

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI 5-KLORO-6-(TİYAZOL-4-İL)-2-OKSO-3H-BENZOTİYAZOL
TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE COX İNHİBİTÖR
ETKİLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. SELCEN ADAK

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Deniz S. DOĞRUER

ANKARA
Haziran 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI 5-KLORO-6-(TİYAZOL-4-İL)-2-OKSO-3H-BENZOTİYAZOL
TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE COX İNHİBİTÖR
ETKİLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. SELCEN ADAK

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Deniz S. DOĞRUEK

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2007-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Haziran 2007

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Şemalar, Tablolar	III
Kısaltmalar	IV
Teşekkür	V
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Enflamasyon, Prostaglandin Yolağı ve Siklooksijenazlar	5
2.2. Non-Steroida Antienflamatuvar İlaçlar ve COX-2 Selektiviteleri	11
2.3. Selektif COX-2 İnhibitörleri	15
2.4. Tromboksanlar, Prostasiklinler ve Antiplatelet Aktivite	33
2.5. Tromboksan Sentaz İnhibitörleri (TxSIs)	34
2.6. Tiyazol ve Türevleri	37
2.6.1. Tiyazol	37
2.6.1.1. Tiyazol Yapısının Genel Sentez Yöntemleri	38
2.6.2. 2-Okso-3H-Benzotiyazol	40
2.6.2.1. 2-okso-3H-Benzotiyazol Yapısının Genel Sentez Yöntemleri	41
2.6.2.2. 5-Kloro-2-okso-3H-Benzotiyazol Yapısının Genel Sentez Yöntemleri	43
2.6.2.3. 2-okso-3H-Benzotiyazol ve 5-Kloro-2-okso- 3H-Benzotiyazolün Kimyasal Tepkimeleri	45
2.6.2.4. 2-Okso-3H-Benzotiyazol ve 5-Kloro-2-Okso-3H- Benzotiyazol Türevlerinin Biyolojik Etkileri	47
2.6.2.4.1. Antinosiseptif, Antienflamatuvar ve Analjezik Etkili Türevler	47
2.6.2.4.2. 2-Okso-3H-Benzotiyazol Yapısına Sahip Farklı Biyolojik Etkili Türevler	50
2.7. Mikrodalga Destekli Kimyasal Sentez	52
2.7.1. Mikrodalga Teorisi	52
2.7.2. Mikrodalga Reaktörü Kullanılarak Gerçekleştirilen Sentez Örnekleri	55
2.7.3. Tiyazol ve Benzotiyazol Halka Sistemlerinin Mikrodalga Reaktörü Destekli Sentez Örnekleri	59
2.8. COX Enzimi İnhibisyonunun <i>in vitro</i> Tayini	60
2.8.1. COX Enzimi İnhibisyonunun Tayininde Kullanılan İmmünoanalizler	65
2.8.1.1. ELISA Testi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	67
2.8.1.1.1. Sandviç(Nonkompetitif) ELISA	68
2.8.1.1.2. Kompetitif ELISA	69
2.8.1.1.3. Direkt ELISA	70
2.8.1.1.4. İndirekt ELISA	71

2.8.2. COX Enzimi İnhibisyonunun Tayininde Kullanılan Diğer <i>in vitro</i> Yöntemler	72
2.8.2.1. Polarografik Yöntem (Oksigraf)	72
2.8.2.2. Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi	73
3. GEREÇ ve YÖNTEM	76
3.1. Kimyasal Çalışmalar	76
3.1.1. Materyal ve Yöntem	76
3.1.1.1. Kimyasal Bileşikler	76
3.1.1.2. Yöntem	76
3.1.1.2.1. 5-kloro-2-okso-3 <i>H</i> -benzotiyazol	76
3.1.1.2.2. 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3 <i>H</i> -benzotiyazol	77
3.1.1.2.3. Tiyobenzamit Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri	77
3.1.1.2.4.5-kloro-6(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3 <i>H</i> -benzotiyazol Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri (Bileşik 1-6)	77
3.1.1.2.5. [5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3 <i>H</i> -benzotiyazol-3-il] asetik asit Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri (Bileşik 7-12)	78
3.2. Analitik Çalışmalar	78
3.2.1. Erime Derecesi Tayini	78
3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller	78
3.2.2.1. Materyal	78
3.2.2.2. Yöntem	79
3.2.3. Spektrometrik Kontroller	79
3.2.3.1. IR Spektrumları	79
3.2.3.2. ¹ H-NMR Spektrumları	79
3.2.4. Elementel Analizler	80
3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	80
3.3.1. COX-1 Enzimi İnhibisyonunun Saptanması	80
3.3.1.1. Materyal	80
3.3.1.2. Yöntem	81
3.3.1.2.1. Örneklerin Hazırlanması	81
3.3.1.2.2. Reajanların Hazırlanması	82
3.3.1.2.2.1. TxB ₂ Standartlarının Hazırlanması	82
3.3.1.2.2.2. Yıkama Tamponunun Hazırlanması	82
3.3.1.2.3. Analiz Prosedürü	82
3.3.1.2.4. Sonuçların Hesaplanması	84
3.3.2. COX-2 Enzimi İnhibisyonunun Saptanması	85
3.3.2.1. Materyal	85
3.3.2.2. Yöntem	86
3.3.2.2.1. Örneklerin Hazırlanması	86
3.3.2.2.2. Reajanların Hazırlanması	86
3.3.2.2.2.1. PGE ₂ Standartlarının Hazırlanması	86
3.3.2.2.2.2. Yıkama Tamponunun Hazırlanması	87
3.3.2.2.3. Analiz Prosedürü	87
3.3.2.2.4. Sonuçların Hesaplanması	88

4. BULGULAR	90
4.1. Kimyasal Çalışmalar	90
4.1.1. 5-kloro-6-[(2-fenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol (Bileşik 1)	90
4.1.2. 5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol (Bileşik 2)	92
4.1.3. 5-kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol (Bileşik 3)	94
4.1.4. 5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol (Bileşik 4)	96
4.1.5. 5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol (Bileşik 5)	98
4.1.6. 5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol (Bileşik 6)	100
4.1.7. [5-kloro-6-[(2-fenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il] asetik asit (Bileşik 7)	102
4.1.8. [5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il] asetik asit (Bileşik 8)	104
4.1.9. [5-kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il] asetik asit (Bileşik 9)	106
4.1.10. [5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il] asetik asit (Bileşik 10)	108
4.1.11. [5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il] asetik asit (Bileşik 11)	110
4.1.12. [5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il] asetik asit (Bileşik 12)	112
4.2. Biyolojik Aktivite Çalışması	114
5. TARTIŞMA	116
6. SONUÇ	124
7. ÖZET	126
8. SUMMARY	127
8. KAYNAKLAR	128
9. ÖZGEÇMİŞ	140

ŞEKİLLER, ŞEMALAR, TABLolar

Şekil 1: COX-1 ve COX-2'nin NSAİİ Bağlanma Bölgelerinin Şematik Olarak Karşılaştırılması	8
Şekil 2: COX-1 ve COX-2 İçin Bazı Anahtar Aminoasit Kalıntıları	9
Şekil 3: Normal ve Aterosklerotik Arterlerde TxA ₂ ve PGI ₂ Üretiminin Herhangi Bir Ajanla Muamelenin Olmadığı, Düşük Doz Aspirin İle Muamele Edildiği ve Koksiblerle Muamele Edildiği Durumlar İçin Şematik Olarak Karşılaştırılması	27
Şekil 4: Sandviç ve Kompetitif ELISA	69
Şekil 5: Sandviç ve Kompetitif ELISA Uygulamasının Şematik Gösterimi	69
Şekil 6: Direkt ve İndirekt ELISA	71
Şekil 7: Polarografik Yöntem ile Ölçülen Oksijen Tüketim Hızı	73
Şema 1: Araşidonik Asit Yolağından Elde Edilen Metabolitler	6
Tablo 1: NSAİİ'lerin Kimyasal ve Farmakolojik Sınıflandırılması	12
Tablo 2: Küçük Kimyasal Değişikliklerin Asetilsalisilik Asitin COX-1 ve COX-2 Bağlanma Bölgesi ile Etkileşimi Üzerine Etkileri	13
Tablo 3: Zomepirak ve Flurbiprofen Analoglarının COX-2 Selektiviteleri	14
Tablo 4 : Selektif COX-2 İnhibitörleri Sınıfına Ait Bazı Kimyasal Bileşikler	16
Tablo 5: Radyasyon Tiplerinin ve Bağ Enerjilerinin Karşılaştırılması	52
Tablo 6: 2,5-disübstitüe-1,3,4-oksodiazolün mikrodalga destekli sentezi ile geleneksel yöntemle yapılan sentezinin süre ve verim açısından karşılaştırılması	59
Tablo 7: NSAİİ'lerin COX-2 Selektivitesini Araştırmak İçin En Çok Kullanılan <i>in vitro</i> Analiz Sistemler	61
Tablo 8: TxB ₂ Test Plan Sayfası	83
Tablo 9: PGE ₂ Test Plan Sayfası	87
Tablo 10: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 inhibitör aktivite testi sonuçları	114
Tablo 11: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-2 inhibitör aktivite testi sonuçları	115

Tablo 12: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin kimyasal yapıları, erime dereceleri ve % verimleri	116
Tablo 13: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite testi sonuçları	120
Tablo 14: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin kimyasal yapıları, erime dereceleri, % verimleri, COX-1 ve COX-2 inhibisyon aktivite testi sonuçları	125

KISALTMALAR

NSAİİ	: Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
COX	: Siklooksijenaz
GI	: Gastrointestinal
VIGOR	: The Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research Study
CLASS	: The Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study
APPROVe	: Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX
PGI₂	: Prostasiklin
TxA₂	: Tromboksan A ₂
HETE	: Hidroeikozatetraenoik asit
HpETE	: Hidroperoksieikozatetraenoik asit
LTB₄	: Lökotrien B ₄
LTA₄	: Lökotrien A ₄
LTC₄	: Lökotrien C ₄
LTD₄	: Lökotrien D ₄
LTE₄	: Lökotrien E ₄
PGG₂	: Prostaglandin G ₂
PGH₂	: Prostaglandin H ₂
PGD₂	: Prostaglandin D ₂
PGF₂	: Prostaglandin F ₂
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
TxB₂	: Tromboksan B ₂
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
TxSIs	: Tromboksan Sentaz İnhibitörleri
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
PFA	: Polifosforik Asit
Diglim	: Dietilen glikol dimetil eter
DMF	: Dimetil Formamit

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında yanımda olan, bilgisini ve zamanını hiçbir zaman esirgemeyen, bana sonsuz destek ve özveri gösteren değerli hocam tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Deniz S. Doğruer'e ,

Yüksek Lisans çalışmalarına imkan verdiği için Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ningur Noyanalpan'a,

Çalışmalarım esnasında bana her konuda yardımcı olan, desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Serdar Ünlü'ye,

Aktivite çalışmalarında bilgileriyle yol gösteren Sayın Doç. Dr. Erden Banoğlu'na, zamanını ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Dr. Yasemin Dünder'a,

Tez çalışmam boyunca bana yakın ilgi, destek ve yardım gösteren Sayın Doç. Dr. Tijen Önkol'a,

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Şeyma Cankara, Arş. Gör. Leyla Uzun ve Arş. Gör. Şölen Uurlu'ya,

Tüm Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Ve

Tez çalışmam boyunca verdikleri her türlü maddi ve manevi destek için sevgili aileme,

Kişisel gelişimime katkı sağlayan, hedeflerime giden yolda beni sürekli cesaretlendiren, ufkumu açan, her zaman sonsuz desteğini ve ilgisini gördüğüm, moral kaynağım sevgili nişanlım İbrahim Durmuş'a,

teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ağrı ve enflamasyonun tedavisinde en yaygın olarak kullanılan terapötik ajanlardır. Bu grup ilaçların kullanımı özellikle romatizmal hastalıklarda önem kazanır. Çünkü romatizmal hastalıklardaki enflamasyon şartları, diğer grup hastalıklardan daha çok rahatsızlığa neden olur. Romatizmal hastalıklar, otoimmün şartları da içine alan bağ dokusu hastalıkları olarak sınıflandırılabilirler. Bunlar romatoid artrit, osteoartrit, gut, romatik ateş, sistemik lupus eritematos ve psoriasis de içine alır. Bu hastalıklar tek veya birçok organ sistemini etkileyen kronik enflamasyon durumlarıdır ve tedavileri esas olarak enflamasyona yöneliktir. Amerika'da 60 yaş üzeri hastalarda yapılan bir araştırma sonucuna göre, 50 milyon insanın benzer klinik artrit tipine sahip olduğu ve bunların 20 milyonunun klinik tedaviye gereksinim duyduğu göz önüne alındığında, NSAİİ'lerin önemi anlaşılmaktadır.¹

Aspirin® (asetilsalisilik asit), 108 yıl önce 1899'da romatizmal hastalıkları tedavi etmek amacıyla piyasaya sürülen ilk güçlü antienflamatuvar ilaçtır. Takip eden yıllarda fenilbutazon, indometasin, ibuprofen gibi çok sayıda NSAİİ geliştirilmiştir. NSAİİ'lerin etki mekanizmasının keşfedilmesi ise 1971 yılında gerçekleşmiştir. Vane adlı araştırmacı ve arkadaşları siklooksijenaz enziminin bütün bu bileşiklerin ortak moleküler hedefi olduğunu belirlemiştir.^{2,3}

Siklooksijenaz (COX) enziminin iki izoformu bulunmaktadır. COX-2 olarak adlandırılan ve COX-1 enziminden belirgin şekilde farklı olan bu ikinci izoform 1990'ların başında keşfedilmiştir. Her iki enzim de araşidonik asiti prostaglandinlere dönüştürür, ancak organizmadaki dağılımları ve fizyolojik rolleri açısından birbirinden ayrılırlar.^{2,3}

COX-1 fizyolojik koşullarda hemen hemen tüm dokularda bulunur (gastrik mukoza, ince ve kalın bağırsak mukozası, böbrek, plateletler, vasküler endotelyum) ve homeostatik fonksiyonlara aracılık eden prostanoidleri üretir. COX-1 miktarı enflamasyon esnasında artmaz.² COX-2 ise; enflamatuvar, mitojenik ve onkogenik uyarılar, büyüme faktörleri, hormonlar, yüksek stres, böbreğin tuz/su yoksunluğu vb. diğer fizyolojik uyarılar ile yüksek oranda indüklenir ve

enflamasyon sürecinde ağrıyı oluşturan prostaglandinlerin üretimini sağlar.^{2,3}

NSAİİ'lar romatizmal hastalıkların tedavisinde büyük yarar göstermektedirler. Fakat ne yazık ki, bu grup ilaçlar ülserasyon gibi gastrointestinal (GI) toksisiteler başta olmak üzere birçok yan etkilere sahiptir. ABD'de NSAİİ'ların neden olduğu GI ülserasyonlar nedeniyle yılda 7000 ölüm gerçekleştiği hesap edilmektedir.²

NSAİİ'ların GI ve renal sistemdeki toksisitesi, bu grup ilaçların COX-1 ve COX-2 inhibisyonunda bir seçiciliklerinin olmaması ile ilişkilendirilmektedir. Tüm klasik NSAİİ'lar standart antienflamatuvar dozlarda hem COX-1'i hem de COX-2'yi inhibe ederler. Oysa yapılan araştırmalar, GI ve renal fonksiyonlarda önemli olan prostaglandinlerin COX-1; enflamasyona, ateşe ve ağrıya aracılık eden prostaglandinlerin ise COX-2 aracılığı ile üretildiği hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur. Yani, yararlı antienflamatuvar ve analjezik etkiler COX-2'nin inhibisyonuna bağlıdır. GI toksisite ise COX-1'in eş zamanlı inhibisyonunun bir sonucudur.^{2,3}

Bu hipotezin ortaya atılmasını takip eden yıllarda antienflamatuvar ilaç keşfi üzerine çalışmalar çarpıcı şekilde hız kazanmıştır. Bugün 500'den fazla selektif COX-2 inhibitörünün varlığı bilinmektedir.²

Selektif COX-2 inhibitörleri arasında en büyük araştırma visinal diaril heterosiklikler olarak adlandırılan sınıf üzerine yapılmıştır.^{2,3}

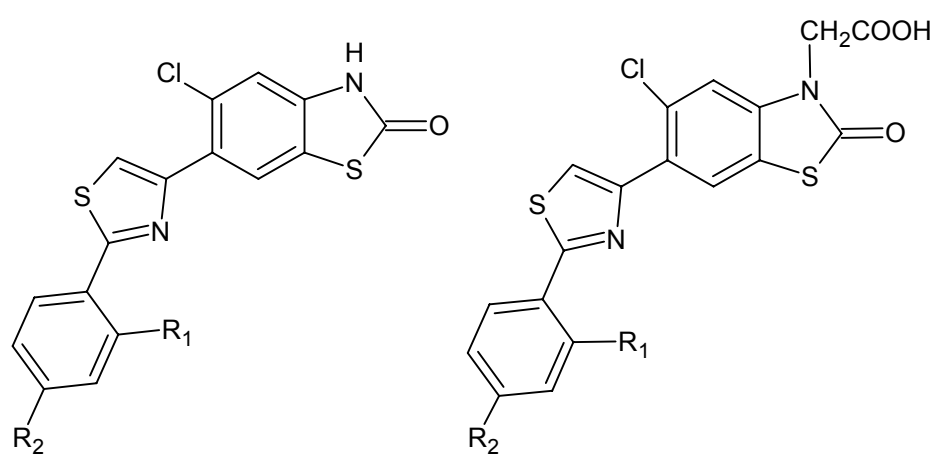
Yapılan çalışmalar sonucunda bu sınıfa ait birçok etkili bileşik sentez edilmiştir. Vioxx®'un etken maddesi olan Rofekoksib ve Celebrex®'in etken maddesi olan Selekoksib bu grup bileşiklere örnektir. Ayrıca, Dup-697 ve Valdekoksib de bu grubun etki bakımından öne çıkan bileşiklerindendir.^{2,3,4}

Zaman içerisinde yapılan araştırmalar sonucunda, COX-2 enziminin böbrekte, vasküler sistemde, akciğerde, kemikte, pankreas adacıklarında, spinal kordta ve beyinde fizyolojik koşullarda bulunduğu saptanmıştır. Böylece, selektif COX-2 inhibitörlerinin klasik NSAİİ'lara nazaran daha iyi tolere edilmediği, sadece eskiden var olandan farklı yeni yan etkiler ortaya çıkardığı görüşü yaygınlaşmıştır.² Gerçekten de, ortaya çıkan yan etkiler kardiyovasküler sistemle ilgili olup, GI yan etkilerden çok daha ciddi sonuçlara yol açabilecek niteliktedir.²

Güçlü bir selektif COX-2 inhibitörü olarak 1999 yılında dünya ilaç piyasasına sunulmuş olan Rofekoksib etken maddesini içeren Vioxx® adlı ilaç kardiyovasküler hastalıkları olan veya risk altında olan hasta gruplarında kalp krizleriyle sonuçlanan ciddi yan etkilere neden olduğu gerekçesiyle 2005 yılında piyasadan çekilmiştir. VIGOR, CLASS, APPROVe adlı araştırmaların sonuçları bu kararın alınmasında etkili olmuştur.⁵⁻⁸

Selektif COX-2 inhibitörlerinin platelet aktivasyonunda önemli rollere sahip olan prostasiklin (PGI₂) ile tromboksan A₂ (TxA₂) arasındaki dengeyi bozarak bu yan etkilere neden oldukları düşünülse de henüz ortaya çıkan kardiyovasküler yan etkilerin mekanizması aydınlatılamamıştır.⁷

Bu bilgiler ışığında, merkezi halkası tiyazol olan 1,3 diaril yapısında COX-2 inhibitörü olabileceği düşünülen 12 adet bileşik tasarlanmıştır. Tasarlanan bileşiklerin 6 tanesi aynı zamanda TxA₂ sentaz inhibitörlerinin farmakoforik grubuna sahip olduğu için, bu bileşiklerin TxA₂ sentaz inhibisyonu yaparak antiplatelet aktivite göstereceği de düşünülmüştür. Tasarlanan bileşikler, merkezi tiyazol halkasına meta konumlarından bağlanmış olan 5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol ve fenil halkalarını içermektedir. Fenil halkasının 2 ve 4 numaralı konumlarına F, Cl, OCH₃ gibi küçük grupların süstitüsüyonu ile türevlendirmeye gidilmiştir. Sentezi ve *in vitro* enzim deneyleri ile COX-2 selektivitelerinin araştırılması amaçlanan TxA₂ sentaz inhibitörü de olabilecek bileşiklerin kimyasal yapıları aşağıda gösterilmiştir.



R ₁	R ₂
H	H
H	Cl
H	F
H	OCH ₃
Cl	H
F	H

2. GENEL BİLGİLER

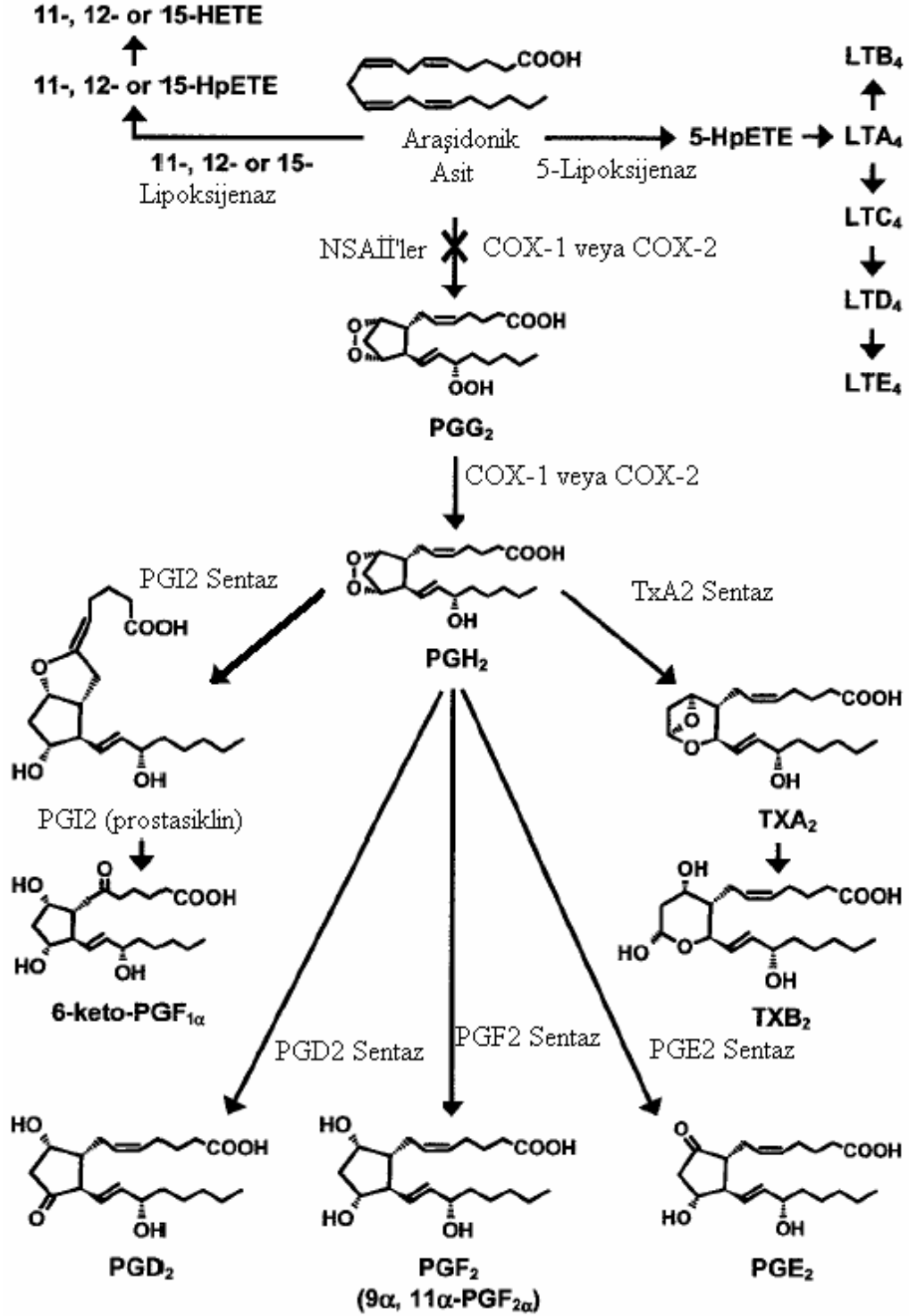
2.1. Enflamasyon, Prostaglandin Yolağı ve Siklooksijenazlar

Enflamasyon, çeşitli fiziksel ve kimyasal etkilerin, mikroorganizma ve parazit enfeksiyonlarının neden olduğu ve damar kas dokusu dahil bütün organlarda oluşan bir tepki reaksiyonudur. Kızarıklık (eritema), ödem, ağrı, artmış sıcaklık ve fonksiyon bozukluğu enflamasyonun belirtileridir. Enflamasyon akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır. Akut enflamasyon kısa süreli olup, plazma sıvısı ve protein eksüdasyonu ve belirgin nötrofil birikimi ile karakterizedir. Kronik enflamasyonda ise lenfosit ve makrofaj toplanması görülür ve uzun sürelidir. Vazoaktif aminler, plazma proteazları, platelet aktive eden faktör, sitokinler, nitrik oksit ve oksijen kaynaklı serbest radikaller, lizozomal unsurlar ve araşidonik asit metabolitleri enflamasyonun kimyasal mediyatörleridir.^{1,9,10}

Araşidonik asitten sentezlenen prostaglandinlerin enflamasyon, ağrı ve ateş oluşumunda önemli rolleri olduğu ve nonsteroidal antienflamatuvar ilaçların prostaglandin biyosentezini inhibe ederek etki gösterdikleri kanıtlanmıştır.¹

Araşidonik asit, hücre membranı fosfolipitlerinin hidrolizi sonucu serbest hale geçen doymamış yağ asitidir. Araşidonik asit ve analoglarından siklooksijenaz ve lipooksijenaz adları verilen iki farklı yolakla değişik eikozanoidler oluşur.¹

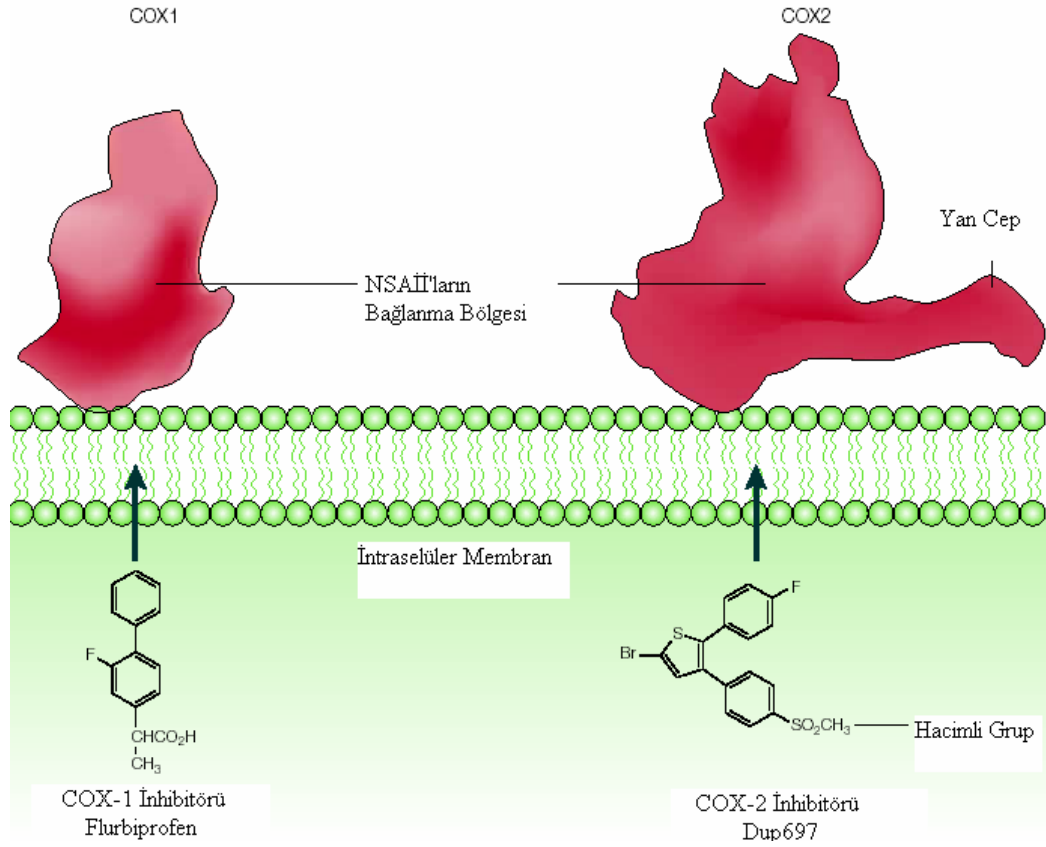
Araşidonik Asit Yolağı



Şema 1 : Araşidonik Asit Yolağından Elde Edilen Metabolitler¹¹

Prostaglandin endoperoksit sentaz olarak da bilinen siklooksijenaz (COX), araşidonik asidin prostaglandinlere dönüştürülmesi için gerekli olan anahtar enzimdir.¹² Siklooksijenaz enziminin COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. COX-2 olarak adlandırılan ve COX-1 enziminden belirgin şekilde farklı olan bu ikinci izoform 1990'ların başında keşfedilmiştir. Her iki enzim de araşidonik asiti prostaglandinlere dönüştürür, ancak organizmadaki dağılımları ve fizyolojik rolleri açısından birbirinden ayrılırlar.^{2,3} Yapısal olarak çok benzer olan bu izoformlar, fonksiyonel olarak birbirlerinden çok farklıdırlar. Bu duruma, enzim yapısındaki amino asit kompozisyonlarındaki ufak fakat büyük rol oynayan değişiklikler yol açmaktadır.¹³ COX-3 ve COX-4 olarak adlandırılan izoformların varlığı ise şüphelidir ve bu konuda henüz kesin bir bilgi yoktur.

COX-1 ilk olarak 1988 yılında koyun, fare ve insandan izole edilmiştir. Gen 22 kb boyutundadır. İnsanda 9q32-q33.3 kromozomunda yer almaktadır. 11 ekzon içerir. 2.8 kb'lık mRNA ve ~68 kDa'luk protein üretir. COX-2 geni ise 8,3 kb'lık bir gendir ve 10 ekzondan oluşur. İnsan 1q25.2-q25.3 kromozomunda yer alır. mRNA'sı 4.1-4.5 kb'dır ve ~68 kDa'luk bir proteini kodlar. Bununla birlikte, her iki enzim de benzer tersiyer yapıya sahiptir.^{12,14} COX-1 enzimi 576 aminoasit taşırken, COX-2 enzimi 587 aminoasit içermektedir. Aynı türlerde COX-1 ve COX-2 arasında amino asit diziliminde % 60-65 benzerlik vardır. Farklı türlerde ise her bir izoform amino asit dizilişi bakımından % 85-90 benzerlik gösterir. Siklooksijenaz izoformları arasında aminoasit dizilimindeki en büyük farklılık reseptöre bağlanma bölgelerinde görülmektedir. COX-2 enziminin C terminalinde bulunan 18 aminoasit COX-1 enziminde yer almamaktadır.¹⁵

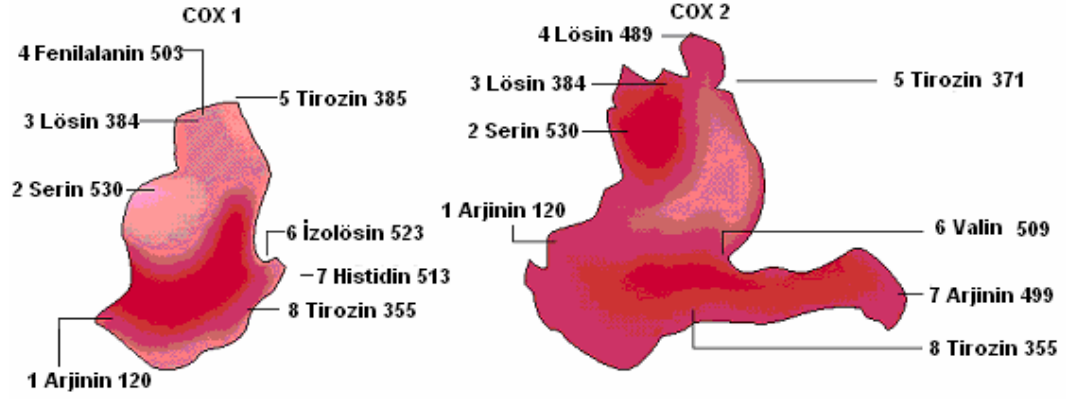


Şekil 1: COX-1 ve COX-2'nin NSAİİ Bağlanma Bölgelerinin Şematik Olarak Karşılaştırılması¹⁶

COX-1 ve COX-2 enzimleri homodimerdirler. Her monomer üç bölge içerir. Bunlar; epidermal büyüme faktörü benzeri bölge, membran bağlanma bölgesi ve katalitik bölgedir. Katalitik bölge hem siklooksijenaz hem de peroksidaz aktif bölgesini içerir.^{12,17}

Her iki COX yapısında da katalitik bölgenin merkezinden başlayıp, membran bağlanma bölgesinin dış yüzeyine kadar süren bir kanal bulunur. COX-1 ve COX-2'nin membran bağlanma bölgesi plazma membran tabakasının iç kısmı ile bağlantılıdır ve salınan araşidonik asitin COX aktif bölgesine veya kanala ulaşarak, PGG₂'ye dönüşmesini sağlar. Peroksidaz aktif bölgesi ile olan etkileşim ise PGG₂'nin PGH₂'ye redüklenmesi ile sonuçlanır. Birçok NSAİİ COX aktif bölgesine bağlanmak için araşidonik asit ile yarışır. COX kanalındaki substrat ve inhibitör bağlanmalarında sekiz aminoasit kalıntısı büyük bir rol oynar. Browner adlı araştırmacı aktif bölgeyi çevreleyen aminoasit kalıntılarını birinci ve ikinci

kabuk olarak tanımlamıştır. Birinci kabuk aminoasitler inhibitörler ile doğrudan temas halinde olanlardır. İkinci kabuk aminoasitler ise inhibitörlere doğrudan temas etmez.¹²



Şekil 2 : COX-1 ve COX-2 İçin Bazı Anahtar Aminoasit Kalıntıları¹⁶

Katalitik Merkez: COX-1 enziminde kanalın en üst kısmında bulunan Tirozin 385 aminoasiti (COX-2'de karşılık gelen homolog aminoasit Tirozin 371'dir) hem grubu ile birlikte katalitik merkezi oluşturur.^{12,16}

Asetilasyon Bölgesi: Serin 530 aminoasitinin hidroksil grubu asetilasyon için hedef bölgedir ve COX-1'in aspirin ile irreversible inhibisyonu bu yolla gerçekleşir. Bu polar aminoasit ayrıca indometasin gibi benzoil grubu içeren ya da diklofenak ve meklofenamat gibi anilino NH'ı içeren inhibitörlerin enzime bağlanmasında da rol oynar.^{12,16}

Yan Cep: Selektif COX-2 inhibitörlerinin bağlanmasında COX-2 enziminin iki yapısal özelliği rol oynar. Birincisi, COX-1'deki İzolösin 523 yerine COX-2'de bulunan daha küçük hacimli Valin 509, merkezdeki COX kanalına bitişik olarak buluna yan cebe ulaşımı sağlar. Ayrıca, COX-1'deki Histidin 513 yerine COX-2'de bulunan Arjinin 499, COX-2 inhibitörlerin sülfon kısmı ile hidrojen bağı yapar.

İkinci farklılık ise, COX-1'deki ikinci kabuk aminoasitlerinden olan Fenilalanin 503, COX-2'de Lösin 489 ile yer değiştirmiştir. Daha küçük hacimli olan bu aminoasit, COX-2'nin bağlanma bölgesinin en üst kısmında bulunan birinci kabuk aminoasitlerinden Lösin 384'e fazladan alan sağlar ve böylece daha büyük inhibitörlerin enzime bağlamasına olanak verir.^{12,16}

COX-1 ve COX-2 regölasyon ve doku dağılımında farklılık gösterirler. COX-1 fizyolojik koşullarda hemen hemen tüm dokularda (gastrik mukoza, ince ve kalın bağırsak mukozası, böbrek, plateletler, vasküler endotelyum) bulunur ve homeostatik fonksiyonlara aracılık eden prostanoitleri üretir. COX-1 miktarı enflamasyon esnasında artmaz.^y

COX-2 ise; enflamatuvar, mitojenik ve onkojenik uyarılar, büyüme faktörleri, hormonlar, yüksek stres, böbreğin tuz/su yoksunluğu vb. diğler fizyolojik uyarılar ile yüksek oranda indüklenir ve enflamasyon sürecini desteklemek için, ağrıyı oluşturan prostaglandinlerin üretimini sağlar.^{2,3}

Bu bulgular, COX-1 fizyolojik fonksiyonlardan sorumlu iken, COX-2'nin enflamasyondan sorumlu prostaglandinleri ürettiğı fikrinin kabul edilmesine neden olmuştur.²

COX-3 izoformunun var olup olmadığı hakkında yapılan araştırmalar ise hala devam etmektedir ve bu konuda henüz kesin bir bulgu elde edilememiştir. Ancak, araştırmacıların birleştiğı ortak nokta COX-3 olarak adlandırılan ve yeni bir siklooksijenaz formu olduğı düşünölen bu enzimin parasetamolün etki mekanizması ile ilişkili olabileceğidir.¹⁸⁻²²

Parasetamol (asetaminofen) güçlü analjezik ve antipiretik etkileri olan ancak çok düşük antienflamatuvar aktiviteye sahip bir non-steroidal antienflamatuvar ilaçtır. İnsanlarda kullanıldığında, idrardaki prostaglandin metabolit seviyelerini düşürmektedir. Fakat, plateletlerde ve mide mukozasında prostaglandin sentezinde herhangi bir azalmaya yol açmamaktadır. Parasetamol hem COX-1'in hem de COX-2'nin *in vitro* olarak zayıf bir inhibitörü olduğundan, henüz tanımlanmamış bir COX formunu inhibe ederek etki gösterdiğine dair düşönceler vardır.^{18,19}

Hayvan çalışmalarında farklı doku homojenatlarındaki COX enzimleri, parasetamolün inhibitör aktivitesinde farklı sonuçlar vermektedir. Bazı araştırmacılar bu durumun siklooksijenaz enziminin ikiden fazla izoformu olduğuna dair bir kanıt teşkil ettiğini düşünmektedirler. Yüksek doz NSAİİ ile indüklenen bir COX-2 varyantının parasetamol tarafından yüksek derecede inhibe edildiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle Botting adlı araştırmacı, COX-3'ün COX-2'yi kodlayan aynı genin bir ürünü olduğunu ancak farklı moleküler özelliklere sahip olabileceğini belirtmiştir.¹⁸ Bazı araştırmacılar ise COX-3'ün COX-1 varyantı olduğu düşüncesine sahiptir ve bu nedenle COX-3 yerine COX-1b olarak adlandırılmasının siklooksijenaz varyantları arasındaki ilişki açısından daha doğru bir terminoloji olacağını belirtmektedirler.^{19,20,22} Ancak günümüzde literatürde kayıtlı, insanda var olan bağımsız bir üçüncü COX geni ile ilgili kesin bilgi bulunmamaktadır.^{19,22}

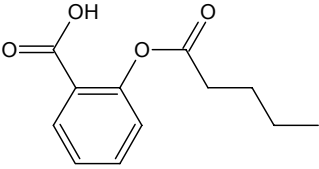
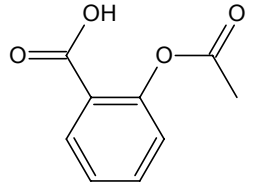
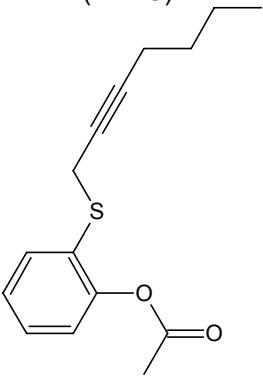
2.2. Non-Steroidal Antienflamatuvar İlaçlar ve COX-2 Selektiviteleri

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar yüksek derecede yapısal çeşitlilik gösteren bir gruptur. NSAİİ'lara ait en az sekiz farklı yapısal sınıf tanımlanmıştır. Bu bileşiklerde yapılan en ufak kimyasal değişiklikler, COX enzimine bağlanma özelliklerinde büyük farklılıklara yol açabilmektedir. Bu durum asetilsalisilik asit ve türevleri için Tablo 2'de gösterilmiştir. Aynı durum Tablo 1'de gösterilen tüm kimyasal sınıflar için de geçerlidir.¹²

Tablo 1 : NSAİİ'ların Kimyasal ve Farmakolojik Sınıflandırılması¹²

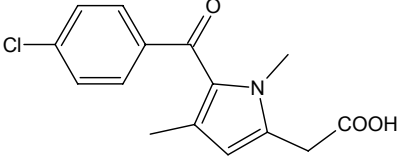
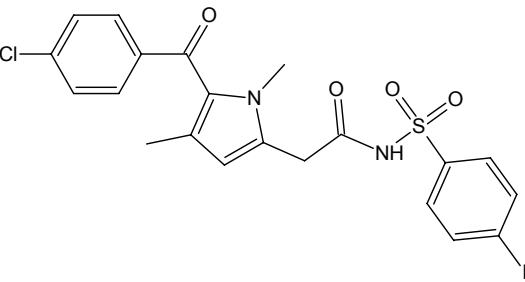
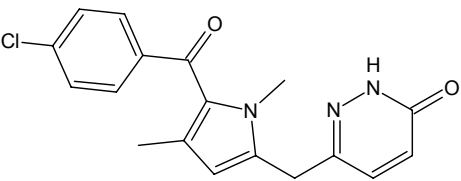
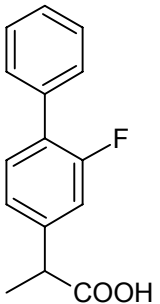
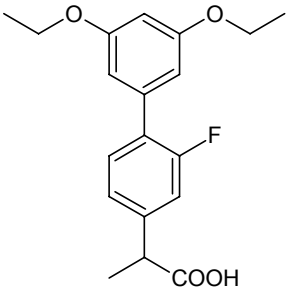
Kimyasal Sınıflandırma	Farmakolojik Sınıflandırma		
	COX-1 Selektif	Non Selektif	COX-2 Tercihli ve Selektif
1. Salisilik Asitler	<u>piyasada:</u> -Düşük doz Aspirin <u>farmakolojik ajan:</u> -Valerilsalisilik asit	<u>piyasada:</u> -Yüksek doz Aspirin -Salisilik asit	<u>farmakolojik ajan:</u> -APHS (Heptinilsülfid)
2. Pirazolidindionlar	Bilgi Mevcut Değil		
3. Arilasetik asit ve propiyonik asitler	<u>piyasada:</u> -İndoprofen	<u>piyasada:</u> -İndometasin -Naproxen -İbuprofen -Flurbiprofen	<u>geliştirme aşamasında:</u> -Zomepirak analogları <u>farmakolojik ajan:</u> -İndometasin analogları
4. Fenamik asitler ve diklofenak		<u>piyasada:</u> -Mefenamik asit -Flufenamik asit -Meklofenamat -Diklofenak	<u>farmakolojik ajan:</u> -Hidroksi diklofenak
5. Enolkarboksamitler	<u>farmakolojik ajan:</u> -5/-E-Fenil Meloksikam	<u>piyasada:</u> -Piroksikam -Tenoksikam -Lomoksikam <u>farmakolojik ajan:</u> -4/-E-Metil Meloksikam	<u>piyasada:</u> -Meloksikam <u>farmakolojik ajan:</u> -Sülfonil-izokinolin türevi
6. Asidik Sülfonamitler			<u>piyasada:</u> -Nimesulid <u>farmakolojik ajan:</u> -İzobenzofuran türevleri
7. Diaril Heterosiklikler	<u>farmakolojik ajan:</u> -L 745, 296, SC-560		<u>piyasada:</u> -Selekoksib, Rofekoksib <u>geliştirme aşamasında:</u> -JTE-522, -FR 140423 <u>farmakolojik ajan:</u> -Dup 697, SC 58125, DFU
8. Di-terciyer-butil-fenoller	<u>farmakolojik ajan:</u> -PD-138387'nin oksazonol türevleri		<u>geliştirme aşamasında:</u> -CI-1004, -PD-138387

Tablo 2 : Küçük Kimyasal Değişikliklerin Asetilsalisilik Asitin COX-1 ve COX-2 Bağlanma Bölgesi ile Etkileşimi Üzerine Etkileri¹²

Bileşik	COX Afinitesi	Bağlanma Özellikleri	Aktif Bölge Etkileşimleri
Valerilsalisilik Asit 	(COX-1 selektif)	-irreversibl -zamana bağımlı inhibisyon	-Serin 530'un asetilasyonu
Asetilsalisilik Asit 	Düşük doz COX-1 selektif Yüksek doz COX-2 selektif	-irreversibl -zamana bağımlı inhibisyon	-Serin 530'un asetilasyonu -Arjinin 106, Tirozin 341
Heptinilsülfid türevleri (APHS) 	COX-2 selektif	-irreversibl -zamana bağımlı inhibisyon	-Serin 530'un asetilasyonu -Arjinin 106, Tirozin 341 yan cebi ile etkileşimi yok.

Klinikte kullanılan birçok NSAİİ, arilasetik ve propiyonik asit sınıfına aittir. Tablo 1’de bu gruba ait birkaç örnek listelenmiştir. Bu sınıfın yapı aktivite ilişkisine ait en dikkat çekici nokta, küçük yapısal farklılıklar içeren yeni bileşikler, selektiviteyi büyük ölçüde etkilemektedir. Zomepirak ve flurbiprofen non-selektif inhibitörler olmalarına karşın, bu bileşiklerin analogları olan RS 57067, RS 104897 ve 3’, 5’-dietoksiflurbiprofen selektif COX-2 inhibitörler sınıfında yer almaktadır. Zomepirak analoglarının COX-2 selektiviteleri, COX-2 enziminde fazladan yer (Lösin 489 ve Lösin 384) işgal etmeleri ile ilişkilendirilmektedir.^{3,12,23,24}

Tablo 3: Zomepirak ve Flurbiprofen Analoglarının COX-2 Selektiviteleri

	IC₅₀ COX-2 (μM)	IC₅₀ COX-1 (μM)	Literatür No
 Zomepirak	2	0.3	3, 24
 RS 104897	0.9	242	3, 24
 RS 57067	0.7	> 1000	3, 24
 Flurbiprofen	0.010	0.011	3, 24
 3', 5'-dietoksiflurbiprofen	0.32	25	3, 24

NSAİİ'lar romatizmal hastalıkların tedavisinde büyük yarar göstermektedirler. Ancak, bu grup ilaçlar, ülserasyon gibi gastrointestinal toksisiteler başta olmak üzere birçok yan etkilere sahiptir.²

NSAİİ'ların GI ve renal sistemdeki toksisitesi, COX-1 ve COX-2 inhibisyonunda bir seçiciliklerinin olmaması ile ilişkilendirilmektedir. Tüm klasik NSAİİ'lar standart antienflamatuvar dozlarda hem COX-1'i hem de COX-2'yi inhibe ederler. Oysa yapılan araştırmalar, GI ve renal fonksiyonlarda önemli olan prostaglandinlerin COX-1; inflamasyona, ateşe ve ağrıya aracılık eden prostaglandinlerin ise COX-2 aracılığı ile üretildiğini göstermektedir. Yani, yararlı antienflamatuvar ve analjezik etkiler COX-2'nin inhibisyonuna bağlıdır. GI toksisite ise COX-1'in eş zamanlı inhibisyonunun bir sonucudur.^{2,3,25}

Bu ayrımın ortaya konmasından sonra antienflamatuvar ilaç keşfi üzerine çalışmalar çarpıcı şekilde hız kazanmıştır. Günümüzde 500'den fazla selektif COX-2 inhibitörünün varlığı bilinmektedir.^{2,26}

2.3. Selektif COX-2 İnhibitörleri

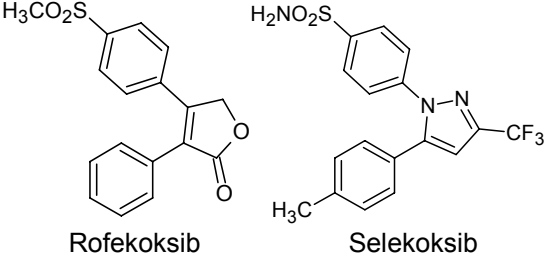
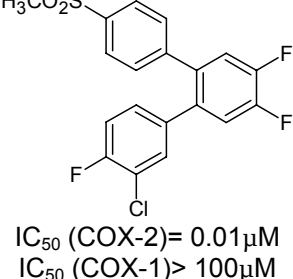
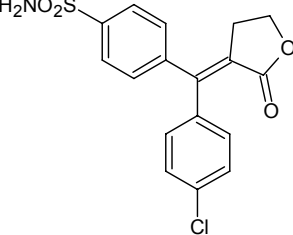
Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmış bir grup olmasına rağmen, COX-2'nin keşfinden beri bu grup ilaçlar daha çok COX-2 selektivitelerine göre tanımlanmaya başlanmıştır. Henüz bu konuda uluslararası kabul görmüş bir nomenklatür yoktur. Ancak, literatür bilgisine göre NSAİİ'lar genel olarak COX-1 selektif, non-selektif, COX-2 tercihlili ve COX-2 selektif olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadır. Bazı literatürlerde COX-2 tercihlili yerine COX-2 selektif ve COX-2 selektif yerine ise COX-2 spesifik terimleri kullanılabilmektedir.¹²

Selektif COX-2 inhibitörleri için altı farklı sınıf tanımlanmıştır.^{2,4}

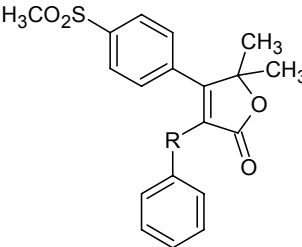
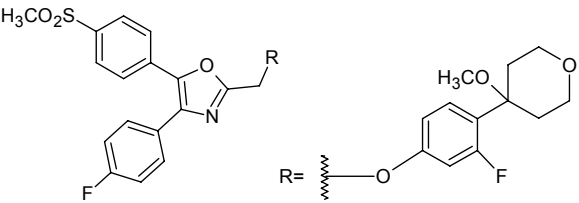
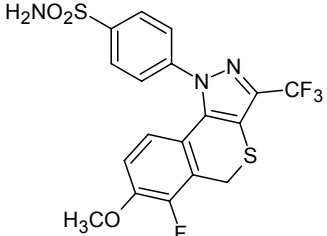
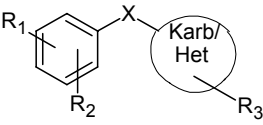
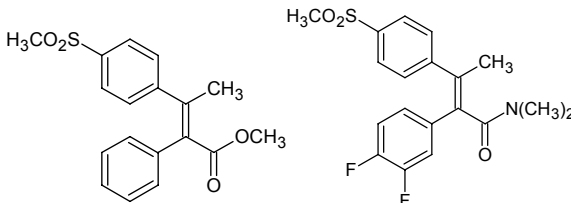
- 1- Visinal diaril heterosiklikler
 - orto-Diaril heterosiklikler
 - orto-Diaril karbosiklikler
 - 1,1-Diaril alkenler
 - Heteroatom köprüsü taşıyan diaril heterosiklikler
 - Dual COX-2/5 Lipoksijenaz inhibitörü olan diaril heterosiklikler
 - Diaril bisikloheterosiklikler
- 2- Diaril ve arilheteroaril eterler ve tiyoeter türevleri
- 3-1,2 Diariletilen türevleri (cis-stilben türevleri)
- 4-Diaril ve aril/heteroaril ketonlar
- 5-Antioksidan bileşikler
- 6-COX-2 selektivitesi yüksek, modifiye edilmiş bilinen nonsteroidal antiinflatuvar ilaçlar

Bu sınıflara ait bazı örnek bileşikler Tablo 4'te gösterilmiştir.

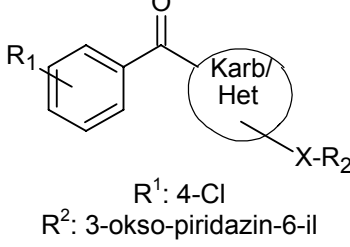
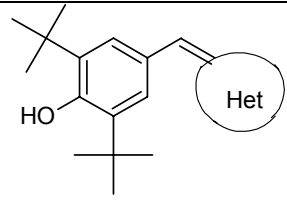
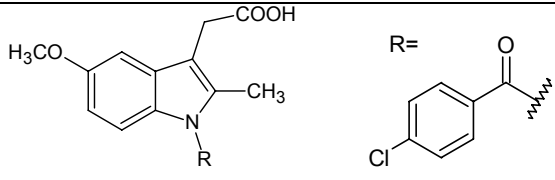
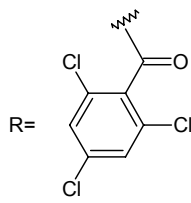
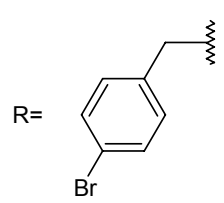
Tablo 4 : Selektif COX-2 İnhibitörleri Sınıfına Ait Bazı Kimyasal Bileşikler^{2,4}

COX-2 Selektif İnhibitörler	Örnek Bileşikler	Literatür No
1.Visinal diaril heterosiklikler		
a) orto-Diaril heterosiklikler	 Rofekoksib Selekoksisb	2,4
b) orto-Diaril karbosiklikler	 IC₅₀ (COX-2)= 0.01µM IC₅₀ (COX-1)> 100µM	4
c) 1,1-Diaril alkenler		4

Tablo 4'ün Devamı

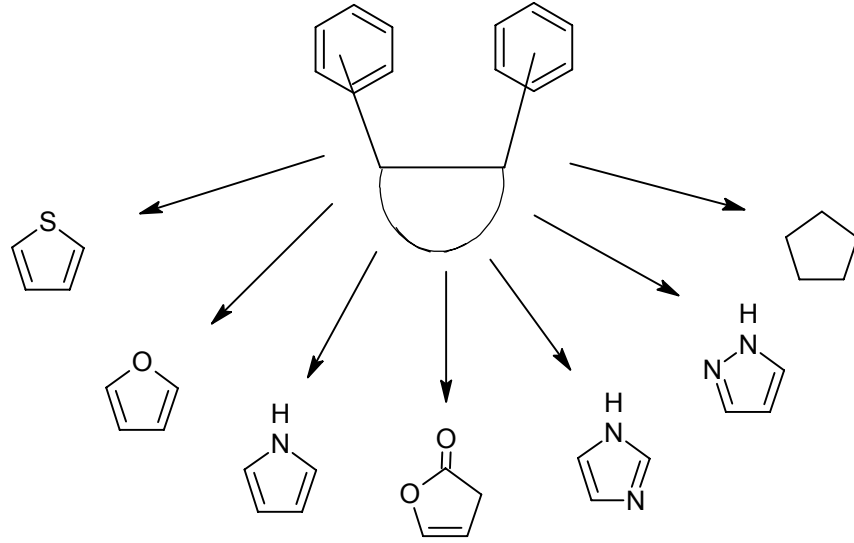
d) Heteroatom köprüsü taşıyan diaril heterosiklikler	 R= O IC_{50} (COX-2)= 0. 02 μM IC_{50} (COX-1)> 50μM R= S IC_{50} (COX-2)= 0. 07 μM IC_{50} (COX-1)> 50μM R= CO IC_{50} (COX-2)= 0. 6 μM IC_{50} (COX-1)> 50μM	4
e) Dual COX-2/5 Lipoksijenaz inhibitörü olan diaril heterosiklikler	 R= IC_{50} (COX-2)= 0. 1 μM IC_{50} (COX-1)> 100μM IC_{50} (5-LO)= 0. 02 μM	4
f) Diaril bisikloheterosiklikler	 IC_{50} (COX-2)< 0. 1 μM IC_{50} (COX-1)> 100μM	4
2- Diaril ve arilheteroaril eterler ve tiyoeter türevleri	 R¹: 4-F R²: H R³: 5-NHSO₂CH₃	2
3-1,2 Diariletilen türevleri (cis-stilben türevleri)		4

Tablo 4'ün Devamı

4-Diaril ve aril/heteroaril ketonlar	 R¹: 4-Cl R²: 3-okso-piridazin-6-il	2
5-Antioksidan bileşikler		2
6-COX-2 selektivitesi yüksek, modifiye edilmiş bilinen nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar	 IC₅₀ (COX-2)= 0. 01 µM IC₅₀ (COX-1)= 0. 006 µM indometasin  IC₅₀ (COX-2)= 0. 5 µM IC₅₀ (COX-1)> 100 µM  IC₅₀ (COX-2)= 0. 009 µM IC₅₀ (COX-1)= 41 µM	3,4,24

Selektif COX–2 inhibitörleri arasında en büyük araştırma visinal diaril heterosiklikler olarak adlandırılan sınıf üzerine yapılmıştır.^{2,3,4}

Bu sınıf, visinal pozisyonlarda 2 fenil sübstitüenti taşıyan merkezi bir heterosiklik halka ile karakterizedir. Çok çeşitli heterosiklik halkalar COX–2 selektif inhibitörler için kalıp olarak kullanılabilir. Furan, pirol, tiyazol, oksazol, imidazol, isoksazol, primidin ve tiyofen bu heterosiklik halkalara birer örnektir.^{2,4,26,27}

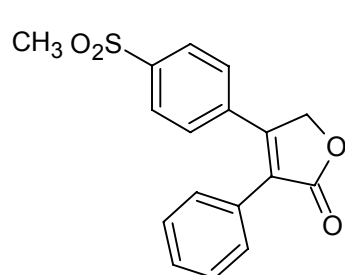


Merkezi halka bazı bileşiklerde karboksilik de
olabilmektedir.^{2,4,27}

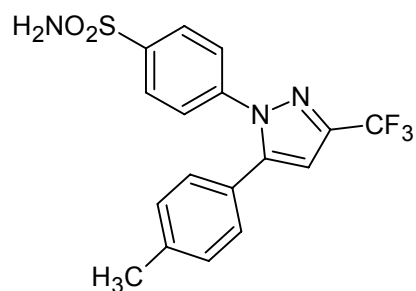
Aromatik halkalardan biri para konumunda metilsülfonil veya sülfonamit ile sübstitüe edilirse COX-2 selektivitesi artmaktadır. Metilsülfonil parçasının sülfonamit ile yer değiştirmesi sonucu, COX-2 spesifisitesinde azalma fakat oral biyoyararlılıkta artma gözlenmektedir.²

Metilsülfon veya sülfonamid parçası taşımayan aromatik halka nonsübstitüe olabileceği gibi, F, Cl, CH₃, MeO gibi çeşitli küçük gruplarla da sübstitüe olabilir.²

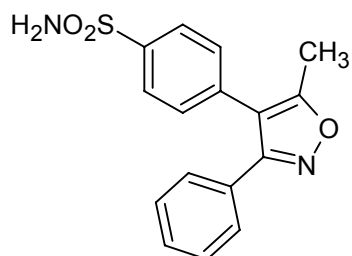
Yapılan çalışmalar sonucunda bu sınıfa ait birçok etkili bileşik sentez edilmiştir. Vioxx®'un etken maddesi olan Rofekoksib ve Celebrex®'in etken maddesi olan Selekoksib bu grup bileşiklere örnektir. Ayrıca Valdekoksib de bu grubun etki bakımından öne çıkan bileşiklerindendir.²⁻⁴



Rofekoksib

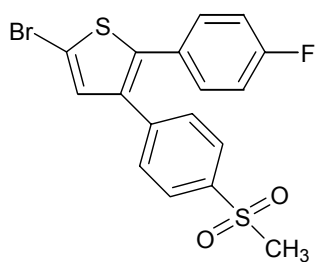


Selekoksisib

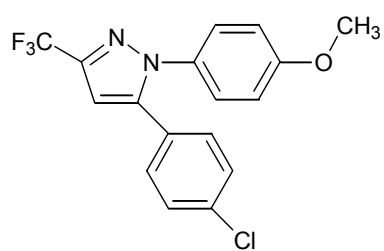


Valdekoksib

DuP-697 ve SC-560 ise sırasıyla COX-2 ve COX-1'in selektif inhibitörleri olup, diaril yapısına sahip bileşiklerdir. Bu özellikleri nedeniyle *in vitro* COX-2 ve COX-1 selektivite testlerinde sıklıkla referans standart olarak kullanılırlar.²⁻⁴

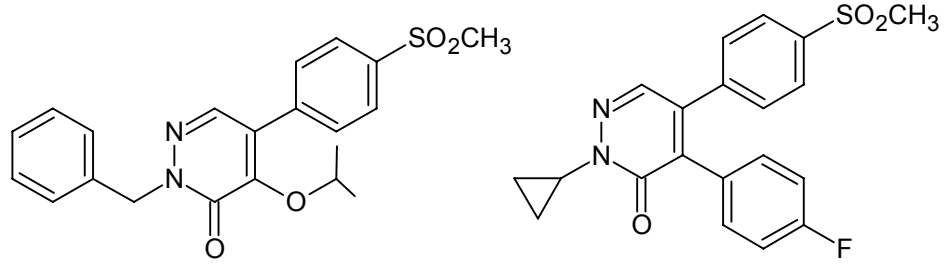


DuP-697

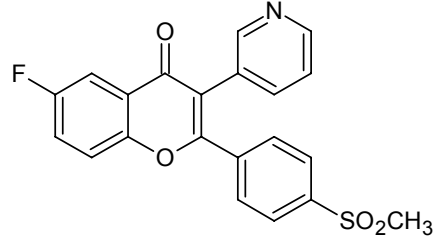


SC-560

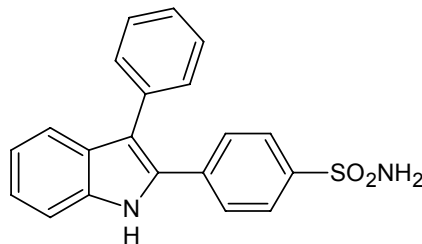
Chun Sing Li ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada merkezi halka olarak piridazinon kullanmışlar ve güçlü, selektif, oral aktif COX-2 inhibitör bileşikler elde etmişlerdir.²⁸



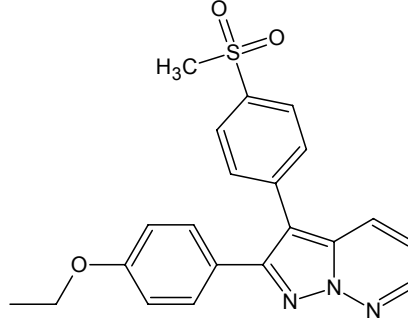
Yoo ve arkadaşları ise merkezi halka olarak doğal bir flavonoid olan benzopirani kullanarak güçlü, oral aktif bir COX-2 inhibitör bileşik elde ettiklerini bildirmişlerdir.²⁹



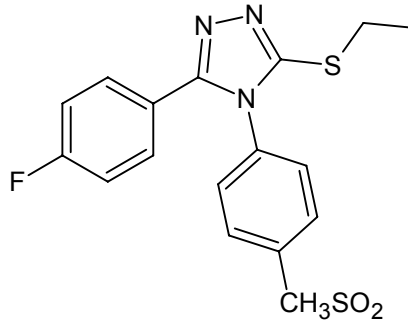
Hu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise merkez halka olarak indol kullanılarak bir seri güçlü COX-2 inhibitör bileşik sentez edilmiş ve bir bileşiğin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak selekoksibten daha çok selektivite gösterdiği bildirilmiştir.³⁰



Beswick ve arkadaşları ise kaynaşmış halka sistemlerinden pirazolo[1,5-b]piridazini merkez halka olarak kullanmışlar ve sentez ettikleri bileşiklerin IC₅₀ değerlerini selekoksib, rofekoksib, valdekoksib ve etorikoksib ile kıyaslayarak, en az bu dört bileşik kadar güçlü ve selektif olan yeni bileşikler sentez ettiklerini bildirmişlerdir.³¹

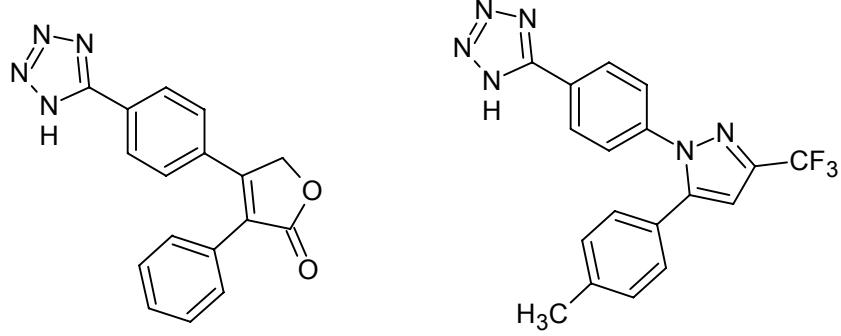


3-alkiltiyo-4,5-diaril-4*H*-1,2,4-triazol türevlerinin sentez edildiği bir çalışmada ise COX-1 IC₅₀ değeri 20.5 nM, COX-2 IC₅₀ değeri ise 1.8 nM olan bir bileşik elde edilmiştir. Araştırmacılar, selekoksib ile kıyaslandığında bu bileşiğin oldukça yüksek bir *in vitro* selektivite gösterdiğini belirtmişlerdir (selekoksib COX-1 IC₅₀: 3.7 nM, COX-2 IC₅₀: 2.2 nM).³²

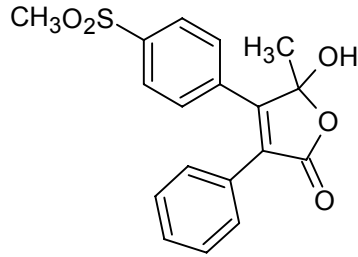


Aynı araştırmacıların yaptığı bir diğer çalışmada ise suda çözünebilen parenteral COX-2 inhibitörler elde etmek amacıyla, rofekoksib ve selekoksib analogları sentez edilmiştir. Bunun için rofekoksib ve selekoksibin yapısında bulunan SO₂CH₃ ve SO₂NH₂ grupları tetrazol halkası ile yer değiştirilmiştir. Sentez edilen analogların selekoksibe kıyasla yüksek *in vitro* selektivite gösterdiği, pH 7'nin üzerinde suda

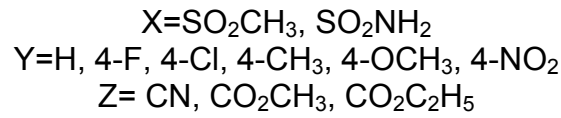
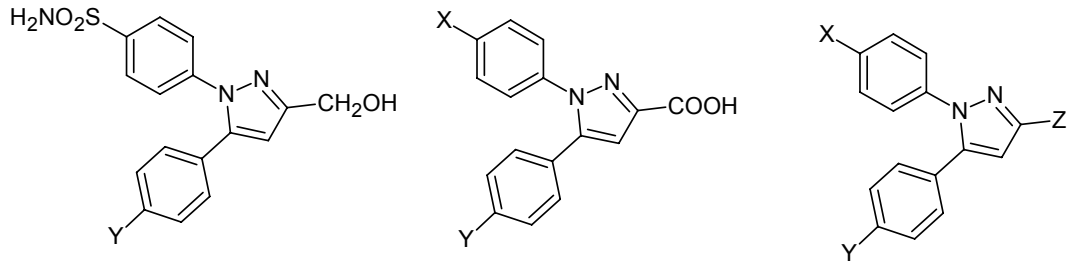
çözünürlüğün oldukça yüksek olduğu ve sıçan pençe ödem testinde iyi bir antienflamatuvar etki gösterdiği belirtilmiştir.³³



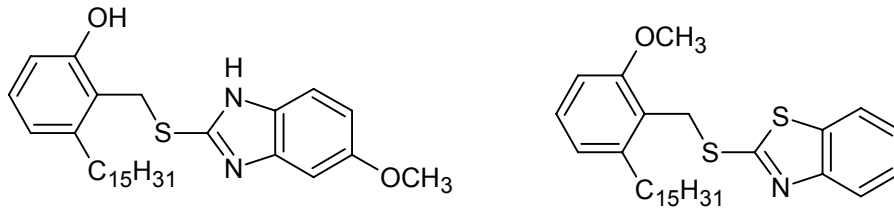
Bir diğer çalışmada Black ve arkadaşları, rofekoksibi model olarak oldukça yüksek selektivite gösteren 3,4-diaril-5-hidroksifuranon türevi COX-2 inhibitörler sentez etmişlerdir. Araştırmacılar, merkezi halkadaki hidroksil grubunun sodyum tuzuna çevrilmesi ile bileşiklerin suda çözünürlüklerinin artacağını ve intravenöz formülasyona uygun bileşikler haline gelebileceğini belirtmişlerdir.³⁴



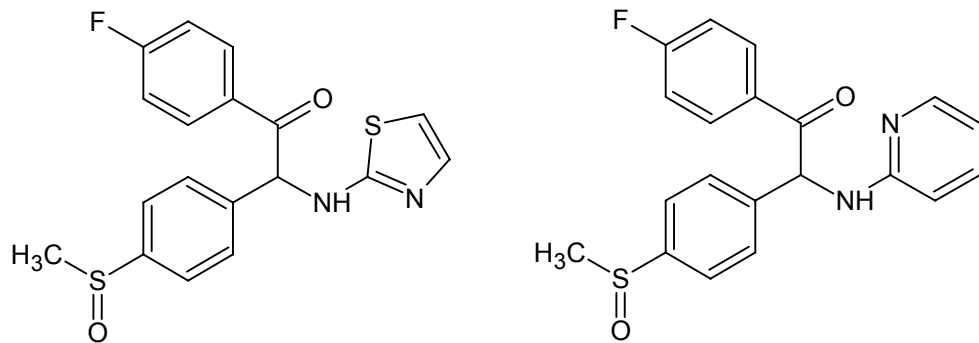
Selekoksibi model olarak alan bir çalışmada ise, merkez halka üzerinden selekoksibin alkol, asit ve ester türevleri hazırlanmıştır. Ancak, selekoksibten *in vivo* daha aktif olan bir bileşik elde edilememiştir.³⁵

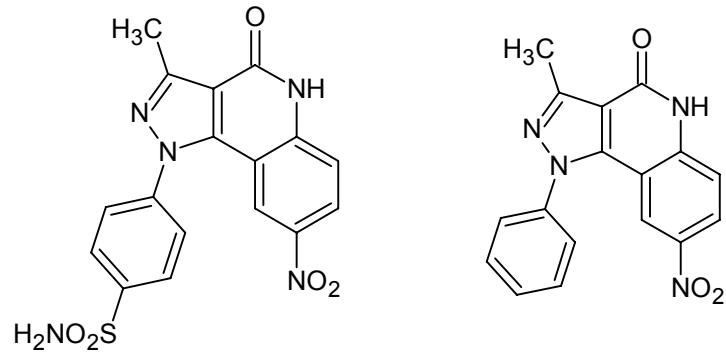


Bir başka çalışmada ise Paramashivappa ve arkadaşları heterosiklik halka olarak benzimidazol, benzotiyazol ve benzoksazol türevlerini kullanarak, arilheteroaril tiyoeter sınıfı bileşiklerin yapısına benzeyen ve COX-2'ye karşı COX-1'den yaklaşık 384 ila 470 kat daha selektif olan bileşikler sentezlemişlerdir.³⁶

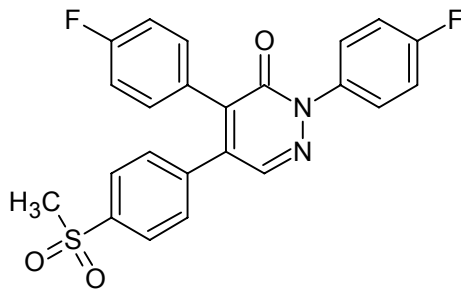


Baruah ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise yapı olarak sırasıyla diaril bisikloheterosiklikler ve cis-stilben türevlerine benzeyen, pirazolo [4,3-c] quinolin-4-on ve 1,2-diaril-1-etanon türevi bileşikler sentez edilmiştir. Her iki gruptan, ikişer bileşiğin selektif COX-2 inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir.³⁷

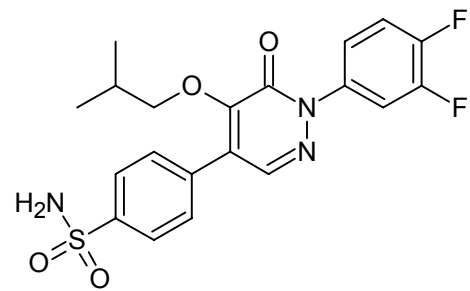




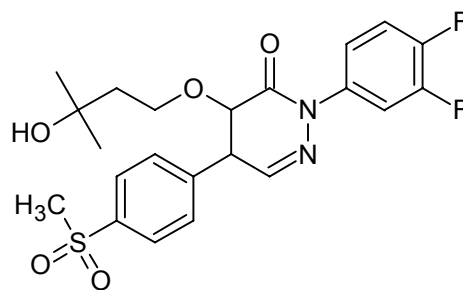
Literatürde merkezi halkaya bağlı diaril bileşenlerinin visinal pozisyonda olmadığı, buna rağmen oldukça yüksek COX-2 selektivite gösteren bileşiklerin elde edildiğine dair bilgiler de mevcuttur.³⁸⁻⁴⁰



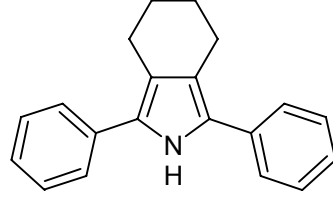
A-241611
(IC₅₀ COX-2/COX-1= 0.185/ 29)



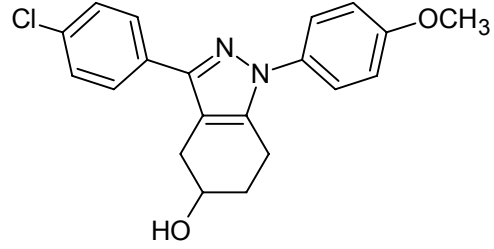
A-282904
(IC₅₀ COX-2/COX-1= 2.8/64.9)



ABT-963
(IC₅₀ COX-2/COX-1= 0.017/4.7)



(IC₅₀ COX-2/COX-1= 1/100-500)



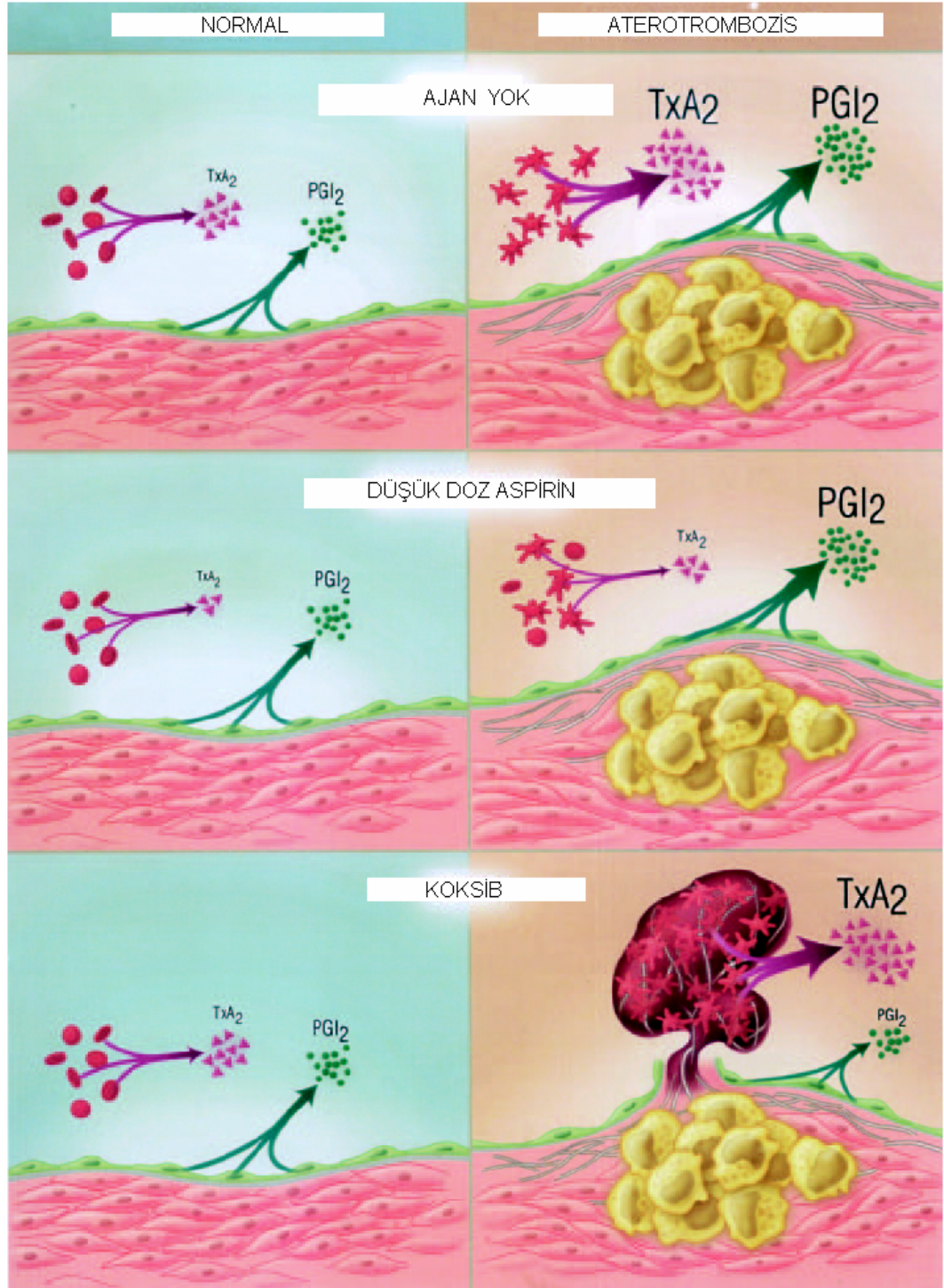
(IC₅₀ COX-2/COX-1= 0.46/>10)

COX-2 izoformunun keşfi ile araştırmacılar NSAİİ'ların gastrik toksisitelerinden uzak, etkili bileşikler sentez etmek amacıyla selektif COX-2 inhibitörlere yönelmiştir.⁴¹ Ancak zaman içerisinde COX-2 enzimi üzerinde yapılan detaylı çalışmalar ve yeni bulgular COX-2'nin sadece enflamasyon esnasında indüklenen bir enzim olmadığını, fizyolojik koşullarda böbrekte, vasküler sistemde, akciğerde, kemikte, pankreas adacıklarında, spinal kordta ve beyinde bulunduğunu göstermiştir.^{2,42}

Spesifik COX-2 inhibisyonunun kan basıncını arttırdığı bildirilmektedir. Ayrıca, COX-2'nin spesifik inhibisyonu ile sistemik PGI₂'nin üretimi azalmaktadır ve bu da vasküler sistemde PGI₂'nin ana kaynağının COX-2 olduğunu düşündürmektedir.² Selektif COX-2 inhibitörler, vasküler PGI₂ üretimini azaltarak, protrombotik (TxA₂) ve antitrombotik (PGI₂) eikozanoidlerin arasındaki dengeyi etkilemekte ve platelet aktivasyonunu engelleyen homeostatik mekanizmalara müdahale etmektedirler. Bu sınıf ilaçların potansiyel protrombotik etkilere neden olduğuna dair temel ve klinik veriler hızla artmaktadır.⁷

Ayrıca yapılan araştırmalar, COX-2'nin iskeminin hemen öncesinde vazgeçilmez bir kardiyoprotektif rolü olduğunu göstermektedir. Bu nedenle COX-2'yi "kardiyoprotektif bir protein" olarak tanımlayan araştırmacılar bulunmaktadır.⁷

Böylece, selektif COX-2 inhibitörlerinin klasik NSAİİ'lara nazaran daha iyi tolere edilmediği, sadece eskiden var olandan farklı yeni yan etkiler ortaya çıkardığı görüşü yaygınlaşmıştır.^{2,41,43}



Şekil 3 : Normal ve Aterosklerotik Arterlerde TxA_2 ve PGI_2 Üretiminin Herhangi Bir Ajanla Muamelenin Olmadığı, Düşük Doz Aspirin İle Muamele Edildiği ve Koksiblerle Muamele Edildiği Durumlar İçin Şematik Olarak Karşılaştırılması⁴⁴

Rofekoksib etken maddesini içeren Vioxx® adlı ilaç, güçlü bir selektif COX-2 inhibitörü olarak 1999 yılında tanıtılarak dünya ilaç piyasasına sunulmuştur.⁵ Ancak kardiyovasküler hastalıkları olan veya risk altında olan hasta gruplarında bu ilaçların kullanımının kalp krizleriyle sonuçlanan ciddi yan etkilere neden olduğu gerekçesiyle 2005 yılında Merck İlaç Firması tarafından Vioxx® gönüllü olarak piyasadan çekilmiştir. Firma 3 yıl boyunca süren APPROVe adlı araştırmanın sonuçlarına dayanarak bu kararı vermiştir.⁶

Bu konuyla ilgili olarak, APPROVe ile birlikte VIGOR ve CLASS adlı iki ayrı araştırmanın sonuçları da yol gösterici niteliktedir.⁶⁻⁸

VIGOR (The Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research Study):

8076 romatoid artritli hasta üzerinde günlük 50 mg rofekoksib ile günlük 1000 mg naproksen'in gastrointestinal toksisitelerini kıyaslamak için yapılan çift-körlü, randomize, sınıflara ayrılmış, paralel bir çalışmadır. Çalışmanın sonuçları 2000 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada aspirin kullanımına izin verilmemiştir. Rofekoksib grubundan 4047/65, naproksen grubundan ise 4029/33 kişide vasküler olaylar gözlemlenmiştir. Rofekoksib grubundan 46 hasta, naproksen grubundan ise 20 hastada ciddi trombotik kardiyovasküler rahatsızlık görülmüştür.^{7,8,16,22,43-46}

APPROVe (Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX)

Merck Firması yetkilileri Vioxx'un kardiyovasküler güvenlik profilini test etmek için daha uzun süreli bir teste gereksinim olduğunu düşünerek APPROVe adlı 156 hafta (üç yıl) süren, çok merkezli, prospektif, randomize, çift körlü ve plasebo kontrollü bir klinik çalışma yapmışlardır. Bu çalışma geçmişte kolorektal adenoma öyküsüne sahip olan hastalarda yeniden kolorektal polip oluşumunun önlenmesinde 25 mg'lık Vioxx'un etkinliğini değerlendirmek üzere tasarlanmıştır. Çalışma 2000 yılında başlamış ve toplam 2600 hasta bu çalışmaya dahil olmuştur. Plasebo kullanan hastalarla kıyaslandığında Vioxx kullanan hastalarda tedavinin 18. ayından itibaren başlayan, kalp krizi ve inmeye neden olan artmış kardiyovasküler olay riski görülmüştür. İlk 18 aylık dönemde ise

herhangi bir artmış kardiyovasküler risk gözlenmemiştir. VİGOR'dan sonra yapılan bu ikinci çalışmada da artmış kardiyovasküler risk tespit edilmesinden sonra, Merck Firması Rofekoksib etken maddesini içeren Vioxx adlı selektif COX-2 inhibitör ilaçlarını gönüllü olarak piyasadan çekmiştir.^{6,8,46}

CLASS (The Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study):

CLASS ise yine selektif COX-2 inhibitörler sınıfına ait etkili bir ilacın uzun dönemli kullanımına yönelik bir güvenlik testi çalışmasıdır. Günde 2 kez 400 mg selekoksib alan, günde 3 kez 800 mg ibuprofen alan ya da günde 2 kez 75 mg diklofenak alan 8059 hasta üzerinde yapılan çift körlü, randomize ve kontrollü bir çalışmadır. Bu çalışmada günlük <325 mg dozda aspirin kullanımına izin verilmiştir. Sonuç olarak ise NSAİİ'lerle kıyaslandığında, selekoksibin kardiyovasküler olaylarda anlamlı bir farklılık göstermediği belirtilmiştir.^{7,8,16,22,43,45,46}

Bu çalışmanın sonucu VİGOR testi ile karşılaştırıldığında, selekoksibin rofekoksibe nazaran daha güvenli bir kardiyovasküler profil çizmesindeki olası nedenlerin, rofekoksib ile selekoksibin kimyasal yapılarındaki farklılıktan; her iki çalışmada kullanılan NSAİİ'ler arasındaki farklılıktan veya CLASS çalışmasında günlük <325 mg dozda kullanılan aspirinin antiplatelet etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.^{7,8}

Walter ve arkadaşları kardiyovasküler yan etkiler gösteren refokoksibin sülfon türevi, refokoksibe kıyasla daha güvenilir bir profil çizen selekoksibin ise sülfonamit türevi olduğunu göz önüne alarak, sülfon ve sülfonamit türevi selektif COX-2 inhibitörlerin aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların önemli bir nedeni olan insan LDL oksidasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, sülfon türevi olan rofekoksibin zayıf doku dağılımına sahipken, sülfonamit türevi olan selekoksibin ise fizyolojik pH'da yüklü durumda bulunduğu için geniş doku dağılımına sahip olduğunu belirtmişler ve bu kimyasal özelliğin kardiyovasküler riskte belirleyici olan endotelial fonksiyonda söz konusu bileşikler için ayırt edici bir etkiye neden olabileceğini düşünmüşlerdir.⁴⁷

Çalışmada, selektif (rofekoksib, etorikoksib, selekoksib, valdekoksib), tercihli (meloksikam) ve non-selektif (ibuprofen, naproksen, diklofenak) COX inhibitörlerinin varlığı ve yokluğunda insan LDL oksidasyonu ölçülmüştür. COX-2 selektif ajanlar kendi aralarında kimyasal olarak sülfon (rofekoksib, etorikoksib) ve sülfonamit (selekoksib, valdekoksib) türevleri olarak ikiye ayrılmıştır. Ayrıca rofekoksib ve eterokoksibin aktivitesi metil fenil sülfon ve dimetil sülfon yapısı içeren diğer sülfon analogları ile de kıyaslanmıştır. Pozitif kontrol olarak ise α -tokoferolün suda çözünebilen bir analogu olan Trolox kullanılmıştır. Test edilen ajanlar içinde yalnız rofekoksib ve eterokoksibin LDL oksidasyonunu arttırdığı gözlenmiştir.⁴⁷

Söz konusu COX-2 inhibitörlerinin LDL ve membran lipitleri oksidasyonu üzerinde farklı etki göstermelerinin fizikokimyasal temellerini anlayabilmek için araştırmacılar, küçük açılı x-ray kırılım yöntemini kullanarak, bu ajanların membran yapısındaki etkilerini ölçmüştür. Sülfon ve sülfonamit COX-2 inhibitörlerinin düşük konsantrasyonlarda ortama ilave edilmesi ile fosfolipit moleküllerinin yapılarında birbirinden ayrı değişikliklerin meydana geldiği belirtilmiştir. Rofekoksibin ilavesiyle fosfolipitin baş kısmı bölgesinde belirgin bir elektron yoğunluğu artışı, membranın hidrokarbon bölgesinde ise elektron yoğunluğu azalması gözlenmiştir. Buna karşılık selekoksibin ilavesiyle ise membranın üst kısmındaki hidrokarbon bölgesinde belirgin bir elektron yoğunluğu artışı gözlenmiştir. Ortaya çıkan bu sonuç selekoksibin membran fosfolipitinin baş grubu bölgesine bitişik olan fosfolipit açıl zinciri ile etkileşmesine bağlanmıştır.⁴⁷

Bu çalışmanın sonucunda rofekoksib ve eterokoksibin membran fosfolipit tabakasında serbest radikal iyonlarının geçirgenliğinde artışa neden olduğu ve lipit yapısındaki bu ayırt edici fizikokimyasal değişikliğin rofekoksibin kardiyovasküler yan etkisi için bir açıklama olabileceği belirtilmiştir.⁴⁷

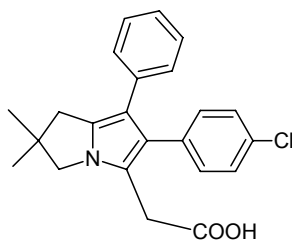
Bu çalışmada her ne kadar rofekoksibin gösterdiği kardiyovasküler yan etkilerin hücre membranı ile etkileşimdeki farklılıktan kaynaklandığı ve tüm COX-2 selektif inhibitörlerine mal edilemeyeceği vurgulansa da, ortaya çıkan bu yan etkinin bir sınıf etkisi olup olmadığı üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

Selektif COX-2 inhibitörlerinden rofekoksibin kardiyovasküler yan etkiler göstermesi nedeniyle piyasadan çekilmesinin ardından dual COX/LOX inhibitörleri üzerine yapılan çalışmalar da artmıştır. İki büyük araşidonik asit metabolik yolağına etki ederek geniş çaplı bir antienflamatuvar aktivite sağladıkları ve COX inhibitörlerinin rahatsız edici gastrik yan etkilerinden büyük oranda uzak oldukları için dual COX/LOX inhibitörleri son yıllarda dikkat çeken bir sınıf olmuştur.⁴⁸

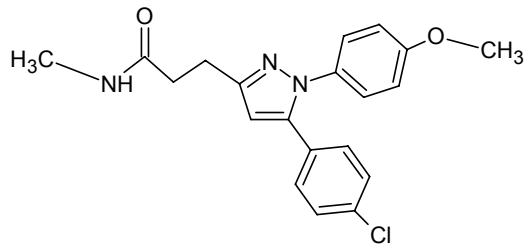
Prostaglandin üretimini engellemenin yanı sıra, bu bileşikler enflamasyon sürecinin bir diğer önemli mediyatörü olan kemotaktik lökotrienlerin biyosentezini de inhibe ederler. Lökotrienler enflamasyon bölgesine nötrofillerin invazyonunu indükler. Özellikle gastrik ülser oluşumu gibi durumlarda nötrofil invazyonu önemli bir basamak olduğundan, lökotrienlerin inhibisyonu gastrik yan etkileri önlemektedir.⁴⁹

Likofelon ([2,2-dimetil-6-(4-klorofenil-7-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazolin-5-il]asetik asit) bu grubun öne çıkan bileşiklerindendir. Merckle GmbH tarafından keşfedilip, EuroAllaince tarafından geliştirilen Likofelon (IC_{50} COX=0.21 μ M, IC_{50} 5-LOX=0.18 μ M), kullanıldığı dozlarda gastrointestinal yan etkilere neden olmaksızın belirgin analjezik, antienflamatuvar ve antiastmatik etkiler gösterir. Artritisin en yaygın formu olan ostreoartritiste (OA) kullanılmak üzere klinik değerlendirme aşamasında olan Likofelonun doyurucu farmakodinamik etkilerinin yanı sıra iyi tolere edildiği de belirtilmektedir.⁵⁰

Pirazol türevi bir dual inhibitör olan Tepoksalin ise bu grupta öne çıkan bir diğer bileşiktir. COX üzerinde *in vitro* olarak güçlü inhibitör aktivite gösteren Tepoksalin (IC_{50} :4,6 μ M), ayrıca stimüle edilmiş insan perifer kan lökositlerinde TxB_2 üretimini de inhibe etmiştir (ED₅₀:3,5 mg/kg p.o). 100mg/kg altındaki dozlarda herhangi bir ülserojenik aktivite göstermemiştir.⁴⁸



Likofelon



Tepoksalin

NSAİİ kullanan romatoit artritli hastalarda tümör gelişme riskinin düşük olduğunu gösteren epidemiyolojik çalışmalar sonucu COX enziminin kanser patogenezi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Yapılan birçok çalışmada NSAİİ'ların kolon, akciğer, mide ve göğüs kanseri gibi çeşitli kanser tiplerinin gelişmesini önlediği belirtilmiştir. Ayda 16 aspirinden daha fazla aspirin tüketen insan popülasyonunda kolon kanseri gelişme riski, aspirin kullanmayanlara göre % 40-50 daha az bulunmuştur. Tüm bu bulgular NSAİİ'ların antienflamatuvar aktivitelerine ek olarak antikanser özelliklere sahip olduklarını göstermiştir.^{4,51}

İmmünohistokimyasal analizler COX-2'nin epitelyal insan kanserlerinde sürekli salındığını göstermiştir. COX-2 ekspresyonunun neoplastik hücrelerde yaklaşık olarak % 40- 80 civarında olduğu tespit edilmiştir. Kanser hücrelerindeki immünoreaktif COX-2 yoğunluğunun diğer hücre tiplerine göre daha fazla olduğu belirtilmiştir.⁴

Bu sebeple çeşitli COX-1 ve COX-2 inhibitörlerinin özellikle kolon kanserinde değerlendirildiği çalışmalar yapılmıştır. Birçok tümörün büyüüp gelişmesinde tümörlü bölgeye yeterli kan sağlayabilmek için anjiyogenezis ile yeni kan damarlarının oluşumu anahtar rol oynamaktadır. Anjiyogenezisin meydana gelmesi için, endotelial hücrelerin anjiyojenik büyüme faktörlerine, vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörüne (bFGF) cevap vermesi gerekmektedir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar hem non-selektif inhibitörlerin hem de COX-2 inhibitörlerinin anjiyojenik cevaba karşı etki gösterdiklerini böylece tümör gelişimini önlediklerini ortaya koymaktadır.^{4,51}

Ayrıca, yapılan birçok epidemiyolojik çalışma, NSAİİ'ların uzun süreli kullanımının Alzheimer hastalığının gelişme riskini azalttığını göstermektedir. Alzheimer, yaşlı popülasyonda yaygın olarak görülen nörodejeneratif bir hastalıktır ve hafıza kaybı ile karakterizedir. Alzheimer'da kronik enflamatuvar süreçlerin rol oynadığına inanılmaktadır. Bu nedenle NSAİİ'ların bu hastalığın tedavisinde önemli bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu konu üzerindeki araştırmalar devam etmektedir.⁵²

2.4. Tromboksanlar, Prostaglandinler ve Antiplatelet Aktivite

Kanın pıhtılaşmasını engelleyen ya da oluşan pıhtıyı eriten ilaçlar antitrombotik ilaçlar olarak adlandırılır. Etki profilleri yönünden, pıhtılaşma mekanizmalarını inhibe eden (antikoagülanlar), trombosit adezyon ve/veya agregasyonunu engelleyen (antitrombositikler, antiplateletler), trombusu eriten (fibrinolitikler, trombolitikler) ilaçlar olmak üzere üç grupta toplanırlar. Pıhtılaşma; hemostaz sırasında damar dışında, tromboz olayında ise damar içinde oluşur. Yaşamsal, fizyolojik bir olay olan hemostaz, zedelenmiş ya da kesilmiş damardan kanamanın durmasıdır. Tromboz ise hemostaza benzer mekanizmalarla oluşan damar içi pıhtı (trombus) oluşumudur; istenmeyen ve patolojik bir durumdur. Antitrombotik ilaçlar esas olarak tromboz ve onun neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılırlar.⁵³

Araşidonik asit metabolitleri enflamasyonun yanı sıra çeşitli kardiyovasküler, pulmoner ve tromboembolik hastalıkların patogeneğinde de anahtar rol oynarlar. Bu biyoaktif metabolitlerden en önemlisi tromboksan A_2 'dir.^{54,55}

TxA_2 başlıca aktive olmuş plateletlerde ve makrofajlarda tromboksan sentaz enzimi tarafından bir iç peroksit yapısı taşıyan PGH_2 'den üretilir. TxA_2 taşıdığı dayanıksız epoksi bağı nedeniyle hızla nonenzimatik olarak kendisinden daha kararlı fakat biyolojik olarak inaktif olan metaboliti Tromboksan B_2 'ye dönüşür. ($t_{1/2}=30$ sn, $37^\circ C$) TxB_2 'nin idrardaki ana metaboliti 2,3-dinor TxB_2 olarak teşhis edilmiştir.^{54,55}

TxA_2 platelet kümeleşmesine, vazokonstriksiyona ve bronkokonstriksiyona yol açan iki büyük aktivite gösterir; platelet fonksiyonlarının ve düz kas kontraksiyonunun stimülasyonu. TxA_2 ayrıca vasküler düz kas hücrelerinin mitogeneğinde anahtar rol oynar ve renal tübüler hücrelerin cis-platin kaynaklı apoptozisiyle de dolaylı olarak ilgilidir. TxA_2 'nin biyosentez prekürsörü olan içperoksit PGH_2 de düz kas ve plateletlerde TxA_2 'nin bağlandığı reseptör bölgesine bağlanarak aynı agonist etkileri gösterir.⁵⁴

Ciddi periferik vasküler rahatsızlık, myokard enfarktüsü, unstable anjina, gebeliğe bağlı hipertansiyon ve preeclampsia, astım, lupus nefritis, trombozis ve koroner trombotik sendromlar gibi çeşitli hastalık durumlarında hastaların idrar ve kanında sırasıyla TxA_2 'nin

metabolitleri olan 2,3-dinor TxB_2 ve TxB_2 'nin artışına bağlı olarak bu hastalıklarda TxA_2 'nin aşırı üretildiği ortaya çıkmıştır.^{54,55}

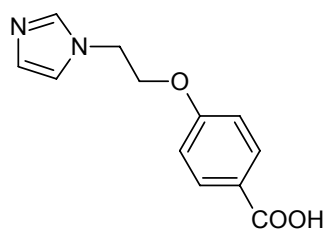
Bu klinik tabloların çoğunda özellikle de portal hipertansiyon, preeclampsia ve iskemik kalp rahatsızlıklarında TxA_2 biyosentezindeki artışa prostasiklin (PGI_2) üretimindeki artış eşlik eder. PGI_2 siklooksijenaz yolağından elde edilen bir diğer güçlü araşidonik asit metabolitidir. PGI_2 başlıca vasküler ve bronşiyal endotelyumda içperoksit yapısı taşıyan PGH_2 'den prostasiklin sentaz enzimi tarafından üretilir.⁵⁴

PGI_2 platelet agregasyonunun, vasküler ve bronşiyal düz kas kontraksiyonunun en güçlü fizyolojik inhibitörlerinden biri olduğundan TxA_2 'nin fonksiyonel bir antagonisti olarak değerlendirilmektedir. Gerçekten de, prostasiklinin IP reseptör olarak adlandırılan G-protein bağlı reseptörlere etkimesiyle, TxA_2 'nin etkilerine karşılık bir denge oluşturduğu düşünülmektedir.⁵⁴ TxA_2 'nin biyolojik etkilerini azaltan ilaçların prostasiklinin oluşumu ve aktivitesine etki etmemek şartıyla TxA_2 üretiminin arttığı hastalıklarda terapötik açıdan bir yarar sağlaması beklenmektedir.⁵⁴

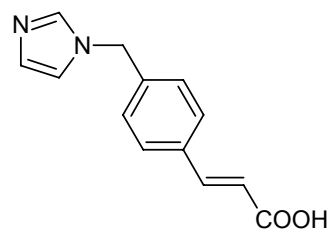
Bu nedenle tromboksan sentaz inhibitörleri, $\text{TxA}_2/\text{PGH}_2$ reseptör antagonistleri, dual etkili bileşikler (tromboksan sentaz inhibitörü/reseptör antagonisti) ve prostasiklin agonistleri sınıfına ait birçok bileşik sentez edilmiştir.^{54,55}

2.5. Tromboksan Sentaz İnhibitörleri (TxSIs)

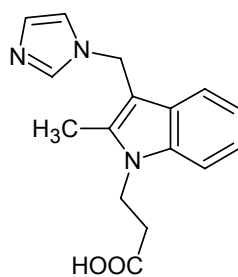
Tromboksan sentaz inhibitörleri seçici olarak Tromboksan A_2 biyosentezini inhibe ederler. Dazoksiben (UK 37248), Dazmagrel (UK 38485), Pirmagrel (CGS 13080), OKY 1581, Ozagrel (OKY 046), İsobogrel (CV 4151), Furegrelate (U63557A) ve CS-518 gibi birçok tromboksan sentaz inhibitörü anjina tipleri, periferik vasküler rahatsızlıklar, Raynaud's sendromu gibi çeşitli kardiyovasküler rahatsızlığı olan hastalarda ve ayrıca sağlıklı gönüllülerde klinik olarak test edilmiştir.^{54,55}



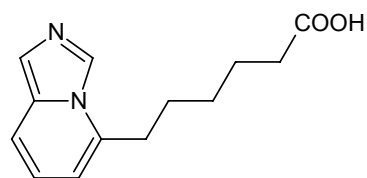
dazoksiben



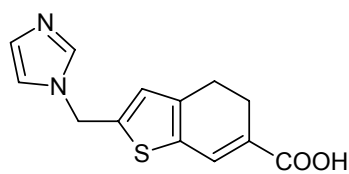
ozagrel



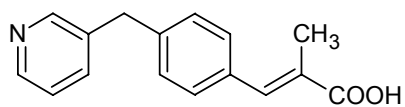
dazmagrel



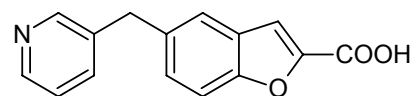
pirmagrel



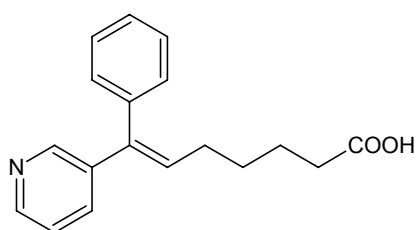
CS-518



OKY 1581

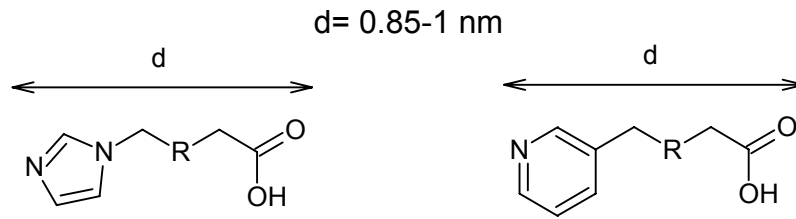


furegrelate

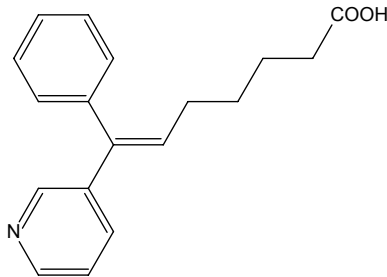


isobogrel

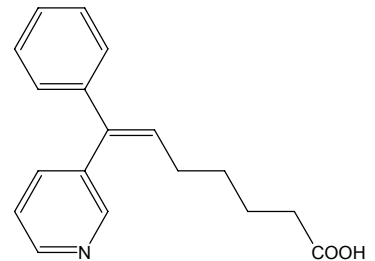
Birçok TxSI imidazol-1-il veya piridin-3-il parçası taşıdığından, yapısal olarak iki farklı tromboksan sentaz inhibitör sınıfı tanımlanmıştır; imidazolden türeyen TxSI'lar ve piridinden türeyen TxSI'lar. Yapı aktivite ilişkisi bakımından TxSI'ların gerekli yapısal özellikleri temel bir N atomu (3 numaralı konumdan süstitüe edilmiş bir piridin veya N-süstitüe bir imidazol halkası) ve bu N atomundan 0,85–1 nm uzaklıkta bulunan bir karboksilik asit grubudur. Bu heterosiklik halkalardaki N atomunun tromboksan sentaz enziminin katalitik bölgesindeki hem grubunun Fe atomu ile bir kompleks oluşturduğu kabul edilmiştir.⁵⁴



Dazoksiben imidazol türevi bir tromboksan sentaz inhibitörü olup, bu sınıfın klinik denemelerde kullanılan ilk bileşimidir. Dazoksibeni sırasıyla diğer imidazol bileşikler olan Ozagrel, CS-518, Dazmagrel ve Pirmagrel izlemiştir. Piridinik TxSI'larda ise İsbogrel (CV 4151) lider bileşik olduğu kabul görmüştür. İsbogrel'in inhibitör aktivitesinin stereoizomerizmine bağlı olduğu bulunmuştur. Gerçekten de İsbogrel'in E izomeri, Z izomerinden çok daha aktiftir. Bu sonuç E izomerde piridin halkasına ait N atomu ile karboksilik asit grubu arasındaki mesafenin 8,92 nm iken Z izomerde yalnızca 4,92 nm olması ile açıklanmıştır. İsbogrel ile yapısal benzerlik gösteren OKY 1581 ve Furegrelate (U 63557A) da TxSI'ların aynı kimyasal sınıfına aittir.^{54,55}



(E) izomer: d= 0.892 nm



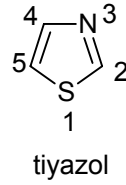
(Z) izomer: d=0.492 nm

İsbogrel (CV-4151)

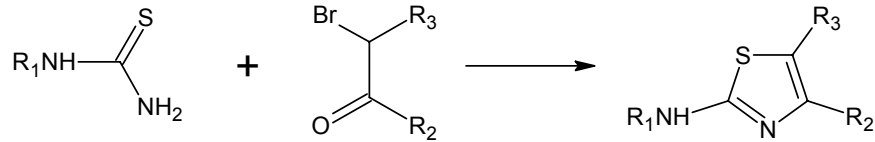
2.6. Tiyazol ve Türevleri

2.6.1. Tiyazol

Tiyazol halkası aşağıda gösterildiği gibi numaralandırılmaktadır. Halkanın adlandırılmasında IUPAC 1,3-tiyazol ismini kullansa da, söz konusu heterosiklik halka için tiyazol terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır.⁵⁶

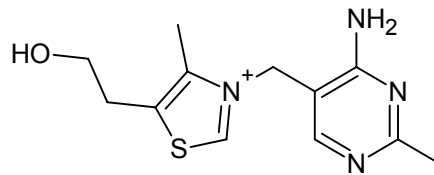


İlk kez Hantzsch tarafından tiyoüre ve α -halo karbonil bileşiklerinin reaksiyonu sonucu tiyazollerin elde edildiği bildirilmiştir.⁵⁶



Tiyazolün kendisi doğada bulunmamasına rağmen, tiyazol halkası peptit alkaloidleri ve siklopeptitler gibi birçok doğal ürünün yapısında bulunmaktadır. Bu ürünler önemli antibiyotik ve antifungal özelliklere sahiptir. Ayrıca deniz ürünlerinden izole edilen doğal tiyazol ürünleri ise antineoplastik ve sitotoksik aktivite göstermektedir.⁵⁶

Tiyazol halkası içeren en önemli doğal ürün tiyamindir (B_1 vitamini).⁵⁶



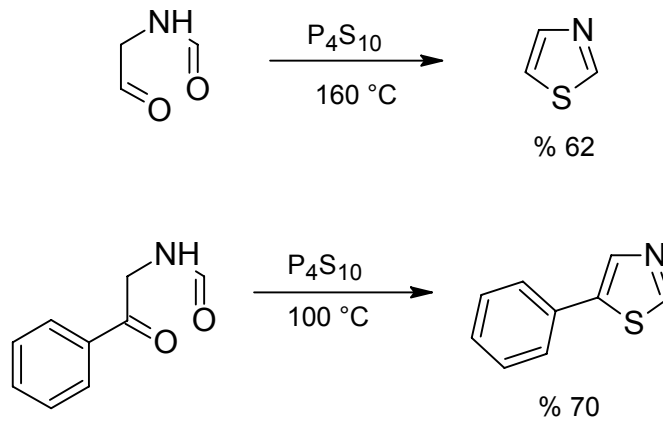
Tiyamin

Tiyazol renksiz sıvı bir maddedir. Kaynama noktası 118.2 °C'dir. Isıya karşı dayanıklıdır, 530°C'de bozunur. Piridine kıyasla daha az bazik özellik gösterir, birçok metal tuzu ile kompleks oluşturabilir, aromatik karakterdedir.⁵⁶

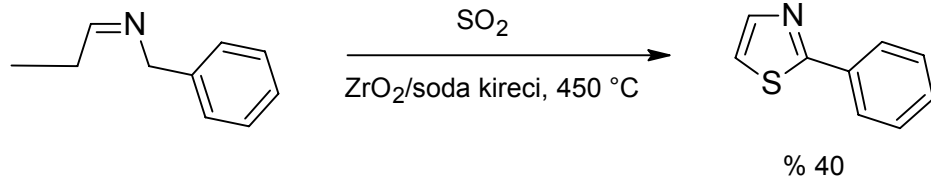
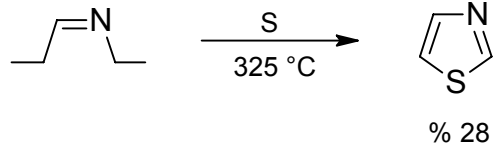
¹H-NMR'da (CDCl₃) 8.89 (H₂), 7.99 (H₄), 7.43 (H₅) ppm'de pik verir.⁵⁶

2.6.1.1. Tiyazol Halkasının Genel Sentez Yöntemleri

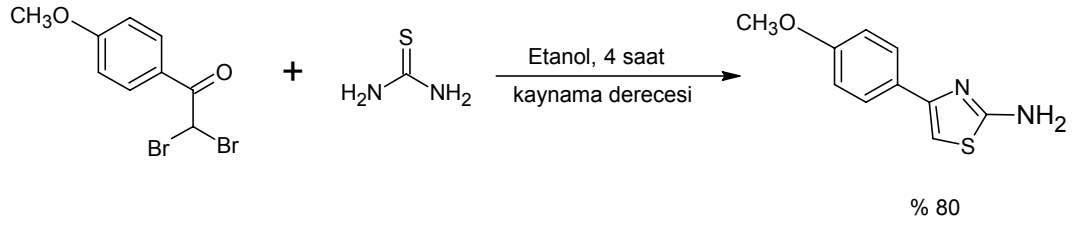
Tiyazol türevleri α-açilamino karbonillerin kükürt verici bir ajan ile tepkimesinden sentezlenebilmektedir.⁵⁶



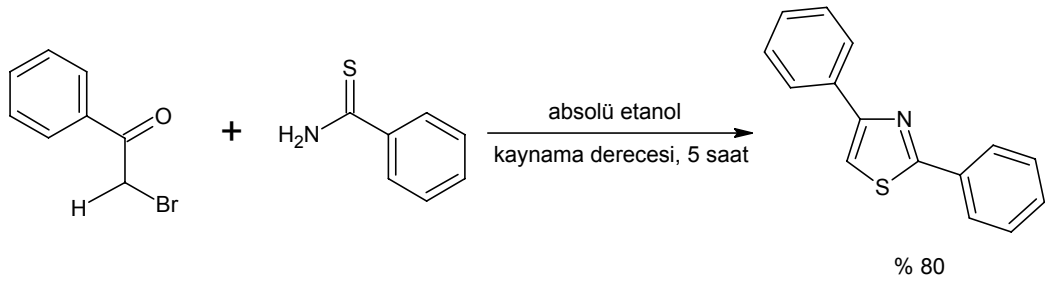
N-alkiliminlerin 300 °C üzeri sıcaklıklarda gaz fazdaki elementel kükürt ile tepkimesinden veya 450°C'de bir metal oksit katalizörü varlığında kükürtdioksit ile reaksiyonundan tiyazol türevleri elde edilmektedir.⁵⁶



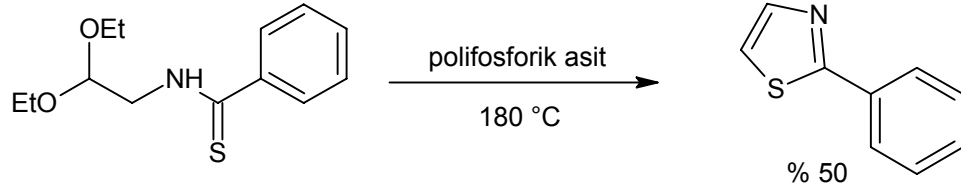
2,2-Dibromo-1-(4-metoksifenil)etanon ve tiyoürenin etanol içinde 4 saat geri çeviren soğutucuda ısıtılması sonucu % 80 verimle 2-amino-4-(4-metoksifenil)tiyazol bileşiğinin elde edildiği bildirilmektedir.⁵⁶



Tiyazol türevleri α -halo ketonların tiyoamitler ile reaksiyonundan da oluşmaktadır.⁵⁶

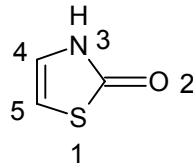


Tiyoaçilamino asetallerden hareketle asit katalizli halka kapama reaksiyonu ile tiyazol türevleri sentezlenmiştir.⁵⁶

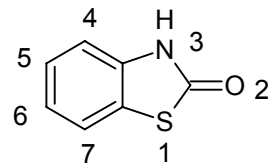


2.6.2. 2-okso-3H-Benzotiyazol ve Türevleri

2-okso-3H-Benzotiyazol halka sistemi, 2-tiyazolon halkasının 4. ve 5. konumlarından benzen halkası ile kaynaşması sonucu oluşan bisiklik bir bisiklik halka sistemidir. Molekülün numaralandırılması aşağıdaki gibidir.

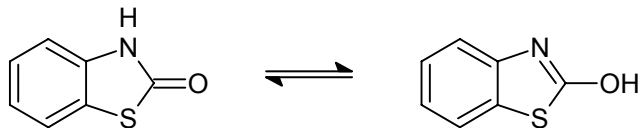


2-okso-3H-Tiyazol
(2-tiyazolon)



2-okso-3H-Benzotiyazol
(2-benzotiyazolon)

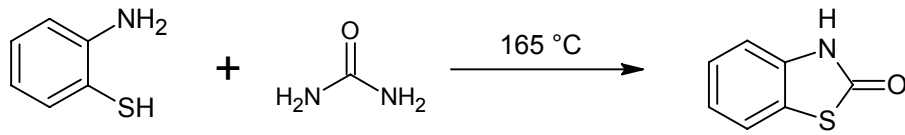
3. konumda sübstitüent içermeyen 2-okso-3H-benzotiyazol türevleri, azot atomundaki serbest hidrojeninden dolayı aşağıda gösterildiği gibi tautomerik sistemler olup dengenin 2-okso-3H-benzotiyazol lehine olduğu belirtilmiştir.⁵⁷



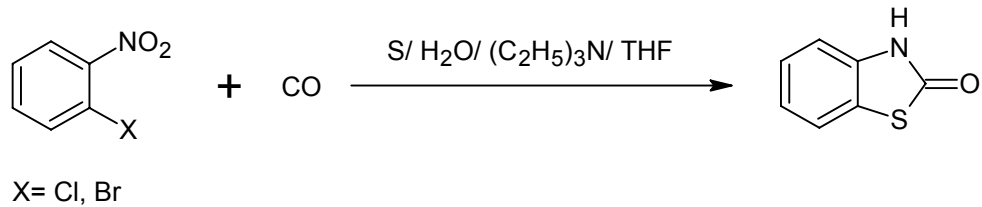
Tautomer dengenin 2-okso-3*H*-benzotiyazol lehine olduğu ilk kez UV spektroskopisi ile gösterilmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan IR çalışmaları bu verileri doğrulamıştır. IR spektrumlarında halka karbonilini belirleyen pikin yanı sıra N-H piki de görülmektedir. Ancak O-H gerilim pikine rastlanmamaktadır.⁵⁸ 2-okso-3*H*-benzotiyazolün 3350 cm⁻¹ de N-H, 1675-1660 cm⁻¹ de C=O gerilim bantlarına sahip olduğu bildirilmiştir^{59,60}. Ayrıca NMR’da, DMSO-d₆ içinde alınan spektrumunda aromatik protonlar δ 7,00-7,65 ppm’de, N-H protonu da δ 11,50 ppm’de gözlenilmiştir⁵⁸.

2.6.2.1. 2-okso-3*H*-Benzotiyazol Yapısının Genel Sentez Yöntemleri

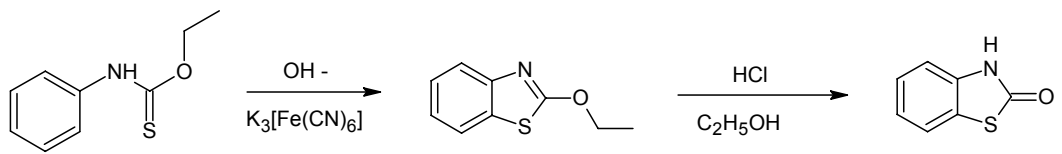
2-Aminotiyofenol ve üre karışımı 165°C’de ergitildiğinde 2-okso-3*H*-benzotiyazol sentez edilmiştir⁶¹. Aynı başlangıç maddeleri azot gazı altında klorobenzen içinde ısıtıldığında ise ürün % 72 verimle elde edilmiştir.⁶²



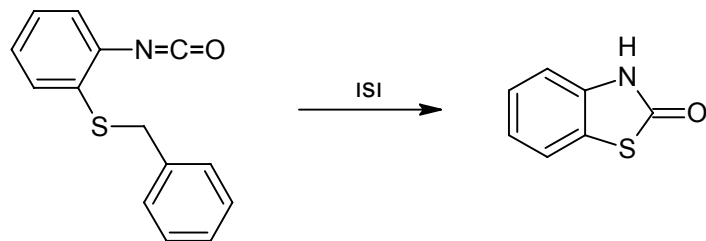
2-Halonitrobenzen, trietilamin varlığında tetrahidrofuran içinde su, karbon monoksit ve kükürtün tepkimesi sonucu 2-okso-3*H*-benzotiyazolü vermektedir⁶³.



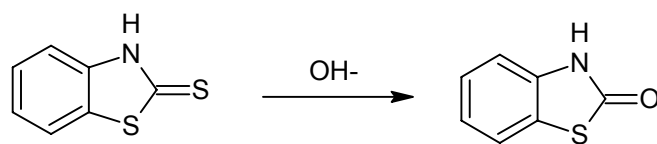
N-Ariltiyoüretanların alkali ortamda potasyum ferrisiyanür ile halka kapanması sonucu oluşan 2-etoksibenzotiyazolün asit ortamda hidrolizi ile 2-okso-3*H*-benzotiyazol elde edilmiştir^{57,64}.



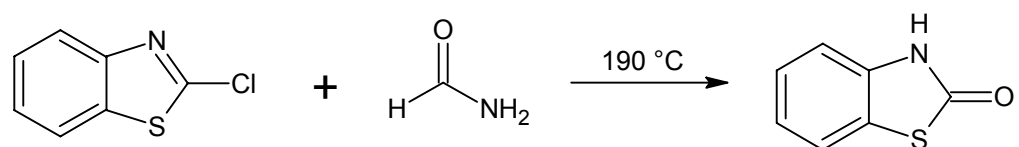
2-Benziltiyofenil izosiyanatlar kuru kuruya ısıtıldığında 2-okso-3*H*-benzotiyazola siklize olmaktadır ⁶⁵.



2(3*H*)-Benzotiyazoltiyonun seyreltik alkali ortamda ve klor veya brom gibi yükseltgen maddeler varlığında hidroliz edildiğinde 2-okso-3*H*-benzotiyazola dönüştüğü bilinmektedir ⁶⁶.

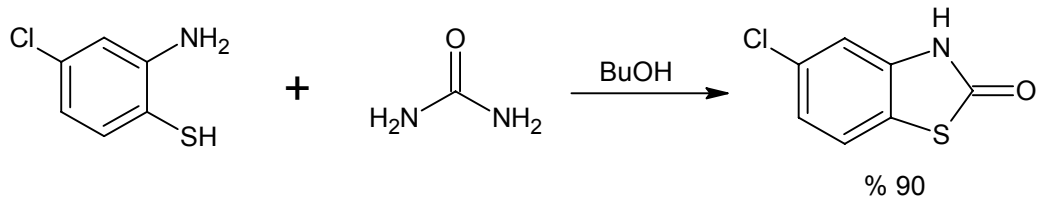


D'Amico, 2-klorobenzotiyazolü formamid ile tepkimeye soktuğunda 2-okso-3*H*-benzotiyazolü % 90 verimle elde ettiğini bildirmiştir ⁶⁷.

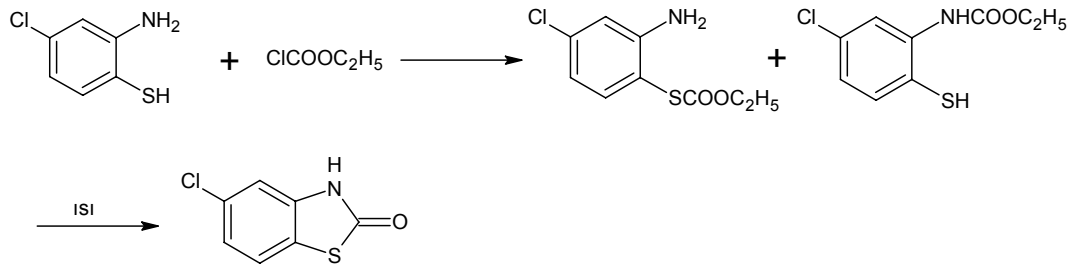


2.6.2.2. 5-Kloro-2-okso-3*H*-Benzotiyazol Yapısının Genel Sentez Yöntemleri

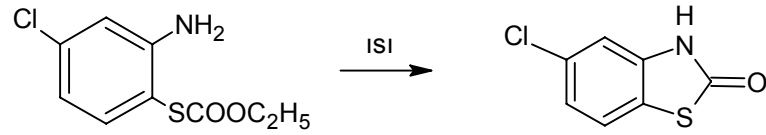
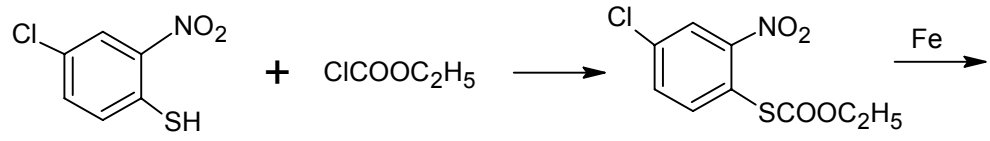
Üre ve 2-amino-4-klorotiyofenolün butanol varlığında 110 °C'de 5 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılması sonucu %90 verimle 5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol elde edilmiştir.⁶⁸ Aynı başlangıç maddelerinin sadece ergitilmesi ile de 5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol elde edilebilmektedir.⁶²



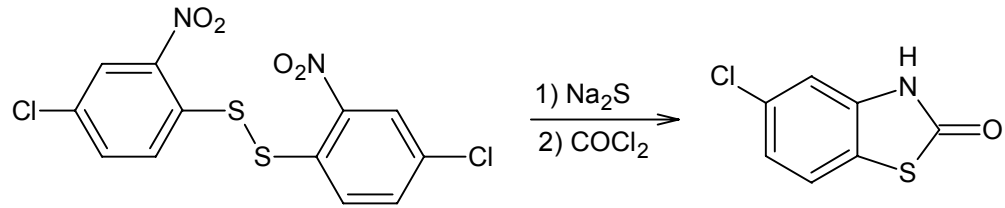
2-Amino-4-klorotiyofenol ile etil kloroformatın tepkimesi sonucu elde edilen bileşiklerin, sodyum karbonat ve dimetilformamit içinde ısıtılması sonucu aynı bileşiğin elde edildiği literatürde bildirilmektedir.⁶⁹



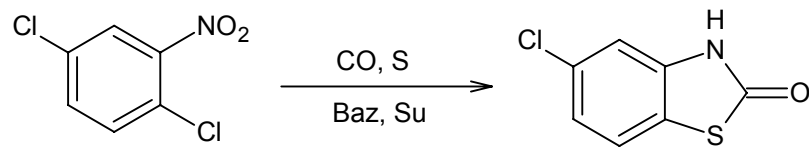
Etil kloroformat ile 5-kloro-2-nitrotiyofenolün tepkimesinden elde edilen ester türevinin oda sıcaklığında redüktör metaller ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan 2-amino-4-klorofenil etiltiyokarbonat türevinin ısıtılması ile 5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol elde edildiği bildirilmiştir.^{70,71}



Aynı bileşiğin 2,5-dikloronitrobenzen disülfür bileşiğinin alkali ortamda sodyum sülfürün aşırısı ve fosgen ile tepkimeye girmesi sonucu da elde edildiği bildirilmiştir.^{72,73}



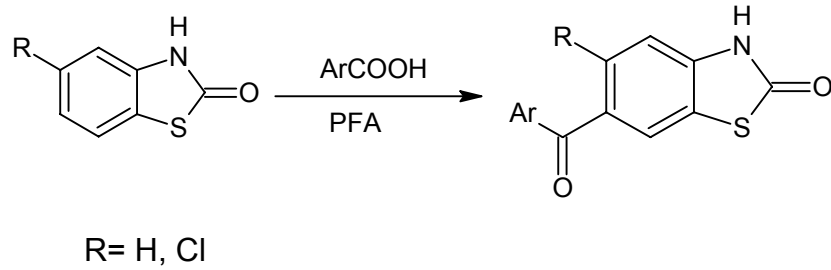
2,5-dikloronitrobenzen, karbon monoksit ve kükürt ile bir baz ve su varlığında reaksiyona sokulduğunda yüksek verim ve saflıkta 5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol sentez edilmiştir.⁷⁴



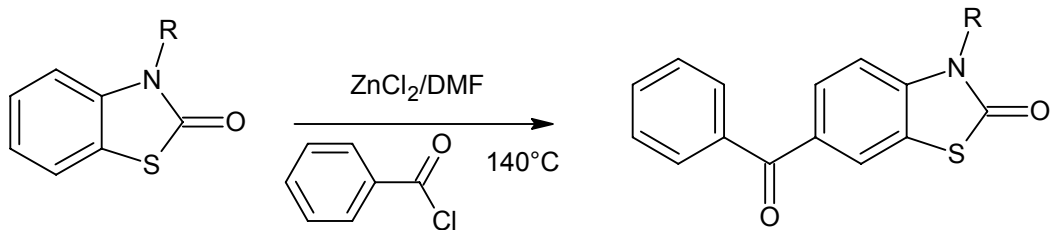
2.6.2.3. 2-okso-3*H*-Benzotiyazol ve 5-Kloro-2-okso-3*H*-Benzotiyazolün Kimyasal Tepkimeleri

2-okso-3*H*-benzotiyazol ve türevleri genellikle katı bileşikler olup, çoğunlukla fenolik karakterdedirler. Hem zayıf asit hem de zayıf bazik özellik gösterirler. 2-okso-3*H*-benzotiyazolün pKa değerleri 10.37 ve 1.89 olarak bildirilmiştir ⁷⁵.

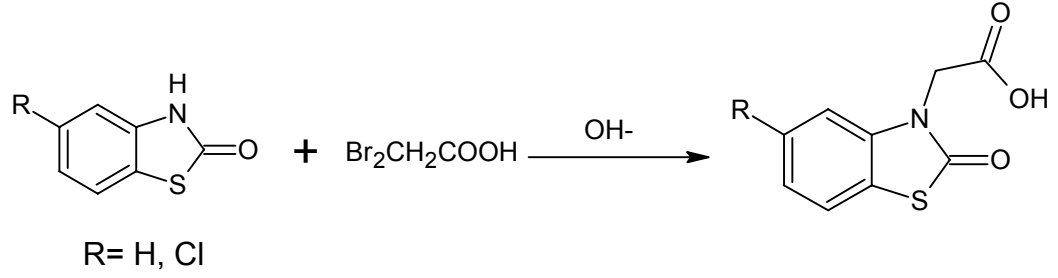
2-okso-3*H*-benzotiyazolün polifosforik asit (PFA) içinde özellikle aromatik karboksilli asitlerle tepkimeye girdiğinde 6-açıl-2-okso-3*H*-benzotiyazol türevlerini verdiği bildirilmiştir ⁷⁶⁻⁷⁹



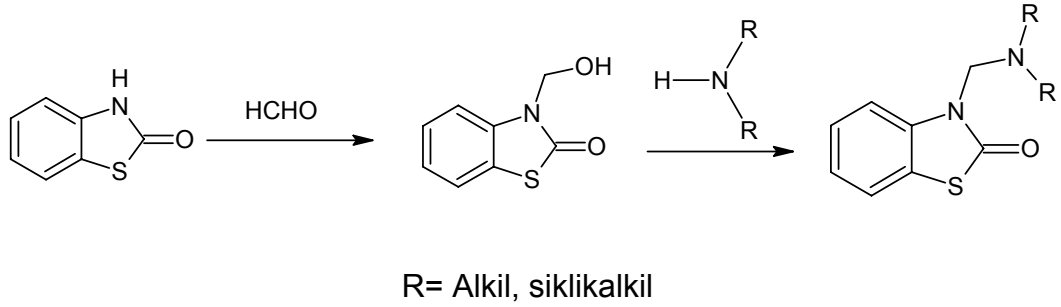
2-okso-3*H*-benzotiyazol, benzoil klorür ile $ZnCl_2$ ve DMF varlığında 140 °C'de 2 saat boyunca ısıtıldığında yüksek verimlerde 6-benzoil-2-okso-3*H*-benzotiyazol elde edilmiştir. ^{80,81}



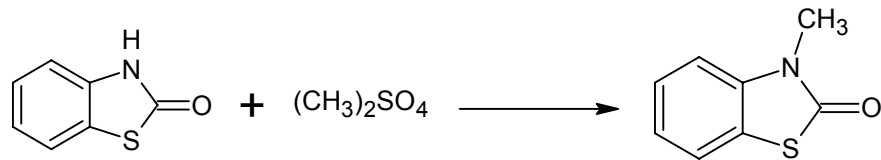
2-okso-3*H*-benzotiyazolün alkali ortamda bromoasetik asit ile tepkimesinden 2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-asetik asit elde edilmiştir ⁸².



2-okso-3*H*-benzotiyazolün, formaldehit ve uygun aminlerle metanol içinde ısıtılmasıyla Mannich bazlarını verdikleri bildirilmiştir ^{83,84}.



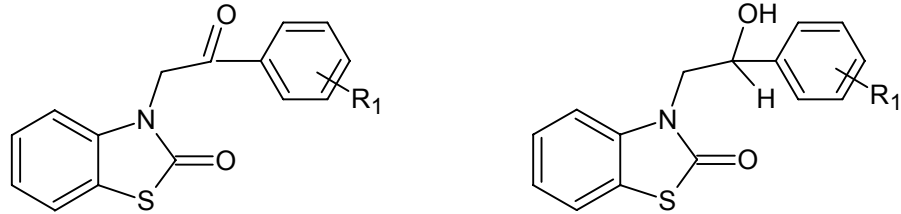
2-okso-3*H*-benzotiyazol dimetil sülfatla tepkimeye girdiğinde 3-metil-2-okso-3*H*-benzotiyazol elde edilmiştir ⁸⁵.



2.6.2.4. 2-Okso-3*H*-Benzotiyazol ve 5-Kloro-2-Okso-3*H*-Benzotiyazol Türevlerinin Biyolojik Etkileri

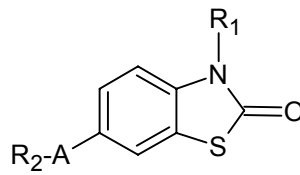
2.6.2.4.1. Antinosiseptif, Antienflamatuvar ve Analjezik Etkili Türevler

1-fenil-2-(2-benzotiyazolinon-3-il)etanon ve 1-fenil-2-(2-benzotiyazolinon-3-il)etanol türevlerinin antinosiseptif aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir.⁸⁶



R₁: H, 2-Cl, 4-Cl, 2-CH₃, 4-Br

6-sübstitüe-2-okso-3*H*-benzotiyazol türevlerinin de analjezik etkiye sahip oldukları bildirilmiştir.⁸⁷

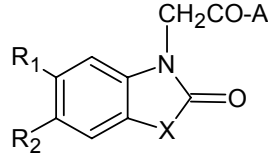


R₁: H, CH₃

A: CO, CH₂, CHOH

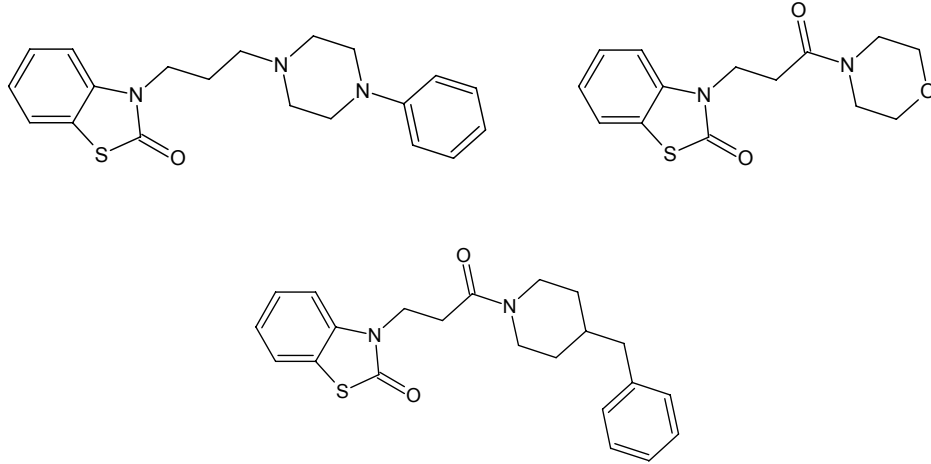
R₂: fenil, sübstitüe fenil, fenol, n-C₄H₉

(2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il)asetik asit ve (2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il)alkanoik asit türevlerinin antinosiseptif ve antienflamatuvar aktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir.⁸⁸

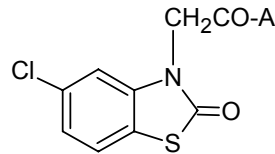


X: O, S A: OH, OCH₃, OC₂H₅
R₁: H, Cl R₂: H, CH₃, COC₆H₅

Bazı 3-sübstitüe-2okso-3*H*-benzotiyazol türevlerinin antinosiseptif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.⁸⁹

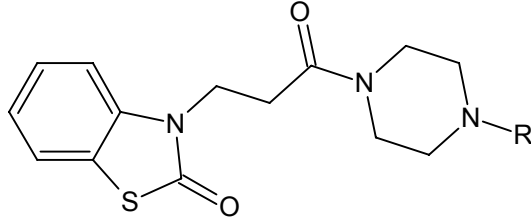


Aşağıda genel yapıları gösterilen (5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il)asetamit türevlerinin antinosiseptif aktivite gösterdikleri bildirilmiştir.⁹⁰



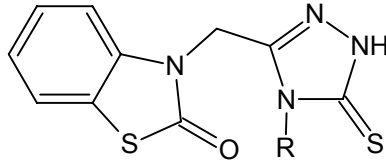
A= morfolinil, 4-sübstitüe piperazinil, 4-sübstitüe piperidinil, sübstitüe piridinil

Bazı (2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il)propanamit türevlerinin antinosiseptif aktivitesi olduğu literatürde bildirilmiştir.⁹¹



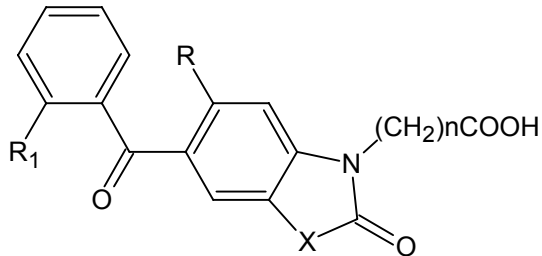
R= piridinil, süstitüe fenil, benzil

Bazı [(2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il)metil]-4-alkil/aril-1*H*-1,2,4-triazol-5-tiyon türevlerinin antinosiseptif aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir.⁹²



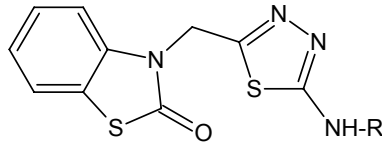
R= metil, etil, allil, fenil, 4-sbstitüe fenil, benzil, fenetil

Asetik asit ve propanoik asit kalıntısı taşıyan bazı 6-açıl-2-okso-3*H*-benzotiyazol türevlerinin analjezik ve antienflamatuvar etki gösterdikleri bildirilmiştir.⁹³



n= 1,2 R= H, Cl R₁= Cl, F, H X= O, S

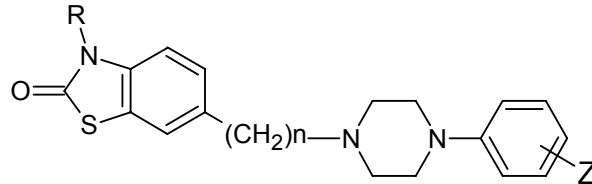
2-[(2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il)metil]-5-aril/alkilamino-1,3,4-tiyadiazol bileşiklerinin antinosiseptif aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir.⁹⁴



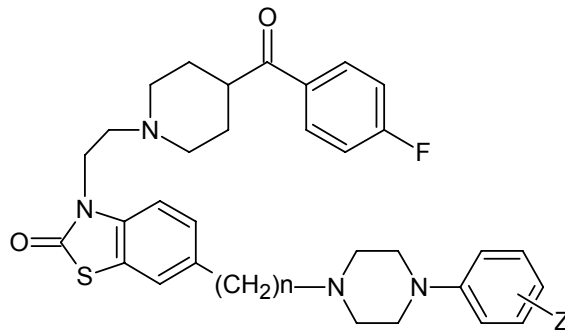
R= metil, etil, allil, sikloheksil, fenetil, fenil, 4-süstitüe fenil

2.6.2.4.2. 2-Okso-3*H*-Benzotiyazol Yapısına Sahip Bileşiklerin Diğer Biyolojik Etkileri

Diouf ve arkadaşları 6-(1,4-süstitüepiperazin-1-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol ve 6-(1,4-süstitüepiperazin-1-il)-3-(1,4-süstitüepiperidin-1-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol türevlerinin serotonin ve dopamin reseptör ligandı olup, anksiyolitik etkiye sahip olduklarını belirtmiştir.⁹⁵

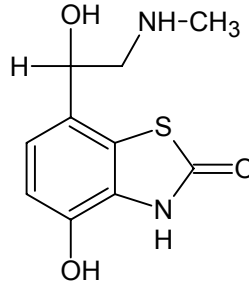


R= H, CH₃ n=2, 3, 4 Z=H, 2-OCH₃, 3-CF₃, 2-F, 4-F

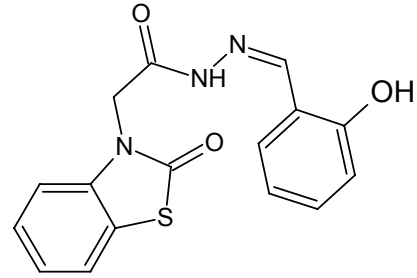
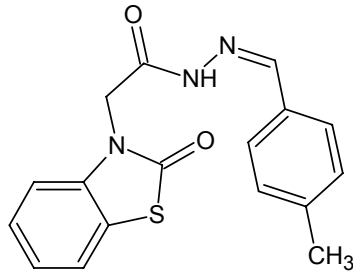


Z=H, 2-OCH₃, 3-CF₃

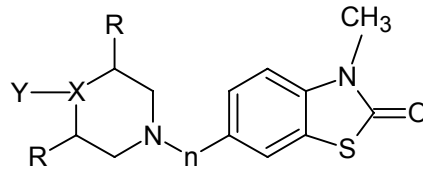
Suzuki ve arkadaşları bir deniz süngerisi olan *Dysidea sp.*'den izole ettikleri 4-hidroksi-7-[1-(1-hidroksi-2-metilamino)etil]-2-okso-3H-benzotiyazol yapısının selektif β_2 -adrenoseptör agonisti olduğunu ve bronkodilatör etki gösterdiğini bildirmişlerdir.⁹⁶



Bazı (2/4-süstitüe) benzaldehit (2-okso-3H-benzotiyazol-3-il)asetohidrazonların antikonvülsan aktiviteye sahip oldukları literatürde bildirilmiştir.⁹⁷



6-piperidino veya 6-piperazino-alkil-2-okso-3H-benzotiyazollerin $\sigma/5$ -HT_{1A} ligandı oldukları bildirilmiştir.⁹⁸



n=2, 4 R= H, CH₃ X= N, CH
Y= fenil, benzil, 2,4- veya 3,4-diklorobenzil

2.7. Mikrodalga Destekli Kimyasal Sentez

2.7.1. Mikrodalga Teorisi

Mikrodalga radyasyonu 0,3-300 GHz frekans aralığındaki elektromanyetik radyasyondur ve bu da 1 cm ila 1 m arasındaki dalga boyuna karşılık gelir. Bu nedenle, elektromanyetik spektrumun mikrodalga bölgesi, IR ve radyo frekansları arasında yer alır. 1-25 cm arasındaki dalga boyları yoğun olarak RADAR için; geriye kalan dalga boyu aralığı ise telekomünikasyon için kullanılır. Mutfaklarda kullanılan mikrodalga fırınları ile kimyasal sentezlerde kullanılan mikrodalga reaktörlerinin tümü, telekomünikasyonla ve cep telefonu frekansları ile etkileşimden uzak durmak için 2,45 GHz'lik bir frekansta çalışırlar ve bu da 12,25 cm'lik bir dalga boyuna karşılık gelir. Diğer frekanslarda iş gören mikrodalga ısıtma aygıtları da bulunmaktadır fakat bunlar sentetik kimyada kullanılan reaktörler değildir. Gerçekten de, 2,45 GHz'den farklı frekanslarda mikrodalga ile gerçekleşen organik sentezlere ait yayın örnekleri çok nadirdir.⁹⁹⁻¹⁰¹

Tablo 5'te sunulan veriler incelendiğinde, 2,45 GHz (0,0016 ev)'deki mikrodalga fotonunun enerjisinin, moleküler bağları kırmak için çok düşük olduğu ve hatta Brownian hareketinden bile düşük olduğu görülmektedir. Bu sebeple mikrodalgaların, ultraviyole ve görünür radyasyonda (fotokimya) olduğunun aksine, elektromanyetik enerjiyi doğrudan absorblayarak kimyasal reaksiyonları indükleyemeyecekleri açıktır.⁹⁹

Tablo 5 : Radyasyon tiplerinin ve bağ enerjilerinin karşılaştırılması⁹⁹

Radyasyon Tipi	Frekans (MHz)	Kuantum Enerjisi (eV)	Bağ Tipi	Bağ Enerjisi (eV)
Gama ışınları	3.0×10^{14}	1.24×10^6	CC tek bağ	3.61
X-ışınları	3.0×10^{13}	1.24×10^5	CC çifte bağ	6.35
Ultraviyole	1.0×10^9	4.1	CO tek bağ	3.74
Görünür ışık	6×10^8	2.5	CO çifte bağ	7.71
Infrared ışık	3.0×10^6	0.012	CH bağı	4.28
Mikrodalgaları	2450	0.0016	OH bağı	4.80
Radyofrekansları	1	4.0×10^{-9}	Hidrojen bağı	0.04-0.44

Mikrodalga kimyası, maddelerin “mikrodalga dielektrik ısıtma” etkileri kullanılarak, etkili bir şekilde ısıtılmasına dayanır. Mikrodalga dielektrik ısıtması, belirli maddelerin (örneğin bir solvan veya reajan) mikrodalga enerjisini absorblayıp, bu enerjiyi ısıya dönüştürebilme yeteneklerine bağlıdır. Mikrodalgalar, elektrik ve manyetik alan bileşenlerinden oluşan elektromanyetik dalgalardır. Mikrodalga sentezleri ile ilgili birçok pratik amaç için, dalga-madde etkileşimlerinde önemi olan, elektromanyetik alanın elektrik bileşenidir. Fakat bazı örneklerde, manyetik alan etkileşimleri de (örneğin geçiş metal oksitleri ile) ayrıca ilişkili olabilir.⁹⁹

Elektromanyetik alanın elektrik bileşeni, iki ana mekanizmayla ısınmaya neden olur: dipolar polarizasyon (kutuplaşma) ve iyonik iletim.⁹⁹⁻¹⁰¹

Elektrik alan bileşeninin matriks ile etkileşimi, dipolar polarizasyon mekanizması olarak adlandırılır. Mikrodalga ile ısımlandığında, ısı üretebilen bir madde dipol momente sahip olmalıdır. Mikrodalga frekanslarına maruz bırakıldığında, örneğe ait dipoller uygulanan elektrik alanda sıralanırlar. Uygulanan alan dalgalanma gösterdiğinde, dipol alan değişen elektrik alana göre yeniden düzenlenir ve bu esnada, moleküler sürtünme ve dielektrik kaybı yoluyla, enerji ısı formuna dönüşür. Bu işlem ile üretilen ısı miktarı, matriksin uygulanan alanın frekansı ile kendini düzene sokma yeteneği ile doğru orantılıdır. Eğer dipol, uygulanan alan ile yeniden sıralanmak için yeterli zamana sahip değilse (yüksek frekanslı ısıtma) ya da çok hızlı sıralanıyorsa (düşük frekanslı ısıtma) ısınma gerçekleşmeyecektir. Tüm ticari sistemlerde kullanılan 2,45 GHz'lik frekans, bu iki uç arasında yer alır ve moleküler dipole, alanda sıralanması için yetecek, fakat değişen alanı takip etmesine yetmeyecek kadar zaman verir. Bu nedenle dipol, elektrik alan ile kendini sıralamak için yeniden düzenlendiğinde, alan zaten değişecek ve dipol ile alanın yönü arasında bir faz farkı oluşacaktır. Bu faz farkı, dipolden moleküler sürtünme ve çarpışma yoluyla enerji kaybına, dielektrik ısınmasında ise artışa neden olur. Özet olarak, alan enerjisi ortama transfer edilir; elektrik enerjisi de kinetik veya termal enerjiye ve en sonunda da ısıya dönüştürülür. Şu vurgulanmalıdır ki, mikrodalga ışığı ve polar çözücü arasında ısımanın frekansı ile rotasyonel gevşeme sürecindeki frekans yaklaşık olarak eşleştiğinde oluşan - etkileşim, kuantum mekanik rezonans olgusu değildir. Kuantize rotasyonel bandlar arası geçişler hesaba katılmaz ve enerji transferi spesifik bir maddenin özelliği değildir, aksine tüm yığını içeren kolektif bir olgunun sonucudur. Isı, polar moleküller arasında oluşan sürtünme kuvveti tarafından üretilir. Gazlar mikrodalga ısıtması altında ısıtılamazlar çünkü dönüş yapan moleküller arasındaki uzaklık çok fazladır. Benzer biçimde, buz ise

mikrodalga geçirgendir, çünkü su dipolleri kristal kafes içinde hapsolmuştur ve sıvı fazdaki gibi rahat hareket edememektedirler.⁹⁹

Bir maddenin belli bir frekanstaki elektromanyetik enerjiyi ısı enerjisine dönüştürebilme yeteneği $\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$ denklemi ile gösterilir. Bu denklemde, δ yayılma faktörüdür, ϵ'' dielektrik kayıp sabitidir ve elektromanyetik radyasyonun ısıya dönüşme verimliliğini gösterir. ϵ' ise dielektrik sabitidir ve bir molekülün bir elektrik alanda polarize olabilme yeteneğini ölçer. Yüksek $\tan \delta$ değeri bir maddenin mikrodalga enerjisine yüksek hassasiyet gösterdiğini belirtir. $\tan \delta$ değerleri dielektrik sabiti ile doğru orantılıdır ve dielektrik sabiti ne kadar büyükse mikrodalga ile etkileşim o kadar fazladır. Su, DMF, metanol, etil asetat, aseton, kloroform, asetik asit ve diklorometan gibi solvanlar yüksek $\tan \delta$ değerlerine sahip oldukları için, mikrodalga ışımasına maruz kaldıklarında hızlıca ısınırlar. Hekzan, toluen, dietil eter ve karbontetraklorür gibi solvanlar ise düşük $\tan \delta$ değerine sahiptirler ve mikrodalga radyasyonu altında ısıtılamazlar.¹⁰⁰⁻¹⁰¹

İkinci ana ısıtma mekanizması ise, iyonik iletim mekanizmasıdır. İyonik iletim boyunca, bir örnekteki çözünmüş yüklü parçacıklar (genellikle iyonlar), mikrodalga alanının etkisi altında ileri ve geriye salınırken, komşu molekül veya atomlarla çarpışırlar. Bu çarpışmalar, sallanma veya harekete neden olarak ısı oluştururlar. Bu nedenle, eşit miktarlarda distile su ve musluk suyu taşıyan iki örnek, sırayla sabit radyasyon gücünde mikrodalga ışımasıyla ısıtılırsa, iyonik içeriğinden dolayı musluk suyu örneğinde daha hızlı ısınma meydana gelecektir. Benzer iyonik iletim etkileri, mikrodalga alanda iyonik sıvıların ısıtma davranışları dikkate alındığında özellikle önem arz etmektedir. İletkenlik ilkesi, ısı üretme kapasitesi dikkate alındığında dipolar rotasyon mekanizmasından daha kuvvetli bir etkidir.⁹⁹⁻¹⁰¹

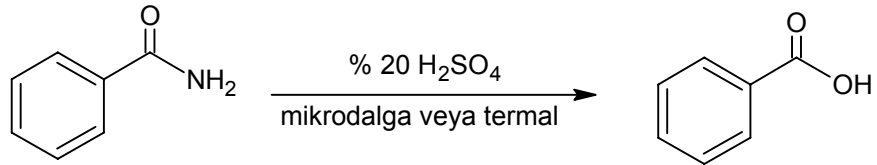
Mikrodalga ışımasının madde ile etkileşimi, üç farklı süreç ile karakterizedir; emilim, iletim ve yansıma. Polar organik solvanlar gibi yüksek dielektriği olan maddeler, mikrodalgaları güçlü absorbe ederler ve sonuç olarak ortam hızlı bir şekilde ısınır. Non-polar maddeler, penetre olan mikrodalgalar ile sadece küçük etkileşimler gösterirler ve bu nedenle reaktörlerin yapı malzemeleri olarak kullanılabilirler. Eğer mikrodalga ışıması, malzeme yüzeyi tarafından yansıtılırsa, sistemde enerji eşleşmesi ya çok az olacaktır ya da hiç olmayacaktır. Malzemenin ısısı çok az yükselecektir. Yüksek iletken metaller için bu dikkate değer bir özelliktir.⁹⁹

2.7.2. Mikrodalga Reaktörü Kullanılarak Gerçekleştirilen Sentez Örnekleri

1970'lerin sonlarından beri termal enerjiye alternatif olarak kimyasal reaksiyonlarda mikrodalga radyasyonu kullanılmaktadır. Mikrodalga teknolojisine duyulan ilginin sonucunda, mikrodalga kimyası günümüzde artık her laboratuvarında yoğun olarak kullanılan bir laboratuvar tekniği haline gelmiştir.¹⁰⁰

Geleneksel termal ısıtma ile kıyaslandığında, mikrodalga radyasyonu daha hızlı ve daha temiz reaksiyonlar sağlar. Elde edilen ürünlerin verimi yüksektir ve genellikle daha basit pürifikasyon prosedürleri gerektirir.¹⁰⁰

Organik sentezde mikrodalga kullanımı ile ilgili ilk yayın 1986 yılında Gedye ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Tetrahedron Letters dergisinde yayımlanan çalışmada benzamitin hidrolizi hem mikrodalga ile hem de termal ısı ile gerçekleştirilmiş ve iki yöntem birbiri ile kıyaslanmıştır. Sonuçta mikrodalga ile yapılan reaksiyonun daha kısa sürede ve daha yüksek verim ile yürüdüğü bildirilmiştir.¹⁰²

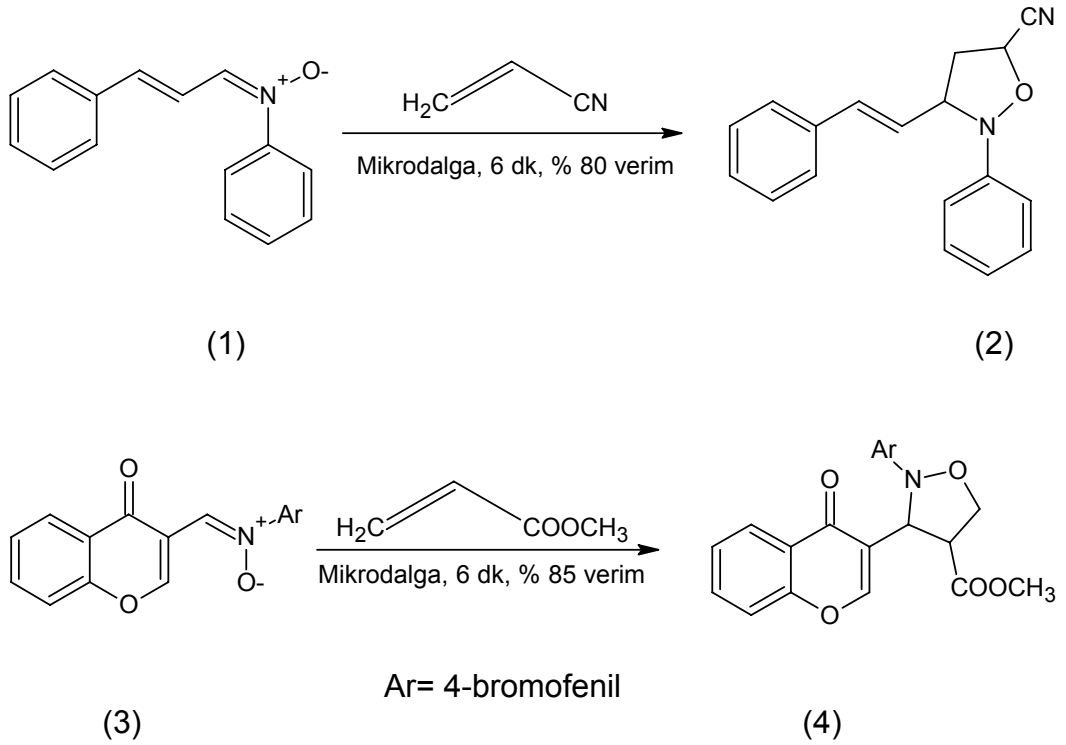


Termal= 1 saat, % 90 verim (geri çeviren soğutucu altında)
Mikrodalga= 10 dk, % 99 verim

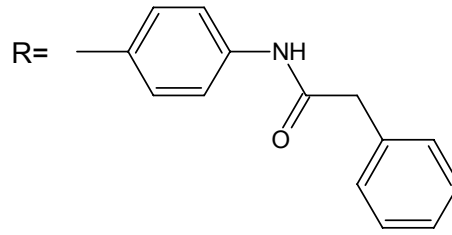
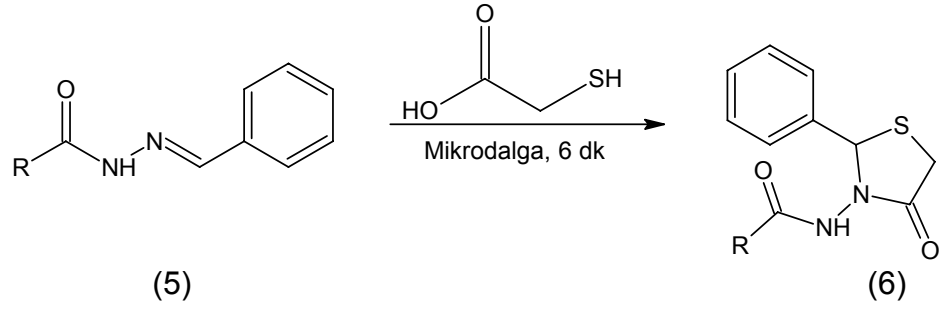
Günümüzde mikrodalga kullanılarak gerçekleştirilen organik sentezlerle ilgili literatürde pek çok örnek bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda mikrodalga destekli sentezlerin reaksiyon süresini kısaltmanın yanı sıra çoğunlukla ürün verimini de arttırdığı belirtilmektedir.

Örneğin, mikrodalga reaktöründe konjuge nitronun (1) akrinonitril ile tepkimesinden 6 dakikada % 80 verimle istenen siklokatim ürünü (2) elde edilmiştir. Aynı tepkime termal ısı ile gerçekleştiğinde 2-3 gün sürmekte ve ürün % 66 verimle elde edilmektedir.¹⁰⁰

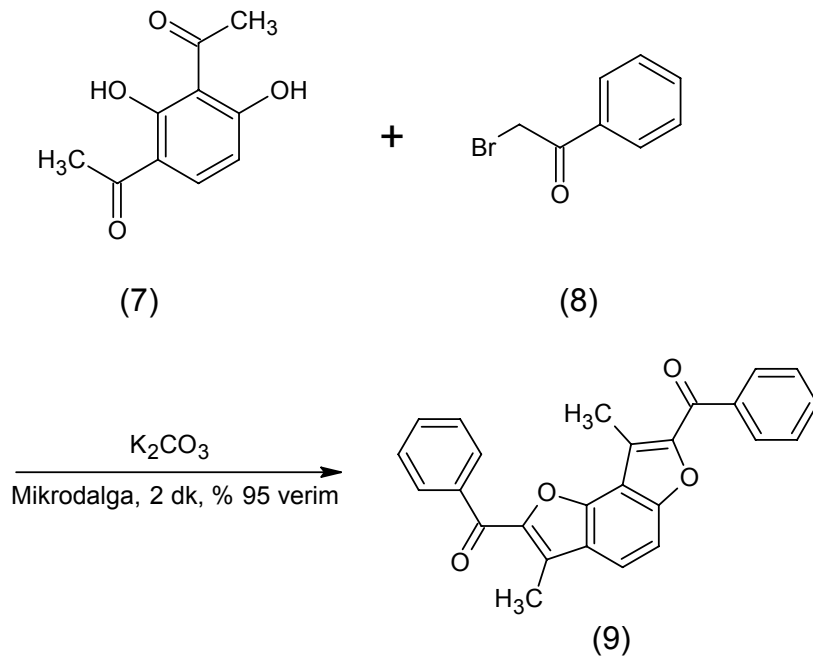
Bir diğer siklokatım reaksiyonunda konjuge kromon nitronu (3) metil akrilat ile solvansız olarak mikrodalga reaktöründe tepkimeye sokulduğunda, isoksazolidin (4) 6 dakikada % 85 verimle elde edilmiştir. Aynı reaksiyon geleneksel yöntemlerle toluen içinde geri çeviren soğutucu altında yapıldığında % 50 verimle ürün elde edebilmek için 2 günlük süreye ihtiyaç duyulmaktadır.¹⁰⁰



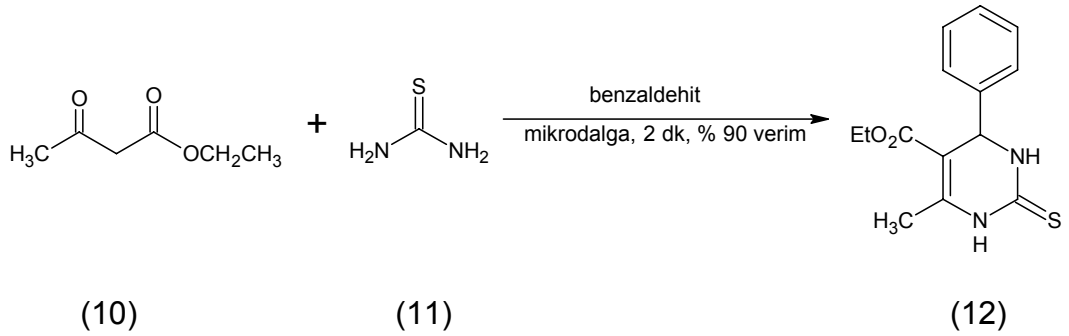
Benziliden hidrazitin (5) tiyoglikolik asit ile mikrodalga reaktöründe 540 W'ta kondensasyonu sonucu 6 dakikada elde edilen tiyazoldin-4-on (6) bileşiği, geleneksel yöntemler ile 120° C'de 10 saat boyunca ısıtılarak % 36 verimle elde edilebilmektedir. Mikrodalga ile gerçekleştirilen sentezde ürün veriminin geleneksel yöntemle kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir.¹⁰⁰



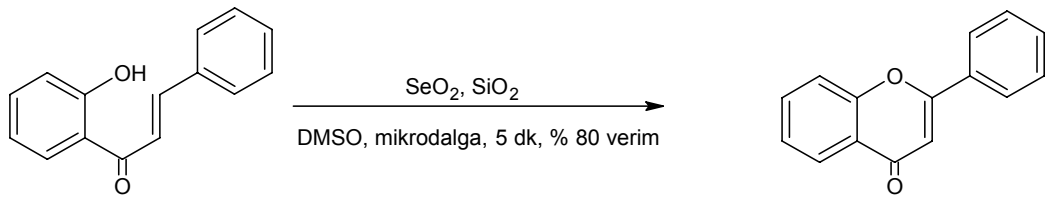
Bir diğer örnekte, geleneksel termal şartlarda etilendiklorür içinde faz transfer katalizörü olarak tetrabutil amonyum hidrojen sülfat kullanıldığında, %85 verimle trisiklik benzofuran (9) elde edebilmek için 6-8 saat boyunca 55-60° C'de ısıtma gereklidir. Aynı reaksiyon K_2CO_3 varlığında (7) ve (8)'in kondensasyonu ile mikrodalga reaktöründe gerçekleştirildiğinde ise 300 W enerji kullanılarak 2 dk içinde % 95 verimle aynı ürünün elde edildiği bildirilmiştir. Reaksiyonda faz transfer katalizörü de kullanılmamıştır.¹⁰⁰



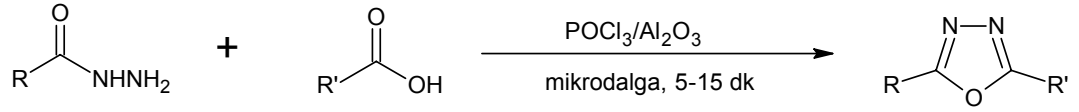
Herhangi bir solvana ve katalizöre ihtiyaç duyulmaksızın mikrodalga reaktöründe etilasetoasetatın (10) eşdeğer mol benzaldehit ve tiyoüre (11) kullanılarak 800 W'daki reaksiyonu ile istenen dihidrotiyopirimidon türevi (12) 2 dakikalık bir sürede ve % 90 verimle elde edilmiştir. Aynı reaksiyon geleneksel yöntemlerle (etanol, HCl, geri çeviren soğutucu) gerçekleştirildiğinde ise ürün verimi yarı yarıya azalmaktadır.¹⁰⁰



2-hidroksikalkonun mikrodalga reaktöründe 400 W'ta 5 dakika boyunca SeO_2 ve eser miktardaki dimetilsülfoksit (DMSO) ile muamele edilmesi sonucu % 80 verimle beklenen flavon türevi sentez edilmiştir. Reaksiyonda DMSO hem oksidasyon ajanı hem de enerji transfer aracı olarak etkilimtedir. DMSO kullanılmadığında ürün % 10 daha az verimle elde edilmektedir. Reaksiyon yağ banyosunda 107-109 °C'de gerçekleştirildiğinde ise verim % 46'lara düşmektedir ve reaksiyonun tamamlanabilmesi için 1 saatlik süre gerekmektedir.¹⁰⁰



Khan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, bir seri 2,5-disübstitüe-1,3,4-oksodiazol türevinin mikrodalga reaktöründeki sentez süreleri ve ürün verimleri, geleneksel yöntemle gerçekleştirilen sentezlerin süre ve verimleri ile kıyaslandığında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.¹⁰³

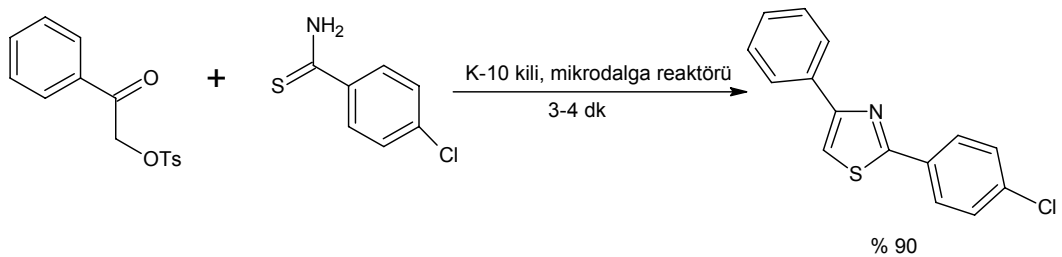


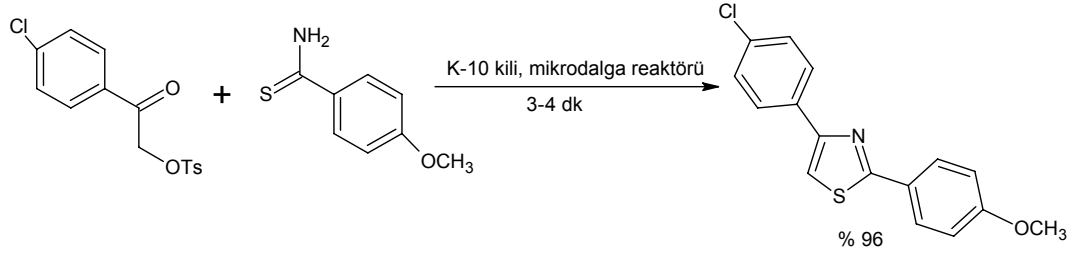
Tablo 6: 2,5-disüstitüe-1,3,4-oksodiazolün mikrodalga destekli sentezi ile geleneksel yöntemle yapılan sentezinin süre ve verim açısından karşılaştırılması¹⁰³

R'	Mikrodalga		Geleneksel Yöntem	
	Süre (dk)	Verim (%)	Süre (saat)	Verim (%)
C ₆ H ₅	12	92	6	81
o-NO ₂ C ₆ H ₄	9	96	5	86
o-BrC ₆ H ₄	12	92	6	76
m-BrC ₆ H ₄	12	87	6	71
p-BrC ₆ H ₄	12	85	6	68
3-piridinil	12	89	9	75
CH ₂ Cl	7	87	5	78
CHCl ₂	7	85	4	77
CCl ₃	6	91	4	76
p-CH ₃ C ₆ H ₄	13	81	7	69
3,4,5-trimetoksi benzoil	15	79	9	63
1-C ₁₀ H ₇	12	83	9	69
2-C ₁₀ H ₇	12	81	8	72

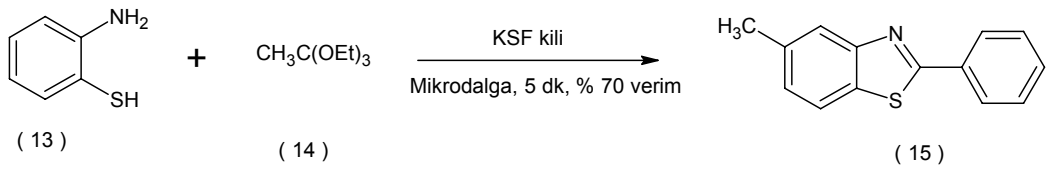
2.7.3. Tiyazol ve Benzotiyazol Halka Sistemlerinin Mikrodalga Reaktörü Destekli Sentez Örnekleri

Tiyobenzamitler ile α-tosiloksisüstitüe ketonların herhangi bir solvana ihtiyaç duymaksızın, asidik montmorillonit K-10 kili içindeki reaksiyonundan 2,4-diariltiyazollerin elde edildiği literatürde bildirilmektedir. Bu sentez yönteminde mikrodalga reaktörü kullanıldığında yüksek verimde ürün elde edildiği bildirilmiştir.⁵⁶





Benzotiyazoller, HCl veya polifosforik asit varlığında geleneksel ısıtma ile 13 gibi bir nükleofilin karboksilik asitlerle kondensasyonundan elde edilebilmektedir. Mikrodalga enerjisinin kullanımı ise bu tarz kondensasyon reaksiyonları için alternatif bir kaynaktır ve reaksiyon süresini düşürerek, daha yüksek verimlerde ve daha saf ürün elde etmeyi sağlar. 14 nolu orto-ester KSF kili varlığında 10 nolu bileşik ile mikrodalga reaktöründe azot atmosferi altında 60 W'da reaksiyona sokulduğunda, 5 dk içinde %70 verimle sübstitüe benzotiyazol (15) elde edilmiştir. Geleneksel ısıtma ile kıyaslandığında (toluen, geri çeviren soğutucu), KSF kili varlığında mikrodalga ile elde edilene yakın verimde ürün elde edebilmek ve reaksiyonu tamamlayabilmek için 12 saate ihtiyaç duyulmaktadır.¹⁰⁰



2.8. COX Enzimi İnhibisyonunun *in vitro* Tayini

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçların COX-1 ve COX-2'ye karşı göreceli inhibitör aktivitelerini tanımlamak ve kıyaslamak için çok sayıda *in vitro* analiz geliştirilmiştir. İnhibitör aktiviteler IC₅₀ değeri ile belirtilmiştir. Seçicilik ise COX-1 ve COX-2'ye ait IC₅₀ değerlerinin birbirine oranı olarak ifade edilmiştir.^{12,104}

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçların COX-2 selektivitesini araştırmak için geliştirilen ve en çok kullanılan *in vitro* analiz sistemleri Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7 : NSAİİ'ların COX-2 Selektivitesini Araştırmak İçin En Çok Kullanılan *in vitro* Analiz Sistemleri¹⁰⁴

Siklooksijenaz-1	Siklooksijenaz-2
Öküz aortik endotel hücreleri	LPS ile indüklenmiş fare makrofajları
Koç seminal damarı (saflaştırılmış)	Koyun plasentası (saflaştırılmış)
İnsan yıkanmış plateletleri	IL-1 ile indüklenmiş sıçan mesangiyal hücreleri
Domuz makrofajları (stimüle edilmemiş)	Domuz makrofajları (LPS)
Fare rekombinant enzimleri	Fare rekombinant enzimleri
İnsan hücre hattı (histiositik lenfoma hücreleri U-937)	İnsan hücre hattı (osteosarkom hücre hattı 143.98.2)
İnsan rekombinant enzimleri (saflaştırılmış, mikrozomlar, bütün hücreler)	İnsan rekombinant enzimleri (saflaştırılmış, mikrozomlar, bütün hücreler)
Pıhtılaşmış insan tam kanı (plateletler)	LPS ile indüklenmiş insan tam kanı (monositler)
İnsan gastrik mukoza parçaları	LPS ile indüklenmiş insan monositleri
İnsan kondrositleri (stimüle edilmemiş)	IL-1 ile indüklenmiş insan kondrositleri
İnsan sinoviyositleri (stimüle edilmemiş)	IL-1 ile indüklenmiş insan sinoviyositleri
İnsan plateletleri	IL-1 ile indüklenmiş insan sinoviyositleri

Bu test sistemleri 3 grupta sınıflandırılabilir¹⁰⁴:

1- Hayvan enzimleri, hayvan hücreleri veya hayvan hücre hatları kullanan sistemler (ilk geliştirilen sistemler).

2- İnsan rekombinant enzimleri, insan hücre hatları veya insan kan hücreleri (özellikle plateletler ve monositler) kullanan analizler (bugünkü kullanılan standartlar).

3- İnsan gastrik mukoza hücreleri, kondrositler ve sinoviositler (non-steroidal antienflamatuvar ilaçların yan etkileri ve antienflamatuvar etkilerinin görüldüğü hedef insan hücrelerini kullanan yeni geliştirilen modeller)

in vitro test sistemlerinde, deney koşulları analize bağı olarak farklılık gösterebilir. Kullanılan enzimler hayvan veya insan kaynaklı olabilir, doğal veya rekombinant olabilirler. Enzimler izole olarak kullanılabildikleri gibi, mikrozomal preparatlar içinde veya tam hücre analizlerinde de kullanılabılırler. Deney koşullarında başka farklılıklar da bulunmaktadır¹⁰⁴.

Birincisi; araşidonik asitin kaynağıdır. Prostaglandin sentezi endojen olarak salınan araşidonik asitten veya eksojen olarak ortama eklenen araşidonik asitten ölçülebilir. İkinci durumda, farklı laboratuvarlarda farklı konsantrasyonlar kullanılmaktadır.

İkincisi; rekombinant COX-1 ve COX-2 enzimlerinin gen replikasyonu için kullanılan çeşitli ekspresyon sistemleri bulunmaktadır. Ayrıca, COX-1 veya COX-2 geni ile transfekte edilen hücrelerin kökenleri farklı olabilir.

Üçüncüsü; COX-2 indükleyici ajanın varlığı veya yokluğu çeşitlilik gösterebilir. Rekombinant enzimlerle transfekte olmuş hücreler, bu enzimi kendiliğinden salarlar. Bu durum COX-2'nin indüklenmesi gereken diğer hücreler ile tezat oluşturur. COX-2'nin indüklenmesi genellikle bakteriyel lipopolisakkarit veya interlökin-1, tümör nekrozis faktör gibi çeşitli sitokinler tarafından gerçekleştirilir. Bu endotoksinler ve sitokinler çeşitli konsantrasyonlarda verilebilir.

Dördüncüsü; ilaçla, COX-2 indükleyici ajanla, veya araşidonik asitle inkübasyonun süresi farklı laboratuvarlar arasında değişmektedir. Bu durum COX-2 inhibisyonu zamana bağımlı olduğu için, çalışma sonuçlarını etkileyebilir.

Beşincisi; ortamdaki protein konsantrasyonları farklılık gösterebilir. Bu, plazma proteinlerine kolay bağlandığı bilinen non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar için hassas bir durumdur.

İdeal Bir Analizin Özellikleri : ^{12,104}

- 1- Analiz, tüm hücrelerde bulunan doğal insan enzimlerini kullanmalıdır.
- 2- Kullanılan hücreler, non-steroidal antienflamatuvar ilaçların, antienflamatuvar etkileri ve yan etkileri için hedef hücreler olmalıdır.
- 3- COX-2 enzimi kendiliğinden salınmamalı, bunun yerine indüklenerek oluşmalıdır. Ancak böylece enflamasyon süreci taklit edilmiş olur.
- 4- Prostaglandin sentezi eksojen olarak eklenen araşidonik asitten değil, endojenik kaynaklardan salınan araşidonik asitten ölçülmelidir.
- 5- Ortamdaki protein konsantrasyonu, proteinlere bağlanan ilacı hesaba katabilmek amacıyla, plazma protein konsantrasyonuna oldukça benzer olmalıdır.

Ancak, bir test sistemini seçerken sadece bahsedilen bu özelliklerin hesaba katılması yeterli olmaz. Bunun yanında, analizin pratik yönü, yapılabirliği ve üretkenliği de değerlendirilmelidir. Bu durum belki, COX-1 için ideal bir test sistemi olan insan gastrik mukoza dokusunun ve COX-2 için ideal bir sistem olan interlökin-1 ile indüklenmiş insan sinoviyal dokusunun, neden rutin kullanımlar için onaylanmadığını açıklayabilir.¹⁰⁴

Bir analiz sistemi seçerken, çalışmanın amacını belirlemek ayrıca önemlidir. Eğer amaç, bir ilaç ile enzimin aktif bölgesi arasındaki etkileşimi moleküler seviyede araştırmak ise, o zaman izole enzimler kullanılmalıdır. Yapı-aktivite ilişkisi ve tarama çalışmaları için, insan hücre hatları veya insan rekombinant enzimleri idealdir. Eğer çalışmanın amacı selektif COX-2 inhibisyonunun klinik belirginliğini incelemek ise, bu durumda en yaygın kullanılan sistemler, tam hücre içinde bulunan insan rekombinant enzimleri ve insan tam kan deneyidir.¹⁰⁴

İnsan tam kan deneyinde, COX-1 aktivitesi için pıhtılaşmış insan tam kanı, COX-2 aktivitesi içinse lipopolisakkarit ile indüklenen tam kan kullanılır. İnsan tam kan deneyinin birçok avantajı vardır. Öncelikle, intakt insan hücreleri kullanılır. Bu hücreler non-steroidal antienflamatuvar ilaçların antienflamatuvar etkileri (monositler) ve yan etkileri (plateletler) için hedef hücrelerdir. Ayrıca, tam kanda bulunan plazma proteinleri, non-

steroidal antienflamatuar ilaçların *in vivo* etkileşimleri için iyi bir temsil sağlar. Dahası, her iki analiz için de kullanılan tam kan, analiz sonuçlarının doğru kıyaslanabilmesine imkan vermek için aynı gönüllüden ya da hastadan aynı anda alınır. Son olarak, analiz daha önce non-steroidal antienflamatuar ilaç kullanmış gönüllü veya hastalardan alınan kan ile de yapılabilir (*ex vivo* analiz). Böylece, *in vitro* bulguların *in vivo* sonuçlarla kıyası yapılabilir.¹⁰⁴

İnsan Tam Kan Deneyinin Başlıca Dezavantajları :

1- COX-2'nin indüklenmesi gerektiğinden, COX-1 ve COX-2 için farklı inkübasyon süreleri kullanılmaktadır.

2- Non-steroidal antienflamatuar ilaçların terapötik ve yan etkilerini temsil etmek için insan tam kan deneyinde platelet ve monositler kullanılmaktadır. Oysa gastrik mukoza hücreleri ve sinoviyositler, platelet ve monositlerden daha uygun hedef hücreler olurlardı.^{12,104}

in vitro sistemler, aktivitenin tanımlanmasında önemlidirler. Ancak, verilen bir dozda, *in vivo* COX-1 ve COX-2 inhibisyonunun seviyesi, sadece *in vitro* sonuçlara bakarak tahmin edilemez. Her bir bileşimin farmakokinetik özellikleri (plazma seviyeleri, dağılımı, plazma proteinlerine bağlanmaları gibi) hesaba katılmalıdır.¹⁰⁴

Bu bilgiler ışığında, COX-2 inhibitörlerinin aktivitelerini değerlendirmek üzere birçok araştırmacı farklı *in vitro* test sistemleri geliştirmiştir. Laufer ve arkadaşlarının çalışmaları da bunlardan biridir.¹⁰⁵ Laufer, saflaştırılmış enzim sistemleri, mikrozomal membranlar, kültüre edilmiş intakt hücreler, insan kan tam deneyleri ve buna benzer daha önce geliştirilen *in vitro* test sistemlerinin iyi iş görmelerine karşın, bünyelerinde bazı kusurlar taşıdıklarını ve bu nedenle bu eksiklik ve kusurlardan uzak yeni bir *in vitro* test sistemi geliştirmeyi hedeflediklerini belirtmiştir. Laufer ve arkadaşları bu çalışmalarında, taze izole edilmiş insan mononükleer hücre ve plateletlerini kullandıkları bir test sistemi tasarlamışlardır. Araştırmacılar geliştirdikleri bu sistemi, diğer test sistemleri ile kıyaslamışlar ve çıkan sonuçların daha önce bildirilen sonuçlar ile aynı olduğunu belirtmişlerdir.

Dannhardt ve Ulbrich'in yaptıkları bir başka çalışmada ise, öküz aortik koroner endotelial hücreleri kullanılarak yeni bir test sistemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada COX-1 kaynağı olarak öküz aortik

koroner endotelial hücreleri, COX-2 kaynağı olarak ise Aspirin ile muamele edilip forbol miristat asetat ile aktive edilmiş öküz aortik koroner endotelial hücreleri kullanılmıştır. COX-2 ekspresyonunun, bu hücrelerde zamana ve konsantrasyona bağlı indüksiyonu HPLC analizi ile değerlendirilmiş ve ayrıca poliklonal antikorlar kullanılarak Western Blot analizi ile de tespit edilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar geliştirilen sistemin COX-1 ve COX-2 analizlerinin eksiklik ve problemlerine çözüm olduğunu belirtmişlerdir.¹⁰⁶

Patrignani ve arkadaşları ise, heparinize insan tam kan örneklerini 24 saat boyunca 37 °C'de lipopolisakkarit ile inkübe edip, PGE₂ miktarını radyoimmünanaliz ile ölçmüşlerdir.¹⁰⁷

2.8.1. COX Enzimi İnhibisyonunun Tayininde Kullanılan İmmünanalizler

İmmünanalizler antikorların eşsiz özelliklerini kullanan hassas analitik testlerdir. Tıp ve temel yaşam bilimleri araştırmaları alanında, 20. yüzyıldaki en verimli teknolojik katkılardan biri olarak kabul edilmektedirler. İmmünolojik teknikler ve özellikle de immünanalizler, kompleks moleküllerin çok küçük konsantrasyonlarını incelemek için kullanılan teferruatlı biyokimyasal araçlardır.¹⁰⁸

İmmünanalizler eşsiz niteliklerini, antikorların üç önemli özelliğinden alırlar;

- 1- Antikorların, doğal ve insan yapımı kimyasallara, biyomoleküllere, hücre ve virüslere son derece geniş çaptaki bağlanabilme özellikleri,
- 2- Antikorların bağlandığı maddeye eşsiz özgüllükleri,
- 3- Antikor ve hedefi arasındaki bağlanmanın gücü

Bu özelliklerinden dolayı immünanalizler, biyolojik sıvılardaki çok küçük konsantrasyonlar için bile doğru sonuçlar verir.¹⁰⁸

İmmünanalizler ile ayrı ayrı hem antikor hem de antijen varlığı ölçülebilir. İmmünanalizler, kompetitif veya nonkompetitif (sandviç) ya da homojen veya heterojen olarak sınıflandırılabilirler.^{109,110}

Kompetetif immüanalizde, bilinmeyen örnekteki antijen, antikora bağlanmak için işaretli antijen ile yarışır. Daha sonra, antikora bağlanan işaretli antijenin miktarı ölçülür. Bu yöntemde cevap, bilinmeyen örnekteki antijen miktarı ile ters orantılıdır. Çünkü, bilinmeyen örnek içerisinde, işaretli antijen ile yarışacak ne kadar az antijen var ise, cevap o kadar büyük olacaktır.^{109,110}

Sandviç analiz olarak ta bilinen nonkompetetif immüanalizde ise, bilinmeyen örnek içerisindeki antijen antikora bağlanır. Sonra, işaretli antikor antijene bağlanır ve ortamdaki işaretli antikorun miktarı ölçülür. Kompetetif immüanalizin tersine, nonkompetetif immüanalizde sonuçlar, antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Çünkü bilinmeyen örnek içerisinde antijen yok ise, işaretli antikor antijene bağlanamayacaktır.^{109,110}

Heterojen immüanalizler, bağlanmamış antikor veya antijeni bölgeden uzaklaştırmak için fazladan bir basamağa ihtiyaç duyarlar ve bunun için genellikle bir katı faz reajanı kullanırlar. Homojen immüanalizler bu basamağa ihtiyaç duymadıklarından, kullanımları daha kolay ve daha hızlıdır.^{109,110}

İmmüanaliz sonuçları doğru, kesin, hassas ve özgül olmak zorundadır. Özellikle doğruluk ve kesinlik, immüanalizlerin kullanımları açısından vazgeçilmez gerekliliklerdir.¹¹¹

Doğruluk, analizin gerçek cevabı verdiği anlamına gelir. Ölçülen analit miktarı ile örnekte bulunan analit miktarı aynı olmalıdır.¹¹¹

Kesinlik ise, analitin miktarını her defasında tekrarlanabilir bir şekilde ölçebilmenin bir ifadesidir.¹¹¹

Klinik hassaslık ve özgüllük ise, doğruluk ve kesinliğin alt başlıkları olarak düşünülebilir. Eğer bir analiz, pozitif hata üretmeyen doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar verme özelliğine sahipse, özgül bir analiz olarak tanımlanabilir. Pozitif hatadan kasıt, örneğin bir hepatit testinde kişi hepatitli olmadığı halde, test sonucunun pozitif çıkması yani kişinin hasta olduğunun saptanmasıdır. Hassaslık ise, bir analizin negatif hata üretmeyen doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği anlamına gelir. Negatif hata ile kastedilen, bir önceki hepatit örneğinden devam edilirse, hepatitli

bir kişinin analiz sonucunun hasta olduğu halde sağlıklı olarak çıkmasıdır.¹¹¹

İmmüanaliz yöntemleri kabaca şu şekilde sınıflandırılabilir;¹¹²

- a- Radyoimmüanaliz
- b- Enzim İmmüanaliz
- c- Floresans İmmüanaliz
- d- Kemilüminesans İmmüanaliz
- e- Biyolüminesans İmmüanaliz
- f- Nefelometrik ve Türbidimetrik İmmüanaliz

COX enzimi inhibisyonunun tayininde bu yöntemler içerisinde en çok kullanılanlardan biri enzim immüanaliz (EIA) yöntemidir. EIA, bütün ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) benzeri analizleri tanımlamak için kullanılan jenerik bir terimdir.¹¹³

2.8.1.1. ELISA Testi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay veya ELISA, bir örnekte antijen veya antikor varlığını tespit eden ve immünolojide sıkça kullanılan biyokimyasal bir tekniktir. ELISA'da iki adet antikor kullanılır. Biri, antijene spesifik olan antikordur. Diğeri ise, antijen-antikor kompleksine etki eder ve bir enzime bağlıdır. Testin isminde de geçtiği gibi, enzime bağlı olan bu ikinci antikor, sinyal üreten kromojenik veya florojenik bir substrat da oluşturabilir.¹¹⁴

ELISA, yüksek turnover sayısına sahip kolay analiz edilen bir enzime bağlı antikor veya antijenleri kullanmak suretiyle, basit enzim analizlerinin hassaslığı ile antikorların özgülüğünü birleştirir.¹¹⁵

ELISA'nın dört farklı tipi vardır;

- 1-Sandviç ELISA (nonkompetitif ELISA)
- 2-Kompetitif ELISA
- 3-Direkt ELISA
- 4-İndirekt ELISA

2.8.1.1.1. Sandviç(Nonkompetetif) ELISA¹¹⁵⁻¹¹⁷

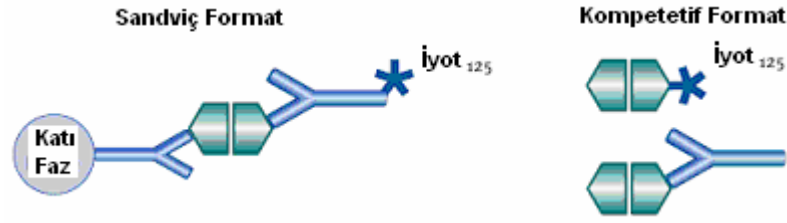
İki antikorlu “Sandviç ELİSA”, immüanalizler içinde en kullanışlı olan yöntemlerden biridir. Bu analiz, bilinmeyen örneklerdeki antijen konsantrasyonunu saptamak için kullanılır. ELISA hızlı ve doğru bir analizdir ve eğer saflaştırılmış bir antijen standardı mevcutsa, örnekteki net antijen miktarını da ölçebilir. Sandviç ELISA’da, iki adet antikora ihtiyaç vardır. Antikorlar, antijenin birbiri ile örtüşmeyen farklı epitop bölgelerine bağlanmaktadır. Antijenin farklı kısımları tanıyabilen iki adet monoklonal antikor veya bir grup afinite-saflaştırılmış poliklonal antikor ile bu sağlanabilir.

Bu analizi uygulamak için, bir antikor (capture antikor) saflaştırılır ve tabla kuyucuklarının dibine yapıştırılmış olan katı faza bağlanır. Daha sonra antijen eklenir ve katı faza bağlı olan antikor ile bir kompleks oluşturmaları sağlanır. Bağlanmamış ürünler yıkanarak uzaklaştırılır ve işaretli ikinci bir antikor (belirleyici antikor), antijene bağlanmak için ortama bırakılır. Böylece sandviç modeli oluşmuş olur. Daha sonra, kolorimetrik bir substrat aracılığı ile matrikse bağlanan işaretli ikinci antikorun miktarı ölçülerek analiz sonlandırılır.

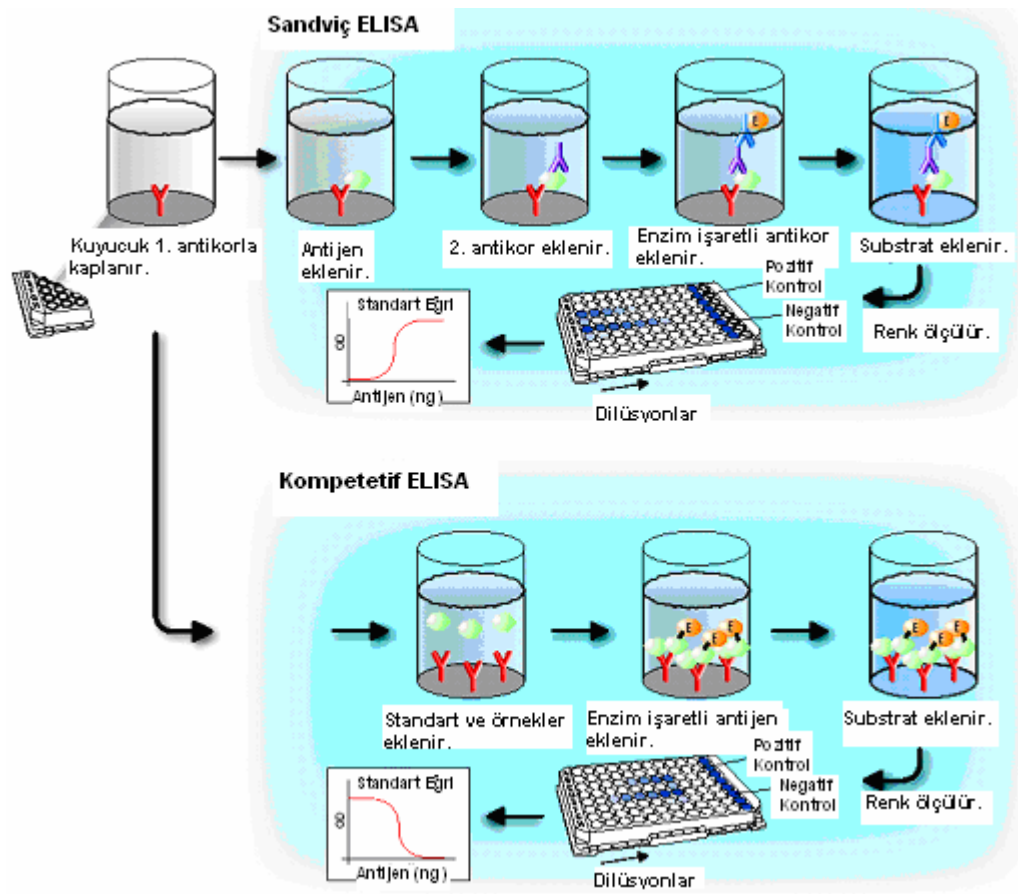
Bu tekniğin başlıca avantajları, kullanım öncesi antijenin saflaştırılmasına gerek yoktur ve analizler oldukça spesifiktir. Yöntemin en büyük dezavantajı ise, her antikorun bu yöntemde kullanılamamasıdır. Sandviç ELISA yönteminde eşlenmiş çiftler halinde olan monoklonal antikor kombinasyonları kullanılır. Eşlenmiş çiftler halinde olan monoklonal antikorlar, antijenin farklı epitop bölgelerini tanıyarak, bu farklı bölgelere bağlanırlar. Böylece birbirlerinin bağlanma özelliklerini engellemezler.

Sandviç ELISA’nın hassaslığı dört faktöre dayanır;

- 1-Katı faza bağlanan birinci antikorun molekül sayısı
- 2-Birinci antikorun antijene olan isteği
- 3-İkinci antikorun antijene olan isteği
- 4-İkinci antikorun spesifik aktivitesi



Şekil 4 : Sandviç ve Kompetitif ELISA¹¹⁷



Şekil 5 : Sandviç ve Kompetitif ELISA Uygulamasının Şematik Gösterimi¹¹⁵

2.8.1.1.2. Kompetitif ELISA¹¹⁵⁻¹¹⁷

Eğer eşlenmiş çiftler halinde olan antikorların kullanımı hedef için uygun değilse (antijen küçükse ve sadece bir epitop içeriyorsa), bu durumda diğer bir seçenek olarak Kompetitif ELISA kullanılabilir. Bu yöntemin bir diğer avantajı da saflaştırılmamış antikorların kullanılabilmesidir. Kompetitif ELISA'da genellikle antikor yerine antijen

işaretlenir. İşaretli olmayan antijen ile işaretli antijen primer antikora bağlanmak için yarışır.

Kompetitif ELISA'yı uygulamak için, teşhis enzimi bir reajan ile (örneğin yabancu peroksidazı) konjuge edilmelidir. Enzim, immünojen antikor veya primer antikordan herhangi birine bağlanabilir. Kompetitif ELISA'nın birçok farklı konfigürasyonu mevcuttur. Bazı konfigürasyonlarda işaretli immünojen antikor yarışmacı antikor olarak kullanılır.

Bu yöntemde, mikrotitre tablanın 96 kuyucuğunun her biri işaretli olmayan saflaştırılmış primer antikor ile kaplanır. Daha sonra bu primer antikor yine işaretli olmayan standartlar ve bilinmeyenler (antijen) ile inkübe edilir. Bu reaksiyon dengeye ulaştığında, ortama konjuge (işaretli) immünojen ilave edilir. Bu konjugat, primer antikorların işaretli olmayan antijen ile işgal edilmemiş bağlanma bölgesine bağlanır. Bu nedenle örnek veya standartta ne kadar fazla immünojen varsa, konjuge immünojenin bağlanma miktarı o kadar düşük olacaktır. Tablaya substrat ilavesi ile reaksiyon tamamlanır ve oluşan renk ölçülerek analiz sonucu yorumlanır.

2.8.1.1.3. Direkt ELISA^{113,116}

1940'larda Coons ve arkadaşlarının doku antijenlerini tespit etmek için floresan etiket ile antikor işaretleme çalışmaları, direkt ölçüm yönteminin başlangıcını teşkil etmektedir. Bu teknikte, işaretli bir primer antikor doğrudan antijen ile reaksiyona girer. Bu yöntem ELISA'da çok sık kullanılmaz. Daha çok hücre ve dokuların immünohistokimyasal boyanmasında kullanılmaktadır.

Direkt ELISA'nın Avantajları;

- Tek bir antikor kullanıldığı için yöntem hızlıdır.
- Sekonder antikorların çapraz reaksiyonu elimine edilmiştir.

Direkt ELISA'nın Dezavantajları;

- Primer antikorun immünoaktivitesi, işaretlenme sonucu azalabilir.
- Primer antikorların her birinin işaretlenmesi zaman kaybına neden olur ve de pahalıdır.
- Bir deneyden diğerine primer antikor işaretleme seçeneğinde esneklik yoktur.
- Sinyal amplifikasyonu küçüktür.



Şekil 6 : Direkt ve İndirekt ELISA¹¹⁶

2.8.1.1.4. İndirekt ELISA^{113,116}

İki basamaklı indirekt yöntemde, tayin için işaretli sekonder bir antikor kullanılır. Bu yöntem ilk olarak 1954 yılında Weller ve Coons tarafından açıklanmıştır ve günümüzde hala popüler bir yöntemdir. Öncelikle primer antikor antijen ile inkübe edilir. Daha sonra primer antikoru tanıyan işaretli sekonder antikor ile inkübasyona devam edilir.

İndirekt ELISA'nın Avantajları;

- Geniş çeşitlilikteki işaretli sekonder antikorlar ticari olarak mevcuttur.
- Çok yönlüdür, birden fazla kullanım alanı vardır. Birçok primer antikor aynı cinste yapılabilir ve aynı işaretli sekonder antikorlar tayin için kullanılabilir.
- Primer antikorun immünoaktivitesi işaretleme ile etkilenmez.
- Her bir primer antikor, işaretli sekonder antikorun bağlandığı çok sayıda epitop içerdiği için hassaslık artmıştır. Böylece sinyal amplifikasyonu sağlanır.
- Aynı primer antikor ile farklı görüntüleme belirteçleri kullanılabilir.

İndirekt ELISA'nın Dezavantajları;

- Sekonder antikorların non-spesifik sinyal ile sonuçlanan çapraz reaksiyonları meydana gelebilir.
- Prosedürde fazladan bir inkübasyon basamağı gereklidir.

2.8.2. COX Enzimi İnhibisyonunun Tayininde Kullanılan Diğer *in vitro* Yöntemler

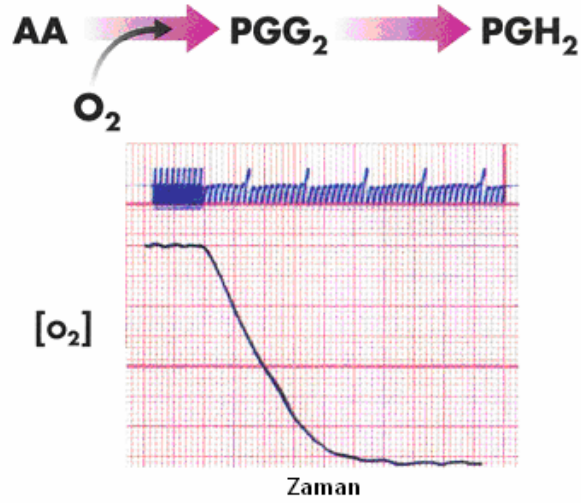
Araşidonik asit metabolitlerinin seviyelerini ölçmek için birçok analitik teknik geliştirilmiştir. İmmüanalizler, gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi ve HPLC yöntemleri bu tekniklerden birkaçıdır.¹¹⁸ Bunlar dışında, COX aktivitesini ölçmek üzere farklı bazı analitik yöntemler de tanımlanmıştır.¹¹⁹

2.8.2.1. Polarografik Yöntem (Oksigraf)¹¹⁹

Polarografi elektrokimyasal bir yöntemdir. Bu yöntem ile siklooksijenaz aktivitesini ölçmek için oksigrafa bağlı bir oksijen elektrodu vasıtasıyla oksijen tüketimi izlenir. Reaksiyon karışımı EDTA, hematin, fenol ve COX içeren Tris tampondan (pH 8,0) oluşur. Reaksiyon araşidonat ile başlatılır ve oksijen tüketim hızı grafik kağıdına çizilir.

Yöntemin avantajları; doğruluğu, sürekliliği ve siklooksijenaz aktivitesini doğrudan ölçmesidir. Detaylı inhibitör/enzim mekanistik çalışmaları için çok uygun bir yöntemdir.

Yüksek işlem hacimli analizler için uygun olmaması, gerekli teçhizatın her laboratuvarda bulunmaması, fazla miktarda enzime ihtiyaç duyulması bu yöntemin dezavantajlarını teşkil eder.



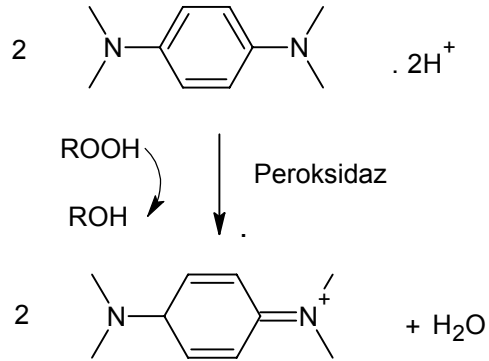
Şekil 7 : Polarografik Yöntem ile Ölçülen Oksijen Tüketim Hızı¹¹⁹

2.8.2.2. Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi¹¹⁹

Siklooksijenazlar, hem siklooksijenaz hem de peroksidaz aktivitesi sergileyen iki fonksiyonlu enzimlerdir. İkinci reaksiyonda, hidroperoksiendoperoksit türevi olan PGG_2 'nin ilgili alkol türevi olan PGH_2 'ye redüksiyonu katalizlenir. Bu reaksiyon, hidroperoksit redüklendiğinde oksitlenen ikinci bir redükleyici substrata ihtiyaç duyar. COX aktivite testlerinde redükleyici olarak kullanılan substrat genellikle fenoldür ancak başka oksitlenebilen aromatik halkalar da bu amaçla kullanılabilir. Seçilen redükleyici substratlar, oksitlendiklerinde UV veya lüminesans ile tayin edilebilen bir kromofor oluştururlar. Bu durum, üç genel yöntem ile siklooksijenazların peroksidaz aktivitesini tayin etmeyi mümkün kılar ;

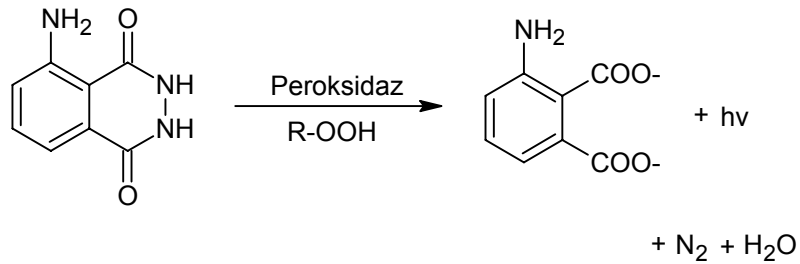
1-Peroksidaz aktivitesinin kolorimetrik tayini, hidrojen peroksit veya araşidonik asit substrat olarak kullanıldığında, N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiaminin (TMPD) oksidasyonunu ölçerek saptanabilir. Reaksiyon karışımı hematin, TMPD ve COX içerir. Reaksiyon substrat (hidrojen peroksit veya araşidonik asit) ile başlatılır ve spektrofotometrede 611 nm'de absorbansta bir artış kaydedilir. Peroksidaz aktivitesi, redüklenen 1 mol hidroperoksite karşılık oksitlenen 2 mol TPMD'nin stokiyometrisine ve $12,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'lik tükenme katsayısına bağlı olarak hesap edilir.

UV/Vis Spektrofotometresi ile ölçülebilmesi yöntemin avantajıdır. Ancak bu yöntem ile siklooksijenaz aktivitesi doğrudan ölçülemez, antioksidanlar analiz sonuçlarını etkileyebilir.



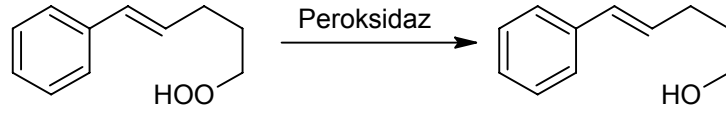
2- Redükleyici substrat olarak lüminol kullanıldığında, siklooksijenazların peroksit aktivitesi lüminesans oluşturur. Reaksiyon hematin, lüminol ve COX içerir, araşidonik asit ile başlatılır. Oluşan lüminesans bir lüminometrede kaydedilir.

Reaksiyon bir deney tüpünde bile yapılabilir ve oldukça hassastır. Bu avantajlara rağmen siklooksijenaz aktivitesi doğrudan ölçülemez, antioksidanlar analiz sonuçlarını etkileyebilir. Ayrıca lüminometreler pahalı aletlerdir, her laboratuvarında bulunmayabilirler.



3- Peroksidaz aktivitesi 5-fenil-4-pentil-hidroperoksitin (PPHP) ilgili alkol olan 5-fenil-4-pentenil alkole (PPA) redüksiyonundan da doğrudan ölçülebilir. Reaksiyon karışımı EDTA, fenol ve COX içeren Tris (pH 8.0) tamponundan oluşur. Reaksiyon PPHP ile başlatılır, 2 dakika inkübe edilir. Daha sonra ortam asitlendirilerek C₁₈ ters-faz kartuşunda PPHP/PPA ekstrakte edilir. Filtre edilen kısım C₁₈ ters faz kolonu ile doğrudan HPLC analizinde kullanılır. 252 nm'de görüntülenir. PPHP ve PPA konsantrasyonları internal standart referansı ile hesaplanır.

Peroksidaz aktivitesini doğrudan ölçmesi ve iç kontroller kullanarak analizi standardize etmesi, yöntemin avantajlarıdır. HPLC aletinin bazı laboratuvarlarda bulunmayışı, yüksek işlem hacimli analizlere uyumlu olmaması, örneklerin saflaştırılma gereklilikleri ve analizin çok hassas olmayışı ise yöntemin başlıca dezavantajlarıdır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Materyal ve Yöntem

3.1.1.1. Kimyasal Bileşikler

Bu çalışmada, sentez başlangıç maddeleri olarak 2-amino-4-klorotiyofenol (Merck), üre (Merck), 2-bromoasetik asit (Merck), tiyobenzamit (Lancaster), 2-klorobenzamit (Aldrich), 4-klorobenzamit (Aldrich), 4-metoksitiyobenzamit (Aldrich), 2-florobenzamit (Aldrich), 4-florobenzamit (Aldrich), fosforpentasülfür (Merck), metalik sodyum (Merck) kullanılmıştır.

Spektral analizlerde potasyum bromür (Merck), dimetilsülfoksit-d₆ (DMSO-d₆) (Aldrich) kullanılmıştır.

Sentezlerde hareket maddesi olarak kullanılan 5-kloro-2-okso-(3*H*)-benzotiyazol, 2-florotiyobenzamit, 2-klorotiyobenzamit, 4-florotiyobenzamit, 4-klorobenzamit, 6-bromoasetil-5-kloro2-okso-(3*H*)-benzotiyazol literatürde kayıtlı yöntemlere göre tarafımızdan sentezlenmiştir.

3.1.1.2. Yöntem

3.1.1.2.1. 5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol

15,95 g (0.1 mol) 2-amino-4-klorotiyofenol ve 12 g (0.2 mol) üre balona alındı. Balonun merkezine Weflon magnet konuldu ve balon mikro dalga reaktörüne yerleştirildi. Balon içeriği, 300 Watt enerjide, 5 dk içinde 130°C'ye getirildi ve sıcaklık 4 dk boyunca 130°C'de sabit tutuldu. Süre sonunda, balon içeriği soğutuldu ve buzlu su içine boşaltıldı. Çöken madde süzüldü, kurutuldu ve asetik asit-su karışımından kristalize edildi. Verim 12 g'dır (% 32.34). Bileşiğin erime noktası 197-205 °C'dir. (Literatür e.n 192 °C)¹²⁰

3.1.1.2.2. 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol

9,275 g (0.05 mol) 5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol ve 8,34 g (0.06 mol) bromoasetik asit balona alındı. Balona 100 ml polifosforik asit (PFA) azar azar ilave edildi ve balon içeriği homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırıldı. Balon mikro dalga reaktörüne yerleştirildi. Balon içeriği, 300 Watt enerjide, 30 dk içinde 145°C'ye getirildi ve 20 dk boyunca aynı sıcaklıkta sabit tutuldu. Süre sonunda, balon içeriği soğutulularak porsiyonlar halinde buzlu su içine boşaltıldı. Çöken madde süzüldü, kurutuldu ve elde edilen bileşik herhangi bir temizleme işlemi yapılmaksızın sonraki basamakta kullanıldı.

3.1.1.2.3. Tiyobenzamit Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri

Uygun benzamit türevi ve fosforpentasülfür (P₂S₅), 100 ml benzen içinde 30 dk boyunca CaCl₂ başlığı takılmış geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Süre sonunda balon içeriği başka bir balona dekante edildi ve benzen rotavaporda kuruluğa kadar uçuruldu. Çöken madde bir behere alınarak aseton-petrol eteri karışımından kristalize edildi.

3.1.1.2.4. 5-kloro-6(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri (Bileşik 1-6)

14 g (0.045 mol) 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol ve 0.0228 mol uygun tiyobenzamit türevi balona alındı. Üzerine 80 ml dietilen glikol dimetil eter (diglim) ilave edildi. Balon 150° C'de 1 saat boyunca ısıtılıp karıştırıldı. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya boşaltıldı. Çöken madde süzüldü, kurutuldu ve bir behere alınarak %10'luk NaOH çözeltisi ile muamele edildi. Çöken katı kısım süzüldü, su içinde homojenize edilerek derişik hidroklorik asit ile asitlendirildi ve çöktürüldü. Ürünler bulgular kısmında açıklandığı şekilde elde edildikten sonra uygun çözücünden kristalize edildi.

3.1.1.2.5. [5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il]asetik asit Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri
(Bileşik 7-12)

0.011 mol metalik sodyum tartılarak balona alındı. Üzerine 40 ml absolü etanol konularak, çözünene kadar oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra balon içeriği rotavaporda kuruluğa kadar uçurularak sodyum etoksit elde edildi. Balon içeriği soğutulduktan sonra üzerine 0.005 mol uygun 5-kloro-6(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol türevi ilave edildi. 50 ml dimetil formamit varlığında balon içeriğinin çözünmesi sağlandı ve üzerine 0.005 mol bromoasetik asit ilave edildi. Balon mikrodalga reaktöründe, geri çeviren soğutucu altında 300 Watt enerjide, 5 dakika içinde 120°C'ye getirildi ve sıcaklık 30 dakika boyunca 120°C'de sabit tutuldu. Süre sonunda, balon içeriği soğutuldu, çöken madde süzülerek bir behere alındı. Su içinde homojenize edilerek, derişik hidroklorik asit ile asitlendirildi ve çöktürüldü. Çöken madde süzüldü, kurutuldu. Ürünler, bulgular kısmında açıklandığı şekilde elde edildikten sonra uygun çözücünden kristalize edildi.

3.2. Analitik Çalışmalar

3.2.1. Erime Derecesi Tayini

Bileşiklerin erime dereceleri Electrothermal 9200 erime derecesi tayini cihazında saptandı.

3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller

3.2.2.1. Materyal

Plaklar: Çalışmamızda Silikajel 60 F254 (Merck, Kat. No: 5554) hazır plakları kullanılmıştır.

Çözücü sistemleri: Bileşiklerin kromatografik özelliklerini saptadığımız çözücü sistemleri aşağıda belirtilmiştir.

- Ç-1: Siklohekzan-Etil asetat (60 : 40)
Ç-2: Benzen-Metanol (90:10)
Ç-3: Metanol-Amonyak (99 : 1)

3.2.2.2. Yöntem

Sürükleme Şartları: Kromotografi kuvvetlerine taze hazırlanmış çözücü sistemleri konulduktan sonra oda sıcaklığında doygunluk sağlandı. Hazır plaklara sentez bileşikleri ile başlangıç maddelerinin uygun çözücüdeki çözeltileri uygulanıp, oda sıcaklığında bildirilen çözücü sistemlerinde sürüklenerek Rf değerleri hesaplandı.

Lekelerin Belirlenmesi: Kromotogramlarda bileşikler ve sentez başlangıç maddelerine ait lekeler UV lambası altında 254 nm ve 366 nm'de, ayrıca Dragendorf belirteci ile belirlendi.

3.2.3. Spektrometrik Kontroller

3.2.3.1. IR Spektrumları

Spektrumlar, potasyum bromür ile 10 ton/cm² basınçta hazırlanan yaklaşık % 1 oranında madde içeren diskler kullanılarak, Bruker Vector 22 IR (Opus Spectroscopic Software Version 2.0) spektrometresinde kaydedildi. Dalga sayısı (cm⁻¹) cinsinden değerlendirildi.

3.2.3.2. ¹H-NMR Spektrumları

Spektrumlar, maddelerin DMSO-d₆ içindeki çözeltilerinden yararlanılarak kayıt edildi. Spektrumların alınmasında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digital FT-NMR spektrometresinden yararlanıldı.

3.2.4. Elementel Analizler

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki CHNS-932 (LECO) Elementel Analiz Cihazında yaptırılmıştır.

3.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.3.1. COX-1 Enzimi İnhibisyonunun Saptanması

COX-1 enziminin *in vitro* inhibitör aktivite testi, Tromboksan B₂ (TxB₂) miktarının ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. COX-1 enzimi, trombositlerden Tromboksan A₂ (TxA₂) salınımını indükler. TxA₂ siklooksijenaz yolağından elde edilen biyolojik olarak aktif bir araşidonik asit metabolitidir ve platelet agregasyonu ile vazokonstrüksiyonda rol alır. Fizyolojik şartlar altında TxA₂'nin yarı ömrü 37 saniyedir. TxA₂ taşıdığı dayanıksız epoksit bağı nedeniyle hızla nonenzimatik olarak kendisinden daha kararlı fakat biyolojik olarak inaktif olan metaboliti TxB₂'ye dönüşür. *in vivo* TxA₂ üretimi, TxB₂ ve 2,3-dinör TxB₂ ölçümü ile saptanır.⁵⁴ Bu nedenle, COX-1 enziminin aktivitesi, oluşan TxB₂ miktarına bağlı olarak değerlendirilir. COX-1 enziminin inhibisyonu arttıkça, oluşan TxB₂ miktarı azalmaktadır.

TxB₂ miktarı kompetitif ELISA yöntemi ile ölçülmektedir. Bu yöntem ile TxB₂'nin kantitatif ölçümü yapılabilmektedir.¹²¹

3.3.1.1. Materyal

Kan: Çalışmamızda son bir hafta içerisinde nonsteroidal antienflamatuvar ilaç almamış, gönüllü ve sağlıklı kişiden antikoagülan içermeyen tüplere kan alınmıştır.

Enzim Kiti: Çalışmamızda Assay Designs Correlate-EIA™ Thromboxane B₂ Enzyme Immunoassay Kit (Katalog No: 900-002) (96 Kuyucuklu) kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan materyal aşağıda belirtilmiştir.

- Keçi anti-Tavşan IgG Mikrotitre Tabla, 96 kuyucuklu, Katalog No: 80-0060 (Tavşan IgG'inin Fc kısmına spesifik, keçi antikoru ile kaplanmış kırılıp ayrılabilen şeritli tabla)

-TxB₂ EIA Konjugatı, 6 ml, Katalog No: 80-0005 (TxB₂ ile konjuge edilmiş mavi renkli alkalın fosfataz çözeltisi)

- TxB₂ EIA Antikoru, 6 ml, Katalog No: 80-0006 (TxB₂'ye karşı sarı renkli tavşan poliklonal antikor çözeltisi)

-Analiz Tamponu, 30 ml, Katalog No: 80-0010 (Koruyucu olarak proteinler ve sodyum azid içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi)

-Konsantre Yıkama Tamponu, 30 ml, Katalog No: 80-1286 (Deterjan içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi)

-Tromboksan B₂ Standartı, 0.5 ml, Katalog No: 80-0007 (TxB₂'nin 100,000 pg/mL'lik çözeltisi)

-pNpp Substratı, 20 ml, Katalog No: 80-0075 (Tampon içinde p-nitrofenil fosfat çözeltisi)

-Durdurma Çözeltisi, 5 ml, Katalog No: 80-0247 (Su içinde trisodyum fosfat çözeltisi)

-TxB₂ Test Plan Sayfası, 1 adet, Katalog No: 30-0003

3.3.1.2. Yöntem

3.3.1.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Tez çalışmamız kapsamında sentez edilen bileşiklerin DMSO içinde 5,11 mM konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Son bir hafta içerisinde nonsteroidal antienflamatuvar ilaç almamış, gönüllü ve sağlıklı kişiden antikoagülan içermeyen tüplere alınan kandan her bir ependorf tüpüne 500 µl aktarılmıştır. Üzerine bileşiklerin stok çözeltisinden 1 µl eklenerek karıştırılmış ve örnekler 1 saat boyunca 37 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda numuneler buza alınmış ve 4 °C'de 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar analiz tamponu ile uygun konsantrasyona dilüe edilmiştir.

3.3.1.2.2. Reajanların Hazırlanması

3.3.1.2.2.1. TxB₂ Standartlarının Hazırlanması

100,000 pg/ml konsantrasyondaki TxB₂ standart çözeltisi oda sıcaklığına getirilir. 7 adet epondorf tüpü hazırlanarak, analiz tamponundan 1. tüpe 900 µl, diğer 6 tüpe ise 666 µl konulur. 100,000 pg/ml konsantrasyondaki TxB₂ standart çözeltisinden 1. tüpe 100 µl ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. 1. tüpten 333 µl çözelti alınarak 2. tüpe ilave edilir. 2. tüp de vorteks ile karıştırılır. Bu şekilde her defasında bir önceki tüpten 333 µl çözelti alınarak bir sonraki tüpe ilave edilir ve tüpler vorteks ile karıştırılır. Böylece tüplerdeki TxB₂ konsantrasyonu 1. tüpten 7. tüpe doğru sırasıyla 10,000, 3,333, 1,111, 370, 123, 41.1 ve 13.7 pg/ml olması sağlanır.

3.3.1.2.2.2. Yıkama Tamponunun Hazırlanması

Kit içerisinde bulunan konsantre yıkama tamponundan 5 ml alınarak, 95 ml deiyonize su ile seyreltilir. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 3 ay boyunca saklanabilir.

3.3.1.2.3. Analiz Prosedürü

Reajanlar kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Tüm standart ve örnekler çift çalışılmıştır.

İşlem basamakları aşağıdaki gibidir ;

1-Analiz plan sayfası kullanılarak örneklere ait kuyucukların yerleri belirlenir.

Tablo 8 : TxB₂ Test Plan Sayfası

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kör	St 1	St 5	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
B	SC	St 1	St 5	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
C	SC	St 2	St 6	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
D	TA	St 2	St 6	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
E	NSB	St 3	St 7	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
F	NSB	St 3	St 7	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
G	Bo	St 4	Kan	Kan'	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
H	Bo	St 4	Kan	Kan'	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.

TA: Total Aktivite

NSB: Spesifik Olmayan Bağlanma

Bo: En Fazla Bağlanma

SC: Referans olarak Kullanılan Güçlü COX-1 İnhibitörü İlaç

2- NSB ve Bo (0 pg/ml standart) kuyucuklarına 100 µl analiz tamponu ilave edilir.

3- Standart kuyucuklarına ilgili tüplerden 100 µl standart eklenir.

4- Uygun kuyucuklara örneklerden 100 µl eklenir.

5- NSB kuyucuklarına 50 µl analiz tamponu ilave edilir.

6- Total Aktivite (TA) ve Kör kuyucukları dışındaki her kuyucuğa 50 µl mavi konjugat eklenir.

7- Kör, TA ve NSB kuyucukları dışındaki her kuyucuğa 50 µl sarı antikor ilave edilir.

Bu işlemlerden sonra, Kör ve TA kuyucukları boş oldukları için renksiz, NSB kuyucukları mavi, kullanılan bütün diğer kuyucuklar ise yeşil renkte olacaktır.

8- Plak, oda sıcaklığında 2 saat boyunca 500 rpm'de çalkalayıcıda çalkalanır.

9- Süre sonunda her kuyucuk 400 µl yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkanır.

10- Son yıkamadan sonra, kalan yıkama çözeltisi bir kağıt havlu ile uzaklaştırılır.

11- TA kuyucuklarına 5 µl mavi konjugat eklenir.

12- Her kuyucuğa 200 µl pNpp substrat çözeltisi eklenir. Plak oda sıcaklığında 45 dk boyunca çalkalamadan bekletilir.

13- Süre sonunda her kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi ilave edilir ve kuyucukların absorbansı 405 nm’de ölçülür.

3.3.1.2.4. Sonuçların Hesaplanması

1- Her bir standart ve örnek için optik yoğunluklarının (OD) ortalaması hesaplanır. Bu ortalamalardan NSB kuyucuklarının optik yoğunluk ortalamaları çıkartılır. Böylece ortalama net optik yoğunluk bulunmuş olur.

Ortalama Net OD= Standart veya Örneklerin OD Ortalamaları- NSB OD Ortalaması

2- Yüzde bağlanma hesabı için, her bir standart kuyucuk için bulunan Net Ortalama Yoğunluk Değeri, maksimum bağlanma kuyucukları olan Bo’nun Net Ortalama Yoğunluk Değerine bölünür ve sonuç 100 ile çarpılır.

% Bağlanma = (Net OD/ Net Bo OD) x 100

3- Sigma Plot programı kullanılarak, standartların TxB_2 konsantrasyonlarına karşı yüzde bağlanmalarını gösteren logaritmik bir eğri çizilir. Bu eğriden yararlanarak örneklerin TxB_2 konsantrasyonu saptanır.

4- Kandaki TxB_2 konsantrasyonu ile örneklerin TxB_2 konsantrasyonu birbirine oranlandığında, örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplanabilir.

% İnhibisyon = $\frac{(Kan\ TxB_2\ konsantrasyonu - Örnek\ TxB_2\ konsantrasyonu)}{Kan\ TxB_2\ konsantrasyonu} \times 100$

3.3.2. COX-2 Enzimi İnhibisyonunun Saptanması

COX-2 enziminin *in vitro* inhibitör aktivite testi, Prostaglandin E₂ (PGE₂) miktarının ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Lipopolisakkarit (LPS) gibi bir indükleyici ajan varlığında, kandaki monositlerden COX-2 enzimi aracılığı ile, PGE₂ sentezlenir. PGE₂, siklooksijenaz yolağından elde edilen biyolojik olarak aktif bir araşidonik asit metabolitidir. Vazodilatasyonda rol alır, anti ve pro-inflamatuvar etki gösterir. cAMP seviyelerini düzenler, kemik rezorpsiyonunu indükler ve termaregülatör etkiye sahiptir.¹²¹

COX-2 enziminin aktivitesi, oluşan PGE₂ miktarına bağlı olarak değerlendirilir. COX-2 enziminin inhibisyonu arttıkça, oluşan PGE₂ miktarı azalmaktadır.

PGE₂ miktarı kompetitif ELISA yöntemi ile ölçülmektedir. Bu yöntem ile PGE₂'nin kantitatif ölçümü yapılabilmektedir.¹²²

3.3.2.1. Materyal

Kan: Çalışmamızda son bir hafta içerisinde nonsteroidal antienflamatuvar ilaç almamış, gönüllü ve sağlıklı kişiden heparinli tüplere kan alınmıştır.

Enzim Kiti: Çalışmamızda Assay Designs Correlate-EIA™ Prostaglandin E₂ Enzyme Immunoassay Kit (Katalog No: 900-001) (96 Kuyucuklu) kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan materyal aşağıda belirtilmiştir.

- Keçi anti-Fare IgG Mikrotitre Tabla, 96 kuyucuklu, Katalog No: 80-0050 (Fare IgG'ine spesifik, keçi antikoru ile kaplanmış kırılıp ayrılabilen şeritli tabla)

-PGE₂ EIA Konjugatı, 6 ml, Katalog No: 80-0002 (PGE₂ ile konjuge edilmiş mavi renkli alkalın fosfataz çözeltisi)

- PGE₂ EIA Antikoru, 6 ml, Katalog No: 80-0003 (PGE₂'ye karşı sarı renkli monoklonal antikor çözeltisi)

-Analiz Tamponu, 30 ml, Katalog No: 80-0010 (Koruyucu olarak proteinler ve sodyum azid içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi)

-Konsantre Yıkama Tamponu, 30 ml, Katalog No: 80-1286 (Deterjan içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi)

-Prostaglandin E₂ Standartı, 0.5 ml, Katalog No: 80-0004 (PGE₂'nin 50,000 pg/mL'lik çözeltisi)

-pNpp Substratı, 20 ml, Katalog No: 80-0075 (Tampon içinde p-nitrofenil fosfat çözeltisi)

-Durdurma Çözeltisi, 5 ml, Katalog No: 80-0247 (Su içinde trisodyum fosfat çözeltisi)

-PGE₂ Test Plan Sayfası, 1 adet, Katalog No: 30-0002

3.3.2.2. Yöntem

3.3.2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Tez çalışmamız kapsamında sentez edilen bileşiklerin DMSO içinde 5,11 mM konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Son bir hafta içerisinde nonsteroidal antienflamatuvar ilaç almamış, gönüllü ve sağlıklı kişiden heparinli tüplere alınan kandan her bir epondorf tüpüne 500 µl aktarılmıştır. Üzerine 0.51 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış olan stok lipopolisakkarit (LPS) çözeltisinden 10 µl ve bileşiklerin stok çözeltisinden 1 µl eklenerek karıştırılmış ve örnekler 24 saat boyunca 37 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda numuneler buza alınmış ve 4 °C'de 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar, kite ait analiz tamponu ile uygun konsantrasyona dilüe edilmiştir.

3.3.2.2.2. Reajanların Hazırlanması

3.3.2.2.2.1. PGE₂ Standartlarının Hazırlanması

50,000 pg/ml konsantrasyondaki PGE₂ standart çözeltisi oda sıcaklığına getirilir. 7 adet epondorf tüpü hazırlanarak, analiz tamponundan 1. tüpe 995 µl, diğer 6 tüpe ise 500 µl konulur. 50,000 pg/ml

konsantrasyondaki PGE₂ standart çözeltisinden 1. tüpe 50 µl ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. 1. tüpten 500 µl çözelti alınarak 2. tüpe ilave edilir. 2. tüp de vorteks ile karıştırılır. Bu şekilde her defasında bir önceki tüpten 500 µl çözelti alınarak bir sonraki tüpe ilave edilir ve tüpler vorteks ile karıştırılır. Böylece tüplerdeki TxB₂ konsantrasyonu 1. tüpten 7. tüpe doğru sırasıyla 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1 ve 39.1 pg/ml olması sağlanır.

3.3.2.2.2. Yıkama Tamponunun Hazırlanması

Kit içerisinde bulunan konsantre yıkama tamponundan 5 ml alınarak, 95 ml deiyonize su ile seyreltilir. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 3 ay boyunca saklanabilir.

3.3.2.2.3. Analiz Prosedürü

Reajanlar kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Tüm standart ve örnekler çift çalışılmıştır.

İşlem basamakları aşağıdaki gibidir ;

1-Analiz plan sayfası kullanılarak örneklerle ait kuyucukların yerleri belirlenir.

Tablo 9 : PGE₂ Test Plan Sayfası

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kör	St 1	St 5	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
B	Dup	St 1	St 5	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
C	Dup	St 2	St 6	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
D	TA	St 2	St 6	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
E	NSB	St 3	St 7	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
F	NSB	St 3	St 7	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
G	Bo	St 4	Kan	Kan'	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.
H	Bo	St 4	Kan	Kan'	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.	Ör.

TA: Total Aktivite,

NSB: Spesifik Olmayan Bağlanma,

Bo: En Fazla Bağlanma

Dup: Referans olarak Kullanılan Güçlü COX-2 İnhibitörü İlaç

2- NSB ve Bo (0 pg/ml standart) kuyucuklarına 100 µl analiz tamponu ilave edilir.

3- Standart kuyucuklarına ilgili tüplerden 100 µl standart eklenir.

4- Uygun kuyucuklara örneklerden 100 µl eklenir.

5- NSB kuyucuklarına 50 µl analiz tamponu ilave edilir.

6- Total Aktivite (TA) ve Kör kuyucukları dışındaki her kuyucuğa 50 µl mavi konjugat eklenir.

7- Kör, TA ve NSB kuyucukları dışındaki her kuyucuğa 50 µl sarı antikor ilave edilir.

Bu işlemlerden sonra, Kör ve TA kuyucukları boş oldukları için renksiz, NSB kuyucukları mavi, kullanılan bütün diğer kuyucuklar ise yeşil renkte olacaktır.

8- Plak, oda sıcaklığında 2 saat boyunca 500 rpm'de çalkalayıcıda çalkalanır.

9- Süre sonunda her kuyucuk 400 µl yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkanır.

10- Son yıkamadan sonra, kalan yıkama çözeltisi bir peçete ile uzaklaştırılır.

11- TA kuyucuklarına 5 µl mavi konjugat eklenir.

12- Her kuyucuğa 200 µl pNpp substrat çözeltisi eklenir. Plak oda sıcaklığında 45 dk boyunca çalkalamadan bekletilir.

13- Süre sonunda her kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi ilave edilir ve kuyucukların absorbanı 405 nm'de okunur.

3.3.2.2.4. Sonuçların Hesaplanması

1- Her bir standart ve örnek için optik yoğunluklarının (OD) ortalaması hesaplanır. Bu ortalamalardan NSB kuyucuklarının optik yoğunluk ortalamaları çıkartılır. Böylece ortalama net optik yoğunluk bulunmuş olur.

Ortalama Net OD= Standart veya Örneklerin OD Ortalamaları- NSB OD Ortalaması

2- Yüzde bağlanma hesabı için, her bir standart kuyucuk için bulunan Net Ortalama Yoğunluk Değeri, maksimum bağlanma kuyucukları olan Bo'nun Net Ortalama Yoğunluk Değerine bölünür ve sonuç 100 ile çarpılır.

$$\% \text{Bağlanma} = (\text{Net OD} / \text{Net Bo OD}) \times 100$$

3- Sigma Plot programı kullanılarak, standartların PGE₂ konsantrasyonlarına karşı yüzde bağlanmalarını gösteren logaritmik bir eğri çizilir. Bu eğriden yararlanarak örneklerin PGE₂ konsantrasyonu saptanır.

4- Kandaki PGE₂ konsantrasyonu ile örneklerin PGE₂ konsantrasyonu birbirine oranlandığında, örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplanabilir.

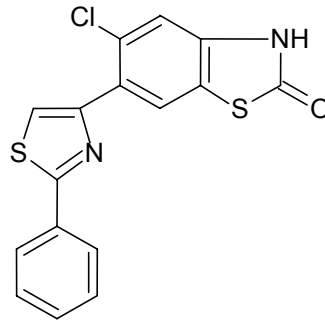
$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{(\text{Kan PGE}_2 \text{ konsantrasyonu} - \text{Örnek PGE}_2 \text{ konsantrasyonu})}{\text{Kan PGE}_2 \text{ konsantrasyonu}} \times 100$$

4. BULGULAR

4.1. Kimyasal Çalışmalar

4.1.1. 5-kloro-6-[(2-fenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol

(Bileşik 1)



14 g (0.04567 mol) 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol ve 3.12 g (0.02277 mol) tiyobenzamitten dietilen glikol dimetil eter içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Çöken madde süzüldü, kurutuldu. Etanolden kristalize edildi. Verim 3 g'dır. (%19)

Bileşiğin erime noktası 285 °C 'dir. Suda, asetonitrilde çözünmez; aseton, dimetil formamit, dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-1, Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.44, 0.72 ve 0.84'tür.

IR spektrumunda (KBr), 3132 (N-H gerilim, laktam, zayıf), 3071 (C-H gerilim, aromatik, zayıf), 1679 (C=O gerilim, laktam, güçlü), 1601 (C=C gerilim, aromatik) cm⁻¹'de bandlar görülür.

¹H-NMR spektrumunda (DMSO-d₆), δ 12.13 (s, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, H⁷), 8.07 (s, 1H, tiyazol-H), 8.01-7.98 (m, 2H, fenil-H², H⁶), 7.51-7.49 (m, 3H, fenil-H³, H⁴, H⁵), 7.23 (s, 1H, H⁴) ppm'de pikler görülür.

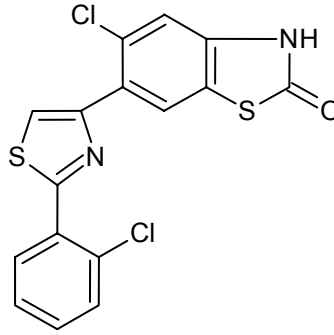
Elementel analiz

C₁₆H₉ClN₂OS₂ (M.A.= 344.83) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	55.73	2.63	18.60	8.12
Bulunan	55.96	2.76	18.51	8.26

4.1.2. 5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol

(Bileşik 2)



11 g (0.03588 mol) 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol ve 3.07 g (0.01790 mol) 2-klorotiyobenzamitten dietilen glikol dimetil eter içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Çöken madde süzüldü, kurutuldu. Etanolden kristalize edildi. Verim 1,9 g'dır. (%14.00)

Bileşiğin erime noktası 264 °C 'dir. Suda, asetonitril ve metanolde çözünmez; aseton, dimetil formamit, dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-1, Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.39, 0.73 ve 0.83'tür.

IR spektrumunda 3421 (N-H gerilim, laktam, zayıf), 3139 (C-H gerilimi, aromatik, zayıf), 1703 (C=O gerilim, laktam, güçlü), 1605 (C=C gerilimi, aromatik, zayıf) cm^{-1} 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (DMSO-d_6) δ 12.12 (s, 1H, NH), 8.30-8.27 (m, 1H, fenil- H^4), 8.23 (s, 1H, H^7), 8.21 (s, 1H, tiyazol-H), 7.66-7.63 (m, 1H, fenil- H^6), 7.51- 7.49 (m, 2H, fenil- H^3 , H^5), 7.23 (s, 1H, H^4) ppm'de pikler görülür.

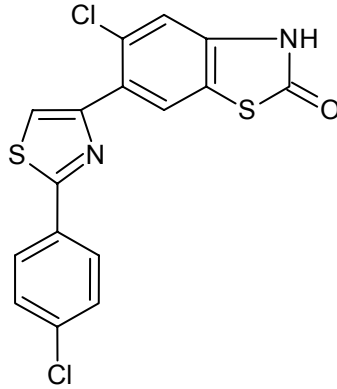
Elementel analiz

$C_{16}H_8Cl_2N_2OS_2$ (M.A.= 379.28) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	50.67	2.13	16.91	7.39
Bulunan	50.89	2.21	16.96	7.56

4.1.3. 5-kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol

(Bileşik 3)



14 g (0.04567 mol) 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol ve 3.91 g (0.0228 mol) 4-klorotiyobenzamitten dietilen glikol dimetil eter içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Çöken madde süzüldü, kurutuldu. Etanolden kristalize edildi. Verim 2.4 g'dır. (%14)

Bileşiğin erime noktası 308 °C 'dir. Suda çözünmez; aseton, dimetil formamit, dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-1, Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.37, 0.70 ve 0.85'tir.

IR spektrumunda 3134 (N-H gerilim, laktam, zayıf), 3064 (C-H gerilimi, aromatik, zayıf), 1680(C=O gerilim, laktam, güçlü), 1601 (C=C gerilimi, aromatik, zayıf) cm⁻¹ de bandlar görülür.

¹H-NMR spektrumunda (DMSO-d₆) δ 8.19 (s, 1H, H⁷), 8.10 (s, 1H, tiyazol-H), 8.03-8.01 (m, 2H, fenil-H², H⁶), 7.58- 7.56 (m, 2H, fenil-H³, H⁵), 7.23 (s, 1H, H⁴) ppm'de pikler görülür.

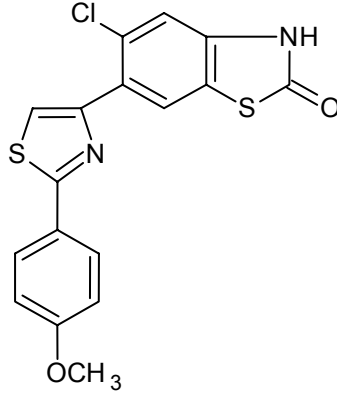
Elementel analiz

$C_{16}H_8Cl_2N_2OS_2$ (M.A.= 379.28) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	50.67	2.13	16.91	7.39
Bulunan	50.33	2.25	16.71	7.30

4.1.4. 5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol

(Bileşik 4)



14 g (0.04567 mol) 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol ve 3.80 g (0.0228 mol) 4-metoksitiyobenzamitten dietilen glikol dimetil eter içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Çöken madde süzüldü, kurutuldu. İzopropil alkolden kristalize edildi. Verim 2.8 g'dır. (%17)

Bileşiğin erime noktası 257 °C 'dir. Suda, etanolde, metanolde çözünmez; aseton, dimetil formamit, dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-1, Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.28, 0.68 ve 0.77'dir.

IR spektrumunda 3150 (N-H gerilim, laktam, zayıf), 2972 (C-H gerilimi, alifatik, zayıf), 1701 (C=O gerilim, laktam, güçlü), 1605 (C=C gerilim, aromatik, zayıf) cm⁻¹'de bandlar görülür.

¹H-NMR spektrumunda (DMSO-d₆) δ 12.11 (s, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, H⁷), 7.97 (s, 1H, tiyazol-H), 7.94-7.92 (m, 2H, fenil-H², H⁶), 7.22 (s, 1H, H⁴) 7.06- 7.03 (m, 2H, fenil-H³, H⁵), 3.81 (s, 3H, OCH₃) ppm'de pikler görülür.

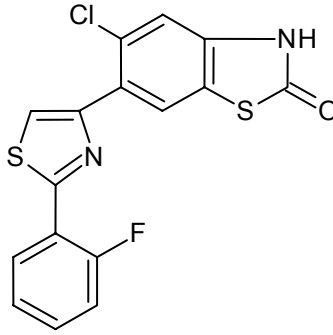
Elementel analiz

$C_{17}H_{11}ClN_2O_2S_2$ (M.A.= 374.86) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	54.47	2.96	17.11	7.47
Bulunan	54.49	3.05	17.19	7.64

4.1.5. 5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol

(Bileşik 5)



14 g (0.04567 mol) 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol ve 3.534 g (0.0228 mol) 2-florotiyobenzamitten dietilen glikol dimetil eter içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Çöken madde süzüldü, kurutuldu. İzopropil alkolden kristalize edildi. Verim 3.5 g'dır. (%21)

Bileşiğin erime noktası 262 °C 'dir. Suda, etanolde, metanolde çözünmez; aseton, dimetil formamit, dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-1, Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.35, 0.71 ve 0.83'tür.

IR spektrumunda 3458 (N-H gerilim, laktam, zayıf), 3070 (C-H gerilimi, aromatik, zayıf), 1713 (C=O gerilim, laktam, güçlü), 1607 (C=C gerilim, aromatik, zayıf) cm⁻¹'de bandlar görülür.

¹H-NMR spektrumunda (DMSO-d₆) δ 12.15 (s, 1H, NH), 8.34-8.30 (t, 1H, fenil-H⁴), 8.23 (s, 1H, H⁷), 8.20 (s, 1H, tiyazol-H), 7.58-7.52 (m, 1H, fenil-H⁶), 7.46-7.35 (m, 2H, fenil-H³, H⁵) 7.23 (s, 1H, H⁴) ppm'de pikler görülür.

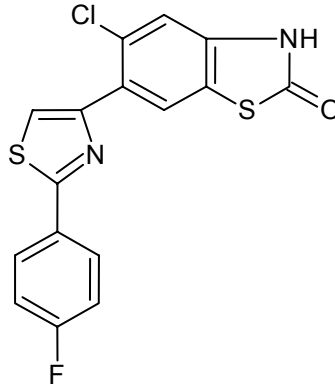
Elementel analiz

$C_{16}H_8ClFN_2OS_2$ (M.A.= 362.82) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	52.96	2.22	17.67	7.72
Bulunan	53.18	2.42	17.61	7.83

4.1.6. 5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol

(Bileşik 6)



14 g (0.04567 mol) 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol ve 3.534 g (0.0228 mol) 4-florotiyobenzamitten dietilen glikol dimetil eter içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Çöken madde süzüldü, kurutuldu. Etanolden kristalize edildi. Verim 2.4 g'dır. (%15)

Bileşiğin erime noktası 305 °C 'dir. Suda, metanol, izopropil alkolde çözünmez; aseton, dimetil formamit, dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-1, Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0,36, 0.69 ve 0.82'dir.

IR spektrumunda 3132 (N-H gerilim, laktam, zayıf), 3063 (C-H gerilimi, aromatik, zayıf), 1683 (C=O gerilim, laktam, güçlü), 1602 (C=C gerilimi, aromatik, zayıf) cm⁻¹ de bandlar görülür.

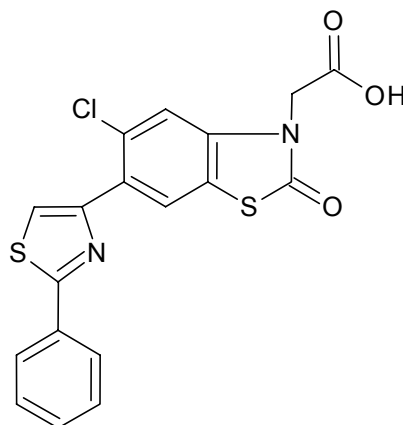
¹H-NMR spektrumunda (DMSO-d₆) δ 12.10 (s, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, H⁷), 8.06-8.03 (m, 3H, tiyazol-H, fenil-H², H⁶), 7.36- 7.32 (t, 2H, fenil-H³, H⁵), 7.22 (s, 1H, H⁴) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$C_{16}H_8ClFN_2OS_2$ (M.A.= 362.82) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	52.96	2.22	17.67	7.72
Bulunan	52.99	2.36	17.51	7.70

4.1.7. [5-kloro-6-[(2-fenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit (Bileşik 7)



2 g (0.00579 mol) 5-kloro-6-[(2-fenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol ve 0.80 g (0.00579 mol) bromoasetik asitten sodyum etoksit varlığında dimetil formamit içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Metanolden kristalize edildi. Verim 0.3 g'dır. (%13)

Bileşiğin erime noktası 244 °C 'dir. Suda, etanolde çözünmez; dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.12 ve 0.88'dir.

IR spektrumunda 3600-2550 (-OH gerilimi, karboksilik asit, yayvan), 3064 (C-H gerilimi, aromatik, zayıf), 2979 (C-H gerilimi, alifatik, zayıf), 1732 (C=O gerilim, alifatik karboksilik asit, güçlü), 1660 (C=O gerilim, laktam, güçlü) cm⁻¹ de bandlar görülür.

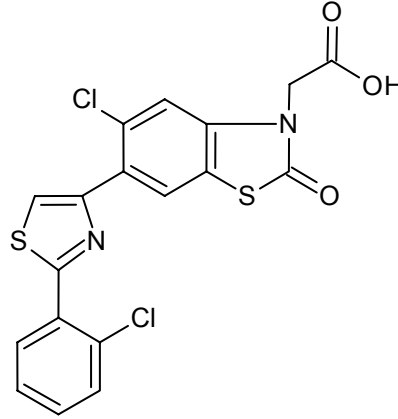
¹H-NMR spektrumunda (DMSO-d₆), δ 8.41 (s, 1H, H⁷), 8.21 (s, 1H, tiyazol-H), 8.11-8.09 (m, 2H, fenil-H², H⁶), 7.79 (s, 1H, H⁴), 7.61-7.60 (m, 3H, fenil-H³, H⁴, H⁵), 4.89 (s, 2H, CH₂) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$C_{18}H_{11}ClN_2O_3S_2$ (M.A.= 402.87) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	53.66	2.75	15.92	6.95
Bulunan	53.11	3.03	15.68	7.03

4.1.8. [5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit (Bileşik 8)



1.730 g (0.00456 mol) 5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol ve 0.6255 g (0.00456 mol) bromoasetik asitten sodyum etoksit varlığında dimetil formamit içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Asetik asitten kristalize edildi. Verim 0.43 g'dır. (%22)

Bileşiğin erime noktası 252 °C 'dir. Suda, etanolde, metanolde çözünmez; dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.10 ve 0.87'dir.

IR spektrumunda 3300-2800 (OH gerilimi, karboksilik asit, yayvan), 3074 (C-H gerilimi, aromatik, zayıf), 1737 (C=O gerilim, alifatik karboksilik asit, güçlü), 1629 (C=O gerilim, laktam, güçlü) cm^{-1} 'de bandlar görülür.

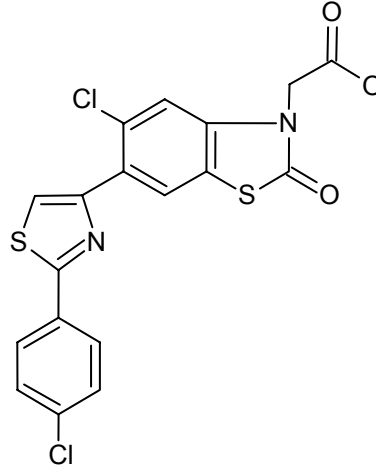
$^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8.32 (s, 1H, H^7), 8.31-8.29 (m, 1H, fenil- H^4), 8.27 (s, 1H, tiyazol-H), 7.70 (s, 1H, H^4), 7.66-7.64 (m, 1H, fenil- H^6), 7.52- 7.49 (m, 2H, fenil- H^3 , H^5), δ 4,79 (s, 2H, CH_2) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$C_{18}H_{10}Cl_2N_2O_3S_2$ (M.A.= 437.31) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	49.44	2.30	14.66	6.41
Bulunan	49.57	2.41	14.62	6.52

4.1.9. [5-kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit (Bileşik 9)



1.54 g (0.0040 mol) 5-kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol ve 0.556 g (0.0040 mol) bromoasetik asitten sodyum etoksit varlığında dimetil formamit içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Asetik asitten kristalize edildi. Verim 0.245 g'dır. (%14)

Bileşiğin erime noktası 282 °C 'dir. Suda, etanolde, metanolde çözünmez; dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.13 ve 0.89'dur.

IR spektrumunda 3620-2480 (-OH gerilimi, karboksilik asit, yayvan), 3148 (C-H gerilimi, aromatik, orta), 2933 (C-H gerilimi, alifatik, zayıf), 1746 (C=O gerilim, alifatik karboksilik asit, güçlü), 1650 (C=O gerilim, laktam, güçlü), 1567 (C=C gerilim, aromatik, zayıf) cm^{-1} 'de bandlar görülür.

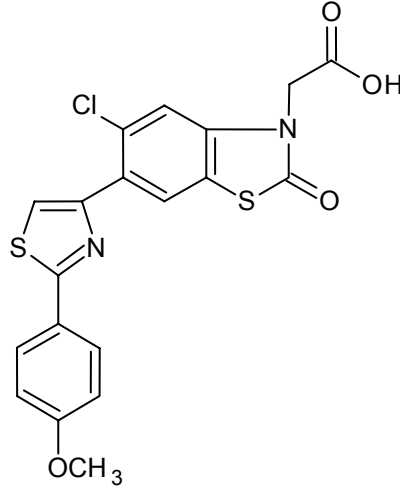
$^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8.30 (s, 1H, H^7), 8.14 (s, 1H, tiyazol-H), 8.03-8.01 (m, 2H, fenil- H^2 , H^6), 7.69 (s, 1H, H^4), 7.58-7.56 (m, 2H, fenil- H^3 , H^5), 4.78 (s, 1H, CH_2) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$C_{18}H_{10}Cl_2N_2O_3S_2$ (M.A.= 437.31) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	49.44	2.30	14.66	6.41
Bulunan	49.49	2.51	14.58	6.51

4.1.10. [5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit (Bileşik 10)



2 g (0.0053 mol) 5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol ve 0.73 g (0.0053 mol) bromoasetik asitten sodyum etoksit varlığında dimetil formamit içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Metanolden kristalize edildi. Verim 0.210 g'dır. (% 9)

Bileşiğin erime noktası 207 °C 'dir. Suda, etanolde çözünmez; dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.13 ve 0.87'dir.

IR spektrumunda 3320-2400 (-OH gerilimi, karboksilik asit, yayvan), 3003 (C-H gerilimi, aromatik, orta), 2962 (C-H gerilimi, alifatik, zayıf), 1721 (C=O gerilim, alifatik karboksilik asit, güçlü), 1696 (C=O gerilim, laktam, güçlü), 1608 (C=C gerilim, aromatik, orta şiddetli) cm⁻¹'de bandlar görülür.

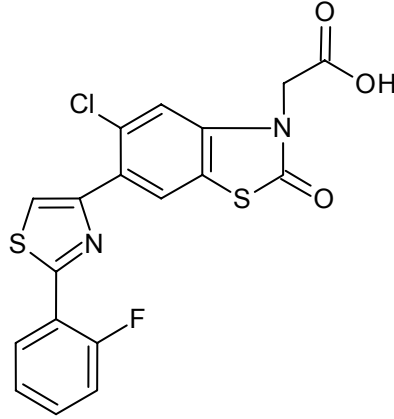
¹H-NMR spektrumunda (DMSO-d₆) δ 8.30 (s, 1H, H⁷), 8.01 (s, 1H, tiyazol-H), 7.95-7.93 (m, 2H, fenil-H², H⁶), 7.69 (s, 1H, H⁴) 7.06-7.04 (m, 2H, fenil-H³, H⁵), 4.78 (s, 2H, CH₂), 3.81 (s, 3H, OCH₃) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$C_{19}H_{13}ClN_2O_4S_2$ (M.A.= 432.90) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	52.71	3.03	14.81	6.47
Bulunan	53.00	3.22	14.77	6.60

4.1.11. [5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]- 2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit (Bileşik 11)



2.5 g (0.0068 mol) 5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol ve 0.944 g (0.0068 mol) bromoasetik asitten sodyum etoksit varlığında dimetil formamit içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Metanolden kristalize edildi. Verim 0.240 g'dır. (% 8)

Bileşiğin erime noktası 249 °C 'dir. Suda, etanolde çözünmez; dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.14 ve 0.88'dir.

IR spektrumunda 3340-2500 (-OH gerilimi, karboksilik asit, yayvan), 3071 (C-H gerilimi, aromatik, zayıf), 1719 (C=O gerilim, alifatik karboksilik asit, güçlü), 1672 (C=O gerilim, laktam, güçlü), 1602 (C=C gerilim, aromatik, zayıf) cm^{-1} 'de bandlar görülür.

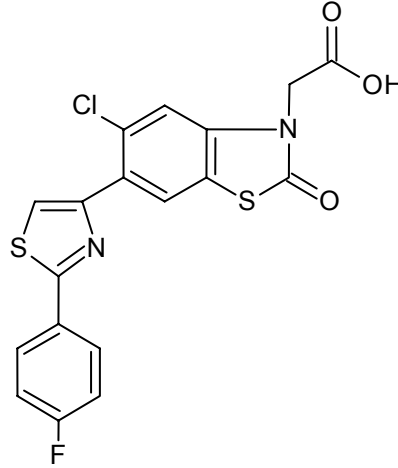
$^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8,37 (s, 1H, H^7), 8.36-8.34 (m, 1H, fenil- H^4), 8.27 (s, 1H, tiyazol-H), 7.73 (s, 1H, H^4), 7.61-7.55 (m, 1H, fenil- H^6), 7.49-7.38 (m, 2H, fenil- H^3 , H^5), 4.81 (s, 2H, CH_2) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{ClFN}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (M.A.= 420.86) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	51.37	2.39	15.24	6.66
Bulunan	51.57	2.50	15.31	6.83

4.1.12. [5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]- 2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit (Bileşik 12)



2 g (0.0055 mol) 5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol ve 0.764 g (0.0055 mol) bromoasetik asitten sodyum etoksit varlığında dimetil formamit içinde genel sentez yöntemi ile elde edildi. Metanolden kristalize edildi. Verim 0.340 g'dır. (%15)

Bileşiğin erime noktası 271 °C 'dir. Suda, etanolde çözünmez; dimetil sülfoksitte çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde R_f değerleri sırasıyla 0.11 ve 0.85'tir.

IR spektrumunda 3700-2750 (-OH gerilimi, karboksilik asit, yayvan), 3135 (C-H gerilimi, aromatik, zayıf), 1729 (C=O gerilim, alifatik karboksilik asit, güçlü), 1690 (C=O gerilim, laktam, güçlü), 1599 (C=C gerilimi, aromatik, zayıf) cm^{-1} 'de bandlar görülür.

^1H -NMR spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8.31 (s, 1H, H^7), 8.10 (s, 1H, tiyazol-H), 8.07-8.04 (m, 2H, fenil- H^2 , H^6), 7.69 (s, 1H, H^4), 7.37-7.33 (t, 2H, fenil- H^3 , H^5), 4.78 (s, 2H, CH_2) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

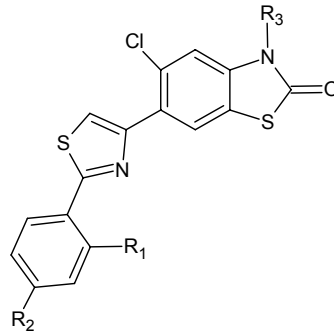
$C_{18}H_{10}ClFN_2O_3S_2$ (M.A.= 420.86) için:

	%C	%H	%S	%N
Hesaplanan	51.37	2.39	15.24	6.66
Bulunan	51.26	2.50	15.14	6.66

4.2. Biyolojik Aktivite Çalışması

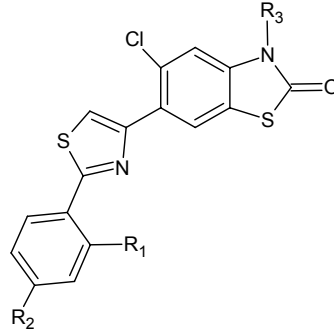
Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 inhibitör aktivite sonuçları Tablo 10'da, COX-2 inhibitör aktivite sonuçları ise Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 10 : Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 inhibitör aktivite testi sonuçları



Bileşik No	R ₁	R ₂	R ₃	% B/B ₀	TxB ₂ pg/ml	% COX-1 İnhibisyonu
1	H	H	H	5,581	6681	15,05
2	Cl	H	H	4,969	7790	2,69
3	H	Cl	H	5,084	7657	8,23
4	H	OCH ₃	H	5,199	7354	8,23
5	F	H	H	5,619	6599	16,09
6	H	F	H	5,389	6942	11,73
7	H	H	CH ₂ COOH	4,663	8645	1,65
8	Cl	H	CH ₂ COOH	5,772	6270	20,27
9	H	Cl	CH ₂ COOH	5,198	7309	7,07
10	H	OCH ₃	CH ₂ COOH	6,078	5995	23,77
11	F	H	CH ₂ COOH	5,504	6820	13,29
12	H	F	CH ₂ COOH	4,855	8069	1,65
SC-558				98,28	0	100
KAN				4,931	7865	0

Tablo 11 : Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-2 inhibitör aktivite testi sonuçları

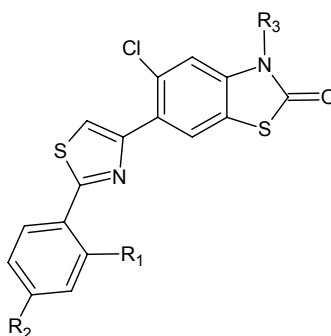


Bileşik No	R ₁	R ₂	R ₃	% B/B ₀	PGE ₂ pg/ml	% COX-2 inhibisyonu
1	H	H	H	4,766	4932	17,85
2	Cl	H	H	4,928	4998	24.02
3	H	Cl	H	3,696	0	0
4	H	OCH ₃	H	4,864	4061	25,96
5	F	H	H	5.253	3142	42,72
6	H	F	H	4,183	0	0
7	H	H	CH ₂ COOH	4,734	4562	16,83
8	Cl	H	CH ₂ COOH	4,799	4293	21,73
9	H	Cl	CH ₂ COOH	4,604	5264	4,03
10	H	OCH ₃	CH ₂ COOH	4,669	4880	11,03
11	F	H	CH ₂ COOH	4,702	4896	12,98
12	H	F	CH ₂ COOH	5,253	3142	42,72
DuP-697				50,486	0	100
KAN				4,572	5485	0

5. TARTIŞMA

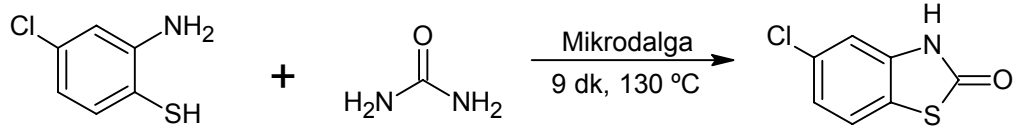
Çalışmamızda altı tanesi 5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol yapısına sahip, altı tanesi ise [5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il]asetik asit yapısına sahip on iki adet bileşiğin sentezi yapılmış ve *in vitro* enzim deneyleri ile bu bileşiklerin COX inhibitör etkileri araştırılmıştır. Tablo 12’de sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları, erime dereceleri ve % verimleri yer almaktadır.

Tablo 12 : Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin kimyasal yapıları, erime dereceleri ve % verimleri

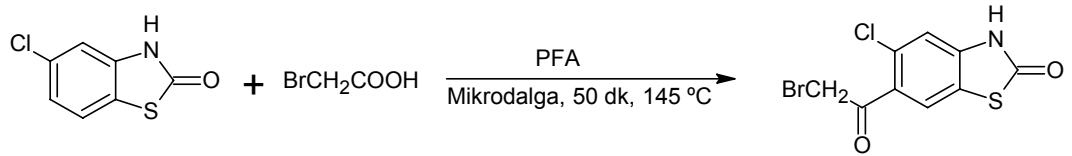


Bileşik No	R ₁	R ₂	R ₃	Erime Derecesi (°C)	% Verim
1	H	H	H	285	19
2	Cl	H	H	264	14
3	H	Cl	H	308	14
4	H	OCH ₃	H	257	17
5	F	H	H	262	21
6	H	F	H	305	15
7	H	H	CH ₂ COOH	244	13
8	Cl	H	CH ₂ COOH	252	22
9	H	Cl	CH ₂ COOH	282	14
10	H	OCH ₃	CH ₂ COOH	207	9
11	F	H	CH ₂ COOH	249	8
12	H	F	CH ₂ COOH	271	15

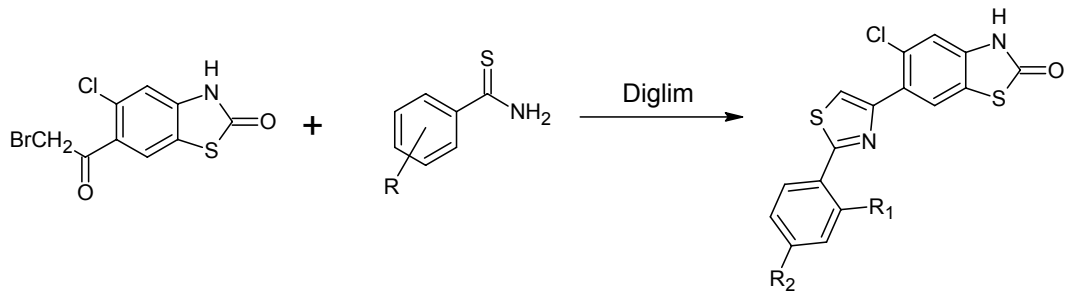
Başlangıç maddesi 5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol, 2-amino-4-klorotiyofenol ile ürenin mikrodalga reaktöründe herhangi bir solvana ihtiyaç duyulmaksızın ısıtılması ile elde edilmiştir.



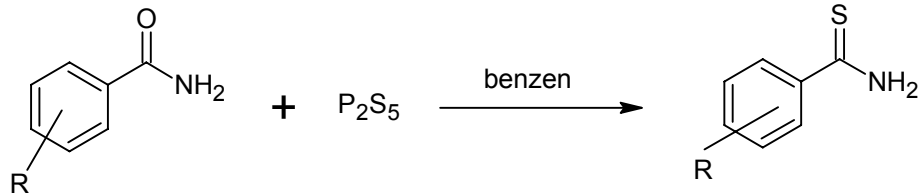
5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol ve bromoasetik asitin PFA varlığında mikrodalga reaktöründe ısıtılması sonucu ise 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol elde edilmiştir. Bu bileşiğin geleneksel olarak PFA içerisinde yağ banyosunda sentezlenmesi için uygulanan yöntemde başarılı sonuçlar alınamamıştır.



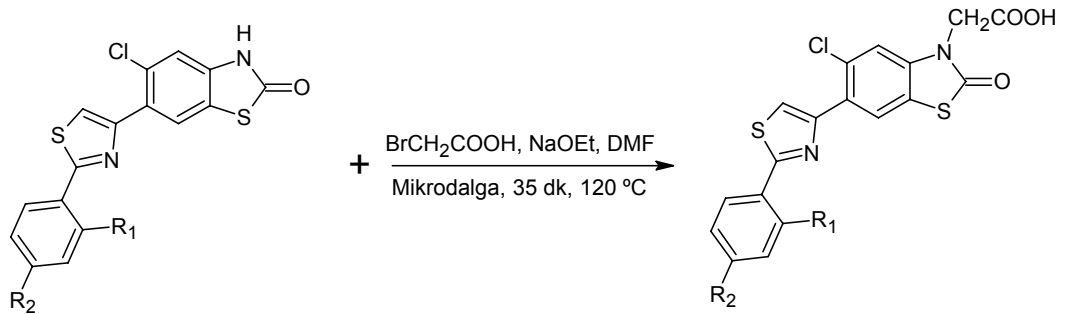
5-kloro-6(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol türevlerine ulaşmak için 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol ile uygun tiyobenzamit türevi, dietilen glikol dimetil eter (diglim) varlığında düşük ısıda karıştırılmış, elde edilen madde seyreltik NaOH ile muamele edilmiş ve çöken tuz su içine alınarak derişik hidroklorik asit ile ortam asitlendirilmiştir.



Tiyobenzamit türevleri (2-klorotiyobenzamit, 2-florotiyobenzamit, 4-klorotiyobenzamit, 4-florotiyobenzamit), ilgili benzamit türevinin fosforpentasülfür (P_2S_5) ile benzen içinde $CaCl_2$ başlığı takılmış geri çeviren soğutucu altında ısıtılması ile elde edilmiştir.



5-kloro-6(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzotiyazol türevlerinin dimetilformamit varlığında sodyum etoksit ve bromoasetik asit ile geri çeviren soğutucu altında mikrodalga reaktöründe tepkimeye girmesi sonucu [5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit türevlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir.



Elde edilen bileşiklerin yapıları, IR, $^1\text{H-NMR}$ ve elementel analiz verileri ile kanıtlanmıştır.

5-kloro-6(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzotiyazol türevlerinin IR spektrumlarında, $3458\text{-}3132\text{ cm}^{-1}$ arası N-H gerilim bandı, $3139\text{-}3063\text{ cm}^{-1}$ arası aromatik C-H gerilim bandı ve $1713\text{-}1679\text{ cm}^{-1}$ arası C=O gerilim bandı gözlenmiştir.

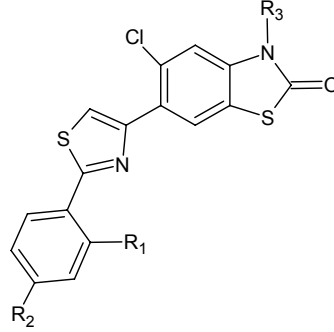
5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzotiyazol türevlerinin ^1H -NMR spektrumlarında, δ 12.15-12.10 ppm arasında N-H, δ 8.23-8.18 ppm arası 5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol H^7 , δ 8.21-7.97 ppm arası tiyazol H ve δ 8.34-7.22 ppm arası 5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol H^4 protonlarına ait sinyaller görülmüştür.

[5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit türevlerinin IR spektrumlarında, 3700-2400 cm^{-1} arası O-H gerilim bandı, 3148-3003 cm^{-1} arası aromatik C-H gerilim bandı, 2979-2933 cm^{-1} arası alifatik C-H gerilim bandı, 1746-1719 cm^{-1} arası karboksilik asite ait C=O gerilim bandı ve 1696-1629 cm^{-1} arası laktam karboniline ait C=O gerilim bandı gözlenmiştir.

[5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit türevlerinin ^1H -NMR spektrumlarında, δ 8.41-8.30 ppm arası 5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol H^7 , δ 8.27-8.01 ppm arası tiyazol H, δ 7.79-7.69 ppm arası 5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol H^4 ve δ 4.89-4.78 ppm arası CH_2 protonlarına ait sinyaller görülmüştür.

Bileşiklerin COX-1 enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesini saptamak için pıhtılaşmış insan tam kanı ve Assay Designs Correlate-EIA™ Thromboxane B_2 Enzyme Immunoassay Kiti kullanılmıştır. Bileşiklerin COX-2 enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesini test etmek için ise LPS ile 24 saat indüklenmiş olan insan tam kanı ve Assay Designs Correlate-EIA™ Prostaglandine E_2 Enzyme Immunoassay Kiti kullanılmıştır. COX-1 ve COX-2 enzim deneylerinde standart olarak sırasıyla COX-1 ve COX-2'nin selektif inhibitörleri olan diaril yapısındaki SC-558 ve DuP-697 kullanılmıştır. Bileşikler 10 μM konsantrasyonda test edilmiştir. İnhibitör etki sonuçları Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13 : Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite testi sonuçları



Bileşik No	R ₁	R ₂	R ₃	% COX-1 inhibisyonu	% COX-2 inhibisyonu
1	H	H	H	15,05	17,85
2	Cl	H	H	2,69	24,02
3	H	Cl	H	8,23	0
4	H	OCH ₃	H	8,23	25,96
5	F	H	H	16,09	42,72
6	H	F	H	11,73	0
7	H	H	CH ₂ COOH	1,65	16,83
8	Cl	H	CH ₂ COOH	20,27	21,73
9	H	Cl	CH ₂ COOH	7,07	4,03
10	H	OCH ₃	CH ₂ COOH	23,77	11,03
11	F	H	CH ₂ COOH	13,29	12,98
12	H	F	CH ₂ COOH	1,65	42,72
SC-558				100	-
DuP-697				-	100

Bileşik 3 ve Bileşik 6'nın COX-2 inhibisyonu bulunmamaktadır.

1 nolu bileşik olan 5-kloro-6-[(2-fenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol, % 15,05 oranında COX-1 enzimini inhibe ederken, % 17,85 oranında COX-2 enzimini inhibe etmektedir. COX enzimleri üzerinde herhangi bir seçicilik göstermemektedir.

1 nolu bileşiğin asetik asit türevidi olan 7 nolu bileşik ise, % 1,65 oranında COX-1 enzimini inhibe ederken, % 16,83 oranında COX-2'yi inhibe etmektedir. Yapıya asetik asit girdiğinde, COX-2 inhibitör

aktivitede anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş ancak seçicilikte artış olmuştur. 1 ve 7 nolu bileşiklerin COX-1 inhibitör aktiviteleri kıyaslandığında asetik asit türevinin inhibitör aktivitesinin belirgin şekilde düştüğü görülmektedir.

2 nolu bileşik olan 5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzotiyazol, % 2,69 oranında COX-1 enzimini inhibe ederken, % 24,02 oranında COX-2 enzimini inhibe etmektedir. Bu türevin COX-2 seçiciliğinde artış gözlenmektedir.

2 nolu bileşiğin asetik asit türevidi olan 8 nolu bileşik ise, % 20,27 oranında COX-1 enzimini inhibe ederken, % 21,73 oranında COX-2'yi inhibe etmektedir. Asetik asit türevinin 2 nolu bileşiğe kıyasla COX-1 inhibitör aktivitesi belirgin şekilde artmıştır. COX-2 inhibitör aktivitede ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak 8 nolu bileşiğin COX enzimleri arasında seçiciliği yoktur.

3 nolu bileşik olan 5-kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzotiyazol, % 8,23 oranında COX-1 enzimini inhibe etmekte, COX-2 enzimini 10 µM konsantrasyonda inhibe etmemektedir. 9 nolu bileşik 3 nolu bileşiğin asetik asit türevidir. % 7,07 oranında COX-1 enzimini inhibe ederken, % 4,03 oranında COX-2'yi inhibe etmektedir.

4 nolu bileşik olan 5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzotiyazol, % 8,23 oranında COX-1'i, % 25,96 oranında ise COX-2'yi inhibe etmektedir. Bu bileşiğin de COX-2 seçiciliğinde artış gözlenmektedir. 4 nolu bileşiğin asetik asit türevi olan 10 nolu bileşik ise COX-1 enzimine seçicilik göstermekte, % 23,77 oranında COX-1'i, 11,03 oranında COX-2'yi inhibe etmektedir.

5 nolu bileşik olan 5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzotiyazolün de COX-2 seçiciliği bulunmaktadır. 5 nolu bileşik, % 16,09 oranında COX-1'i, % 42,72 oranında ise COX-2'yi inhibe etmektedir.

11 nolu bileşik 5 nolu bileşiğin asetik asit türevidir. % 13, 29 oranında COX-1'i, % 12,98 oranında ise COX-2'yi inhibe eden bileşiğin iki enzim arasında bir seçiciliği bulunmamaktadır. 2 nolu bileşiğe göre de COX-2 inhibitör aktivitesinde düşüş gözlenmektedir.

6 nolu bileşik olan 5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol, % 11,73 oranında COX-1 enzimini inhibe etmekte, COX-2 enzimini 10 µM konsantrasyonda inhibe etmemektedir. 12 nolu bileşik 6 nolu bileşiğin asetik asit türevidir. 12 nolu bileşik, % 1,65 oranında COX-1 enzimini inhibe ederken, % 42,72 oranında COX-2'yi inhibe etmektedir. Bileşik COX-2 enzimine seçicilik göstermektedir.

Genel olarak bileşiklerin COX-1 ve COX-2 enzimleri üzerindeki inhibitör etkilerini karşılaştırdığımızda, bileşiklerin COX-2 inhibitör etkilerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Benzotiyazolon ve asetik asit türevlerini karşılaştırdığımızda ise genel olarak asetik asit türevlerinin COX-1 enzimi üzerindeki inhibitör aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir. Ancak, Bileşik 6'nın asetik asit türevi olan Bileşik 12'nin COX-2 inhibitör etkisi asetik asit artığına bağlı olarak % 0'dan % 42.72'ye yükselmiştir. Buna karşılık asetik asit artığı COX-1 inhibitör etkiyi % 11.75'ten % 1.65'e düşürmüştür.

Ancak, her iki durumda da ele alınan inhibisyon yüzdeleri yüksek değerler değildir. Yaptığımız çalışmada önemli düzeyde selektif COX-2 inhibitörü bileşiklere ulaşamamıştır. Bileşik 12 bu konuda dikkat çekicidir.

Hem COX-1 hem de TxA₂ sentaz enziminin *in vitro* aktivitesi TxB₂ üzerinden değerlendirilmektedir. Bu nedenle sentezlediğimiz asetik asit türevleri benzotiyazolon türevlerine kıyasla daha yüksek ve anlamlı COX-1 inhibitör aktivite gösterebilir idi, ortaya çıkan bu durumun COX-1 enzimi üzerindeki inhibitör etkilerinden mi, yoksa TxA₂ sentaz enzimi üzerindeki inhibitör etkilerinden mi kaynaklandığını anlayabilmek için plateletçe zengin kanda *in vitro* TxA₂ sentaz inhibisyon testi yapılacaktır. Ancak, asetik asit türevlerinin COX-1 inhibisyonlarındaki artış yeterli düzeyde bulunmadığından, söz konusu testi yapmaya gerek duyulmamıştır.

Her ne kadar COX-1 ve COX-2 enzimleri üzerinde yüksek düzeylerde % inhibisyon değerlerine sahip bileşiklere ulaşamamış ise de, selektif COX-2 inhibitör etki açısından bakıldığında bir asetik asit türevi olan Bileşik 12 en önemli bileşik olarak değerlendirilebilir. Asetik asit artığının yapıya katılması ile COX-2 selektif inhibitör etki de artış sadece bu bileşikte ortaya çıkmıştır.

Hem selektif COX-2 inhibitör etkide artış hem de TxA₂ sentaz inhibitör etki açısından bakıldığında asetik asit türevi bileşiklerde COX-1 ve COX-2 inhibitör etkilerin her ikisinin de arttığı bileşiklerin değerlendirilmesi gerekir. Bileşik 8 bu açıdan dikkat çekmektedir. COX-1 inhibitör etki % 2.69'dan % 20.27'ye yükselmiş, aynı zamanda COX-2 inhibitör etki de korunmuştur. COX-1 inhibitör etki tayini yönteminde TxA₂ sentaz inhibitör etki nedeni ile de TxB₂ miktarında azalma oluşabileceği düşünüldüğünden bu bileşiğin hem TxA₂ sentaz inhibitörü hem de selektif COX-2 inhibitörü etkiye sahip olacağı düşünülebilir. Ancak inhibitör etki şiddetindeki artış şimdilik yeterli görülmediğinden bu bileşik için selektif TxA₂ sentaz inhibitör etki tayini çalışması yapılmamıştır.

Bu çalışmamızın devamı olarak, Bileşik 8'in yapısı göz önünde bulundurularak, selektif COX-2 inhibitör etkisi daha yüksek, COX-1'i inhibe etmeden TxA₂ sentazı inhibe edebilecek bileşiklerin tasarımı ve inhibitör etkilerinin (COX-1, COX-2, TxA₂ sentaz) ortaya konulması çalışmaları düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda altı tanesi 5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol yapısına sahip, altı tanesi ise [5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il]asetik asit yapısına sahip on iki adet bileşiğin sentezi yapılmış ve *in vitro* enzim deneyleri ile bu bileşiklerin COX inhibitör etkileri araştırılmıştır.

2-amino-4-klorotiyofenol ile ürenin mikrodalga reaktöründeki tepkimesinden elde edilen 5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol halkasının, bromoasetik asit ile PFA içindeki reaksiyonundan 6-bromoasetil türevine ulaşılmıştır. Daha sonra 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazolün ilgili tiyobenzamit türevleriyle tepkimesinden 5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol türevleri elde edilmiştir. Bu türevlerin 2-bromoasetik asit ile tepkimesinden ise, 5-kloro-2-okso-3*H*-benzotiyazol halkasının 3 numaralı konumunda asetik asit sübstitüenti taşıyan [5-kloro-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il]asetik asit türevlerine geçilmiştir.

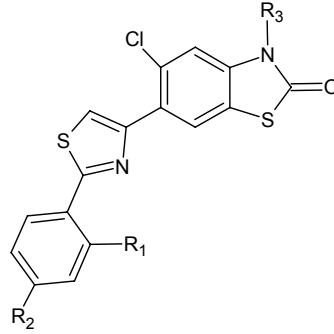
Bileşiklerin yapıları IR, ¹H-NMR ve elementel analiz verileri ile kanıtlanmıştır.

Bileşiklerin 10 µM konsantrasyonda, COX-1 ve COX-2 enzimi inhibitör aktivitesi araştırılmıştır.

Bileşiklerden [5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il]asetik asit yapısındaki (**Bileşik 8**) ve [5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il]asetik asit yapısındaki (**Bileşik 12**) iki bileşiğin COX-inhibitör etkileri dikkat çekici bulunmuştur. Birincisi asetik asit artığının yapıya girmesi ile COX-1 ve COX-2 inhibitör etkinin artışı ortaya koymuş, ikinci bileşik ise COX-2 inhibitör selektivitenin de artışı ortaya koymuştur.

Tablo 14'te sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları, erime dereceleri, % verimleri ve COX enzimi inhibitör aktivite testi sonuçları yer almaktadır.

Tablo 14 : Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin kimyasal yapıları, erime dereceleri, % verimleri, COX-1 ve COX-2 inhibisyon aktivite testi sonuçları



Bileşik No	R ₁	R ₂	R ₃	Erime Derecesi (°C)	% Verim	% COX-1 İnhibisyonu	% COX-2 İnhibisyonu
1	H	H	H	285	19	15,05	17,85
2	Cl	H	H	264	14	2,69	24,02
3	H	Cl	H	308	14	8,23	0
4	H	OCH ₃	H	257	17	8,23	25,96
5	F	H	H	262	21	16,09	42,72
6	H	F	H	305	15	11,73	0
7	H	H	CH ₂ COOH	244	13	1,65	16,83
8	Cl	H	CH ₂ COOH	252	22	20,27	21,73
9	H	Cl	CH ₂ COOH	282	14	7,07	4,03
10	H	OCH ₃	CH ₂ COOH	207	9	23,77	11,03
11	F	H	CH ₂ COOH	249	8	13,29	12,98
12	H	F	CH ₂ COOH	271	15	1,65	42,72
DuP-697						-	100
SC-558						100	-

Bu çalışmamızın devamı olarak, Bileşik 8'in yapısı göz önünde bulundurularak, selektif COX-2 inhibitör etkisi daha yüksek, COX-1'i inhibe etmeden TxA₂ sentazı inhibe edebilecek bileşiklerin tasarımı ve inhibitör etkilerinin (COX-1, COX-2, TxA₂ sentaz) ortaya konulması çalışmaları düşünülmektedir.

BAZI 5-KLORO-6-(TİYAZOL-4-İL)-2-OKSO-3H-BENZOTİYAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE COX İNHİBİTÖR ETKİLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

ÖZET

Bu yüksek lisans tezinin amacı COX-2 inhibitörü olabileceği düşünülen, aynı zamanda TxA₂ sentaz inhibitörü de olabilecek bileşiklerin sentezini gerçekleştirmek ve bu bileşiklerin *in vitro* enzim immüanaliz yöntemi ile COX-2 selektivitelerini araştırmaktır.

Çalışmamızda merkezi halkası tiyazol olan 1,3 diaril yapısında 12 adet bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Tasarlanan bileşiklerin 6 tanesi aynı zamanda TxA₂ sentaz inhibitörlerinin farmakoforik grubuna sahip olduğu için, bu bileşiklerin TxA₂ sentaz inhibisyonu yaparak antiplatelet aktivite göstereceği de düşünülmüştür. Tasarlanan bileşikler, merkezi tiyazol halkasına meta konumlarından bağlanmış olan 5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol ve fenil halkalarını içermektedir. Fenil halkasının 2 ve 4 numaralı konumlarına F, Cl, OCH₃ gibi küçük grupların süstitüsyonu ile türevlendirmeye gidilmiştir.

Elde edilen bileşiklerin yapıları IR, ¹H-NMR ve elementel analiz verileri ile kanıtlanmıştır. Bileşiklerin 10 µM konsantrasyonda, COX-1 ve COX-2 enzimi inhibitör aktivitesi araştırılmıştır.

Bileşiklerden [5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit yapısındaki (**Bileşik 8**) ve [5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzotiyazol-3-il]asetik asit (**Bileşik 12**) yapısındaki iki bileşiğin COX-inhibitör etkileri dikkat çekici bulunmuştur. Birincisi asetik asit artığının yapıya girmesi ile COX-1 ve COX-2 inhibitör etkinin artışı ortaya koymuş, ikinci bileşik ise COX-2 inhibitör selektivitenin de artışı ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Tiyazol, 5-kloro-2-okso-3H-benzotiyazol, COX-2 selektif inhibitörler, TxA₂ inhibitör aktivite

STUDIES ON THE SYNTHESIS AND COX INHIBITORY EFFECTS OF SOME 5-CHLORO-6-(THIAZOLE-4-YL)-2-OXO-3H-BENZOTHIAZOLE DERIVATIVES

SUMMARY

The aim of this master thesis is perform the synthesis of compounds which may possess both COX-2 and TxA₂ inhibitory activities and determine *in vitro* COX-2 selective inhibitory activities of these compounds by *in vitro* enzyme immunoassay method.

In this study, twelve compounds which bear a central thiazole ring and have 1,3 diaryl structure were designed and synthesized. Since the six of the designed compounds have the structural features needed to achieve TxA₂ inhibitory activity, these six compounds were also expected to have antiplatelet activity. The designed compounds carry 5-chloro-2-oxo-3H-benzothiazole and phenyl moiety at meta positions of the central thiazole ring. Derivatives carrying F, Cl, OCH₃ groups at positions meta or para of phenyl ring have synthesized.

The structure of the compounds have been elucidated by IR, ¹H-NMR and elementary analysis data. The test for the COX-1 and COX-2 enzyme inhibitory activity has been performed at 10 µM concentration.

Two of the compounds which have the structure [5-chloro-6-[2-(2-chlorophenyl)-1,3-thiazole-4-yl]-2-oxo-3H-benzothiazole-3-yl]acetic acid (**Compound 8**) and [5-chloro-6-[2-(4-florophenyl)-1,3-thiazole-4-yl]-2-oxo-3H-benzothiazole-3-yl]acetic acid (**Compound 12**) attracts attention. First one exhibits increased COX-1 and COX-2 inhibitory activity and second one exhibits increased COX-2 selective inhibitory activity.

Key Words: Thiazole, 5-chloro-2-oxo-3H-benzothiazole, COX-2 selective inhibitors, TxA₂ inhibitory activity

KAYNAKLAR

- 1- Erdoğan H., Nonsteroidal Antiinflatuvar İlaçlar, Akgün H. ve ark, Farmasötik Kimya, 2. Baskı, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları; 2004
- 2- G. Dannhardt, S. Laufer. Structural Approaches to Explain the Selectivity of COX-2 Inhibitors. Is There A Common Pharmacophore?, Current Medicinal Chemistry 2000; 7: 1101-12
- 3- Dannhardt G., Kiefer W. Cyclooxygenase Inhibitors-Current Status and Future Prospects. Eur. J. Med. Chem 2000; 36: 109–26
- 4- A.S. Kalgutkar, Z. Zhao. Discovery and Design of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors as Non-Ulcerogenic, Anti-Inflammatory Drugs with Potential Utility as Anti-Cancer Agents. Current Drug Targets 2001; 2: 79-106
- 5- Prasit P., Wang Z., Brideau C., Chan C., Charleson C., Cromlish W., Ethier D., Evans J. F., Ford-Hutchinson A.W., Gauthier J. Y., Gordon R., Guay J., Gresser M., Kargman S., Kennedy B., Leblanc Y., Leger S., Mancini J., O'Neill G. P., Ouellet M., Percival M. D., Perrier H., Riendeau D., Rodger I, Tagari P., Therien M., Vickers P., Wong P., Xu L. J. Young R. N., Zamboni R. The Discovery of Rofecoxib, [MK 966, VIOXX[®], 4(4'Methylsulfonylphenyl)-3-Phenyl-2(5H)-Furanone], An Orally Active Cyclooxygenase-2 Inhibitor. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 1999; 9: 1773-78
- 6- Merck Announces Voluntary Worldwide Withdrawal of VIOXX[®]
URL:http://www.vioxx.com/vioxx/documents/english/vioxx_press_release.pdf [okundu 2007 Nisan 23]
- 7- Mukherjee D. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors and Potential Risk of Cardiovascular Events. Biochemical Pharmacology 2002; 63: 817-21
- 8- Stacy Z. A., Dobesh P. P., Trujillo T. C. Cardiovascular Risks of Cyclooxygenase Inhibition. Pharmacotherapy, 2006; 26(7): 919-38
- 9- Abacıoğlu N., Aljezi, İnflamasyon, Pirezis ve Nonsteroidal Analjezik ve Antiinflatuvar İlaçlar, Bökesoy T.A., Çakıcı İ., Melli M. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Ders Kitabı. Ankara, Gazi Kitabevi 2000; 437-95

- 10- Scott A., Khan K. M., Roberts C R., Cook J. L., Duronio V. What do we mean by the term inflammation? A contemporary basic science update for sports medicine. *Br J Sports Medicine* 2004; 38: 372-80
- 11- Simmons D. L., Botting R.M., Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews* 2004; 56(3): 387-437
- 12- J.V. Ryn, G. Trummlitz, M. Pairet: COX-2 Selectivity and Inflammatory Processes. *Current Medicinal Chemistry* 2000; 7: 1145-61
- 13- Turini M. E., Dubois R. N. Cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target. *Annu. Rev. Med.* 2002; 53: 35-57
- 14- Vane J. R., Bakhle Y.S., Botting R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998; 38: 97-120
- 15- Smith W.L., Dewitt D.L., Garavito R.M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem* 2000; 69:145-82
- 16- Flower R. J. The development of COX-2 inhibitors. *Nature Reviews, Drug Discovery* 2003; 2: 179-91
- 17- Garavito R. M., Mulichak A. M. The Structure of Mammalian Cyclooxygenases. *Anu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2003; 32: 183-206
- 18- Botting R.M. Mechanism of Action of Acetaminophen: Is There a Cyclooxygenase-3 ?, *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31: 202-10
- 19- Davies N. M., Good R. L., Roupe K. A., Yanez J. A. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?-not as easy as 1, 2, 3. *J. Pharmaceut. Sci.* 200; 7(2): 217-26
- 20- Kis B., Snipes J. A., Busija D. W. Acetaminophen and the Cyclooxygenase-3 Puzzle: Sorting out Facts, Fictions and Uncertainties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005; 315(1): 1-7
- 21- Warner T. D., Mitchell J. A. Cyclooxygenase-3(COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99(21): 13371-373

- 22- Warner T. D., Mitchell J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* 2004; 18: 790–804
- 23- P. Brooks, P. Emery, J. F. Evans, H. Fenner, C. J. Hawkey, C. Patrono, J. Smolen, F. Breedveld, R. Day, M. Dougados, E. W. Ehrich, J. Gijon-Baños, T. K. Kvien, M. H. Van Rijswijk, T. Warner and H. Zeidler: Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2, *Rheumatology*, 38: 779-788(1999)
- 24- C Michaux, C Charlier. Structural Approach for COX-2 Inhibition. *Mini Reviews In Medicinal Chemistry* 2004; 4: 603-15
- 25- Brune K. et al. Safety of Anti-Inflammatory Treatment-New Ways of Thinking, *Rheumatology* 2004; 43(Suppl. 1): 116-20
- 26- C.A. Koontogiorgis, D.J. Hadjipavlou-Litina. Non Steroidal Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents, *Current Medicinal Chemistry* 2002; 9: 89-98
- 27- S. Shahapurkar, T. Pandya. Quantitative Structure Activity Relationship Studies of Diaryl Furanones as Selective COX-2 Inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry* 2004; 39: 899-904
- 28- Li C. S., Brideau C., Chan C. C., Savoie C., Claveau D., Charleson S., Gordon R., Greig G., Gauthier J. Y., Lau C. K., Riendeau D., Therien M., Wong E., Prasit P. Pyridazinones as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13: 597–600
- 29- Joo Y. H., Kim J. K., Kang S. H., Noh M. S., Ha J. Y., Choi J. K., Lim K. M., Lee C. H., Chung S. 2,3-Diarylbenzopyran Derivatives as a Novel Class of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13: 413–17
- 30- Hu W., Guo Z., Chu F., Bai A., Yi X. Cheng G. Li J.: Synthesis and Biological Evaluation of Substituted 2-Sulfonyl-phenyl-3-phenyl-indoles: A New Series of Selective COX-2 Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2003; 11: 1153–60
- 31- Beswick P., Bingham S., Bountra C., Brown T., Browning K., Campbell I., Chessell I., Clayton N., Collins S., O'Reil J., Guntrip S., Halsam C., Lambeth P., Lucas F., Mathews N., Murkit G., Naylor A., Pegg N., Pickup E., Player H., Price H., Stevens A., Stratton S., Wiseman J. Identification of 2,3-diaryl-pyrazolo[1,5-b]pyridazines as

potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004; 14: 5445–48

- 32- Navidpour L., Shafaroodi H., Abdi K., Amini M., Ghahremani M. H., Dehpourd A. R., Shaeaa A. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted 3-alkylthio-4,5-diaryl-4H-1,2,4-triazoles as selective COX-2 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006; 14(8): 2507-17
- 33- Navidpour L., Amini M., Shafaroodi H., Abdi K., Ghahremani M. H., Dehpourd A. R., Shaeaa A.: Design and synthesis of new water-soluble tetrazolide derivatives of celecoxib and rofecoxib as selective cyclooxygenase -2 (COX-2) inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2006; 16(17): 4483-87
- 34- Black W. C., Brideau C., Chan C. C., Charleson S., Cromlish W., Gordon R., Grimm E. L., Hughes G., Leger S., Li C. S., Riendeau D., Therin M., Wang Z., Xu L. J., Prasit P.:3,4-Diaryl-5-hydroxyfuranones: Highly Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2 with Aqueous Solubility, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13: 1195–98
- 35- Menozzi G., Merello L., Fossa P., Mosti L., Piana A. 4-Substituted 1,5-diarylpyrazole, analogues of celecoxib: synthesis and preliminary evaluation of biological properties, *Il Farmaco* 2003; 58: 795-808
- 36- Paramashivappa R., Kumar P. P., Subba Rao P. V., Rao S. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole/Benzothiazole and Benzoxazole Derivatives as Cyclooxygenase Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003 13: 657–60
- 37- Baruah B., Dasu K., Vaitilingam B., Vanguri A., Casturi S. R., Yeleswarapu K. R. 1,2-Diaryl-1-ethanone and pyrazolo [4,3-c] quinoline-4-one as novel selective cyclooxygenase-2 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004; 14: 445–48
- 38- Haris R. R., Black L., Surapaneni S., Kolasa T., Majest S., Namovic M. T., Grayson G., Komater V., Wilcox D., King L., Marsh K., Jrvs M. F., Nuss M., Nellans H., Pruesser L., Reinhart G.A., Cox B., Jacobson P., Stewart A., Coghlan M., Carter C., Bell R. L. ABT-963 [2-(3,4-Difluoro-phenyl)-4-(3-hydroxy-3-methyl-butoxy)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-2H-pyridazin-3-one], A Highly Potent and Selective Disubstituted Pyridazinone Cyclooxygenase-2 Inhibitor,

The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics
2004; 311(3): 904–12

- 39- Portevin B., Tordjman J.: 1,3 Diaryl-4,5,6,7-Tetrahydro-2*H*-Isoindole Derivatives: A New Series of Potent and Selective COX-2 Inhibitors In Which a Sulfonyl Group Is Not a Structural Requisite, J. Med. Chem. 2000; 43: 4582-93
- 40- Sui Z., Guan J. 1,3-Diarylcycloalkanopyrazoles and Diphenyl Hydrazides as Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2000; 10: 601-4
- 41- Nielsen O. H., Ainsworth M., Csillag C., Madsen J. R. Systematic review: coxibs, non-steroidal anti-inflammatory drugs or no cyclooxygenase inhibitors in gastroenterological high-risk patients?, Aliment Pharmacol Ther 2006; 23: 27–33
- 42- Gajraj N. M. Cyclooxygenase-2 Inhibitors, Anesth Analg 2003; 96:1720–38
- 43- Malhotra S., Shafiq N., Pandhi P. COX-2 Inhibitors: A CLASS Act or Just VIGORously Promoted, Medscape General Medicine 2004; 6(1): e37
- 44- Antman E. M., Demets D., Loscalzo J. Cyclooxygenase Inhibition and Cardiovascular Risk, Circulation 2005; 112: 759-70
- 45- Howard P. A., Delafontaine P. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cardiovascular Risk, Journal of the American College of Cardiology 2004; 43(4): 519-25
- 46- Bakr M., Waller D. G. COX-2 Inhibitors and the Cardiovascular System: Is There a Class Effect?, Br J Cardiol. 2005; 12(5): 387-91
- 47- Walter M. F., Jacob R. F., Day C. A., Dahlborg R., Weng Y., Mason R. P. Sulfone COX-2 inhibitors increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs, Atherosclerosis 2004; 177: 235–43
- 48- Leval X., Julemont F., Delarge J., Pirotte B., Dogne J. M. New Trends in Dual 5-LOX/COX Inhibition, Current Medicinal Chemistry 2002; 9: 941-62
- 49- Ulbrich H., Fiebich B., Dannhardt G. Cyclooxygenase-1/2 (COX-1/COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitors of the 6,7-diaryl-

2,3-1H-dihydropyrrolizine type, European Journal of Medicinal Chemistry 2002; 37: 953-59

- 50- Kulkarni S. K., Singh V. Licofelone-A Novel Analgesic and Anti-Inflammatory Agent, Current Topics in Medicinal Chemistry 2007; 7(3): 251-63
- 51- Dempke W., Rie C., Grothey A., Schmoll H. J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?, J Cancer Res Clin Oncol 2001; 127: 411-17
- 52- Townsend K. P., Pratico D. Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs, The FASEB Journal 2005;19: 1592-1601
- 53- Kalyoncu N. İ. Antitrombotik İlaçlar: antikoagülan İlaçlar, Antitrombotik (antiplatelet) İlaçlar, Fibrinolitik (trombolitik) İlaçlar, J Pharmacol 2004; 2 (4): 295-316
- 54- Dogne J. M., Leval X., Delarge J., David J. L., Masereel B. New Trends in Thromboxane and Prostacylin Modulators, Current Medicinal Chemistry 2000; 7, 609–28
- 55- Dogne J. M., Hanson J., Leval X., Masereel B., Kolh P., Pirotte B. New Developments on Thromboxane Modulators, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 2004; 4: 649-57
- 56- Kikelj D., Urleb U. Thiazoles, Science of Synthesis 2002; 11: 627-833
- 57- Hunter R. F., Parken E.R. The Unsaturation and Tautomeric Mobility of Heterocyclic Compounds., J. Chem Soc. 1935; 1755-61
- 58- D'amico J.J., Fuhrhop R. W., Bollinger F. G., Dahl W.E. Synthesis of Heterocyclic Compounds From o-aminobenzenethiol and Ammonium Thiocarbamate, J. Hetero. Chem. 1986; 23: 641-45
- 59- Baudin J. B. Hareau G., Julia S.A., Lorne R., Ruel O. Stereochemistry of Direct Olefin Formation from Carbonyl Compounds and Lithiated Heterocyclic Compounds, Bull. Soc. Chim. Fr. 1993; 130: 856-78
- 60- Thomsan M., Dejongh D.C. Pyrolyses and Mass Spectra of 2-Benzoxazolinone, 2-Benzimidazolinone and 2-Benzothiazolone. Can J. Chem. 1973; 51: 3313-21

- 61- Fife H.T, Hutchins J. E. C., Wang M.S. Highly Efficient Intramolecular Nucleophilic Reactions, J. Am. Chem. Soc. 1975; 97: 5878-82
- 62- Kansai S., Seizo K. K. Benzothiazolinone Derivatives, Jpn. Kokai Tokyo Koho, JP 5948472, 1984
- 63- Konishi K., Nishiguchi I., Hirashima T. A Facile One-Pot Synthesis of Benzothiazolones from 2-Halonitrobenzenes, Synthesis 1984; 3: 254-55
- 64- Jacobson P. Oxydationsproducte des Phenylsulfurethans, Ber. 1886; 19: 1811-13
- 65- Jilale A., Decroix B., Morel J. Synthesis from Isocyanetes of N-Alkylated 2-Benzothiazolinones and Thienothiazolin-2-one, Chem Scr. 1987; 27(3): 423-28
- 66- Van D. E. M., 1-Hydroxybenzothiazole, US2179987, 1940
- 67- D'amico J. J., Webster, S. T., Campbell R. H. Twine C. E. 2-Substituted Thiobenzothiazole and Related Compounds, J. Org. Chem. 1965; 30: 3618-25
- 68- Kawaoka Y., Takashita K. Production of Benzothiazolone Compound, JP8092229, 1996.
- 69- Hasegawa M. 2-Benzothiazolinones, Jpn. Kokai Tokyo Koho JP., 61191677, 1987
- 70- Nishi T., Uno T., Koga Y., Shu Y., Igawa T. Blood Platelet Adhesion Inhibitor, JP2306916, 1990.
- 71- Nakamoto Y., Ishizuka N., Hayashi I., Katou H. Preparation of 2-Benzothiazolinone Derivative, JP5804396, 1983.
- 72- Umio S., Ueda I., Matsuo M. 2-Benzothiazolinones, Japan Kokai, 7378167, 1974
- 73- Yokoo H., SekuGuchi K. Benzothiazolinones, Jpn. Kokai Tokyo Koho, JP61191677, 1987
- 74- Hirashima T., Nishiguchi I., Miyata T., Konishi K., Yanagida Y. Preparation of 2-Benzothiazolone Compound, JP58162583, 1983

- 75- Joshi S. R., Srivastava P. K., Tandon S. N. Substituent Effects on pK values of Some Thiazoles and Benzothiazoles, *Ind. J. Chem.* 1973; 11: 248-49
- 76- Yous S., Poupaert J. H., Leesieur I., Depreux P., Lesieur D., AlCl_3 -DMF Reagent in the Fridel Crafts Reaction., *J. Org. Chem.* 1994; 59: 1574-76
- 77- Petrov O. L., Antonova A. T.S., Kalcheva V. B., Veleva C. H. G. Synthesis of 6-Benzoyl-2(3H)-Benzothiazolones and Compounds of Their Reduction and Alkylation, *Dokl. Bulg. Akad. Nauk.* 1994; 47(3): 31-4
- 78- Lesieur D., Lespagnol C., Yous S. Preparation of 6-Acylbenzothiazolones and Analogs as Drugs, EP395526 ,1991
- 79- Kitaura Y., Oku. T., Baba Y., Kashara C., Hashimoto M. Benzoxazolone and Benzothiazolone Derivatives, WO8501289, 1985
- 80- Guenadil F., Aichaoui H., Liacha M. Benzoylation of 2(3H)-Benzothiazolones in the Presence of 8 Equivalent of Zinc Chloride in N,N-Dimethylformamide, Phosphorus, Sulfur and Silicon 2002; 177: 755-57
- 81- Guenadil F., Aichaoui H. Study of The Acylation Reaction of 2(3H)-Benzothiazolones in The Mixture of ZnCl_2 -DMF, Phosphorus, Sulfur and Silicon 2002; 177: 2633-38
- 82- D'amico J. J., Bollinger F. G. Synthesis of 2-oxo-3-Benzothiazolineacetyl Chloride, 5-chloro-2-oxo-3-Benzothiazolineacetyl Chloride and Derivatives, *J. Hetero. Chem.* 1988; 25: 1183-90
- 83- D'amico J. J., Bollinger F. G. Synthesis of 3-Substitued-2-Benzothiazolinone, 2-Benzoxozolinone and Benzothiazoline-2-thione, *J. Hetero Chem.* 1989; 26 : 1245-53
- 84- Sutoris V., Susoliakova M., Holbova E., Rada B. Benzothiazole Compounds., *Chem. Zvesti* 1980; 34(5): 700-705
- 85- Hunter R. F. The Unsaturation and Tautomeric Mobility Of Heterocyclic Compounds., *J. Chem. Soc.* 1930; 125-147
- 86- Önkol T., Şahin M. F. Structure-Activity Relationships Studis on 1-Phenyl-2-(2-Benzothiazolinone-3-yl) Ethanones and Their Reduced Derivatives, *J. Fac. Pharm. Gazi* 2000; 17(1): 11-7

- 87- Yous S., Poupaert J. H., Chavatte P., Bizot Espiard J. G., Gaignard D. H., Lesieur D. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Analgesic 6-Substituted 2(3*H*)-Benzothiazolones, Drug Design and Discovery 2001; 17: 331-36
- 88- Önkol T., Dündar Y., Sırmagül B., Erol K., Şahin M. F. (2-oxobenzazolin-3-yl) Alkanoic Acid Derivatives and Antinociceptive Activity, J. Fac. Pharm. Gazi 2002; 19(1): 15-24
- 89- Çakır B., Ulucay A., Doğruer D. S., Isimer A., Sahin M. F.: Synthesis and antinociceptive activity of some 3-substitued benzothiazolone derivatives, Il Farmaco 1999; 54: 846-51
- 90- Önkol T., Dogruer D.S., Ito S., Sahin M.F. Synthesis and antinociceptive activity of (5-chloro-2-benzothiazolinon-3-yl)acetamide derivatives, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem 2000; 333: 337-40
- 91- Önkol T., Ito S., Yıldırım E., Erol K., Sahin M.F. Synthesis and antinociceptive activity of (2-benzazolon-3-yl)propionamide derivatives, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem 2001; 334: 17-20
- 92- Gökçe M., Çakır B., Erol K., Sahin M.F. Synthesis and antinociceptive activity of [(2-oxobenzothiazolin-3-yl)methyl]-4-alkyl/aryl-1,2,4-triazoline-5-thiones, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 2001; 334: 279–83
- 93- Ünlü S., Önkol T., Dündar Y., Ökçelik B., Küpeli E., Yeşilada E., Noyanalpan N., Şahin M. F. Synthesis and Analgesic and Anti-inflammatory Activity of Some New (6-Acyl-2-benzoxazolinone and 6-Acyl-2-benzothiazolinone Derivatives with Acetic Acid and Propanoic Acid Residues, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.2003; 336: 353-61
- 94- Önkol T., Çakır B., Şahin M. F., Yıldırım E., Erol K. Synthesis and Antinociceptive Activity of 2-[(2-Oxobenzothiazolin-3-yl)methyl]-5-aminoalkyl/aryl-1,3,4-thiadiazole, Turk J Chem 2004; 28: 461-68
- 95- Diouf O., Carato P., Lesieur I., Rettori M. C., Caignard D. H. Synthesis and pharmacological evaluation of novel 4-(4-fluorobenzoyl)piperidine derivatives as mixed 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/D₂ receptor ligands, Eur. J. Med. Chem. 1999; 34:69-73
- 96- Suzuki H., Shindo K., Ueno A., Miura T., Takei M., Sakakibara M., Fukamachi H., Tanaka J., Higa T. S1319: A Novel β_2 -Adrenoceptor

Agonist From A Marine Sponge *Dysidea* SP.: Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 1999; 9: 1361-64

- 97- Çakır B., Yıldırım E., Ercanlı T., Erol K., Sahin M. F. Synthesis and anticonvulsant activity of some (2/4-substituted)benzaldehyde (2-oxo-benzothiazolin-3-yl)acetohydrazones, II Farmaco 1999; 54: 842-45
- 98- Mickalad A. M., Poupaert J. H., Spampinato S., Lesieur D. Synthesis and Pharmacological Evaluation of 6-Piperidino- and 6-Piperazinoalkyl-2(3*H*)-benzothiazolones as Mixed $\sigma/5$ -HT_{1A} Ligands, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2002; 12: 1149-52
- 99- C. Oliver K., Alexander S., Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry, Vol 25, WILEY, 2005
- 100- Molteni V., Ellis D. A. Recent Advances in Microwave-Assisted Synthesis of Heterocyclic Compounds, Current Organic Synthesis 2005; 2: 333-75
- 101- Lidström P., Tierney J., Wathey B., Westman J. Microwave Assisted Organic Synthesis-A Review, Tetrahedron 2001; 57: 9225-83
- 102- Kappe C. O., Stadler A., Mannhold R., Kubinyi H., Folkers G. Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry, Volume 25, Germany, 2005
- 103- Khan K. M., Ullaha Z., Rania M., Perveenb S., Haidera S. M., Choudharya M. I., Rahmana A., Voelter W. Microwave-Assisted Synthesis of 2,5-Disubstituted-1,3,4-Oxadiazoles, Letters in Organic Chemistry 2004; 1: 50-52
- 104- M. Pairet, J. Van Ryn. Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non,steroidal anti-inflammatory drugs, Inflammation Research 1998; 47(2), 93-101
- 105- S. Laufer, P. Zechmeister, T. Klein. Development of an *in vitro* test system fort he evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors, Inflammation Research 1999; 48:133-38
- 106- G. Dannhardt, H. Ulbrich. *in vitro* test system for the evaluation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors based on a single HPLC run with UV detection using

bovine aortic coronary endothelial cells (BAECs), *Inflammation Research* 2001; 50: 262-69

- 107- P. Patrignani et al. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994; 271: 1705-12
- 108- Wild B. *The Immunoassay Handbook*, Third Edition, San Diego, Elsevier, 2005
- 109- URL:<http://en.wikipedia.org/wiki/Immunoassay> [okundu 2007 Mart 31]
- 110- Introduction to Immunoassays, Chapter 1
URL:www.abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning_immunoassay_01.pdf [okundu 2007 Mart 31]
- 111- Factors impacting immunoassay analytical performance, Chapter 3.
URL:www.abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning_immunoassay_03.pdf [okundu 2007 Mart 31]
- 112- Diamandis, E.P., Christopoulos, T.K. *Immunoassay*, San Diego, Academic Press, 2007
- 113- URL:<http://www.komabiotech.com/FAQ/immunology/ELISA.htm#elisa> [okundu 2007 Nisan 02]
- 114- http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_immunosorbent_assay [okundu 2007 Mart 31]
- 115- URL: <http://www.chemicon.com/resource/litlibrary/ant101.pdf> [okundu 2007 Nisan 2]
- 116- <http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403#introelisa> [okundu 2007 Nisan 2]
- 117- [abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning_immunoassay_02.pdf](http://www.abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning_immunoassay_02.pdf), Chapter 2, Immunoassay detection technologies [okundu 2007 Nisan 4]
- 118- H. G. Kim, Y. N. Huh, K. S. Park: Simultaneous HPLC analysis of arachidonic acid metabolites in biological samples with simple solid phase extraction, *Journal of Physiol Pharmacology* 1998; 2: 779-86

- 119- <http://www.caymanchem.com/app/template/currents,010.vm/a/z>
Detecting and measuring cyclooxygenases, Issue 10, Spring 2001,
[okundu 2007 Nisan 5]
- 120- Teppema J., Sebrell L. B. Researches on Mercaptothiazoles, J. Am.
Chem. Soc. 1927; 49: 1748-58
- 121- Assay Designs Correlate-EIA™ Thromboxane B₂ Enzyme
Immunoassay Kit Catalog No. 900-002 Kitapçığı
- 122- Assay Designs Correlate-EIA™ Prostaglandin E₂ Enzyme
Immunoassay Kit Catalog No. 900-001 Kitapçığı

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Selcen
Soyadı : Adak
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara-1982
Eğitimi : Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
(2001-2005)
Mamak Anadolu Lisesi
(1993-2000)
A.Paşa İlkokulu
(1988-1993)
Yabancı Dili : İngilizce
Görevi : TÜBİTAK
Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Bilimsel Programlar Uzman Yardımcısı
(Mart 2006- ...)