)	299
GC-NPD	•Nikotin •Kotinin	Plazma	N-etilnornikotin N-etilnorkotinin	sıvı-sıvı ekstr.	>90	1-100 ng/mL 4-400 ng/mL	78
GC-NPD	•Nikotin •Kotinin	Plazma	5-metilkotinin	sıvı-sıvı ekstr.	>90	1-100 ng/mL 1-1000 ng/mL	93
GC-MS	•Nornikotin	İdrar	5-metilnornikotin	sıvı-sıvı ekstr.	92-96	2-1500 ng/mL	339
GC-MS	•Nikotin •Kotinin	Plazma	Nikotin-d ₄ Kotinin-d ₄	sıvı-sıvı ekstr.	>90	1-100 ng/mL 10-1000 ng/mL	148
GC-MS	•Nikotin •Kotinin	Plazma	N-etilnornikotin N-etilnorkotinin	sıvı-sıvı ekstr.	-	0-40 ng/mL 0-350 ng/mL	89
GC-MS	•Nornikotin •Anabasin •Anatabin	İdrar	2-(3-piridil)- hekzahidroazepin	kati faz kolon kromatografisi	>90	1-100 ng/mL	147
GC-NPD GC-MS	•Trans-3'- hidroksikotinin	İdrar	trans-3'-hidroksi orto-kotinin	sıvı-sıvı ekstr.	-	10-10,000 ng/mL	144
GC-MS	•Trans-3'- hidroksikotinin	Plazma İdrar	-	sıvı-sıvı ekstr.	75.2 (plazma) 88.8 (idrar)	20-200 ng/mL (kan) 500 ng-10 µg/mL (idrar)	228
GC-NPD	•Nikotin	Plazma	Kinolin	sıvı-sıvı ekstr.	100-101	2-125 ng/mL	237

4.5.1.3 Gaz Kromatografisi-Mass Spektrometrisi (GC-MS)

Gaz kromatografisi ile kombine edilmiş mass spektrometrisi (GC-MS) gibi yüksek ayırma gücüne sahip iki tekniğin birleşimi günümüz kimyasında çok etkili bir analitik yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (225). Tütün içenlerin plazma ve idrarında, ayrıca nikotin içeren farmasötik preparat içindeki nikotin tayininde, farmakokinetik çalışmalarında yeteri kadar hassasiyeti sağlamaktadır. Bu kombine tekniğin bir avantajı da yüksek ayırma gücüne sahip seçilmiş iyon izleme (SIM: Selective Ion Monitoring) yöntemi ile plazmada nikotinin 100 femtogramdan küçük seviyelerde tayinine imkan vermesidir. SIM kullanılan GC-MS uygulamalarından nikotinin metabolizmasının araştırıldığı çok sayıda çalışmada yararlanılmıştır (Bkz. Tablo 4.4) (147,148).

4.5.1.4 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Mass Spektrometrisi (LC-MS)

GC-MS ayırımı, kombine edilmiş analiz teknikleri içinde en yüksek hassasiyeti sağlamakla birlikte, uçucu ve ancak ısıyla bozulmayan maddelere uygulanabilir olması çoğu bileşiğin analizini engellemektedir.

Özellikle bu sınırlılık peptidler, proteinler gibi biyolojik araştırmalarda önemli bir yer tutan sınıfı da kapsayınca LC ile kombine olan mass spektrometrisine ilgi yoğunlaştırılmıştır. Özellikle kantitatif tayin için iyi bir kromatografik ayırım sağlayan LC-MS tekniği SIM ile birleştiğinde analizde hassasiyet maksimum düzeye ulaşır ve mass seçici detektörünün avantajını bir kez daha ortaya koyar, hızlı örnek analizleri de sağlamış olur (Bkz. Tablo 4.5) (332).

Tablo 4.5 İnsan Vücut Sıvılarında Nikotin ve Metabolitlerinin Tanınmasında Kullanılan LC-MS Yöntemleri

Tayın	Analit	Biyolojik Örnek	İnternal Standart	Örnek Hazırlama	Geri Kazanım (%)	Linearite	Kaynak
LC-MS	•Nikotin •Trans-3'-hidroksikotinin •Kotinin	İdrar	Döterolanmış kotinin (kotinin-metil-d ₃)	sıvı-sıvı ekstr.	–	20-8000 ng/mL	206
LC-MS	•Nikotin •Kotinin •Trans-3'-hidroksikotinin glukronitler	İdrar	Döterolanmış kotinin (kotinin-metil-d ₃)	sıvı-sıvı ekstr.	–	20-200 ng/mL	45
LC-MS	•Nikotin •Kotinin	Plazma	Döterolanmış nikotin ve kotinin (nikotin ve kotinin-metil-d ₃)	sıvı-sıvı ekstr.	106 86.2	1-50 ng/mL 10-500 ng/mL	332

4.5.2 İnsanlarda Nikotin ve Metabolitlerinin Tayini İçin Kullanılan Yeni Yöntemler

İnsan organizmasında nikotinin dağılımı, nikotinin organizmaya alınmasından sonra genellikle plazmadaki konsantrasyonlarının zamana karşı oluşturduğu grafikler esas alınarak yapılmaktadır. Ancak son yıllarda nikotin, başlı başına kendisini içeren nikotin sakızı ya da transdermal formülasyonu gibi farmasötik bir preparat olarak da karşımıza çıkmaktadır. Nikotinin tüm vücutta ve vücut bölümlerinde dağılımının açığa çıkartılması fizyolojik ve farmakolojik etkilerinin de aydınlatılması yolunda ışıık tutar.

Son zamanlarda özellikle insanlarda farklı dokularda ve organlarda nikotinin dağılımını tayin eden yöntemler geliştirilmiştir.

Bu yöntemlerden ilki bireyin organ ya da dokularındaki net değişimlerin direkt ölçümünü başarabilen bölgesel kateterizasyondur. Aseptik koşullarda çalışmayı gerektiren bu teknikte üzerinde araştırmanın yapıldığı bölgede komplikasyon riski vardır.

Positron emission tomography (PET) tekniğı, beyin bölümlerinde kan akışı ve oksijen tüketiminin anlaşılmasına katkıda bulunur. Son zamanlarda PET tekniğinden, beyindeki nöronal aktivite kontrolü ya da müskarınik reseptörlerin aydınlatılması gibi araştırmalarda yararlanılmıştır (83,119). İnsan ve maymun beyinde radyoaktif nikotinin dağılımının PET tekniğı ile elde edilen bulguları, daha önce nörofizyolojik ve farmakolojik olarak da bulunan nikotinik reseptörlerin dağılımı ile korelasyonludur (236).

Alzheimerli hastalarda beyindeki nikotinik reseptörlerin sayısında karakteristik azalma da bu teknikle aydınlatılmıştır. Tüm vücuda ait PET izleme sistemleri günümüzde bulunmaktadır dolayısıyla, nikotinin yalnızca beyinde değil ayrıca karaciğer ve böbrekte de bölgesel dağılımının kontrolüne imkan tanır ve bu organlarda nikotinin fizyolojisinin anlaşılmasında ışıık tutar.

Nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopisi nikotin ve metabolitlerinin plazma ve idrarda tayininde kullanılmaktadır (249,329). Bu çalışma tekniği, özellikle venöz özellikteki damarlar gibi bölgesel kan havuzlarında paramagnetik deoksihemoglobinin değişen miktarı ile oluşan doku oksijenasyonundaki farklılıklarının tayinini sağlar. Tütün içimi ya da nikotinin infüzyonuyla, oksijen tüketiminin artmasından dolayı, NMR tekniği vücudun farklı bölgelerinde nikotinin etkileri ve dokulara dağılımının kontrolünde yararlı bir teknik olabileceği düşünölmektedir.



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Araç ve Gereçler

5.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyak (Merck), Asetanilid (Merck), Aseton (Lab Scan), Asetonitril (Labscan), Benzaldehit (Merck), Benzen (Merck), Benzil Klorür (Merck), Benzoil Klorür (Merck), Benzoilmetilamin*, Dietileter (Merck), Diklorometan (Merck), Dimetilformamid (Fluka), Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Merck), Etil asetat (Fluka), Fenobarbital sodyum (Fluka), Glukoz-6-fosfat disodyum (British Drug Houses), Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (Boehringer Mannheim Corporation), Hidroklorik asit (Merck), 3'-Hidroksikotinin**, 5'-Hidroksikotinin**, Kalsiyum klorür (Merck), 4-Klorobenzaldehit (Fluka), 4-Klorobenzil klorür (Merck), 4-Klorobenzoil klorür (Aldrich), Kloroform (Merck), Kotinin perklorat**, Magnezyum Klorür (Merck), Metanol (Merck), Nikotinamid (Merck), β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat disodyum (Sigma), Nornikotin**, Nornikotin dikamsilat***, Norkotinin**, Orto fosforik asit (Merck), Petrol eteri (Riedel de Haën), 4-(3-piridil)-4-oksobutiramid**, 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid**, Potasyum Klorür (Merck), Silikajel 60 F 254 (Alüminyum üzerine kaplanmış hazır plaklar) (Merck), Silikajel 60-GF 254 (Kalın tabaka kromatografisi plaklarını kaplamada kullanmak için), Sodyum Bikarbonat (Merck), Sodyum Hidroksit (Merck), Sodyum Hidrür (Merck), Sodyum İyodür (Merck), Sodyum Karbonat (Merck), Sodyum klorür (Merck), Sukroz (Merck), Susuz Sodyum Sülfat (Merck), Trietilamin (Aldrich), Tris Tampon (British Drug Houses).

* Prof. Dr. Mert Ülgen'den temin edilmiştir.

** Prof. Dr. John W. Gorrod'a.

*** Dr. Peyton Jacob (III)'a sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

5.1.2 Kullanılan Elektronik Cihazlar

Banka Santrifüjü	Hettich EBA 8 S
Bidistile Su Cihazı	Millipore Milli Q-RG
Cam Tanklar	Hanovia, Berkshire
El Homojenizatörü	Fisons Scientific Apparatus
Elektrikli Homojenizatör	IKA Werke T25
Elementel Analiz Cihazı	Carlo Erba 1106
Erime Sıcaklığı Tayin Aleti	Büchi-530
Etüv	Heraeus Instruments
Evaporatör	IKA Werke RV 05-ST
Hassas Terazı	Sartorius Analitik A 200S
Infrared Spektrofotometre	Mattson 1000 FITR
İnkübatör	Memmert SV 1422
Kütle Spektrometre	Fisons Instruments VG Platform
Magnetik Karıştırıcı	İKA Labortechnik
pH Metre	Hanna HI 9321
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3K 30
Tüp Çalkalayıcı	Heidolph, Duomax 1030
Ultrasonik Banyo	Bransonic 221
Ultraviyole Lamba	Hanovia, Berkshire
Ultraviyole Spektrofotometre	Beckman DU 530
Vortex	İKA MS2 Minishaker

* IR Spektrumlarının alınmasına olanak sağlayan İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Fakültesi Anorganik Kimya Anabilim Dalı Başkanlığı'na teşekkür ederim.

5.2 Yöntemler

5.2.1 Tersiyer Aminlerin (I ve II) Sentezi

Nornikotin az miktar dimetilformamidde çözüldükten sonra bir cam balona alınarak üzerine hesaplanmış miktarda sodyum iyodür ve sodyum karbonat ilave edildi. Karışım 90°C'de geri çeviren soğutucu altında bir süre ısıtıldıktan sonra ortama benzil klorür ya da p-klorobenzil klorür porsiyonlar halinde yaklaşık 1 saat içinde ilave edilirken reaksiyonun sıcaklığı 100°C'de sabit tutuldu.

Tersiyer aminlerin oluşumu sırasında İTK ile elde edilen sonuçlara göre reaksiyon ortamında tersiyer aminlerin yanısıra bazı yan ürünler de bulunmaktaydı. Dimetilformamid içindeki reaksiyon ortamına bidistile su eklenerek soğutuldu. Tersiyer amin I su ilavesiyle çöken katının süzülüp, suyla yıkanması, II ise sulu fazın önce petrol eteri, ardından da dietileterle ekstre edilmesi suretiyle elde edildi.

5.2.2 Amidlerin (I a ve II a) Sentezi

Nornikotin benzende çözülerek reaksiyonun kabı geri çeviren soğutucu altında sıcaklığı 90-100°C'ye ayarlanmış elektrikli mantoda ısıtılmaya başlandı ve hesaplanmış miktarda sodyum hidrür ilave edilerek ısıtılmaya devam edildi. Kısa bir süre sonra reaksiyon ortamında oluşan sodyum tuzunun üzerine benzende çözülmüş halde bulunan benzoil klorür ya da p-klorobenzoil klorür çözeltisi damla damla eklendi. Reaksiyon ortamının sıcaklığı 120-130°C'de sabit tutularak ısıtmaya devam edildi ve İTK analizleri ile amid oluşumu optimum seviyede gözlendiğinde reaksiyonlar durduruldu. Soğutulunca ortama çöken katı maddeler süzülerek alındı, soğuk benzenle yıkandı. İTK sonuçları ile I a'nın saf olduğu gözlendi. II a için ise petrol eteri-diklorometan karışımından billurlandırma yapıldı.

5.2.3 Laktamların (I b ve II b) Sentezi

Laktamların sentezi, amidlerinkine benzer yöntemle yapıldı. Başlangıç maddesi olarak norkotininin kullanıldığı bu reaksiyonlarda organik çözücü benzenli ortamda eşit mol sodyum hidrür ilave edilip geri çeviren soğutucu altında 90-100°C'ye ısıtmakla norkotinin sodyum tuzu elde edildi. Benzende çözülmüş benzil klorür ya da p-kloro benzil klorürün küçük porsiyonlar halinde karışıma eklenmesi ile laktamlar oluşturuldu. Reaksiyonların ilerleyişi İTK ile izlendi ve laktama ait lekenin maksimuma ulaştığı yani başlangıç maddelerinin azaldığı zaman reaksiyonlar durdurularak benzenli çözeltiler süzüldü ve çözücü alçak basınç altında uçuruldu. I b'ye ait ham ürün organik çözücülerle yıkanarak II b'ye ait ham ürün ise preparatif KTK ile 5.2.5'te anlatılan yöntem izlenerek saflaştırıldı.

5.2.4 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Araştırmada üzeri 0.25 mm kalınlığında silika jel ile önceden kaplanmış, 20x20 cm boyutlarında hazır aluminyum plaklar (Silikajel 60 F254, Merck) kullanıldı. Metabolik deneylerde kullanılan substratlar ve olası metabolitlerinden oluşan analitler, uygun bir hacimde (1mg/mL gibi) metanol ya da metanolde çözünürlüğün olmadığı durumlarda başka bir çözücüde (aseton, eter vb...) çözülerek kılcal borular yardımıyla, plakların alt kenarından 2 cm mesafedeki başlangıç çizgisine birer cm aralık bırakılarak adsorban madde üzerine tatbik edilerek çözücülerinin uçması için beklendi.

Kromatografi için kullanılan cam tanklara 100 mL mobil faz karışımı ilave edilerek çözücü buharıyla doymasını sağlamak amacıyla 20x20 cm boyutlarında kesilmiş bir süzgeç kağıdı yerleştirildi ve kapakları sıkıca kapatılarak tankların tamamen doyması sağlandıktan sonra örneklerin tatbik edildiği plaklar düşeyle hafif bir açı yapacak şekilde yerleştirildi. Böylelikle mobil fazın başlangıç noktasından fronta kadar ulaşması sağlandı. İTK çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri:

A₁= Kloroform: Metanol: Amonyak (9:3:1, h/h)

A₂= Kloroform: Metanol (9:3, h/h)

Developmandan sonra tanktan çıkartılan plaklar kurumaya bırakıldı. Kromatografi plağına tatbik edilen örneklerin plak üzerindeki yerleri 254 nm'lik ultraviyole ışık altında belirlendi. Elde edilen lekelerin uygulama noktasına olan uzaklığı ve çözücü frontunun uygulama noktasına olan uzaklığı ölçülerek her bileşik için R_f100 değeri hesaplandı.

Daha sonra çeşitli püskürtme belirteçleri uygulanarak bileşiklerin verdikleri renkler kaydedildi (Bkz. Tablo 5.1).

Tablo 5.1 İTK Analizlerinde Kullanılan Belirteçler

D ₁	Dragendorff Belirteci (A) 2g. Bizmut subnitrat, 25 mL asetik asit ve 100 mL su karışımında çözülür. (B) 40g. Potasyum iyodür 100 mL suda çözülür. Dragendorff belirteci kullanılacağı zaman, 1 mL A çözeltisi, 1 mL B çözeltisi ve 2mL asetik asit alınarak 10 mL'ye distile suyla tamamlanır.
D ₂	Tollens (Amonyaklı Gümüş Nitrat) Belirteci Gümüş nitrat çözeltisi (%10) üzerine çökelti oluşumu tamamlanıncaya kadar damla damla 2M sodyum hidroksit; bu karışım üzerine berrak bir çözelti elde edilinceye kadar amonyak ilave edilir.
D ₃	Dimetilaminosinnamaldehit Belirteci 4- Dimetilaminosinnamaldehitin 1M, 50 mL hidroklorik asit ve 50 mL etanoldeki %0.2'lik çözeltisi.
D ₄	Erlich Belirteci 4- Dimetilaminobenzaldehitin derişik hidroklorik asit içindeki %10'luk çözeltisidir. Kullanılmadan hemen önce asetonla 1:4 oranda seyreltilir.

5.2.5 Preparatif Kalın Tabaka Kromatografisi (KTK)

Sentezlenen bileşiklerden Iİb'ye sentez başlangıç maddelerinden ya da reaksiyon yan ürünlerinden kurtarmak için preparatif kalın tabaka kromatografisi uygulandı.

- Plakların Hazırlanması: Preparatif kalın tabaka kromatografisi için kullanılacak olan cam plaklar (20x20 cm) önce etanol, sonra da asetonla silinip kurutuldu. Beş adet preparatif plak hazırlamak için 60 g silika jel (Silica gel 60 GF254,

Merck), 120 mL distile su ile kapaklı bir erlende kuvvetlice çalkalanarak bulamaç haline getirildi. Plak çekici cihazın haznesine yerleştirilen plaklar, tabaka kalınlığı 0.5 mm'ye ayarlandıktan sonra hazırlanan bulamaçla kaplandı. Kuruması için oda sıcaklığında bir süre bekletilen plaklar, 100°C'lik etüvde 1 saat tutularak aktive edildi.

- Örneklerin Plaklara Tatbiki ve Saf Maddelerin İzolasyonu: İzolasyonu yapılacak olan karışım halindeki örnek çözünbileceği miktarda organik çözücülerde çözülerek preparatif plakların alt kenarından 2 cm yükseklikte düz bir çizgi üzerine dar bir bant halinde tatbik edilerek kurutuldu. Plaklar, bölüm 5.2.4'te anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan tanklara yerleştirildi, mobil fazın başlangıç noktasından fronta ilerlemesi sağlanarak, developmandan sonra tanktan çıkartılan plaklar kurumaya bırakıldı.

Plaklar üzerinde ayrılan bantlar, 254 nm'lik ultraviyole lamba altında görünür hale getirildi ve izolasyonu yapılacak leke plağın çok küçük bir kısmına püskürtülen belirteç yardımıyla kesinleştirildi. Söz konusu maddeye ait bant kazınarak adsorban maddenin uygun bir organik çözücüyle (diklorometan) elüsyonu yapıldı ve çözücünün uçurulmasıyla saf madde kazanıldı.

5.2.6 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Araştırmamız üç ayrı HPLC cihazıyla gerçekleştirildi. Bunlardan birincisi, nornikotin ve norkotinin türevi sentez maddelerinin saflığının kontrolü için, diğerleri de substratların olası metabolitlerinden ayrımını sağlamak ve oluşan metabolitlerin miktar tayini çalışmalarında kullanıldı. Bu cihazların modüllerine ilişkin bilgiler aşağıda gruplandırılarak verilmiştir.

(I) Bu zıt faz izokratik HPLC sisteminin kurulmasında bir Gilson çözücü dağıtım ünitesi (pompa), 20 µL'lik bir loop bağlanmış Rheodyne model 7125 enjektör, bir Spherisorb 5 µm ODS (250x4,6 mm id) marka ön kolon, Waters µ-Bondapak C₁₈ kolon, değişken dalga boylu bir Milton Roy spectro Monitor III (model 1204 A) UV detektör ve bir Shimadzu C-R8A integratör kullanıldı.

(II) Gradient teknik ile çalışmaya olanak sağlayan bu sistem bir Waters 600 controller ünitesine bağlı Waters 600 pompa, 20,50 ya da 100 μ L'lik bir loop bağlanmış Rheodyne (model- 7125İ) enjektör, Waters marka Novapak ön kolon, Waters marka gaz giderici, değişken dalga boylu bir Waters (model-481) detektör ve ProGC Data Station kromatografik veri toplayıcı sistemden ibaretti.

(III) Bu izokratik HPLC sisteminin modüllerini de Waters (model-510) pompa ve Rheodyne marka 50 μ L'lik loop bağlanmış enjektör sistemi, Waters marka Novapak ön kolon, Waters detektör (model-481) ve bir Software Unicam 4480 kromatografik veri toplayıcı sistem oluştuyordu.

Çalışmamız sırasında farklı özellikte birden fazla zıt faz kolon kullanıldı. Kalitatif ve kantitatif analizlerde kullanılan kolonlar özellikleri ile birlikte aşağıda belirtilmiştir (Bkz. Tablo 5.2). Bu kolonların hangi cihazla birlikte kullanıldığı Tablo 5.3'te ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Tablo 5.2 HPLC Analizlerinde Kullanılan Kolonlar ve Özellikleri

Kolon Markası	Partikül Büyüklüğü
μ - Bondapak C ₁₈	3.9 x 300 mm i.d.
Novapak C ₁₈	3.9 x 150 mm i.d.
Spherisorb S5 ODS1	2 x 250 mm i.d.
Kromasil 100-5C ₁₈	25 cm x 4.6 mm i.d.

Substrat ve metabolitleri en az 5 mg tam olarak tartıldıktan sonra mg/mL konsantrasyonu sağlayacak şekilde metanolde çözüldü. Hazırlanan seyreltik standart çözeltilerden gerektiğinde tekrar seyreltilerek 5-50 μ L hacimler Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografa enjekte edildi. Böylelikle substrat ve metabolitlerin kolonda ayrımları sağlanarak tutulma zamanları tespit edildi.

Bazı substratların inkübasyonundan sonra elde edilen metabolik ekstratların HPLC analizi için, tayin edilen metabolitlerin yapılarının aydınlatılmasında yardımcı

olması amacıyla sisteme bir Agilent marka diode-array UV detektör bağlanmıştır. Bu cihazla standartların ve metabolitlerin UV spektrumları HPLC analizleri ile aynı anda alınmış ve karşılaştırılmaları mümkün olabilmektedir.

Mobil fazlar hazırlandıktan sonra süzülmesi için Sartorius süzme kiti (Sartorius Instruments Ltd., Belmont, Surrey); süzülen çözelti sistemlerinin gazının giderilmesi için ise Branson 221 marka ultrasonik banyo kullanıldı.

Araştırmada kullanılan mobil faz sistemleri ve çalışma koşulları aşağıdaki tabloda (Bkz. Tablo 5.3) belirtilmiştir.

Tablo 5.3 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisinde Kullanılan Mobil Fazlar

Program	HPLC Cihazı	Mobil Faz Bileşimi	Oran (h/h)	Son pH	Akış Hızı	Detektör Dalga boyu λ (nm)	Kolon
S ₁	II	ACN: FT:TEA	100:899:1	7	0.7	260	μ -Bondapak C ₁₈
S ₂	II	ACN:FT:TEA	80:919:1	7.2	0.7	260	Novapak C ₁₈ 3.9x150mm
S ₃	III	ACN:FT:TEA	120:879:1	6.72	0.7	260	Spherisorb C ₁₈ S5 ODS1

ACN: Asetonitril; FT: Fosfat tamponu (0.02 M, pH=7.4); TEA: Trietilamin Hassasiyet: 10 mV; Kağıt Hızı: 0.25 cm/dak.

Olası metabolitlerinin sayısı diğer setlere göre daha çok olan kotinin setinin ayırımı için çok sayıda sistem denendi. Aşağıdaki tablolarda bu sistemlerin bazı görülmektedir (Bkz. Tablo 5.4 ve Tablo 5.5).

Tablo 5.4 Kotinin ve Olası Metabolitlerin Ayırımı İçin Denenen Bazı İzokratik HPLC Sistemleri

Program	Mobil Faz Bileşimi	Oran (h/h)	Son pH	Akış Hızı	Detektör dalga boyu λ (nm)	Kolon
B ₁	ACN: FT: TEA	100:899:1	7	0.7	260	Novapak C ₁₈
B ₂	ACN: FT: TEA	100:899:1	7	1	260	Kromasil C ₁₈
B ₃	ACN: FT: TEA	90:909:1	7	1	260	Kromasil C ₁₈

Tablo 5.5 Kotinin ve Olası Metabolitlerin Ayırımı İçin Denenen Gradient HPLC Sistemleri

Program	Mobil Faz Bileşimi	Curve	Son pH	Akış Hızı	Detektör dalga boyu λ (nm)	Kolon
B ₄	t= 0.dak; B'den %92, A'dan %8 t=20.dak; B'den %90, A'dan %10 t=25.dak; B'den %80, A'dan %20	3	7	1 1 1	260	Kromasil C ₁₈
B ₅	t= 0.dak; B'den %92, A'dan %8 t= 25.dak; B'den %80, A'dan 20	3	7	1 1	260	Kromasil C ₁₈

A= Asetonitril; B= Fosfat tamponu (0.02M, pH:7.4), %0.1 trietilamin.

Tezimizin konuları arasında yer alan, nornikotin türevi tersiyer amin yapısındaki sentez bileşiklerinden N-1'-benzilnornikotin ve N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin ile amid yapısındaki N-1'-benzoilnornikotin, N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotinın sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizması çalışılmadan önce bu substratlar ve ilgili metabolitlerinin HPLC ayırımları için mobil faz sistemleri denendi. Bu setlere ait HPLC analizi ile ilgili bilgiler aşağıdaki tabloda görülmektedir (Bkz. Tablo 5.6).

Tablo 5.6. Sentezlenen Substratlar ve Olası Metabolitlerinin Ayırımı İçin Kullanılan HPLC Sistemleri

Program	HPLC Cihazı	Mobil Faz Bileşimi	Curve	Son pH	Akış Hızı	Detektör Dalga Boyu λ (nm)	Kolon
S ₄	II	t=0.dak; B'den %78, A'dan %22 t=15.dak; B'den %78, A'dan %22 t=20.dak; B'den %40, A'dan %60	6	5	0.7	210	Novapak C ₁₈
S ₅	II	t=0.dak; B'den %78, A'dan %22 t=15.dak; B'den %78, A'dan %22 t=20.dak; B'den %70, A'dan %30 t=25.dak; B'den %40, A'dan %60	6	3	0.7	210	Novapak C ₁₈
Program	HPLC Cihazı	Mobil Faz Bileşimi	Oran	Son pH	Akış Hızı	Detektör Dalga Boyu λ (nm)	Kolon
S ₆	II	ACN: FT: TEA	250:749:1	7.15	0.6	210	Novapak C ₁₈
S ₇	II	ACN: FT: TEA	290:709:1	7.15	0.7	210	Novapak C ₁₈

A, ACN= Asetonitril; B= Fosfat tamponu (0.02 M, pH=7.4), %0.1 Trietilamin; FT= Fosfat tamponu; TEA= Trietilamin

5.2.7 Karaciğer Mikrozomal Preparatının Hazırlanması

5.2.7.1 Mikrozomların Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

Mikrozomların hazırlanmasında;

- İzotonik sodyum klorür (% 0.9),
- Sukroz çözeltisi (0.25 M),
- Kalsiyum klorür çözeltisi (80 mM),
- Potasyum klorür çözeltisi (0.15 M),
- Fosfat tamponu (0.2 M; pH: 7.4) kullanılmıştır.

Fosfat tamponunun hazırlanması için ise;

- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat 28.6 g
- Potasyum dihidrojen otoposfat 5.4 g
- Bidistile su 1 lt

kullanılmış olup, son hacme tamamlamadan önce çözeltinin pH'ı ortofosforik asitle 7.4'e ayarlanmıştır.

5.2.7.2 Deney Hayvanları

Çalışmada Wistar albino yetişkin dişi ve erkek sıçanlar (200-250 g) kullanıldı.*

Bu çalışmanın protokolü ve deney hayvanları ile ilgili uygulamalar için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

5.2.7.3 Mikrozomal Süspansiyonun Hazırlanması

Karaciğer mikrozomal preparatının hazırlanması için kalsiyum klorür çöktürme yönteminden yararlanıldı. Araştırmada kullanılan deney hayvanları servikal dislokasyon

* Deney hayvanlarının teminine olanak sağlayan M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Feyza Kartal'a teşekkür ederim.

ile öldürülmeden önce bir gece aç bırakıldı ve yalnızca su diyeti uygulandı. Enzim denatürasyonunu en aza indirmek için bütün işlemler 0-4°C'de yani buz banyosunda yapıldı.

Servikal dislokasyon ile öldürülen sıçanların karaciğerleri çıkartılarak;

- İzotonik sodyum klorür (% 0.9 a/h) çözeltisi içine aktarıldı,
- Süzgeç kağıtları arasında kurutulup tartılan karaciğerler çok hızlı bir şekilde ince parçalara kesilerek, 0.25 M sukroz çözeltisi (1 g karaciğer için 3 mL) bulunan homojenizatör kabına aktarıldı,
- Elektrikli homojenizatörle düşük hızda 3 kez 10'ar saniye yapılan homojenizasyondan sonra el homojenizatörü ile homojenizasyon gerçekleştirildi.
- Homojenat, 4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 10.500 rpm'de, 30 dakika santrifüjlendi.
- Nükleus, mitokondri, hücre yıkıntıları ve bozulmamış hücre partiküllerini içeren pellet atıldı,
- Mikrozomlar ve hücrenin çözünebilen fraksiyonlarını içeren postmitokondriyel süpernatant mezüre alınarak hacmi ölçüldü,
- Süpernatant üzerine 80 mM kalsiyum klorür çözeltisi (9 mL süpernatant için 1mL) eklendi,
- El homojenizatörü ile iyice homojenize edildi,
- Karışım, endoplazmik retikulum fragmentinin çökmesi için 5 dakika bekletildi,
- Soğutmalı santrifüjde 4°C'de 15.500 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi,
- Süpernatant kısmı dikkatle ayrılarak atıldı,
- Pellet kısmına 0.15 M potasyum klorür (ilk süpernatant ve kalsiyum klorür çözeltilerinin hacminin toplamı kadar hacimde) eklendi,
- El homojenizatörü ile süspansiyonun karıştırılmasından sonra,
- Homojenat 15.500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek kalsiyum klorür ve proteinlerin fazlası uzaklaştırıldı,
- Supernatant ayrılarak atıldı,
- Yıkanmış mikrozomları içeren pellete, buzla soğutulmuş, 0.2 M, pH:7.4 fosfat tamponu eklendi,

- El homojenizatörü ile karıştırılarak homojenize edildi,
- Süspansiyonun 1mL'sinde 0.5 g orijinal karaciğer ihtiva eden mikrozomal preparat sonradan kullanılmak üzere -80°C'deki derin dondurucuda saklandı.

5.2.8 Beyin Homojenatının Hazırlanması

Beyin homojenatları Jacob ve ark. (145), tarafından belirtilen yöntemle göre hazırlandı. Karaciğer mikrozomal preparatının hazırlanmasından önceki aşamada olduğu gibi sıçanlar bir gece aç bırakılarak yalnızca su verildi. Servikal dislokasyon ile öldürülen sıçanların beyinleri çıkartılarak;

- İzotonik potasyum klorür (% 0.9 a/h) çözeltisi içine aktarıldı,
- Süzgeç kağıtları arasında hızlıca kurutulup tartıldıktan sonra ince parçalar halinde kesildi,
- Küçük parçalar halindeki beyin dokusuna pH: 7.4 olan Tris-potasyum klorür çözeltisi eklendi,
- Teflon bir havan eli ve bir cam tüpten ibaret olan homojenizatör içinde dikkatle karıştırıldı,
- Süspansiyonun 1 mL'sinde 0.5 g beyin dokusu ihtiva eden homojenat enzim kaynağı olarak yararlanılacağı deneyde derhal kullanıldı.

Tris-potasyum klorür tamponunun hazırlanması için;

- | | |
|-------------------|---------|
| • Potasyum klorür | 11.5 g |
| • Tris | 30.34 g |
| • Bidistile su | 1 lt |

kullanılmış olup son hacme tamamlanmadan önce çözeltinin pH'ı hidroklorik asitle 7.4'e ayarlanmıştır.

5.2.9 Enzim Kaynaklarının Fenobarbitalle İndüksiyonu

Deney hayvanı olarak seçilen sıçanların bir grubuna 5 gün boyunca izotonik sodyum klorür çözeltisinde çözölmüş olarak 60 mg/kg fenobarbital sodyum diğer

grubuna ise yalnızca tuz çözeltisi intraperitoneal yoldan günde bir kez enjekte edildi (220). Fenobarbital enjeksiyonunun bitiminden 24 saat sonra hayvanlar servikal dislokasyonla öldürülüp, karaciğer ve beyinleri izole edilerek 5.2.7 ve 5.2.8’de belirtilen yöntemlerle mikrozomal preparat ve beyin homojenatları hazırlandı.

5.2.10 İnkübasyon

5.2.10.1 Standart Kofaktör Karışımları

Oksidasyon, aromatik hidroksilasyon ve redüksiyon gibi metabolik reaksiyonlar için, standart bir inkübasyon erleni başına ihtiyaç duyulan kofaktörler ve miktarları aşağıdaki tabloda verilmiştir. Bir inkübasyon erleni için 2 mL fosfat tamponunda çözülerek inkübasyondan hemen önce hazırlanan kofaktör karışımı içinde bekletildiği takdirde hızlıca deaktive olabilen glukoz 6-fosfat dehidrojenaz enzimi ön inkübasyondan hemen önce bu karışıma ilave edildi. Metabolik reaksiyonlar için gerekli olan NADPH, bu standart karışım sayesinde oluşturulmaktadır (Bkz. Tablo 5.7).

Tablo 5.7 Oksidatif Mikrozomal Metabolizma Reaksiyonlarında Kullanılan Standart Kofaktör Karışımın İçeriği ve Miktarları

Kofaktör	Miktar
NADP Disodyum	1.57 mg (2 μ mol)
G-6-P Disodyum	3.04 mg (10 μ mol)
G-6-P Dehidrojenaz	1.40 μ L (1 ünite)
MgCl ₂ (%50, a/a)	8.00 μ L (20 μ mol)

5.2.10.2 Standart İnkübasyon Prosedürü

İnkübasyonlar, 25 mL’lik üstü açık erlenlerde, sıcaklığı 37°C’ye ayarlanmış inkübatörde (çalkalama hareketi yapabilen su banyosu) biyolojik sistemle ilgili substratın reaksiyonu esasına dayanır. Erlen başına 2’şer mL kofaktör çözeltisi NADPH üretimini sağlamak amacıyla, 37°C’de 5 dakika ön inkübasyona tabi tutuldu. Sonra bir inkübasyon erleni başına 50 μ L metanolde çözülmüş olan 2 μ mol substrat ve hemen

ardından 1'er mL mikrozomal preparat ya da beyin homojenatı ilave edilerek 37°C'de 30 dakika inkübasyon gerçekleştirildi.

Biyolojik deneylerde, bu şekilde test gruplarının olduğu inkübasyon erlenlerinin yanında farklı şekillerde düzenlenmiş ve aynı ekstraksiyon prosedürlerine tabi tutulan kontrol erlenleri de hazırlandı (Bkz. Tablo 5.8). Bu erlenlerin içerikleri en genel şekliyle şöylece özetlenebilir:

1. Denatüre (inaktif hale geçirilmiş) mikrozomlar ya da beyin homojenatından oluşan kontrol: Normal mikrozom ya da beyin homojenatının yerine, 100°C'de, 15 dakika ısıtılarak denatüre edilen doku preparatının ilave edilmesi ile hazırlandı.

2. Mikrozomsuz (ya da beyin homojenatsız) kontrol: Normal mikrozom ya da beyin homojenatı yerine aynı hacim yani 1mL fosfat tamponu (0.2M; pH:7.4) ilave edilmesiyle hazırlandı.

3. Kofaktörsüz kontrol: Normal kofaktör çözeltisi yerine aynı hacim yani 2mL fosfat tamponu (0.2M; pH:7.4) ilave edilmesi ile hazırlandı.

4. Mikrozomsuz (ya da beyin homojenatsız) kofaktörsüz kontrol: Normal mikrozom ya da beyin homojenatı ve kofaktör çözeltisi yerine bunlara eşit hacimde fosfat tamponu (0.2 M; pH:7.4) ilave edilmesiyle hazırlandı.

5. Substratsız kontrol: Normal substrat çözeltisi yerine aynı hacim yani 50 µL fosfat tamponu (0.2M; pH:7.4) ilave edilmesi ile hazırlandı.

Tablo 5.8 *İn vitro* metabolizma deneylerinde test ve kontrol inkübasyon erlenlerinin genel içeriklerini gösteren protokol

Erlenler	Substrat	Mikrozom ya da Beyin Homojenatı	Kofaktörler
Test	+	+	+
Kontrol 1	+	Denatüre	+
Kontrol 2	+	Tampon	+
Kontrol 3	+	+	Tampon
Kontrol 4	+	Tampon	Tampon
Kontrol 5	-	+	+

5.2.11 Ekstraksiyon

İnkübasyondan sonra enzimatik reaksiyonlar erlenlerin buz üzerine yerleştirilmesi ve içeriklerinin 10 mL'lik kapaklı cam tüplere aktarılması ile sonlandırıldı. Her bir tüpe 0.8 g NaCl, 5 mL diklorometan ve ilgili internal standart (benzoilmetilamin ya da asetanilid) ilave edilerek substrat ve metabolitlerin ekstraksiyon çözücüsüyle iyi bir şekilde karışımının sağlanması için 2 dakika vortex (tüp karıştırıcı) cihazında, sonra da 60°'lik bir açıyla salınım hareketi yapan çalkalayıcı cihazda 15 dakika tutulmasıyla ekstraksiyonun tamamlanması sağlandı. Ekstraksiyonu takiben tüpler 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Organik faz pastör pipetleri yardımıyla kantitatif olarak temiz ve kuru tüplere aktarıldı. İnkübasyon ortamının bulunduğu sulu fazı içeren tüplere tekrar 5'er mL diklorometan ilave edilerek ekstraksiyon işlemi aynen tekrarlandı. Organik fazlar birleştirilerek azot gazı altında, 40°C'lik su banyosunda kuruluğa kadar uçuruldu ve **metabolik ekstraleler** kazanıldı.

5.2.12 İnkübasyon Sonrası Elde Edilen Metabolik Ekstrelerin Kromatografik Sistemlere Uygulanması

Biyolojik sistemlerin ekstraksiyonundan sonra kazanılan metabolik ekstralelerin HPLC analizleri için 200 µL metanol ilave edilerek, tüp içeriklerinin 2 dakika vortex cihazında tutulmasıyla tam çözünmesi sağlandı. Bunun ardından tüpler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve HPLC sistemine uygulandı.

5.2.13 Metabolik Ekstrelerde Substrat ve Metabolitlerinin Miktar Tayini

5.2.13.1 Standartların Hazırlanması

Referans standartların stok çözeltileri (1 µg/µL, 0.5 µg/µL) metanolde hazırlanarak, 0°C’de saklandı. Analizden önce seyreltmeler günlük yapılmak suretiyle taze hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. Stok çözeltilerin soğukta (0-4°C’de) saklandıkları takdirde en az 3 ay kararlı oldukları gözlemlendi.

Kalibrasyon standartları, stok standartların bilinen miktarlarının inaktif inkübasyon ortamına ilave edilerek ekstre edilmesi suretiyle elde edildi. Bu standartlar kalibrasyon eğrilerinin çizdirilmesinde kullanıldı.

5.2.13.2 Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan bileşiklerin optimum ekstraksiyon ve analitik yöntemlerinin tayininden sonra metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan metabolitlerin miktarını tayin için yöntem geliştirildi. Oluşan metabolitlerin miktarlarını tayin etmek için her metabolitin kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi gereklidir.

Buradaki en önemli husus, bu çalışmayı yaparken kullanılan koşulların metabolik çalışmada kullanılan koşullarla mümkün olduğu ölçüde aynı olmasıdır. Bundan dolayı, her bir bileşiğin kalibrasyon eğrisini çizebilmek için inaktif hale geçirilmiş mikrozomal süspansiyon ve inaktif kofaktör çözeltisi yani tampon çözelti (0.2 M, pH:7.4) kullanılmıştır.

Bileşiklerin stok çözeltilerinden bilinen miktarları alınarak farklı konsantrasyon aralıkları elde edildi. Nornikotin seti için her mL’inde 16.5-264 nmol nornikotin, 15-135 nmol norkotinin, 8-64 nmol nikotinamid ve 370 nmol oranlarında benzoilmetilamin içeren; kotinin seti için 90-720 nmol kotinin, 7.5-180 nmol norkotinin, 6.5-156 nmol 5’-hidroksikotinin, 52-520 nmol 3’-hidroksikotinin, 20-240 nmol nikotinamid ve 74 nmol

benzoilmetilamin ilgili standartlara ait stoklardan alınarak içinde denatüre edilmek suretiyle inaktif hale geçirilmiş 1mL mikrozm ve 2mL tampon çözelti bulunan ekstraksiyon tüplerine eklendi. İkili özdeş gruplar halinde çalışılan katım reaksiyonlarının daha sonra 0.8 g sodyum klorür varlığında diklorometanla 5.2.11'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonları yapıldı. Organik fazlar kuruluğa kadar 40-45°C'de ve azot gazı altında uçuruldu.

Organik ekstratlar metanolle 200 µL hacme seyreltildi ve HPLC ile 5.2.12'de belirtildiği şekilde analizleri yapıldı. Analizde enjeksiyon hacimleri, ilgili sete ait metabolik ekstratların hacimleri ile eşit tutuldu.

5.2.13.3 Doğruluk Testleri

Miktar tayini deneylerinde metodun doğruluğunun kontrolü için her bir bileşiğin kalibrasyon grafiğinin çizdirildiği noktaların dışında düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç ayrı konsantrasyonda inaktif dokuya katım yapılarak elde edilen organik ekstratların uçurulması ve HPLC cihazına farklı günlerde uygulanması suretiyle kalibrasyon doğrularındaki sapmalar incelendi. Örneklerin kromatografik analizleri sonucu elde edilen konsantrasyonların gerçek konsantrasyonlarına oranlarının 100 ile çarpılması ile % geri kazanım değerleri tayin edildi.

5.2.13.4 Hesaplama Yöntemi

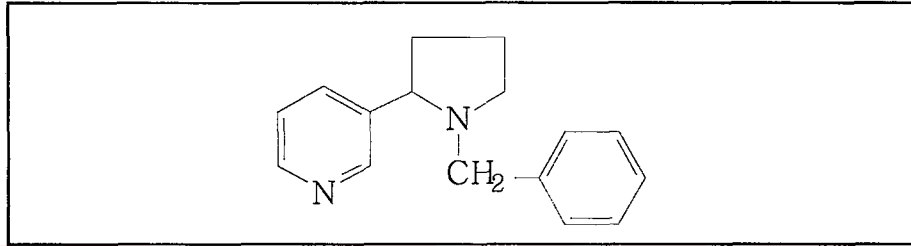
Her bir bileşiğin kalibrasyon eğrisi pik alanlarının internal standartın pik alanına oranı alınarak çizdirildi. Bilinmeyen konsantrasyonu, standartların konsantrasyona karşı pik alanı oranı grafiklerinden bulunan regresyon eşitliği kullanılarak tayin edildi.

6. BULGULAR

6.1 Sentezlenen Bileşiklerin Karakterizasyonu

6.1.1 Tersiyer Aminler

6.1.1.1 N-1'-Benzilnornikotin (I)

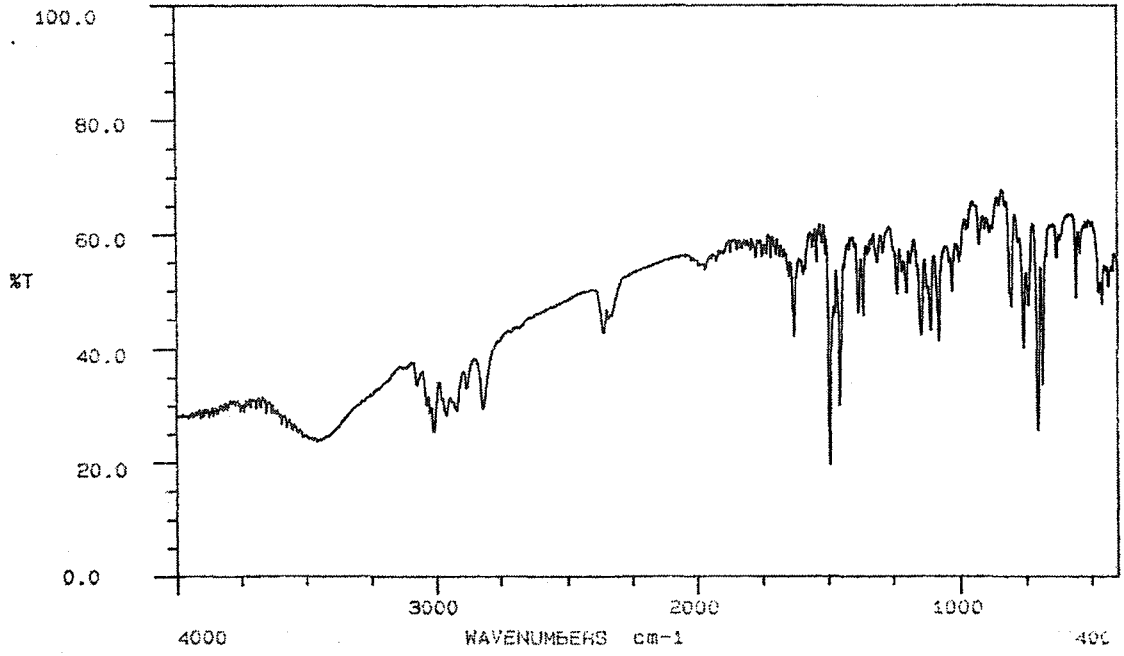


Nornikotin (1.35 mmol, 0.2 g), sodyum iyodür (1.35 mmol, 0.2 g), susuz sodyum karbonat (1.35 mmol, 0.14 g) ve benzil klorürden (1.35 mmol, 0.17 g) hareketle 3 mL dimetilformamid içinde gerçekleştirilen reaksiyon 5.2.1'de belirtilen yöntemle göre tamamlandı. Ham ürün bol suyla yıkanarak alkol-su karışımından billurlandırıldı. Açık kahverengi toz; verim: %40,e.n.: 142-143 °C (72,106).

Spektral Bulgular:

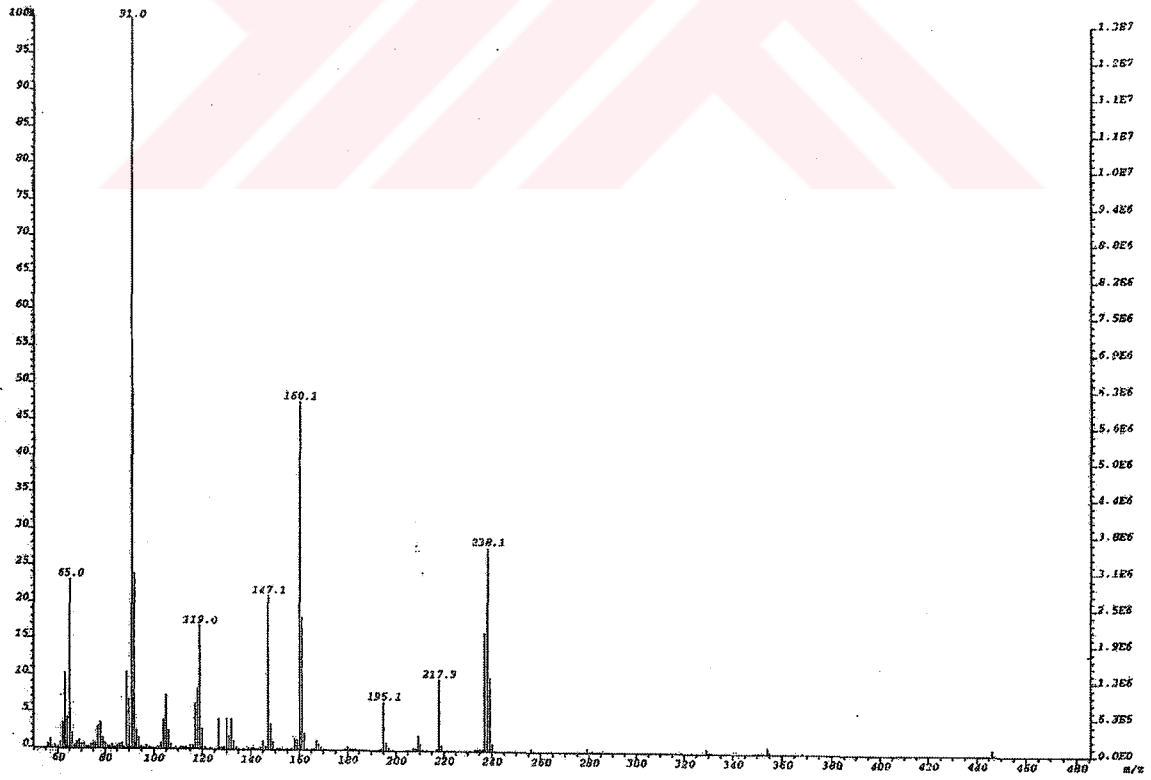
UV Spektrumu $\lambda_{\text{maks.}}$, nm (ϵ): 261 (16993), 213 (72709) (100 mL'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

IR Spektrumu (KBr) $\nu_{\text{maks.}}$ (cm^{-1}): 3090, 3050 (aromatik, C-H gerilme bandı), 2950 (CH_2 grupları, C-H asim. gerilme bandı), 2875 (CH_2 grupları, C-H sim. gerilme bandı), 1625 (aromatik, C=N gerilme bandı), 1600, 1590, 1490, 1450 (aromatik, C=C gerilme bandı), 775-710 (monosüstitüe benzen, C-H gerilme bandı).



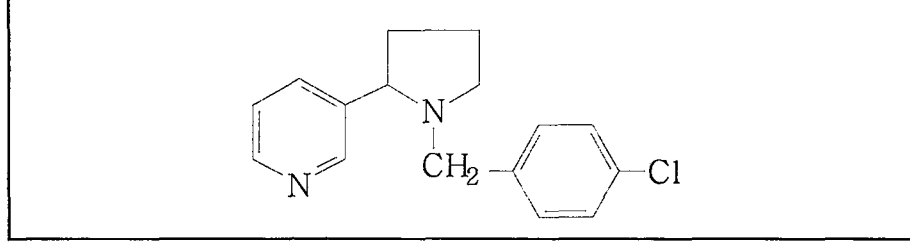
Şekil 1. N-1'-benzylornikotin (I)'in IR Spektrumu

Kütle Spektrumu (EI, m/z): 238 (M^+), 218, 195, 161, 160, 147, 120, 119, 105, 91, 65, 63.



Şekil 2. N-1'-benzylornikotin (I)'in Kütle Spektrumu

6.1.1.2 N-1'-(p-Klorobenzil) nornikotin (II)

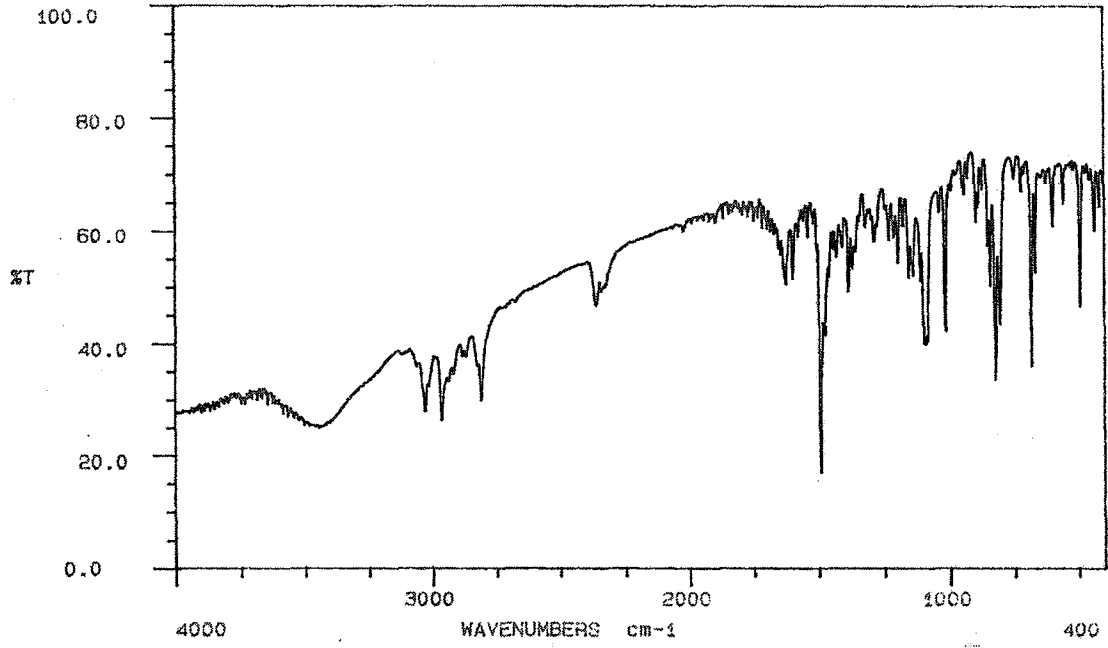


Başlangıç maddesi olarak yine nornikotin (1.01 mmol, 0.15 g), ekimolar miktarda sodyum iyodür (1.01 mmol, 0.15 g), sodyum karbonat (1.01 mmol, 0.11 g) ve p-klorobenzil klorür (1.01 mmol, 0.16 g) ile 5.2.1'de verilen yönteme göre reaksiyonundan hazırlandı. Reaksiyon ortamında bulunan yan ürünler, petrol eteri ile uzaklaştırıldı. Sulu fazda bulunan tersiyer amin dietileterle ekstraksiyon sonucu elde edildi. Koyu kahverengi toz; verim: %30, e.n.: 128-130 °C.

Spektral Bulgular:

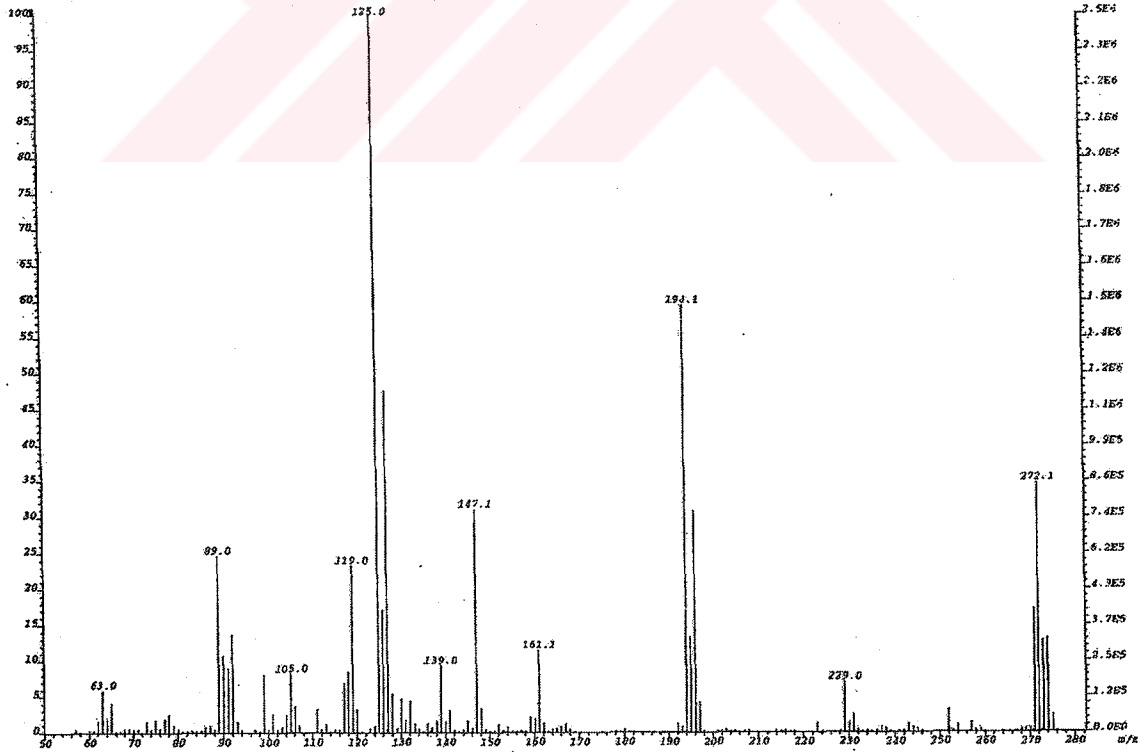
UV Spektrumu $\lambda_{\text{maks.}}$, nm (ϵ): 263 (6310), 219 (46267), 203 (41099) (100 mL'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

IR Spektrumu (KBr) $\nu_{\text{maks.}}$ (cm^{-1}): 3090, 3040 (aromatik, C-H gerilme bandı), 2950 (CH_2 grupları, C-H asim. gerilme bandı), 2850 (CH_2 grupları, C-H sim. gerilme bandı), 1610 (aromatik, C=N gerilme bandı), 1590, 1560, 1490, 1469 (aromatik, C=C gerilme bandı), 1090 (C-Cl gerilme bandı), 840-775 (süstitüe benzen, C-H gerilme bandı).



Şekil 3. N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin (II)'nin IR Spektrumu

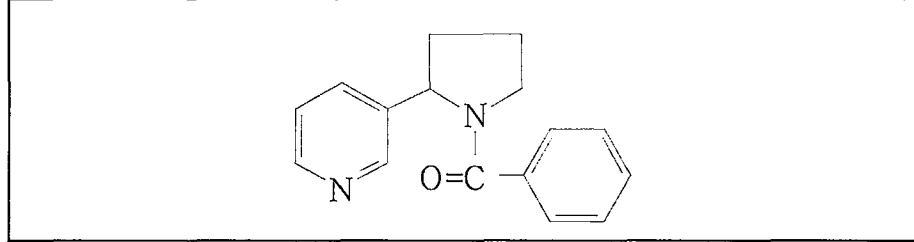
Kütle Spektrumu (EI, m/z): 272 (M^+), 252, 229, 194, 161, 147, 139, 125, 120, 119, 105, 91, 89, 65, 63.



Şekil 4. N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin (II)'nin Kütle Spektrumu

6.1.2 Amidler

6.1.2.1 N-1'-Benzoilnornikotin (Ia)

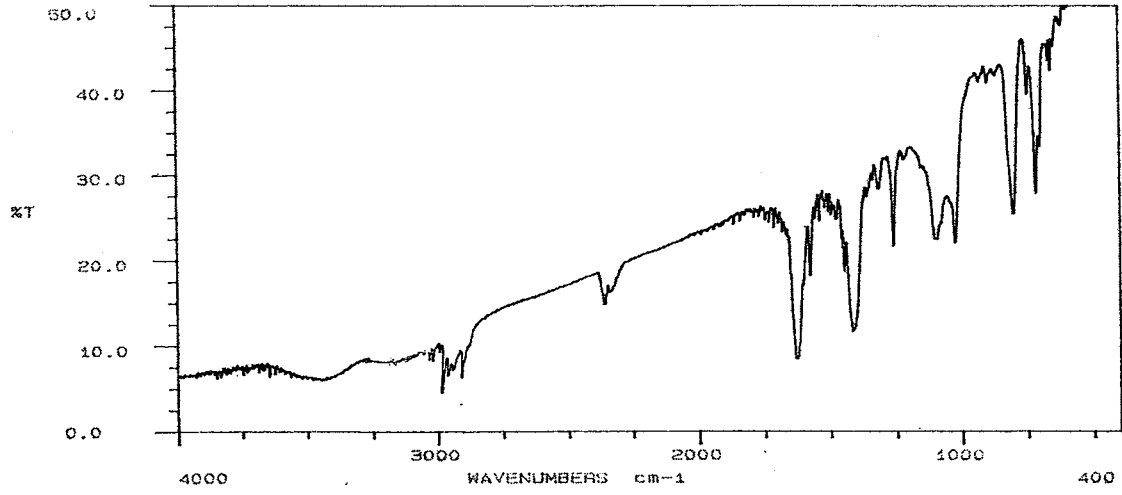


Nornikotin (0.51 mmol, 0.07 g), sodyum hidrür (0.51 mmol, 0.012 g) ve benzoil klorürün (0.51 mmol, 0.07 g), 6 mL benzen içinde 5.2.2'de verilen yöntemle göre reaksiyonundan elde edildi. Krem rengi toz, verim: %23, e.n.: 145-148 °C.

Spektral Bulgular:

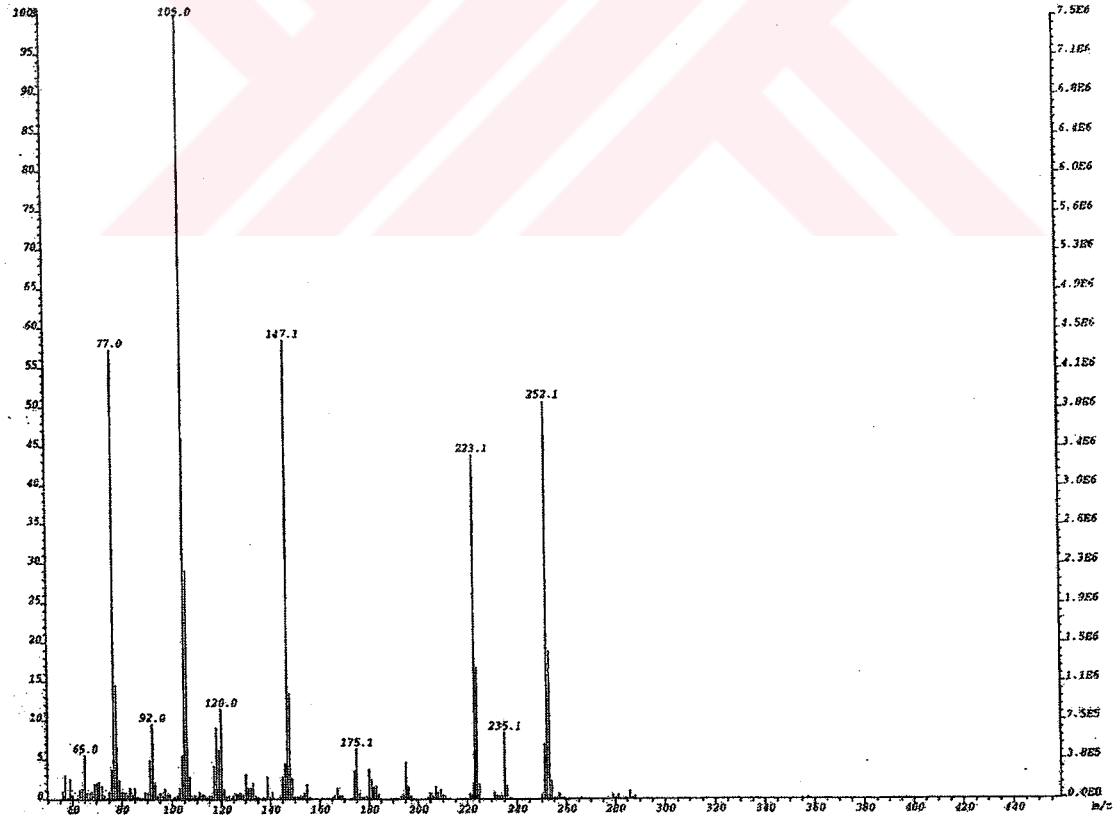
UV Spektrumu $\lambda_{\text{maks.}}$ nm (ϵ): 263 (16639), 207 (60025) (100 mL'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

IR Spektrumu (KBr) $\nu_{\text{maks.}}$ (cm^{-1}): 3050, 3000 (aromatik, C-H gerilme bandı), 2950 (CH_2 grupları, C-H asim. gerilme bandı), 2800 (CH_2 grupları, C-H sim. gerilme bandı), 1630 (amid, C=O gerilme bandı), 1605 (aromatik, C=N gerilme bandı), 1580, 1480, 1425 (aromatik, C=C gerilme bandı), 780 (süstitüe benzen, C-H gerilme bandı).



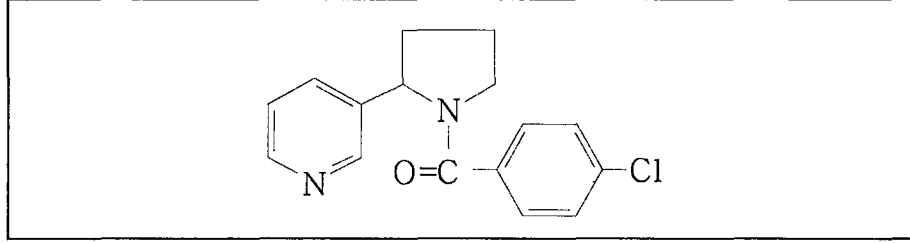
Şekil 5. N-1'-benzoinnornikotin (Ia)'nın IR Spektrumu

Kütle Spektrumu (EI, m/z): 252 (M^+), 235, 223, 175, 147, 120, 105, 92, 77, 65.



Şekil 6. N-1'-benzoinnornikotin (Ia)'nın Kütle Spektrumu

6.1.2.2 N-1'-(p-Klorobenzoil) nornikotin (IIa)

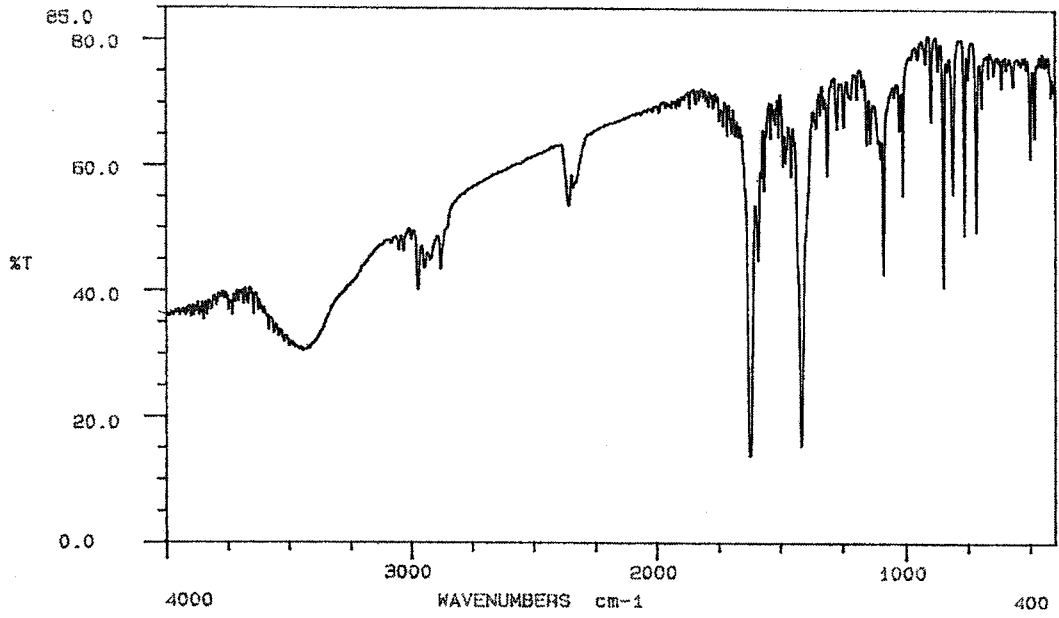


Nornikotin (0.34 mmol, 0.05 g), sodyum hidrür (0.34 mmol, 0.008 g) ve p-klorobenzoil klorür (0.34 mmol, 0.059 g) ile 5.2.2'de belirtilen yöntemle 5 mL benzen içindeki reaksiyonundan hazırlanmıştır. Ham ürün su banyosunda diklorometanda çözülerek, sıcak petrol eterinin damla damla ilavesiyle bu karışımdan billurlandırıldı. Sarı katı, verim: %50, e.n.: 210-213 °C.

Spektral Bulgular:

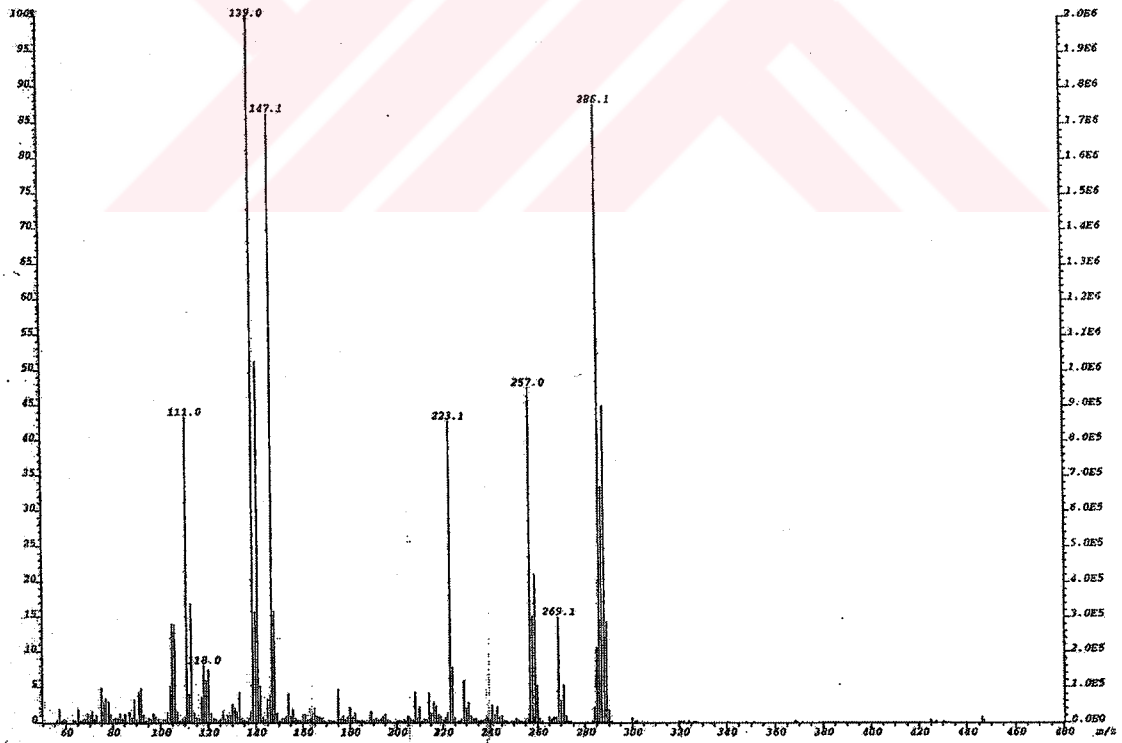
UV Spektrumu $\lambda_{\text{maks.}}$, nm (ϵ): 225 (46790), 205 (66438) (100 mL'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

IR Spektrumu (KBr) $\nu_{\text{maks.}}$ (cm^{-1}): 3100, 3050 (aromatik, C-H gerilme bandı), 2950 (CH_2 grupları, C-H asim. gerilme bandı), 2800 (CH_2 grupları, C-H sim. gerilme bandı), 1625 (amid, C=O gerilme bandı), 1615 (aromatik, C=N gerilme bandı), 1590, 1470, 1430 (aromatik, C=C gerilme bandı), 1085 (C-Cl gerilme bandı), 800 (süstitüe benzen, C-H gerilme bandı).



Şekil 7. N-1'-(p-klorobenzoil) normikotin (IIa)'nın IR Spektrumu

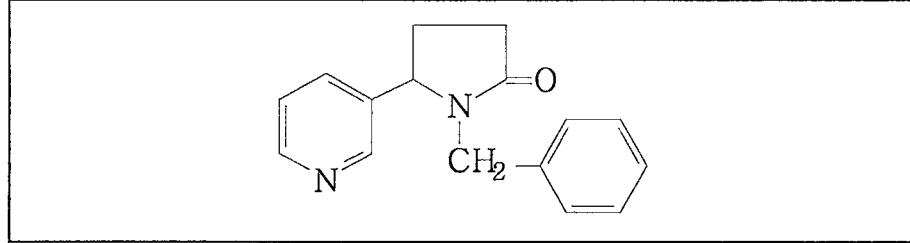
Kütle Spektrumu (EI, m/z): 286 (M^+), 269, 257, 223, 175, 147, 139, 120, 111, 92.



Şekil 8. N-1'-(p-klorobenzoil) normikotin (IIa)'nın Kütle Spektrumu

6.1.3 Laktamlar

6.1.3.1 N-1'-Benzilnorkotinin (Ib)



Norkotinin (0.31 mmol, 0.05 g), 5 mL benzen içinde sodyum hidrür (0.31 mmol, 0.007 g) ve benzil klorür (0.31 mmol, 0.039 g) ile 5.2.3'te verilen yönteme göre reaksiyonundan elde edildi. Organik c z c n n alçak basınca altında u urulmasından sonra kalan kırmızı-kahve renkteki katı kısma dietileter eklenerek yan ürünler uzaklaştırıldı. Etere geçen kısım, organik c z c n n u urulmasından sonra petrol eterinde c z lerek sodyum klorür ile doyurulmuş su ile 3 kez ekstre edildi. Organik fazın sodyum sülfatla kurutulması ve alçak basınç altında uçurulması ile Ib elde edildi. Açık kahverengi macun, verim: %12.8.

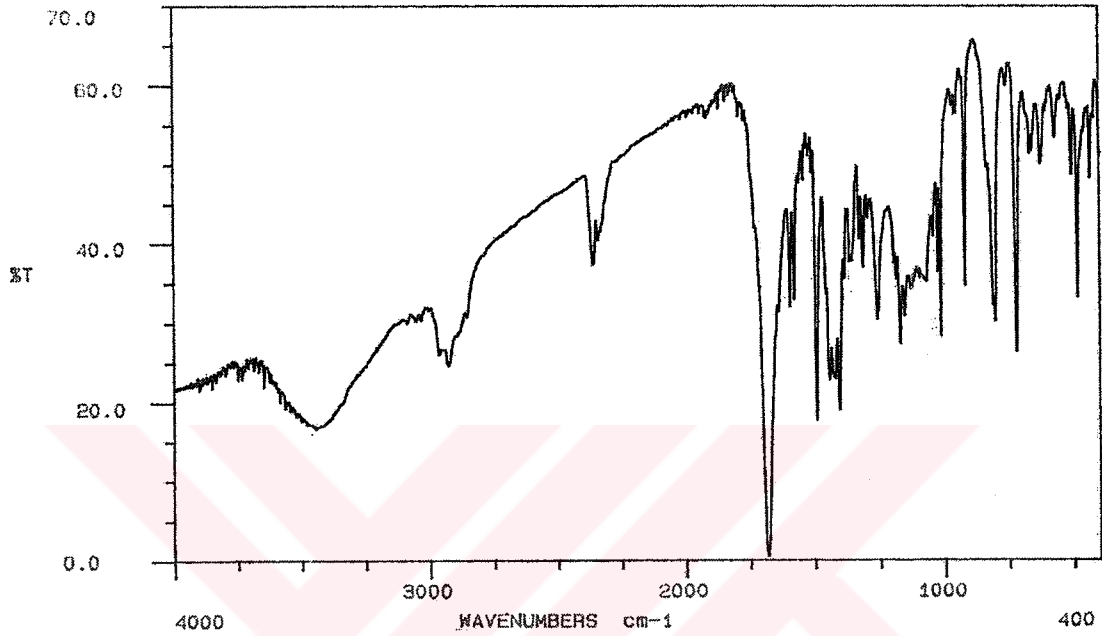
Spektral Bulgular:

UV Spektrumu $\lambda_{\text{maks.}}$, nm (ϵ): 260 (19883), 210 (70006) (100 mL'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü c zelti).

Elemental Analiz: C₁₆H₁₆N₂O için

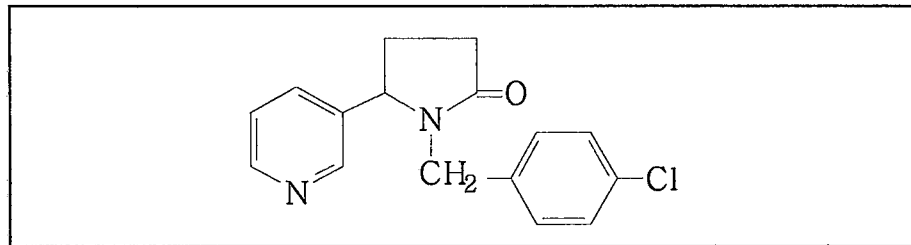
	%C	%H	%N
Hesaplanan	76.17	6.39	11.10
Bulunan	76.08	6.62	11.06

IR Spektrumu (KBr) $\nu_{\text{maks.}}$ (cm^{-1}): 3100, 3050 (aromatik, C-H gerilme bandı), 2958-2916 (CH_2 grupları, C-H asim. ve sim. gerilme bandı), 1685 (laktam, C=O gerilme bandı), 1605 (aromatik, C=N gerilme bandı), 1570, 1510, 1440 (aromatik, C=C gerilme bandı), 850 (süstitüe benzen, C-H gerilme bandı).



Şekil 9. N-1'-benzyl-norkotin (Ib)'nin IR Spektrumu

6.1.3.2 N-1'-(p-Klorobenzil) norkotin (IIb)



Norkotin (0.62 mmol, 0.1 g), sodyum hidrür (0.62 mmol, 0.015 g) ve p-klorobenzil klorür (0.62 mmol, 0.099 g) 10 mL benzen ile 5.2.3'te verilen yöntemle göre reaksiyonu ile yapıldı. Benzenin ortamdan uzaklaştırılmasını takiben kahverengi ham ürün dietileterle yıkandı ve organik çözücüye geçen kısım preparatif KTK ile

5.2.5'te verilen yönteme göre A₁ üzücü sistemi kullanılarak saflaştırıldı. Koyu kahverengi, macun, verim: %20.

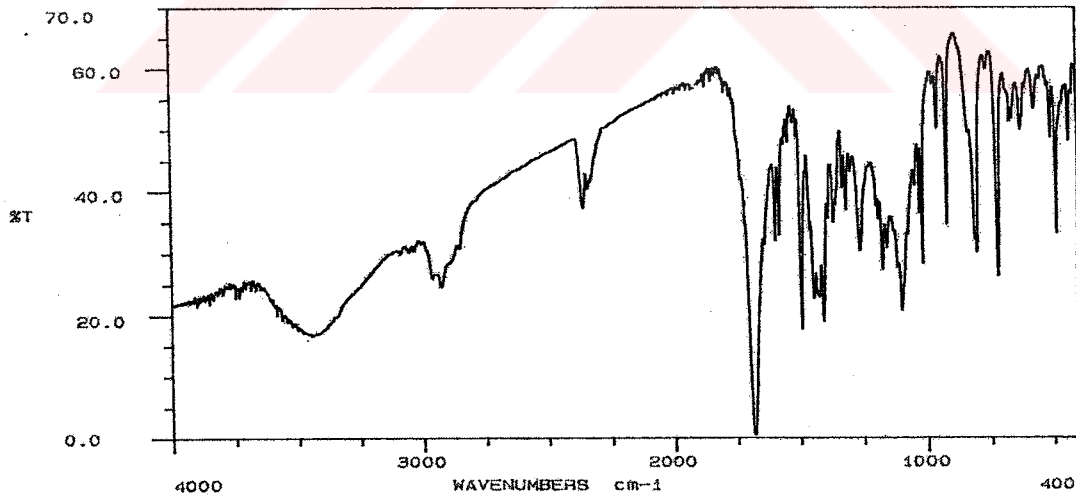
Spektral Bulgular:

UV Spektrumu $\lambda_{maks.}$, nm (ϵ): 261 (573), 222 (2951) omuz, 200 (5988) (100 mL'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü  zelti).

Elemental Analiz: C₁₆H₁₅ClN₂O için

	%C	%H	%N
Hesaplanan	67.02	5.27	9.77
Bulunan	67.37	5.04	9.72

IR Spektrumu (KBr) $\nu_{maks.}$ (cm⁻¹): 3100, 3050 (aromatik, C-H gerilme bandı), 2972-2833 (CH₂ grupları, C-H asim. ve sim. gerilme bandı), 1670 (laktam, C=O gerilme bandı), 1610 (aromatik, C=N gerilme bandı), 1580, 1510, 1450 (aromatik, C=C gerilme bandı), 1085 (C-Cl gerilme bandı), 850-750 (sübstitüe benzen, C-H gerilme bandı).



şekil 10. N-1'-(p-klorobenzil) norkotinin (IIb)'nin IR Spektrumu

6.2 Substratların Beyin Homojenatı İle Yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Bulgular

Nornikotin, kotinin ve norkotinin substratlarının sıçan beyin homojenatı ile inkübasyonunda hem normal hem de fenobarbitalle indüklenmiş deney hayvanları kullanıldığı için genel inkübasyon işleminde Tablo 6.1'de görüldüğü gibi modifikasyon yapılmıştır.

Tablo 6.1 Beyin homojenatı ile yapılan *in vitro* metabolizma deneylerinde kullanılan test ve kontrol inkübasyon erlenlerinin içeriklerini gösteren deney protokolü

Erlenler	Substrat	Beyin Homojenatı	Kofaktörler
Test 1	+	İndüklenmiş Homojenat	+
Test 2	+	Normal Homojenat	+
Kontrol 1	+	Denatüre İndüklenmiş Homojenat	+
Kontrol 2	+	İndüklenmiş Homojenat	Tampon
Kontrol 3	+	Denatüre Normal Homojenat	+
Kontrol 4	+	Normal Homojenat	Tampon
Kontrol 5	+	Tris Tamponu	Tampon
Kontrol 6	–	İndüklenmiş Homojenat	+
Kontrol 7	–	Normal Homojenat	+

Substratlar ve olası metabolitlerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografa enjekte edilmesinden sonra elde edilen tutulma zamanları Tablo 6.2'de görülmektedir. Metabolik ekstrelerin HPLC cihazına enjeksiyonu stoklardan 5 µL alınması suretiyle yapıldı.

Tablo 6.2 Nornikotin, Kotinin ve Norkotinin substratları ve olası metabolitlerinin S₁ HPLC programında elde edilen tutulma zamanları

Bileşik	Tutulma Zamanı (dak.)
	S ₁
Nornikotin Seti	
Nornikotin dikamsilat	19.33
Norkotinin	10.40
Nikotinamid	6.35
Benzoilmetilamin	13.37
Kotinin Seti	
Kotinin perklorat	14.53
3'-Hidroksikotinin	8.37
5'-Hidroksikotinin ve 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid	9.53
Norkotinin	10.38
Nikotinamid	6.35
Benzoilmetilamin	13.00
Norkotinin Seti	
Norkotinin	10.25
4-(3-Piridil)-4-oksobutiramid	8.07
Nikotinamid	6.28
Asetanilid	16.68

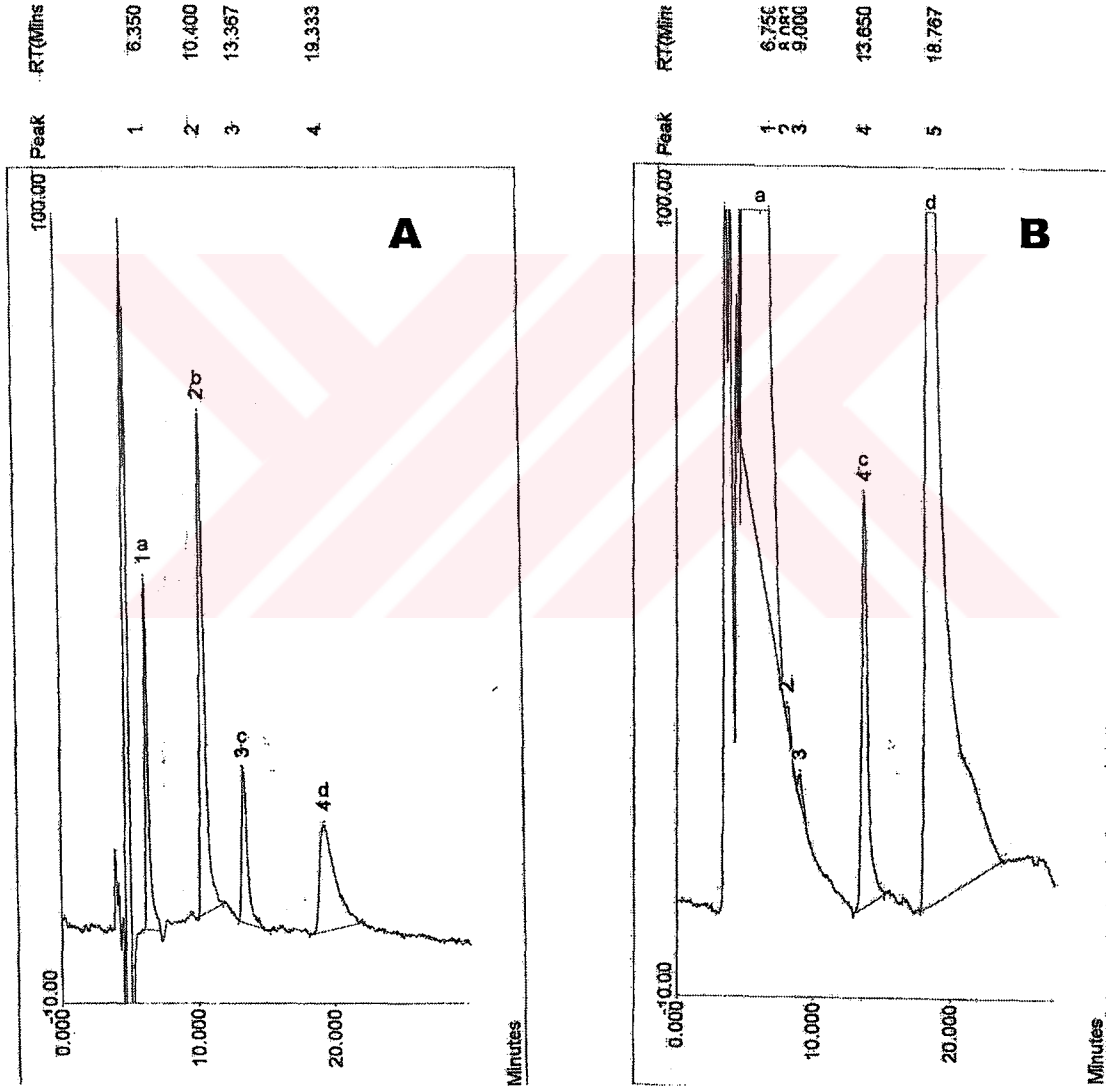
Nornikotin, kotinin ve norkotinine ait standartlar karışımının A₁ ve A₂ mobil faz sistemleri kullanılarak 5.2.4'te belirtildiği şekilde ince tabaka kromatografisine uygulanması sonucu bileşiklerin elde edilen R_{fx}100 değerleri Tablo 6.3'te görülmektedir.

Tablo 6.3 Substratlar ve Olası Metabolitlerinin İTK ile Elde Edilen R_{fx}100 Değerleri

Bileşik	R _{fx} 100	
	A ₁	A ₂
Nornikotin	91	6
Norkotinin	86	48
Kotinin perklorat	93	62
3'-Hidroksikotinin	78	50
5'-Hidroksikotinin ve 4-(3-Piridil)-4-okso-N-metilbutiramid	84	58
4-(3-Piridil)-4-oksobutiramid	80	41
Nikotinamid	63	40
Benzoilmetilamin	88	65
Asetanilid	90	64

6.2.1 Nornikotinin Metabolizması İle İlgili HPLC ve TLC Bulguları

Nornikotinin inkübasyonunu takiben 5.2.11' de belirtilen ekstraksiyondan önce tüm inkübasyon erlenlerine metanolle seyreltilmiş 10 µL (74 nmol'e eşdeğer) benzoilmetilamin internal standartı eklendi. Organik fazlarının uçurulmasından sonra metabolik ekstratlar 5.2.12'de belirtildiği şekilde HPLC sistemine uygulandı. Nornikotin setine ait metabolik ekstratların HPLC kromatogramları Şekil 11'de görülmektedir.

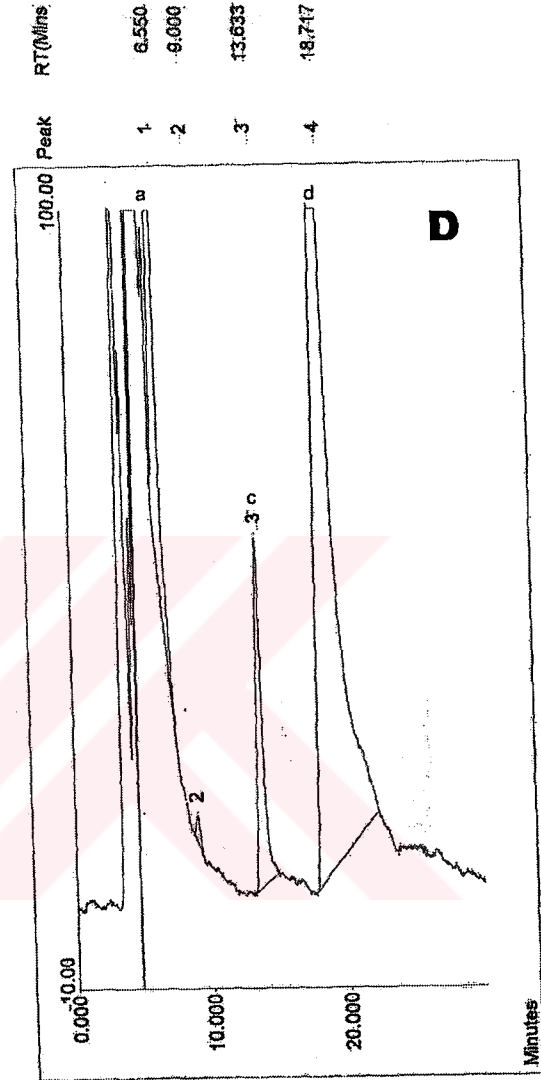
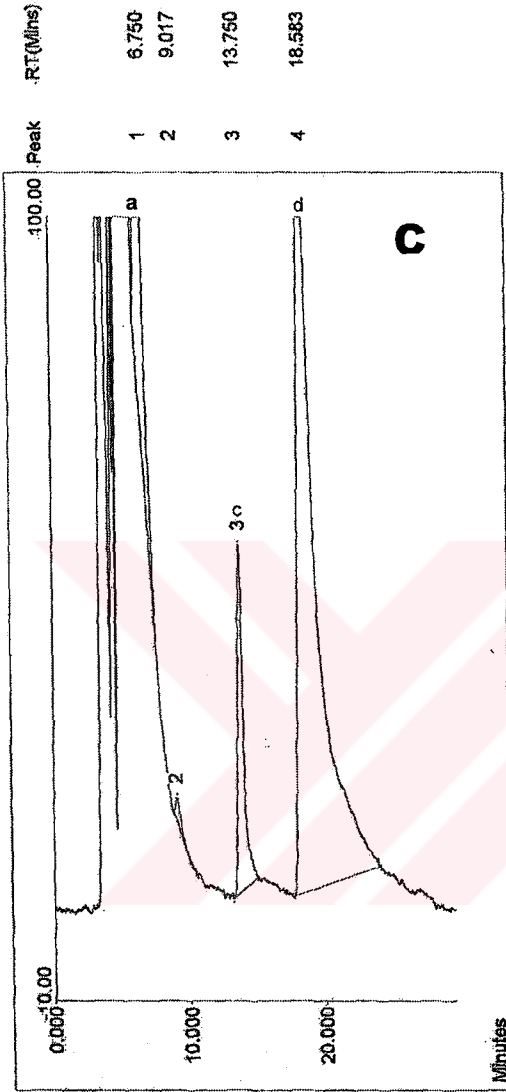


Şekil 11. Nornikotinin sıçan beyin homojenatı ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları

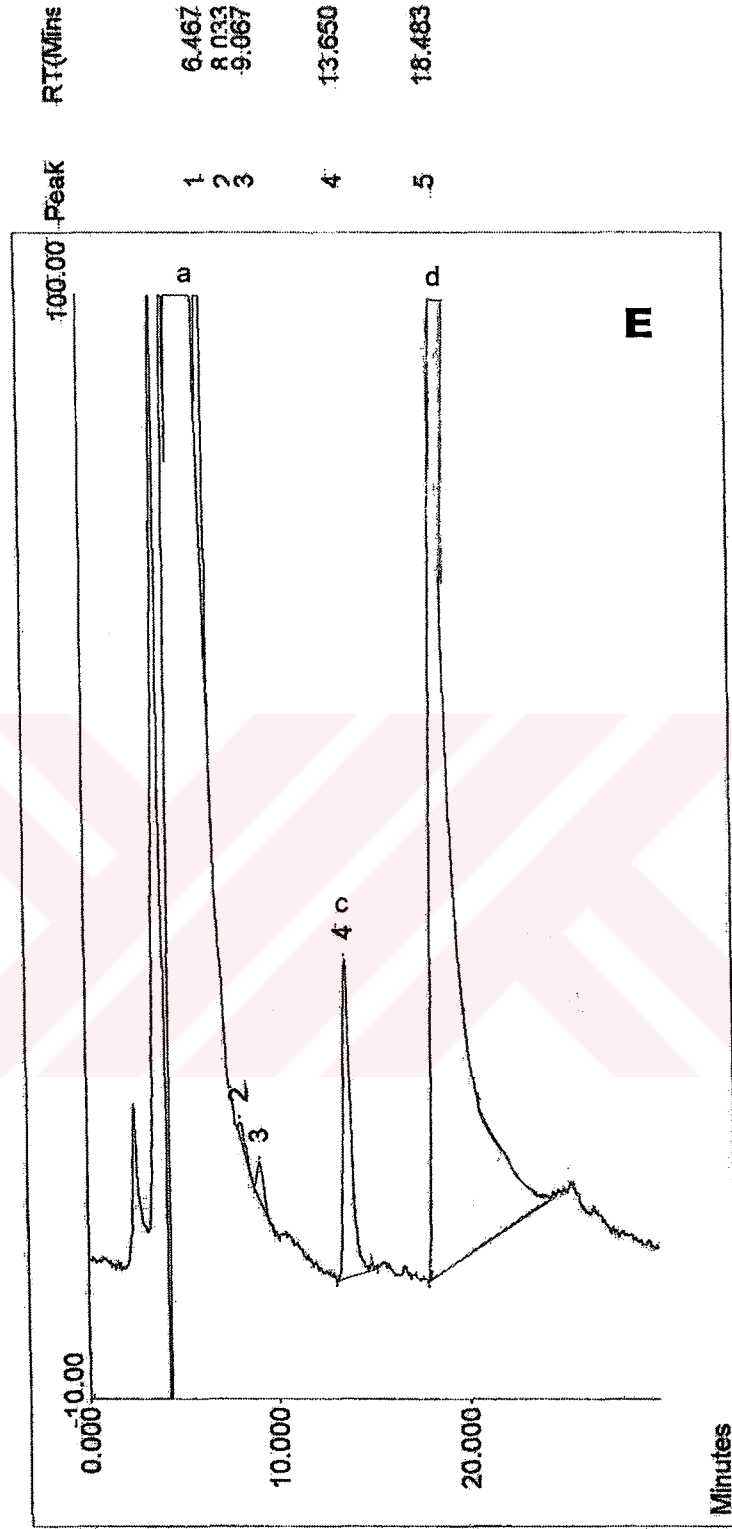
A. Nornikotin ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

B. Nornikotinin fenobarbitalle indüklenmiş beyin homojenatı ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstratın HPLC kromatogramı

a=Nikotinamid, b=Norkotinin, c=Benzoilmetilamin (internal standart), d=Nornikotin (substrat)

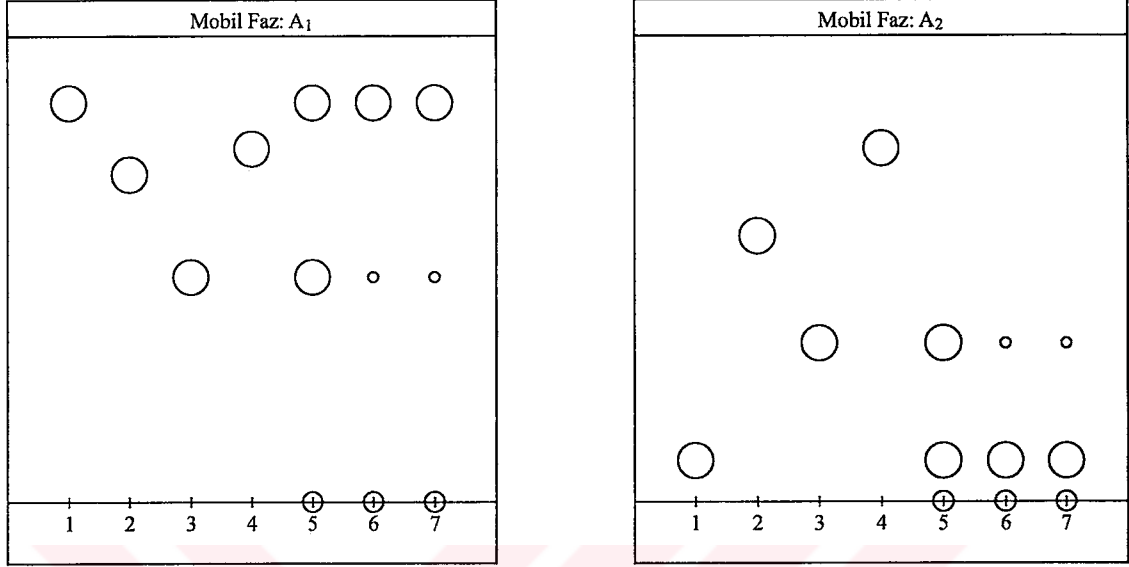


C. Nornikotin normal beyin homojenatı ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstrinden alınan HPLC kromatogramı
D. Denatüre edilmiş beyin homojenatı ile yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı



E. Nornikotin kofaktörlerin ilave edilmediği beyin homojenatı ile yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı

Nornikotin ve olası metabolit standartları ile metabolik ekstrelerine ait İTK kromatogramları Şekil 12'de görülmektedir.



Şekil 12. Substrat olarak nornikotin kullanıldığı beyin homojenatı karışımlarına ait İTK kromatogramları

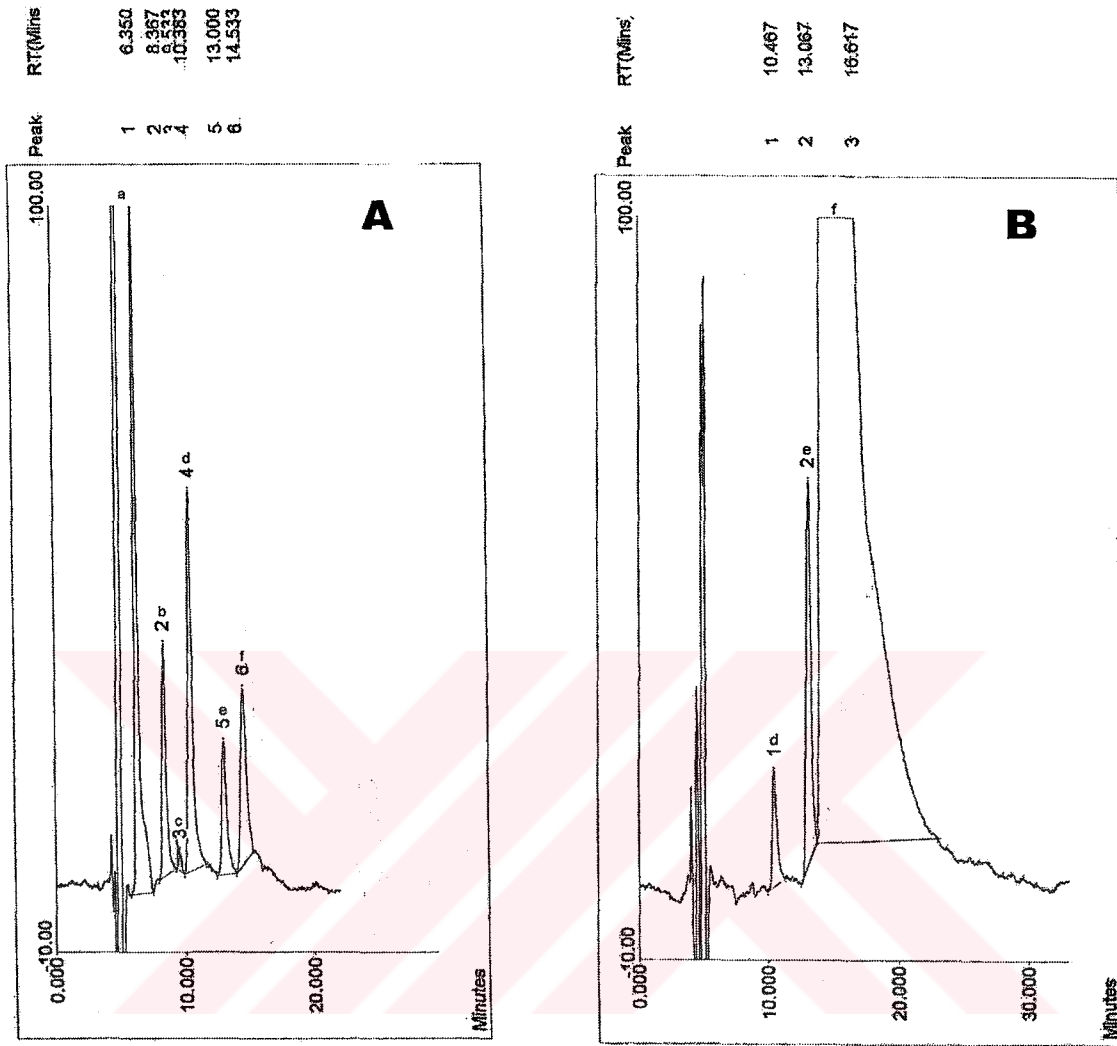
1=Nornikotin, 2=Norkotin, 3=Nikotinamid, 4=Benzoilmetilamin, 5=Test 1 (İndüklenmiş homojenat)
6=Kontrol 1 (Denattire İndüklenmiş homojenat), 7=Kontrol 2 (Kofaktörsüz homojenat)

6.2.2 Kotininin Metabolizması İle İlgili HPLC ve İTK Bulguları

Kotininin normal ve indüklenmiş beyin homojenatı ile inkübasyonundan sonra inkübatlara metanolde seyreltilmiş 10 µL (74 nmol'e eşdeğer) benzoilmetilamin ilavesiyle diklorometan ekstraksiyonu yapılarak Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografa enjekte edilmiştir.

Kotinin setine ait standartlar karışımının ve metabolik ekstrelerin kromatogramları Şekil 13'te görülmektedir.

Şekil 14'te ise bu standartlar ve metabolik ekstrelerin İTK kromatogramları bulunmaktadır.



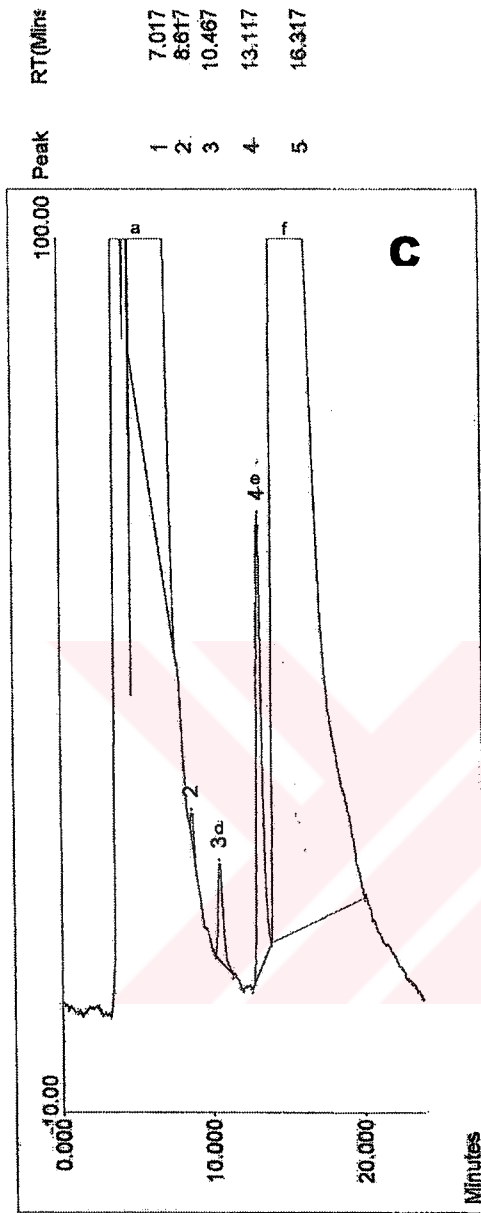
Şekil 13. Kotininin sıçan beyin homojenatı ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. Kotinin ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

B. Kotininin beyin homojenatı ve kofaktör içermeyen ortamda yapılan kontrol deneylerinden elde edilen HPLC kromatogramı

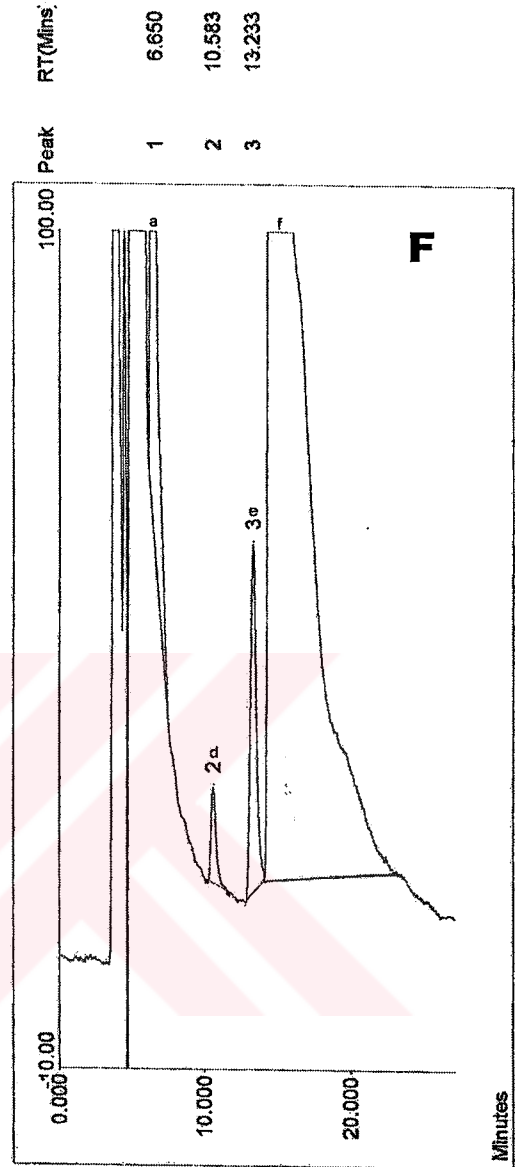
a=Nikotinamid, b=3'-Hidroksikotinin, c=5'-Hidroksikotinin, d=Norkotinin

e=Benzoilmetilomin (internal standart) f=Kotinin Perklorat (substrat)



C. Kotininin fenobarbitalle indüklenmiş beyin homojenatı ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı

D. Kotininin normal beyin homojenatı ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı

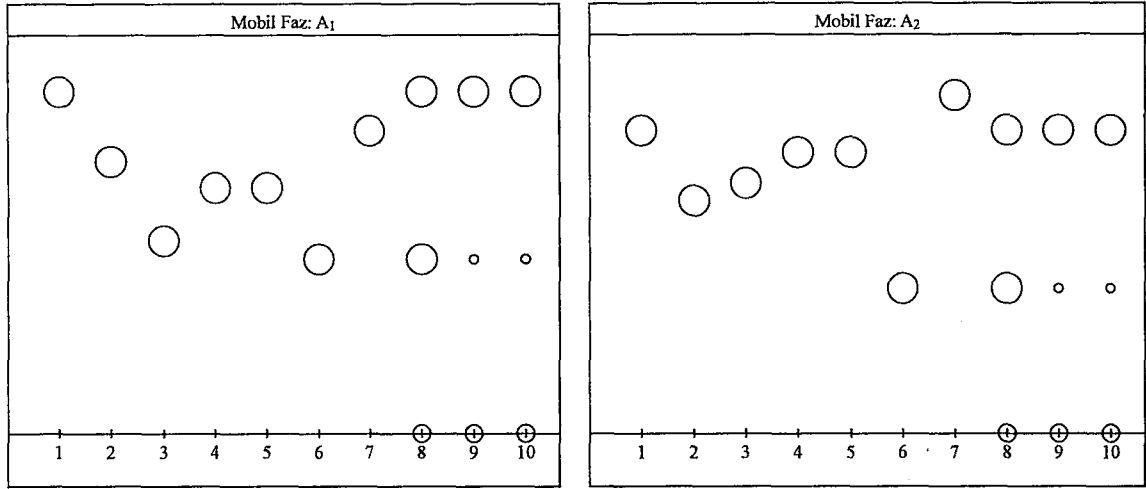


E. Kotininin kofaktörlerin ilave edilmediği beyin homojenatı ile yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı

F. Denattüre edilmiş beyin homojenatı ile yapılan denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı



G. İndüklenmiş homojenat ve kofaktör ile yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı



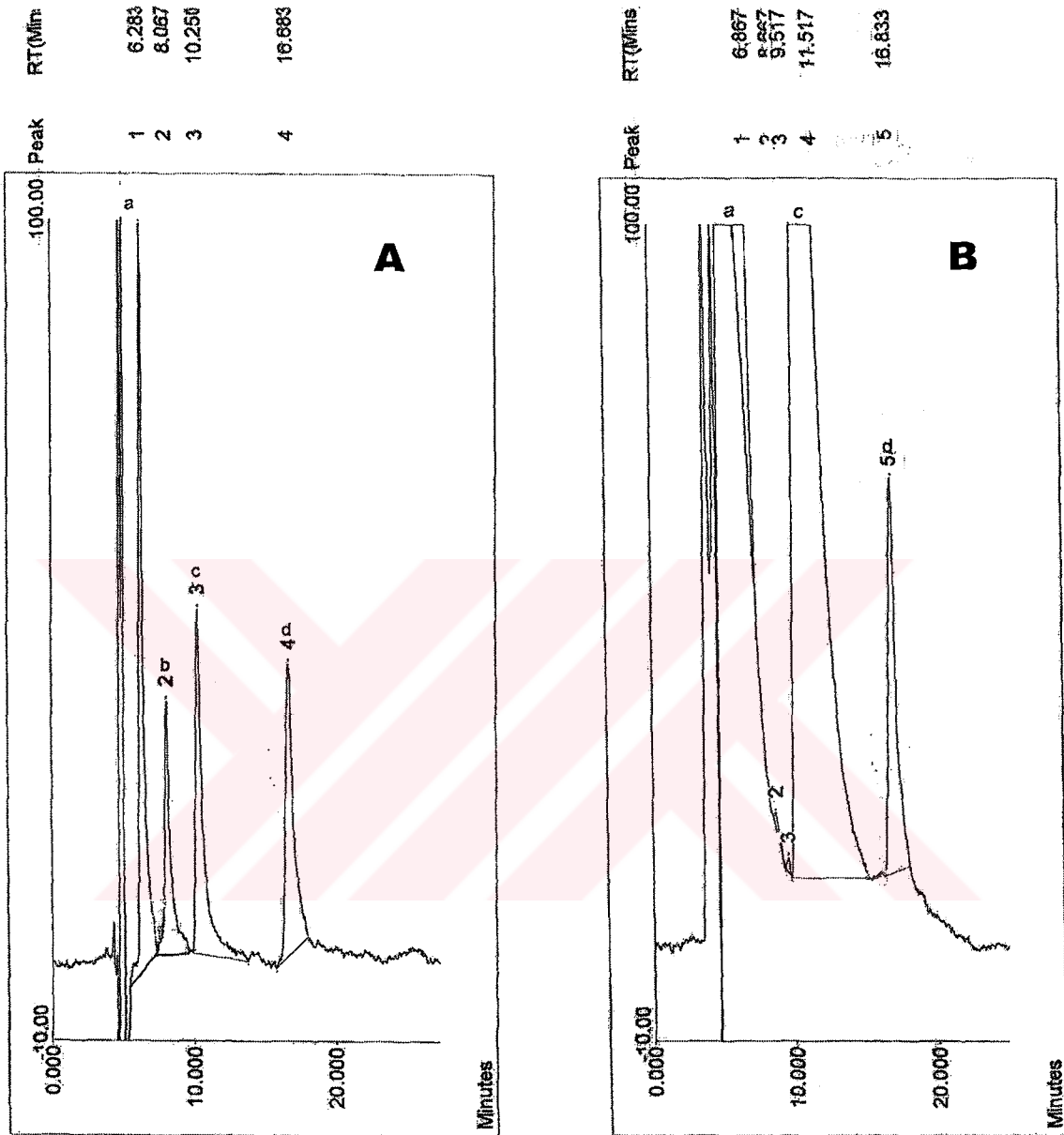
Şekil 14. Substrat olarak kotininin kullanıldığı beyin homojenatı karışımlarına ait İTK kromatogramları 1=Kotinin perklorat, 2=Norkotinin, 3=3'-Hidroksikotinin, 4=5'-Hidroksikotinin, 5=4-(3-Piridil)-4-okso-N-metilbutiramid, 6=Nikotinamid, 7=Benzoilmetilamin, 8=Test 1 (İndüklenmiş homojenat), 9=Kontrol 1 (Denatüre İndüklenmiş homojenat), 10=Kontrol 2 (Kofaktörsüz homojenat)

6.2.3 Norkotininin Metabolizması İle İlgili HPLC ve İTK Bulguları

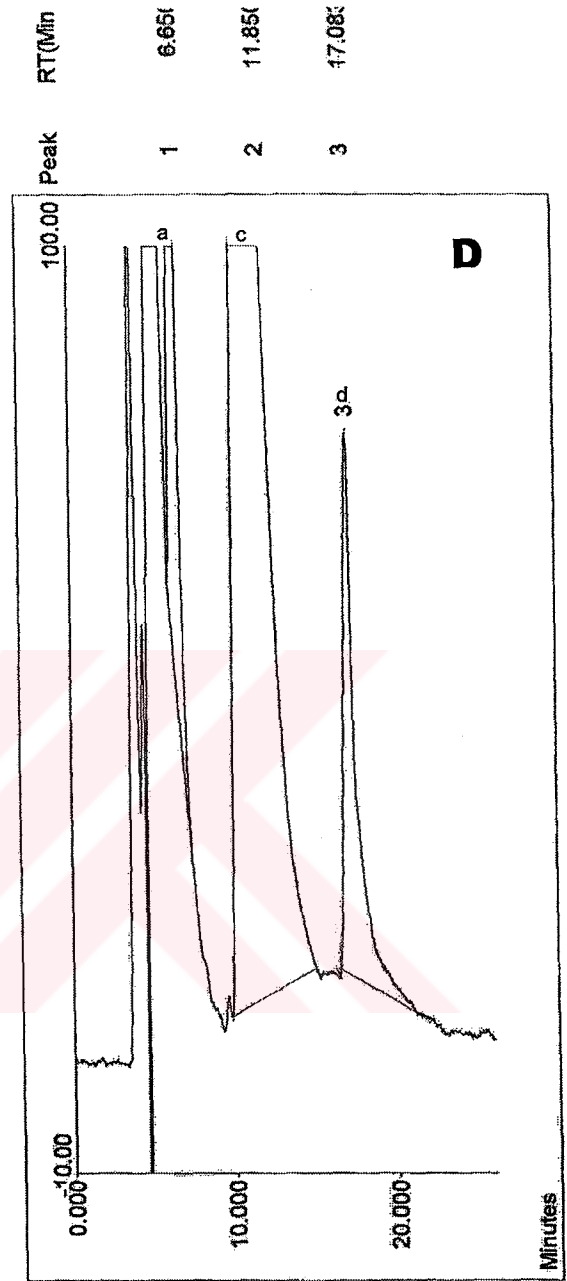
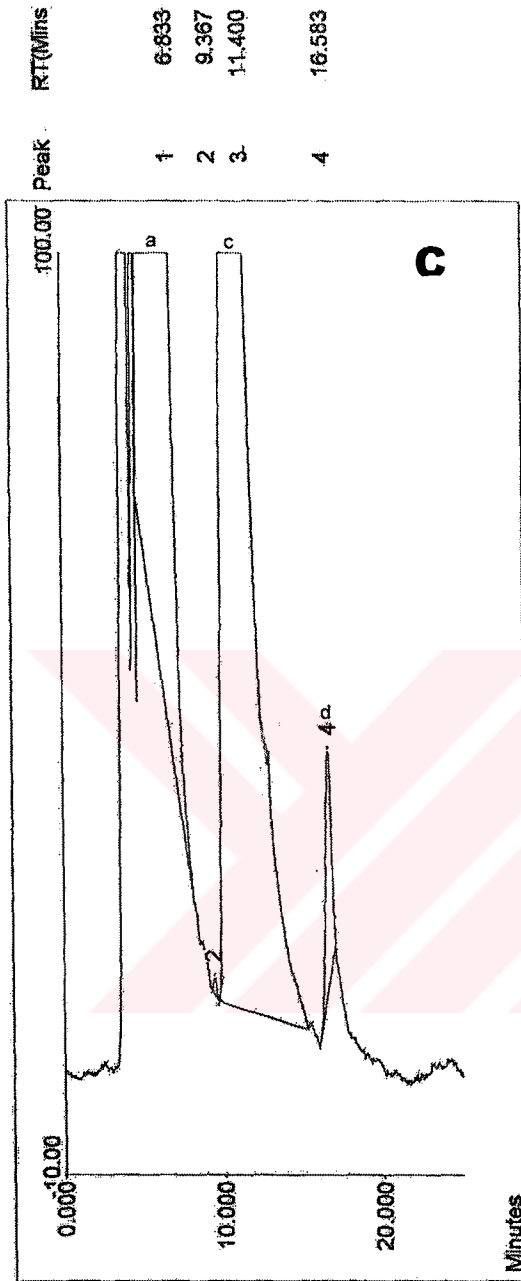
Beyin homojenatı ile yapılan çalışmamızın son substratı olan norkotinin de diğer substratlarla aynı inkübasyon ve ekstraksiyon yöntemlerine tabi tutuldu. Ancak nornikotin ve kotinin setinden farklı olarak bu sete ait homojenatlara metanolde seyreltilmiş 5 µL asetanilid (37 nmol'e eşdeğer) eklenerek biyolojik ortamdan organik faza geçirildi.

S₁ mobil faz sisteminde substrat norkotinin ve olası metabolitlerinin HPLC kromatogramları Şekil 15'te görülmektedir.

Şekil 16'da da A₁ ve A₂ mobil faz sistemleri ile yapılan İTK kromatogramları belirtilmiştir.



Şekil 15. Norkotininin sıçan beyin homojenatı ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları
A. Norkotinin ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı
B. Norkotininin normal beyin homojenatı ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik
ekstreden alınan HPLC kromatogramı
a=Nikotinamid, b=4-(3-Piridil)-4-oksobutiramid, c=Norkotinin (substrat)
d=Asetonilid (internal standart)

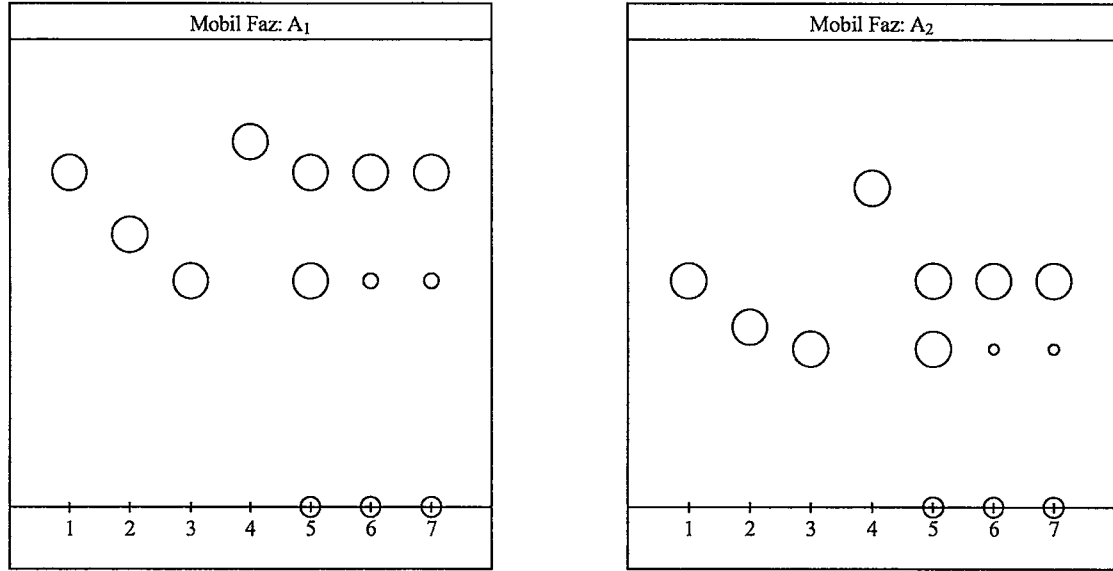


C. Norkotininin fenobarbitalle indüklenmiş beyin homojenatı ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı
D. Denatüre edilmiş beyin homojenatı ile yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı



E. Norkotininin kofaktörlerin ilave edilmediği indüklenmiş beyin homojenatı ile yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı

F. Norkotininin kofaktörlerin ilave edilmediği normal beyin homojenatı ile yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 16. Substrat olarak norkotininin kullanıldığı beyin homojenatı karışımlarına ait İTK kromatogramları

1=Norkotinin, 2=4-(3-Pridil)-4-oksobutiramid, 3=Nikotinamid, 4=Asetanilid, 5=Test 1 (İndüklenmiş homojenat), 6=Kontrol 1 (Denatüre indüklenmiş homojenat), 7=Kontrol 2 (Kofaktörsüz homojenat)

6.3 Substratların Karaciğer Mikrozomları İle Yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Bulgular

Beyin homojenatı ile yapılan inkübasyonda olduğu gibi normal ve indüklenmiş sıçan karaciğeri mikrozomlarının kullanıldığı modifiye edilmiş inkübasyon protokolü Tablo 6.4'te verilmiştir.

Tablo 6.4 Karaciğer mikrozomları ile yapılan *in vitro* metabolizma deneylerinde kullanılan test ve kontrol inkübasyon erlenlerinin içeriklerini gösteren deney protokolü

Erlenler	Substrat	Mikrozom	Kofaktörler
Test 1	+	İndüklenmiş Mikrozom	+
Test 2	+	Normal Mikrozom	+
Kontrol 1	+	Denatüre İndüklenmiş Mikrozom	+
Kontrol 2	+	İndüklenmiş Mikrozom	Tampon
Kontrol 3	+	Denatüre Normal Mikrozom	+
Kontrol 4	+	Normal Mikrozom	Tampon
Kontrol 5	+	Tampon	Tampon
Kontrol 6	-	İndüklenmiş Mikrozom	+
Kontrol 7	-	Normal Mikrozom	+

Substrat ve olası metabolitlerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografa enjeksiyonunu takiben elde edilen tutulma zamanları Tablo 6.5'te verilmiştir.

Tablo 6.5 Nornikotin, kotinin ve norkotinin substratları ve olası metabolitlerinin S₁, S₂ ve S₃ HPLC programlarında elde edilen tutulma zamanları

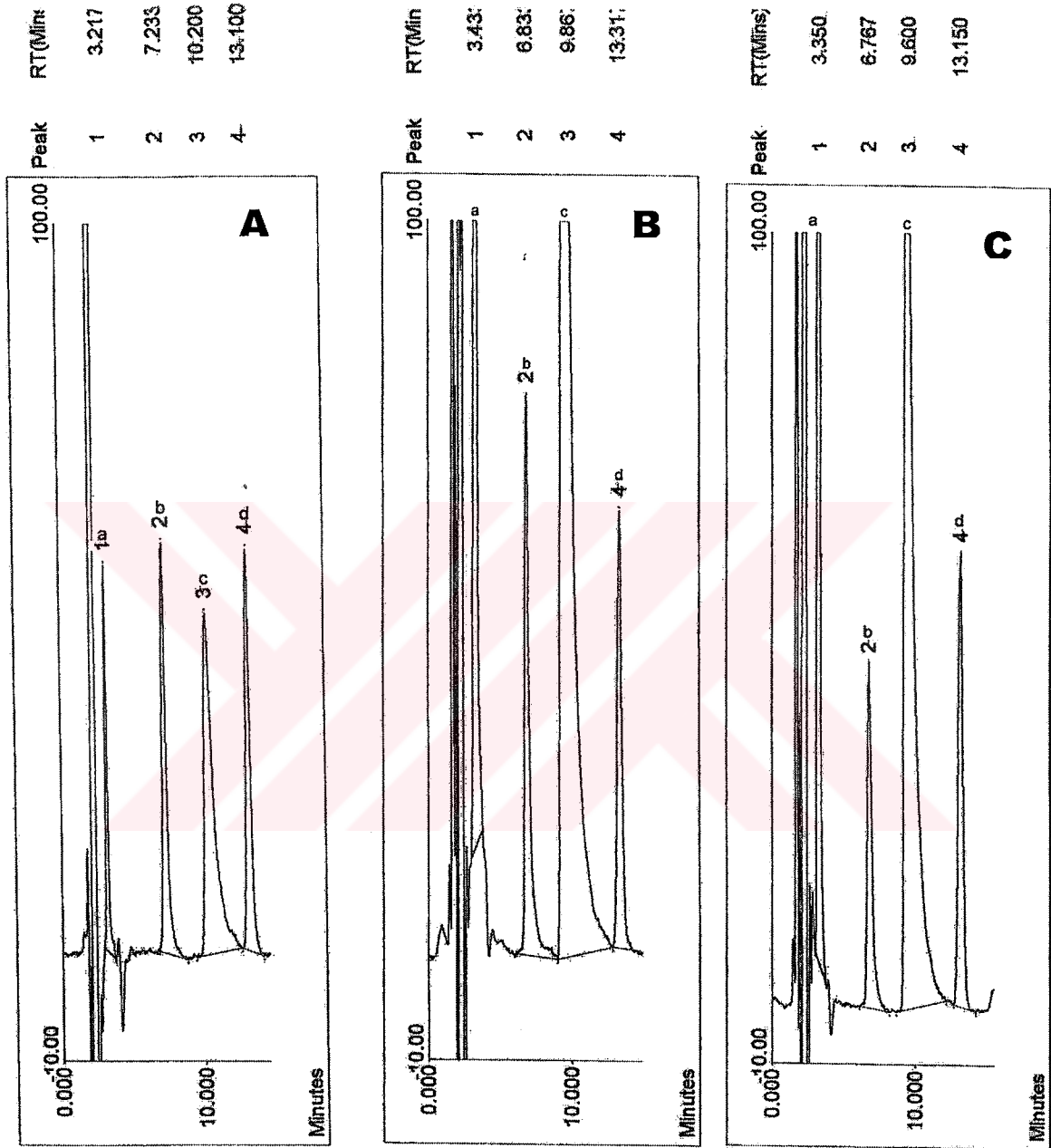
Bileşik	Tutulma Zamanı (dak.)		
	S ₁	S ₂	S ₃
Nornikotin Seti			
Nornikotin dikamsilat	—	10.1	—
Norkotinin	—	7.23	—
Nikotinamid	—	3.22	—
Benzoilmetilamin	—	13.1	—
Kotinin Seti			
Kotinin perklorat	—	—	20.63
3'-Hidroksikotinin	—	—	8.47
5'-Hidroksikotinin ve 4-(3-piridil) 4-okso-N-metilbutiramid	—	—	9.80
Norkotinin	—	—	12.22
Nikotinamid	—	—	6.37
Benzoilmetilamin	—	—	15.05
Norkotinin Seti			
Norkotinin	10.48	—	—
4-(3-Piridil)-4-oksobutiramid	8.27	—	—
Nikotinamid	6.50	—	—
Asetanilid	17.42	—	—

6.3.1 Nornikotinin Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları

Sıçan karaciğeri mikrozomları ile *in vitro* metabolizması çalışılan ilk substrat olan nornikotinin inkübasyonunu takiben ekstraksiyon test ve kontrol gruplarının her birine 10 µL (74 nmol'e eşdeğer) internal standart benzoilmetilamin ilavesi ile 5.2.11'de anlatıldığı şekilde yapıldı.

Metanolle 200 µL'ye seyreltilen nornikotin metabolik ekstrelerine ait stoklardan tekrar 1:1 oranda seyreltme yapılarak HPLC sistemine 5'er µL enjekte edilmek suretiyle test ve kontrol erlenlerinden elde edilen sonuçların karşılaştırması yapıldı.

Nornikotin setine ait S₂ HPLC programının kullanıldığı kromatografik analiz sonuçları Şekil 17'de görülmektedir.



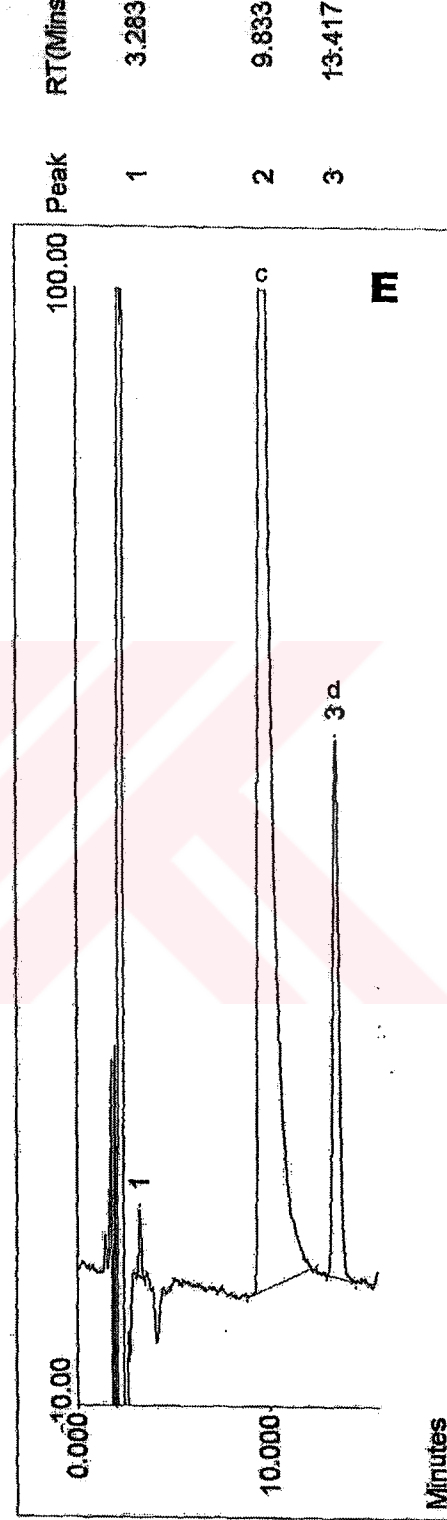
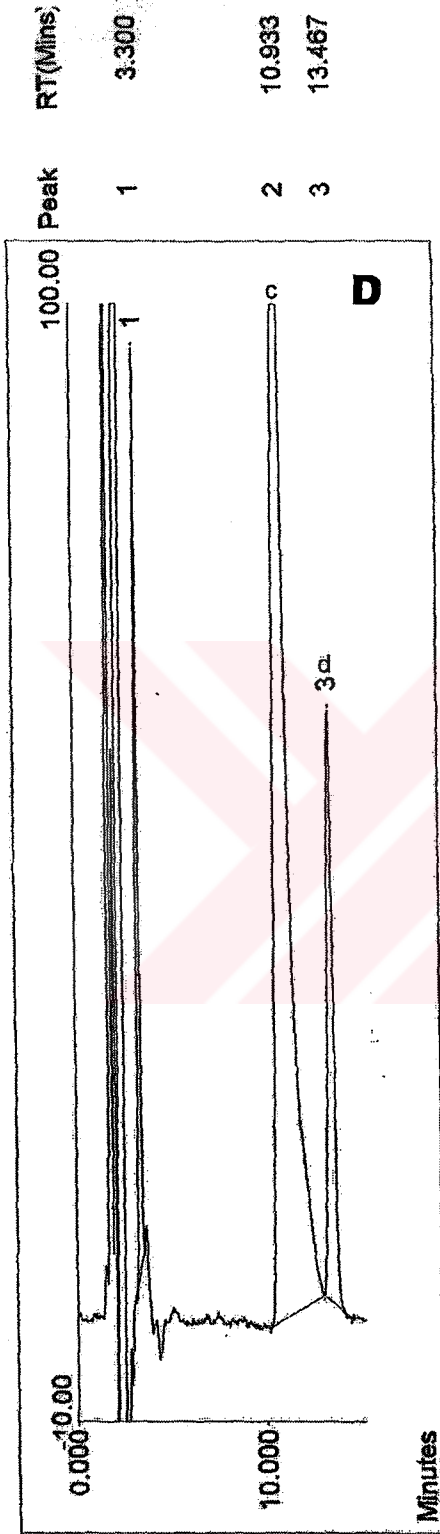
Şekil 17. Nornikotinın sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. Nornikotin ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

B. Nornikotin fenobarbitalle indüklenmiş karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı

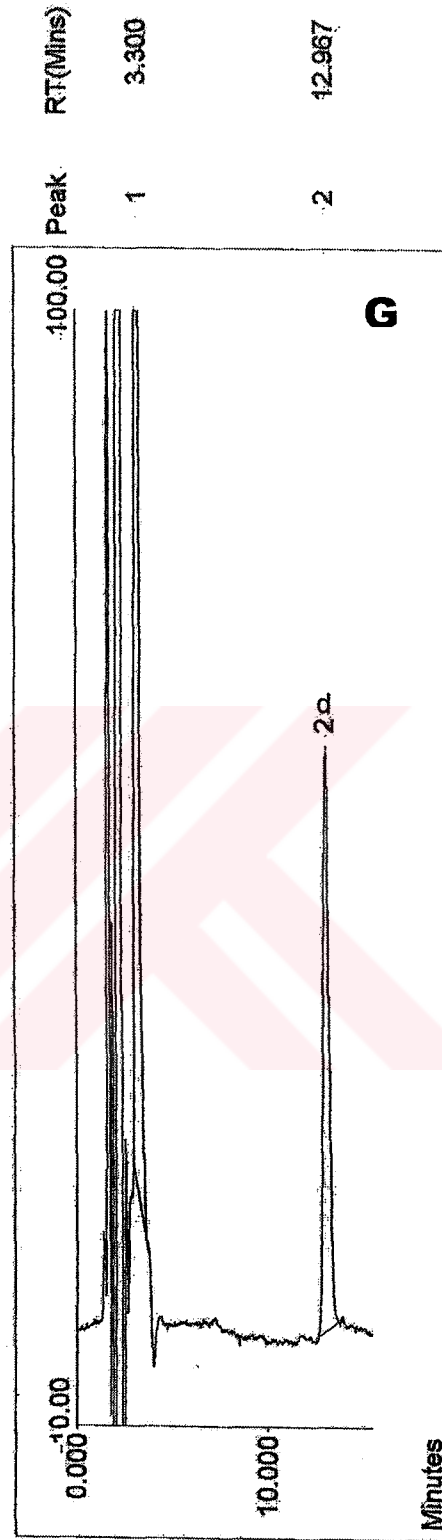
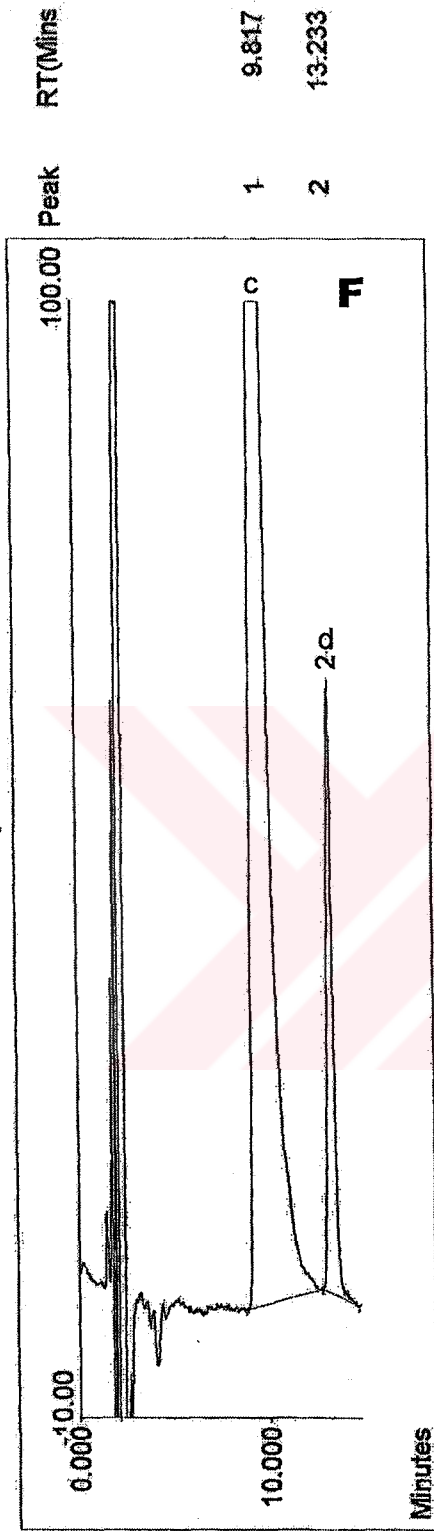
C. Nornikotin normal karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı

a=Nikotinamid, b=Norkotin, c=Nomikotin (substrat), d=Benzoilmetilamin (internal standart)



D. Nornikotinin denatüre edilmiş mikrozomal preparatlarla yapılan kontrol deneylerinden elde edilen HPLC kromatogramı

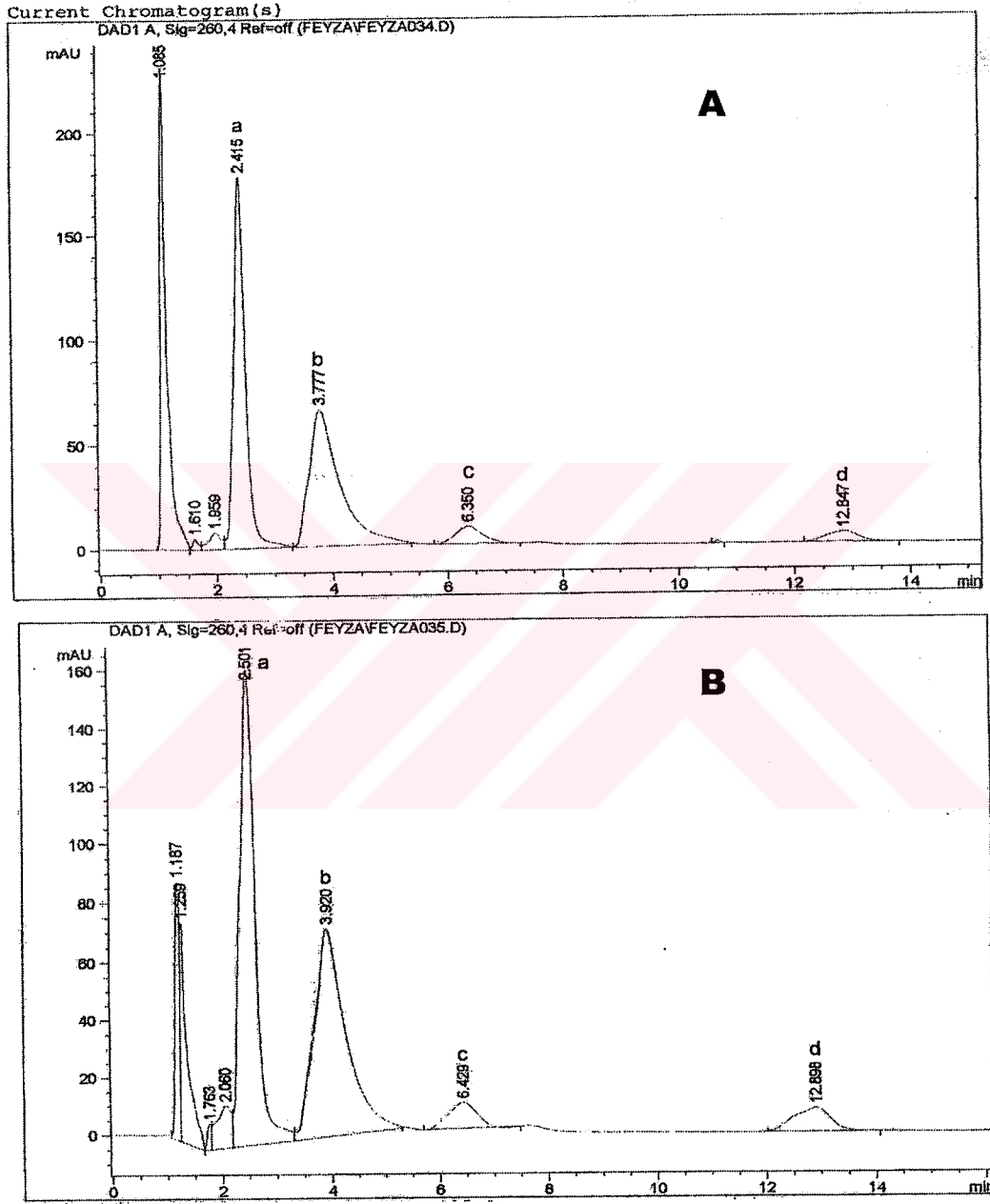
E. Kofaktörlerin ilave edilmediği mikrozomal preparatlarla yapılan kontrol deneylerinden elde edilen HPLC kromatogramı



F. Nornikotinik mikrozomal preparat ve kofaktör içermeyen ortamda yapılan kontrol deneylerinden elde edilen HPLC kromatogramı

G. İndüklenmiş mikrozom ve kofaktör ile yapılan kontrol deneylerinden elde edilen HPLC kromatogramı

Diode-array detektör bağlanarak nornikotin setine ait bileşiklerin standartlar karışımı ve metabolik ekstrelerden elde edilen örneklerin HPLC kromatogramları Şekil 18'de, bileşiklerin UV spektrumları ise Şekil 18.1-18.4'te görülmektedir.



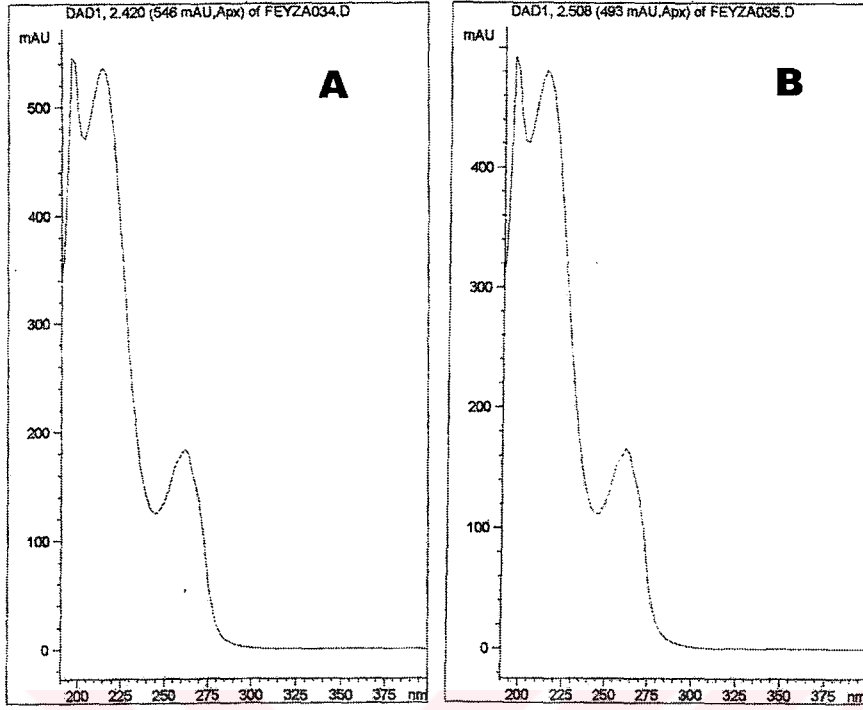
Şekil 18. Nornikotinın sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen metabolik ekstrelerin diode-array detektör bağlı HPLC sistemi ile elde edilen kromatogramları

A. Nornikotin ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

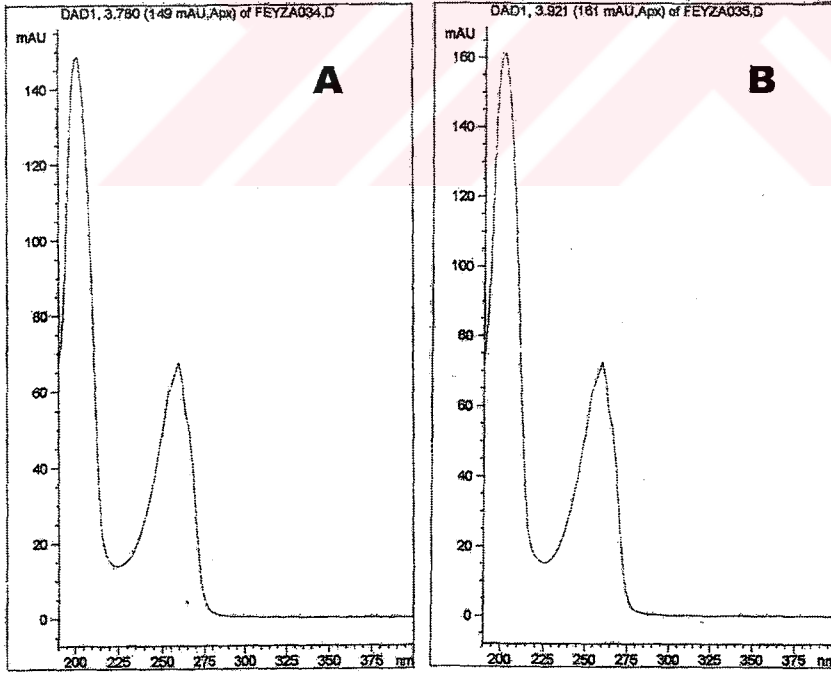
B. Nornikotin karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstradan alınan HPLC kromatogramı

a=Nikotinamid, b=Nornikotin, c=Norkotin

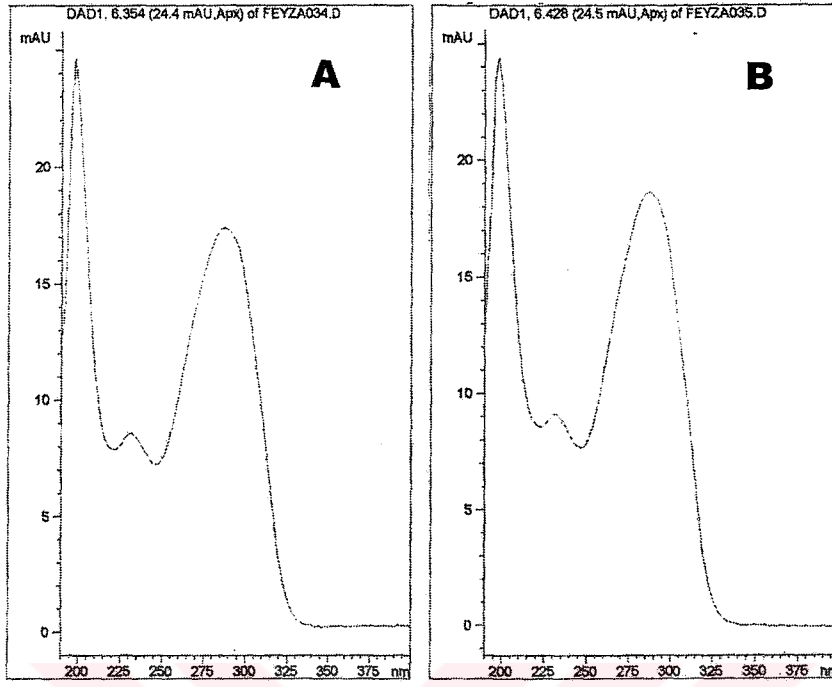
d=Benzoilmetilamin (internal standart)



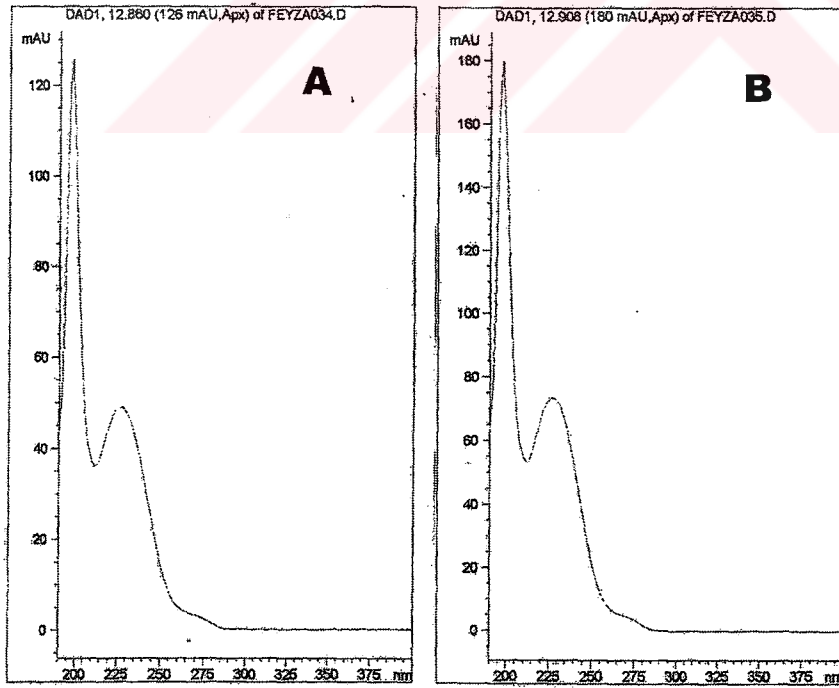
Şekil 18.1 A. Standart karışımdaki nikotinamidin UV spektrumu
B. Metabolik ekstredeki nikotinamidin UV spektrumu



Şekil 18.2 A. Standart karışımdaki normikotinin UV spektrumu
B. Metabolik ekstredeki normikotinin UV spektrumu



Şekil 18.3. A. Standart karışımındaki norkotininin UV spektrumu
B. Metabolik ekstredeki norkotininin UV spektrumu



Şekil 18.4 A. Standart karışımındaki benzoilmetilaminin UV spektrumu
B. Metabolik ekstredeki benzoilmetilaminin UV spektrumu

6.3.1.1 Mikrozomal Ekstrelerde Nornikotin ve Olası Metabolitlerinin Miktar Tayini İle İlgili Bulgular

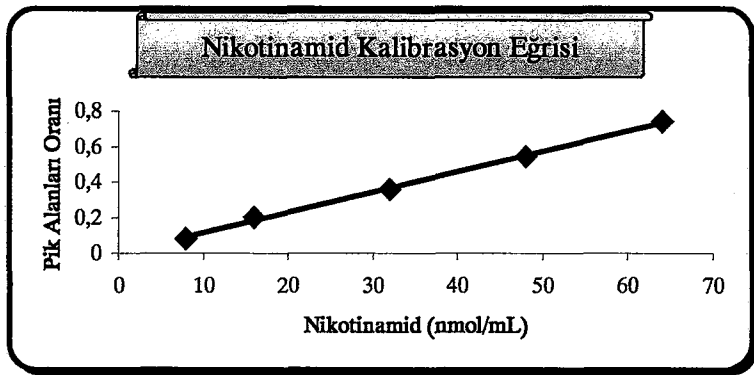
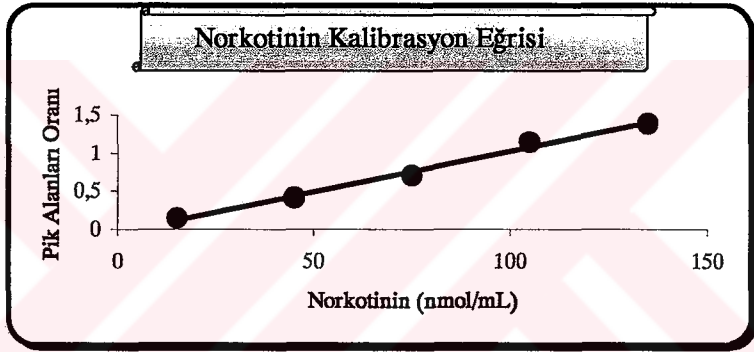
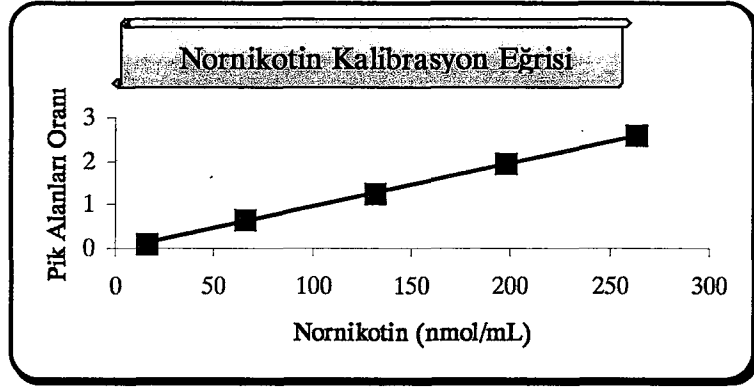
Mikrozomal inkübasyon karışımı ekstrlerinde nornikotin ve olası metabolitlerinin miktar tayini çalışması Bölüm 5.2.13'te belirtilen yöntem izlenerek yapıldı.

Aşağıdaki tabloda (Bkz. Tablo 6.6) nornikotin, norkotinin ve nikotinamidin S₂ HPLC programı ile tayin edilen linearite değerleri görülmektedir.

Tablo 6.6 Nornikotin Setine Ait Bileşiklerin Linearitesi

Bileşik	Konsantrasyon (nmol/mL)	Alan
Nornikotin	16.5	0.1144
	66	0.6510
	132	1.2320
	198	1.9380
	264	2.6038
Regresyon Analizi: $y=0.01x-0.0439$ $R^2=0.9992$		
Norkotinin	15	0.1427
	45	0.4138
	75	0.7091
	105	1.1391
	135	1.3875
Regresyon Analizi: $y=0.0107x-0.0453$ $R^2=0.9929$		
Nikotinamid	8	0.0814
	16	0.2003
	32	0.3612
	48	0.5415
	64	0.7405
Regresyon Analizi: $y=0.0115x-0.0011$ $R^2=0.9980$		

Aşağıda bu bileşiklere ait kalibrasyon eğrileri görülmektedir.



Şekil 19. Nornikotin setine ait bileşiklerin miktar tayininde kullanılan kalibrasyon eğrileri

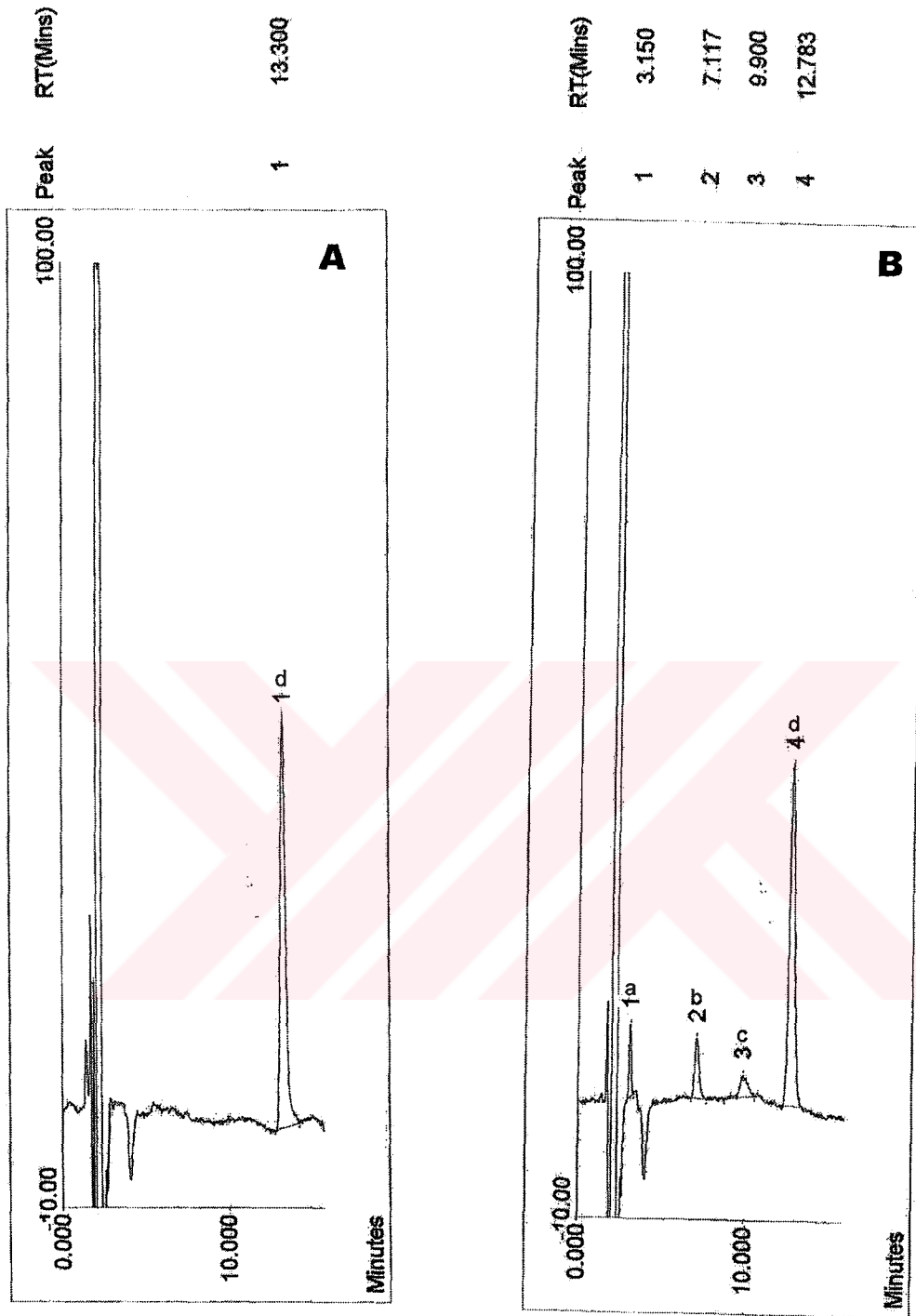
Nornikotin için 41.25, 165 ve 231 nmol/mL, norkotinin için 30, 90 ve 120 nmol/mL, nikotinamid için ise 12, 40 ve 56 nmol/mL konsantrasyonlarında olmak üzere üçer ayrı kontrol örneğinin inaktif dokuya katım yapılarak ekstre edilmesinden sonra elde edilen organik ekstrelerin farklı günlerde S₂ HPLC programı ile analizi yapılarak metodun doğruluğu araştırıldı. Aşağıdaki tabloda bu konsantrasyonlarda tayin edilen % geri kazanım değerleri verilmiştir.

Tablo 6.7 Nornikotin setine ait bileşiklerin tayininde metod performansı

Bileşik	Gerçek Konsantrasyon (nmol/mL)	DeneySEL Bulunan Konsantrasyon	Geri Kazanım (Ort. ± S.S.) (%)
Nornikotin	41.25	40.05	97±0.02
	165	161.66	98±0.08
	231	229.29	99±0.11
Norkotinin	30	29.60	99±0.02
	90	91.57	102±0.06
	120	118.52	99±0.01
Nikotinamid	12	11.30	94±0.03
	40	39.84	99±0.06
	56	53.92	96±0.01

S.S.: Standart Sapma

Nornikotin setine ait bileşiklerin inaktif inkübasyon ortamına katımından sonra elde edilen HPLC kromatogramları Şekil 20'de görülmektedir.

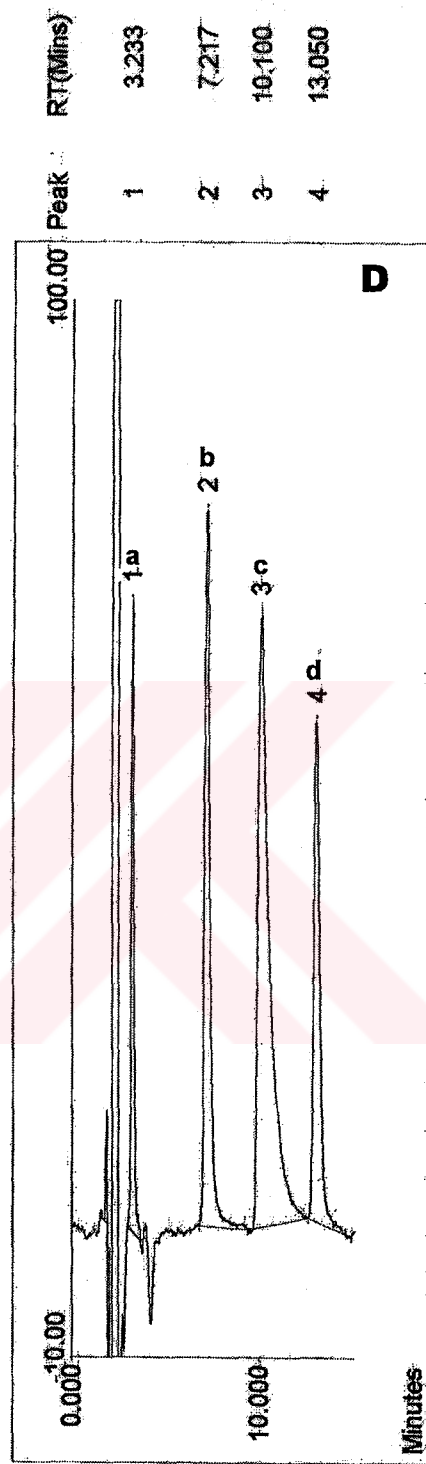
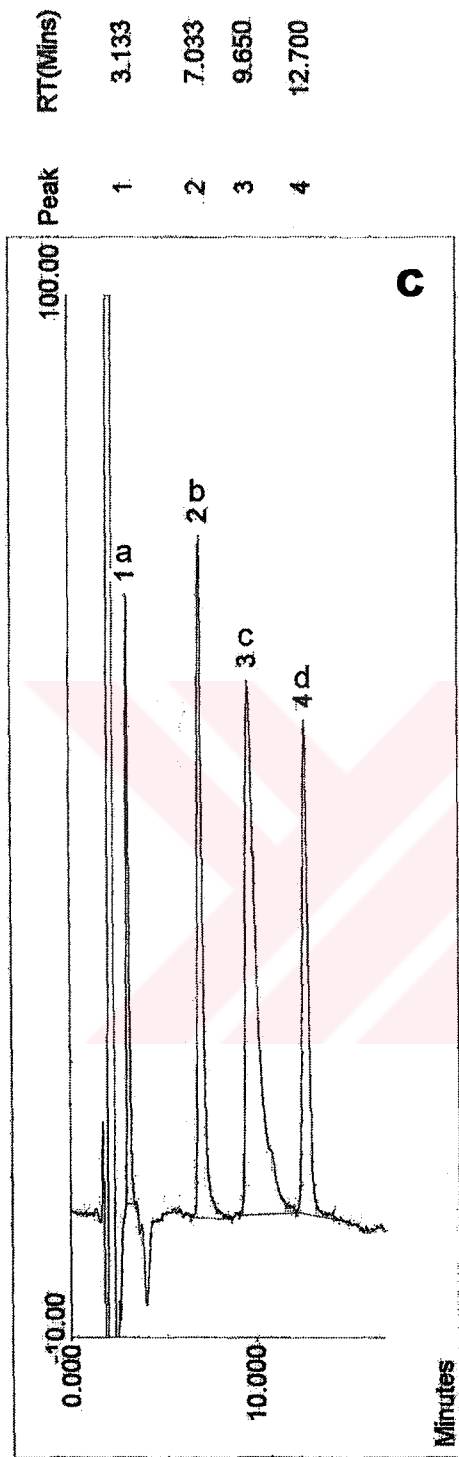


Şekil 20. Nornikotin setine ait bileşiklerin miktar tayini çalışmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. Blank

B. 8 nmol/mL Nikotinamid, 15 nmol/mL Norkotinin, 16.5 nmol/mL Nornikotin katımı ile elde edilen HPLC kromatogramı

a=Nikotinamid, b=Norkotinin, c=Nornikotin, d=Benzoilmetilamin



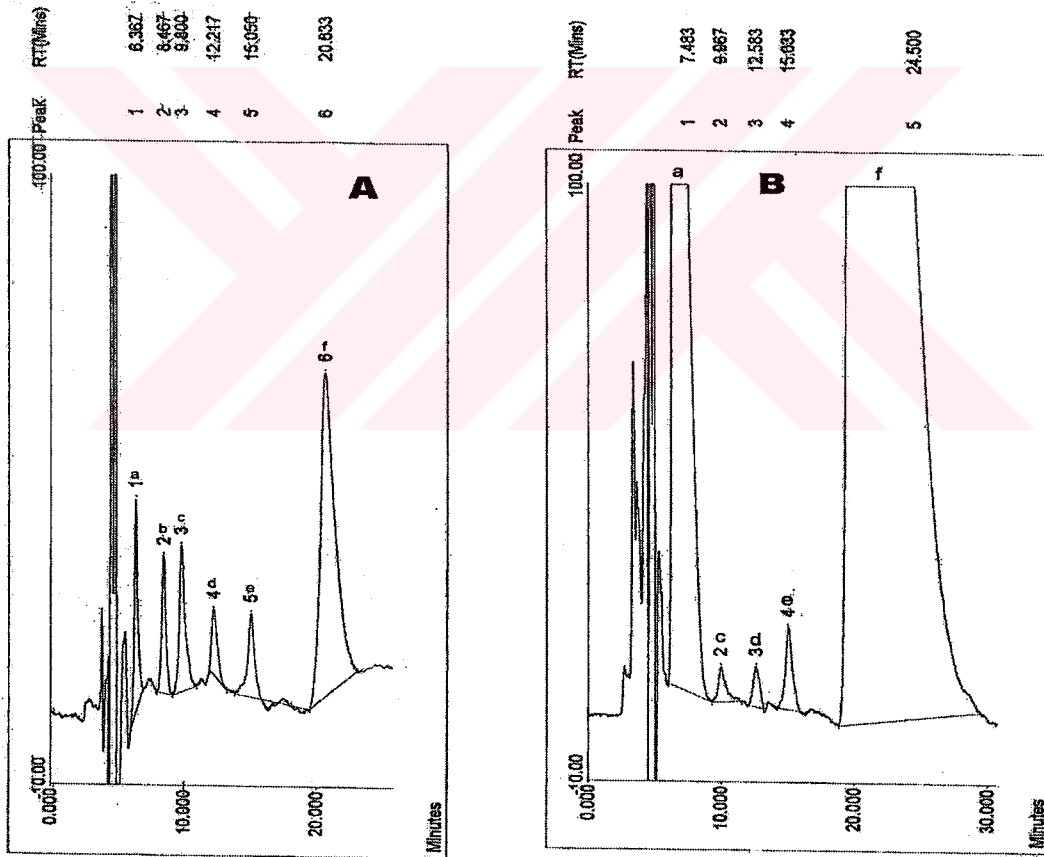
C. 48 nmol/mL Nikotinamid, 105 nmol/mL Norkotinin, 198 nmol/mL Nornikotin katımı ile elde edilen HPLC kromatogramı
D. 56 nmol/mL Nikotinamid, 120 nmol/mL Norkotinin, 231 nmol/mL Nornikotin katımı ile elde edilen HPLC kromatogramı

6.3.2 Kotininin Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları

Kotinin setine ait metabolik ekstreler, inkübasyonu takiben test ve kontrol erlenlerine 2'şer μL (14.8 nmol'e eşdeğer) benzoilmetilamin ilavesi ve ekstraksiyon sonunda organik fazın uçurulması ile (Bölüm 5.2.11) elde edildi.

Metabolik ekstrelerin HPLC analizleri 200 μL 'ye seyreltilen stok çözeltilerden 10 μL enjekte edilmesi suretiyle yapılmıştır.

Kotininin normal ve fenobarbitalle indüklenmiş sıçan karaciğeri mikrozomları ile yapılan inkübasyonu sonucu elde edilen sonuçları gösteren HPLC kromatogramları Şekil 21'de verilmiştir.



Şekil 21. Kotininin sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. Kotinin ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

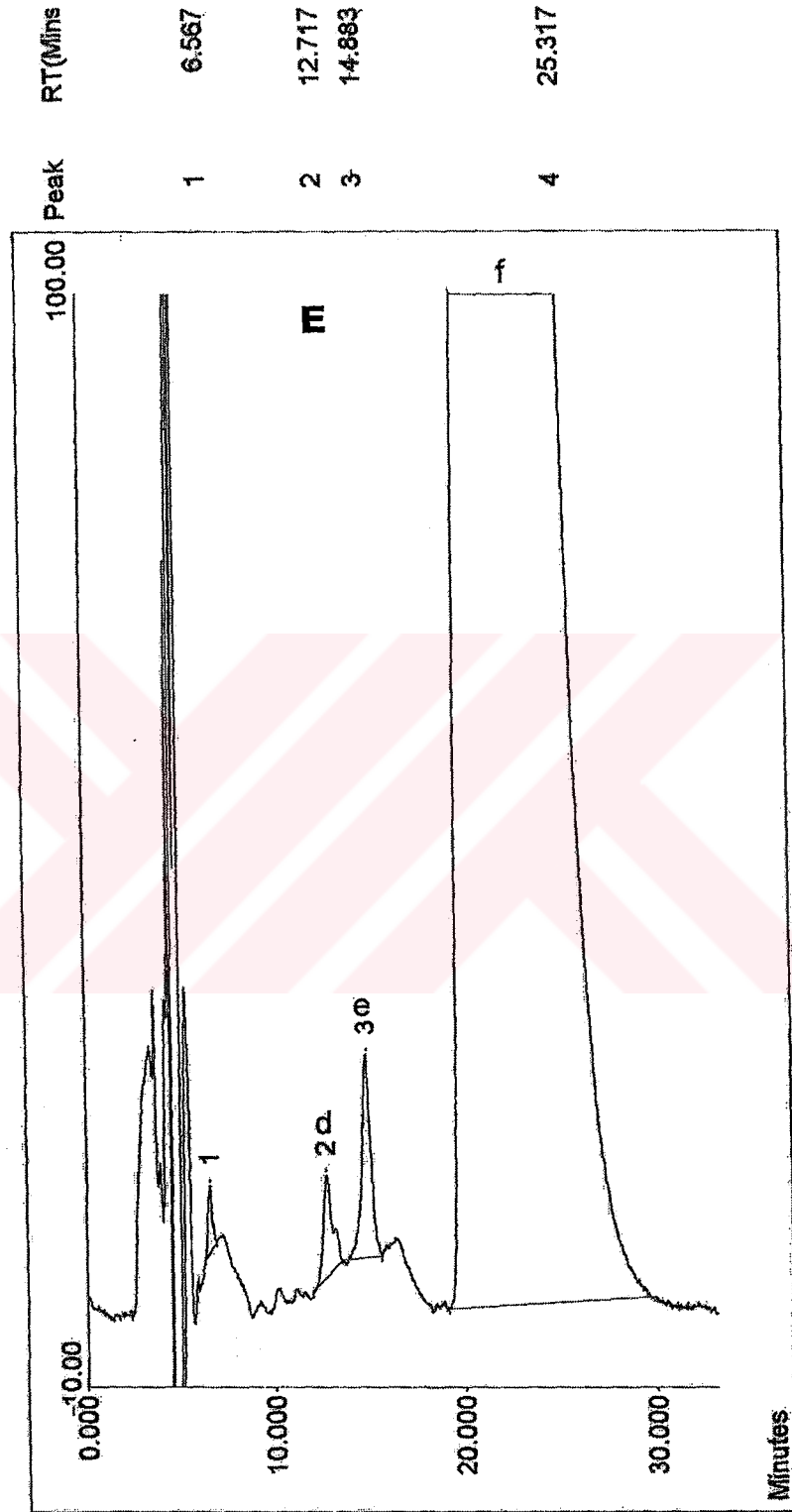
B. Kotininin fenobarbitalle indüklenmiş karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstradan alınan HPLC kromatogramı

a=Nikotinamid, b=3'-Hidroksikotinin, c=5'-Hidroksikotinin, d=Norkotinin

e=Benzoilmetilamin (internal standart), f=Kotinin perklorat (substrat)

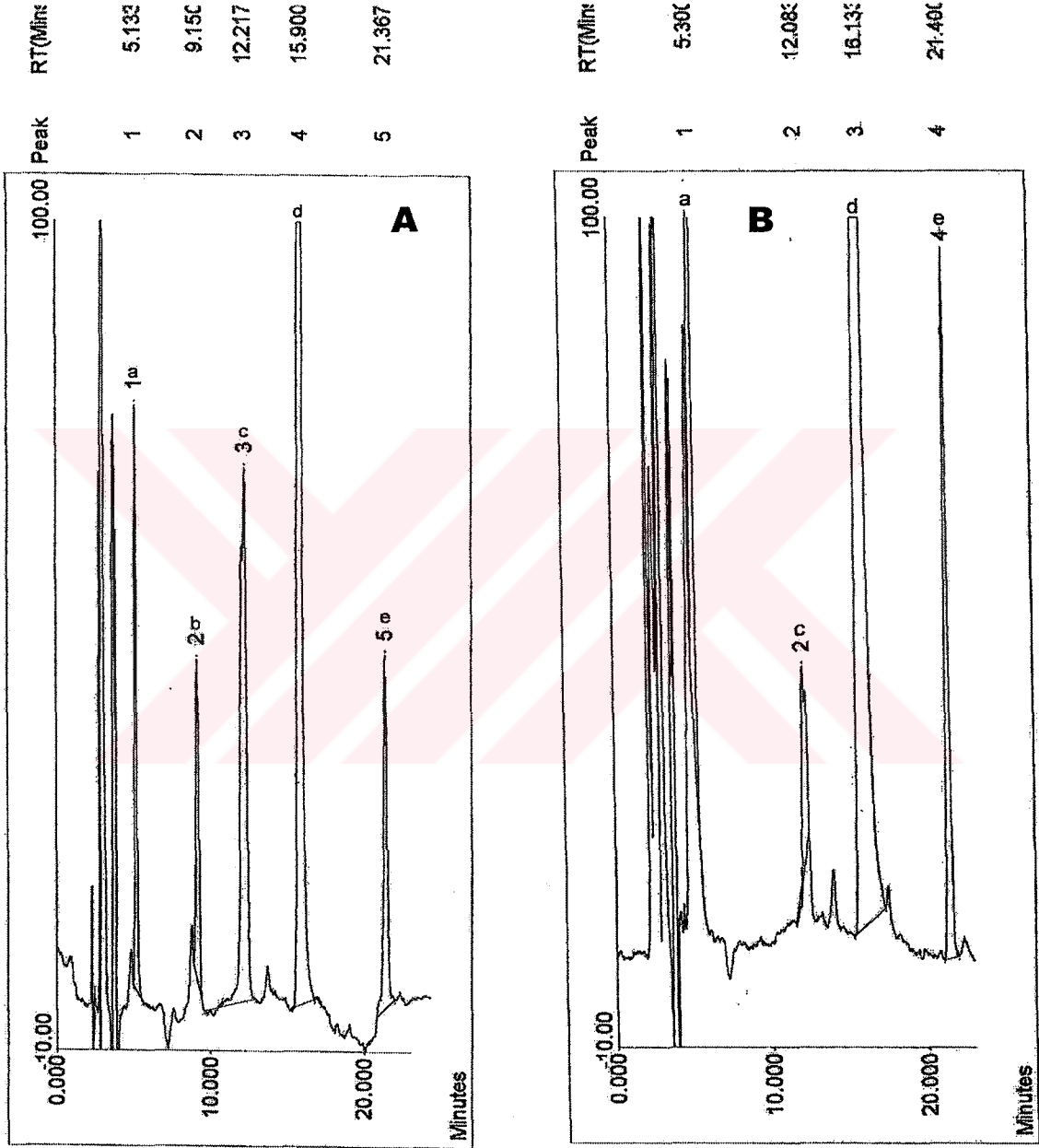


C. Kotininin normal karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı
D. Kotininin mikrozomal preparat ve kofaktör içermeyen ortamda yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı



E. Kotininin kofaktörlerin ilave edilmediği mikrozomal preparatlarla yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromotogramı

Kotininin substrat olarak kullanıldığı metabolik ekstrelerde 3'-hidroksikotinin oluşup oluşmadığının ispatı için kullanılan HPLC sistemine ait kromatogramlar Şekil 22'de görülmektedir.



Şekil 22. Kotinin metabolik ekstrelerinin B₅ HPLC programı ile elde edilen kromatogramları
A. Kotinin ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının B₅ HPLC programı ile yapılan HPLC kromatogramı
B. Kotininin fenobarbitalle indüklenmiş karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstradan alınan HPLC kromatogramı
a=Nikotinamid, b=3'-Hidroksikotinin, c=5'-Hidroksikotinin ve norkotinin
d=Kotinin (substrat), e=Benzoilmetilamin (internal standart).

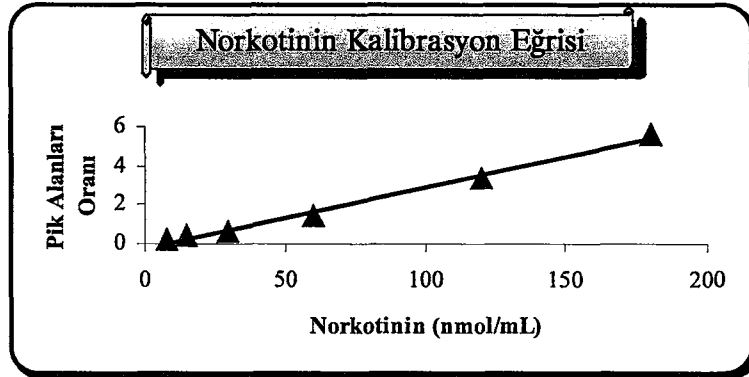
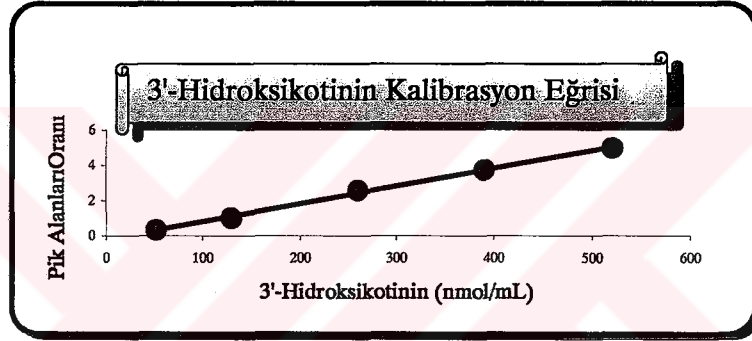
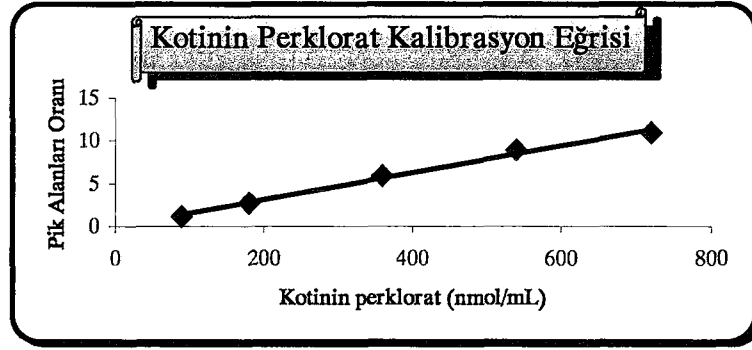
6.3.2.1 Mikrozomal Ekstrelerde Kotinin ve Olası Metabolitlerinin Miktar Tayini İle İlgili Bulgular

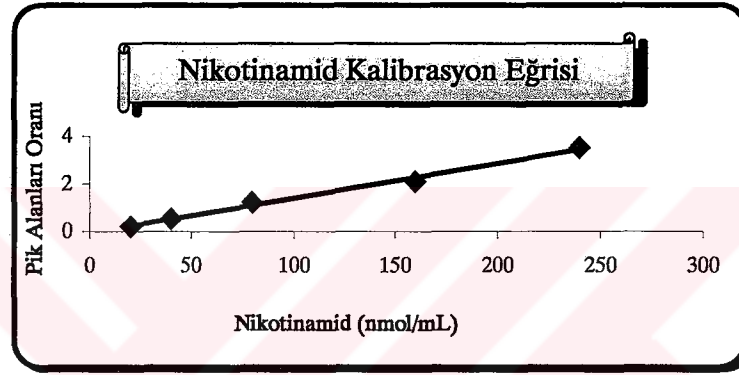
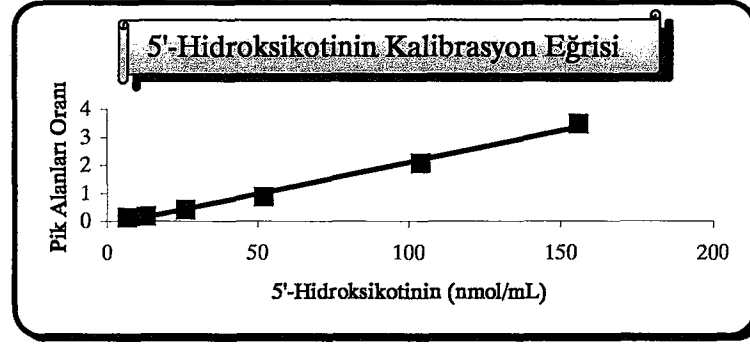
Kotinin ve olası metabolitlerinin mikrozomal inkübasyon karışımlarında miktarını tayin etmek için Bölüm 5.2.13'te belirtilen yöntem izlendi. Bu yöntem gereğince kotinin ve olası metabolitlerinin S₃ HPLC programı kullanılarak tayin edilen lineariteleri Tablo 6.8'de görülmektedir.

Tablo 6.8 Kotinin Setine Ait Bileşiklerin Lineariteleri

Bileşik	Konsantrasyon (nmol/mL)	Alan
Kotinin Perklorat	90	1.1029
	180	2.7368
	360	5.8567
	540	8.9052
	720	10.9231
Regresyon Analizi: $y=0.0159x-0.0897$		$R^2=0.9931$
3'-Hidroksikotinin	52	0.3326
	130	1.0267
	260	2.5916
	390	3.7626
	520	4.9880
Regresyon Analizi: $y=0.0101x-0.1825$		$R^2=0.9973$
Norkotinin	7.5	0.1964
	15	0.4088
	30	0.6400
	60	1.4361
	120	3.3702
	180	5.5941
Regresyon Analizi: $y=0.0312x-0.2016$		$R^2=0.9924$
5'-Hidroksikotinin	6.5	0.1381
	13	0.1814
	26	0.4132
	52	0.8671
	104	2.0792
	156	3.4785
Regresyon Analizi: $y=0.0224x-0.1445$		$R^2=0.9919$
Nikotinamid	20	0.2198
	40	0.5394
	80	1.2164
	160	2.1132
	240	3.5209
Regresyon Analizi: $y=0.0146x-0.0506$		$R^2=0.9938$

Aşağıda kotinin ve olası metabolitlerine ait kalibrasyon eğrileri görülmektedir.





Şekil 23. Kotinin setine ait bileşiklerin miktar tayininde kullanılan kalibrasyon eğrileri

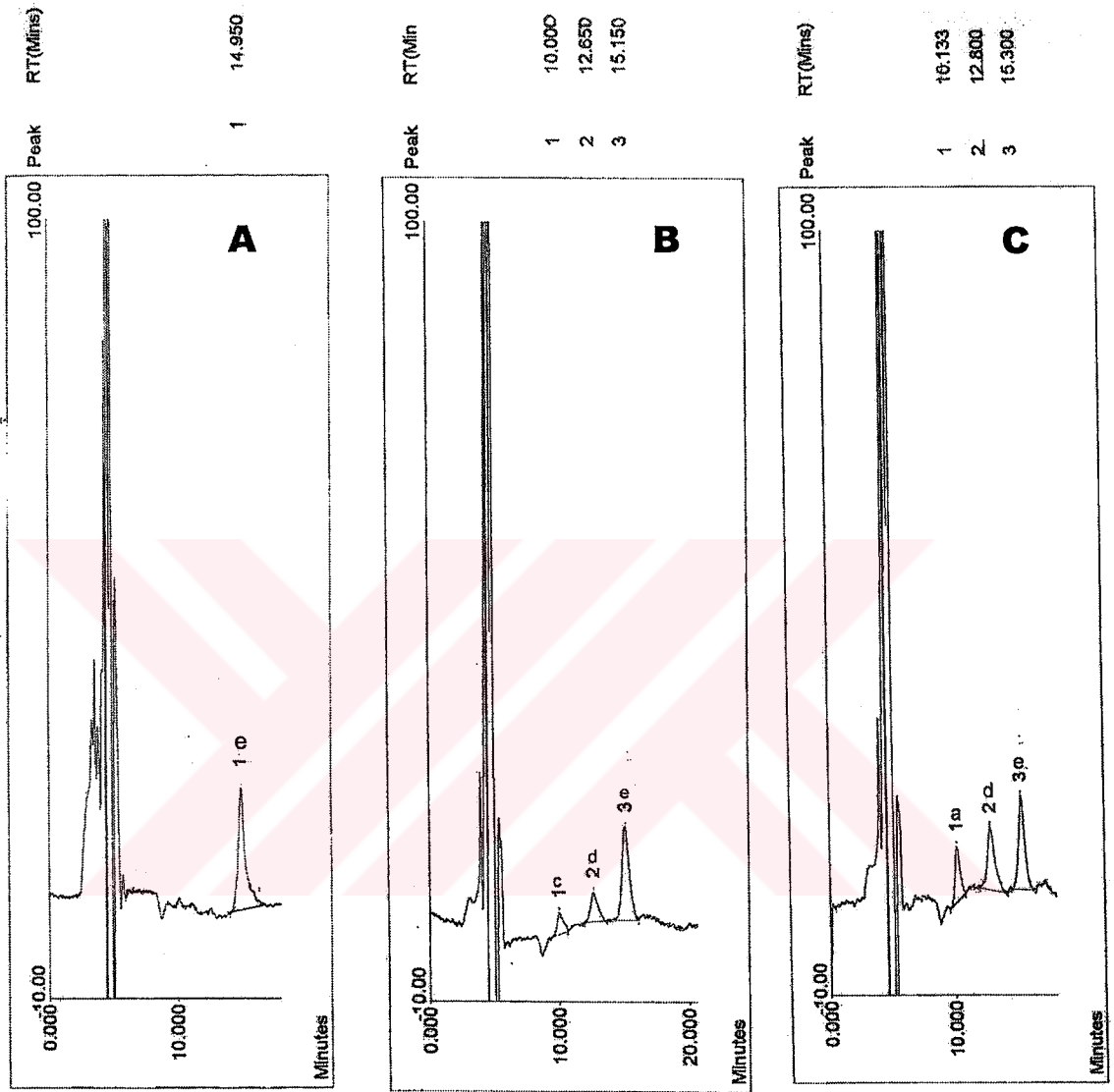
Kotinin için 135, 270 ve 450 nmol/mL, 3'-hidroksikotinin için 91, 195 ve 291 nmol/mL, norkotinin için 22.5, 45, 90 nmol/mL, 5'-hidroksikotinin için 19.5, 39, 78 nmol/mL, nikotinamid için ise 30, 60 ve 120 nmol/mL konsantrasyonlarında olmak üzere üçer ayrı kontrol örneği inaktif dokuya katım yapılması ve aynı yöntemle ekstraksiyonundan sonra elde edilen organik ekstratların farklı günlerde S₃ HPLC programı ile analizi yapılarak uygulanan metodun doğruluğu incelendi. Aşağıdaki tabloda bu konsantrasyonlarda tayin edilen % geri kazanım değerleri görülmektedir (Bkz. Tablo 6.9).

Tablo 6.9 Kotinin Setine Ait Bileşiklerin Tayininde Metod Performansı

Bileşik	Gerçek Konsantrasyon (nmol/mL)	DeneySEL Bulunan Konsantrasyon	Geri Kazanım (Ort. $\pm$ S.S.) (%)
Kotinin	135	106.82	79 $\pm$ 0.03
	270	221.67	82 $\pm$ 0.2
	450	348.11	77 $\pm$ 0.03
3'-Hidroksikotinin	91	84.64	93 $\pm$ 0.03
	195	174.43	89 $\pm$ 0.05
	325	270.04	83 $\pm$ 0.06
Norkotinin	22.5	20.11	89 $\pm$ 0.01
	45	40.89	91 $\pm$ 0.07
	90	80.04	89 $\pm$ 0.08
5'-Hidroksikotinin	19.5	19.30	99 $\pm$ 0.02
	39	38.88	99 $\pm$ 0.08
	78	69.94	90 $\pm$ 0.08
Nikotinamid	30	31.19	104 $\pm$ 0.03
	60	60.61	101 $\pm$ 0.02
	120	104.2	87 $\pm$ 0.03

S.S.: Standart Sapma

Kotinin setine ait bileşiklerin inaktif inkübasyon ortamına katımından sonra elde edilen HPLC kromatogramları Şekil 24'te görülmektedir.

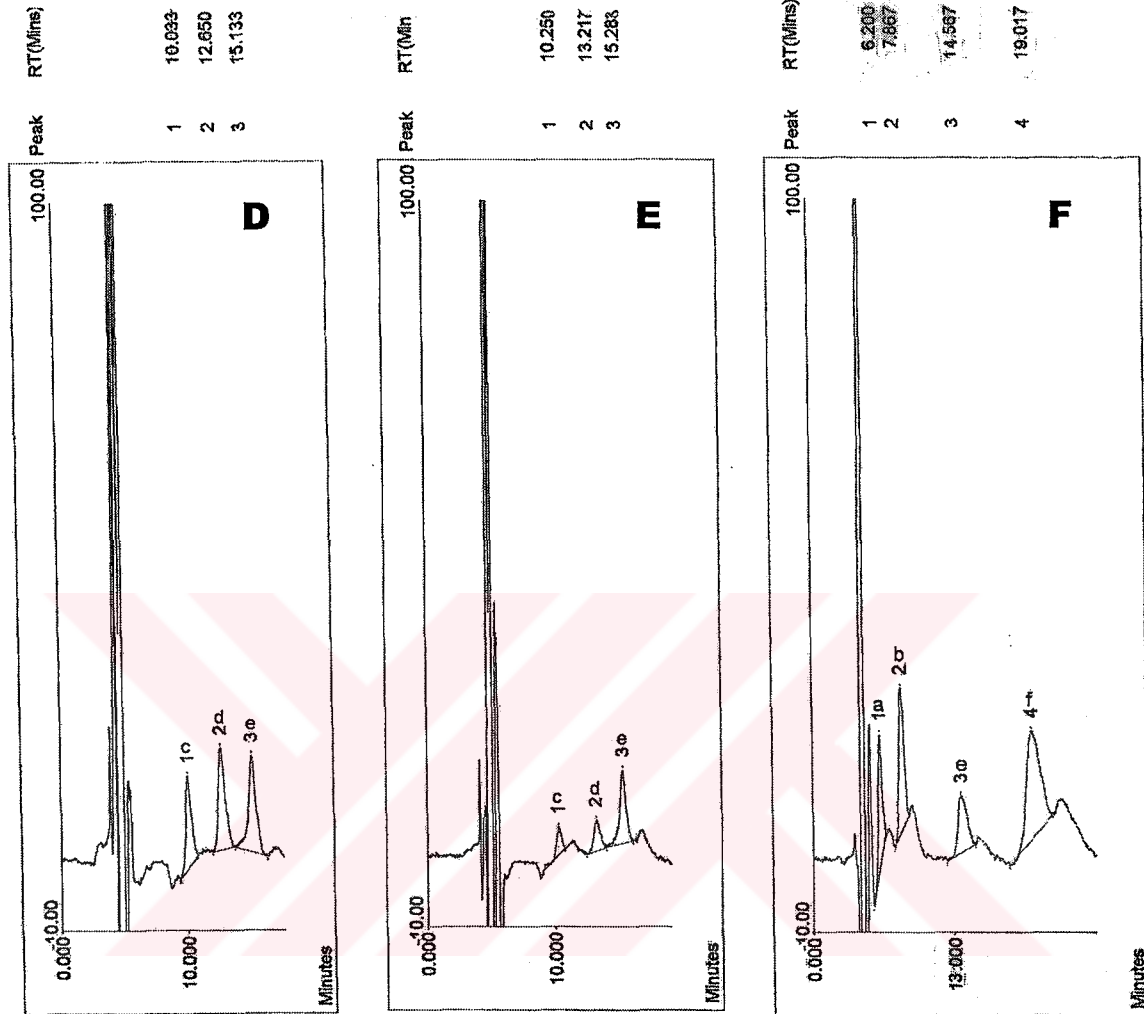


Şekil 24. Kotinin setine ait bileşiklerin miktar tayini çalışmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. Blank

B. 13 nmol/mL 5'-Hidroksikotinin ve 15 nmol/mL norkotininin katımı ile elde edilen HPLC kromatogramı

C. 26 nmol/mL 5'-Hidroksikotinin ve 30 nmol/mL norkotinin katımı ile elde edilen HPLC kromatogramı
c=5'-Hidroksikotinin, d=Norkotinin, e=Benzoilmetilamin (internal standart)



D. 52 nmol/mL 5'-Hidroksikotinin ve 60 nmol/mL norkotinin katımı ile elde edilen HPLC kromatogramı

E. 19.5 nmol/mL 5'-Hidroksikotinin ve 22.5 nmol/mL norkotinin katımı ile elde edilen HPLC kromatogramı

F. 60 nmol/mL nikotinamid, 195 nmol/mL 3'-hidroksikotinin ve 270 nmol/mL kotinin katımı ile elde edilen HPLC kromatogramı

a=Nikotinamid, b=3'-Hidroksikotinin, c=5'-Hidroksikotinin, d=Norkotinin, e=Benzoilmetilamin (internal standart), f=Kotinin perklorat (substrat)

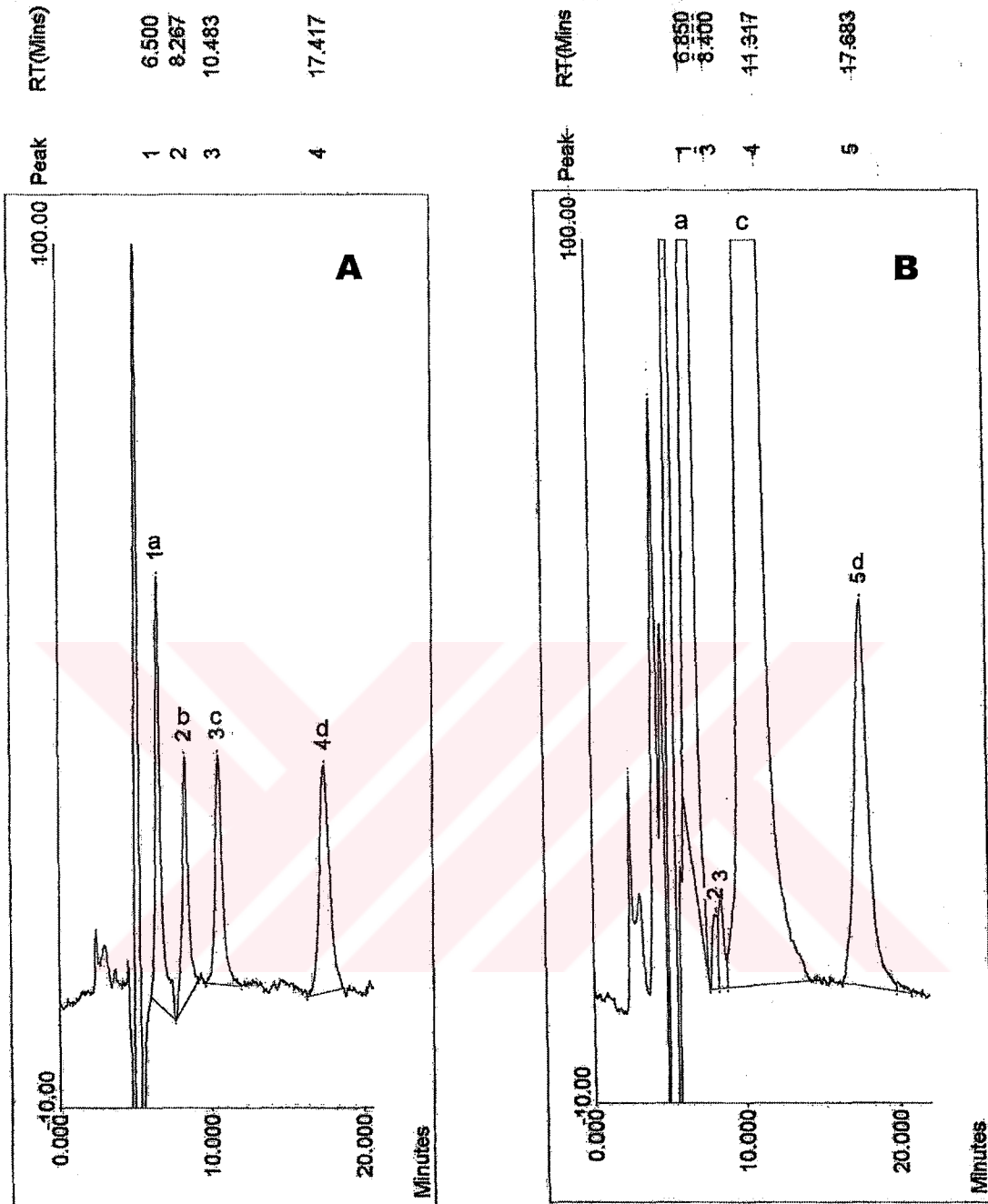
6.3.3 Norkotininin Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları

Norkotininin sıçan karaciğeri mikrozomları ile inkübasyonundan sonra beyin homojenatı ile yapılan deneylerde olduğu gibi ekstraksiyon öncesi ilgili tüm erlenlere asetanilid internal standartı 5 µL (37 nmol'e eşdeğer) eklendi.

Norkotinin metabolik ekstrelerinin HPLC analizleri 200 µL'ye metanolle yapılan seyreltmeden sonra stoktan alınan örneğin 1:1 oranda tekrar seyreltilmesi ve bu son çözeltiden 15 µL enjekte edilmesi ile yapılmıştır.

Norkotinin setine ait metabolik ekstrelerin kromatogramları Şekil 25'te görülmektedir.





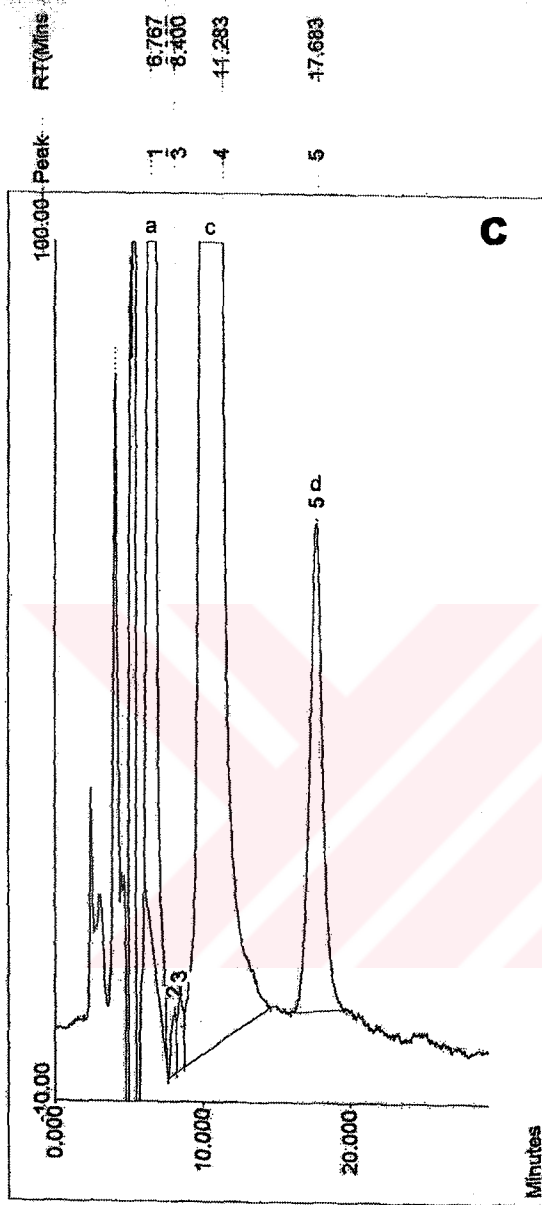
Şekil 25. Norkotininin sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. Norkotinin ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

B. Norkotininin fenobarbitalle indüklenmiş karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstradan alınan HPLC kromatogramı

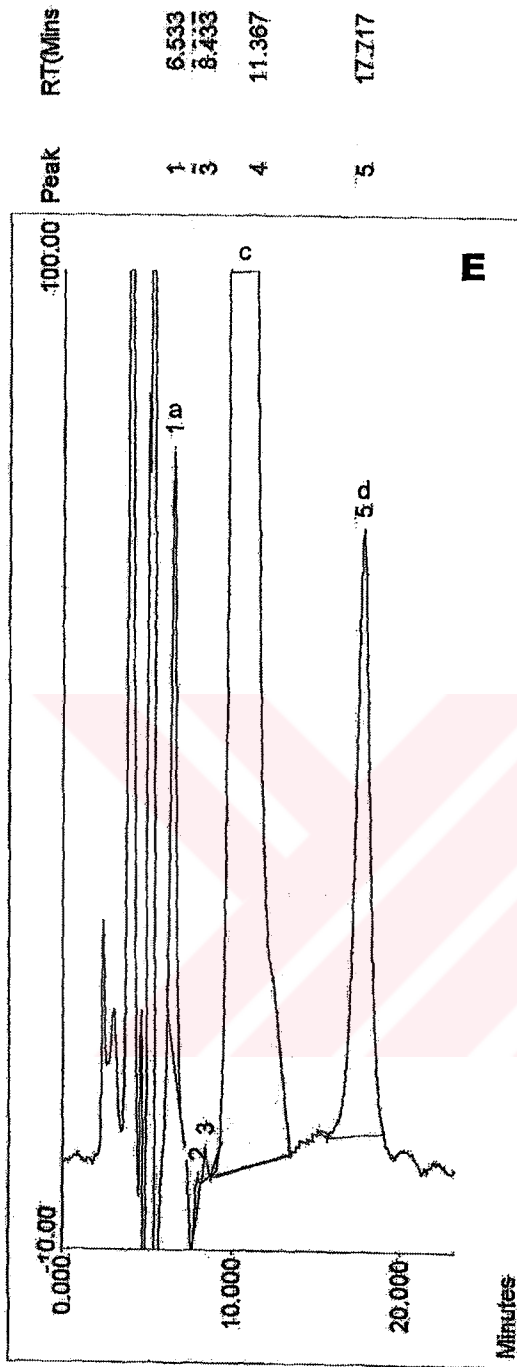
a=Nikotinamid, b=4-(3-Piridil)-4-oksobutiramid, c=Norkotinin (substrat)

d=Asetanilid (internal standart)



C. Norkotininin normal karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı

D. Denatüre edilmiş mikrozomal preparatlarla yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı



E. Norkotininin kofaktörlerin ilave edilmediği mikrozomal preparatlarla yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı

F. İndüklenmiş mikrozom ve kofaktör ile yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı

6.4 Sentezlenen Substratların Karaciğer Mikrozoamları İle Yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Bulgular

Tezimizin konularından biri olan nornikotin türevi substratların metabolizması için Tablo 5.8’de verilen inkübasyon protokolü kullanıldı.

N-1’-Benzilnornikotin (I), N-1’-(p-klorobenzil) nornikotin (II), N-1’-benzoilnornikotin (Ia) ve N-1’-(p-klorobenzoil) nornikotin ve olası metabolitlerinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografa enjeksiyonunu takiben elde edilen tutulma zamanlarını gösteren tablo aşağıda görülmektedir (Bkz. Tablo 6.10).

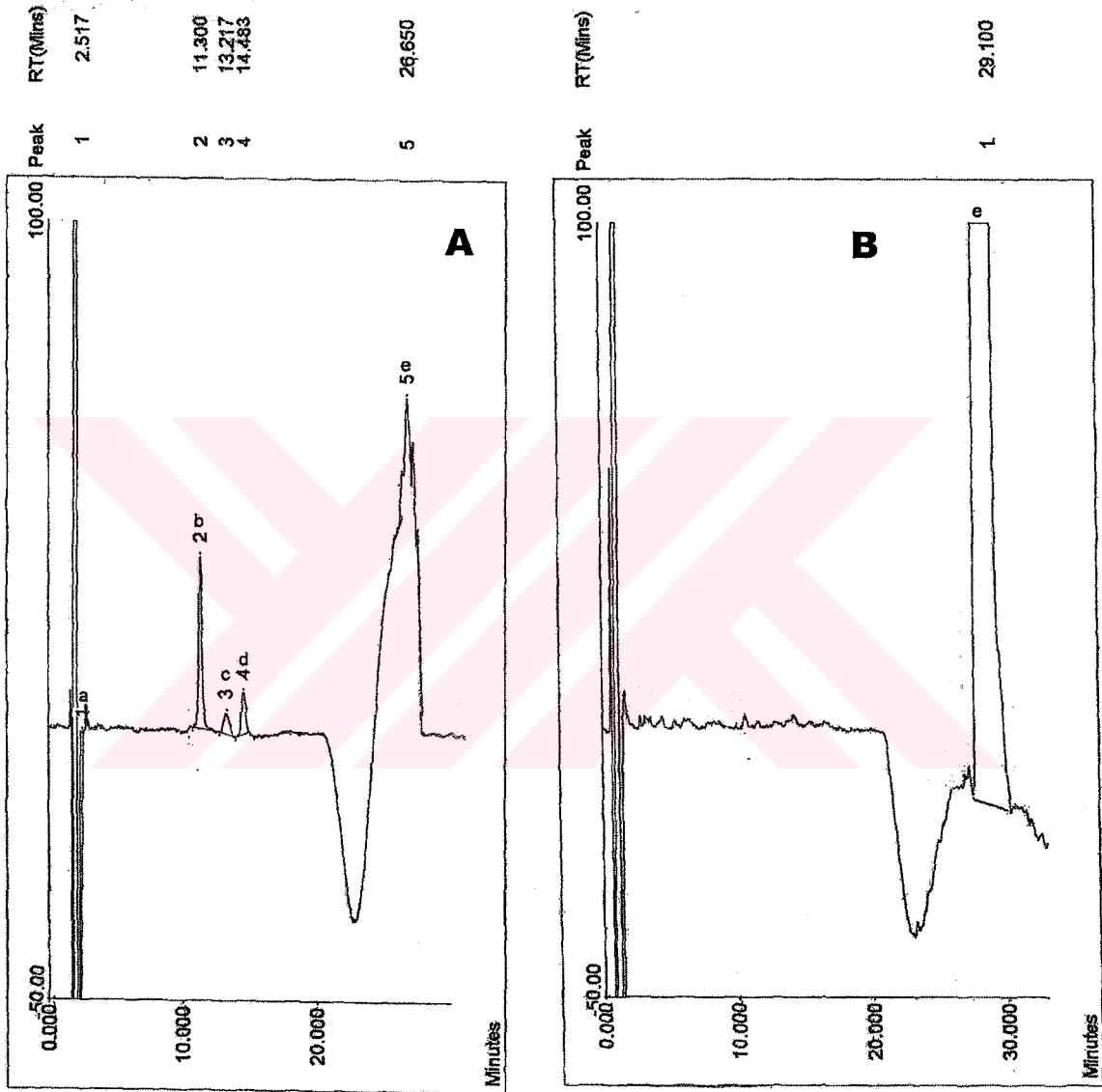
Tablo 6.10 Bileşik I; II; Ia; IIa ve olası metabolitlerinin S₄, S₅, S₆ ve S₇ HPLC programlarında elde edilen tutulma zamanları

Bileşik	Tutulma Zamanı (dak.)			
	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇
N-1’-Benzilnornikotin (I)	26.25	-	-	-
N-1’-Benzoilnornikotin (I a)	13.22	-	-	-
N-1’-Benzilnorkotin (I b)	14.48	-	-	-
Nornikotin	2.52	-	-	-
Benzaldehit	11.30	-	-	-
N-1’-(p-Klorobenzil)nornikotin (II)	-	33.95	-	-
N-1’-(p-Klorobenzoil)nornikotin (II a)	-	10.12	-	-
N-1’-(p-Klorobenzil)norkotin (II b)	-	12.57	-	-
Nornikotin	-	3.15	-	-
p-Klorobenzaldehit	-	26.78	-	-
N-1’-Benzoilnornikotin (I a)	-	-	13.20	-
Nornikotin	-	-	5.72	-
N-1’-(p-Klorobenzoil)nornikotin (II a)	-	-	-	9.02
Nornikotin	-	-	-	5.75

6.4.1 N-1’- Benzilnornikotin (I) ve N-1’-(p-klorobenzil) nornikotin (II)’in Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları

Tersiyer amin yapısındaki sentez bileşikleri olan I ve II’nin sıçan karaciğeri mikrozoamları ile inkübasyonunu takiben ekstraksiyonları Bölüm 5.2.11’de anlatıldığı şekilde yapıldı.

I ve II'nin metabolik ekstraları HPLC analizinden önce 200 µL'ye metanolle seyreltildi. I'e yani N-1'-benzilnornikotine ait metabolik ekstre stoklarından 10'ar µL alınması ve S₄ HPLC sistemine enjekte edilmesinden sonra örneklerin kromatografik analiz sonuçları Şekil 26'da görülmektedir.

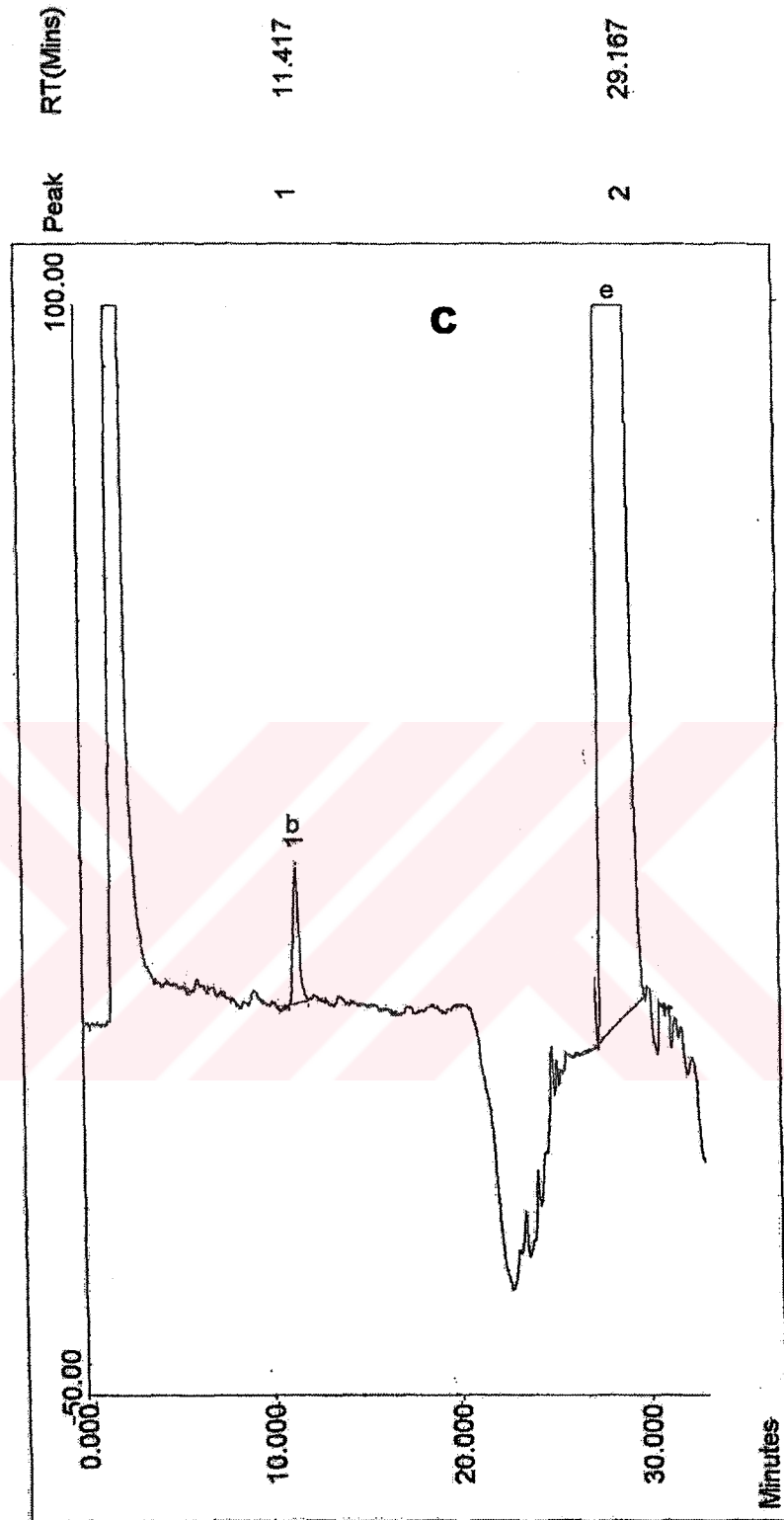


Şekil 26. N-1'-benzilnornikotin (I) sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. N-1'-benzilnornikotin (I) ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

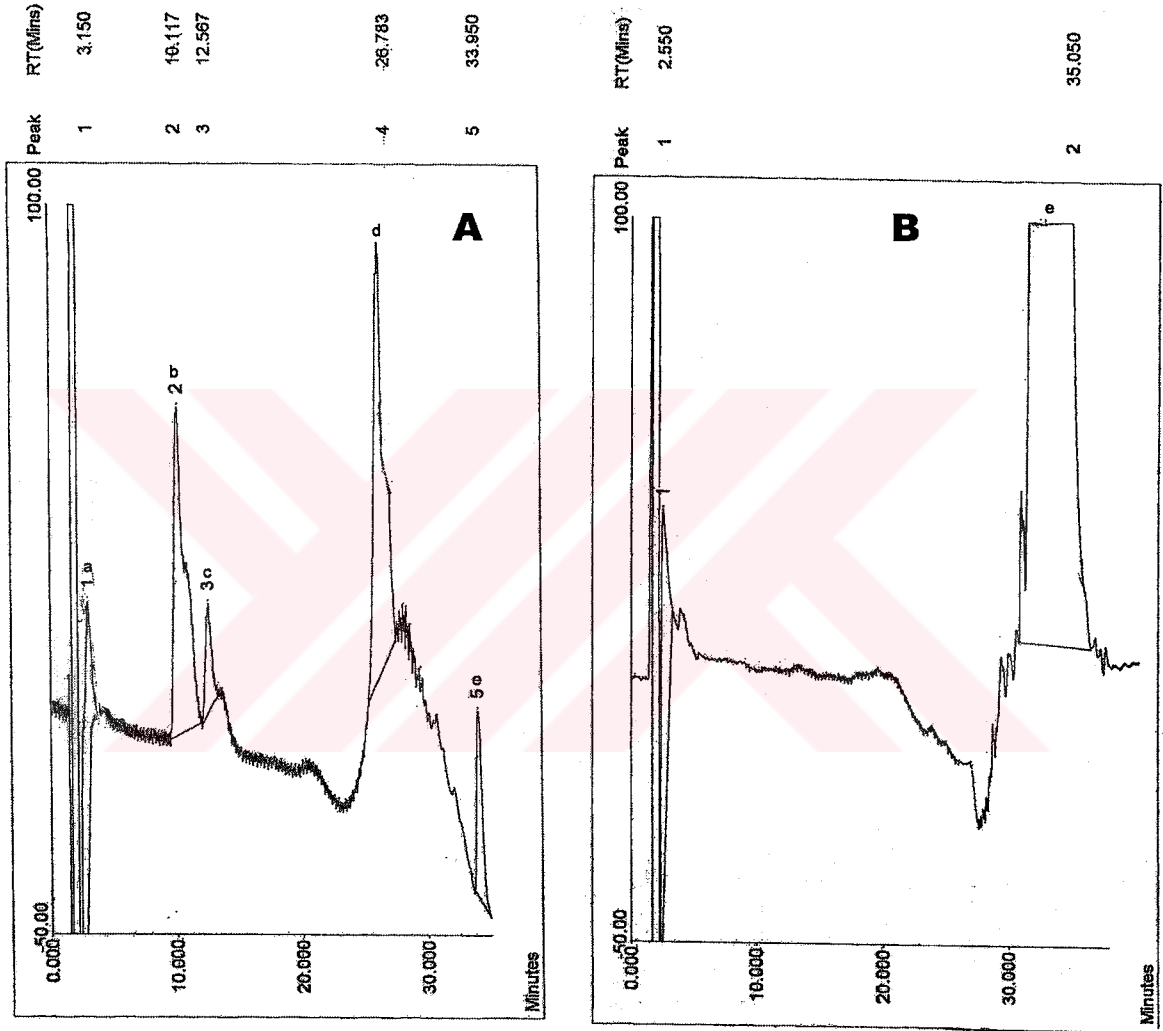
B. (I)'in kofaktörlerin ilave edilmediği mikrozomal preparatlarla yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı

a= Nornikotin, b= Benzaldehit, c= N-1'-benzoilnornikotin (Ia), d= N-1'-benzilnorkotin (Ib) e= N-1'-benzilnornikotin (I) (substrat)



C. N-1'-benzylornikotin (I)'in karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı

Sentezlenen II numaralı bileşik olan N-1'-(p-klorobenzil) normikotin metabolik ekstralarının de 200 µL metanolde çözülüp stoklardan 15'er µL alınması ve S₅ HPLC sistemine enjekte edilmesinden sonra örneklerin kromatografik analiz sonuçları Şekil 27'de verilmiştir.

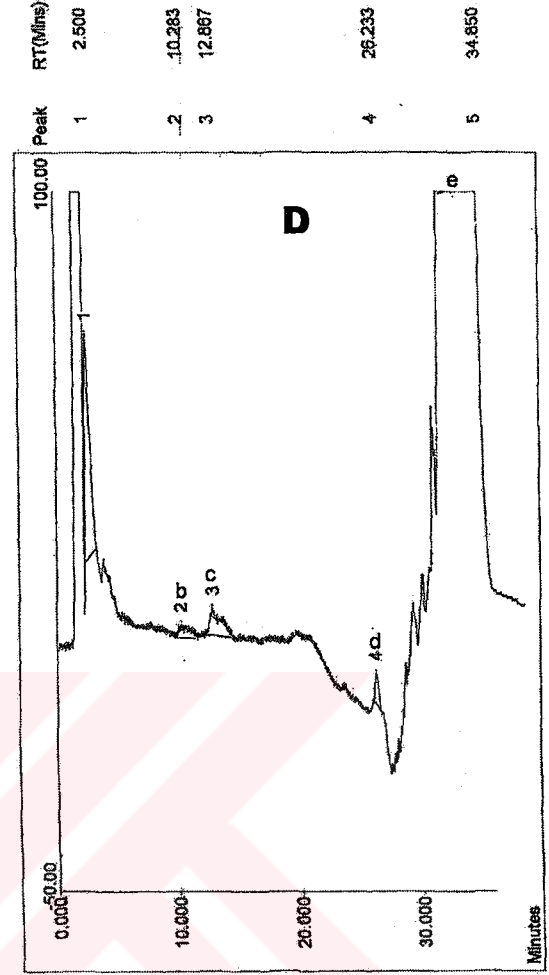
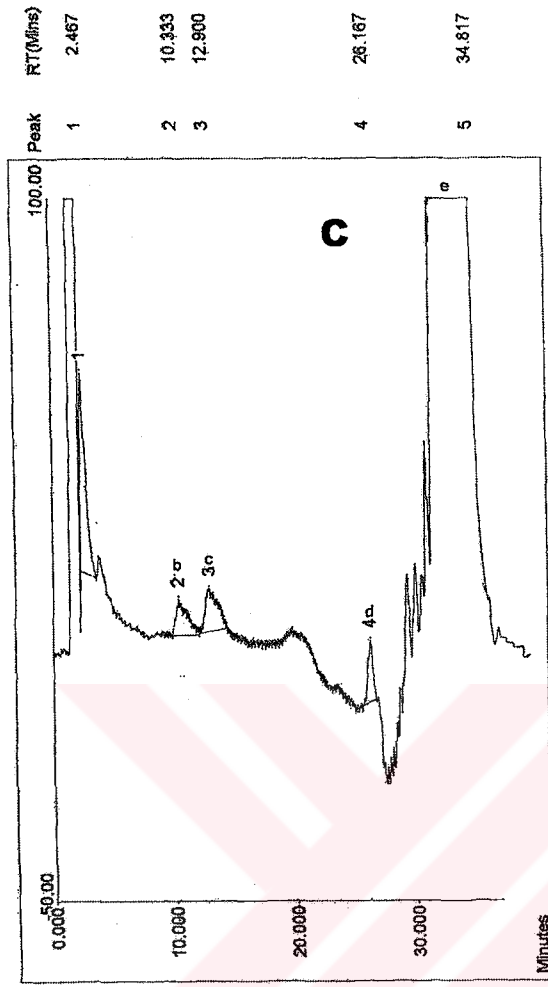


Şekil 27. N-1'-(p-klorobenzil) normikotin (II) sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. N-1'-(p-klorobenzil) normikotin (II) ve olası metabolitlerine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

B. (II)'nin denatüre edilmiş mikrozomal preparatlarla yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı

a= Normikotin, b= N-1'-(p-klorobenzoil) normikotin (IIa), c= N-1'-(p-klorobenzil) norkotin (IIb), d= p-Klorobenzaldehit, e= N-1'-(p-klorobenzil) normikotin (II) (substrat)



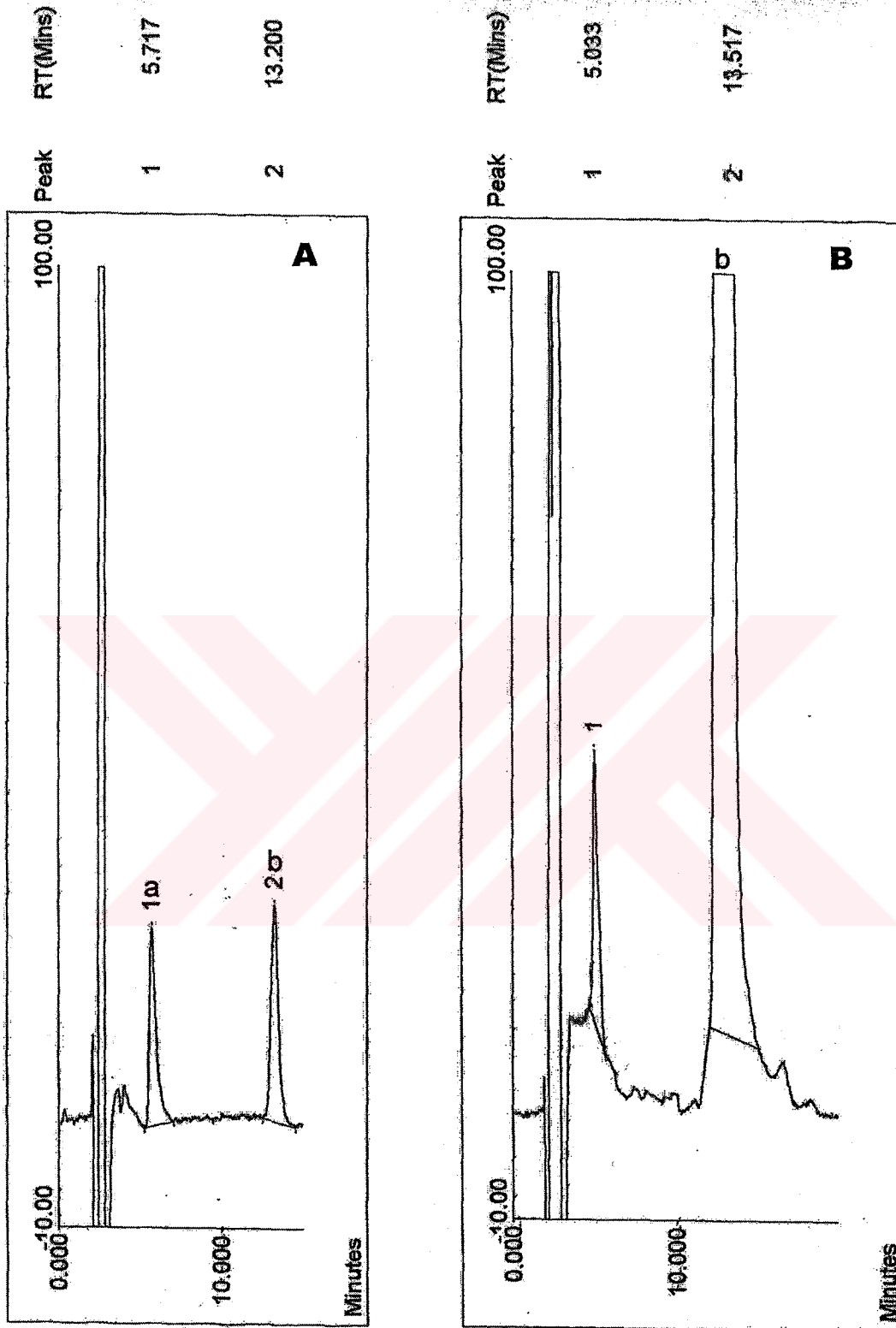
C. N-1'-(p-klorobenzil) normikotin (II)'in fenobarbitalle indüklenmiş karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı
D. (II)'nin normal karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı

6.4.2 N-1'-Benzoilnornikotin (Ia) ve N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (IIa)'in Metabolizması İle İlgili HPLC Bulguları

Tezimizin konuları arasında yer alan sentezlediğimiz bileşiklerden N-1'-benzoilnornikotin (Ia) ve N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (IIa)'in metabolizması da sıçan karaciğer mikrozomları ile çalışılmış olup, diklorometan ile ekstraksiyonları yapılmıştır (Bölüm 5.2.11).

Ia'ya ait metabolik ekstrelerin metanolle 200 µL'ye seyreltilmesi ve bu stoklardan 15'er µL alınarak S₆ HPLC sistemine enjekte edilmesinin ardından elde edilen kromatogramlar Şekil 28'de görülmektedir.



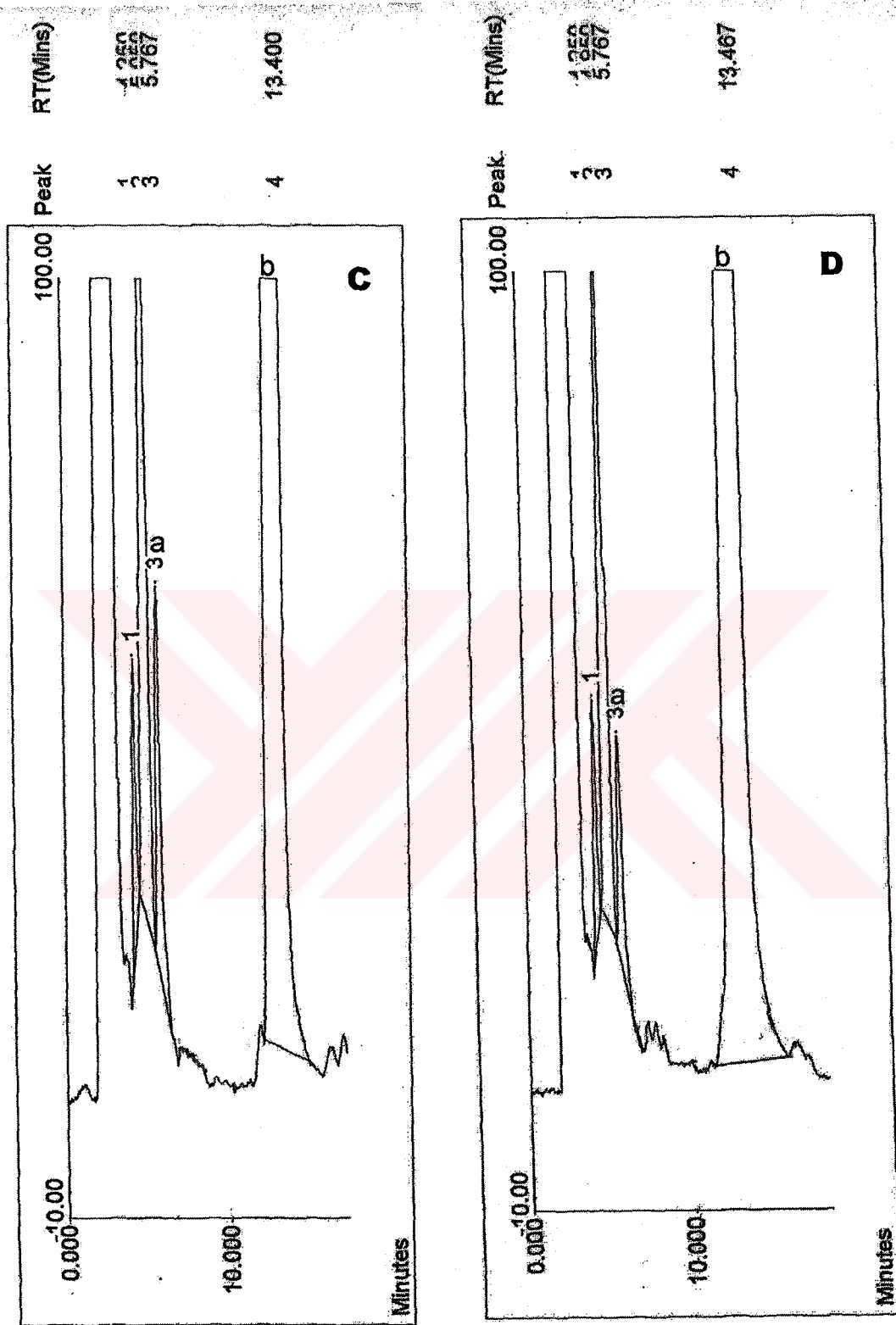


Şekil 28. N-1'-Benzoilnornikotin (Ia) sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. N-1'-Benzoilnornikotin (Ia) ve olası metabolitine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

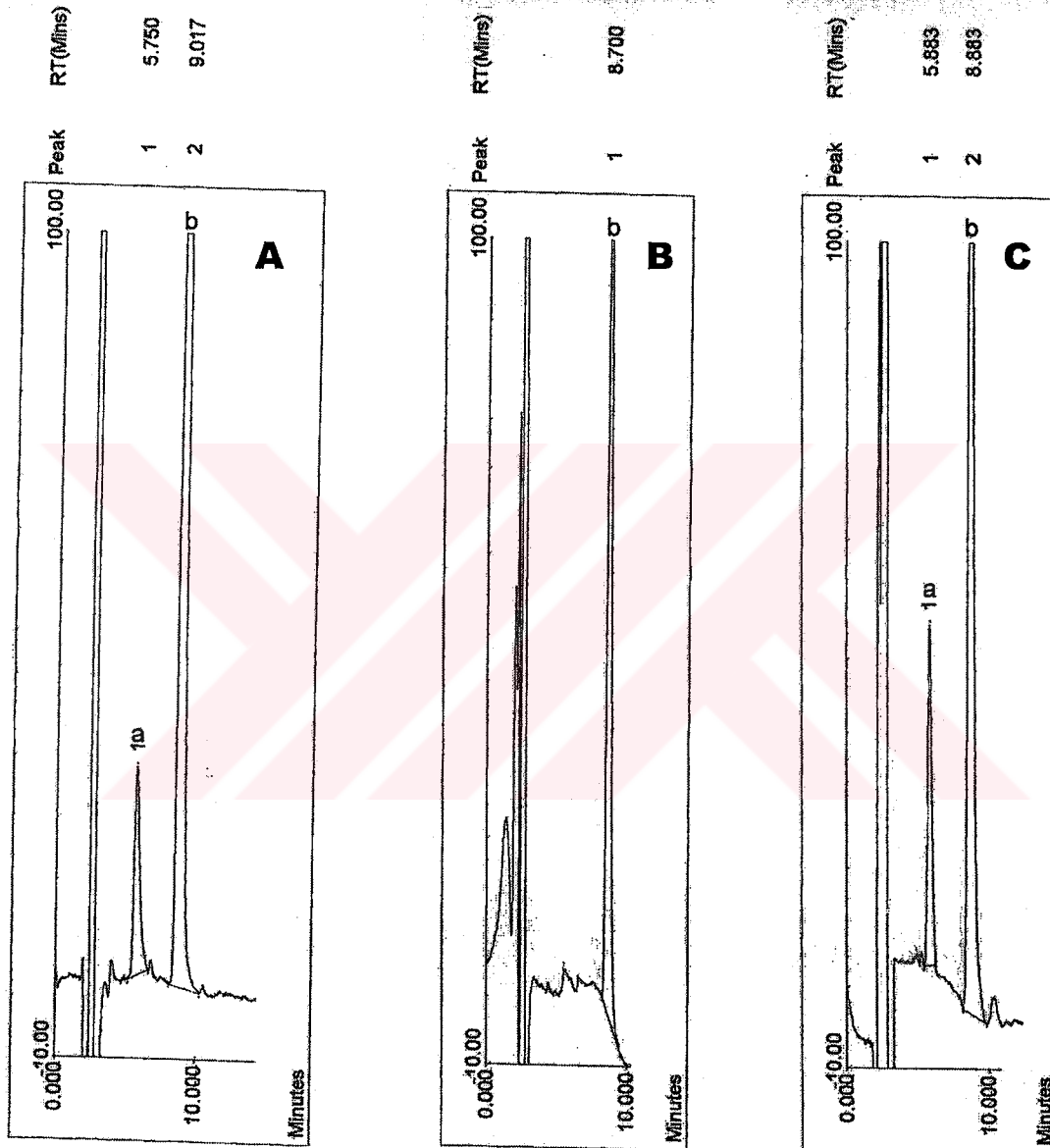
B. (Ia)'nın kofaktörlerin ilave edilmediği mikrozomal preparatlarla yapılan kontrol denemelerinden elde edilen HPLC kromatogramı

a= Nornikotin, b= N-1'-benzoilnornikotin (Ia) (substrat)



C. N-1'-benzoilnornikotin (Ia)'in fenobarbitalle indüklenmiş karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı
D. (Ia)'nın normal karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı

Metabolizması araştırılan amid yapıdaki substratların ikincisi olan N-1'-(p-klorobenzoil) normikotin (IIa)'e ait metabolik ekstrelerin 200 µL metanolde seyreltilmiş stoklarından 10 µL alınarak S₇ HPLC sistemine enjekte edilmesinden sonra elde edilen kromatogramlar Şekil 29'da verilmiştir.



Şekil 29. N-1'-(p-klorobenzoil) normikotin (IIa) sıçan karaciğeri mikrozomları ile metabolizmasından elde edilen HPLC kromatogramları

A. N-1'-(p-klorobenzoil) normikotin (IIa) ve olası metabolitine ait standartlar karışımının HPLC kromatogramı

B. (IIa)'nın kofaktörlerin ilave edilmediği mikrozomal preparatlarla yapılan kontrol deneylerinden elde edilen HPLC kromatogramı

C. (IIa)'nın fenobarbitalle indüklenmiş karaciğer mikrozomları ile *in vitro* metabolizması sonrasında elde edilen metabolik ekstreden alınan HPLC kromatogramı

a= Normikotin, b= N-1'-(p-klorobenzoil) normikotin (IIa) (substrat)

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

7.1 Araştırmamızda Kullanılan Substratlar ve Olası Metabolitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Nornikotin analogları olan substratlar ve olası metabolitleri olan laktamların elde edilmesinde genellikle literatür yöntemleri kullanılmakla birlikte bazı durumlarda bu yöntemlerde küçük modifikasyonlar da yapıldı.

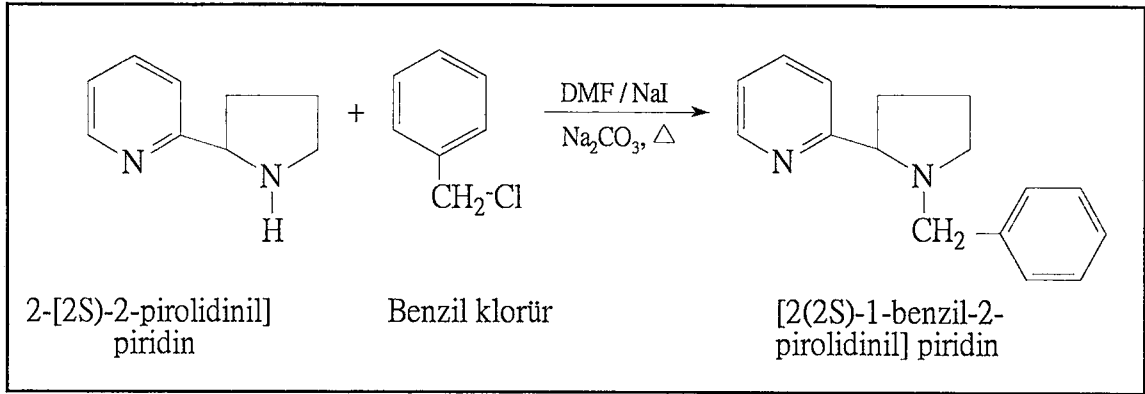
7.1.1 Tersiyer Aminler

Sekonder aminlerin alkil halojenürlerle baz katalizörlüğünde reaksiyona sokulması, tersiyer aminlerin sentezinde çok sıklıkla kullanılmakta olan bir yöntemdir (33).

Tersiyer aminlerin sentezinde ortama sekonder amin ve benzil klorüre eş mol sayıda sodyum iyodür eklenmiştir. Bundan amaç, daha önceki çalışmalardan da bilindiği üzere (51) benzil klorürün sodyum iyodür ile reaksiyona girmesiyle benzil klorürden daha reaktif olan benzil iyodürün ortamda oluşturulması ve bu şekilde reaksiyonun hızının artırılması idi.

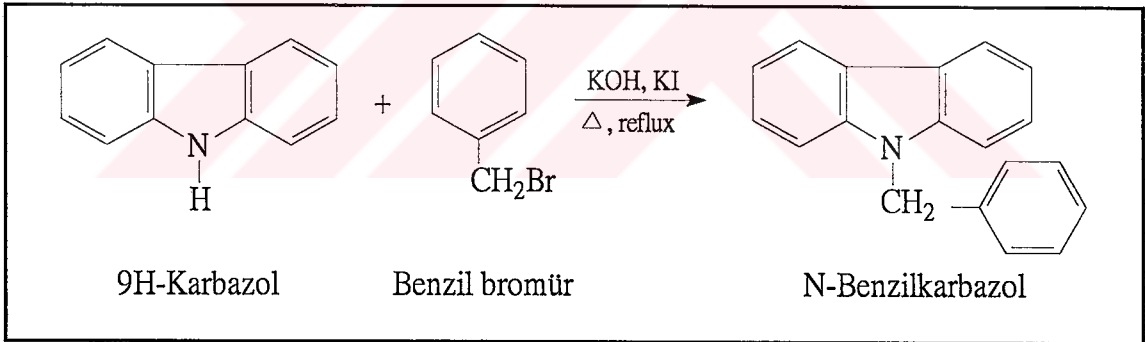
Sıcaklığın 90-100°C dolayında sabit tutulması ile aminlerin olası bir katernizasyonu engellenmeye çalışıldı.

Çalışmamıza konu olan substratlardan biri olan N-1'-benzilnornikotin (I)'e kimyasal bakımından çok benzeyen 2-[(2S)-1-benzil-2-pirolidinil] piridin, Chelucci ve ark. (51) tarafından 2-[(2S)-2-pirolidinil] piridinin dimetilformamid içinde sodyum iyodür, sodyum karbonat ve benzil klorür ile sıcakta, geri çeviren soğutucu altında reaksiyonundan elde edilmiştir.



Ülgen ve Gorrod (311), 2,4,6-trisüstitüe N.N-dibenzil anilinlerin eldesinde benzer şekilde primer anilinlerin potasyum karbonat ve potasyum iyodürlü ortamda alkil halojenürle reaksiyonundan yararlanmışlardır.

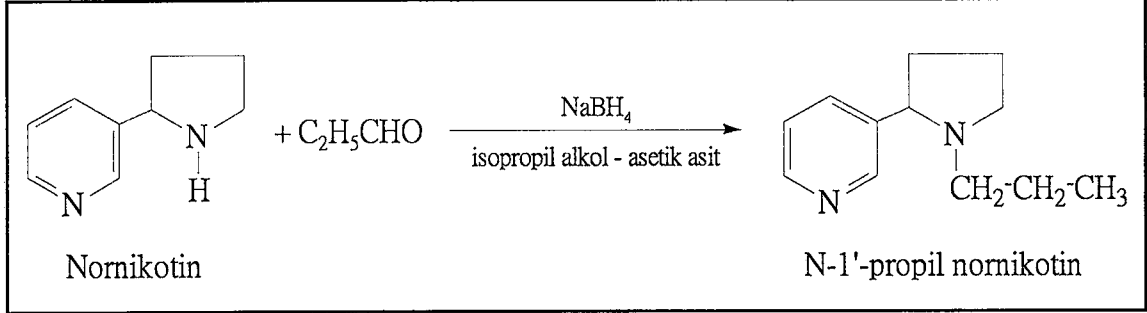
Ülgen ve ark. (314), çok asidik yapıdaki 9H-karbazolün benzillenmesi için reaksiyon ortamını potasyum hidroksit ile alkalilendirerek potasyum iyodür varlığında benzil bromürün ilavesini yaparak N-benzilkarbazol elde etmişlerdir.



Tersiyer amin substratlardan N-1'-benzilnornikotin, literatürde kayıtlı olan bir bileşiktir (72,106).

Glassco ve ark. (106), (±) nornikotin N-süstitüe analoglarının farmakolojik etkilerini araştırmak üzere sentezlerini yapmışlardır. Bu bileşiklerden biri olan I'in sentezi için nornikotin, benzil klorür ile potasyum bikarbonat varlığında reaksiyonundan yararlanılmıştır.

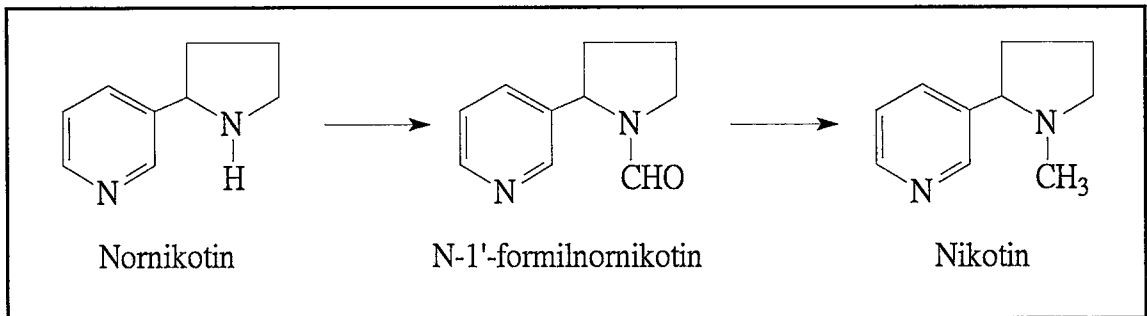
Sekonder aminlerin alkil halojenürlerle direkt olarak alkillenmesi ile tersiyer amin sentezlenebileceği gibi karbonil grubu taşıyan bileşiklerin redüktif alkilasyonundan da elde edilebilmektedir. Zhang ve ark. (339), N-1'- propilnornikotin sentezini bu esastan yararlanarak yapmışlardır.



4- Sübstitüe-N-etil-N-metilanilinlerin sentezlenmesi için Cowan ve ark. (56), benzilleme yönteminden farklı olarak, 4-sübstitüe anilinın trietilortoformatla reaksiyonunu takiben oluşan N-etil-4-sübstitüe formanilidlerin $LiAlH_4$ ile redüksiyonundan yararlanmışlardır.

Optikçe aktif alkilnikotinlerin eldesinde de redüksiyondan yararlanılmıştır. Organolityumlarla kotininin alkilasyonu sonucu oluşan enaminlerin sodyumsiyanoborohidrür ile redüksiyonundan 5'-alkil nikotinler kazanılmıştır (32,286,287).

Nornikotinın dimetilformamid içinde zirkonyum oksit ile reaksiyonundan nikotin eldesi, nornikotinden tersiyer amin eldesinde kullanılan yöntemlere başka bir örnek gösterilmektedir (302).



Substrat olarak kullandığımız tersiyer aminlerin sentezi sırasında reaksiyon ortamında ilgili tersiyer aminlerin yanısıra fazla oranda yan ürün de bulunmaktaydı. Esasen, nornikotin üzerinden gerçekleştirilen tersiyer aminlerin sentezinde bahsedilen yan ürünlerin oluşumu da literatürde kayıtlıdır (339). Bu nedenle tersiyer aminlerde verim yüzdesi yüksek olamamıştır.

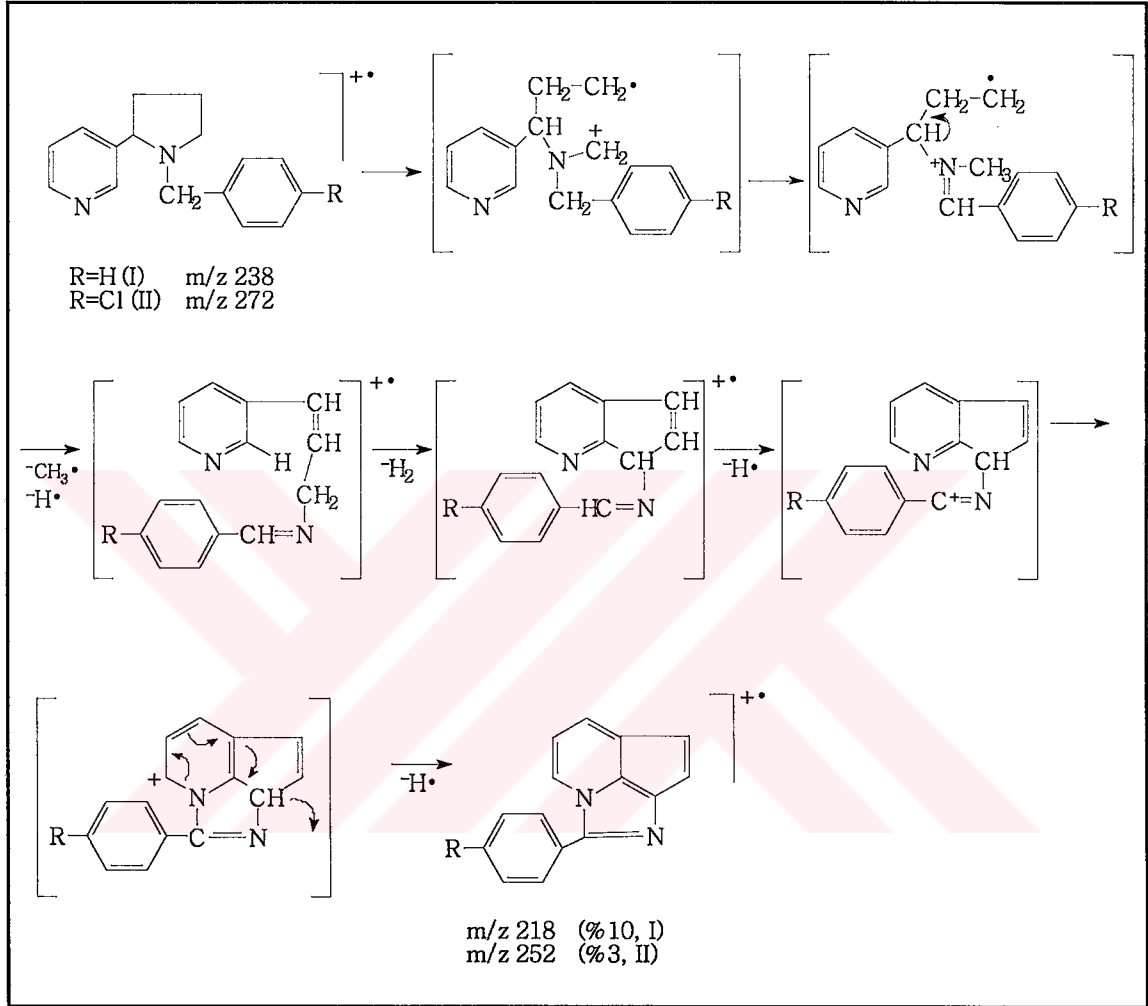
Substrat olarak sentezlenen tersiyer aminlerin İTK ve HPLC analizlerinden saf oldukları gözlemlendi. Nikotin türevi bileşiklerin UV spektrumlarında karakteristik maksimum absorpsiyon gösterdikleri dalga boyu olan 260 nm tersiyer aminlerin UV spektrumunda da gözlenmektedir (291,301).

Tersiyer amin yapısındaki bileşiklerin IR spektrumlarında aromatik C=C gerilme titreşimlerini temsil eden bandlar $1610-1450\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenirken, p-klorobenzil artığı taşıyan aminde Ar-Cl gerilme bandı 1070 cm^{-1} 'de tespit edilmiştir. Aminlerde CH_2 gruplarına ait karakteristik asimetric ve simetric gerilme titreşimleri $2950-2850\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenmektedir.

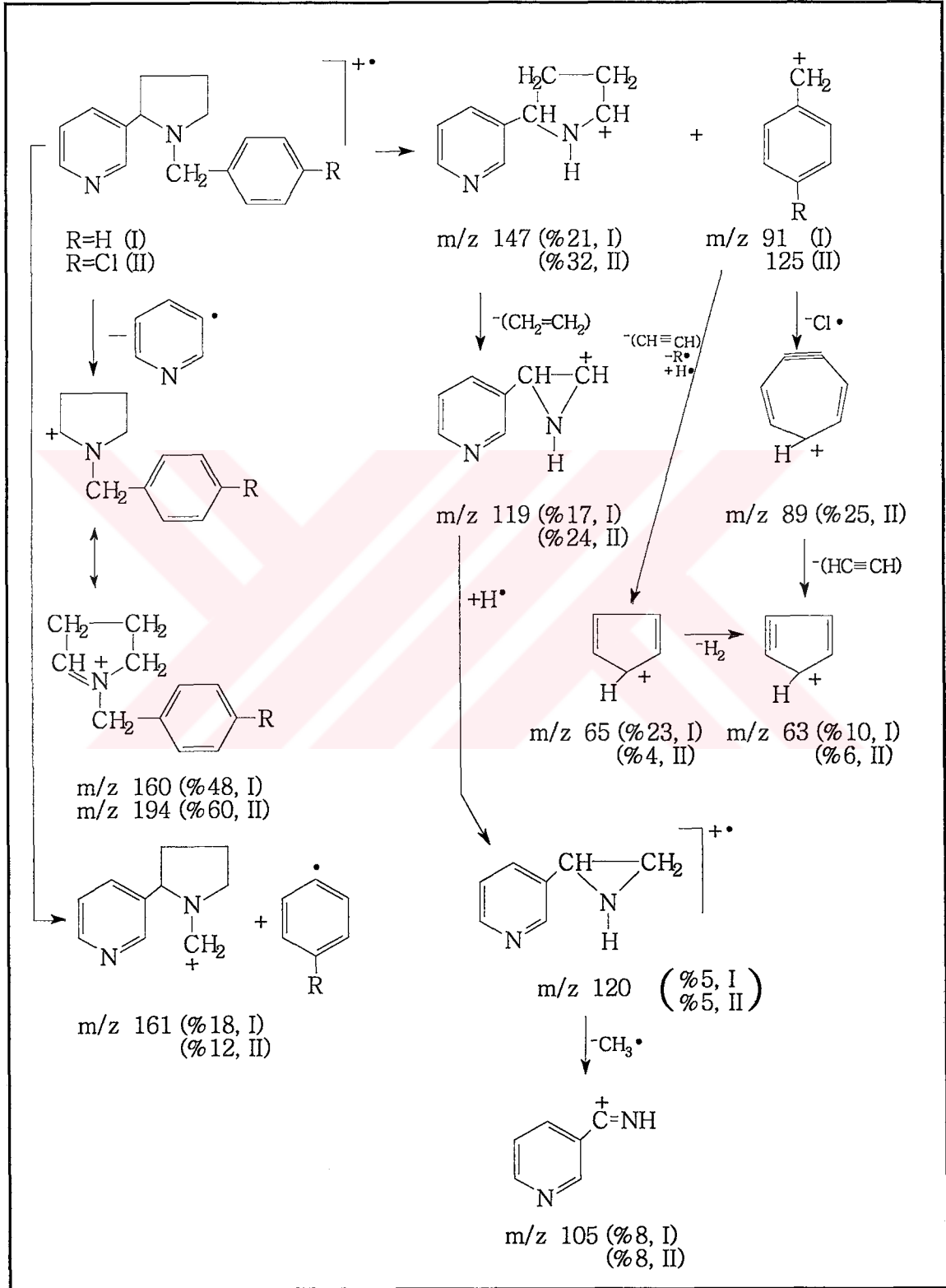
Tersiyer aminlerin electron impact modunda alınan kütle spektrumlarının m/z değerleri 238 ve 272 olan moleküler iyon piklerini vermeleri, bununla birlikte beklenen fragment iyonlarının da spektrumlarda gözlenmesi, bu bileşiklerin yapılarını doğrulamaktadır. Söz konusu aminlerin kütle spektrumlarında ana parçalanmaların m/z değerleri sırasıyla 91 ve 125 olan benzil ve p-klorobenzil katyonlarının oluşumu ile meydana geldiği gözlenmiştir. Benzer şekilde temel pikleri oluşturan bu parçaların atılmasıyla nornikotin fragmentlerinin her iki spektrumda da gözlenmesi bileşiklerin yapılarını kanıtlamaktadır. Literatürde kayıtlı olan I'in kütle spektrumunda elde edilen fragmentlerle bizim bulgularımız paralellik göstermektedir (106).

Bileşik I ve II'ye ait IR ve Kütle spektrumları Şekil 1-4'te görülmektedir.

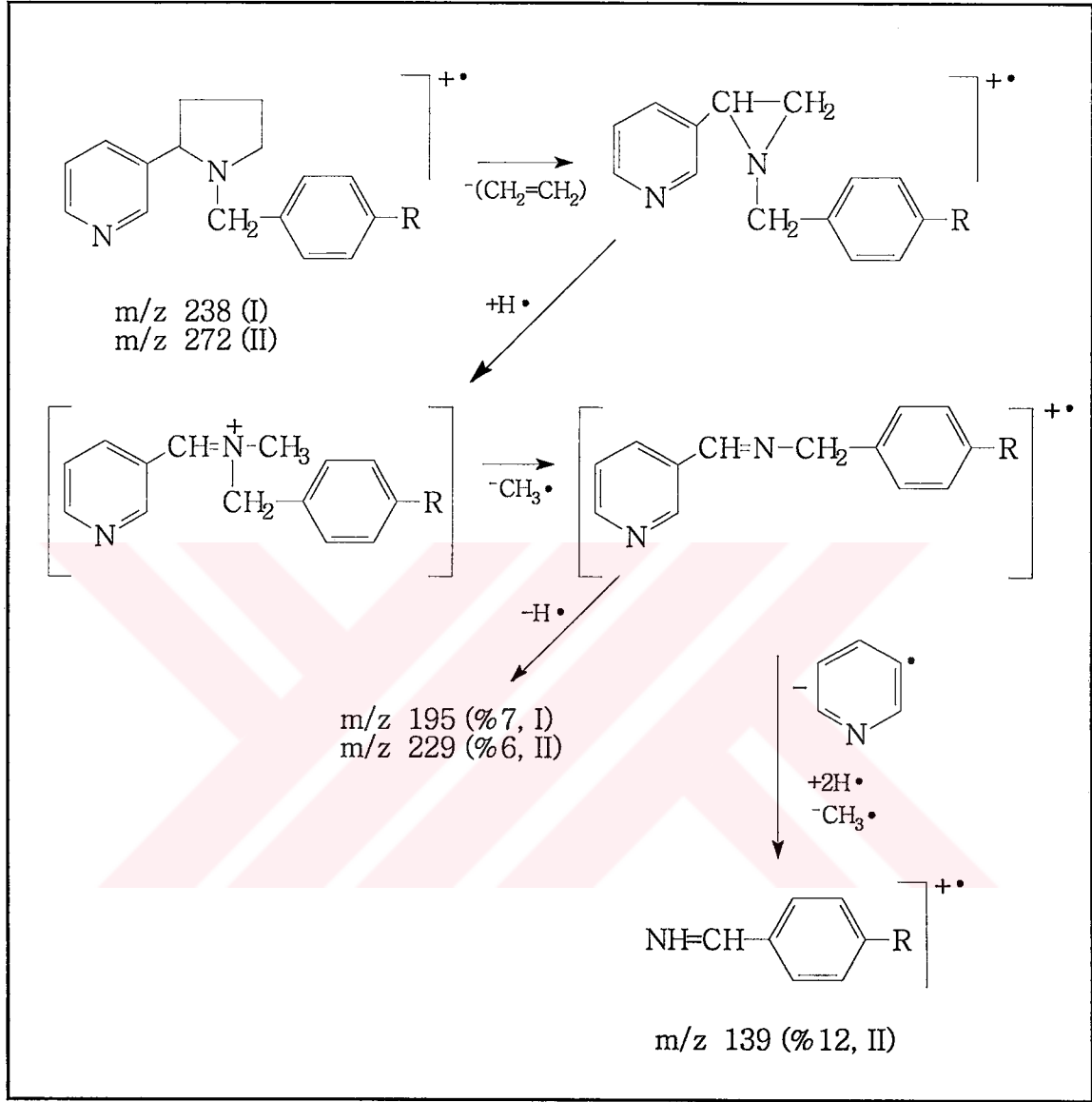
Molekül yapısında bir klor atomu taşıyan tersiyer amin fonksiyonel grubuna sahip bileşik II'nin kütle spektrumunda moleküler iyon pikinin 1/3'ü büyüklüğünde M+2 pik gözlenmiştir. Her iki aminin kütle spektrumunda da görülen m/z değeri 218 ve 252 olan parçaların aynı mekanizmayla meydana geldiği düşünülmektedir.



Bileşik I ve II'de alkil grubunun yapıdan ayrılması ile oluşan amin parçasından etilen kökünün atılması ile m/z değeri 119 olan fragment görülmektedir (107).



Tersiyer aminlerde görülen sırasıyla m/z değeri 195 ve 229'a karşılık gelen parçaların oluşum mekanizmaları aşağıdaki şekilde düşünülmüştür.



7.1.2 Amidler ve Laktamlar

Araştırmamıza konu olan tersiyer aminlerin olası metabolitlerinden olan aynı zamanda metabolizması da araştırılan amidlerin sentezlenmesi için başlangıç maddesi olan nornikotin sodyum hidrür gibi kuvvetli alkali varlığında benzen içerisinde ilgili açıl klorürle reaksiyonundan yararlanılmıştır.

Amidlerin sentezi için bilinen en genel yöntem Schotten-Baumann reaksiyonu gereğince ilgili aminin sodyum hidroksitli ortamda açıl klorürle açillenmesi (176,312) olmakla birlikte, bu yöntemle sentezlenen amidlerle verim oldukça az bulunmuştur. Zayıf bazik yapının buna sebebiyet verdiği düşünülmektedir.

Bu nedenle amid ve laktamların sentezinde benzenli ortamda sodyum hidrürle reaksiyon kullanılmıştır (29,185).

Ülgen ve ark. (314) karbazol ile benzoil klorürden N-benzoilkarbazol elde edilmesinde sodyum hidrürlü ortamda reaksiyondan yararlanırken Küçüközel ve ark. (160) ise, 4-kloroanilin ile 4-klorobenzoil klorürden N-(4-klorobenzoil)-4-kloroanilin elde edilmesinde Schotten Baumann reaksiyonunu kullanmışlardır.

Laktam yapısındaki Ib ve IIb sentezi norkotininden hareketle gerçekleştirilmiştir.

Ancak; amidlerin sentezinde reaksiyonun oda sıcaklığına getirilmesiyle ortama çöken amidlerin tersine, laktamların izolasyonu ancak ekstraksiyonla mümkün olabilmektedir. Laktam yapısındaki IIb bileşiğinin ekstraksiyonu takiben kalın tabaka kromatografisi ile saflaştırılması sağlanmıştır.

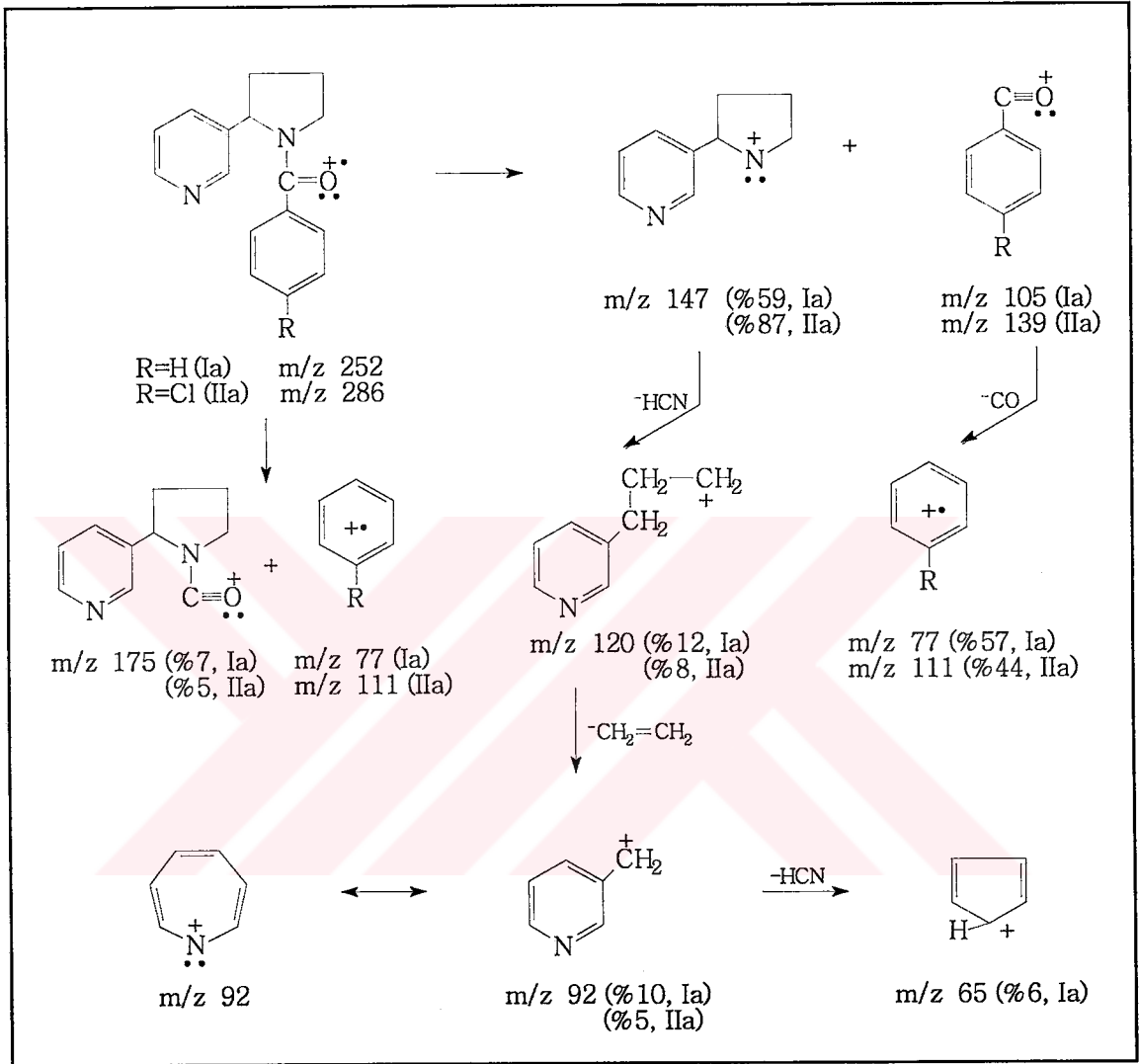
IIa bileşiğinin UV spektrumunda, nikotin türevlerinin karakteristik maksimum absorpsiyon gösterdikleri dalga boyu olan 260 nm'de gözlenmesi gereken band, 225 nm'deki band tarafından örtüldüğü için net görülememektedir.

Ia ve IIa bileşiklerinin potasyum bromür içinde alınan IR spektrumlarında, bu bileşiklerin karakterizasyonunda önemli bir kriter olan C=O gerilme titreşimleri yaklaşık 1630 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Ib ve IIb'de ise bu değer 1680 cm^{-1} civarında kaydedilmiş ve başlangıç maddesi norkotinine ait N-H gerilim bandının kaybolduğu tespit edilmiştir.

Amidlere ait kütle spektrumlarında sırasıyla N-1'-benzoilnornikotin (Ia) ve N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (II a) için m/z 252 ve 286'da moleküler iyon pikleri tespit edilmiştir. Her iki bileşikte de ortak bir parçalanma yolu olarak m/z değerleri 105 ve 139 olan benzoil ve p-klorobenzoil katyonlarına ait fragmentler temel pik olarak gözlenmiştir. Bu parçalanmalar sonucu açığa çıkan ve nornikotine karşılık gelen 147 fragmentinin oluşumu her iki amidin de yapısını doğrulamaktadır.

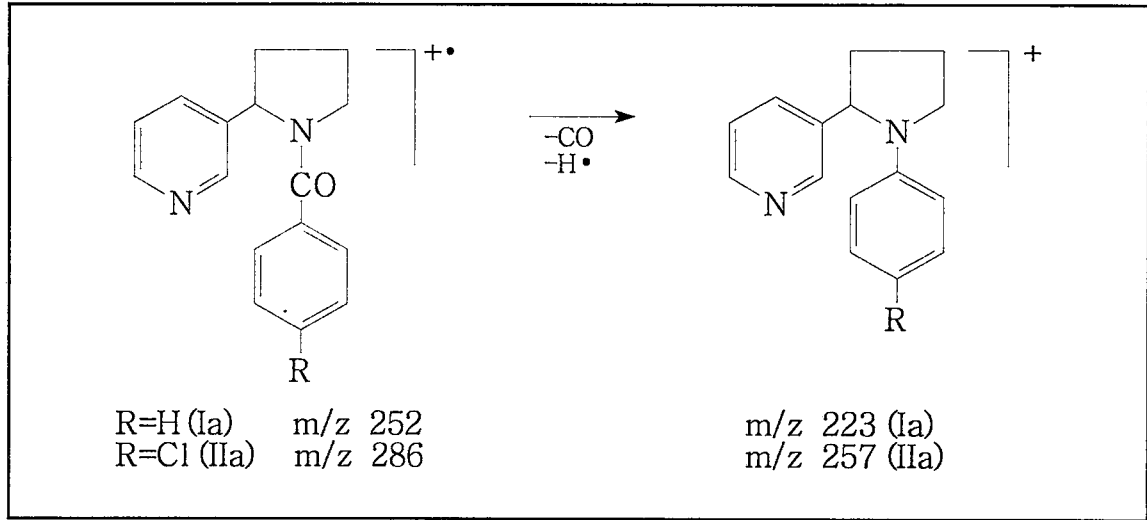
Bileşik I a ve II a'nın IR ve kütle spektrumları Şekil 5-8'de, I b ve IIb'nin IR spektrumları ise Şekil 9-10'da verilmiştir.

Tüm karbonil bileşiklerinde olduğu gibi, amidlerde de α -bölünmesi sonucu meydana gelen bu parçaların oluşumu aşağıdaki gibi düşünülmüştür.

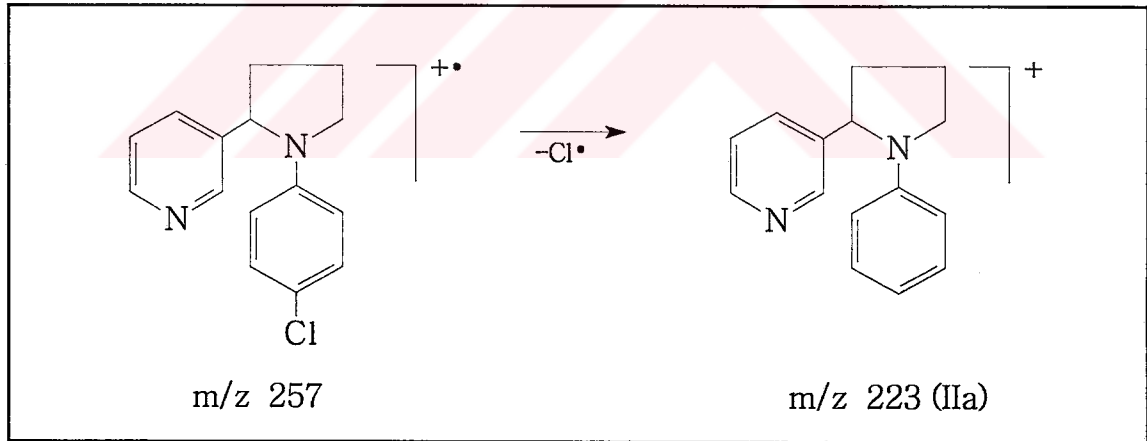


Kütle spektrumunda m/z değeri 147 olan parçadan HCN'in nötral atılmasından sonra oluşan m/z değeri 120 olan ve bundan da etilen ($CH_2=CH_2$) grubunun çıkması ile oluşan parçalanmalar her iki amidde de görülmüş olup bu fraksiyonların yüzdeleri düşüktür.

Her iki amide de yapıdan CO grubunun atılmasıyla oluşan bağıl bollukları 44 ve 47 olan fragmentler tespit edilmiştir.

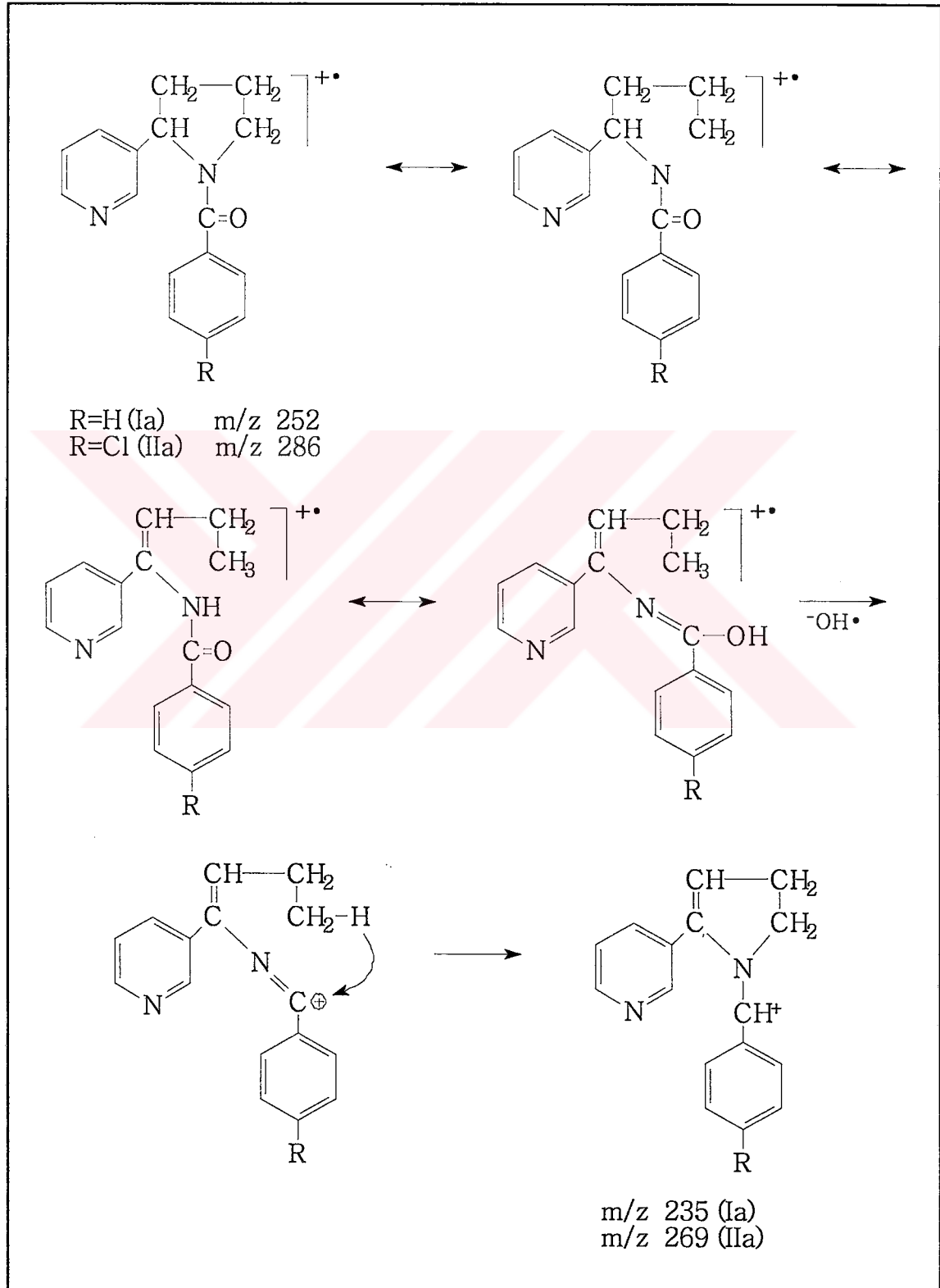


Bileşik IIa'ya ait olan ve m/z 257 olan fragment daha sonra Cl grubunu yapıdan atarak m/z değeri 223 ve bağıl bolluğu %43 olan parçayı oluşturmaktadır.



Bileşik Ia'nın kütle spektrumunda klorun varlığını kanıtlayan ve moleküler iyon pikinin 1/3'ü büyüklüğünde olan bir $M+2$ piki gözlenmektedir.

Amid yapısındaki bileşiklerin (Ia ve IIa) kütle parçalanmalarında yapıdan -OH grubunun ayrılmasıyla oluşan fragmentler görülmüştür. Bu fragmentlerin yüzdeleri sırasıyla %9 ve 15 olarak tespit edilmiştir.



7.2 Substrat ve Metabolitlerin Kromatografik Analizleri

7.2.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, diğer kromatografi tekniklerine göre bazı avantajlara sahip olduğu için, günümüzde birçok konuda olduğu gibi, ilaç metabolizması araştırmalarında da çok yaygın bir kullanım alanına sahiptir (16,210,254). Gaz kromatografisi ile kıyaslandığında daha düşük sıcaklıklarda çalışmaya imkan tanıyarak kararlı olmayan ve uçucu maddelerin analizinin yapılabilmesi gibi üstünlüklere sahip olan bu ayırım tekniği ayrıca UV ve MS detektörlerinin sisteme eklenmesi ile daha gelişmiş ve çok daha hassas ve güvenilir sonuçlar sunabilmektedir.

Metabolik reaksiyonlar sonucunda substrattan daha polar bileşikler meydana geldiğinden araştırmaya konu olan substrat ve metabolitlerinin ayırımında, fizikokimyasal bakımdan birbirine benzeyen bileşiklerin ayırımına olanak sağlayan normal faz sıvı kromatografisinden ziyade farklı polarite ve lipofilikliğe sahip bileşiklerin ayırımında kullanılabilen ters faz sıvı kromatografisi tercih edildi (77,250).

Nornikotinle metabolizma deneylerinde detektöre ilave olarak sisteme bağlanan ve kolondan elüe edilen bileşiklerin aynı anda UV spektrumlarının alınmasına olanak tanıyan diode-array özellikte detektör bağlandı (91). HPLC analizi sırasında standart bileşiklerin UV spektrumları, metabolik ekstrelerin analizinde tespit edilen maddelerin UV spektrumları ile karşılaştırılarak sözkonusu metabolitlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanıldı.

Araştırmamızda kullanılan substratlar ve olası metabolitlerinin birbirinden ayırımını sağlamak amacıyla farklı hacim oranlarında asetonitril-tampon karışımları kullanıldı. Nikotin ve türevlerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde zıt faz tekniği ile ayırımlarının en iyi gerçekleştiği tampon sistemlerinden birinin fosfat tamponu olduğu literatürde kaydedilmektedir (52,189). Bundan dolayı tampon çözelti olarak 0.02

M konsantrasyondaki fosfat tamponu (pH:7.4) kullanıldı. Mobil fazların son pH'ı ortofosforik asitle istenilen değere getirildi. HPLC analizleri için kullanılan ayırım sistemlerine ilişkin kolon, mobil faz bileşimi, pH, akış hızı ile ilgili bilgiler Bölüm 5.2.6'da Tablo 5.2-5.6'da verilmiştir. HPLC ayırımında tampon çözeltiler kullanıldığı için kolon, cihazın her kullanımında kolon hacminin iki katı bidistile su ile yıkandı. Analizden önce mobil fazın yine aynı hacimde kolondan geçirilmesi ile cihazın stabilizasyonu sağlandı.

Substratlar ve olası metabolitlerinin ayırımı için kullanılan HPLC analizlerinin sonuçları Tablo 6.2 ve Tablo 6.10'da özetlenmiştir.

HPLC ayırımlarında detektörün dalga boyu genellikle 260 nm'ye ayarlanmıştır. Çünkü nikotin metabolitlerinin tek tek UV spektrumları alındığında bu dalga boyunda maksimum absorpsiyon gösterdikleri saptanmıştır. Ancak biyolojik sıvılardan nikotin ve metabolitlerinin tayininde 254 nm dalga boyunda da analiz yapıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (184,243,341).

Sentezlenen bileşiklerin metabolizması ile ilgili HPLC analizlerinde 210 nm dalga boyunda çalışıldı.

HPLC ayırımı için kullanılan çözücü sistemleri, substrat ve olası metabolitlerin mümkün olan en iyi şekilde ayırımlarını sağlayacak şekilde modifiye edildi. Tüm sistemlerde de en polar bileşik olan nikotinamid kolondan en önce elüe oluyorken, kullanılan kolonun uzunluğu ve partikül büyüklüğüne göre tutulma zamanları değişkenlik göstermekteydi. Metabolitlerine göre nonpolar olan substratlarda daha geç bir tutulma gözlenirken, bazik nornikotinle yapılan çalışmalarda sistemin pH'ı 7.2'ye ayarlanmıştır.

HPLC ile yapılan miktar tayini deneylerinde ekstraksiyon ve enjeksiyon hacmi gibi faktörlerden gelebilecek istenmeyen özellikleri minimuma indirmek amacıyla internal standart kullanıldı. Yapısal olarak çalışılan bileşiklere benzer yapıdaki benzoilmetilamin denenilen çok sayıdaki madde içinde en uygun özellik göstermekteydi.

Ancak nornikotin ve kotinin setlerinde substrat ve olası metabolitlerinden farklı bir tutulma gösteren benzoilmetilamin, norkotinin setinde, metabolize olmadan kalan substrat tarafından örtüleceği için kullanılamadı. Dolayısıyla norkotininle ilgili çalışmalar için internal standart olarak asetanilid kullanıldı. Bu bileşiğin zıt faz HPLC ile nikotin ve metabolitlerinin ayırımında internal standart olarak kullanımına ilişkin kayıt ayrıca literatürde de mevcuttur (162).

Son yıllarda araştırmamızın konusu olan substratlardan N-1'-benzoilnornikotin (281) ve N-1'-benzilnornikotin (13) enantiyomerlerinin ayırımı gaz kromatografisine uygulanmış olduğu gibi (12) β -siklodekstrinle türevlendirilmiş ya da şiral α_1 - asid glikoprotein bağlı stasyoner faz (81) kullanılarak da HPLC ile yapılmıştır.

Araştırmamızda kullanılan substrat ve metabolitlerinin HPLC analizinde fosfat tamponundan önce asetonitril-su karışımları denendi (90,243). Ancak bazı standartların tutulma zamanlarında gün içi dahi sapmalar ve maddelerin kolondan geç elüsyonu gözlemlendi. Tamponlanmamış asetonitril-su karışımlarında saptanan bu etkinin değişebilen iyonizasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir (189). Ayrıca yüksek su konsantrasyonlarında silanol gruplarının etkileşiminin daha kuvvetli olup, silanol yüzeyini koruyan filmi bozabileceği kaydedilmiştir (188). Tampon çözeltilerin kullanımı ile, yalnızca iyonize olabilen bileşiklerin kromatografik özelliğinin pH'ının stabilize edilmesi değil aynı zamanda disosiye olmuş silanol gruplarıyla bazik bileşiklerin iyon değişimi etkileşimine karşı koyabilen katyon sağlanabilmesi de mümkün olmaktadır.

Nikotin, pKa değeri 3.12 olan piridin halkası ve 8.02 olan pirolidin halkasından dolayı, diprotik baz özelliği göstermektedir. Bu nedenle pH 7-7.5 arasında nikotinin %25'inden azının nötral yani serbest baz formuna dönmesi, zıt faz tekniği ile çalışıldığında nikotinin yüzeydeki silanol grupları ile kuvvetli bir etkileşim gösterebileceği ve zayıf bir pik keskinliği ve piklerde kuyruklanma meydana getirebileceği ihtimallerini beraberinde getirmektedir.

Bu etkileri minimuma indirebilmek amacıyla nikotin türevlerinin ayırımında baz ile deaktive edilmiş bir mobil faz seçiminin yapılması ve mobil faza trietilamin katımı uygun görülmüştür (52,167). Dolayısıyla mobil fazlara %0.1 oranında trietilamin ilave edildikten sonra karışımın son pH'ı istenilen değere ayarlanmıştır. Bu modifikasyon sonucunda, özellikle nornikotinin substrat olarak kullanıldığı çalışma gruplarında pik keskinliğinin arttığı ve retensiyon zamanlarının kısaldığı gözlenmiştir.

In vitro hepatik mikrozomal metabolizmaları çalışılacak bileşiklerin metabolitlerinden ayırımında denenen mobil faz sistemlerinin genellikle iyi bir ayırım sağladığı görüldü.

Beyin ve karaciğer dokusu ile metabolizması çalışılan substratlar içinde kotininin, diğerlerine oranla daha çok olası metaboliti bulunduğundan dolayı birbirine yakın polaritedeki bu metabolitlerin ayırımı için farklı oranlarda asetonitril-tampon sistemleri farklı partikül büyüklüğünde kolonlarda ve akış hızlarında incelendi. Bu sistemlerin bileşimi Tablo 5.4 ve 5.5'te görülmektedir. B₁ programı ile bileşiklerin birbirine çok yakın tutulma göstermesi ve kantitatif çalışma imkanını zorlaştırabileceğinden tercih edilmedi. B₂ programı ile nikotinamid ve 3'-hidroksikotinin ayırımı istenilen özellikte değildi. Sulu fazın oranının arttırılması ile ayırım sağlansa dahi (B₃) internal standart benzoilmetilamin ve kotininin tutulma zamanları 40 dakikanın üstüne çıkmıştır.

B₄ sistemi gradient teknikle çalışılmış olup, norkotinin ve 5'-hidroksikotininin aynı tutulmayı göstermesi nedeni ile bu sistem de kullanılamamıştır. Ancak B₅ sisteminden mikrozomal süspansiyondan gelen proteinlerle karışabilme ve iyi gözlenemeyeceği olasılığından dolayı metabolik ekstrelerde 3'-hidroksikotinin oluşumunun incelenmesi amacıyla ilave olarak yararlanılmıştır.

Kotinin ve olası metabolitlerinin en iyi ayırımının S₃ isokratik HPLC programı ile olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızın bir bölümünün konusu olan sentezlediğimiz tersiyer amin substratlarının (I ve II) HPLC ayırımında, isokratik yerine gradient teknik tercih edildi. Bunun nedeni, metabolitlerin ancak düşük oranda asetonitril içeren mobil fazlarda iyi ayırımlarının sağlanabilmesi, tersiyer amin substratlarının ise, bu mobil fazlarda çok uzun tutulmasıydı. Dolayısıyla ayırmda ilk olarak sekonder amin, aldehit, amid ve laktam metabolitlerinin birbirinden ayırımı gerçekleştirildi. İkinci aşamasında da ilk sistemde çok geç elüsyon gösteren substratların asetonitril oranlarının artırılması ile ayırımları sağlandı. Her iki aminin de kendilerine karşılık gelen amid ve laktam metabolitlerinin birbirine çok yakın polar özellik göstermesi bu iki bileşiğin ayırımı oldukça güçleştirdi. Asetonitril oranlarında yapılan çok sınırdaki bir değişimle dahi aynı tutulma zamanını gösteriyorlardı.

Ayrıca amin substratlarının daha kolay ayrılabilmesi için seçilen pH aralıklarında, N-dealkilasyon metaboliti olan ve çok kısa tutulan nornikotin varlığı mikrozomal ekstrelerdeki proteinle örtülebileceği ve sonuçta HPLC analizlerinde bu bileşiğe karşılık gelen pikin net gözlenemeyebileceği için söz konusu metabolitin meydana gelmesine neden olan N-dealkilasyon reaksiyonunun oluşup oluşmadığı bu reaksiyonun diğer ürünleri olan karşılık gelen aldehit metabolitlerinin kromatogramlardaki varlığı incelenerek tayin edildi.

7.2.2 İnce Tabaka Kromatografisi

Araştırmamıza konu olan nikotin metabolitleri ve analoglarının kromatografik ayırımında uzun yıllardan bu yana ince tabaka kromatografisi ve bileşiklerin renk reaktifleri ile teşhisi çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur (123,182,326). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisine göre oldukça eski bir yöntem olan ince tabaka kromatografisi, hızlı, uygulaması kolay ve diğer tekniklerle karşılaştırıldığında daha ucuz olması gibi avantajlara sahip olduğundan günümüzde de oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (256).

Tabaka kalınlığı 0.2 mm olan silikajel kaplı alüminyum plakların (Kieselgel 60, GF₂₅₄, Merck) kullanıldığı İTK çalışmalarında, denenen mobil faz sistemleri ile her bir setteki substratın, olası metabolitlerinden en iyi şekilde ayrılması amaçlandı.

Bölüm 5.2.4'te anlatılan ayırım ve teşhis işlemlerinin uygulanmasından sonra lekelerin tayini Rfx100 değerlerinin karşılaştırılması ve renk reaktifleriyle elde edilen sonuçların gözlenmesi ile yapılmıştır.

Araştırmamızın konusu olan bazı substratlar ve olası metabolitlerine ait standartların İTK ile gerçekleştirilen kromatografik ayırımlarından elde edilen sonuçlar Tablo 6.3'te verilmiştir.

Norkotinin ve olası metabolitlerinin İTK analizi için denenen A₁ sisteminde metabolitlerin birbirinden iyi ayrıldığı gözlenmiş ancak bu sistemde yakın Rfx100 değerine sahip olan norkotinin ve substrat A₂ sisteminde birbirinden daha iyi ayrılabilmiştir.

Laktam yapıdaki substrat kotininin olası metabolitlerinden ayırımı için de yararlanılan A₁ sisteminin etkili olduğu tespit edilmekle birlikte, bu sistemde aynı Rfx100 değerine sahip olan norkotinin ve 5'-hidroksikotinin standartlarının ayırımı A₂ sistemi ile gerçekleştirilebilmiştir. Ancak iki sistemde de 5'-hidroksikotinin ve onun ketoamid tautomeri 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid aynı Rfx100 değerini gösterdikleri için ayırlanamamışlardır.

Laktam yapıdaki substratların ikincisi olan norkotinin ve olası metabolitlerinin ayırımı A₁ ve A₂ sistemleri ile çalışılmış, A₁ ile gerçekleşen ayırımın diğerine oranla daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Substrat ve metabolitlerinin birbirinden ayırımının sağlanmasında kloroform; metanol: amonyak (9:3:1, h/h) (A₁) mobil faz sistemi kullanılmıştır. Bu sistem ve farklı hacimlerdeki oranları nikotin ve diğer tütün alkaloidlerinin analizlerini konu alan çoğu

araştırmada kullanılmıştır (73,92,129). Kloroform: metanol (9:3, h/h) (A₂) sisteminin de kullanıldığı kaynaklar mevcuttur (92,270).

Kromatografik ayırimda lekelerin yerlerinin tespit edilmesi için, dalga boyu 254 nm olan ultraviyole ışığın yanında püskürtme belirteçlerinden de yararlanıldı (Bkz. Tablo 5.1). Dragendorff belirtecini (D₁) (14,92,182,306) tersiyer amin yapısındaki bileşiklerin turuncu renk oluşturduğu tespit edildi. Ayrıca amid ve laktam gibi heterosiklik azot taşıyan bileşiklerin de bu belirteçle benzer renkler verdiği gözlemlendi.

Dragendorff belirteci (D₁), 254 nm UV lamba altında düşük absorpsiyon gösteren nornikotine ait lekenin İTK plağında daha belirli hale getirilmesinde de etkili olmuştur. Nornikotin, D₁ belirteci ile hemen açık turuncu renk verirken, kotinin ve norkotininin aynı belirteç ile oluşturduğu turuncu renk, 10 saniye içinde kaybolmuştur. Kotininin hidroksillenmiş halka metabolitlerinden hiçbirisi D₁ ile renk vermemiştir.

4-Dimetilaminosinnamaldehit belirteci (D₃) püskürtülmesi anında hiç bir renk oluşumu gözlenemezken 10 dak. sonra sekonder amin yapısındaki nornikotinin bu belirteçle turuncu, norkotininin olası metaboliti olan 4-(3-piridil)-4-oksobutiramidin ise 30 dakika sonra turuncu-kahve renk verdiği tespit edildi. D₃ belirtecini piridin türevi bazı bileşiklerde geç renk vermesi bizim elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir (73).

Aldehit fonksiyonel grubu taşıyan D₃ belirtecini, primer amin taşımadığı halde standartlarla renk vermesinin, amin gruplarındaki hidrojen atomları ile renkli kondensasyon ürünleri oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (73). Yine aldehit grubuna sahip 4-dimetilaminobenzaldehit (D₄) belirteci de nornikotine karşılık gelen leke üzerine püskürtüldüğünde beklemekle turuncu-sarı renk vermiştir.

Sonuç olarak araştırmanın sentez aşamasından bu yana kullanılan ince tabaka kromatografisi, çoğu standart bileşiğin ayrılmasında iyi sonuçlar vermiştir. Ancak daha tatmin edici sonuçlara ulaşmak ve miktar tayinine de imkan sağlamak için substratlar ve metabolitlerine yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmıştır.

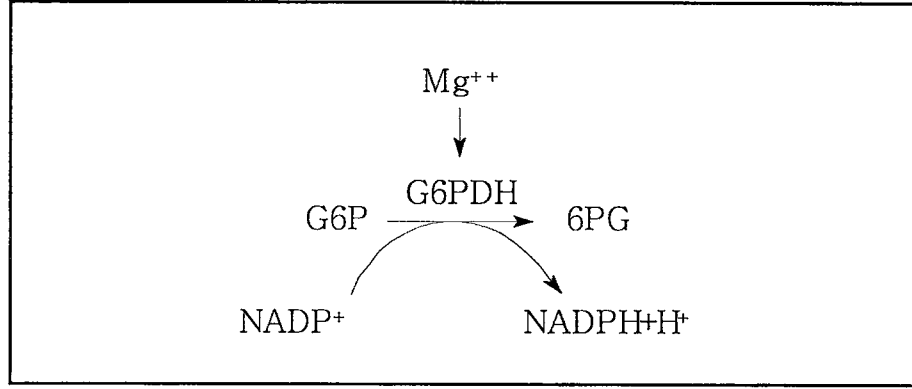
7.3 Biyolojik Sistemin Hazırlanması ve İnkübasyonlar

Nikotin, nikotin metabolitlerinin ve nikotin türevlerinin metabolizmasının *in vivo* olarak (62,167,249) araştırıldığı çalışmaların sayısı literatürde *in vitro* çalışmalara kıyasla sayılamayacak kadar çoktur. Bu nedenle araştırmamıza konu olan substratların metabolizması *in vitro* olarak, sıçan karaciğer mikrozomlarından hazırlanan mikrozomal preparat ve beyin dokusu homojenatı ile çalışıldı. Karaciğer dokusunun özellikle tercih edilmesinin nedeni ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynayan sitokrom P-450 ve FMO gibi enzimlerin karaciğer hücrelerinin mikrozomal fraksiyonunda bulunmaları idi. Enzimatik sistemlere sahip olan beyin dokusu ise nikotinle meydana gelen nörofarmakolojik etkilerden sorumlu olabileceği düşünülen nikotin metabolitlerinin bu dokuda birikebileceğinden dolayı seçilmiştir.

Servikal dislokasyondan önce hayvanlar bir gece aç bırakılarak yalnızca su verildi. Açlığın P450E1, 3A2, 4A2 gibi sitokrom P450 izoenzimlerinin seviyesini arttırdığı literatürde kayıtlıdır (138).

Karaciğer mikrozomal preparatının hazırlanmasına endoplazmik retikulum fragmentlerinin kalsiyum iyonları varlığında agregasyonu esasına dayanan "kalsiyum klorür çöktürme yöntemi" (272) yüksek devirlerde uzun süre santrifüj gerektirmemesi ve kısa sürede deneyin tamamlanması gibi özelliklerinden dolayı tercih edildi.

Karaciğer mikrozomal süspansiyonunun hazırlanmasında işlemler sırasında kofaktörler kayba uğradığı için *in vitro* metabolizma çalışmalarında inkübasyon ortamına ilave edildi. Karma fonksiyon oksidaz (MFO) enzim sisteminin aktivitesinin metabolizma reaksiyonları süresince redüklenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ($\text{NADPH} + \text{H}^+$)'a bağlı olması ve bu maddenin pahalı ve aynı zamanda çok stabil olmamasından dolayı ön inkübasyon sırasında kimyasal reaksiyonla oluşturuldu. Bunun için, NADP^+ disodyum, glukoz-6-fosfat disodyum (G-6-P), glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) ve bu enzimin esansiyel kofaktörü magnezyum iyonlarını içeren standart kofaktör karışımından yararlanıldı. Bu karışımın hazırlanışı 5.2.10.1'de verilmiştir.



Beyin homojenatı ile yapılan deneylerde kofaktörlü ve kofaktörsüz inkübasyonlardan elde edilen metabolik ekstratların kromatografik analizlerinde metabolitlerin oluşum miktarı bakımından fark gözlenmemiştir (145). Doku homojenatının hazırlanması sırasında kofaktör kaybı olmadığı bilinmekle birlikte metabolit oluşumu halinde aradaki farkın kantitatif tayin edilebilmesi için inkübasyon ortamına kofaktörün eklendiği deneyler de düzenlenmiştir.

Ayrıca inkübasyon çalışmalarında Bölüm 5.2.10.2'de belirtildiği gibi test erlenlerinin yanında, enzimin inaktif olduğu ya da kofaktör karışımının bulunmadığı kontrol erlenleri de düzenlenmiş ve bu gruplar da test erlenlerinde olduğu gibi aynı inkübasyon, ekstraksiyon ve evaporasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Böylelikle, kromatografik analizler sonucu tespit edilen reaksiyonların enzim ve kofaktörlere bağlı olup olmadığı anlaşılabilmektedir.

Özellikle nornikotin, kotinin ve norkotininin substrat olarak kullanıldığı metabolik reaksiyonlarda normal inkübasyon protokolüne ilave olarak, beş gün boyunca 60 mg/kg fenobarbital sodyumun intraperitoneal uygulanması ile mikrozomları indüklenmiş olan sıçanların karaciğer ve beyin dokusu kullanılarak metabolik reaksiyonlar üzerinde fenobarbital tarafından indüklenebilen sitokrom P-450 izoenzimlerinin etkisi hem kalitatif hem de kantitatif olarak araştırıldı (220,269).

Daha önce yapılan çalışmaların bir sonucu olarak 3-metilkolantren ya da β -naftoflavonla nikotin oksidasyonunda fenobarbital kadar spesifik bir değişiklik kaydedilmemesinden dolayı enzim indükleyici olarak fenobarbital seçilmiştir (218,223).

Substratların, biyolojik sistemlerle reaksiyonları (inkübasyon) salınım hareketi yapabilen su banyosunun (inkübatör) 37°C'ye ayarlanması ile gerçekleştirildi. *In vitro* çalışmaların çoğunda inkübasyon süresi 30 dakika olarak kaydedilmiş ve bu sürenin metabolik reaksiyonların oluşumu için genellikle yeterli olduğu gözlenmiştir (313). Bu nedenle inkübasyon protokolünün süresi genellikle 30 dakika olarak belirlenmiş ancak, metabolit oluşumunun gözlenmediği hallerde süre 45 ve 60 dakikalara çıkartılarak, metabolik ekstrelerden elde edilen kromatografik analiz sonuçları karşılaştırılmıştır.

7.4 Ekstraksiyon

Bir ksenobiyotiğin metabolizması çalışıldıktan sonra ilk yapılması gereken, biyolojik ortamdan substrat ve metabolitlerinin suyla karışmayan organik bir çözücüyle ekstraksiyonudur. Ekstraksiyon çözücüsünün seçiminde, çözücünün ekstraksiyon gücü, toksisitesi, ekonomikliği, ekstre edilecek bileşiğin çözücü içindeki stabilitesi önemli kriterlerdir.

Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi birkaç nedenden dolayı çok önemlidir. Bunlardan birincisi, ekstraksiyon çözücüsünde safsızlıkların olması halinde, substrat ve/veya metabolitlerle reaksiyona girerek kimyasal yolla -metabonat- dediğimiz yani yanlışlıkla metabolit olarak saptanabilen ürünlerin meydana gelmesidir. Buna örnek olarak dietileteri verebiliriz. Dietileter zamanla substrat ve metabolitlerini okside olmuş ürünlerine dönüştürebilecek peroksitleri yapısında ihtiva edebilmektedir.

Kloroformla yapılan ekstraksiyonlarda da kloroform içerisinde eser miktarda bulunabilen fosgenden dolayı ekstraksiyon sonrasında birtakım bozunma ürünleri meydana gelebilmektedir.

Ekstraksiyon çözücülerinden halojenli hidrokarbonların özellikle diklorometanın ekstraksiyon sırasında bazik yapıdaki maddelerle reaksiyona girerek bu bileşiklerin klorometilklorürlerini yani katerner amonyum türevlerini meydana getirdiği tespit edilmiştir. Ancak metabolik deneyler öncesi ilgili substrat ve olası metabolitlerinin diklorometanla ekstraksiyonları sonrası bahsedilen yan ürünlerin tespit edilmemesi çok sayıda çalışmada olduğu gibi (160,161,299) diklorometanın organik çözücü olarak seçimini sağlamıştır.

Ayrıca ekstraksiyon yapılmadan hemen önce inkübasyon ortamına sodyum klorür ilave edilmesi ile polar özelliğe sahip metabolitlerin, metabolize olmayan substratla birlikte sulu fazdaki çözünürlüklerinin azaltılması ve daha yüksek verimle ekstre edilmesi amaçlanmıştır.

Cowan ve ark. (56), inkübasyon sonunda sodyum klorür ile sulu fazı doyurarak diklorometan ekstraksiyonu ile metabolitleri yüksek verimlerle elde etmişlerdir. Metabolik deneyleri takip eden ekstraksiyon deneyleri sonrasında organik fazların evaporasyonu azot gazı altında ve yüksek ısı uygulamaksızın 40°C'de kuruluğa kadar uçurularak metabolik ekstreler kazanılmıştır.

7.5 Substratların Beyin Homojenatıyla yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Sonuçlar

Nornikotin, kotinin ve norkotinin substratlarının sıçan beyin homojenatı ile inkübasyonu 5.2.10'da verilen yöntem ve Tablo 5.8'de verilen genel deney protokolüne göre yapıldı. Ancak normal ve indüklenmiş homojenat kullanıldığı için uygulanan prosedüre ait detaylı bilgi tablo 6.1'de görülmektedir.

7.5.1 Nornikotinin Metabolizması

Nornikotinin sıçan beyin homojenatıyla yapılan metabolizmasından elde edilen inkübatların kromatografik incelemesinde HPLC için S₁, İTK için ise A₁ mobil faz sistemleri kullanıldı.

Şekil 11A'da standartları laboratuvarımızda mevcut olan nornikotin ve olası metabolitlerinin HPLC sistemine enjeksiyonu ile edilen kromatogram görülmektedir. Bu ayırimda substrat nornikotin 19.33 dakikada kolondan elüe olurken, olası metabolitleri nikotinamid 6.35, norkotinin 10.40, internal standart olarak kullanılan benzoilmetilamin ise 13.37 dakikalık tutulma zamanı göstermişlerdir.

Fenobarbitalle indüklenmiş ve normal beyin homojenatlarının kullanıldığı test 1 ve test 2 inkübasyonlarına ait HPLC kromatogramları Şekil 11B, Şekil 11C'de görülmektedir. Her iki kromatogramda da nornikotin major metaboliti olarak beklenen norkotinin pikine rastlanmamıştır.

Her iki metabolik ekstrede de nikotinamide karşılık gelen pikler gözlenmektedir.

Denatüre beyin homojenatının kullanıldığı (Şekil 11D) ve kofaktörlerin ilave edilmediği, yerine tampon çözeltinin kullanıldığı (Şekil 11E) kontrol denemelerine ait kromatogramlarda metabolize olmadan kalan substrat ve internal standartlar kaydedilmektedir.

İndüklenmiş beyin homojenatıyla yapılan test erlenlerinde rastlanan ve olası metabolitlerden hiçbirinin pikine atfedilemeyen 8.08 ve 9.00'da tayin edilen iki pike kontrol olarak düzenlenen metabolik ekstrelerde de rastlanmaktadır (Şekil 11B ve Şekil 11E). Kontrol erlenlerine ait metabolik ekstrelerin kromatogramında da bu piklerin gözlenmesinden dolayı bunların protein kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Nornikotin beyin homojenatı ile inkübasyonundan elde edilen metabolik ekstrelerin nornikotin olası metabolitlerinin standartları ile birlikte A₁ ve A₂ mobil faz sistemleri ile İTK ile analizleri de yapıldı. 254 nm UV ışık altında yapılan inceleme sonucunda R_{fx}100 değeri sırasıyla 91 ve 6 olan metabolize olmayan substrat dışında sadece nikotinamide karşılık gelen leke tespit edilebildi (Şekil 12). Hem standart hem de metabolik ekstredeki substrat nornikotin, Dragendorff (D₁) ve 4-

dimetilaminosinnamaldehit (D₃) belirteci Erlich (D₄) belirteci püskürtülüp beklediğinde turuncu-sarı renk vermiştir.

7.5.2 Kotininin Metabolizması

Beyin homojenatı ile yapılan inkübasyon serisinin ikinci substratı olan kotininin *in vitro* çalışması Tablo 6.1'de belirtilen protokole göre yapıldı.

Enzimatik çalışma planı için normal (fenobarbitalle indüklenmemiş) homojenat yanında fenobarbitalle indüklenmiş homojenatlar da kullanıldı.

Kotininin olası metabolitleri olan nikotinamid, 3'-hidroksikotinin, 5'-hidroksikotinin, norkotinin, internal standart benzoilmetilamin ve kotinine ait HPLC kromatogramı Şekil 13A'da görülmektedir. Bu standartlar S₁ HPLC sisteminin kullanıldığı zıt faz ayırım tekniğiyle sırasıyla, 6.35, 8.37, 9.53, 10.38, 13.00 ve 14.53 dakikada tutulma zamanı göstermişlerdir.

Yalnızca substratı içeren erlene ait ekstrenin kromatogramında Şekil 13B'de de görüleceği gibi 10.47'de norkotinine karşılık gelen pik görülmekte olup dolayısıyla olası metabolitlerden norkotininin oluşup oluşmadığı kotinine ait metabolik ekstrelerdeki norkotinin miktarının kontrol 5'deki miktarı ile karşılaştırılması suretiyle yapılmıştır.

Kotinin substratına ait fenobarbitalle indüklenmiş ve normal beyin homojenatıyla yapılan test 1 ve test 2 erlenlerine ait metabolik ekstrelerin HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 13C ve Şekil 13D'de görülmektedir. Bu kromatogramlardan anlaşılacağı üzere kotinin sıçan beyin homojenatıyla olası metabolitlerden 3'-hidroksikotinin, 5'-hidroksikotinin ve norkotinine metabolize olmamakta ve sadece nikotinamide karşılık gelen pik gözlenmektedir. Her iki kromatogramda da norkotinin pikinin alanında artış kaydedilmemiştir.

İndüklenmiş homojenat ve tris tamponu (kontrol 2) ve denatüre normal homojenat ve kofaktör (kontrol 3) taşıyan kontrol erlenlerine ait metabolik ekstrelerin

analizlerine göre Şekil 13E ve Şekil 13F'de görüldüğü gibi kontrol örneklerinde de metabolize olmadan kalan substratlar tayin edilmektedir.

Test erlenlerinde (Şekil 13C ve 13D) gözlenen ve 8.62 dakikalık tutulma gösteren pik, fenobarbitalle indüklenmiş homojenat ve tris tamponunun tek başına kullanıldığı kontrol 6 erlenine ait metabolik ekstrenin kromatografik analizinde de (Şekil 13G) gözlemlendiği için -karakterize edilememiş bir metabolit- özelliğinden çıkmıştır.

Benzer durumda, fenobarbitalle indüklenmiş homojenat ve tris tamponundan oluşan kontrol 2 metabolik ekstresinin kromatogramında gözlenen ve 8.03 dakikada elüe olan bileşiğin pikine de bu grubun substratsız boşunda yani kontrol 6 erlenine ait kromatogramında da rastlanmıştır.

Kotininin beyin homojenatıyla yapılan inkübasyonundan elde edilen metabolik ekstreler olası metabolit standartları ile birlikte A₁ ve A₂ mobil faz sistemlerinin kullanıldığı ince tabaka kromatografisi plağına tatbik edildi. Developmandan sonra plaktaki lekelerin UV lamba altında görünür hale getirilmesi ile test inkübatlarına ait metabolik ekstrelerde R_f100 değeri sırasıyla 93 ve 62 olan substrat ve 63 ile 40 olan nikotinamide karşılık gelen lekeler tespit edildi (Şekil 14).

7.5.3 Norkotininin Metabolizması

Norkotininin S₁ mobil fazı kullanılarak yapılan HPLC çalışmasına ait kromatogram Şekil 15A'da görülmektedir. Bu substrata ait oluşması muhtemel metabolit olan 4-(3-piridil)-4-oksobutiramid standartı 8.07 dakika, internal standart asetanilid ise 16.68 dakikalık bir tutulma göstermektedir.

Norkotinin normal ve fenobarbitalle indüklenmiş sıçan beyin homojenatıyla 37°C'de 30 dakikalık inkübasyonundan elde edilen metabolik ekstrelerle ait HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 15B ve Şekil 15C'de görülmektedir. İki

kromatogramdan da izleneceği gibi düşünülen olası metabolit olan 4-(3-piridil)-4-oksobutiramid oluşumu bulunmamakta sadece nikotinamid varlığı gözlenmektedir.

Fenobarbitalle indüklenmiş denatüre homojenat ve kofaktör karışımını ihtiva eden kontrol 1 metabolik ekstresine ait HPLC kromatogramı Şekil 15D'de görülmektedir.

Metabolize olmayan substrat ile birlikte 9.5 dakikada gözlenen ve olası metabolitlerin hiçbirine karşılık gelmeyen pikin oluşumu, aynı zamanda hem test hem de fenobarbitalle indüklenmiş homojenat ve fosfat tamponundan oluşan kontrol 2 erlenine (Şekil 15E) ait metabolik ekstrelerin HPLC kromatogramlarında da görülmüştür. Bu pikin kontrol 5 yani sadece substratın homojenatsız ve kofaktörsüz inkübasyonundan elde edilen metabolik ekstrenin HPLC kromatogramında da bulunmuş olması, hem test hem de kontrol gruplarında gözlenmesi bulgusunu desteklemektedir.

Fenobarbitalle indüklenmemiş normal beyin homojenatının enzim kaynağı olarak kullanıldığı ve kofaktör yerine tamponla yapılan metabolik ekstrenin yani kontrol 4'e ait HPLC kromatogramı da Şekil 15F'de görülmektedir. Tüm test ve kontrol metabolik ekstrelerinin HPLC analizlerinden aldığımız sonuçlar norkotininin sadece nikotinamide metabolize olduğunu göstermektedir. Bu substratın ve olası metabolitlerinin İTK ile ayrımı A₁ ve A₂ sistemleriyle çalışıldığında Rfx100 değerleri bu sistemlerde sırasıyla 86 ve 48 olan metabolize olmayan substrat ve nikotinamid oluşumu saptanmıştır (Şekil 16).

7.6 Substratların Karaciğer Mikrozomlarıyla Yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Sonuçlar

Tütün alkaloidi ve nikotin metabolitlerinden olan nornikotin, kotinin ve norkotininin sıçan karaciğeri ile gerçekleştirilen inkübasyonu için Tablo 6.4'te belirtilen deney protokolü kullanıldı.

7.6.1 Nornikotin Metabolizması

Nornikotin ve olası metabolitlerine ait standartların S₂ sistemi ile gerçekleştirilen HPLC analizi kromatogramı Şekil 17A'da görülmektedir. Çalışılan bu sistem ve zıt faz kolonla nikotinamid, norkotinin, nornikotin ve internal standarta ait pikler sırasıyla 3.22, 7.23, 10.20 ve 13.10 dakikada saptanmıştır.

İndüklenmiş ve normal mikrozomların enzim kaynağı olarak kullanıldığı test 1 ve test 2 inkübasyonlarına ait HPLC kromatogramlarının her ikisinde de tutulma zamanı norkotinine karşılık gelen pikler görülmüştür (Şekil 17B ve Şekil 17C). İndüklenmiş mikrozomlarla yapılan inkübasyonda norkotinin metabolitinin önemli ölçüde arttığı gözlenmektedir.

Norkotinin oluşumunun enzimatik ya da kimyasal nedenlere dayalı olduğunun araştırılması için düzenlenen kontrol erlenlerinin hiçbirinde buna karşılık gelen pike rastlanamamıştır (Şekil 17D-G). Denatüre mikrozomların ya da kofaktör çözeltisi yerine tampon çözeltisinin kullanıldığı kontrol inkübasyonlarında norkotinin oluşmaması, özellikle de fenobarbitalle indüklenmiş mikrozomlarla daha yüksek oranda oluşumun gözlenmesi, reaksiyonların enzimatik kaynaklı olduğunu göstermektedir.

HPLC ayırımı ile gözlenen piklerin yanısıra, sisteme bağlanan diode-array UV detektörünün yardımıyla nornikotin setine ait bileşiklerin UV spektrumlarının karşılaştırılması ile tespit edilen metabolit norkotininin yapısı tekrar doğrulanmıştır (Şekil 18).

7.6.1.1 Nornikotin ve Olası Metabolitlerinin Miktar Tayini

Nornikotin ve olası metabolitlerine ait kalibrasyon eğrileri 5.2.13.2'de anlatılan yöntem izlenerek çizildi. Şekil 19'dan da görüleceği gibi bu bileşiklerin standartlarına ait kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları 0.99'dan büyük bir değere sahipti. Bu sete ait miktar tayini yapılırken konsantrasyon ve pik alanları oranları arasında pozitif bir korelasyon gösteren bu eğrilerden yararlanıldı.

Regresyon analizi eşitlikleri ve korelasyon katsayıları Tablo 6.6'da görülmektedir.

S₂ HPLC sistemi ile çalışıldığında elde edilen bulgular nornikotin 16.5-264 nmol, norkotinin 15-135 nmol nikotinamid ise 8-64 nmol değerleri arasında doğrusal olduğunu göstermiştir. Bileşiklerin bu konsantrasyon aralıklarındaki geri kazanım değerleri sırasıyla nornikotin, norkotinin ve nikotinamid için %97-99, %99-102 ve %94-99 olarak bulunmuştur (Tablo 6.7).

Boş dokuya ait HPLC kromatogramında ilgi duyulan bileşiklerin pikleri ile interfere olan herhangi bir pik görülmemiştir (Şekil 20A).

Kalibrasyon grafiğini çizdirmede kullanılan ve farklı konsantrasyon aralıklarındaki nornikotin, norkotinin, nikotinamid ve internal standarta ait HPLC kromatogramları Şekil 20'de görülmektedir.

Fenobarbitalle indüklenmiş ve indüklenmemiş test ekstrelerindeki norkotinin metabolitinin miktarı, Şekil 19'da verilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak tayin edilmiştir.

7.6.2 Kotinin Metabolizması

Kotinin ve olası metabolitlerine ait standartların S₃ sisteminin kullanıldığı HPLC cihazına enjeksiyonundan sonra nikotinamidin 6.37, 3'-hidroksikotininin 8.47, 5'-hidroksikotininin 9.80, norkotininin 12.22, benzoilmetilaminin 15.05, substratın ise 20.63 dakikada kolondan elüe olduğu Şekil 21A'da da görülmektedir.

Kotinin metabolik test 1 ekstrelerine ait HPLC kromatogramlarında 9.97, 12.58 ve 15.03 dakikalık tutulma zamanlarında gözlenen piklerin sırasıyla 5'-hidroksikotinin, norkotinin ve benzoilmetilamine karşılık geldiği standart bileşiklerin HPLC kromatogramı ile karşılaştırıldığında anlaşılmaktadır (Şekil 21B). Normal mikrozomların kullanıldığı test 2 erlenine ait HPLC kromatogramı da Şekil 21C'de

görülmektedir. 5'-Hidroksikotinin metabolitinin oluşumu normal mikrozomlarla yapılan inkübasyon sonrasında da tespit edilmiş olup oluşumları arasındaki kantitatif fark kolaylıkla makroskopik olarak da gözlenebilmektedir.

Test 1 ve test 2 metabolik ekstralarının HPLC analizlerinde Şekil 21B ve Şekil 21C'de görüldüğü gibi norkotinin oluşumu görülmektedir ancak bu pike sadece substratı içeren kontrol 5 erlenine ait HPLC kromatogramında da (Şekil 21D) rastlanmış olması ve test erlenlerindeki norkotinin miktarında artma gözlenmemesi norkotininin enzimatik reaksiyonla oluşmadığı bulgusunu ortaya çıkartmaktadır.

Şekil 21E'de de normal mikrozom ve tampondan oluşan kontrol 4 erlenine ait metabolik ekstranın HPLC kromatogramı görülmektedir.

Fenobarbital ile yapılan enzim indüksiyonu çalışmalarında 5'-hidroksikotinin metabolitinin oluşumundaki artış sözkonusu metabolik reaksiyonun fenobarbitalle indüklenebilen sitokrom P450 izoenzimleri ile katalize edilmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Kotinin setine ait olası metabolitlerden 3'-hidroksikotininin oluşumuna test erlenlerinde rastlanmamakla birlikte, proteinler ve nikotinamid piki ile örtülmüş olabileceği ihtimali gözönüne alınarak farklı bir HPLC sistemi ile diğer olası metabolitlerin ayırımı sağlanamasa da 3'-hidroksikotinine ait pikin tutulma zamanı daha geriye alınmaya çalışıldı. Bu sistem tüm setin kromatografik ayırımı için kullanılmadı çünkü, 5'-hidroksikotinin ve norkotinin olası metabolitlerine ait pikler ayırlanamaktaydı. Dolayısıyla yalnızca 3'-hidroksikotinin metabolitinin oluşup oluşmadığının ispatı için B₅ HPLC programı ile inceleme yapıldı.

Standartlar karışımı ve fenobarbitalle indüklenmiş mikrozomlarla yapılan test 1 metabolik ekstrasına ait kromatogramlar Şekil 22A ve Şekil 22B'de görülmektedir.

HPLC kromatogramlarından da izleneceği gibi 3'-hidroksikotinin standartına (R_t=9.15) karşılık gelen bir pik oluşumuna testte rastlanmamıştır.

7.6.2.1 Kotinin ve Olası Metabolitlerinin Miktar Tayini

Kotinin ve olası metabolitlerinin miktar tayinini yapabilmek için gerekli kalibrasyon eğrileri 5.2.13.2’de anlatılan yöntemle göre çalışılarak elde edildi. Substrat ve olası metabolitlere ait kalibrasyon eğrileri Şekil 23’te görülmektedir. Eğrilerin 0.99’den büyük korelasyon katsayıları ile lineer olduğu görüldü. Dolayısıyla, her bir bileşiğin konsantrasyon ve pik alanları oranları arasında pozitif bir korelasyon olduğu söylenebilmektedir. Bu kalibrasyon eğrileri, bu çalışma grubunun *in vitro* metabolizmasında miktar tayini için kullanılmıştır.

Kotinin ve olası metabolitlerinin farklı konsantrasyonlarda boş dokuya katım yapılmasından sonra S₃ HPLC sistemi ile yapılan analizleri sonucu bu sistemde kotininin 90-720 nmol, 3’-hidroksikotininin 52-520 nmol, norkotininin 7.5-180 nmol, 5’-hidroksikotininin 6.5-156 nmol, nikotinamidin 20-240 nmol değerleri arasında bir lineerlik gösterdiği bulunmuştur (Tablo 6.8). Bileşiklerin bu konsantrasyon aralıklarındaki geri kazanım değerleri sırasıyla %77-82, %83-93, %89-91, %90-99, %87-104 olarak hesaplanmıştır (Tablo 6.9).

Her bir standarta ait regresyon analizi eşitliği ve korelasyon katsayıları tablo 6.8’de görülmektedir.

Şekil 24A’da da görüldüğü gibi boş inaktif dokuya ait kromatogramda interfere olan herhangi bir pike rastlanmamıştır.

İnaktif inkübasyon ortamına katım yapılmış 5’-hidroksikotinin ve norkotininin kromatografik ayırımı Şekil 24B-24E’de görülmektedir.

Metabolik test ekstrelerinde oluşan 5’-hidroksikotinin miktarı direkt olarak çizilmiş kalibrasyon grafiğinden okundu.

Bu sete ait diğer bileşiklerden nikotinamid, 3'-hidroksikotinin ve kotininin katımı ile yapılan ekstraksiyon çalışmasına örnek Şekil 24F'de görülmektedir.

7.6.3 Norkotinin Metabolizması

Norkotininin sıçan karaciğerlerinden elde edilen mikrozomal preparatlarla NADPH varlığında yapılan *in vitro* inkübasyonundan sonra elde edilen inkübatların diklorometan ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen metabolik ekstratların HPLC ve İTK yöntemleri ile analizleri yapıldı.

Substrat ve olası metabolitlerin S₁ mobil fazının kullanıldığı HPLC sistemine uygulanması sonucu elde edilen standart karışımına ait kromatogram Şekil 25A'da görülmektedir.

Norkotinin setine ait metabolik test 1 ve test 2 ekstratlarının HPLC sistemine enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogramların şekilleri sırasıyla 25B ve 25C'de görülmektedir. Test 1 erlenine ait kromatogramda nikotinamid 6.85, substrat 11.32, asetanilid ise 17.18 dakikalık tutulma zamanı göstermişlerdir.

Test 1 ve test 2 kromatogramlarında gözlenen ve 8.05 dakikada tayin edilen pikin oluşması beklenen metabolit 4-(3-piridil)-4-oksobutiramid olduğu düşünülmüştür. Ancak bu pikin ve aynı zamanda 8.4 dakikada elüe olan pikin de kontrol erlenlerine ait kromatogramlarda da tayin edilmesi ve test erlenlerinde kantitatif olarak fark gözlenmemesi bu piki oluşturan maddenin metabolit olmadığı bulgusunu ortaya çıkartmıştır.

Denatüre indüklenmiş mikrozom ve kofaktörden oluşan kontrol 1 ve normal mikrozom ve tampondan meydana gelen kontrol 4 erlenlerine ait metabolik ekstratların HPLC analizini gösteren kromatogramlar sırasıyla Şekil 25D ve Şekil 25E'de görülmektedir.

Norkotininin karaciğer mikrozomları ile yapılan inkübasyonunda da indüklenmiş mikrozom ile kofaktörlerin substratsız birlikte inkübasyona tabi tutulduğu kontrol 6 erleninin metabolik ekstresinde (Şekil 25F) ekstraksiyonda ortama katılan asetanilid ve 6.80 dakikalık tutulma gösteren pikin varlığı gözlenmektedir.

7.6.4 Nornikotin Türevi Substratların Karaciğer Mikrozomlarıyla Yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Sonuçlar

Nornikotinin başlangıç maddesi olarak kullanıldığı sentez edilen bileşiklerin inkübasyonu da fenobarbitalle indüklenmiş ve normal karaciğer mikrozomları ile yapıldı.

7.6.4.1 N-1'-benzilnornikotin (I)'in Metabolizması

Tersiyer amin yapısındaki substratların birincisi olan N-1'-benzilnornikotin (I) ve olası metabolitlerine ait standartların S₄ sistemi ile gerçekleştirilen HPLC analizine ait kromatogram Şekil 26A'da verilmiştir. Gradient teknikle yapılan bu ayırımda polar metabolit olan nornikotin 2.52 dakikalık bir tutulma gösterirken, diğer olası metabolitleri olan aldehit, amid ve laktam yapısındaki bileşikler birbirine yakın zamanda elüsyon göstermişlerdir (11.30, 13.22 ve 14.48 dak.).

İnkübasyon protokolünde kofaktör çözeltisi yerine tampon çözelti eklenerek düzenlenmiş kontrol inkübasyonlarında yalnızca 29.10 dakikada gözlenen değişmeden kalan substrat görülmektedir (Şekil 26B).

Bu setin test inkübasyonlarının HPLC kromatogramı incelendiğinde 11.42 dakikalık tutulma zamanında gözlenen pikin benzaldehite karşılık geldiği (Şekil 26C), standart karışımına ait HPLC verileriyle karşılaştırma yapıldığında anlaşılmıştır.

Benzaldehit metabolitine karşılık gelen pike kontrol deneylerine ait metabolik ekstrelerde rastlanmamış olup reaksiyonun enzimatik kaynaklı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

7.6.4.2 N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin (II)'in Metabolizması

N-1'-(p-klorobenzil) nornikotin (II)'in, bileşik (I) ile aynı koşullarda yapılan mikrozomal metabolizma çalışması sonrasında metabolik ekstrelerin S₅ sistemi ile HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir.

Birbirinden oldukça farklı polariteye sahip substrat ve metabolitleri ancak gradient teknik ile çalışıldığında daha iyi bir ayırım sağlanmış ve analiz süreleri kısaltılabilmektedir. Mobil faz sisteminin son pH'ı 3'e ayarlanarak klor ile sübstitüe olmuş bileşiklerin kolondan daha erken elüe oldukları gözlenmiştir. Bu sete ait standartlar karışımına ait kromatogram Şekil 27A'da verilmiştir.

Denatüre mikrozomların kullanıldığı kontrol inkübasyonlarında görülen ve 35.05 dakikalık tutulma zamanında gözlenen pik metabolize olmadan kalan substrata karşılık gelmektedir (Şekil 27B).

İndüklenmiş mikrozomların enzim kaynağı olarak kullanıldığı test inkübasyonuna ait HPLC kromatogramında 10.33, 12.9 ve 26.17 dakikalık tutulma zamanlarında gözlenen piklerin sırasıyla amid (IIa), laktam (IIb) ve p-klorobenzaldehite karşılık gelmekte olduğu gözlenmektedir (Şekil 27C). Bununla birlikte normal mikrozomların kullanılarak yapıldığı test inkübasyonuna ait HPLC kromatogramında Şekil 27D'den de görülebileceği gibi yine amid, laktam ve aldehit metabolitleri saptanmış olup miktarları indüklenmiş mikrozomlarla yapılan test erlenindekine oranla çok daha az oranda tespit edilmiştir.

7.6.4.3 N-1'-Benzoilnornikotin (Ia)'in Metabolizması

Sentezlenen bileşiklerden amid yapıdaki substratların birincisi olan N-1'-benzoilnornikotin metabolizması sonucu elde edilen metabolik ekstraların analizi S₆ izokratik HPLC sistemi ile yapılmış olup, hidrolitik reaksiyon sonucu oluşması beklenen nornikotin metaboliti standartlara ait kromatogramda 5.72 dakikalık, substrat ise 13.20 dakikalık tutulma göstermiştir (Şekil 28A).

Kofaktörlerin ilave edilmediği kontrol inkübasyonuna ait kromatogramda Şekil 28B'den de görülebileceği gibi metabolize olmadan kalan substrat 13.52 dakikada görülmektedir.

İndüklenmiş mikrozomlarla yapılan test inkübasyonuna ait HPLC kromatogramında 5.77 dakikalık retensiyon zamanında gözlenen pik nornikotin metabolitine karşılık gelmekte olup, metabolit pikinden önce 4.25 ve 5.05'te iki pike rastlanmıştır (Şekil 28C).

Özellikle 5.05 dakikalık tutulma zamanında gözlenen pik oldukça yüksek oranda oluşmakta olup, mevcut standart bileşiklerden hiçbirine karşılık gelmemekte ve yapısı bilinmemektedir. Bu pik kontrol inkübatlarında da az miktarda görülmekte olup, test erlenlerinde gözlenen pike ait alanın daha yüksek olması, sözkonusu metabolitin enzimatik reaksiyonla oluştuğunu göstermektedir.

Normal mikrozomlarla yapılan test inkübasyonuna ait HPLC kromatogramında da nornikotin metabolitinin oluşumu 5.77 dakikada görülmekte olup indüklenmiş mikrozomlarla karşılaştırıldığında hem nornikotin metaboliti hem de karakterize edilemeyen diğer metabolitlere ait piklerin alanında nicel bir azalma gözlenebilmektedir (Şekil 28D). Dolayısıyla, sözkonusu metabolik reaksiyonların fenobarbitalle indüklenabilen sitokrom P-450 izoenzimleri tarafından katalizlenmiş olabileceği düşünülmektedir.

7.6.4.4 N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (IIa)'in Metabolizması

Metabolizmasını araştırdığımız substratların sonuncusu ve amid yapısındaki N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (IIa) ve olası metaboliti nornikotin ayrımı için S₇ izokratik HPLC sistemi kullanıldı. Standartlar karışımına ait kromatogram Şekil 29A'da görülmektedir.

Kofaktörlerin ilave edilmediği kontrol inkübatlarında yalnızca metabolize olmadan kalan substrata ait pik 8.70 dakikada görülürken (Şekil 29B), metabolik test ekstrelerinde hidroliz metaboliti olan ve 5.88 dakikalık tutulma zamanı gösteren nornikotin oluşumu gözlenmektedir (Şekil 29C).

7.7.1 Beyin Homojenatı İle Yapılan Metabolik Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

Nikotinle meydana gelen nörofarmakolojik etkilere metabolitlerinin önemli ölçüde katkısı olabileceği düşünüldüğünden, bu metabolitlerin beyinde varlığı ve miktarını tayin amacıyla sıçandan izole edilen beyin homojenatının kullanıldığı çalışmamızda seçilen nikotin ara metabolitlerinin metabolize olmadığı gözlenmiştir.

Önceden yapılan farmakokinetik çalışmalar farklı deney hayvanlarına farklı yollardan nikotin verildiğinde beyinlerinde nikotin varlığını göstermiş olsa da (10,55) bu araştırmalar beyinde nikotin ve metabolitlerinin birbiri ile göreceli konsantrasyonunu tayin etmemekte ve metabolitlerin akibeti ile ilgili kapsamlı bilgi vermemektedir.

Fındık faresi üzerinde yapılan metabolizma deneyleri, karaciğer, böbrek ve akciğer dokuları ile nikotinin kotinine metabolize olduğunu ancak beyin dokusu ile yapılan deneylerde metabolit oluşumuna rastlanmadığını göstermekte olup (276) bulgularımızı desteklemektedir.

Nikotinin metabolizmasının kobay ve sıçan beyin homojenatı ile araştırıldığı çalışmalarında Jacob ve ark. (145), kotinin metabolitinin oluşumunu GC-MS analizleri ile göstermişlerdir.

Ghosheh ve ark. (104) akut periferik nikotin verilmesinden sonra, GC-MS analizleri sonuçlarına göre sıçan beyni süpernatantı ekstraktlarında kotinin, nornikotin ve norkotinin oluşumunu gözlemlemişlerdir. Ancak, akut uygulamadan sonra beyinde bu metabolitlerin çok çok düşük miktarlarda bulunması, miktarlarının tayinine imkan vermemiştir.

Dolayısıyla bu bulgu, sıçan beyninin *in vitro* olarak kullanıldığı çalışmamızda ara metabolitlerden metabolit oluşumunun belki de çok az oranda da olsa gerçekleştiği ancak gözlenemediği sonucunu akla getirmektedir. Burada, beyindeki enzim miktarının karaciğerdeki konsantrasyona göre kıyaslanamayacak kadar az olduğu düşünülmelidir (28).

Sıçanlara tek doz (0.54 mg/kg) nikotin verildikten sonra enjeksiyonu takip eden 4. saatte nikotinin tespit edilen miktarı 12.1 ng/g beyin, metabolit kotinin, nornikotin ve norkotininin miktarı sırasıyla 44.6, 11.7, ve 3.1 ng/g beyin olarak bulunmuştur (60).

Ancak tekrarlanmış periyotlarla nikotinin alınımdan sonra hem nikotin hem de metabolitlerinin beyinde birikimi sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde bulunmuş olup, beyindeki nikotin konsantrasyonlarının plazmasındaki nikotin ve kotinin konsantrasyonlarından bağımsız düşünülmesi gerekliliği sonucunu ortaya çıkartmıştır (105).

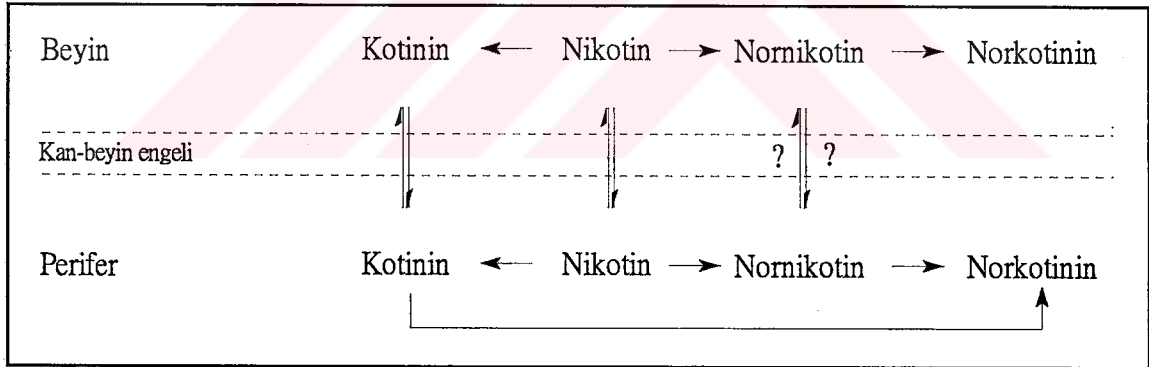
In vitro deneyimizin sonucuna göre kotininin metabolize olmaması *in vivo* olarak bu substratın metabolizmasının çalışıldığı deneylerle korelasyon göstermektedir.

Kotininin periferik alınımdan sonra elde edilen bulgular norkotininin periferde oluştuğunu göstermektedir (36,67,201,202). Crooks ve ark. (59), S-(-)- [G-³H]

kotinin kolaylıkla kan beyin engelini aşabilmesine rağmen bu substratın periferik alımından sonra santral sinir sisteminde norkotinin varlığına rastlamamışlardır. Dolayısıyla, nikotinin periferik alımından sonra beyinde saptanan norkotininin, beyinde nornikotinin 5'-karbon oksidasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir. Ancak *in vivo* metabolizma çalışmaları ile nornikotinin beyinde hangi şekilde bulunduğunu ispatlamak imkansızdır. Çünkü, nikotinin periferde N- demetilasyon ile nornikotine dönüşüp oradan kan-beyin engelini aşıp beyinde bulunması ya da alternatif olarak, lokalize halde beyinde bulunan nikotinin N-demetilasyonu ile bulunması durumu söz konusudur.

Periferik nikotin alımından sonra nikotin 30-60 dakika gibi kısa bir süre geçerken, kotininin beyne nikotinden çok daha kısa sürede dağıldığı ve santral sinir sisteminde nikotinden daha uzun süre kaldığı saptanmıştır (58).

Nikotinin *in vivo* alımından sonra beyinde nikotin metabolitlerinin oluşumu aşağıdaki şekilde özetlenebilir.



Dolayısıyla bu oluşumu en iyi açıklayabilecek bulgu *in vitro* çalışma ile elde edilebilmektedir.

Sıçan beyni ile nornikotinin ya da kotininin norkotinine metabolize olmaması, araştırmamızdan elde edilen bulgularla birleştirildiğinde kısmen de olsa bu deney hayvanının beyinde *in vivo* olarak tespit edilen norkotininin periferde nikotin metaboliti olarak oluşuktan sonra kan beyin engelini geçmesi sonucu meydana geldiğini düşündürmektedir.

Kotininden başka yine periferik nikotin alımından sonra beyinde nornikotin ve norkotinin metabolitleri de bulunmuştur.

Nikotinin periferik alımından sonra beyinde nornikotin metabolitinin varlığı ilk kez Crooks ve ark. (59) tarafından bulunmuştur. Ancak bu çalışmada nornikotinin metabolik olarak beyinde mi oluştuğu yoksa nikotinin periferdeki metabolizmasından sonra mı beyne dağıldığı soruları açıklık kazanamamıştır. Tütündeki total alkaloidlerin %20'sini oluşturan nornikotin, sıçan beyin membranlarında [³H]-nikotinin yüksek affinitesini inhibe etmektedir (55).

Ghosheh ve ark. (105), sıçanlara nikotin enjeksiyonunun sayısının artmasıyla, beyindeki kan oranlarının nornikotinin beyne dağılımında artış olduğunu, sürekli nikotin infüzyonu ile kandaki nikotin ve nornikotin konsantrasyonları sabit iken beyinde bu oranların 4 katı olduğunu kaydetmişlerdir.

Nikotinle kıyaslandığında nornikotinin de santral sinir sisteminde daha uzun süre bulunabildiği öne sürülmektedir (58). Bu nedenle nornikotinin, kronik alımında, daha uzun plazma yarılanma ömrüne sahip olduğu için bu metabolitin beyinde birikebileceği düşünülebilir.

Bundan başka, nornikotin aynı zamanda tütünde bulunan major bir alkaloid olduğundan, beyinde bu bileşiğin görülmesine ayrıca bir neden oluşturmaktadır. Dolayısıyla, nikotini aynı miktarda alan bireylere oranla, tütün dumanına maruz kalan bireylerde santral sinir sisteminde nornikotin birikimi daha yüksek oranda olacaktır.

In vivo, tekrarlanan dozlarla kotinin konsantrasyonlarının beyinde sabit bulunması, nikotinle oluşan etkilerde kotininden ziyade nikotinin sorumlu olabileceği öne sürülmüştür.

İnsan beyin dokusunda olduğu gibi (28) deney hayvanlarının beyinde de sitokrom P450 ve FMO enzim sistemleri tespit edilmiş olup (207,260), karaciğerdeki

P450 enzimlerine yapısal olarak çok benzeyen ve fenobarbital ya da 3-metilkolantren gibi indükleyicilerle seçici olarak indüklenabilen izoenzimlerin varlığı bulunmuştur (6). Son yıllarda alkol bağımlılarında beyindeki sit P450E1 izoenziminin indüklendiği kaydedilmiştir (5).

Ayrıca nikotinin kendisi de beyindeki P450 enzimlerinin ve bazı monooksijenaz aktivitelerinin seçici indüksiyonuna sebep olmaktadır (7,260).

Normal yani fenobarbitalle indüklenmemiş beyin homojenatı ile yapılan deneylerde metabolit bulunamamış olması, aynı sonuçların indüklenmiş homojenatlarla da elde edilmesi ile desteklenmektedir.

Jacob ve ark. (145), kobay ve sıçan beyin homojenatı ile nikotinin metabolizmasını araştırdıkları deneylerinde inkübasyonda kofaktör karışımını ilave etmedikleri çalışma grubunda kotinin miktarının kofaktörlü protokolden farklı olmadığını gözlemişlerdir.

Nornikotin, kotinin ve norkotinin sıçan beyin homojenatı ile inkübasyonları sonucu metabolik ekstrelerde metabolit oluşumuna rastlanmamasından dolayı, inkübasyon koşullarında değişiklikler yapılarak elde edilen sonuçların tartışılması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla beyin homojenatlarında substratları metabolize edebilecek düzeyde NADPH bulunmasına rağmen inkübasyon ortamına kofaktör ilave edilmiş ve inkübasyon süresi bir grup test deneylerinde 30 dakikadan 60 dakikaya çıkartılmıştır. İnkübasyon parametrelerinde bu değişikliklerle birlikte her üç substratla da inkübasyon üçer kez tekrarlanmış ancak metabolit oluşumuna rastlanamamıştır.

Yapılan araştırmalar P450 ve FMO enzimlerinin beyinde en çok sinir hücrelerinde lokalize olduğunu göstermektedir (260). Sinir hücrelerinin rejenerasyonla kendini yenileme yeteneğinin düşük olmasından dolayı beyinde birikecek nikotin metabolitlerine karşı beynin hassasiyet gösterip, hücre fonksiyonlarının harabiyeti söz konusu olabilecektir.

Beyinde metabolize olmayan nikotin metabolitlerinin birikimi ve bunların tanınması, tütün ürünlerinin kullanımının, santral sinir sistemine etkisinin katkısının anlaşılması ve nikotinin nörokimyasal ve farmakolojik etkileri ile ilgili temel kriterlerin açıklanması yolunda yeni bir kaynak oluşturmaktadır.

Üzerinde çalıştığımız substratların sıçandan izole edilen beyin dokusu ile metabolizmasında herhangi bir enzimatik reaksiyona rastlanamamış olmakla birlikte gelecekteki çalışmalarda hamster, kobay gibi farklı ve büyük deney hayvanlarının beyni ya da özellikle insan beyninin enzim kaynağı olarak kullanılması, bu sayede *in vitro* ve *in vivo* bulguların kıyaslanması hedefimiz olmuştur.

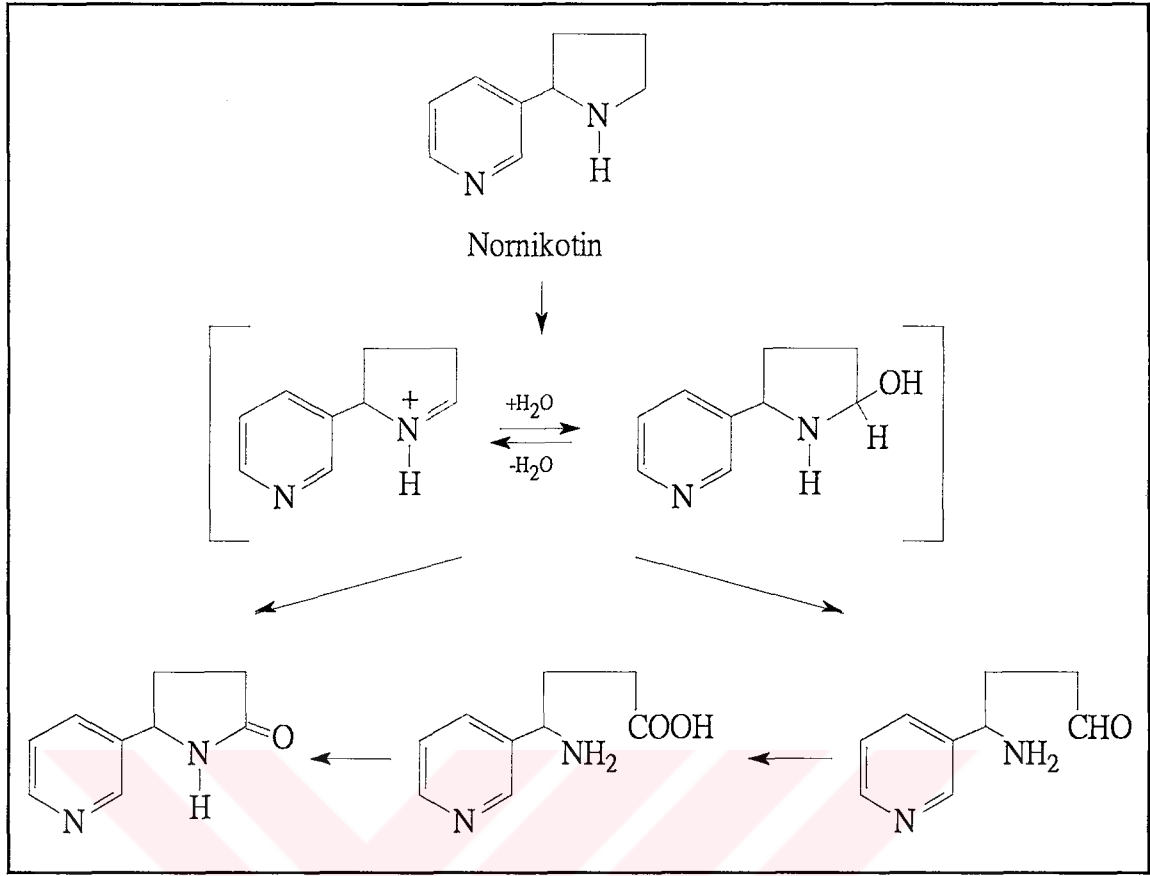
7.7.2 Karaciğer Mikrozomları İle Yapılan Metabolik Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

Tezimizin bir bölümünün konusunu oluşturan nikotin ara metabolitlerinden nornikotin, kotinin ve norkotininin metabolizması üzerinde yapılan çalışmaların sonucu olarak nornikotinin laktam metaboliti norkotinine, kotininin hidroksilasyon metaboliti 5'-hidroksikotinine metabolize olduğu, norkotininin ise metabolize olmadığı gözlenmiştir.

Nornikotinin karbon oksidasyonu ile oluşan norkotininin metabolitinin miktarı normal karaciğer mikrozomları ile 80 nmol/mL olarak bulunurken fenobarbitalle indüklenmiş mikrozomlarla 127 nmol/mL olarak tayin edilmiştir.

Nornikotinin karbon oksidasyonu hem *in vitro* (3,245) hem de *in vivo* (319) deneylerle araştırılmış ve norkotininin major metabolit olduğu bulunmuştur.

Nornikotinden norkotinin oluşumunun nikotinden kotinin metabolit oluşumuna benzer bir mekanizma ile olduğu öne sürülmektedir. Karbinolamin araürününden açık zincir aldehidin oluşumu sonra da bu yapının asit metabolit aracılığıyla norkotinine siklizasyonu düşünülmektedir.



Nornikotinden norkotininin oluşumu

Karbinolamin ara ürünü ile dengede olduğu öne sürülen iminyum iyonunun nükleofillerle reaksiyona girebileceği düşünülmektedir. Çünkü, siyanür iyonları varlığında sekonder siklik aminlerin karaciğer mikrozomları ile inkübasyonundan tersiyer alisiklik aminlerin benzer reaksiyonlar gösterdiği gözlenmektedir (211).

Fenobarbitalle mikrozomları indüklenmiş sıçanlarla yapılan deneylere ait metabolik ekstrelerde norkotin oluşumunun artmış olması enzimatik reaksiyonun daha önce de belirtildiği gibi sitokrom P450 enzimi ile katalizlendiğini göstermektedir.

Nikotin oksidasyonunda fenobarbitalle indüklenebilen sitokrom P450 izoenzimlerinin katalizörlüğü çok sayıda çalışmanın sonucu olarak literatürde kayıtlıdır (219,220,251).

Nikotinden sonra metabolik yolları üzerinde diğer tütün alkaloidlerine göre en çok araştırma yapılan alkaloid kotinindir. Ancak kotininin *in vitro* metabolizması hakkında sınırlı sayıda bilgi mevcuttur.

Nikotinin metabolizması üzerinde yapılan araştırmaların çoğu nikotinin sonraki metabolik yollarının kotinin üzerinden meydana geldiğini göstermektedir (143,317).

Kotinin de nikotin gibi hem karbon hem de azot oksidasyona uğrayabilir.

İnsanlarda nikotinin yaklaşık %70'i kotinine metabolize olmaktadır (141). Kotinin de *in vivo* olarak daha sonra önemli ölçüde metabolize olmaktadır. Yüksek dozda kotinin alan bireylerde major idrar metabolitinin 3'-hidroksikotinin olduğu (36) daha sonra maymunlar üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarda bu metabolitin idrarda trans izomeri şeklinde bulunduğu (67) kaydedilmektedir.

Kotininin hidroksilasyonunun pirolidin halkasının 3'-konumunda meydana geldiği ve hem cis hem de trans izomerinin oluştuğu kaydedilmektedir. Bu oksidasyon ürünleri tütün bağımlılarının idrarında ve nikotinin metabolitleri olarak gözlenmektedir (224,317). Li ve ark. (178), bu metabolitlerin kotininden kobay karaciğer mikrozomlarında da oluştuğunu göstermişlerdir.

Bu konu ile ilgili olarak yapılan kantitatif çalışmalar trans-3'-hidroksikotininini insanda ve deney hayvanlarında (63,97,226,318) *in vivo* major metabolit olarak göstermiştir.

Normal ve indüklenmiş karaciğer mikrozomları ile 3'-hidroksikotinin oluşumu üç ayrı inkübasyonla kontrol edilmiş ancak metabolik ekstrelerde gözlenememiştir. Bu bileşik pek çok türde *in vivo* major metabolit olarak bulunmasına rağmen *in vitro* oluşumuna ilişkin kesin delillerin olmadığı literatürde de kayıtlı olup bizim bulgularımızı desteklemektedir (295). Enzim indüksiyonu yapılarak izole edilmiş organ ve tüm doku preparasyonlarını kullandıkları deneylerinde Foth ve ark. (97), farede trans-3'-hidroksikotinin metabolitinin oluşmadığını gözlemişlerdir.

Kobaydan izole edilen karaciğer mikrozoamları ile kotininin 4-(3-piridil)-4-okso-N-metilbutiramid ve 3'-hidroksikotinine metabolize olduğu, ketoamidin major metabolit olarak gözleendiği kaydedilmektedir (178). 4-(3-Piridil)-4-okso-N-metilbutiramid metabolitinin maymunda da nikotinden oluştuğu ancak siklik tautomeri olan 5'-hidroksikotininin %80'den fazla oranda daha fazla bulunduğu bildirilmiştir (229).

Denatüre edilmiş mikrozoamların kullanıldığı ve kofaktörlerin ilave edilmediği kontrol denemelerinde 5'-hidroksikotinin metabolitinin oluşumunun gözlenmemiş olması reaksiyonun enzimatik kaynaklı olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır.

Fenobarbitalle indüklenmemiş normal sıçan karaciğeri mikrozoamlarının kullanıldığı metabolik ekstrelerde 5'-hidroksikotinin metaboliti 16 nmol/mL miktarında oluşurken, fenobarbitalle mikrozoamların indüklendiği metabolik ekstrelerde 5'-hidroksikotinin metaboliti 28 nmol/mL oranında oluşmuştur.

Murphy ve ark. (212), tütün bağımlılarında kotininin, 5'-hidroksikotinine metabolizmasında sitokrom P4502A6 enziminin katalizör olduğunu öne sürmüşlerdir. Dolayısıyla sitokrom P450 enziminin indüksiyonunu sağlayan fenobarbitalin uygulandığı mikrozoamlarla 5'-hidroksikotinin metabolitinin miktarının artmış olması bu reaksiyonun da P4502A6 enzimi ile katalizlenebileceği sonucunu ortaya çıkartmaktadır.

N-Demetilkotinin (norkotinin) metaboliti tütün bağımlılarında ve ayrıca nikotin ve kotinini farklı yollardan olan bireylerde ve bazı tür hayvanlarda idrar metaboliti olarak bulunmuştur (35,201).

Hamster, kobay ve farenin karaciğer mikrozoamlarını kullanarak yaptıkları araştırmalarında Li ve ark. (178), norkotinin metabolitinin oluşumuna rastlamamışlardır.

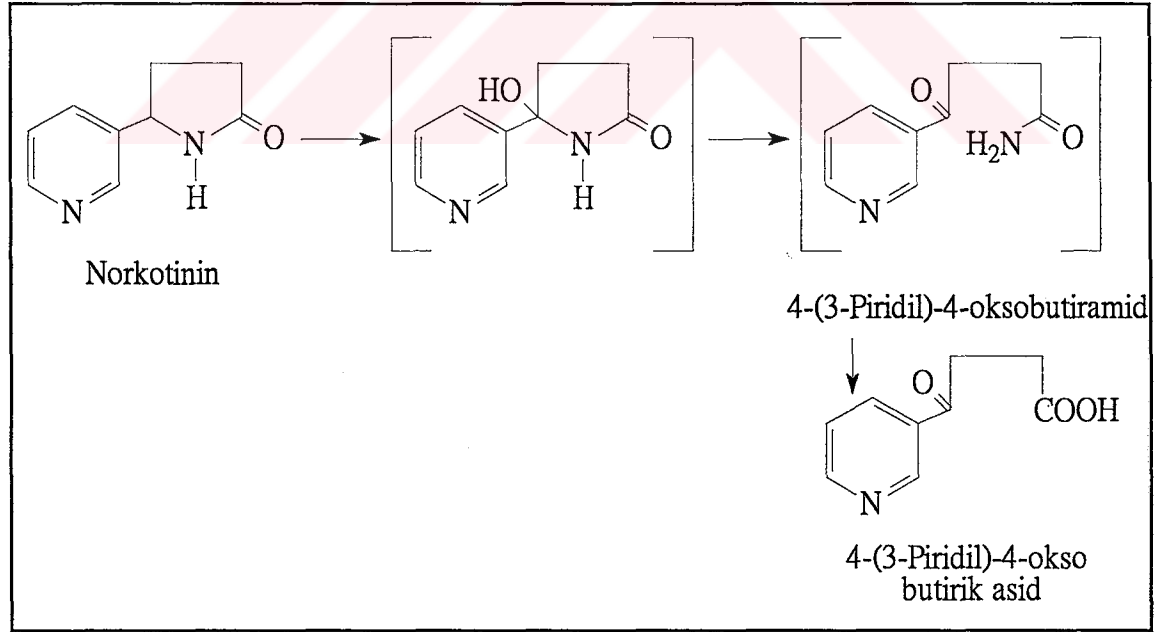
Dolayısıyla, fenobarbitalle mikrozoamlarının indüklendiği sıçan karaciğeri ile de kotininden norkotinin metabolitinin tayin edilememiş olması önceki bulgularla

doğruluk kazanmakta olup, norkotinin metabolitinin çeşitli deney hayvanlarının yalnızca idrar metaboliti olduğu sonucunu ortaya çıkartmaktadır.

Kotininin kobay ve tavşan karaciğerinden hazırlanan preparatlarla inkübasyonundan N-metil grubunda hidroksilasyonla 1'-N-hidroksimetilnorkotinin metabolitinin oluşumu tespit edilmiş olup (177) bu bileşiğin stabil olduğu ve *in vitro* olarak norkotinin oluşumuna neden olmadığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak nikotin metaboliti, aynı zamanda bir tütün alkaloidi olan, tütün bağımlılarının (45) ve nikotin verilen sıçanların idrarında (168,275) tüm nikotin metabolitlerinin %1-2'si oranda oluşan norkotininin oluşum mekanizmasının başlıca nornikotinin oksidasyonu ile olduğu düşünülmektedir.

Norkotininin, 4-(3-piridil)-4-oksobutirik asit oluşumunda bir ara metabolit olduğu, 5'-hidroksinorkotinininden daha sonra deaminasyona uğrayan karşılık gelen hidroksilasyon metabolitlerine dönüştükleri düşünülmektedir.



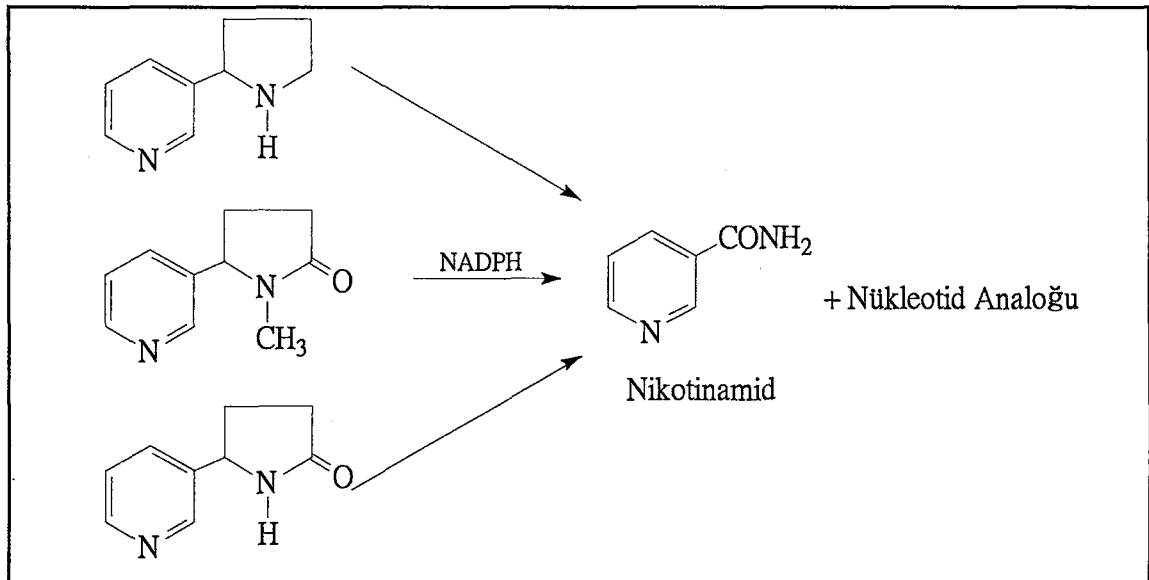
7.7.3 Nikotinamid Oluşumu İle İlgili Sonuçların Değerlendirilmesi

Tez konumuzun kapsamına giren konulardan biri de nikotin ara metabolitlerinden nikotinamidin oluşup oluşmadığının incelenmesiydi.

Beyin homojenatı ve karaciğer mikrozomları ile yapılan deneyler sonucu nornikotin, kotinin ve norkotinin inkübatlarında kofaktörlerin ilave edildiği tüm deneylerde nikotinamidin oluşumu görülmüştür. Özellikle hem kofaktör hem de mikrozom içeren test erlenlerinde nikotinamidin daha yüksek oranda oluştuğu makroskopik olarak da kolaylıkla görülebilmektedir. Buna karşılık kofaktör yerine yalnızca tampon çözelti içeren kontrol denemelerinde nikotinamidin oluşmaması bu maddenin, nikotin ara metabolitlerinin NADPH ile yarışmaya girmesi ve kofaktörün yapısının bozulması ile oluştuğunu düşündürmektedir.

Tüm metabolik test ekstrlerinde nikotinamidin oluşumu HPLC kromatogramları incelendiğinde gözlenebileceği gibi, İTK ile ilgili kromatogramlarda da (Şekil 12,14,16) kolaylıkla görülebilmektedir.

Nornikotin karaciğer mikrozomları ile yapılan metabolizması sonrası elde edilen metabolik ekstrlerin diode-array detektör bağlı HPLC sistemine uygulanması ile standart nikotinamid ve enzimatik reaksiyonla oluşan nikotinamidin UV spektrumları karşılaştırılmış ve nikotinamidin yapısı kanıtlanmıştır (18.1).



Tütün alkaloidi ve aynı zamanda nikotin metabolitleri olan bu bileşiklerden nikotinamidin kofaktörlerin yapısının bozulması ile oluşması nikotin ile birlikte alınan diğer bileşiklerin metabolik reaksiyonlarında birtakım olumsuz faktörlere yol açabilecek ve dolayısıyla toksik sonuçlar gözlenebilecektir.

Yapısında piridin grubu taşıyan bileşiklerde nikotinamid parçalarının değişiminin DNAaz ile oluştuğu düşünülmektedir. Nikotin-TPN'nin, TPN'ye bağlı glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve glutamat dehidrojenaza karşı yarışmalı inhibisyon gösterdiği bulunmuştur (233). Nikotinamid analoglarının oluşumunda NAD glukohidrolazın rol oynadığı deney hayvanlarının beyinde yapılan araştırmalarla tespit edilmiştir (187).

Nikotin ve kotinin injekte edilen tavşanların karaciğer, akciğer ve böbrek ekstrelerinde pmol düzeyinde kotinin nükleotid analogları bulunmuştur (284).

NAD-az transglukozidik aktivitenin özellikle beyinde yüksek olması ve radyoaktif nikotinin intravenöz uygulamadan sonra çok kısa bir zamanda sıçan beyinde birikiminden dolayı, nikotin ve metabolitlerinin beyinde nükleotid analoglarının oluşumu önemli olabilecektir.

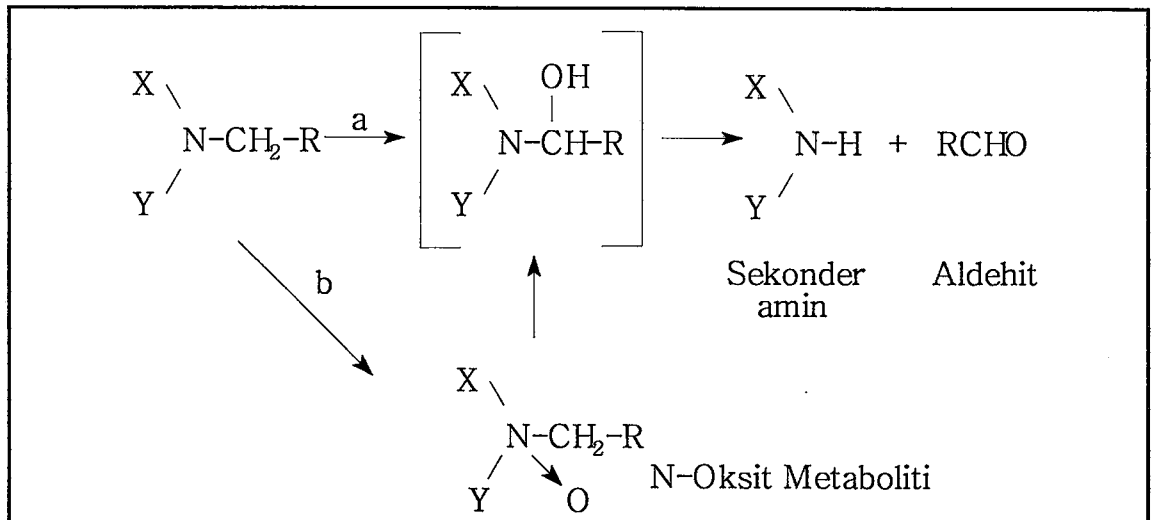
Nikotinin toksisitesine yol açan moleküler olaylar henüz tamamen aydınlatılamamakla birlikte bu alkaloid ve metabolitlerinin nükleotid analoglarının rol oynaması olasılığı oldukça yüksek olabilmektedir. Nükleotid analoglarının oluşumu nikotinin teratojenik etkilerine katkıda bulunmaktadır. 3-Asetilpiridin ve 6-aminonikotinamid gibi piridin türevlerinin NAD-az değişim reaksiyonu ile NAD analoglarını meydana getirdikleri ve bunun sonucu olarak da tavuk embriyosunda spesifik gelişim bozukluklarına neden olduğu tespit edilmiştir (284). İnsan dokularında da bu analogların varlığı ispatlandığında tütün kullanımı ile ilgili hastalıklarda bu bileşiklerin etkisi daha çok dikkati çekecektir.

Alzheimer (232) ve Parkinson (53) gibi santral sinir sistemi kaynaklı hastalıklarda nikotinin tedavi edici özelliğinin araştırılmasında metabolik reaksiyonlarda açığa çıkabilecek nikotinamidin rolünün üstünde durularak araştırılması gerekebilecektir. Bu kapsamda döteryumla işaretlenmiş substratların kullanılarak nikotinamid oluşumunun incelenmesi gelecekteki araştırma konularımızın hedeflerinden birini oluşturmaktadır.

7.7.4 Nornikotin Türevi Substratların Karaciğer Mikrozoamlarıyla Yapılan Metabolizmasından Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

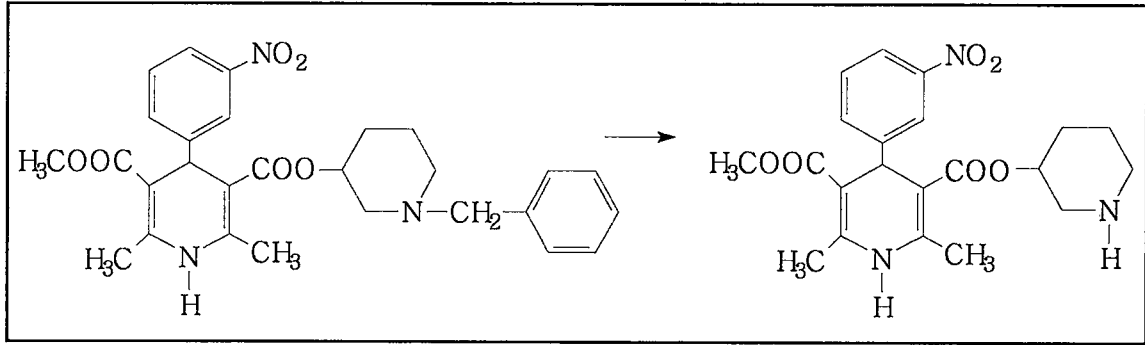
Tersiyer amin yapısındaki substratların (I ve II) sıçan karaciğeri mikrozomal preparatı ile yapılan metabolizmasından elde edilen sonuçlar her iki aminin de N-dealkilasyona uğradığını, benzilik karbonda oksidasyon sonucu oluşan dayanıksız karbinolamin ara ürününün parçalanarak karşılık gelen aldehit ve amin metabolitlerini verdiğini göstermektedir.

N-dealkilasyon için iki ayrı mekanizma öne sürülmektedir. Bunlardan birincisi (a), α -karbon atomunda primer oksidatif atak ile N-metilol oluşumu, stabil olmayan bu yapının da hızlıca dealkillenmiş ürün ve karşılık gelen aldehite dönüşmesidir. Alternatif mekanizma (b) ise azotta bir metabolik atak ile N-oksit oluşumu, bu yapının da yine N-metilol aracılığıyla dealkillenmiş ürün ve karşılık gelen aldehiti vermesidir (115,205).



N-Debenzilasyon, çok sayıda ilaç maddesi ve ksenobiyotiğin *in vivo* ve *in vitro* major metabolik yoludur. Sentezlediğimiz substratlardan aminler benzilik karbon oksidasyonu ile stabil olmayan karbinolaminlerine dönüşmektedir.

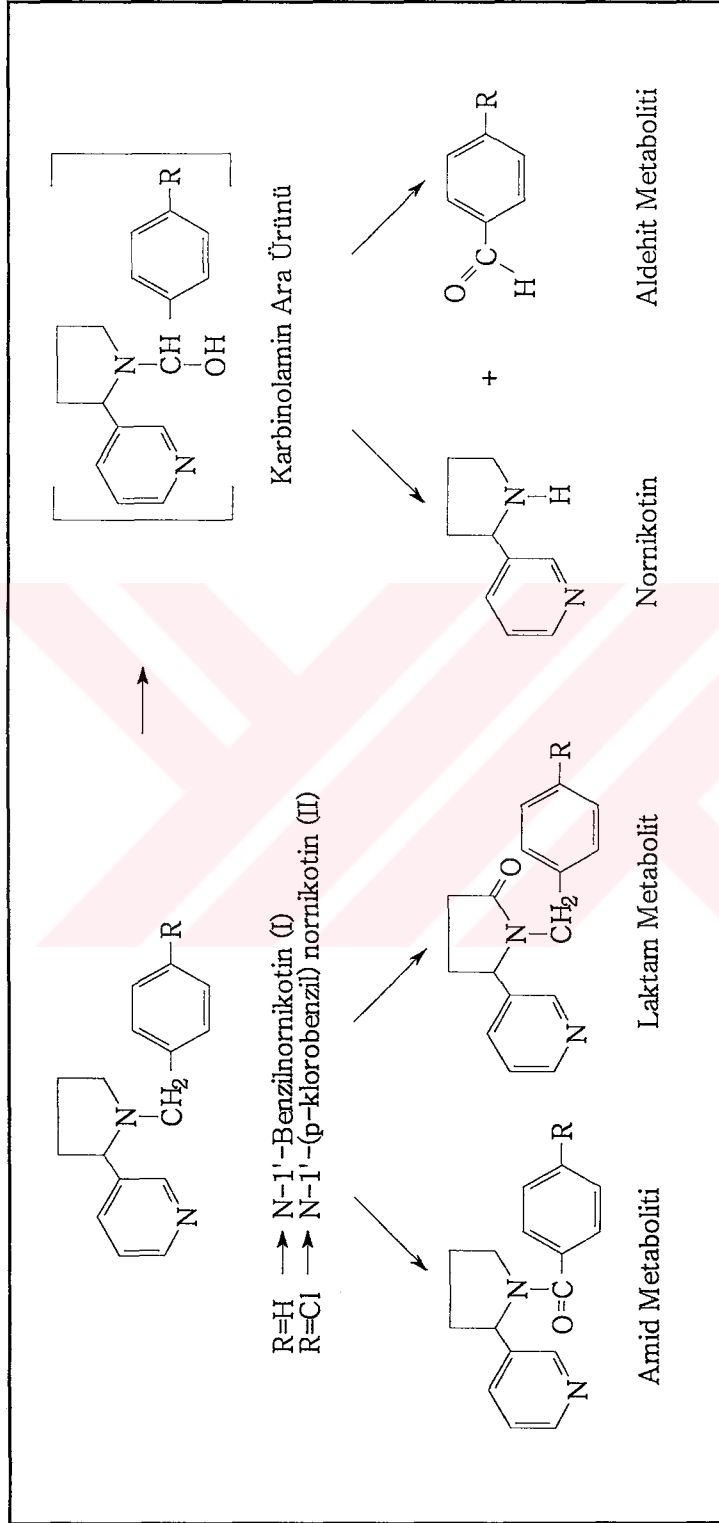
Antihipertansif bir ilaç olan benidipin hidroklorürün sıçan ve köpekte oluşturduğu major idrar metaboliti debenzilasyon ürünüdür (157).



Bileşik II'nin mikrozomal metabolizması sonucu N-dealkilasyon reaksiyonu ile birlikte C-oksidasyonla amid ve laktam metabolitlerini oluşturduğu gözlenmiş olup, II ($\log P^*.3.12$)'ye göre daha az bazik özelliğe sahip olan I ($\log P^*.2.53$)'in aynı koşullarda metabolizması sonucu yalnızca N-dealkilasyon ile kendisine karşılık gelen amin ve aldehite dönüştüğü bulunmuştur. Söz konusu tersiyer amin substratı ile amid metabolitinin oluşmaması, α -karbonda oksidasyon reaksiyonu ile oluşan karbinolamin ara ürününün tekrar oksidasyona uğrayarak amid metabolitini verecek kadar dayanıklı olmadığını ve yalnızca sekonder amin (nornikotin) ve aldehite dekompoze olduğunu göstermiştir.

Sekonder aromatik aminlerin *in vitro* mikrozomal inkübasyonu sonucu kendilerine karşılık gelen amidlere metabolize olduğu çok sayıda araştırmanın sonucudur.

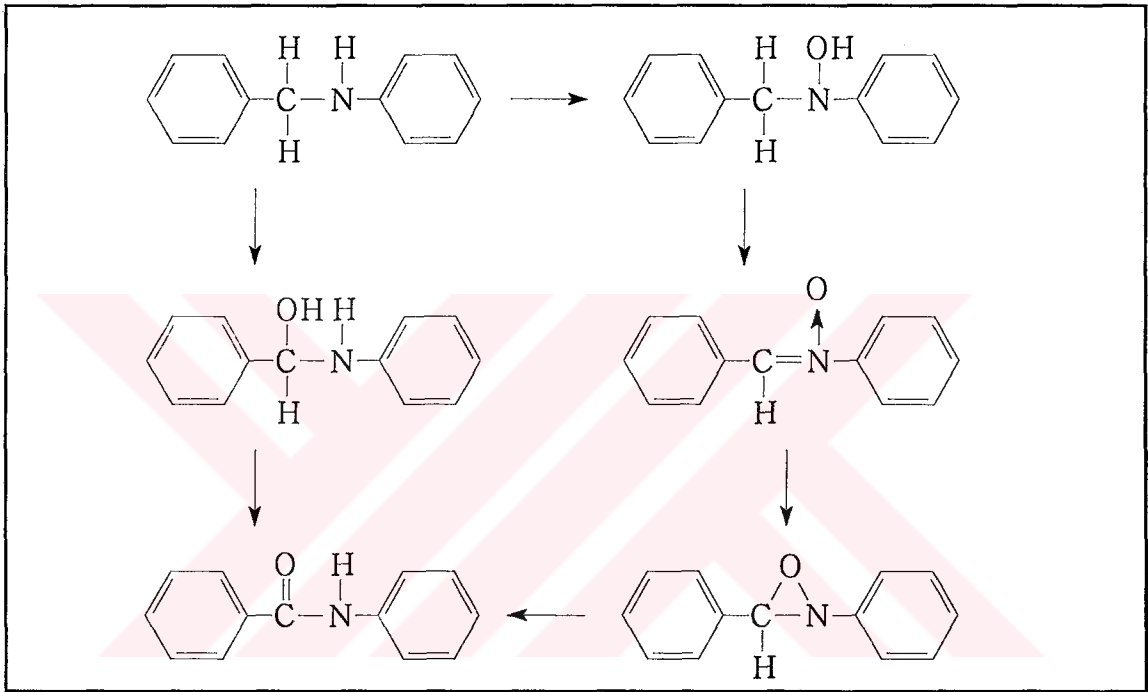
* Bileşiklerin log P değerleri, ProLogP 4.2.D programı kullanılarak hesaplanmıştır.



Tersiyer amin yapısındaki substratların düşünülen olası metabolik yolları

Gooderham ve Gorrod (108), N-benzilanilin ve N-benzil-4-kloroanilin'in farklı deney hayvanlarının karaciğerinden hazırlanan mikrozomal preparatlarla metabolizmasından sonra hamster ve tavşan ile N-benzoilanilinlerin oluştuğunu bulmuşlardır.

N-benzil-4-toluidinin substrat olarak kullanıldığı deneylerde de incelenen tüm türlerde karşılık gelen amid metabolitinin oluşumu görülmüştür (108).



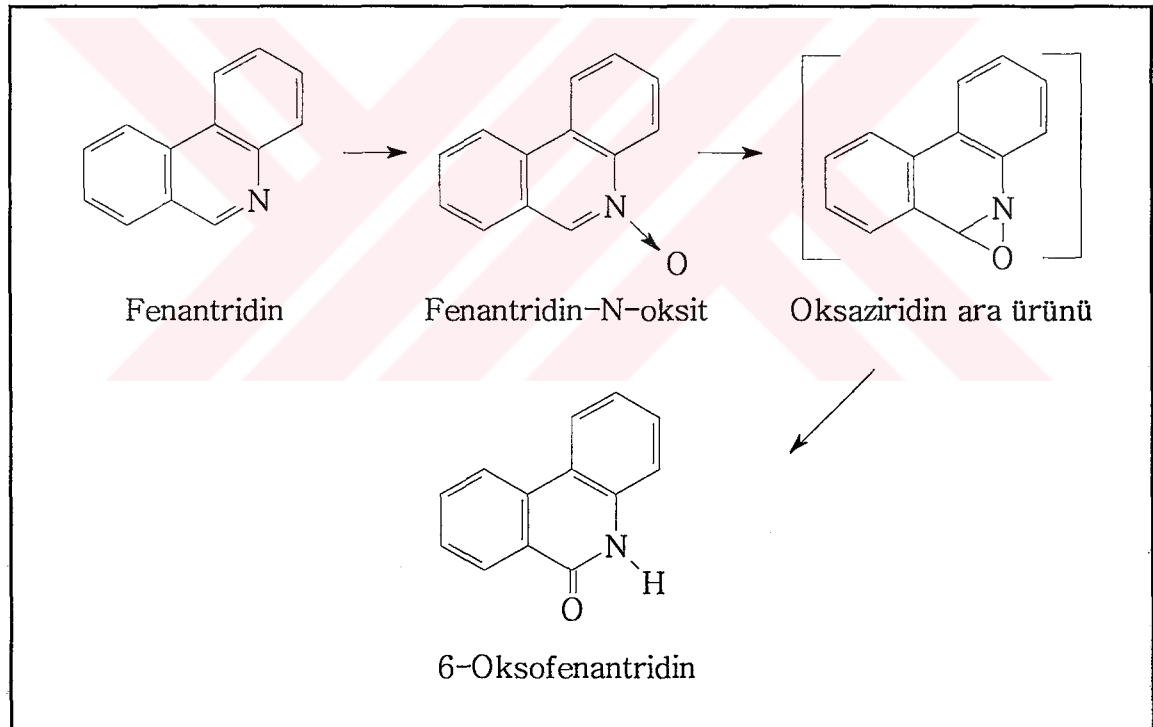
N-Benzilanilin'in karaciğer mikrozomal preparatı ile metabolizmasından N-benzoilanilin'in oluşum mekanizması

Süstitüe N-benzilanilinlerden N-benzil 2,4,6-trikloro-anilin substrat olarak kullanıldığında amid oluşumu gözlenmemiş olup, amin grubunun bazikliğinin bu konudaki kriter noktası olduğu öne sürülmektedir (108).

Küçükgüzel ve ark. (161), N-benzil-N-metilanilin substratından amid oluşumunu gözlememişler ancak muhtemelen stabil olmayan karbinolamin yapısının dealkilasyon metabolitlerini vermek üzere parçalandığını tespit etmişlerdir.

Ülgen ve Gorrod (313), sekonder ve tersiyer benzilik aminlerden amidlerin oluşumunun nonenzimatik yani kimyasal yolla meydana gelebileceğini dolayısıyla, bu ürünlerin -metabonat- olarak isimlendirilebileceğini öne sürmektedirler. Kontrollü ve dikkatli koşullar altında yapılan inkübasyon ve ekstraksiyonu takiben, metabolik ekstrelerin HPLC ile hemen analizlerinin yapılmasından sonra elde edilen sonuçların yanısıra, aynı ekstrelerin bir süre sonra aynı koşullarda tekrar edilen analizlerinde amid miktarında gözlenen artış literatürde kaydedilen bulgularla uygunluk göstermektedir (313).

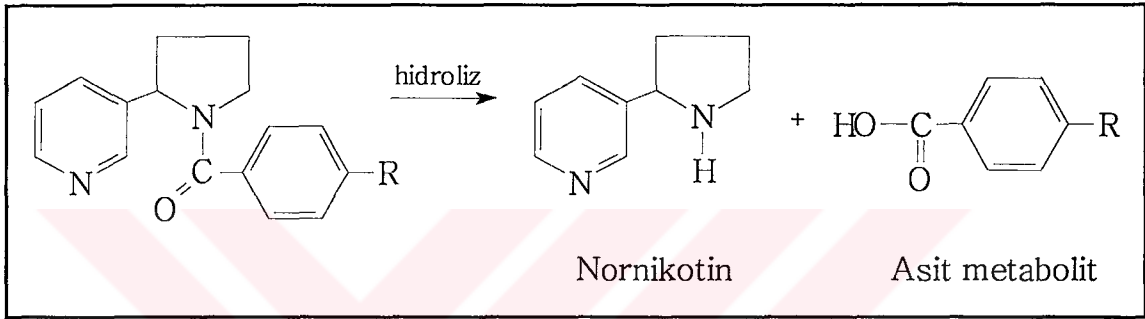
Heteroaromatik azot atomuna sahip fenantridin halkasının sıçan karaciğer mikrozomlarıyla metabolizmasından laktam metaboliti olan 6-oksofenantridine dönüştüğü bulunmuştur (308).



Nornikotin türevi tersiyer amin substratlarından II no'lu bileşiğin metabolizmasında, fenobarbitalle indüklenmiş karaciğer mikrozomları kullanıldığında aldehit ve amid metabolitlerinin miktarında görülen nicel artmaya rağmen (108), laktam metabolitinde bu artışın çok spesifik kaydedilememiş olması bu reaksiyonda özellikle aldehit oksidazların rolü olduğuna dikkati çekebilmektedir. Dolayısıyla laktam

metabolitlerinin oluşumunu ispatı için post mitokondriyel süpernatant fraksiyonunun enzim kaynağı olarak kullanılacağı çalışmalar düzenlemek gelecekte yapılması düşünülen bir araştırma konusu olarak belirlenmiştir.

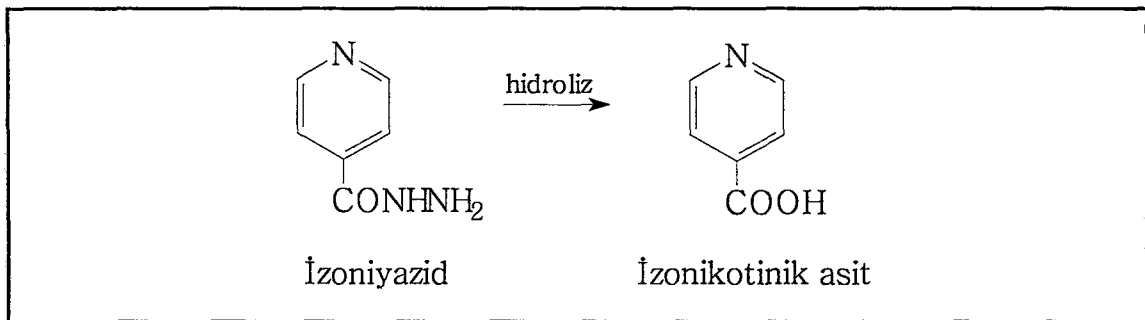
Sentezlenen amid yapısındaki substratların her ikisi de hidrolizle kendilerine karşılık gelen amin metaboliti nornikotin ve aside metabolize olmuşlardır. Ancak asit metabolitleri mikrozomlardan kaynaklanan proteinle örtülü oldukları için enzimatik reaksiyonun oluşumu sekonder amin metabolitinin metabolik test ekstralarında gözlenmesiyle anlaşılmıştır.



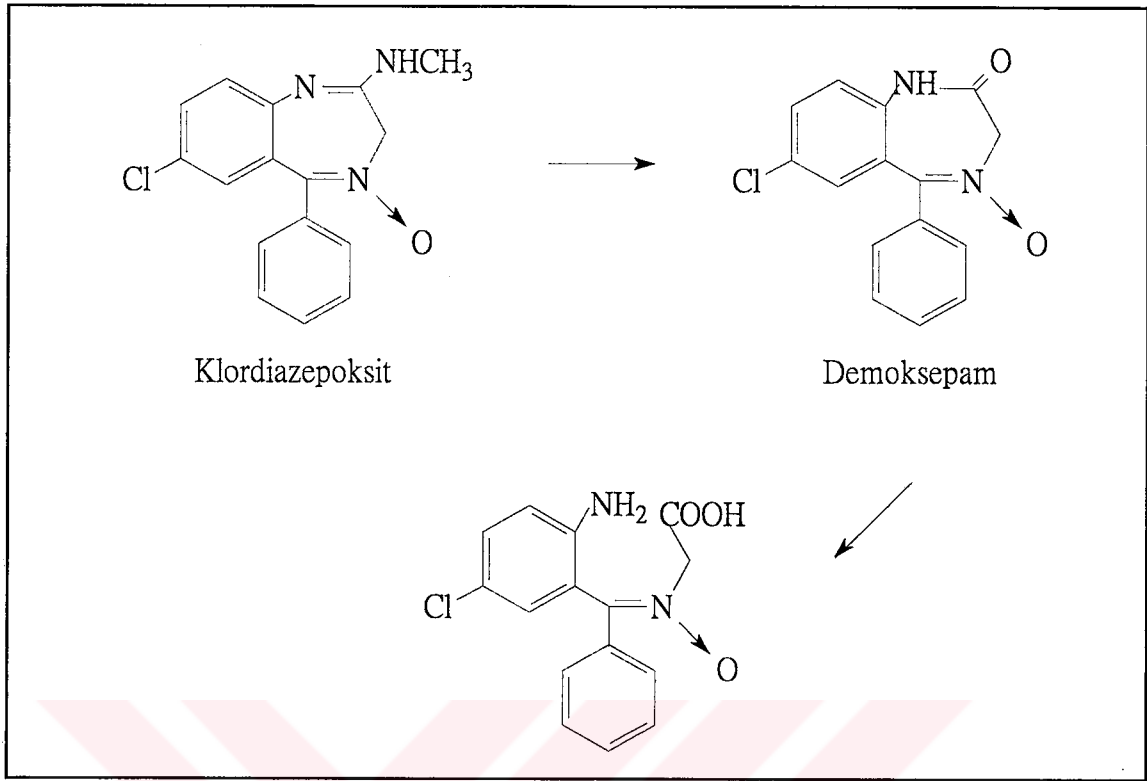
R = H → N-1'-Benzoilnornikotin (Ia)

R = Cl → N-1'-(p-klorobenzoil) nornikotin (IIa)

Tüberkülostatik izoniyazid, daha sonra glisin ile konjuge olan izonikotinik asit metabolitine hidroliz olmaktadır (305).



Klordiazepoksinin major metabolik yolu, laktam metaboliti olan demoksepanı oluşturmak üzere 2-metilamino sübstitüentinin hidrolizidir. Bu ürün idrarla atılmadan önce karşılık gelen aside dönüşmektedir (305).



Sonuç olarak, oksidatif N-dealkilasyon reaksiyonu her iki aminde de gözlenen major metabolik yol olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular ve literatür kayıtları gözden geçirildiğinde tersiyer aminlerden amid metabolitinin oluşumunun substrata spesifik olup, öncelikle azot atomunda meydana gelen bir enzimatik oksidasyonu ardından kimyasal reaksiyon gerektirdiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Sıçan beyinde nikotininkine eşit oranda ilgi gösterdiği bulunan N-1'-benzylornikotin (I) gibi (106) ornikotin türevi tersiyer aminler ya da toksik özellik gösterdikleri saptanmış olan amidler (172) nikotinle meydana gelen farmakolojik ve toksikolojik olaylarda öneme sahip olabilirler. Dolayısıyla bu tür nikotin analoglarının metabolik yollarının aydınlatılması nikotinin henüz tamamen kesinlik kazanmamış metabolik profiline ışık tutabilecektir.

8. KAYNAKLAR

1. Abood L.G., Grassi S., Noggle H.D.: Comparison of the binding of optically pure (-)- and (+)-[³H]nicotine to rat brain membranes. *Neurochem. Res.*, 10(2):259-267, 1985.
2. Aislaitner G., Bello A., Tan S.C., Hutt A.J., Marriott C., Gorrod J.W.: Metabolism of (-)-(S)-nicotine in the isolated perfused rabbit lung. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 22(4):395-402, 1997.
3. Aislaitner G., Li Y., Gorrod J.W.: *In vitro* metabolic studies on (-)-(S)-nornicotine. *Med. Sci. Res.*, 20:897-899, 1992.
4. Aislaitner G., Yang S., Gorrod J.W.: Preliminary evidence for the formation of reactive intermediates during the *in vitro* metabolism of minor tobacco alkaloids. *Med. Sci. Res.*, 21:819-821, 1993.
5. Anandatheerthavarada H.K., Shankar S.K., Bhamre S., Boyd M.R., Song B-J., Ravindranath V.: Induction of brain cytochrome P450IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain Res.*, 601:279-285, 1993.
6. Anandatheerthavarada H.K., Shankar S.K., Ravindranath V.: Rat brain cytochromes P450: catalytic, immunochemical properties and inducibility of multiple forms. *Brain Res.*, 536:339-343, 1990.
7. Anandatheerthavarada H.K., Williams J.F., Wecker L.: Differential effect of chronic nicotine administration on brain cytochrome P4501A1/2 and P4502E1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194(1):312-318, 1993.
8. Anandatheerthavarada H.K., Williams J.F., Wecker L.: The chronic administration of nicotine induces cytochrome P450 in rat brain. *J. Neurochem.*, 60(5):1941-1944, 1993.
9. Anderson L.M., Ward J.M., Park S.S., Rice J.M.: Immunohistochemical localization of cytochrome P450 with polyclonal and monoclonal antibodies. *Pathol. Immunopathol. Res.*, 8:61-94, 1989.
10. Appelgren L.E., Hansson E., Schmitterlöw C.G.: The accumulation and metabolism of C¹⁴-labelled nicotine in the brain of mice and cats. *Acta Physiol. Scand.*, 56:249-257, 1962.
11. Armitage A.K., Ashford J.R., Gorrod J.W., Sullivan F.M.: Environmental tobacco smoke-is it really a carcinogen. *Med. Sci. Res.*, 25:3-7, 1997.
12. Armstrong D.W., Li W., Stalcup A.M., Secor H.V., Izac R.R., Seeman J.I.: Capillary gas chromatographic separation of enantiomers with stable dipentyl- α -, β - and γ -cyclodextrin-derivatized stationary phases. *Anal. Chim. Acta*, 234:365-380, 1990.

13. Armstrong D.W., Stalcup A.M., Hilton M.L., Duncan J.D., Faulkner J.R., Chang S.: Derivatized cyclodextrins for normal-phase liquid chromatographic separation of enantiomers. *Anal. Chem.*, 62:1610-1615, 1990.
14. Baiulescu G.E., Constantinescu T.: Thin layer chromatography combined with microreactions for the identification of alkaloids in mixtures. *Anal. Chem.*, 47(13):2156-2160, 1975.
15. Bardo M.T., Green T.A., Crooks P.A., Dwoskin L.P.: Nicotine is self-administered intravenously by rats. *Psychopharmacology*, 146:290-296, 1999.
16. Barlow R.D., Thompson P.A., Stone R.B.: Simultaneous determination of nicotine, cotinine and five additional nicotine metabolites in the urine of smokers using pre-column derivatisation and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 419:375-380, 1987.
17. Beckett A.H., Gorrod J.W., Jenner P.: Absorption of (-)-nicotine-1'-N-oxide in man and its reduction in the gastrointestinal tract. *J. Pharm. Pharmacol.*, 22:722-723, 1970.
18. Beckett A.H., Gorrod J.W., Jenner P.: The analysis of nicotine-1'-N-oxide in urine, in the presence of nicotine and cotinine, and its application to the study of *in vivo* nicotine metabolism in man. *J. Pharm. Pharmacol.*, 23:55S-61S, 1971.
19. Beckett A.H., Gorrod J.W., Jenner P.: A possible relation between pK_{a1} and lipid solubility and the amounts excreted in urine of some tobacco alkaloids given to man. *J. Pharm. Pharmacol.*, 24:115-120, 1972.
20. Beckett A.H., Triggs E.J.: Determination of nicotine and its metabolite, cotinine, in urine by gas chromatography. *Nature* 211:1415-1417, 1966.
21. Benowitz N.L., Jacob P., III: Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 35(4):499-504, 1984.
22. Benowitz N.L., Jacob P., III: Nicotine and cotinine elimination pharmacokinetics in smokers and nonsmokers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 53(3):316-323, 1993.
23. Benowitz N.L., Jacob P., III: Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 56(5):483-493, 1994.
24. Benowitz N.L., Jacob P., III, Jones R.T., Rosenberg J.: Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 221:368-372, 1982.
25. Benowitz N.L., Jacob P., III, Perez-Stable E.: CYP2D6 phenotype and the metabolism of nicotine and cotinine. *Pharmacogen.*, 6:239-242, 1996.

26. Benowitz N.L., Zevin S., Jacob P., III: Sources of variability in nicotine and cotinine levels with use of nicotine nasal spray, transdermal nicotine and cigarette smoking. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 43:259-267, 1997.
27. Berkman C.E., Park S.B., Wrighton S.A., Cashman J.R.: *In vitro-in vivo* correlations of human (S)-nicotine metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 50(4):565-570, 1995.
28. Bhamre S., Anandatheerthavarada H.K., Shankar S.K., Ravindranath V.: Microsomal cytochrome P450 in human brain regions. *Biochem. Pharmacol.*, 44:1223-1225, 1992.
29. Blascher C.: Synthesen mittels Natramidverbindungen. *Ber.*, 28:432-437, 1895.
30. Booth J., Boyland E.: The metabolism of nicotine into two optically-active stereoisomers of nicotine-1'-oxide by animal tissues *in vitro* and by cigarette smokers. *Biochem. Pharmacol.*, 19:733-742, 1970.
31. Booth J., Boyland E.: Enzymic oxidation of (-)-nicotine by guinea-pig tissues *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 20:407-415, 1971.
32. Borch R.F., Bernstein M.D., Durst H.D.: The cyanohydroborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.*, 93:2897-2904, 1971.
33. Bortnick N., Luskin L.S., Hurwitz M.D., Craig W.E., Exner L.J., Mirza J.: 1 Carbinamines, $RR'R''CNH_2$ I. Reaction with alkyl halides and alkylene oxides. *J. Ac. Chem. Soc.*, 78, 4039-4044, 1955.
34. Botte M., Mabon F., Mouillour M.L., Robins R.J.: Biosynthesis of normicotine in root cultures of *nicotiana glauca* does not involve oxidation at C-5' of nicotine. *Phytochemistry*, 46(1):117-122, 1997.
35. Bowman E.R., Hansson E., Turnbull L.B., McKennis H., Schmitterlöw C.G.: Disposition and fate of (-)-cotinine- H^3 in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 143(3):301-308, 1964.
36. Bowman E.R., McKennis H.: Studies on the metabolism of (-)-cotinine in the human. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 135:306-311, 1962.
37. Bowman E.R., Turnbull L.B., McKennis H.: Metabolism of nicotine in the human and excretion of pyridine compounds by smokers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 127:92-95, 1959.
38. Boyland E.: The possible carcinogenic action of alkaloids of tobacco and betel nut. *Planta Med. (Suppl.)*:13-23, 1968.
39. Boyland E., Roe F.J.C., Gorrod J.W.: Induction of pulmonary tumours in mice by nitrosonornicotine, a possible constituent of tobacco smoke. *Nature*, 202:1126, 1964.
40. Boyland E., Roe F.J.C., Gorrod J.W., Mitchley B.C.V.: The carcinogenicity of nitrosoanabasine, a possible constituent of tobacco smoke. *Br.-J. Cancer*, 18:265-270, 1964.

41. Brandänge S., Lindblom L.: The enzyme "Aldehyde oxidase" is an iminium oxidase. Reaction with nicotine $\Delta^{1'(5')}$ iminium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91(3):991-996, 1979.
42. Brandänge S., Lindblom L.: Synthesis, structure and stability of nicotine $\Delta^{1'(5')}$ -iminium ion, an intermediary metabolite of nicotine. *Acta Chem. Scand.*, 33:187-191, 1979.
43. Brown E.V., Ahmad I.: Alkaloids of cigarette smoke condensate. *Phytochemistry*, 11:3485-3490, 1972.
44. Burton H.R., Andersen R.A., Fleming P.D., Walton L.R.: Changes in chemical composition of burley tobacco during senescence and curing. 2. Acylated pyridine alkaloids. *J. Agric. Food Chem.*, 36:579-584, 1988.
45. Byrd G.D., Chang K., Greene J.M., Don de Bethizy J.: Evidence for urinary excretion of glucuronide conjugates of nicotine, cotinine, and trans-3'-hydroxycotinine in smokers. *Drug Metab. Dispos.* 20(2):192-197, 1992.
46. Byrd G.D., Uhrig M.S., deBethizy J.D., Caldwell W.S., Crooks P.A., Ravard A., Riggs R.M.: Direct determination of cotinine-N-glucuronide in urine using thermospray liquid chromatography/ mass spectrometry. *Biol. Mass Spec.*, 23:103-107, 1994.
47. Carlson T.J., Jones J.P., Peterson L., Castagnoli N., Iyer K.R., Trager W.F.: Stereoselectivity and isotope effects associated with cytochrome P450-catalyzed oxidation of (S)-nicotine. *Drug Metab. Dispos.*, 23(7):749-756, 1995.
48. Carmella S.G., Hecht S.S.: High performance liquid chromatographic analysis of metabolites of the nicotine-derived nitrosamines, N'-nitrosonornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Anal. Biochem.*, 145(2):239-244, 1985.
49. Castle R.N., Burger A.: The synthesis of possible degradation products of nicotine. *J. Am. Pharm. Ass.*, 153(3):163-165, 1954.
50. Chahine R., Aftimos G., Wainberg M.C., Navarro-Delmasure C., Khalil K.A., Chahoud B.: Cotinine modulates the cardiovascular effects of nicotine. *Med. Sci. Res.*, 24:21-23, 1996.
51. Chelucci G., Falorni M., Giacomelli G.: Synthesis of 1-substituted 2-[(2S)-2-pyrrolidinyl] pyridine from L-Proline. *Synthesis*, 12:1121-1122, 1990.
52. Ciolino L.A., Turner J.A., McCauley H.A., Smallwood A.W., Yi T.Y.: Optimization study for the reversed-phase ion-pair liquid chromatographic determination of nicotine in commercial tobacco products. *J. Chromatogr.*, 852:451-463, 1999.
53. Cohen A.J., Roe F.J.C.: Monograph on the pharmacology and toxicology of nicotine: Tobacco Advisory Council, Occasional Paper 4, s.1-45, London, 1981.

54. Cooper D.A., Moore J.M.: Femtogram on-column detection of nicotine by isotope dilution gas chromatography/ negative ion detection mass spectrometry. *Biol. Mass Spec.*, 22:590-594, 1993.
55. Copeland J.R., Adem A., Jacob P., III, Nordberg A.: A comparison of the binding of nicotine and nornicotine stereoisomers to nicotinic binding sites in rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.*, 343:123-127, 1991.
56. Cowan D.A., Patterson L.H., Damani L.A., Gorrod J.W.: Metabolism of 4-substituted-N-ethyl-N-methylanilines. *Biomed. Mass Spec.*, 9(6):233-240, 1982.
57. Crespi C.L., Penman B.W., Gelboin H.V., Gonzalez F.J.: A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is activated by multiple human cytochrome P450 s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis*, 12(7):1197-1201, 1991.
58. Crooks P.A., Dwoskin L.P.: Contribution of CNS nicotine metabolites to the neuropharmacological effects of nicotine and tobacco smoking. *Biochem. Pharmacol.*, 54:743-753, 1997.
59. Crooks P.A., Li M., Dwoskin L.P.: Determination of nicotine metabolites in rat brain after peripheral radiolabeled nicotine administration: Detection of nornicotine. *Drug Metab. Dispos.*, 23(10):1175-1177, 1995.
60. Crooks P.A., Li M., Dwoskin L.P.: Metabolites of nicotine in rat brain after peripheral nicotine administration. *Drug Metab. Dispos.*, 25(1):47-54, 1997.
61. Crooks P.A., Sherratt A.J., Godin C.S.: Oxidative metabolism of nicotine enantiomers in isolated guinea pig hepatocytes. *Med. Sci. Res.*, 20:909-911, 1992.
62. Cundy K.C., Crooks P.A.: High-Performance Liquid Chromatographic method for the determination of N- methylated metabolites of nicotine. *J. Chromatogr.*, 306:291-301, 1984.
63. Cundy K.C., Crooks P.A.: Biotransformation of primary nicotine metabolites. Metabolism of [³H]-S(-)-cotinine in the guinea pig: Determination of *in vivo* urinary metabolites by high-performance liquid chromatography. *Xenobiotica*, 17(7):785-792, 1987.
64. Cundy K.C., Godin C.S., Crooks P.A.: Evidence of stereospecificity in the *in vivo* methylation of [¹⁴C](±)-nicotine in the guinea pig. *Drug Metab. Dispos.*, 12:755-759, 1984.
65. Cundy K.C., Sato M., Crooks P.A.: Stereospecific *in vivo* N-methylation of nicotine in the guinea pig. *Drug Metab. Dispos.*, 13(2):175-185, 1985.

66. Dagne E., Castagnoli N.: Cotinine N-oxide, a new metabolite of nicotine. *J. Med. Chem.*, 15(8):840-841, 1972.
67. Dagne E., Castagnoli N.: Structure of hydroxycotinine, a nicotine metabolite. *J. Med. Chem.* 15(4):356-360, 1972.
68. Dagne E., Gruenke L., Castagnoli N.: Deuterium isotope effects in the *in vivo* metabolism of cotinine. *J. Med. Chem.*, 17(12):1330-1333, 1974.
69. Dajani R.M., Gorrod J.W., Beckett A.H.: Hepatic and extrahepatic reduction of nicotine 1'-N-oxide in rats. *Biochem. J.*, 130(2):88, 1972.
70. Dajani R.M., Gorrod J.W., Beckett A.H.: Reduction *in vivo* of (-)-nicotine-1'-N-oxide by germ-free and conventional rats. *Biochem. Pharmacol.*, 24:648-650, 1974.
71. Dajani R.M., Gorrod J.W., Beckett A.H.: *In vitro* hepatic and extra-hepatic reduction of (-)-nicotine-1'-N-oxide in rats. *Biochem. Pharmacol.*, 24:109-117, 1975.
72. Damaj M.I., Glassco W., Dukat M., May E.L., Glennon R.A., Martin B.R.: Pharmacology of novel nicotinic analogs. *Drug Dev. Res.*, 38:177-187, 1996.
73. Damani L.A., Patterson L.H., Gorrod J.W.: Thin-Layer chromatographic separation and identification of tertiary aromatic amines and their N-oxides. *J. Chromatogr.*, 155(2):337-348, 1978.
74. Damani L.A., Pool W.F., Crooks P.A., Kaderlik R.K., Ziegler D.M.: Stereoselectivity in the N'-oxidation of nicotine isomers by flavin-containing monooxygenase. *Mol. Pharmacol.*, 33:702-705, 1988.
75. Damani L.A., Shaker M.S., Godin C.S., Crooks P.A., Ansher S.S., Jakoby W.B.: The ability of amine N-methyltransferases from rabbit liver to N-methylate azaheterocycles. *J. Pharm. Pharmacol.*, 38:547-550, 1986.
76. Dannan G.A., Guengerich F.P.: Immunochemical comparison and quantitation of microsomal flavin-containing monooxygenases in various hog, mouse, rat, rabbit, dog, and human tissues. *Mol. Pharmacol.*, 22:787-794, 1982.
77. Dash A.K., Wong S.: Liquid chromatographic method for the determination of nicotine in pharmaceutical formulations. *J. Chromatogr.*, 749:81-85, 1996.
78. Davis R.A.: The determination of nicotine and cotinine in plasma. *J. Chromatogr. Sci.*, 24:134-141, 1986.
79. Dawson R.F.: Alkaloid biogenesis. III. Specificity of the nicotine-nornicotine conversion. *J. Am. Chem. Soc.*, 73:4218-4221, 1951.
80. Dawson R.F., Christman D.R., D'Adamo A., Solt M.L., Wolf A.P.: The biosynthesis of nicotine from isotopically labeled nicotinic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 82:2628-2633, 1960.

81. Demetriou D., Rustemeier K., Voncken P., Schepers G.: HPLC separation of the enantiomers of nicotine and nicotine-like compounds. *Chirality*, 5:300-302, 1993.
82. Deutsch J., Hegedus L., Greig N.H., Rapoport S.I., Soncrant T.T.: Electron-impact and chemical ionization detection of nicotine and cotinine by gas chromatography-mass spectrometry in rat plasma and brain. *J. Chromatogr.*, 579: 93-98, 1992
83. Dewey S.L., Volkow N.D., Logan J., Macgregor R.R., Fowler J.S., Schlyer D.J., Bendriem B.: Age-related decreases in muscarinic cholinergic receptor binding in the human brain measured with positron emission tomography (PET). *J. Neurosci Res.*, 27:569-575, 1990.
84. Ding X., Coon M.J.: Purification and characterization of two unique forms of cytochrome P450 from rabbit nasal microsomes. *Biochemistry*, 27:8330-8337, 1988.
85. Ding X., Porter T.D., Peng H-M., Coon M.J.: cDNA and derived amino acid sequence of rabbit nasal cytochrome P450NMB (P450IIG1), a unique isozyme possibly involved in olfaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 285(1): 120-125, 1991.
86. Dingjian H.A., Dreyer-Van Der Glas S.M., Tjan G.T.: Colour tests for the identification of alkaloids and related compounds. *Pharm. Weekbl.*, 115:445-467, 1980.
87. Djordjevic M.V., Bush L.P., Gay S.L., Burton H.R.: Accumulation and distribution of acylated nornicotine derivatives in flue-cured tobacco alkaloid isolines. *J. Agric. Food. Chem.*, 38:347-350, 1990.
88. Dolphin C., Shephard E.A., Povey S., Palmer C.N.A., Ziegler D.M., Ayesb R., Smith R.L., Phillips I.R.: Cloning, primary sequence, and chromosomal mapping of a human flavin-containing monooxygenase (FMO1). *J. Biol. Chem.*, 266(19):12379-12385, 1991.
89. Domino E.F., Hariharan M., VanNoord T., Demana T.: Current experience with HPLC and GC-MS analyses of nicotine and cotinine. *Med. Sci. Res.*, 20:859-860, 1992.
90. Eldirdiri N., Ülgen M., Jacob P., III, Gorrod J.W.: The *in vitro* metabolism of nornicotine and related biotransformation products by microsomal preparations. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 22(4):385-390, 1997.
91. Elliott S.P., Hale K.A.: Development of a high-performance liquid chromatography retention index scale for toxicological drug screening. *J. Chromatogr.*, 694:99-114, 1997.
92. Fejer-Kossey O.: The separation of ten tobacco alkaloids by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 31(2):592-593, 1967.
93. Feyerabend C., Russell M.A.H.: A rapid gas-liquid chromatographic method for the determination of cotinine and nicotine in biological fluids. *J. Pharm. Pharmacol.*, 42:450-452, 1990.

94. Finnegan J.K., Larson P.S., Haag H.B.: Studies of the fate of nicotine in the body. Observations on relation of nicotine dosage to per cent excreted in urine, rate of excretion and rate of detoxication. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 91:357-361, 1947.
95. Flammang A.M., Gelboin H.V., Aoyama T., Gonzalez F.J., McCoy G.D.: Nicotine metabolism by cDNA-expressed human cytochrome P-450s. *Biochem. Arch.*, 8:1-8, 1992.
96. Forrester L.M., Henderson C.J., Glancey M.J., Back D.J., Park B.K., Ball S.E., Kitteringham N.R., McLaren A.W., Miles J.S., Skett P., Wolf C.R.: Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics. *Biochem. J.*, 281:359-368, 1992.
97. Foth H., Aubrecht J., Höhne M., Walther U.I., Kahl G.F.: Increased cotinine elimination and cotinine-N-oxide formation by phenobarbital induction in rat and mouse. *Clin. Investig.*, 70:175-181, 1992.
98. Foth H., Looschen H., Neurath H., Kahl G.F.: Nicotine metabolism in isolated perfused lung and liver of phenobarbital- and benzoflavone-treated rats. *Arch. Toxicol.*, 65:68-72, 1991.
99. Frankenburg W.G., Gottscho A.M.: The chemistry of tobacco fermentation. I. Conversion of the alkaloids. B. The formation of oxynicotine. *J. Am. Chem. Soc.*, 77:5728-5730, 1955.
100. Frankenburg W.G., Gottscho A.M., Mayaud E.W., Tso T.C.: The Chemistry of tobacco fermentation. I. Conversion of the alkaloids. A. The formation of 3-pyridyl methyl ketone and of 2,3'-dipyridyl. *J. Am. Chem. Soc.*, 74:4309-4314, 1952.
101. Friesen J.B., Leete E.: Nicotine synthase- An enzyme from nicotiana species which catalyzes the formation of (S)-nicotine from nicotinic acid and 1-methyl- Δ^2 - pyrrolinium chloride. *Tetrahedron Letters*, 31(44):6295-6298, 1990.
102. Ganz A., Kelsey F.E., Geiling E.M.K.: Excretion and tissue distribution studies on radioactive nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 103:209-214, 1951.
103. Genest K., Farmilo C.G.: Solvent systems for the identification of narcotics by paper chromatography. *J. Chromatogr.*, 6:343-349, 1961.
104. Ghosheh O.A., Dwoskin L.P., Li W-K., Crooks P.A.: Residence times and half-lives of nicotine metabolites in rat brain after acute peripheral administration of [2'- 14 C] nicotine. *Drug Metab. Dispos.*, 27(12):1448-1455, 1999.
105. Ghosheh O.A., Dwoskin L.P., Miller D.K., Crooks P.A.: Accumulation of nicotine and its metabolites in rat brain after intermittent or continuous peripheral administration of [2'- 14 C] nicotine. *Drug Metab. Dispos.*, 29:645-651, 2001.

106. Glassco W., May E.L., Damaj M.I., Martin B.R.: *In vivo* and *in vitro* activity of some N-substituted ($\pm$)-nornicotine analogs. *Med. Chem. Res.*, 4:273-282, 1994.
107. Gleen D.F., Edwards W.B.: Synthesis and mass spectrometry of some structurally related nicotinoids. *J. Org. Chem.*, 43(14):2860-2870, 1978.
108. Gooderham N.J., Gorrod J.W.: Microsomal formation of amides from secondary aromatic amines. *Development of Drugs & Moderns Medicines*. Ed: Gorrod J.W. et al., Ellis Horward Ltd., Chichester, p.319-323, 1986.
109. Gopalakrishnan R., Morse M.A., Lu J., Weghorst C.M., Sabourin C.L.K., Stoner G.D., Murphy S.E.: Exprssion of cytochrome P450 2A3 in rat esophagus: relevance to N-nitrosobenzylmethylamine. *Carcinogenesis*, 20(5):885-891, 1999.
110. Gorrod J.W.: Differentiation of various types of biological oxidation of nitrogen in organic compounds. *Chem.-Biol. Interactions*, 7:289-303, 1973.
111. Gorrod J.W.: Chemical determinants of the enzymology of organic nitrogen oxidation. *Drug Metab. Dispos.*, 13(3):283-286, 1985.
112. Gorrod J.W., Hibberd A.R.: The metabolism of $\Delta^{1'(5')}$ -iminium ion, *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 7(4):293-298, 1982.
113. Gorrod J.W., Jenner P., Keysell G.R., Mikhael B.R.: Oxidative metabolism of nicotine by cigarette smokers with cancer of the urinary bladder. *J. Natl. Cancer Inst.*, 52(5):1421-1424, 1974.
114. Gorrod J.W., Sai Y.: Recognition of novel artifacts produced during the microsomal incubation of secondary alicyclic amines in the presence of cyanide. *Xenobiotica*, 27(4):389-399, 1997.
115. Gorrod J.W., Temple D.J.: The formation of an N-hydroxymethyl intermediate in the N-demethylation of N-methylcarbazole *in vivo* and *in vitro*. *Xenobiotica*, 6:265, 1976.
116. Gorrod J.W., Whittleses C.M.C., Lam S.P.: Biological reactive intermediates. Ed: Witmer C.M., Trapping of reactive intermediates by incorporation of ^{14}C -sodium cyanide during microsomal oxidation, Plenum press, New York, p.657-664, 1990.
117. Guengerich F.P.: Purification and characterization of xenobiotic-metabolizing enzymes from lung tissue. *Pharmac. Ther.*, 45:299-307, 1990.
118. Guengerich F.P.: Human cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci.*, 50:1471-1478, 1992.
119. Halldin C., Någren K., Swahn C-G., Långström B., Nybäck H.: (S) and (R)- ^{11}C -Nicotine and the metabolite (R/S)- ^{11}C -cotinine. Preparation, metabolite studies and *in vivo* distribution in the human brain using PET. *Nucl. Med. Biol.*, 19(8):871-880, 1992.
120. Hammond D.K., Bjerkke R.J., Langone J.J., Strobel H.W.: Metabolism of nicotine by rat liver cytochromes P-450. *Drug Metab. Dispos.*, 19(4):804-808, 1991.

121. Hariharan M., VanNoord T., Greden J.F.: A high performance liquid chromatographic method for routine simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma. *Clin. Chem.*, 34(4):724-729, 1988.
122. Harke H.P., Frahm B., Schultz C., Dontenwill W.: Abbau von nikotin bei hamster und ratte. *Biochem. Pharmacol.*, 19:495-498, 1970.
123. Harke H.P., Mauch A., Frahm B.: Dünnschicht-chromatographische bestimmung von nicotin und nicotinmetaboliten im urin. *Z. Anal. Chem.*, 274(4):300-302, 1975.
124. Hecht S.S.: Metabolic activation and detoxification of tobacco-specific nitrosamines. A model for cancer prevention strategies. *Drug Metab. Rev.*, 26:373-390, 1994.
125. Hecht S.S., Chen C.B., Hoffman D.: Metabolic β -hydroxylation and N'-nitrosation of nicotine. *J. Med. Chem.*, 23:1175-1178, 1980.
126. Hecht S.S., Hoffman D.: Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 9(6):875-884, 1988.
127. Hibberd A.R., Gorrod J.W.: Enzymology of the metabolic pathway from nicotine to cotinine, *in vitro*. *Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet.*, 8(2):151-162, 1983.
128. Hill D.L., Laster W.R., Struck R.F.: Enzymatic metabolism of cyclophosphamide and nicotine and production of a toxic cyclophosphamide metabolite. *Cancer Res.*, 32:658-665, 1972.
129. Hodgson E., Smith E., Guthrie F.E.: Two-dimensional thin-layer chromatography of tobacco alkaloids and related compounds. *J. Chromatogr.*, 20(1):176-177, 1965.
130. Hoffman D., Wynder E.L.: The Chemistry of tobacco and tobacco smoke. Ed: Schmeltz I., Chemical composition and tumorigenicity of tobacco smoke, Plenum Press, New York, s.123-147, 1972.
131. Holt D.W., Flanagan R.J., Hayler A.M., Loizou M.: Simple gas-liquid chromatographic method for the measurement of mexiletine and lignocaine in blood-plasma or serum. *J. Chromatogr.*, 169:295-301, 1979.
132. Horstman M.: Simple high-performance liquid chromatographic method for rapid determination of nicotine and cotinine in urine. *J. Chromatogr.*, 344:391-396, 1985.
133. Hucker H.B.: Intermediates in drug metabolism reactions. *DMG Reviews*, 2:33-56, 1973.
134. Hucker H.B., Gillette J.R., Brodie B.B.: Cotinine : an oxidation product of nicotine formed by rabbit liver. *Nature*, 183: 47, 1959.
135. Hucker H.B., Gillette J.R., Brodie B.B.: Enzymatic pathway for the formation of cotinine. A major metabolite of nicotine in rabbit liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 129:94-100, 1960.

136. Hucker H.B., Larson P.S.: Studies on the metabolism of nornicotine in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 123:259-262, 1958.
137. Imaoka S., Fujita S., Funae Y.: Age-dependent expression of cytochrome P450s in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1097(3):187-192, 1991.
138. Imaoka S., Terano Y., Funae Y.: Changes in the amount of cytochrome P450s in rat hepatic microsomes with starvation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 278(1):168-178, 1990.
139. Inoue T., Tanaka K.: N-Oxidation and N-demethylation of methylephedrine by rat liver microsomes. *Xenobiotica*, 20:265-269, 1990.
140. Jacob P., III, Benowitz N.L., Copeland J.R., Risner M.E., Cone E.J.: Disposition kinetics of nicotine and cotinine enantiomers in rabbits and beagle dogs. *J. Pharm. Sci.*, 77(5):396-400, 1988.
141. Jacob P., III, Benowitz N.L., Shulgin A.T.: Recent studies of nicotine metabolism in humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 30:249-253, 1988.
142. Jacob P., III, Benowitz N.L., Yu L., Shulgin A.T.: Determination of nicotine N-oxide by gas chromatography following thermal conversion to 2-methyl-6-(3-pyridyl) tetrahydro-1,2-oxazine. *Anal. Chem.*, 58(11):2218-2221, 1986.
143. Jacob P., III, Shulgin A.T., Benowitz N.L.: Synthesis of (3'R, 5'S)-trans-3'-hydroxycotinine, a major metabolite of nicotine. Metabolic formation of 3'-hydroxycotinine in humans is highly stereoselective. *J. Med. Chem.*, 33:1888-1891, 1990.
144. Jacob P., III, Shulgin A.T., Yu L., Benowitz N.L.: Determination of the nicotine metabolite trans-3'-hydroxycotinine in urine of smokers using gas chromatography with nitrogen-selective detection or selected ion monitoring. *J. Chromatogr.*, 583:145-154, 1992.
145. Jacob P., III, Ulgen M., Gorrod J.W.: Metabolism of (-)-(S)-nicotine by guinea pig and rat brain: Identification of cotinine. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 22(4):391-394, 1997.
146. Jacob P., III, Wilson M., Benowitz N.L.: Improved gas chromatographic method for the determination of nicotine and cotinine in biological fluids. *J. Chromatogr.*, 222:61-70, 1981.
147. Jacob P., III, Yu L., Liang G., Shulgin A.T., Benowitz N.L.: Gas chromatographic-mass spectrometric method for determination of anabasine, anatabine and other tobacco alkaloids in urine of smokers and smokeless tobacco users. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 619:49-61, 1993.

148. Jacob P., III, Yu L., Wilson M., Benowitz N.L.: Selected ion monitoring method for determination of nicotine, cotinine and deuterium-labeled analogs: Absence of an isotope effect in the clearance of (S)-nicotine-3',3' -d₂ in humans. *Biol. Mass Spec.*, 20:247-252, 1991.
149. Jarvis M., Tunstall-Pedoe H., Feyerabend C., Vesey C., Salloojee Y.: Biochemical markers of smoke absorption and self reported exposure to passive smoking. *J. Epidem. Community Health*, 38:335-339, 1984.
150. Johnstone R.A.W., Plimmer J.R.: The chemical constituents of tobacco and tobacco smoke. *Chem. Rev.*, 59(5):885-936, 1959.
151. Joyce N.J., Leete E.: The formation of 1-methyl-3-nicotinoylpyrrolidine from nicotine-1'-oxide. *Heterocycles*, 29(7):1335-1342, 1989.
152. Kamataki T., Maeda K., Shimada M., Kitani K., Nagai T., Kato R.: Age-related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex-specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from male and female rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233(1):222-228, 1985.
153. Kamataki T., Maeda K., Yamazoe Y., Nagai T., Kato R.: Partial purification and characterization of cytochrome P-450 responsible for the occurrence of sex difference in drug metabolism in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103(1):1-7, 1981.
154. Kamataki T., Maeda K., Yamazoe Y., Nagai T., Kato R.: Sex difference of cytochrome P-450 in the rat: Purification, characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. *Arc. Biochem. Biophys.*, 225(2):758-770, 1983.
155. Klein A.E., Gorrod J.W.: Age as a factor in the metabolism of nicotine. *Europ. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 1:51-58, 1978.
156. Klein A.E., Gorrod J.W.: The metabolism of nicotine in cigarette smokers during pregnancy. *Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet.*, 2:87-93, 1978.
157. Kobayashi H., Okumura S., Kosaka Y., Kobayashi S., Inoue A., Oka T., Nakamizo N.: Identification of benidipin hydrochloride metabolites in rats and dogs. *Arzneimittelforschung*, 38:1753-1756, 1988.
158. Kogan M.J., Verebey K., Jaffee J.H., Mule S.J.: Simultaneous determination of nicotine and cotinine in human plasma by nitrogen detection gas-liquid chromatography. *J. Forensic. Sci.*, 26:6-11, 1981.
159. Kröger H., Bohn G., Rücker G.: Kombiniertes dünnschicht- und gaschromatographisches nachweisverfahren für basische stoffe mit einem stickstoffselektiven flammenionisationsdetektor. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 117(46): 1923-1925, 1977.

160. Küçükgülzel İ., Ülgen M., Gorrod J.W.: *In vitro* microsomal metabolism of nuclear chloro substituted secondary amines and imines. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 22(4):351-358, 1997.
161. Küçükgülzel İ., Ülgen M., Gorrod J.W.: *In vitro* hepatic microsomal metabolism of N-benzyl-N-Methylaniline. *Il Farmaco*, 54:331-337, 1999.
162. Kyerematen G.A., Damiano M.D., Dvorchik B.H., Vesell E.S.: Smoking-induced changes in nicotine disposition: Application of a new HPLC assay for nicotine and its metabolites. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32(6):769-780, 1982.
163. Kyerematen G.A., Morgan M., Chattopadhyay B., deBethizy J.D., Vesell E.S.: Disposition of nicotine and eight metabolites in smokers and nonsmokers: Identification in smokers of two metabolites that are longer lived than cotinine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 48(6):641-651, 1990.
164. Kyerematen G.A., Morgan M., Chattopadhyay B., deBethizy J.D., Vesell E.S.: Nicotine metabolism in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 50(4):462-463, 1991.
165. Kyerematen G.A., Morgan M., Warner G., Martin L.F., Vesell E.S.: Metabolism of nicotine by hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 40(8):1747-1756, 1990.
166. Kyerematen G.A., Owens G.F., Chattopadhyay B., DeBethizy J.D., Vesell E.S.: Sexual dimorphism of nicotine metabolism and distribution in the rat. *Drug Metab. Dispos.*, 16(6):823-828, 1988.
167. Kyerematen G.A., Taylor L.H., DeBethizy J.D., Vesell E.S.: Radiometric-High-Performance Liquid Chromatographic assay for nicotine and twelve of its metabolites. *J. Chromatogr.*, 419:191-203, 1987.
168. Kyerematen G.A., Taylor L.H., DeBethizy J.D., Vesell E.S.: Pharmacokinetics of nicotine and 12 metabolites in the rat. Application of a new radiometric high performance liquid chromatography assay. *Drug Metab. Dispos.*, 16(1):125-129, 1988.
169. Kyerematen G.A., Vesell E.S.: Metabolism of nicotine. *Drug Metab. Rev.*, 23:3-41, 1991.
170. Larson P.S., Finnegan J.K., Haag H.B.: Studies on the fate of nicotine in the body. Observations on the relative rate of elimination of nicotine by the dog, cat, rabbit and mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 95:506-508, 1949.
171. Larson P.S., Haag H.B., Silvette H.: Some effects of nicotine and smoking on metabolic functions. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2:80-109, 1961.
172. Laue G., Preston C.A., Baldwin I.T: Fast track to the trichome: induction of N-acyl nornicotines precedes nicotine induction in *Nicotiana repanda*. *Planta*, 210:510-514, 2000.

173. Lawton M.P., Kronbach T., Johnson E.F., Philpot R.M.: Properties of expressed and native flavin-containing monooxygenases: Evidence of multiple forms in rabbit liver and lung. *Mol. Pharmacol.*, 40:692-698, 1991.
174. Lee B.L., Benowitz N.L., Jacob P., III: Influence of tobacco abstinence on the disposition kinetics and effects of nicotine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 41(4):474-479, 1987.
175. Leete E., Chedekel M.R.: Metabolism of nicotine in *nicotiana glauca*. *Phytochemistry*, 13:1853-1859, 1974.
176. Leonard N.J., Nommensan E. W.: Studies on the mechanism of the von Braun reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 71:2808-2813, 1949.
177. Li Y., Gorrod J.W.: N-Hydroxymethylnorcotinine, a new primary *in vitro* metabolite of cotinine. *Xenobiotica*, 24(5):409-415, 1994.
178. Li Y., Li N.Y., Aislaitner G., Gorrod J.W.: *In vitro* metabolism of cotinine. *Med. Sci. Res.*, 20:903-904, 1992.
179. Liakopoulou-Kyriakides M., Platis F., Moutsos N.B., Kortsaris A.: Determination of nicotine in serum by TLC-densitometry. *Anal. Lett.*, 25(3):485-496, 1992.
180. London S.J., Idle J.R., Daly A K., Coetzee G.A.: Genetic variation of CYP2A6, smoking, and risk of cancer. *Lancet*, 353:898-899, 1999.
181. Machacek D.A., Jiang N.S.: Quantification of cotinine in plasma and saliva by liquid chromatography. *Clin. Chem.*, 32(6):979-982, 1986.
182. Machata G.: Dünnschichtchromatographie in der Toxikologie. *Mic. Acta*, 1:79-86, 1960
183. Martin B.R., Tripathi H.L., Aceto M.D., May E.L.: Relationship of the biodisposition of the stereoisomers of nicotine in the central nervous system to their pharmacological actions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 226(1):157-163, 1983.
184. Maskarinec M.P., Harvey R.W., Caton J.E.: A novel method for the isolation and quantitative analysis of nicotine and cotinine in biological fluids. *J. Anal. Toxicol.*, 2:124-126, 1978.
185. Masumoto H., Ohta S., Hirobe M.: Application of chemical cytochrome P-450 model systems to studies on drug metabolism. *Drug Metab. Dispos.*, 19(4):1-13, 1991.
186. Matsukura S., Sakamoto N., Imura H., Matsuyama H., Tamada T., Ishiguro T. Muranaka H.: Radioimmunoassay of nicotine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64(2):574-580, 1975.
187. Matsumura N., Tanuma S.: Involvement of cytosolic NAD⁺ glycohydrolase in cyclic ADP-ribose metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253:246-252, 1998.

188. McCalley D.V.: Evaluation of reversed-phase column for the analysis of very basic compounds by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 636:213-220, 1993.
189. McCalley D.V.: Effect of organic solvent modifier and nature of solute on the performance of bonded silica reversed-phase columns for the analysis of strongly basic compounds by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 738:169-179, 1996.
190. McCoy G.D., DeMarco G.J., Koop D.R.: Microsomal nicotine metabolism: A comparison of relative activities of six purified rabbit cytochrome P-450 isozymes. *Biochem. Pharmacol.*, 38(7):1185-1188, 1989.
191. McCoy G.D., Howard P.C., DeMarco G.J.: Characterization of hamster liver nicotine metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 35(16):2767-2773, 1986.
192. McCracken N.W., Cholerton S., Idle J.R.: Cotinine formation by cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Med. Sci. Res.*, 20:877-878, 1992.
193. McGovren J.P., Lubawy W.C., Kostenbauder H.B.: Uptake and metabolism of nicotine by the isolated perfused rabbit lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 199(1):198-276, 1976.
194. McKennis H., Bowman E.R., Turnbull L.B.: Mammalian degradation of (-)-nicotine to 3-pyridylacetic acid and other compounds. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 107:145-148, 1961.
195. McKennis H., Schwartz S.L., Bowman E.R.: Alternate routes in the metabolic degradation of the pyrrolidine ring of nicotine. *J. Biol. Chem.*, 239(11):3990-3996, 1964.
196. McKennis H., Schwartz S.L., Turnbull L.B., Tamaki E., Bowman E.R.: The metabolic formation of γ -(3-pyridyl)- γ -hydroxybutyric acid and its possible intermediary role in the mammalian metabolism of nicotine. *J. Biol. Chem.*, 239(11):3981-3989, 1964.
197. McKennis H., Turnbull L.B., Bowman E.R.: γ -(3-pyridyl)- γ -methylaminobutyric acid as a urinary metabolite of nicotine. *J. Am. Chem. Soc.*, 79:6342-6343, 1957.
198. McKennis H., Turnbull L.B., Bowman E.R.: Metabolism of nicotine to (+)- γ -(3-pyridyl)- γ -methylaminobutyric acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 80:6597-6600, 1958.
199. McKennis H., Turnbull L.B., Bowman E.R.: N-Methylation of nicotine and cotinine *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 238(2):719-723, 1963.
200. McKennis H., Turnbull L.B., Bowman E.R., Schwartz S.L.: The corrected structure of a ketoamide arising from the metabolism of (-)-nicotine. *J. Am. Chem. Soc.*, 84:4598-4599, 1962.
201. McKennis H., Turnbull L.B., Bowman E.R., Wada E.: Demethylation of cotinine *in vivo*. *J. Am. Chem. Soc.*, 81:3951-3954, 1959.

202. McKennis H., Turnbull L.B., Schwartz S.L., Tamaki E., Bowman E.R.: Demethylation in the metabolism of (-)-nicotine. *J. Biol. Chem.*, 237(2):541-546, 1962.
203. McKennis H., Turnbull L.B., Wingfield H.N., Dewey L.J.: Metabolites of nicotine and a synthesis of nornicotine. *J. Am. Chem. Soc.*, 80:1634-1636, 1958.
204. McKennis H., Wada E., Bowman E.R., Turnbull L.B.: Demethylation in the metabolism of (-)-nicotine *in vivo*. *Nature*, 190:910-911, 1961.
205. McMahon R.E.: Microsomal dealkylation of drugs. *J. Pharm. Sci.*, 55(5):457-466, 1966.
206. McManus K.T., deBethizy J.D., Garteiz D.A., Kyerematen G.A., Vesell E.S.: A new quantitative thermospray LC-MS method for nicotine and its metabolites in biological fluids. *J. Chromatogr. Sci.*, 28:510-516, 1990.
207. Mesnil M., Testa B., Jenner P.: Xenobiotic metabolism by brain monooxygenases and other cerebral enzymes. *Adv. Drug Res.*, 13:95-207, 1984.
208. Messina E.S., Tyndale R.F., Sellers E.M.: A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282:1608-1614, 1997.
209. Miller R.P., Rotenberg K.S., Adir J.: Effect of dose on the pharmacokinetics of intravenous nicotine in the rat. *Drug Metab. Dispos.*, 5(5):436-443, 1977.
210. Moore J., Greenwood M., Sinclair N.: Automation of a high-performance liquid chromatographic assay for the determination of nicotine, cotinine and 3-hydroxycotinine in human urine. *J. Pharm. Biomed. An.*, 8(8-12):1051-1054, 1990.
211. Murphy P.J.: Enzymatic oxidation of nicotine to nicotine $\Delta^{1(6)}$ iminium ion. *J. Biol. Chem.*, 248(8):2796-2800, 1973.
212. Murphy S.E., Johnson L.M., Pullo D.A.: Characterization of multiple products of cytochrome P450 2A6-catalyzed cotinine metabolism. *Chem. Res. Toxicol.*, 12:639-645, 1999.
213. Nakajima M., Iwata K., Yamamoto T., Funae Y., Yoshida T., Kuroiwa Y.: Nicotine metabolism in liver microsomes from rats with acute hepatitis or cirrhosis. *Drug Metab. Dispos.*, 26(1):36-41, 1998.
214. Nakajima M., Yamamoto T., Nunoya K., Yokoi T., Nagashima K., Inoue K., Funae Y., Shimada N., Kamataki T., Kuroiwa Y.: Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab. Dispos.*, 24(11):1212-1217, 1996.
215. Nakajima M., Yamamoto T., Nunoya K., Yokoi T., Nagashima K., Inoue K., Funae Y., Shimada N., Kamataki T., Kuroiwa Y.: Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277(2):1010-1015, 1996.

216. Nakayama H.: Nicotine metabolism in mammals. *Drug Metab. Drug Int.*, 6(2):96-122, 1988.
217. Nakayama H., Fujihara S., Nakashima T., Kurogochi Y.: Formation of two major nicotine metabolites in livers of guinea pigs. *Biochem. Pharmacol.*, 36(24):4313-4317, 1987.
218. Nakayama H., Nakashima T., Kurogochi Y.: Heterogeneity of hepatic nicotine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 715(2):254-257, 1982.
219. Nakayama H., Nakashima T., Kurogochi Y.: Participation of cytochrome P-450 in nicotine oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108(1):200-205, 1982.
220. Nakayama H., Nakashima T., Kurogochi Y.: Cytochrome P-450-dependent nicotine oxidation by liver microsomes of guinea pigs. *Biochem. Pharmacol.*, 34(13):2281-2286, 1985.
221. Nakayama H., Okuda H., Nakashima T., Imaoka S., Funae Y.: Nicotine metabolism by rat hepatic cytochrome P450s. *Biochem. Pharmacol.*, 45(12):2554-2556, 1993.
222. Nebert D.W., Nelson D.R., Coon M.J., Estabrook R.W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Loper J.C., Sato R., Waterman M.R., Waxman D.J.: The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 10(1):1-14, 1991.
223. Neurath G.B.: Aspects of the oxidative metabolism of nicotine. *Clin. Investig.*, 72:190-195, 1994.
224. Neurath G.B., Dünger M., Krenz O., Orth D., Pein F.G.: Trans-3'-hydroxycotinine - a Main metabolite in smokers. *Klin. Wochenschr.* 66(Supp XI.):2-4, 1988.
225. Neurath G.B., Dünger M., Orth D.: Detection and determination of tautomers of 5'-hydroxynicotine and 2'-hydroxynicotine in smokers' urine. *Med. Sci. Res.*, 20:853-858, 1992.
226. Neurath G.B., Dünger M., Orth D., Pein F.G.: Trans-3'-hydroxycotinine as a main metabolite in urine of smokers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 59:199-201, 1987.
227. Neurath G., Lüttich W.: Gas chromatographic separation of 4'-nitroazobenzene-4-carboxamides of primary and secondary amines. *J. Chromatogr.* 37(2):205-212, 1968.
228. Neurath G.B., Pein F.G.: Gas chromatographic determination of trans-3'-hydroxycotinine, a major metabolite of nicotine in smokers. *J. Chromatogr.*, 415:400-406, 1987.
229. Nguyen T.L., Dagne E., Gruenke L., Bhargava H., Castagnoli N.: The tautomeric structures of 5'-hydroxycotinine, a secondary mammalian metabolite of nicotine. *J. Org. Chem.*, 46:758-760, 1981.

230. Nguyen T-L., Gruenke L.D., Castagnoli N.: Metabolic N-demethylation of nicotine. Trapping of a reactive iminium species with cyanide ion. *J. Med. Chem.*, 19(9):1168-1169, 1976.
231. Nguyen T-L., Gruenke L.D., Castagnoli N.: Metabolic oxidation of nicotine to chemically reactive intermediates. *J. Med. Chem.*, 22(3):259-263, 1979.
232. Nordberg A., Nilsson-Hakansson L., Adem A., Hardy J., Alafuzoff I., Lai Z., Herrera-Marschitz M., Winblad B.: The role of nicotinic receptors in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.*, 79:353-362, 1989.
233. Nurten N., Üstündağ İ., Sayhan N., Bermek E.: ADP-Ribosylation of human serum proteins promoted by endogenous NAD Glycohydrolase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200(1):450-458, 1994.
234. Nwosu C.G., Crooks P.A.: Species variation and stereoselectivity in the metabolism of nicotine enantiomers. *Xenobiotica*, 18(12):1361-1372, 1988.
235. Nwosu C.G., Godin C.S., Houdi A.A., Damani L.A., Crooks P.A.: Enantioselective metabolism during continuous administration of S-(-)- and R-(+)-nicotine isomers to guinea-pigs. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40:862-869, 1988.
236. Nybäck H., Nordberg A., Längström B., Halldin C., Hartvig P., Ahlin A., Swahn C-G., Sedvall G.: Attempts to visualize nicotinic receptors in the brain of monkey and man by positron emission tomography. *Prog. Brain Res.*, 79:313-319, 1989.
237. Nyström L., Pettersson M., Rångemark C.: Simple and sensitive method for determination of nicotine in plasma by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 701:124-128, 1997.
238. Obach R.S., Vunakis H.V.: Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent oxidation of $\Delta^{1'(5')}$ iminium ion to cotinine by rabbit liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 39(1):R1-R4, 1990.
239. Obach R.S., Vunakis H.V.: Radioimmunoassay of nicotine $\Delta^{1'(5')}$ -iminium ion, an intermediate formed during the metabolism of nicotine to cotinine. *Drug Metab. Dispos.*, 18:508-513, 1990.
240. Oddo C., Pauli A.M., Pastor J.: Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of nicotine and cotinine in nonsmoker human and rat urines. *J. Chromatogr.*, 708:95-101, 1998.
241. O'Doherty S., Revans A., Smith C.L., McBride M., Cooke M.: Determination of cis- and trans- 3- hydroxycotinine by high performance liquid chromatography. *J. High Res. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.*, 11:723-725, 1988.

242. Owen F.B., Larson P.S.: Studies on the fate of nicotine in the animal body. Observations on the number and chemical nature of nicotine metabolites in the dog and cat. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 115:402-407, 1958.
243. Pacifici R., Pichini S., Altieri I., Rosa M., Bacosi A., Caronna A.: Determination of nicotine and two major metabolites in serum by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 612:209-213, 1993.
244. Papadopoulos N.M.: Nicotine-1'-oxide: A metabolite of nicotine in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, 106:182-185, 1964.
245. Papadopoulos N.M.: Formation of nornicotine and other metabolites from nicotine *in vitro* and *in vivo*. *Can. J. Biochemistry*, 42(4):435-442, 1964.
246. Papadopoulos N.M., Kintzios J.A.: Formation of metabolites from nicotine by a rabbit liver preparation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 140:269-277, 1963.
247. Park S.B., Jacob P., III, Benowitz N.L., Cashman J.R.: Stereoselective metabolism of (S)-(-)-nicotine in humans: Formation of trans-(S)-(-)-nicotine N-1'-oxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 6:880-888, 1993.
248. Parviainen M.T., Barlow R.D.: Assessment of exposure to environmental tobacco smoke using a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination nicotine and two of its metabolites in urine. *J. Chromatogr.*, 431:216-221, 1988.
249. Parviainen M.T., Puhakainen E.V.J., Laatikainen R., Savolainen K., Herranen J., Barlow R.D.: Nicotine metabolites in the urine of smokers. *J. Chromatogr.*, 525:193-202, 1990.
250. Perkins S.L., Livesey J.F., Escares E.A., Belcher J.M., Dudley D.K.: High-Performance Liquid Chromatographic method compared with a modified radioimmunoassay of cotinine in plasma. *Clin. Chem.*, 37(11):1989-1993, 1991.
251. Peterson L.A., Castagnoli N.: Regio and stereochemical studies on the α -carbon oxidation of (S)- nicotine by cytochrome P-450 model systems. *J. Med. Chem.* 31:637-640, 1988.
252. Peterson L.A., Trevor A., Castagnoli N.: Stereochemical studies on the cytochrome P-450 catalyzed oxidation of (S)-nicotine to the (S)- nicotine $\Delta^{1'(S)}$ -iminium species. *J. Med. Chem.* 30:249-254, 1984.
253. Phillipson J.D., Handa S.S.: Nicotine N-oxides. *Phytochemistry*, 14(12):2683-2690, 1975.

254. Pichini S., Altieri I., Pacifici R., Rosa M., Ottaviani G., Zuccaro P.: Simultaneous determination of cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in human serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 577(2):358-361, 1992.
255. Pool W.F., Houdi A.A., Damani L.A., Layton W.J., Crooks P.A.: Isolation and characterization of N-methyl-N'-oxonicotinium ion, a new urinary metabolite of R-(+)-nicotine in the guinea pig. *Drug Metab./Dispos.*, 14(5):574-579, 1986.
256. Pothier J., Galand N., Viel C.: Determination of some narcotic and toxic alkaloidal compounds by overpressured thin-layer chromatography with ethyl acetate as eluent. *J. Chromatogr.*, 634:356-359, 1993.
257. Poulsen L.L., Taylor K., Williams D.E., Masters B.S.S., Ziegler D.M.: Substrate specificity of the rabbit lung flavin-containing monooxygenase for amines: Oxidation products of primary alkylamines. *Mol. Pharmacol.*, 30:680-685, 1986.
258. Preussman R.: Zum oxydativen abbau von nitrosaminen mit enzym-freien modellsystemen. *Arzneimittelforschung*, 14:769-774, 1964.
259. Pritchard W.S., Robinson J.H.: Examining the relation between usual-brand nicotine yield, blood cotinine concentration and the nicotine-"compensation" hypothesis. *Psychopharmacol.*, 124:282-284, 1996.
260. Ravindranath V., Bhamre S., Bhagwat S.V., Anandatheerthavarada, Slauker S.K., Tirumalai P.S.: Xenobiotic metabolism in brain. *Toxicol. Lett.*, 82/83:633-638, 1995.
261. Ravindranath V., Boyd M.R.: Xenobiotic metabolism in brain. *Drug Metab. Rev.*, 27(3):419-448, 1995.
262. Rayburn C.H., Harlan W.R., Hanmer H.R.: Rearrangement of nicotine oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 72:1721-1723, 1950.
263. Risner M.E., Cone E.J., Benowitz N.L., Jacob P., III: Effects of the stereoisomers of nicotine and nornicotine on schedule-controlled responding and physiological parameters of dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244:807-813, 1988.
264. Rop P.P., Grimaldi F., Oddoze C., Viala A.: Determination of nicotine and its main metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 612:302-309, 1993.
265. Rose J.E.: Nicotine addiction and treatment. *Annu. Rev. Med.*, 47:493-507, 1996.
266. Russell M.A.H., Feyerabend C.: Cigarette smoking: A dependence on high-nicotine boli. *Drug Metab. Rev.*, 8(1):29-57, 1978.
267. Rüdell U., Foth H., Kahl G.F.: Eightfold induction of nicotine elimination in perfused rat liver by pretreatment with phenobarbital. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148(1):192-198, 1987.

268. Ryan D.E., Levin W.: Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol. Ther.*, 45:153-239, 1990.
269. Sai Y., Gorrod J.W.: Metabolic interconversion of acid metabolites of cotinine *in vitro*. *Drug Metab. Drug Int.*, 12(2):93-103, 1995.
270. Salvadori M.C., Velletri M.E., Camargo M.M.A., Araujo A.C.P.: Identification of doping agents by chromatographic techniques and UV spectrophotometry. *Analyst*, 113:1189-1195, 1988.
271. Saunders J.A., Blume D.E.: Quantitation of major tobacco alkaloids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 205(1):147-154, 1981.
272. Schenkman J.B., Cinti D.L.: Preparation of microsomes with calcium. *Methods Enzymol.*, 52:83-89, 1978.
273. Schenkman J.B., Thummel K.E., Favreau L.V.: Physiological and patho-physiological alterations in rat hepatic cytochrome P-450. *Drug Metab. Rev.*, 20(2-4):557-584, 1989.
274. Schepers G., Demetriou D., Rustemeier K., Voncken P., Diehl B.: Nicotine phase 2 metabolites in human urine- structure of metabolically formed trans-3'-hydroxycotinine glucuronide. *Med. Sci. Res.*, 20:863-865, 1992.
275. Schepers G., Rustemeier K., Walk R.A., Hackenberg U.: Metabolism of S-nicotine in noninduced and Aroclor-induced rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 18(2):187-197, 1993.
276. Schmitterlöw C.G., Hansson E., Andersson G., Appelgren L.E., Hoffmann P.C.: Distribution of nicotine in the central nervous system. Nicotine in the CNS, *Ann. NY Acad. Sci.*, 142:2-14, 1967.
277. Schuller H.M., Castonguay A., Orloff M., Rossignol G.: Modulation of the uptake and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by nicotine in hamster lung. *Cancer Res.*, 51:2009-2014, 1991.
278. Schwartz S.L., McKennis H.: Studies on the degradation of the pyrrolidine ring of (-)-nicotine *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 238(5):1807-1812, 1963.
279. Schwartz S.L., McKennis H.: Mammalian degradation of (-)-demethylcotinine. *Nature*, 202:594-595, 1964.
280. Seaton M., Kyerematen G.A., Morgan M., Jeszenka E.V., Vesell E.S.: Nicotine metabolism in stump-tailed macaques, *Macaca arctoides*. *Drug Metab. Dispos.*, 19(5):946-954, 1991.
281. Seeman J.I., Secor H.V., Armstrong D.W., Timmons K.D., Ward T.J.: Enantiomeric resolution and chiral recognition of racemic nicotine and nicotine analogues by β -cyclodextrin complexation. *Anal. Chem.*, 60:2120-2127, 1988.

282. Sepkovic D.W., Haley N.J., Axelrad C.M., Shigematsu A., LaVoie E.J.: Short-term studies on the *in vivo* metabolism of N-oxides of nicotine in rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 18:205-214, 1986.
283. Shen W., Franke J., Vunakis H.V.: Nicotinamide nucleotide analogues of nicotine and cotinine. *Biochem. Pharmacol.*, 26:1835-1840, 1977.
284. Shen W.C., Greene K.M., Vunakis H.V.: Detection by radioimmunoassay of nicotinamide nucleotide analogues in tissues of rabbits injected with nicotine and cotinine. *Biochem. Pharmacol.*, 26:1841-1846, 1977.
285. Shen W.C., Vunakis H.V.: The formation and characterization of the nicotine analog of triphosphopyridine nucleotide. *Biochemistry*, 13(26):5362-5367, 1974.
286. Shibagaki M., Matsushita H., Kaneko H.: Stereoselectivity in the synthesis of 5'-alkylated nicotines. *Heterocycles*, 24(8):2315-2319, 1986.
287. Shibagaki M., Matsushita H., Kaneko H.: The synthesis of 5'-alkylnicotines. *Heterocycles*, 24(2):423-428, 1986.
288. Shibata K.: Fates of N'-methylnicotinamide and nicotinamide N-oxide in mice. *Agric. Biol. Chem.*, 54:1739, 1990.
289. Shigenaga M.K., Trevor A.J., Castagnoli N.: Metabolism- dependent covalent binding of (S)- [5- ³H]nicotine to liver and lung microsomal macromolecules. *Drug Metab. Dispos.*, 16(3):397-402, 1988.
290. Shulgin A.T., Jacob P.III., Benowitz N.L., Lau D.: Identification and quantitative analysis of cotinine-N-oxide in human urine. *J. Chromatogr.*, 423:365-372, 1987.
291. Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C.: Spectrometric identification of organic compounds. Ed: Sawicki D., John Wiley and Sons Inc., Singapore, 1991.
292. Slanina P., Stålhandske T.: *In vitro* metabolism of nicotine in liver of ageing mice. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 226:258-262, 1977.
293. Sloan J.W., Martin W.R., Hernandez J., Hook R.: Binding characteristics of (-)- and (+)- nicotine to the rat brain P2 Fraction. *Pharmacol. Biochem.*, 23:987-993, 1985.
294. Soranno T.M., Sultatos L.G.: Biotransformation of the insecticide parathion by mouse brain. *Toxicol. Lett.*, 60:27-37, 1992.
295. Stålhandske T.: The metabolism of nicotine and cotinine by a mouse liver preparation. *Acta Physiol. Scand.*, 78:236-248, 1970.
296. Stålhandske T.: Effects of increased liver metabolism of nicotine on its uptake, elimination and toxicity in mice. *Acta Physiol. Scand.*, 80:222-234, 1970.
297. Stålhandske T., Slanina P.: Lethal brain concentrations of nicotine in mice of different ages. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 28:233-240, 1970.

298. Stålhandske T., Slanina P., Tjälve H., Hansson E., Schmitterlöw C.G.: Metabolism *in vitro* of ^{14}C - nicotine in livers of foetal, newborn and young mice. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 27:363-380, 1969.
299. Stehlik G., Kainzbauer J., Tausch H., Richter O.: Improved method for routine determination of nicotine and its main metabolites in biological fluids. *J. Chromatogr.*, 232:295-303, 1982.
300. Sugihara K., Kitamura S., Tatsumi K.: S-(-) Nicotine-1'-N-oxide reductase activity of rat liver aldehyde oxidase. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 40(3):535-541, 1996.
301. Swain M.L., Eisner A., Woodward C.F., Brice B.A.: Ultraviolet absorption spectra of nicotine, nornicotine and some of their derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 71:1341-1345, 1949.
302. Takahashi K., Shibagaki M., Matsushita H.: Formylation of amines by dimethylformamide in the presence of hydrous zirconium oxide. *Agric. Biol. Chem.*, 52(3):853-854, 1988.
303. Testa B., Jenner P.: Phase I reactions. Ed.: Dekker M., Drug metabolism. Chemical and biochemical aspects, s. 61- 99, New York, Basel, 1976.
304. Thompson J.A., Norris K.S., Petersen D.R.: Isolation and analysis of N-oxide metabolites of tertiary amines: Quantitation of nicotine-1'-N-oxide formation in mice. *J. Chromatogr.*, 341:349-359, 1985.
305. Tilstone W.J., Stead A.M.: Pharmacokinetics, metabolism and the interpretation of results. Ed.: Moffat A.C., Jackson J.W., Mass M.S., Widdop B., 276-305, The pharmaceutical press, London, 1986.
306. Tschirch, C., Kraus L.: Goldregen-Alkaloid Cytisin. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 132(47):2560-2561, 1992.
307. Tsujimoto A., Nakashima T., Tanino S., Dohi T., Kurogochi Y.: Tissue distribution of [^3H] nicotine in dogs and rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32:21-31, 1975.
308. Tunç N., Yılmaz F., Ülgen M., Gorrod J.W.: *In vitro* metabolic N- and C-oxidation of phenanthridine. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 22(4):345-349, 1997.
309. Turner D.M.: The metabolism of [^{14}C] nicotine in the cat. *Biochem. J.*, 115:889-896, 1969.
310. Tynes R.E., Philpot R.M.: Tissue and species-dependent expression of multiple forms of mammalian microsomal flavin-containing monooxygenase. *Mol. Pharmacol.*, 31:569-574, 1987.
311. Ülgen M., Gorrod J.W.: Synthesis and characterisation of some new 2,4,6-trisubstituted N,N-dibenzylanilines. *J. Pharm. Univ. Mar.*, 7(1):25-32, 1991.

312. Ülgen M., Gorrod J.W.: Synthesis, isolation and characterisation of some substituted N-benzyl and N-benzoyl anilines. J. Fac. Pharm., Istanbul, 30:1-9, 1994.
313. Ülgen M., Gorrod J.W.: Studies on the *in vitro* hepatic microsomal formation of amides during the metabolism of certain secondary and tertiary benzylic amines. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 25(2):145-150, 2000.
314. Ülgen M., Kajbaf M., Lamb J., Jahanshahi M., Gorrod J.W., Naylor S.: Characterization of N-benzylcarbazole and its metabolites from microsomal mixtures by tandem mass spectrometry. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 19(4):343-348, 1994.
315. Venkatesh K., Levi P.E., Hodgson E.: The flavin containing monooxygenase of mouse kidney. Biochem. Pharmacol., 42(7):1411-1420, 1991.
316. Vesell E.S.: On the significance of host factors that affect drug disposition. Clin. Pharmacol. Ther., 31(1):1-7, 1982.
317. Voncken P., Rustemeier K., Schepers G.: Identification of cis-3'-hydroxycotinine as a urinary nicotine metabolite. Xenobiotica, 20(12):1353-1356, 1990.
318. Voncken P., Schepers G., Schäfer K-H.: Capillary gas chromatographic determination of trans-3'-hydroxycotinine simultaneously with nicotine and cotinine in urine and blood samples. J. Chromatogr., 479:410-418, 1989.
319. Wada E., Bowman E.R., Turnbull L.B., McKennis H.: Norcotinine (desmethylnicotinine) as a urinary metabolite of nornicotine. J. Med. Pharm. Chem., 4(1):21-30, 1961.
320. Wada E., Yamasaki K.: Degradation of nicotine by soil bacteria. J. Am. Chem. Soc., 76:155-157, 1954.
321. Watkins P.B.: Role of cytochrome P-450 in drug metabolism and hepatotoxicity. Seminars in liver disease., 10(4):235-250, 1990.
322. Watkins P.B., Wrighton S.A., Schuetz E.G., Molowa D.T., Guzelian P.S.: Identification of glucocorticoid-inducible cytochrome P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. J. Clin. Invest., 80:1029-1036, 1987.
323. Watson I.D.: Rapid analysis of nicotine and cotinine in urine of smokers by isocratic high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 143:203-206, 1977.
324. Waxman D.J., Azaroff L.: Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. Biochem. J., 281:577-592, 1992.
325. Waxman D.J., Dannan G.A., Guengerich F.P.: Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: Age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. Biochemistry, 24:4409-4417, 1985.
326. Werle E., Koebke K.: Über den abbau von nikotin und nikotylin durch lebergewebe. Ann., 562:60-66, 1949.

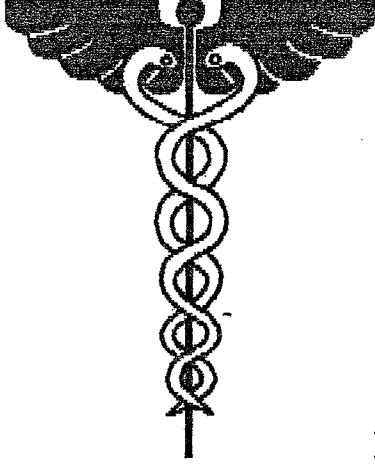
327. Werle E., Schievelbein H.: Tabellen zur toxikologie, pharmakologie und chemie von inhaltsstoffen des tabaks und des tabakrauchs. *Arzneimittelforschung*, 12:202-206, 1962.
328. Wheeler C.W., Guenther T.M.: Cytochrome P-450-dependent metabolism of xenobiotics in human lung. *J. Biochem. Toxicol.*, 6(3):163-169, 1991.
329. Whidby J.F., Seeman J.I.: The configuration of nicotine. A nuclear magnetic resonance study. *J. Org. Chem.*, 41(9):1585-1590, 1976.
330. Williams D.E., Ding X., Coon M.J.: Rabbit nasal cytochrome P-450 NMa has activity as a nicotine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166(2):945-952, 1990.
331. Williams D.E., Shigenaga M.K., Castagnoli N.: The role of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenase in the metabolism of (S)-nicotine by rabbit lung. *Drug Metab. Dispos.*, 18(4):418-428, 1990.
332. Xu A.S., Peng L.L., Havel J.A., Petersen M.E., Fiene J.A., Hulse J.D.: Determination of nicotine and cotinine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization interface. *J. Chromatogr.*, 682:249-257, 1996.
333. Yamamoto I., Inoki R., Iwatsubo K.: Penetration of nicotine-¹⁴C into several rat tissues *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 12:560-567, 1968.
334. Yamano S., Tatsuno J., Gonzalez F.J. : The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochemistry*, 29:1322-1329, 1990.
335. Yang K.S., Gholson R.K., Waller G.R.: Studies on nicotine biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 87:4184-4188, 1965.
336. Yi J.M., Sprouse C.T., Bowman E.R., McKennis H.: The interrelationship between the metabolism of (S)-cotinine-N-oxide and (S)-cotinine. *Drug Metab. Dispos.*, 5(4):355-362, 1977.
337. Yong T., Zheng M.Q., Linthicum D.S.: Nicotine induces leukocyte rolling and adhesion in the cerebral microcirculation of mouse. *J. Neuroimmunol.*, 80:158-164, 1997.
338. Zevin S., Jacob P., III, Benowitz N.: Cotinine effects on nicotine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 61(6):649-654, 1997.
339. Zhang Y., Jacob P.III., Benowitz N.L.: Determination of nornicotine in smokers'urine by gas chromatography following reductive alkylation to N'-propylnornicotine. *J. Chromatogr.*, 525:349-357, 1990.
340. Zhu P.L., Snyder L.R., Dolan J.W., Djordjevic N.M., Hill D.W., Sander L.C., Waeghe T.J.. Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution. I. Predicting separation as a function of temperature and gradient conditions. *J. Chromatogr.*, 756:21-39, 1996.

341. Zuccaro P., Altieri I., Rosa M., Passa A.R., Pichini S., Ricciarello G., Pacifici R.:
Determination of nicotine and four metabolites in the serum of smokers by high-
performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. Biomed.*
Appl., 621:257-261, 1993.



9. ÖZGEÇMİŞ

27 Şubat 1972 tarihinde İstanbul'da dünyaya geldim. İlk ve orta öğrenimimi sırasıyla Şişli 19 Mayıs İlkokulu ve Nişantaşı Kız Lisesinde tamamladım. 1989 Yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ni kazandım. Fakülteyi 1993 yılında bitirdim. 1993 Eylül döneminde Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nın açtığı sınavı kazanarak bu bölümde yüksek lisans programına başladım. 1994 Ocak döneminde aynı Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 1996 Şubat döneminde Prof. Dr. Mert Ülgen'in danışmanlığını yaptığı "N-(2,4,6-trimetilbenzil)-N,N-dibenzilamin, N-(2,6-diklorobenzil)-N,N-dibenzilamin ve N-isopropil-N,N-dibenzilaminin *in vitro* mikrozomal metabolizması" konulu yüksek lisans tezimi verdim. Aynı dönemde enstitü tarafından açılan sınavı kazanarak doktora programına Prof. Dr. Mert Ülgen'in danışmanlığında başladım. Halen Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU PROJE ONAY FORMU

ONAY NO:12.99.mar

SAYIN:FEYZA YILMAZ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULUNA " 15.3.1999" TARİHİNDE YAPMIŞ
OLDUĞUNUZ "NİKOTİN ARA METABOLİTLERİNİN VE NİKOTİN ANALOGLARININ
SENTEZ ANALİZ VE METABOLİTLERİ"BAŞLIKLİ ARAŞTIRMA PROJESİ BAŞVURUSU
DHEK ÜYELERİNCE İNCELENMİŞ VE 16.7.1999 TARİHİNDE ONAY ALMIŞTIR.

VET.HEK.DİLEK ÖZBEYLİ
DHEK YÜRÜTÜCÜ SEKRETER

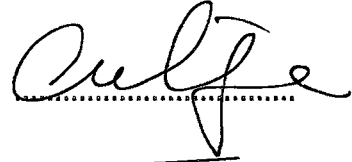
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DHEK BAŞKANLIĞI

SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

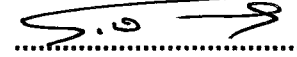
Doktora öğrencisi Feyza YILMAZ'ın, çalışması jürimiz tarafından Farmasötik Kimya
nabilim Dalı Doktora tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

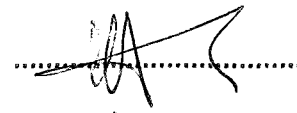
ez Danışmanı : Prof.Dr.Mert ÜLGEN
niversitesi : Marmara



ye : Prof.Dr.Sevim ROLLAS
niversitesi : Marmara



ye : Doç.Dr.Eser İLHAN
niversitesi : İstanbul



ye : Yrd.Doç.Dr.Güniz KÜÇÜKGÜZEL
niversitesi : Marmara



ye : Yrd.Doç.Dr.İlkay KÜÇÜKGÜZEL
niversitesi : Marmara



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2002 tarih ve
ıylık kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür