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

BAZI 6-(TİYAZOL-4-İL)-2-OKSO-3*H*-BENZOKSAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖR ETKİLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. ŞEYMA CANKARA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. SERDAR ÜNLÜ

ANKARA
Aralık 2007

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

BAZI 6-(TİYAZOL–4-İL)-2-OKSO-3*H*-BENZOKSAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖR ETKİLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. ŞEYMA CANKARA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. SERDAR ÜNLÜ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2007-21 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Aralık 2007

TEŞEKKÜR

Öncelikle beni danışmanlığına kabul eden, bana emek veren, tezimi şekillendiren, derin kimya bilgisi ve laboratuvar tecrübelerinden her zaman faydalandığım, hayat tecrübelerini örnek aldığım çok sevgili hocam Prof. Dr. Serdar Ünlü' ye,

Desteğini hep hissettiğim, tüm çözüm yolarının kesişim noktasında olan ve en zevkli yükşek lisans derslerimi aldığım değerli hocam, büyük kimyacı Prof. Dr. M. Fethi Şahin'e,

Yükşek Lisans çalışmalarıma imkan verdiği için Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Ningur Noyanalpan'a,

Enzim deneylerinde tecrübe ve bilgisiyle yol gösteren, ayrıca her sorunuma uzaklardan bile çözüm yetiştiren, çalışma azmine ve hırsına her zaman hayran kaldığım değerli hocam Doç. Dr. Erden Banoğlu'na,

Elindeki imkanları sonuna kadar sunmaktan çekinmeyen, koruyucu yaklaşımını, yakın ilgi ve sevgisini hep hissettiğim sevgili hocam Doç. Dr. Tijen Önkol'a, sorularımı hiçbir zaman cevapsız bırakmayan, çalışma disiplini ve idealistliğini hayranlıkla izlediğim, açık yürekli sevgili hocam Doç. Dr. Deniz Doğruer'e,

Aktivite deneylerini uygularken hep başımda duran, laboratuvarda merak ve sabrını örnek aldığım, bir iş arkadaşının ötesine geçen, sevgili ablam ve değerli hocam Dr. Yasemin Dündar'a,

Bir mesainin gerektirdiği her işi beraberce yaptığım, tüm sıkıntılara birlikte göğüs gerdiğim, her zaman desteklerini gördüğüm, öğrenciliğimde keşfedemediğim canım arkadaşlarım Arş. Gör. Ecz. Leyla Uzun ve Arş. Gör. Uzm.Ecz. Şölen Urlu'ya,

Mantıklı çözüm yolları ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan dostum Uzm. Ecz. Selcen Adak'a,

Tüm Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Tezimin son halini almasında emekleri geçen sevgili arkadaşlarım Emrah Çiçekli ve Muhlis Murat Akay' a,

Beni her zaman dinleyen, fikirlerime değer veren, hayatımın her aşamasında yolumu açan ve destekleyen canım aileme,

Desteğiyle her zaman arkamda duran, beni yüreklendiren, kararlarıma saygı gösteren, büyük mutluluk kaynağım Ozan Pirol' a,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

I. İÇİNDEKİLER.....i
II. ŞEKİLLER.....v
III. TABLOLAR.....vi
IV. KISALTMALAR.....vii

I. İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ..... 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1 Enflamasyon Ve Araşidonik Asit Yolağı..... 5
2.1.1 Siklooksijenaz Ürünleri 6
2.1.2 Prostanoidlerin Biyokimyası 7
2.1.3 Prostanoidlerin Biyolojik Etkileri 8
2.1.4 Siklooksijenazın İki İzoformu 10
2.1.4.1 Enzim Yapıları.....12
2.1.4.1.1 COX-1 ve COX-2'nin Substrat ve İnhibitör ile Bağlanmasından Sorumlu Yapıları 13
2.1.4.2 Doku Dağılımları 16
2.2 Non-Steroidal Antienflamatuvar İlaçlar 18
2.3 Selektif COX-2 İnhibitörleri 23
2.3.1 Selektif COX-2 İnhibitörlerinin Kardiyovasküler Etkileri 50
2.3.2 COX-2 İnhibitörleri ile Yeni Terapötik Hedefler.....55
2.4 Tromboksan ve Antiplatelet Aktivite 59
2.5 Tiyazol.....66
2.5.1 Tiyazol Halkasının Genel Sentez Yöntemleri 67
2.6 2-Okso-3*H*-benzoksazol.....70
2.6.1 2-Okso-3*H*-benzoksazol ile İlgili Genel Bilgiler.....70
2.6.2 2-Okso-3*H*-benzoksazol Bileşiğinin Genel Sentez Yöntemleri 70
2.6.3 2-Okso-3*H*-benzoksazolün Kimyasal Tepkimeleri.....73
2.6.4 Analjezik ve Antienflamatuvar Etkili 2-Okso-3*H*-benzoksazol Yapısındaki Bileşikler 76
2.7 Mikrodalga Sentezleri.....80
2.7.1 Mikrodalga Sentezleri ve Medisinal Kimya 80
2.7.2 Mikrodalga Enerjisi Destekli Organik Sentezler.....81
2.7.3 Mikrodalga Teorisi 82
2.7.3.1 Mikrodalga Radyasyonu.....82
2.7.3.2 Mikrodalganın Dielektrik Isıtması 84
2.7.3.3 Maddelerin Dielektrik Özellikleri 86
2.7.4 Mikrodalga Etkileri 87
2.7.4.1 Termal Etkiler (Kinetik).....88
2.7.4.2 Özel (Spesifik) Mikrodalga Etkileri.....89
2.7.4.3 Mikrodalga Isısal olmayan (Nontermal) Etkileri 94
2.8 COX Enzimleri İnhibisyonunun *In Vitro* Analizi 99
2.8.1 COX İnhibitör Etki Tayini İçin *In vitro* Test Sistemleri 100

2.8.1.1 İdeal Bir *In vitro* Analizin Taşıması Gereken Nitelikler 108
2.8.1.2 Uygun Analizin Seçimi 108
2.8.2 COX Enziminin İnhibisyonunun Tayininde Kullanılan İmmünolojik Teknikler 109
2.8.2.1 İmmün Analizlere Giriş 109
2.8.2.1.1 Antikor- Antijen Kavramları 109
2.8.2.1.2 Antikor- Antijen Birleşmesinin Özellikleri 110
2.8.2.1.3 Poliklonal ve Monoklonal Antikorlar 111
2.8.2.2 İmmün Analizlerin Çeşitleri 114
2.8.2.2.1 Kompetitif Immün Analizler 114
2.8.2.2.2 Non-Kompetitif Immün Analizler (Sandviç yöntemi) 115
2.8.2.2.3 Homojen ve Heterojen İmmün Analizler 116
2.8.2.3 İmmün Analizler Arasından: ELISA 118
2.8.2.3.1 Doğrudan ELISA 119
2.8.2.3.2 Dolaylı ELISA 121
2.8.2.3.3 Sandviç ELISA 123
2.8.2.3.4 Kompetitif ELISA 124
3. GEREÇ VE YÖNTEM 126
3.1 Kimyasal Çalışmalar 126
3.1.1 Materyal ve Yöntem 126
3.1.1.1 Kimyasal Bileşikler 126
3.1.1.2 Yöntem 126
3.1.1.2.1 2-Okso-3*H*-benzoksazol 126
3.1.1.2.2 6-(2-Bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol 126
3.1.1.2.3 Tiyobenzamit Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi 127
3.1.1.2.4 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-Okso-3*H*-Benzoksazol Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 1-6) 127
3.1.1.2.5 Etil 2-[6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-Okso-3*H*-Benzoksazol-3-il]asetat Türevlerinin Sentez Yöntemi (Bilkeşik 7-12) 128
3.1.1.2.6 2-[6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)- 2-Okso-3*H*-Benzoksazol-3-il]asetik asit Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 13-18) 128
3.2 Analitik Kontroller 129
3.2.1 Erime Derecesi Tayini 129
3.2.2 İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller 129
3.2.2.1 Materyal 129
3.2.2.2 Yöntem 129
3.2.3 Spektrometrik Kontroller 130
3.2.3.1 IR Spektrumları 130
3.2.3.2 ^{1}H-NMR Spektrumları 130
3.2.4 Elementel Analizler 130
3.3 Biyolojik Etkinlik Çalışmaları 131
3.3.1 COX-1 Enzimi İnhibitör Aktivite Testi 131
3.3.1.1 Materyal 132

3.3.1.2 Yöntem 133
3.3.1.2.1 Numunelerin Hazırlanması 133
3.3.1.2.2 Set İçindeki Reajanların Hazırlanması 133
3.3.1.2.2.1 TxB_2 Standartlarının Hazırlanması 133
3.3.1.2.2.2 Yıkama Tamponunun Hazırlanması 134
3.3.1.2.3 Analiz Prosedürü 134
3.3.1.2.4 Hesaplamalar 136
3.3.2 COX-2 Enzimi İnhibitör Aktivite Testi 137
3.3.2.1 Materyal 137
3.3.2.2 Yöntem 138
3.3.2.2.1 Numunelerin Hazırlanması 138
3.3.2.2.2 Set İçindeki Reajanların Hazırlanması 139
3.3.2.2.2.1 PGE_2 Standartlarının Hazırlanması 139
3.3.2.2.2.2 Yıkama Tamponunun Hazırlanması 139
3.3.2.2.3 Analiz Prosedürü 139
4. BULGULAR 143
4.1 Kimyasal Çalışmalar 143
4.1.1 6-(2-Fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 1) 143
4.1.2 6-[2-(2-Florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol ... (Bileşik 2) 144
4.1.3 6-[2-(2-Klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 3) 145
4.1.4 6-[2-(4-Florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 4) 146
4.1.5 6-[2-(4-Klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 5) 148
4.1.6 6-[2-(4-Metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 6) 149
4.1.7 Etil 2-[6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 7) 150
4.1.8 Etil 2-[6-(2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il] asetat (Bileşik 8) 152
4.1.9 Etil 2-[6-(2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 9) 153
4.1.10 Etil 2-[6-(2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 10) 155
4.1.11 Etil 2-[6-(2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 11) 156
4.1.12 Etil 2-[6-(2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 12) 158
4.1.13 2-[6-(2-Fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 13) 159
4.1.14 2-[6-(2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 14) 160

4.1.15 2-[6-(2-(2-Klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 15) 162
4.1.16 2-[6-(2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 16) 163
4.1.17 2-[6-(2-(4-Klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 17) 165
4.1.18 2-[6-(2-(4-Metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 18) 166
4.2 Biyolojik Aktivite Çalışması 168
5. TARTIŞMA 170
6. SONUÇ 177
7. ÖZET 180
8. SUMMARY 181
9. KAYNAKLAR 182
10. ÖZGEÇMİŞ 191

II. ŞEKİLLER

Şekil 1: Araşidonik Asit Biyokimyasal Yolağı 8
Şekil 2: Prostanoidlerin Reseptörleri ve Doku Dağılımları 10
Şekil 3: COX-1 varyantları 12
Şekil 4: COX-1 ve COX-2'nin aktif yöreleri ve bağlanma yörelerinin şematik olarak Karşılaştırılması..... 14
Şekil 5: COX inhibitörü maddelerin *in vitro* tam kan analiz sonuçları..... 27
Şekil 6: VIGOR, CLASS, MEDAL, TARGET, ETORIOVER deneylerinin ..... kardiyovasküler ve gastrointestinal risk açısından karşılaştırılması 52
Şekil 7: TxA_2 oluşum ve etkilerini azaltan ilaçlar..... 60
Şekil 8: Elektromanyetik spektrum 83
Şekil 9: Mikrodalganın elektrik ve manyetik alan bileşenleri 84
Şekil 10: Etanolün açık kap mikrodalga ısıtması 91
Şekil 11: COX-1 ve COX-2 inhibisyonu için doz–cevap eğrisi..... 100
Şekil 12: İnsan tam kanında LPS (100 µg/mL) inkübasyonunu takiben PGE_2 ve serbert araşidonat salımının zamanla değişimi. 107
Şekil 13: Koagülasyonu takiben insan tam kanında TxB_2 üretimi. 107
Şekil 14: Antikor yapısı ve fonksiyonel kısımları..... 110
Şekil 15: Poliklonal antikorların çoklu antijen spesifiteleri 111
Şekil 16: Monoklonal antikorların tek tip spesifiteleri..... 112
Şekil 17: Monoklonal antikorların eldesi 113
Şekil 18: Tek basamaklı kompetitif immün analiz..... 114
Şekil 19: İki basamaklı kompetitif immün analiz..... 115
Şekil 20: Nonkompetitif (sandviç) analiz 115
Şekil 21: Homojen ve heterojen immün analizler 116
Şekil 22: ELISA'nın avantajları..... 117
Şekil 23: Doğrudan ELISA'nın uygulanışında a basamağı 120
Şekil 24: Doğrudan ELISA'nın uygulanışında b basamağı 120
Şekil 25: Doğrudan ELISA'nın uygulanışında c basamağı 121
Şekil 26: Dolaylı ELISA'nın uygulaması..... 122
Şekil 27: Kompetitif ve sandviç ELISA 124

III. TABLOLAR

Tablo 1: Bazı klasik nonsteroidal antienflamatuvar ilaç örnekleri 20
Tablo 2: Bazı diarilsikloalkanopirazol türevlerinin COX-2 ve COX-1 IC_{50} değerleri . 33
Tablo 3: Bazı siklohekzanopirazol türevlerinin COX-2 ve COX-1 IC_{50} değerleri 34
Tablo 4: Bazı bisiklik pirazol türevlerinin insan tam kanında yapılan in vitro analiz sonuçları.....39
Tablo 5: Radyasyon tiplerinin ve bağ enerjilerinin karşılaştırılması 83
Tablo 6: Çeşitli solvanların kayıp tanjant değerleri 86
Tablo 7: Tipik 1. derece reaksiyon için sıcaklığın zamanla ilişkisi.....89
Tablo 8: Mikrodalga destekli sentezlerde solvan etkisi 96
Tablo 9: NSAİ'nin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivitelerini değerlendirmekte kullanılan in vitro analizler.....101
Tablo 10: TxB_2 Test Plan Sayfası 134
Tablo 11: PGE_2 Test Plan Sayfası..... 140
Tablo 12: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 inhibitör aktivite test sonuçları.....168
Tablo 13: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite test sonuçları.....175
Tablo 14: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin erime derecesi, % verim % COX-1 ve % COX-2 inhibisyonları.....178

IV. KISALTMALAR

ABB	**:**	Antijen Bağlama Bölgesi
AHA	**:**	American Heart Association
APC	**:**	the Adenoma Prevention with Celecoxib
APPROVe	**:**	Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx
cAMP	**:**	Siklik adenozin monofosfat
cDNA	**:**	Complementary Deoxyribonucleic acid
CLASS	**:**	Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study
CLIA	**:**	Chemiluminescent Immun Assay
COX	**:**	Siklooksijenaz
Diglim	**:**	Dietilenglikol dimetil eter
DMF	**:**	Dimetil Formamit
EDGE	**:**	Etoricoxib Diclofenac Gastrointestinal Evaluation
EIA	**:**	Enzyme Immun Assay
ELISA	**:**	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMEA	**:**	European Medicines Agency
FDA	**:**	Food and Drug Administration
FPIA	**:**	Fluorescence Polarization Immun Assay
GI	**:**	Gastrointestinal
IL-1β	**:**	İnterlökin-1β
kb	**:**	Kilobaz
kDa	**:**	Kilodalton
5-LOX	**:**	5-Lipoksijenaz
LPS	**:**	Lipopolisakkarit
LTA_4	**:**	Lökotrien A_4
LTB_4	**:**	Lökotrien B_4
LTC_4	**:**	Lökotrien C_4
LTD_4	**:**	Lökotrien D_4
LTE_4	**:**	Lökotrien E_4
MEDAL	**:**	Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term
MI	**:**	Miyokard enfarktüsü
mRNA	**:**	Mesajcı Ribonükleik Asit
NO	**:**	Nitrik oksit
NSAİ	**:**	Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
PAF	**:**	Platelet aktive eden faktör
PG	**:**	Prostaglandinler
PGD_2	**:**	Prostaglandin D_2
PGE_2	**:**	Prostaglandin E_2
$PGF_{2\alpha}$	**:**	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
PGG_2	**:**	Prostaglandin G_2
PGH_2	**:**	Prostaglandin H_2
PGHS	**:**	Prostaglandin G/H sentaz
PGI_2	**:**	Prostasiklin

PPA	**:**	Polifosforik Asit
RIA	**:**	Radio Immun Assay
SRS-A	**:**	Slow Reacting Substance of Anaphylaxis
TARGET	**:**	Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial
TNF_{α}	**:**	Tümör Nekroze Edici Faktör α
TxA_2	**:**	Tromboksan A_2
TxB_2	**:**	Tromboksan B_2
TxRA	**:**	Tromboksan Reseptör Antagonistleri
TxSI	**:**	Tromboksan Sentaz İnhibitörleri
VIGOR	**:**	Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research Study

1. GİRİŞ

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAİ), antienflamatuvar, analjezik ve antipiretik aktiviteleri nedeniyle ve akut ve kronik enflamasyonlu rahatsızlıklarda kullanımlarıyla dünyada en fazla reçete edilen ilaç grubudur. Binlerce yıl öncesinde dahi ağrı, enflamasyon ve ateş tedavisinde salisilik asit içeren bitki ekstreleri kullanılıyordu. 1897 yılında NSAİ grubunun ilk üyesi olan Aspirin®'in keşfi ve 1971 yılında Vane ve arkadaşlarının, aspirin de dahil NSAİ'ın antienflamatuvar aktivitesi için moleküler hedeflerinin siklooksijenaz (COX) olduğunu ortaya koyması, bu grup ilaçlar için dönüm noktası niteliğinde keşiflerdir.[1,2] COX, prostaglandinleri (PG) de içeren çeşitli biyoaktif lipitlerin yer aldığı araşidonik asit yolağının ilk iki basamağını katalizler. [1,2]

Membran fosfolipitlerinden oluşan araşidonik asit siklooksijenazın aktivitesiyle prostaglandin G_2 (PGG_2)'ye dönüşür ve bu da dayanıklı bir yapı olmadığından prostaglandin H_2 (PGH_2)'ye redüklenir. PGH_2 ise damarlarlarda prostasikline (PGI_2), çeşitli dokularda prostaglandin D_2 (PGD_2), prostaglandin E_2 (PGE_2), prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) izomerlerine ve trombositlerde tromboksan A_2'ye (TxA_2) dönüşmektedir. Prostaglandin türevi bu maddeler, birçok değişik fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol alırlar.[3]

PG'ler hem fizyolojik süreçteki etkinliklerinden ötürü yararlı, hem de patofizyolojik süreçte yer almalarından dolayı zararlı etkilere sahip mediatörlerdir. Prostanoidler fizyolojik koşullarda gastrik mukozada sitoprotektif etkisiyle, hemostaz ve renal fonksiyonların yürütülmesinde önemli rol oynarken, enflamasyon, ateş, ağrı ve kanser gibi farklı patolojik durumlarda biyosentezleri indüklenir.[4] NSAİ ile COX inhibisyonu tüm PG'lerde ve aynı yolakta yer alan Tromboksan A_2 (TxA_2) seviyelerinde azalmaya neden olduğu için antienflamatuvar ve analjezik etkilerinin yanısıra özellikle gastrointestinal (GI) sistemde ciddi yan etkilere neden olmaktadır.[5,6]

Yıllarca COX enziminin tüm hücrelerde tek tip bir formunun olduğu düşünülmüştür. COX geninin 1988 yılında üç ayrı araştırma grubu tarafından klonlanmasının ardından 1991 yılında Needleman ve Herschman, çalışmalarıyla indüklenebilen, kısa ömürlü bir tipinin daha olduğunu ortaya koyması ile bu izoenzime COX-2, ilk bulunan izoenzime COX-1 denilmiştir. Bu iki izoformun yaklaşık % 60 amino asit homolojisine, yaklaşık aynı moleküler ağırlığa, uzunluğa, benzer üçüncül yapılara ve benzer aktif bölgelere sahip olduğu ortaya konulmuşur.[4,5,7]

COX-1, temel olarak tüm hücrelerde ve daha yüksek seviyelerde plateletlerde, vasküler endotel hücrelerinde, midede, gastrointestinal (GI) mukozada ve böbreklerde toplayıcı kanallarda sentezlenir ve salıverilir, ancak bazı hücrelerde hormon, büyüme faktörü gibi uyaranlara cevap olarak sentez ve salıverilmesinde en fazla 2-4 kat artış olur. COX-1 GI koruma, platelet agregasyonu, renal fonksiyonlar gibi homeostatik dengenin devamlılığında önemli role sahiptir.[5,8] COX-2 ise, aksine ağırlıklı olarak enflamatuvar hücrelerde ve ağrı, enflamasyon, ateş ve karsinogenezis gibi PG sentezine bağımlı patolojik süreçlerde yer alır. Enflamasyon (interlökin-1β [IL-1 β], tümör nekroze edici faktör [TNF_{α}], lipopolisakkarit [LPS]), onkojenik ve mitojenik faktörler (serum forbol esterleri), büyüme faktörleri, sitokinler, bakteriyel endotoksin gibi diğer uyaranlara cevap olarak sentez ve salıverilmesi 10-20 kat artmaktadır. COX-2 sentezi ve salıverilmesi tümör istilası (invazyon), anjiogenezis, metastaz gibi onkojenik süreçleri hızlandırır.[1,5,7,9,10]

COX-3 enziminin varlığına dair henüz netleşmiş bir fikir yoktur. Sıçan karregenan akciğer zarı iltihabıyla yapılan bir çalışmada COX-2 proteinlerinde 48. saatte proenflamatuvar prostanoidleri üreten ikinci bir artış gözlenmiş ve enflamasyonun rezolüsyon fazında oluşan bu proteinin üçüncü bir COX izoformu olabileceği fikri ortaya atılmıştır. Asetominofenin aktivitesi için COX-3'nin mümkün bir yöre olabileceği düşünülmüş ancak bu izoformun varlığı insanlarda ortaya konulmamıştır.[1]

Bu farklı sentez, salıverilme ve doku dağılımı COX-1 aracılı PG'lerin fizyolojik fonksiyonlardan sorumlu iken, COX-2 aracılı PG'lerin patofizyolojik ve enflamasyonlu süreçlerde yer aldığı hipotezinin gelişimine neden olmuştur. Bu hipotez, GI yan etkilerden yoksun antienflamatuvar aktivite için asıl moleküler hedefin COX-2 izoenzimi olduğu savıyla selektif COX-2 inhibitörü olarak bilinen yeni bir sınıfa çığır açmıştır. Hız kazanan çalışmalar ile COX-2'nin keşfinden ancak on yıl sonra non-ülserojenik, antienflamatuvar etkili selektif COX-2 inhibitörü Selekoksib (Celebrex® Pfizer) ve Rofekoksib (Vioxx® Merck) ilaç piyasasındaki yerini almıştır.

Selektif COX-2 inhibitörü antienflamatuvar bileşiklere ulaşmak için yapılan çalışmalarda; diaril yapısında olan heterosiklik bileşikler, (1,3-diaril[11] ve visinal diaril heterosiklikler[12]) 1,2-diariletilen türevleri (cis stilben türevleri), diaril veya aril/heteroaril eterler ve tiyoeter türevleri, diaril ve aril/heteroaril ketonlar, antioksidan bileşikler ve COX-2 selektivitesi yüksek, modifiye edilmiş bilinen nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlardan türetilen birçok farklı kimyasal yapıda bileşik sentezlenmiştir. Diaril heterosiklik yapıda olan bileşiklerde merkezi halka olarak; pirol, furan, oksazol, pirazol, tiyofen, tiyazol kullanılmış, fenil halkasının para konumunda aminosülfonil veya metilsülfonil grubunun olmasının ve diğer

halkada halojen bulunmasının selektif COX-2 inhibitör aktivite için önemli olduğu bildirilmiştir.[2,10,13,14] Tiyazol halkası içeren yapıların antienflamatuvar, analjezik, antipiretik aktivitesi olduğu da bildirilmiştir.[15,16]

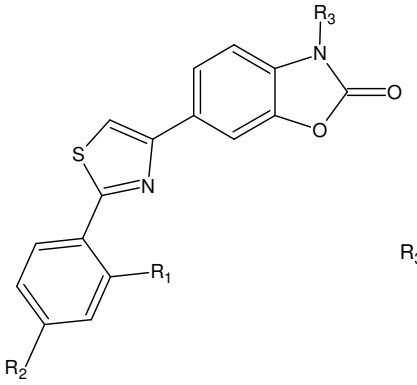
Selektif olarak sadece patolojik süreçlerde etkin olan enzimin inhibisyonu ile aktivite gösteren bu grubun klasik NSAİ'ye göre daha etkin ve güvenli olması beklenmiştir. Ancak bu grubun daha etkin antienflamatuvar ve klasik NSAİ'ye göre daha iyi tolere edildiğinin gösterilmesine rağmen bazı bileşiklerde ilaç güvenilirliği beklendiği gibi olmamıştır. COX-2 mRNA'sının beyin, böbrek, testis, vasküler endotel ve trakeada fizyolojik koşullarda varlığı ve homeostatik dengede etkin rolü olduğu ortaya çıkarılmıştır.[4,8,9] Bu nedenle, inhibisyonunun da yan etkilere neden olması şaşırtıcı bir sonuç olmamıştır. Selektif COX-2 inhibitörlerinin kullanımıyla ortaya çıkan özellikle kardiyovasküler sistemle ilgili ciddi yan etkiler nedeniyle Merck & Co. gönüllü olarak Vioxx®'u piyasadan çektiğini ilan etmiştir [17]. VIGOR (The **Vi**oxx **G**astrointestinal **O**utcomes **R**esearch), CLASS (**C**elecoxib **L**ong-term **A**rthritis **S**afety **S**tudy) ve APPROVe (**A**denomatous **P**olyp **Pr**evention **o**n **V**ioxx) çalışmalarıyla edinilen çelişkili sonuçlar bu kararda etkili olmuş[18], Ardından Celebrex® de aynı çekinceler nedeniyle toplatılmıştır.

Selektif COX-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler yan etkileri üzerindeki tartışmalar halen sürmektedir. İnsan damar içi endotelinde ağırlıklı olarak COX-2 ile etkinleşen doğal antitrombotik ajan olan PGI_2, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonun engellenmesi ve vazodilatasyon ile görevlidir. Trombositlerde COX-1 metaboliti olan TxA_2 ise vazokonstriksiyon, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve trombosit agregasyonunda görevlidir. Bir teoriye göre, selektif COX-2 inhibisyonu ile prostasiklinin etkinliği azalırken trombositlerde COX-1 aktivitesi inhibe olmadığı için TxA_2 etkinliğinin devam etmesi, bu iki ajan arasındaki denge bozmakta ve protrombotik ajan olan TxA_2 lehine kaydırmaktadır.[4,5,9,18] Ancak bu etkileyici hipotez, klinik çalışmalardan edinilen bulgularla doğrulanamamıştır. Bu nedenle, COX-2 inhibitörleri ile kardiyovasküler vakalar arasında bir ilişki varsa, bunu yalnızca COX-1 ve COX-2 inhibisyonu arasındaki dengesizliğe dayandırmaktan daha kompleks bir mekanizmaya ihtiyaç duyulduğu gözlenmiştir.[18]

Ciddi periferik vasküler rahatsızlıklar, miyokard enfarktüsü, stabil olmayan angina, gebeliğe bağlı hipertansiyon, astma, lupus nefritis, trombozis, koroner trombotik sendromlar gibi bir seri hastalıkta hastaların idrar ve kanında TxA_2'nin metabolitleri olan TxB_2 ve 2,3-dinor TxB_2'nin arttığı görülmüş ve bu hastalıklarda TxA_2'nin aşırı üretildiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, TxA_2'nin biyolojik etkilerini azaltan ilaçların, TxA_2

üretiminin arttığı durumlarda terapötik açıdan yarar sağlaması beklenebilir. Buna göre, Tromboksan sentaz enzimini inhibe etmek ya da TxA_2'nin etkileştiği TP reseptörlerini bloke etmek iki anahtar hedef olmuştur.[6]

Bu bilgiler ışığında, selektif COX-2 inhibisyonunun enflamasyon tedavisindeki önemi anlaşılmış olup kardiyovasküler yan etkilerinin de önüne geçebilmesi amacıyla antiplatelet aktivite göstermesi bakımından tromboksan sentaz enzimini de inhibe edebilecek etkide bileşiklerin sentezlenmesi ve aktivitelerinin incelenmesi düşünülmüş ve onsekiz molekül tasarlanmıştır. Tasarlanan bu bileşikler, 1,3-diaril heterosiklik halka yapısında olup merkez halka olarak tiyazol taşımaktadır ve merkezi halkanın meta konumlarından birinde antienflamatuvar etkinliğe katkısı olabilecek 2-okso-3*H*-benzoksazol ve diğerine de 2 ve 4 numaralı konumlarında -F, -Cl, $-OCH_3$ gibi küçük gruplar taşıyan fenil halkası bulunmaktadır. Bu yapıları itibariyle, 1,3-diaril heterosiklikler olarak bilinen selektif COX–2 inhibitörlerinin yapılarına benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu moleküllerin 12 tanesinden Tx sentaz inhibitörü etkili bileşikler ile benzer farmakoforik grup taşımalarından ötürü antiplatelet aktivite de beklenmektedir. Tasarlanan moleküllerin genel yapısı aşağıda gösterilmiştir.



R_1 = -H, -F, -Cl

R_2 = -H, -F, -Cl, $-OCH_3$

R_3 = -H, $-CH_2COOH$, $-CH_2COOCH_2CH_3$

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Enflamasyon Ve Araşidonik Asit Yolağı

Eikozanoidler, yirmi karbonlu yağ asitlerinden türeyen ve güçlü biyolojik etkinlik gösteren endojen maddelerdir. “Eikozanoid” adı Yunanca yirmi anlamına gelen “eicosa” dan gelir. Yirmi karbonlu yağ asidi iskeleti üzerinde var olan yapı değişikliklerine göre, doğrudan biyolojik etkinliği olan primer eikozanoidler değişik alt gruplarda toplanırlar. Bu alt gruplardaki maddeler, dokularda araşidonik asit ve diğer prekürsör yağ asitleri üzerine COX, LOX ve sitokrom P450 monoksijenaz enzimlerinin etkimesi sonucu oluşurlar.[19]

Araşidonik asit, fosfolipit hücre membranında en çok bulunan çoklu doymamış yağ asitidir. Çeşitli stimulanlarla fosfolipitlerden serbest yağ asitlerinin oluşumu için başlıca yolak olan Fosfolipaz A_2 yolağı aktive olur ve araşidonik asit membran fosfolipitlerinden serbestleştirilir. Araşidonik asidin daha ileri metabolizasyonu sonucu prostanoidler, lökotrienler, proinflamatuvar mediyatörler oluşur.[5]

Enflamasyon, çeşitli fiziksel ve kimyasal etkilerin, mikroorganizma ve parazit enfeksiyonlarının neden olduğu ve damar kas dokusu dahil bütün organlarda oluşan bir tepki reaksiyonudur. Kızarıklık, ödem, ağrı, artmış sıcaklık ve fonksiyon bozukluğu enflamasyonun belirtileridir.[20] Vazoaktif aminler, plazma faktörleri, platelet aktive eden faktör (PAF), sitokinler, nitrik oksit ve oksijen kaynaklı serbest radikaller, lizozomal unsurlar ve araşidonik asidin COX ve LOX metabolitleri enflamasyonun kimyasal mediyatörleridir.[21]

Araşidonik asitten COX katalizörlüğü ile oluşan prostanoidler, doku hasarı ve enflamasyon durumunda vücut cevabına aracılık ederler. PGE_2 ve PGI_2 enflamasyonda yer alan histamin, bradikinin gibi diğer otakoidlerle sinerji içinde hareket ederek kuvvetli vazodilatör olarak etkirler. Kapiller üzerindeki kombine etkileriyle enflamasyonun karakteristiklerinden biri olan kızarıklığa katkıda bulunurlar ve akut enflamasyon bölgesinde kan akışını artırırlar. Vasküler permeabiliteyi artırarak dokunun kabarıklığına neden olurlar. Ayrıca duyusal sinirlerin periferik uçlarında hassasiyeti artırarak hiperaljezi meydana getirirler. Dahası, PGE_2 nöronlar üzerine etkiyerek ateş, kırgınlık ve ağrı gibi enflamasyon göstergelerine verilen sistemik yanıta katkıda bulunur.[5]

Araşidonik asitin 5-LOX yolağından ortaya çıkan mediyatörü lökotrien A_4 (LTA_4)'tür. LTA_4'ün daha ileri enzimatik tepkimeleri sonucu oluşan lökotrien B_4, C_4, D_4 ve E_4 parakrin hormonlar olup geniş biyolojik aktivite gösterirler. LTB_4, enflamasyon hücreleri için kemotaktik etkinlik gösterir. Vazokonstriktif etkili LTB_4, kapiler permeabiliteyi arttırır ve hiperaljeziye neden olur.[19] Sisteinil lökotrienler (LTC_4, D_4, E_4) anaflaksinin yavaş etkiyen maddesinin (SRS-A) üç öğesini oluştururlar. Kuvvetli vazokonstriktif ve bronkokonstriktif etkilidirler. LTC_4 ve LTD_4 yüksek konsantrasyonlarda asit salgılanmasını tetikleyerek gastrik epitel hücrelerinde hasara neden olurlar. Ayrıca LTC_4 ve LTD_4; PGE, PGI_2 ve TxA_2'nin sentezini artırır. Sisteinil LT'ler, koroner arterlerde vazokonstriksiyon da yaparlar.[8,21] Etkili biyolojik aktivilerine bağlı olarak LT'ler bronşiyal astma, psoriaris, ülseratif ve diğer enflamasyonlu kolon hastalıkları, romatoit artrit, gut artriti gibi çok sayıda enflamatuvar ve alerjik hastalıkta önemli mediyatörlerdir.[19] Ek olarak, kanser gelişimi sırasında LT'ler doğrudan ya da büyüme faktörü bağımlı mitojenik yolakta hücre proliferasyonunu artırırlar.

2.1.1 Siklooksijenaz Ürünleri

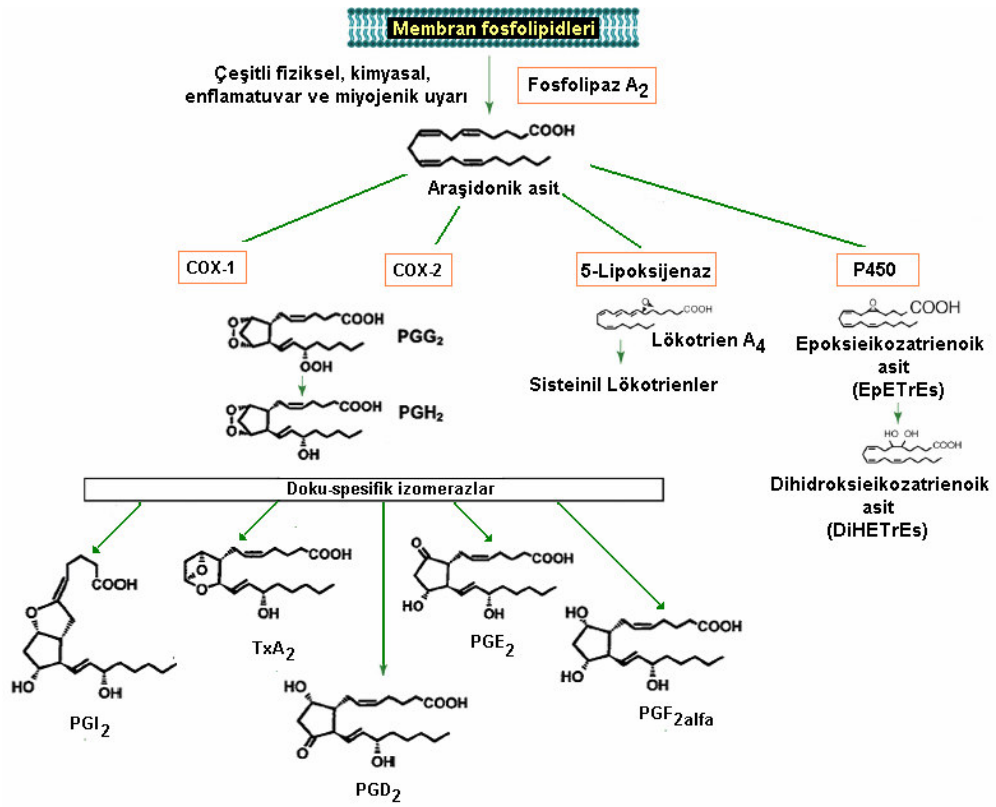
Prostanoidler olarak adlandırılan COX ürünleri eikozanoidler, prostaglandinler (PG), prostasiklinler ve tromboksanlardır. COX enzimleri, araşidonik asidin prostanoidlerin prekürsörleri olan PGG_2 ve PGH_2'ye dönüşümünü katalize eder. Bu nedenle, COX'un diğer adı da prostaglandin G/H sentaz (PGHS)'dır.

PG'ler karbon zincirinin ortasında bir siklopentan halkası bulunan eikozanoidlerdir. Halka ya da ona bağlı yan zincir üzerinde okso ve/veya hidroksil grubu içerirler; ayrıca alifatik zincir üzerinde bir, iki vaya üç çift bağ bulunur. Hepsinde ortak olan, C-13 ve C-14 arasındaki trans çift bağdır.

Siklopentan halkasındaki sübstitüentlerin durumuna göre E, F, D, A, B ve C diye gruplandırılırlar. Bu harfin yanına konulan sayı yan zincirdeki doymamış bağ sayısını gösterir. Halka üzerinde iki hidroksil içeren PGF'lerde ise bu sayının yanında stereoizomerlerini belirtmek üzere α / β simgeleri bulunur. PGI'ler, yapıca PG'lere çok benzemekle birlikte kimyasal farkı siklopentan halkasına ek olarak C-6 ve C-9 arasındaki oksijen atomu nedeniyle ikinci bir halka içermektedirler. Vücuttaki ana PGI, prostasiklin adı verilen PGI_2'dir. Tromboksanlarda ise siklopentan yerine 2,6-dioksabisiklo[3.1.1]heptan halkası vardır.[19]

2.1.2 Prostanoidlerin Biyokimyası

COX, iki farklı katalitik aktiviteye sahiptir; siklooksijenaz aktif bölgesinde iki molekül oksijen kullanarak araşidonik asidi PGG_2'ye dönüştürür, peroksidaz aktif bölgesinde 15-S hidroperoksit yapısındaki PGG_2'yi 15-S hidroksi yapısındaki PGH_2'ye redükler. Bu iki enzimatik aktivite, her bir izozim alt ünitesinde bir adet mevcut olan hem grubuna gereksinim duyar.[8] Ardından dayanıksız siklik endoperoksit olan PGH_2 çeşitli doku-spesifik sentaz ve izomerazlarla diğer prostanoidlere katalizlenir.[4,5] Hücrelerde oldukça yaygın bulunan endoperoksit E-izomeraz ile PGH_2'den PGE_2 oluşturulur. Bu da endoperoksit redüktaz ile $PGF_{2\alpha}$'ya indirgenir.[19] İnsanda sadece mast hücrelerinde ve trombositlerde bulunduğu gösterilen endoperoksit D-izomeraz, bu hücrelerde PGH_2'den PGD_2 oluşturulur.[19] Esas olarak damar ve kılcallarda yerleşmiş bulunan prostasiklin sentaz PGH_2'yi stabil olmayan PGI_2'ye çevirir. PGI_2 enzimatik olmayan hidrolizle hızlı bir şekilde 6-keto-$PGF_{1\alpha}$'ya dönüştürülür.[19] Trombositlerde bulunan tromboksan sentaz enzimi PGH_2'yi TxA_2'ye dönüştürür. TxA_2'nin yarı ömrü sulu ortamda 32 saniye kadardır, stabil fakat biyolojik olarak inaktif türevi olan TxB_2'ye yıkılır.[6]



Şekil 1: Araşidonik Asit Biyokimyasal Yolağı [22]

2.1.3 Prostanoidlerin Biyolojik Etkileri

Prostanoidler, hem otokrin hem de parakrin fonksiyonlara sahip biyoaktif lipitler oldukları için "lokal hormonlar" olarak da düşünülebilirler. Prostanoid oluştuktan sonra hücreden çıkar ve bulunduğu hücrede veya komşu hücrede ikincil mesajcıların seviyesini düzenlemek üzere G protein-bağlı reseptörler ile etkileşirler.[4,5] Prostanoidler genel kural olarak damar düz kaslarını gevşetirler, barsak, uterus gibi diğer yapıların düz kaslarını ise kasarlar.[19]

Kardiyovasküler sistem: PGD_2, PGE'ler ve PGI_2 güçlü vazodilatör etkinlik gösterir. Bütün damar yataklarında vazodilatasyon yaparlar ve kan basıncını düşürürler. PGI_2 büyük ölçüde damar endotel hücrelerinde yapılır ve trombositlerin gerek damar endoteline yapışmalarını (adezyon) ve gerekse birbirlerine yapışmalarını (agregasyon) önleyerek damar içinde trombus oluşumunu engelleyen en

önemli etkendir. Prostasiklin, tüm agonistlerce oluşturulan vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu, vasküler tonusu, lökosit-endotel hücre etkileşimlerini inhibe eder. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, insanlarda endotelyal PGI_2 biyosentezinden sorumlu ana izoenzimin COX-2 olduğunu göstermiştir.[4] Bu mekanizma, endotelden salıverilen nitrik oksit ile de pekiştirilir. [5,19]

TxA_2, bütün damar yataklarında güçlü vazokonstriksiyon yapar. TxA_2, doğrudan etkisiyle trombositleri aktive ederek onların agregasyonuna ve adezyonlarına neden olur; bu yönüyle PGI_2'ye zıt yönde etki yapar.[5,8,19] TxA_2 vasküler düz kas kontraksiyonu ve proliferasyonunun etkin bir tetikleyicisidir. Endotel göçünün ve angiogenezisin de mediyatörü olduğu gösterilmiştir.[4] TxA_2 vasküler permeabiliteyi artırarak ödeme neden olur.[5,8]

Bu bulgulara dayanarak, trombosit fonksiyonunun cAMP aracılığıyla etki yapan iki zıt faktör (TxA_2 ve PGI_2) tarafından düzenlendiği ileri sürülmüştür. Tromboz olayının kontrol altında tutulmasında PGI_2/TxA_2 oranı önemli rol oynar.[9,18,19]

PGE_1 ve PGE_2 kapiler permeabilitesini arttırır. Cilt içine enjekte edilmeleri halinde histamin gibi Lewis'in üçlü cevabını oluşturur.[19]

<u>Gastrointestinal Sistem</u>: PGE_1, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$ ve PGI_2 insana intravenöz enjekte edildiğinde mide asit salgısını inhibe ederler, gerek bazal salgılanmayı ve gerekse yemek, gastrik stimülasyon, kafein vb uyaranlarla oluşan salgılanmayı azaltırlar. PG'ler mide ve barsakta mukus salgısını ve pankreasın dış salgısını artırırlar. PGE'lerin ve PGI_2'nin mide ve diğer bazı dokularda saptanan bir etkisi de sitoprotektif (hücre koruyucu) etkidir; mukus salgısının artmasına, mukozal HCO_3^- salgısının artmasına, H^+ geri difüzyonunun azalmasına, mukozadan geçen kan akışının artmasına, mukoza epitelyumunun rejeneratif kapasitesinin gelişmesine neden olurlar.[5] Aynı etkinlik myokard, pankreas, karaciğer, beyin ve lökositler için de söz konusudur ve bu dokuları iskeminin zedeleyici etkisine karşı koruyabilirler.[19]

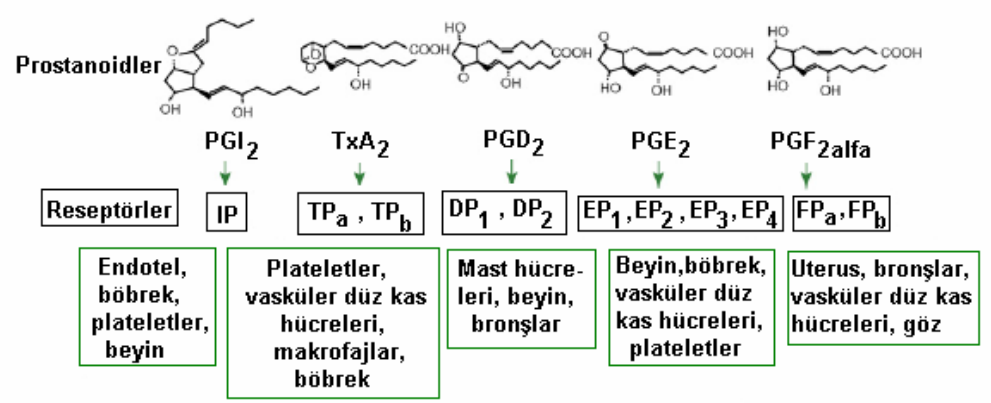
<u>Üriner Sistem:</u> PGI_2 böbreklerde kan akımını arttırır ve su, Na^+, K^+ ve Cl^- iyonlarının atılımını fazlalaştırır.[5,8] PGI_2, PGE_2 ve PGD_2 böbrekte güçlü vazodilatör etki yaparlar. Böbreklerde renin salıverilmesinde rol oynayan faktörün renal PG'lerden daha çok PGI_2 olduğu gösteren kanıtlar vardır. Güçlü vazokonstriktör olan TxA_2 ve

endoperoksit analogları renal damar yatağını büzer, glomerüler filtrasyon hızını, elektrolit ve su atılımını azaltır.[8,19]

Bronşlar: Akciğerlerde damar yatağında oluşan esas prostanoid prostasiklin, bronşlarda ise PG'lerdir. TxA_2 ve $PGF_{2\alpha}$ bronkokonstriktör etkiliyken, PGI_2 ve PGE_2 bronkodilatasyon yapar.[5,19]

Üreme Sistemi: İnsanda intravenöz olarak verilen PGE'ler ve PGF'ler uterusta oksitosik etki yapar, tonusu artırır ve ritmik kasılmalara neden olurlar.[5,8,19]

Santral Sinir Sistemi: PGE_1'in birçok türde güçlü piretik ajan olduğu bulunmuştur.[23] Enfeksiyon hastalıklarında oluşan ateşte, bakterilerin salgıladığı pirojenin bazı sitokinlerin sentez ve salgılanmasını artırdıkları, onların da hipotalamustaki termoregülatör merkezi PGE'lerin oluşumunu artırarak etkilediklerine inanılmaktadır. Beyinde en fazla PGE_2 bulunur. PGI_2 serebrospinal sıvıda bulunur ve kaynağı damar endotelidir. SSS'inde bulunan diğer bir mediyatör olan PGD_2'nin uykunun mediyatörü olduğu konusunda bulgular mevcuttur.[19]



Şekil 2: Prostanoidlerin Reseptörleri ve Doku Dağılımları

2.1.4 Siklooksijenazın İki İzoformu

1976 yılında COX-1 cDNA'sı koyun, fare ve insandan izole edilmiştir. 25Kb büyüklüğündeki gen insanda 9q32-q33.3 kromozomlarında yer almaktadır. Onbir ekson içerir ve 2,8 Kb'lık mRNA ve

yaklaşık 68 kDa moleküler ağırlıkta protein üretir. 1980'lerin sonlarına kadar, COX sentezinin büyüme faktörleri, tümör indükleyicileri, IL-1, LPS, TNFα ile stimüle edilebileceğine dair birçok rapor yayınlanmıştır. İlginç şekilde, glukokortikoidler yapısal olarak hücrelerde bulunan COX miktarını değiştirmediği, çeşitli uyaranlarla indüklenen bu proteinin indüksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu araştırmalar, Dan Simmons'un bu enflamatuvar mediyatörlere cevap olarak artan PG'leri değerlendirirken, bu indüksiyonların COX aktivitesinin muhtemelen diğer bir COX sentez ve salıverilmesindeki artışa bağlı olarak arttığına ve bunun nedeninin indüklenebilir ve COX amino asit dizilişi ile homolog ayrı bir gen olduğuna karar vermesiyle sonuçlanmıştır.[7,23,24]

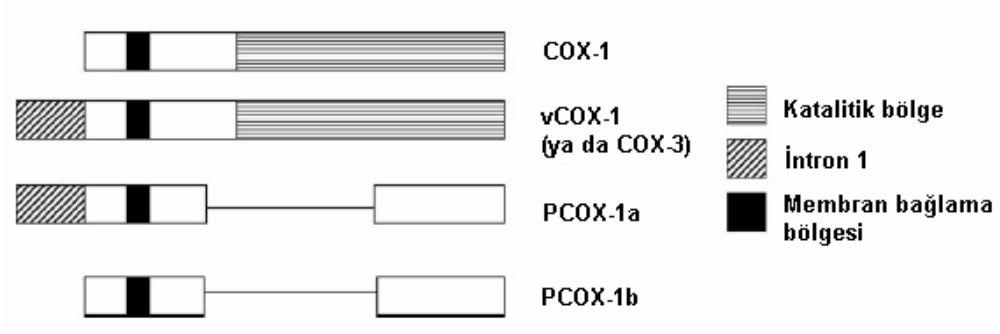
COX-1 ve COX-2 birbirinden ayrı iki gen tarafından türetilmektedir. COX-2 on ekson içeren, insanda 1q25.2-q25.3 üzerinde bulunan 8 Kb boyutunda bir gendir. 4,1 – 4,5 Kb'lık mRNA ve 68 kDa'luk protein üretir.[7,10,23] Ayrıca COX-1 ve COX-2 mRNA stabilitesi ve araşidonik asit substrat havuzunun kullanılması açısından da birbirinden farklıdır.[7] Bu görece küçük genomik boyutu ile COX-2, geniş çeşitililikte hücresel uyarana karşı hızlı ve geçici cevap oluşturmak üzere aktive olan bir gen sınıfının karekteristik özelliklerinden birine sahiptir. Ayrıca, NFkB, AP-2, NF-IL-6 gibi çoklu 5' transkripsiyon faktörleri COX-2'de mevcutken, COX-1'de yoktur. COX-1'de gen büyüklüğü ağır basarken, COX-2'de mRNA büyüklüğü öne çıkmaktadır (COX-2 mRNA'sı 4,1 Kb, COX-1 mRNA'sı 2,8 Kb). Bu boyut farklılığı, COX-2 mRNA'sı üzerinde daha genişçe olan translasyona uğramamış 3' bölgesinden kaynaklanmaktadır. Bunun gibi öğeler COX-1 mRNA'sında yoktur.[8]

COX-1'i COX-2'den ayıran diğer önemli fark COX-2'nin keşfindeki esas dayanak olan, birçok uyarana karşı indüklenen gen sentez ve salımına verdikleri cevaptır. COX-2 sentezi ve salıverilmesi birçok hücre tipinde bakteryal endotoksin, IL-1, IL-17, TNFα gibi sitokinler, epitelyal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri, forbol esterleri gibi mitojenler ile indüklenir. COX-1'in ise çeşitli hücrelerde verdiği cevap çok zayıf olmakla birlikte IL-1 ve forbol esterleriyle indüklendiği görülmüştür.[8]

COX-2'nin keşfinden onbir yıl sonra Daniel Simmons köpek beyninde COX-1 ve COX-2'den farklı olan ve parasetamol ile inhibisyona duyarlı bir COX enzimini tanımlamıştır.[25] Saflaştırılmış COX-1 ve COX-2'nin parasetamol ile inhibe olması için *in vivo* inhibisyona kıyasla daha yüksek konsantrasyonun gerektiğini fark etmişler ve böylece enzimin henüz keşfedilmemiş başka izoformlarının olabileceği fikri gündeme gelmiştir. Apoptopik hücre hatlarında LPS ile indüklenmiş COX-2'ye kıyasla parasetamolün daha duyarlı olduğu farklı COX-2 izoformları gözlemlemişler, buna dayanarak COX-2'nin iki farklı katalitik formu

olabileceğini ve COX-3'ün COX-2 tarafından türetilen bir protein olduğunu öne sürmüşlerdir.[24-26]

Bazı araştırmacılar da bu enzimin COX-1 ile aynı genden türediğini öne sürmüşlerdir. Enflamasyonda salınan PG türlerinin zaman içerisinde değişmesi, başlangıç safhalarında artan PGE_2'nin COX-2 inhibitörleri ile azalması, ancak enflamasyonun zamanla kendiliğinden hafiflediği dönemde PGD_2'nin artması gözlemlerine dayanarak bu geç aşamadaki PG'in COX-3'e bağlı olarak sentezlendiği fikrini savunmuşlardır. COX-1 gibi membran bağlı bir protein olan bu varyantın siklooksijenaz aktivitesinin COX-1'e göre %80 az olduğu ve köpek beyni ve kalbinde sentezi ve salıverilmesi bildirilmiştir. COX-3'ten başka iki kısa COX-1 varyantı daha tanımlanmış ve bunlara da PCOX-1a ve PCOX-1b denmiştir. Bu iki inaktif kısa COX-1 varyantının fonksiyonları bilinmiyor. Bunlar arasında sadece COX-3'ün siklooksijenaz aktivitesi belirlenmiştir.[24,27]



Şekil 3: COX-1 varyantları [27]

Sonuç olarak, COX-3 izozimi insanlarda saptanmamıştır. İnsanlarda COX-1 geninin dizilişi, köpek COX-3'ü ile karşılaştırıldığında, ilk intronun ilave nükleotid içerdiği görülmüştür. Köpeklerde varlığına işaret olabilecek hiçbir çalışma insanlara uyarlanabilecek gibi gözükmemektedir.[27]

2.1.4.1 Enzim Yapıları

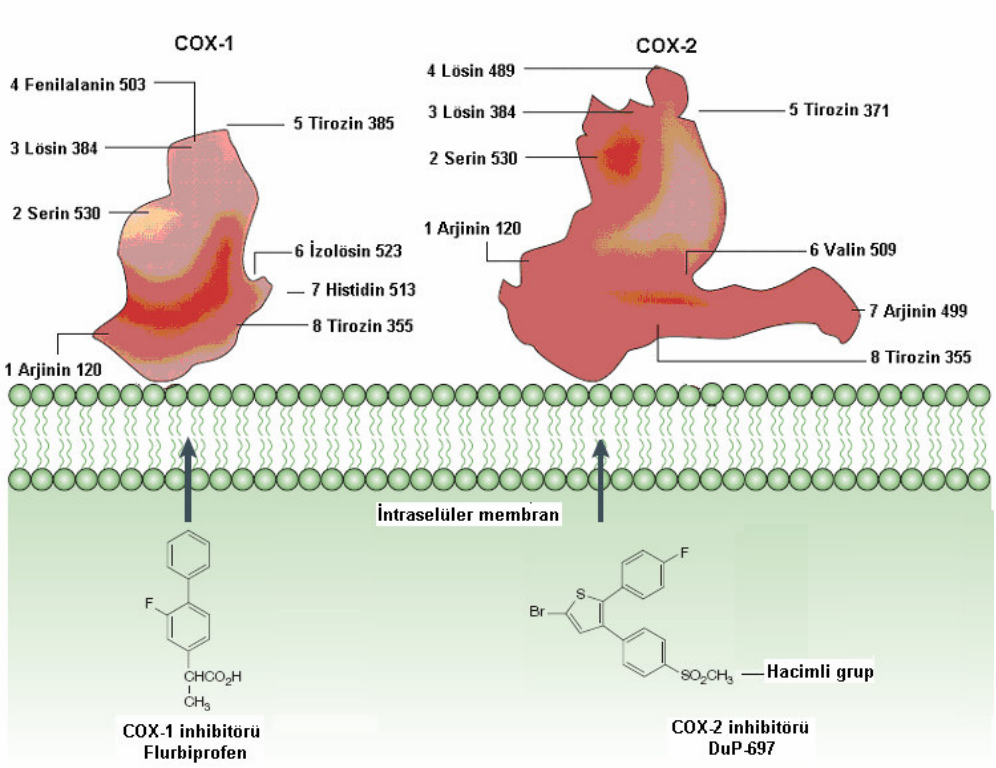
COX enzimleri, endoplazmik retikulumda bulunan integral membran enzimlerindendir ve endoplazmik retikulumun lümenal yüzeyine yerleşmişlerdir. COX-2 ayrıca çekirdek kılıfında da vardır.[5,8,23] Endoplazmik retikulumun posttranslasyonel sürecinin ardından sinyal

peptitte bölünme ve endoplazmik retikulum membranına yerleşmesiyle COX-1 ve COX-2 sırasıyla 67000 ve 72000 Daltonluk ağırlıklarına ulaşır. Siklooksijenaz ve peroksidaz mekanizmaları, iki izozim için hemen hemen aynı olmakla birlikte yağ asitleri substrat tercihlerindeki küçük farklılıklar COX-2 aktif yöresinin COX-1'e kıyasla daha büyük olduğunu düşündürmüştür. Her iki enzimde de amino asit dizilişleri çok benzerdir ve bu iki enzim homodimerdir. COX'ların üçüncül ve dördüncül yapıları ise hemen hemen aynı üç katlanma bölgesinden oluşmaktadır;[5,8,9]

- N-Terminal epitelyal büyüme faktörü (EGF) benzeri bölge
- α- Heliks membran bağlama bölgesi
- COX aktif yöresini içeren C-terminal globüler katalitik bölge

2.1.4.1.1 COX-1 ve COX-2'nin Substrat ve İnhibitör ile Bağlanmasından Sorumlu Yapıları

Koyun COX-1 enziminin ve fare ve insan COX-2 enziminin yapıları X-ışını analizleri ile çözümlenmiştir. Her iki COX iskeleti de katalitik merkezden membran bağlama yöresinin dış yüzeyine kadar genişleyen bir kanal ortaya koyar. Membrandan serbestleşen araşidonik asitin PGG_2'ye siklize olacağı bölge olan COX aktif yöresine ya da kanala girişini sağlamak üzere, COX-1 ve COX-2'nin membran bağlama yöresi plazma membranının iç yüzeyinde birleşmiştir. Birçok NSAİ, COX aktif yöresine bağlanmak üzere araşidonik asit ile yarışır. Kanalda substrat/inhibitör bağlanmasında sekiz amino asit kalıntısının etkin rolü vardır. Browner aktif yöreyi çevreleyen bu amino asitleri, inhibitörler ile doğrudan temas edenleri birinci kabuk, inhibitörler ile doğrudan temas etmeyenleri ikinci kabuk olarak tanımlamıştır. Amino asitlere verilen numaralar COX-1 ve COX-2'de amino asit dizisindeki yerlerini belirtmek içindir.[9]



Şekil 4: COX-1 ve COX-2'nin aktif yöreleri ve bağlanma yörelerinin şematik olarak karşılaştırılması [24]

Katalitik Merkez: COX-1'deki tirozin 385 (COX-2'deki homolog karşılığı tirozin 371) kanalın en üst kısmına yerleşmiştir ve hem grubu ile beraberce katalitik merkezi temsil ederler.[9,24]

Açilleme Yöresi: COX-1'de serin 530 hidroksili (COX-2'de serin 516) açillemenin ve aspirin tarafından geri dönüşümsüz COX-1 inhibisyonunun hedef yöresidir.[23,24] X-ışını analizleriyle serin 530'un ilave bir fonksiyonu aydınlatılmıştır. Bu polar amino asit, indometasin gibi inhibitörlerle benzoil fonksiyonundan, diklofenak, meklofenamat gibi inhibitörlerle amin grubunundan bağlanır.

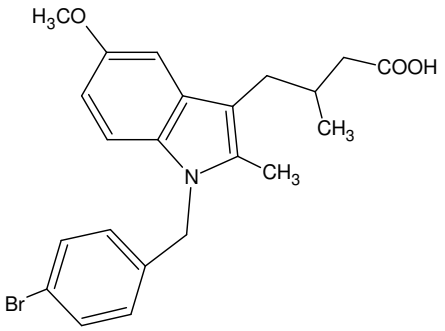
Yan Cep ve İlave Boşluk: COX-2'nin iki yapısal özelliği selektif COX-2 inhibitörlerinin bağlanma duyarlılığının nedenidir. COX-1'de izolösin 523 yerine COX-2'de daha küçük bir amino asit olan valin 509 varlığı merkez-COX kanalına komşu olan yan cebe girişe izin verir. Ek olarak, COX-1'de histidin 513'ün COX-2'de arjinin 499 ile değişmesi

COX-2 inhibitörlerinin sülfon grubu ile hidrojen bağı yapmak için bir yöre oluşturur.[5,9,24]

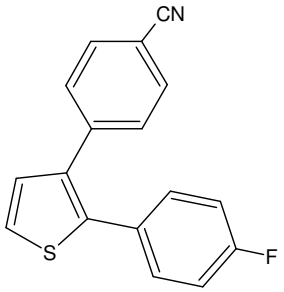
Kanalın üst kısmına ait diğer bir fark, ikinci kabuk amino asitlerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. COX-1'de fenilalanin 503'e karşılık COX-2'de lösin 489 vardır ve bu COX-2'deki daha küçük amino asit, birinci kabuk amino asiti lösin 384'e COX-2 bağlama bölgesinin en üst kısmında ilave bir boşluk yaratır. Böylece COX-2 aktif yöresinin COX-1'e kıyasla % 25 büyük olması nedeniyle daha büyük inhibitör bileşiklerin bağlanması mümkün olur.[4,9,24]

İyonik Bağlanma: Arjinin 120 (COX-2'de arjinin 106) aktif yöredeki en az yüklenen amino asitlerden birisidir. Araşidonik asit de asidik COX inhibitörleri gibi karboksilat anyonuyla arjinin 120'nin guanidinyum katyonuna bağlanır. Bu bağlanmalar COX-1 ve COX-2 için araşidonik asit, flurbiprofen, indometasin ve türevleriyle X-ışını kristalografisinde gösterilmiştir.[9]

NSAİ bağlanmasında COX-2'deki arjinin 106'nın rolü biraz daha farklılaşmıştır. COX-2 selektif inhibitörlerden asidik sülfonamitler (NS-398, flosulid) ve flurbiprofen arjinin 106'nın yokluğuna duyarlı iken, aynı amino asitin yokluğundan DuP 697 gibi non-asidik inhibitörler, COX-2 selektif L-761,066, COX-1 selektif L-745,296, diklofenak, meklofenamat etkilenmemiştir.[9]



L-761,066



L-745,296

Hidrojen bağı yapma: COX-1'deki arjinin 120 (COX-2'de arjinin 106), histidin 513 (COX-2'de arjinin 499) ve tirozin 355 (COX-2'de tirozin 341), glutamik asit 524 (COX-2'de glutamik asit 510) hidrojen bağlanma bölgesini oluşturan iki amino asit grubudur. Glutamik asit 524, tirozin 355, histidin 513 (arjinin 499) substrat ve inhibitörlerin bağlanması

esnasında baskındır. Arjinin 120, glutamik asit 524 ve tirozin 355'inin hidrojen bağı etkileşimlerinin ise geri dönüşümsüz substrat bağlamasında baskın rol oynadığı öne sürülmüştür. Ayrı bu iki hidrojen bağlanma grubunun COX enziminin allosterik aktivasyonundan sorumlu olduğu düşünülmüştür. COX-2 inhibisyonunun zamana bağlı olmasının ve COX-2 selektif NSAİ'nin allosterik enzim aktivasyonu ihtiyacı nedeniyle COX-1 aktivitesindeki azalışın bugüne kadar yapılmış en iyi yapısal açıklaması bu hidrojen bağlama bölgelerinin davranışlarıyla açıklanmıştır.[9]

2.1.4.2 Doku Dağılımları

Genel anlamda COX-1 enzimi üretildiği hücrelerde sürekli sentez edilmesi nedeniyle tüm vücutta mevcutken, COX-2 sadece enflamasyon yöreleri ve patolojik şartlarda bir uyaran etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, birçok inceleme ile COX-1 ve COX-2 arasında daha karmaşık bir ilişki olduğu saptanmıştır; COX-2'nin patolojik olaylara katkısı olan, COX-1'in ise fizyolojik homeostazın sağlanmasından sorumlu olduğu görüşünün tam olarak doğru olmadığı ileri sürülmüştür.[8,24]

COX-1, mide-barsak kanalının epitel hücrelerinde, damar endotelinde, trombositlerde, böbrek glomerül ve tubulus hücrelerinde ve vezikula seminaliste görece fazla miktarlarda bulunur. Bu yerlerde koruyucu ve fizyolojik işlev görür.[19]

COX-2 enziminin ve mRNA'sının birçok doku ve organda sürekli olarak bulunduğu ve duruma göre indüklendiği belirlenmiştir. Santral sinir sistemi, beyin, mide, vasküler endotel, pankreatik adacık hücreleri, böbrek başta tubulus ve toplayıcı kanal hücreleri olmak üzere bazı hücrelerde bazal durumda mevcut olduğu görülmüştür.[4,7,8] Böbrekte macula densa'da saptanmış ve tuz kısıtlaması olduğunda indüklendiği görülmüştür.[8] Omurilikte bulunduğu ve enflamasyon ve ağrılı uyaranlarla indüklendiği belirlenmiştir.[19]

Gastrointestinal kanal mukozasında epitel dışında kalan diğer hücreler COX-2 sentezlediği ve salıverdiği için COX-2'nin de tıpkı COX-1 gibi fizyolojik PG üretimine ve sitoprotektif etkiye katkıda bulunduğu belirlenmiştir. COX-2 tercihli ya da selektif inhibitörlerin daha az GI yan etkilere neden olduğuna dair güçlü kanıtlar olmasına karşın, eğer ülseratif ya da kolonik hasar mevcutsa, bu enflamatuvar lezyonun COX-2 sentez ve salıverilmesini arttırdığı, bu nedenle de selektif COX-2 inhibisyonunun tıpkı NSAİ gibi lezyonda kötüleşmeye ve yara iyileşmesinde gecikmeye neden olduğu da görülmüştür.[7-9,19]

COX-2, uterus epitelinde hamileliğin çeşitli dönemlerinde sentezlenir ve salıverilir; hamileliğin başlangıcında ovumun harekete geçmesinde ve plasenta oluşumu için gerekli anjiyogenezise katkıda bulunur ve hamilelik döneminin sonlanmasında da doğum eyleminin başlamasında rol oynar.[5,8,19]

COX-2 damar çeperinde antiaterojenik ve antitrombotik etkili olan prostasiklinin oluşumunu destekler.[19]

2.2 Non-Steroidal Antienflamatuvar İlaçlar

Aspirin ve ilgili NSAİ analjezik, antienflamatuvar ve antipiretik etkileri nedeniyle romatoit artrit, osteoartrit, psoriaris, astma gibi akut ve kronik enflamasyonlu hastalıklarda, dünyada en yaygın kullanıma sahip ilaç gruplarındandır.[15]

Geçen yüzyıl boyunca NSAİ çok yaygın kullanılmasına rağmen, 1971 yılında Vane bu ilaçların moleküler hedefi olan COX enzimini teşhis edene kadar etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır.[5,7,23] 1971 yılında Vane, aspirinin antienflamatuvar, antipiretik ve analjezik aktiviteye sahip oluşunun nedenini açıklamış, aspirin ve diğer NSAİ'nin etkilerini enflamasyon, şişlik, ağrı ve ateşe neden olan PG'lerin oluşumunu katalize eden ve günümüzde siklooksijenaz olarak bilinen bir enzimi inhibe ederek gösterdiklerini bulmuştur.[7,23]

NSAİ, zayıf analjezik olarak tanımlansa da, enflamasyon kaynaklı ağrılarda narkotik analjeziklerden daha iyi analjezik aktivite de gösterebilirler.[20] Prostasiklin ve diğer PG'ler, en başta gelen hiperaljezik ağrı mediyatörleridir ve NSAİ hiperaljezik komponenti baskı altında tutarak ağrı kesici etkilerini gösterirler.[7,20]

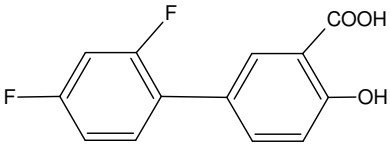
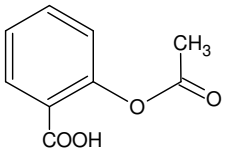
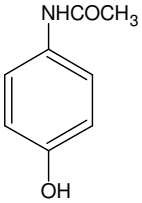
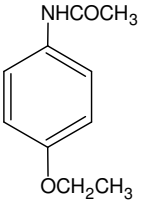
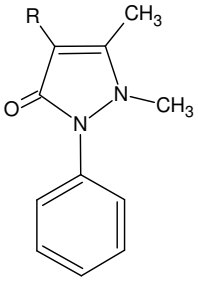
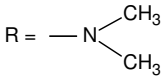
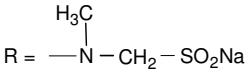
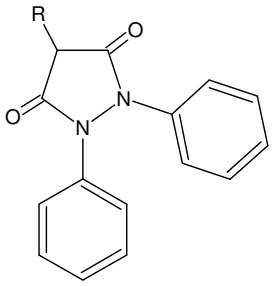
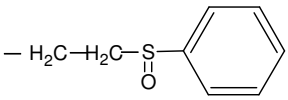
1899'da Aspirin romatoit hastalıklarını tedavi etmek üzere ortaya çıkan ilk güçlü ilaçtır.[23] 1940'larda fenilbutazon, 1950'lerde fenamatlar, 1960'larda indometasin, 1970'lerde propiyonatlar ve 1980'lerde oksikamlar geliştirilmiştir.[24]

Çoğu klasik NSAİ asidiktir, kimyasal yapılarındaki çok çeşitli farklılıklara karşın, hepsinde araşidonik asitte olduğu gibi bir karboksilat anyonu vardır ve COX aktif yöresinde alt kısımdaki arjinin 120 ile iyon çifti meydana getirirler. Bu şekilde COX aktif yöresiyle etkileşim geri dönüşümlüdür.[4,5,23] Aspirin ise farklı olarak COX'u geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. COX-1 serin 530'unu asetilleyerek araşidonik asidin COX kanalının katalitik bölgesine geçişini engeller. Aspirin ile COX-2 serin 516'sının geri dönüşümsüz asetilasyonu sonucu enzim araşidonik asidi PGG_2'ye dönüştüremezken, 15-*R*-hidroksieikozatetraenoik aside dönüşümü devam eder.[4,23]

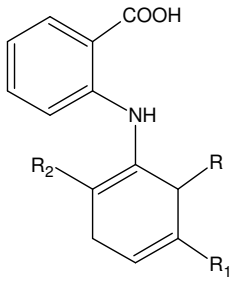
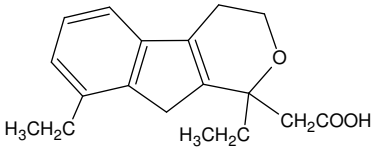
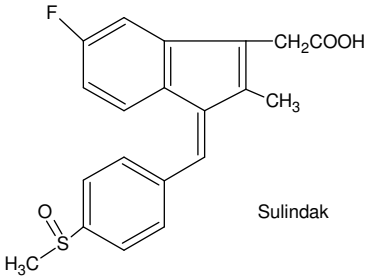
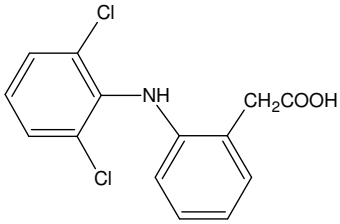
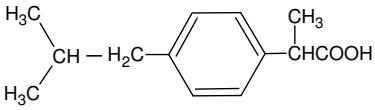
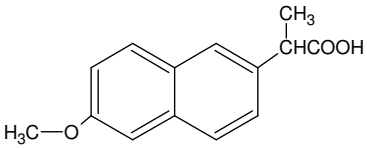
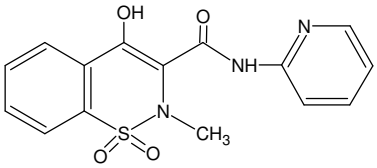
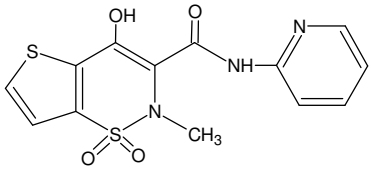
NSAİ, klasik (nonspesifik) NSAİ ve selektif COX-2 inhibitörleri olarak iki ana başlık altında toplanabilir.[5] Klasik NSAİ kimyasal yapılarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler;[9,19,20]

1. Salisilatlar (aspirin ve sodyum salisilat)
2. para-aminofenol türevleri (asetaminofen, fenasetin)
3. Pirazolon türevleri (aminopirin, dipiron, fenilbutazon, oksifenbutazon)
4. N-Arilantranilik asit türevleri ([=fenamatlar] mefenamik asit, flufenamik asit, etofenamat)
5. Aril, heteroarilasetik asit ve propanoik asit türevleri
   - İndolasetik asit türevleri (indometasin, etodolak, sulindak)
   - Pirolasetik asit türevleri (zomepirak, klopirak, tolmetin)
   - Fenilasetik asit türevleri (diklofenak)
   - Fenilpropiyonik asit türevleri (ibuprofen, ketoprofen)
   - Naftalenpiropiyonik asit türevleri (naproksen)
6. Enolik asit - Oksikamlar (piroksikam, tenoksikam)

Tablo 1: Bazı klasik nonsteroidal antienflamatuvar ilaç örnekleri

1. Salisilik asit türevleri	 Diflunisal  Aspirin
2. para-Aminofenol türevleri	 Parasetamol  Fenasetin
3. Pirazolon türevleri	  Aminofenazon  Dipiron  Fenilbutazon  Sulfinpirazon

Tablo 1' in devamı.

4. Fenamatlar	 R: $-CH_3$, R_1: $-CH_3$, R_2: $-H$ — Mefenamik Asit R: $-H$, R_1: $-CF_3$, R_2: $-H$ — Flufenamik Asit R: $-Cl$, R_1: $-CH_3$, R_2: $-Cl$ — Meklofenamik Asit
5. Aril, heteroaril asetik asit ve propanoik asit türevleri	 Etodolak  Sulindak  Diklofenak  Ibuprofen  Naproksen
6. Enolik asitler	 Piroksikam  Tenoksikam

NSAİ, COX enzimlerini birbirinden ayrı, çoğu geri dönüşümlü yarışmalı tipte birçok mekanizma ile inhibe eder. Çeşitli COX inhibitörleriyle yapılan kinetik profil analizlerinde Gierse ve arkadaşları enzim inhibisyon tipleri için dört ayrı model tanımlamışlardır;

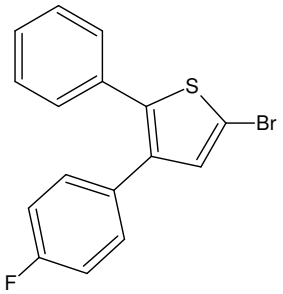
- basit kompetitif inhibisyon (ibuprofen),
- zamana bağlı, zayıf bağlanma ile inhibisyon (naproksen ve oksikamlar),
- zamana bağlı, sıkı bağlanma ile inhibisyon (indometasin),
- geri dönüşümsüz kovalent bağlanma ile inhibisyon (aspirin) şeklindedir.[24]

Tüm klasik NSAİ, aynı terapötik özellikleri paylaşırlar ve hepsi PG'lerin sentezindeki anahtar enzimi inhibe ederek mide mukozasının korunmasında, böbrek fonksiyonlarının devamlılığında ve gerektiğinde plateletlerin agregasyonunda fizyolojik olarak gerekli PG'lerin üretimini de inhibe ettikleri için yüksek dozda erozyon, ülserasyon, kanama hatta ölümle sonuçlanabilen GI ve renal toksisiteye neden olur. Bu sonuç, aspirin benzeri ilaçların hem terapötik hem de yan etkileri için ortak bir açıklama sağlar.[5,23] Bu nedenle, güçlü antienflamatuvar ve analjezik etkiyi koruyacak ve GI yan etkileri en aza indirgenmiş yeni bir sınıf olan selektif COX-2 inhibitörlerin gelişimi tetiklenmiştir.[5,7] İndüklenebilen izoform kavramıyla tanışılmadan önce, bu sınıfın ilk örnekleri hayvan modellerinden gelmiştir. Nimesulid, meloksikam ve etodolak, artmış güvenlik profiline sahip ilk NSAİ'dir. Bu maddeler üzerine yapılan çalışmalar ile, etkilerini indüklenen ikinci izoforma öncelikli bir inhibisyon yaparak gösterdikleri bulunmuştur. Günümüze kadar 500'ü aşkın selektif COX-2 inhibitörü tasarlanmıştır.[5]

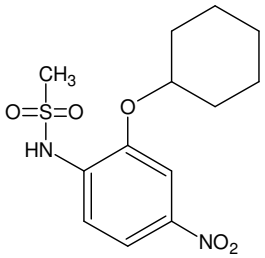
2.3 Selektif COX-2 İnhibitörleri

COX-2'nin enflamasyonda yaygın enzim olarak düşünülmesi bu enzimin inhibisyonunun NSAİ için hedef olabileceği fikrini doğurmuştur. NSAİ'de görülen ciddi yan etkiler COX-1'e bağlanıp, "COX-2 inhibisyonu iyi - COX-1 inhibisyonu kötü" hipotezi gelişmiştir. Ancak ayrı ayrı COX-2 ve COX-1 enzimleri olmayan farelerde yapılan çalışmalarda sonuçlar beklendiği gibi olmamıştır. COX-1'den yoksun farede ülser meydana gelmemiş ve indometasin ile oluşturulan ülser, normal farelerdekine göre daha az gözlenmiştir. COX-2'den yoksun farelerde de, enflamasyonda baskın enzimin COX-2 olmasıyla çelişkili şekilde normal bir enflamatuvar cevap gelişmiştir.[24]

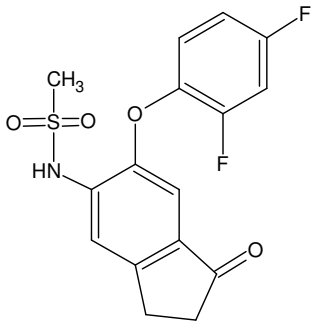
1990 yılında henüz COX-2 keşfedilmemişken, DuP 697 ülserojenik özellikleri indirgenmiş etkili bir antienflamatuvar ajan olarak yayınlanmıştır.[24,28] GI yan etki açısından bu güvenilirlik, ilk önce çoğu karboksilik asit fonksiyonu taşıyan diğer COX inhibitörlerinden farklı farmakokinetik özellik kazandıracağı düşüncesiyle molekülün taşıdığı tiyofen halka yapısına bağlanmıştır. Benzer düşünceler, NS 398 ve flosulid (CGP28238) için de ileri sürülmüştür.[24] Ancak COX-2'nin keşfi ile bu maddelerin etkilerini baskın olarak COX-2 izoenzimini inhibe ederek gösterdikleri kısa süre içerisinde ortaya koyulmuştur. Daha sonra yapılan araştırmalarda DuP 697 ve NS 398 1992'de selektif COX-2 inhibitörü olarak tanımlanmışlar ve selektif COX-2 inhibitörü olarak tanımlanan ilaçlar için başlangıç noktasını oluşturmuşlardır.[24]



DuP 697



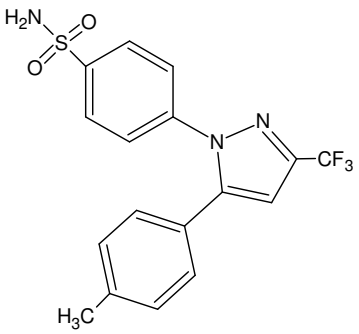
NS 398



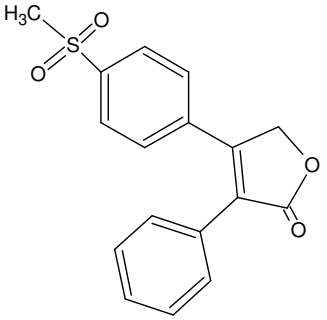
Flosulid

Bu çalışmaların ışığında, selektif COX-2 inhibitörü ilaç geliştirmek için ilk yapılan çalışmalar, pirazol halkasının 1 ve 5 konumlarında, para konumunda sülfonamit ve metilsülfonil fonksiyonu taşıyan fenil sübstitüe türevler üzerinde başlatılmıştır.[24] Daha sonraki yıllarda, 1,5-diarilsübstitüepirazol türevleri selektif COX-2 inhibitörü bileşik geliştirmek için çalışılan en önemli yapılar olmuştur.[2,10,26]

SC 58635 *in vitro* analizler sonucunda yüksek COX-2 selektif inhibitör aktivite göstermiş ve klinik öncesi çalışmalar ile rodentlerde enflamasyon, ağrı ve ateş tedavisinde yüksek etkinlikte bulunmuştur.[24] İnsanlarda osteoartrit, romatoit artrit ve ameliyat sonrası ortaya çıkan ağrılarda plasebo ya da naproksen, ibuprofen, diklofenak gibi NSAİ'ye karşı test edildiğinde elde edilen sonuçlar bu aktiviteyi doğrulamıştır. Platelet ve gastrointestinal yan etkiler üzerindeki insidansın azaldığı da doğrulandıktan sonra 2000 yılında İngiltere'de "selekoksib" adıyla osteoartrit ve romatoit artrit tedavisi için ruhsatını almıştır. 2001 yılında da Merck metilsulfonilfenil serisinden MK 0966 kodlu maddeye "Rofekoksib" adıyla ruhsat almıştır.[24] Bu maddeler, tam kanda yapılan *in vitro* değerlendirmede COX-1/COX-2 IC_{50} değerleri selekoksib için 30, rofekoksib için 272 olarak hesaplanmıştır (Şekil 5).

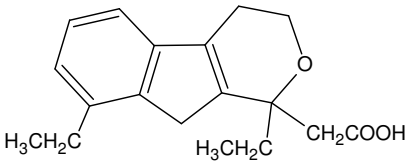


Selekoksib

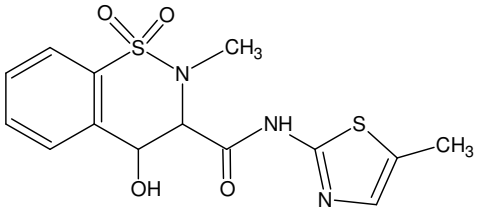


Rofekoksib

COX-2 enziminin sırrının çözülmesinden önce yaklaşık aynı zamanlarda enolkarboksamit yapısında meloksikam, tetrahidropiranoindol yapısında etodolak üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Bu ilaçlar yüksek gastrointestinal toleranslarıyla diğer NSAİ'den farklıdırlar. *In vitro* çalışmalar ile de meloksikam ve etodolakın COX-1/COX-2 selektivitesi yeni ajanlar kadar yüksek bulunmuştur.[24]

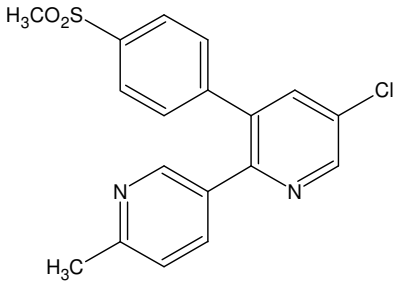


Etodolak

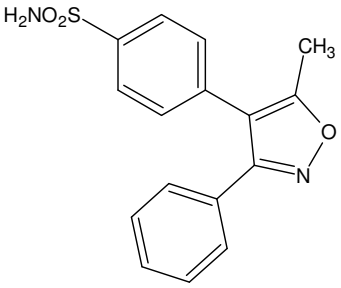


Meloksikam

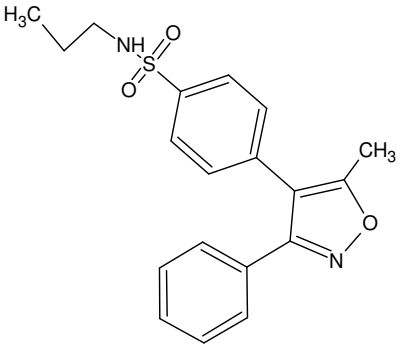
Koksibler üzerinde devam eden çalışmalar ile selektivitesi daha yüksek etorikoksib, valdekoksib, parekoksib (valdekoksibin ön ilacı) ve lumirakoksib geliştirilmiştir. Bu ilaçlar, farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri ile diğer ilaçlardan farklıdırlar. Valdekoksib, platelet COX-1'ini ve monosit COX-2'sini inhibe eder. Selekoksibe oranla yaklaşık iki kat yüksek selektivite gösterir. Parekoksib, valdekoksibin suda çözünebilir inaktif ön ilacıdır, hepatik enzimatik hidroliz ile aktif COX-2 inhibitörüne döner ve aynı farmakokinetik özellikleri paylaşır. Etorikoksib de yüksek selektivite gösteren bir ilaçtır. Lumirakoksib en yüksek COX-2 selektivite ve en kısa yarı ömür (3-6 saat) ile diğer koksiblere göre beklemeyen farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler gösterir. Kimyasal yapısı da trisiklik olmaması ile diğerlerinden farklıdır, fenilasetik asit grubu taşıması ile diklofenaka benzer.



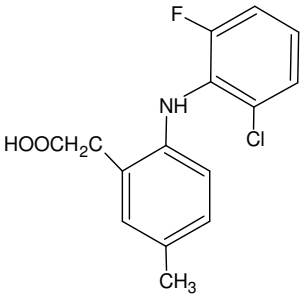
Etorikoksib



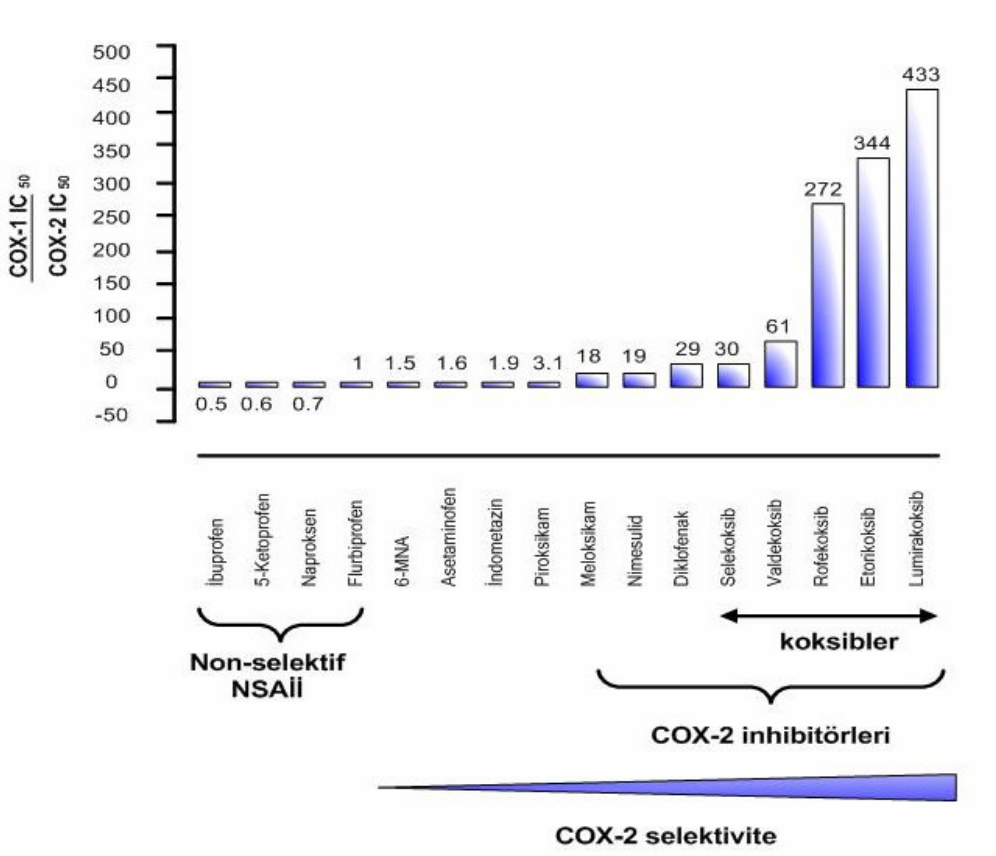
Valdekoksib



Parekoksib



Lumirakoksib



Şekil 5: COX inhibitörü maddelerin *in vitro* tam kan analiz sonuçları [4]

Çeşitli klinik çalışmalar sonucu tüm koksibler osteoartrit, romatoit artrit, akut ağrı (primer dismenore, cerrahi operasyon sonrası dental ağrılar gibi) tedavisinde nonselektif NSAİ'ye göre daha etkin bulunmuştur. Etorikoksib, bel ağrıları ve akut gut artriti için de FDA'dan onay almıştır. Selekoksib de ailesel adenomatoz polipozis için onaylı tek koksib türevidir.[4]

Selektif COX-2 inhibitörleri kimyasal yapılarına göre altı sınıfta incelenebilir. Bu bileşiklerin birçoğu COX-2'yi zamana bağlı ve yarışmalı olarak inhibe eder. Bu inhibitörler, COX-2 enzimine sıkı fakat kovalent olmayan bağlarla bağlanırlar ve enzim yapısında konformasyonel değişiklik yaparlar. COX-2 inhibitörü bileşiklerde enzimin yan cebine sulfonamit gibi hacimli grupların bağlanmasının sonucu olarak geri dönüşümsüz zamana bağlı mekanizma ile gerçekleşir.[24] Rofekoksib ve selekoksib yavaş ve sıkı bağlanma kinetiği göstermektedir.[4]

1- Diaril Heterosiklik Yapıda Olan Selektif COX-2 İnhibitörleri

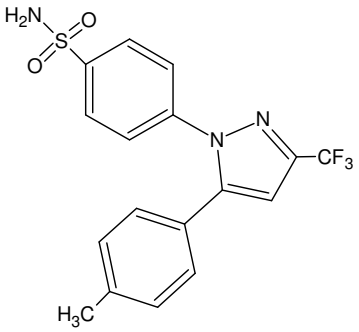
2,3-diariltiyofen iskeleti taşıyan DuP-697 kodlu maddenin non-ülserojenik antienflamatuvar etkisinin saptanmasından ve etkinin selektif COX-2 inhibisyonuyla ilişkili olduğunun anlaşılmasından sonra bu iskeleti taşıyan maddelerin tasarımı hız kazanmıştır. Bu sınıfın iki temel üyesi olan selekoksib ve rofekoksibin FDA'dan onay alması ile, bu stratejinin doğruluğu desteklenmiştir.[2]

Diarilsübstitüe heterosiklik ana yapısını taşıyan selektif COX-2 inhibitörlerinin tek başlık altında toplanamayacak kadar farklı kimyasal yapıları içermesi nedeni ile, literatürlerde aşağıdaki şekilde gruplandırmalardan bahsedilmektedir;[2,10,26]

a) Orto-diaril (visinal diaril) heterosiklik ya da karbosiklikler
b) Meta-diaril heterosiklikler
c) Heteroatom köprüsü taşıyan diarilheterosiklikler
d) Diarilheterosiklik yapıda dual COX-2/5-LOX inhibitörleri
e) Diarilbisikloheterosiklikler

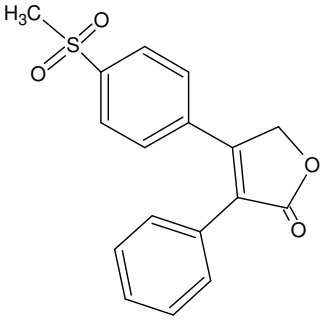
a) Visinal Diaril Heterosiklik Ve Karbosiklik Yapıda Olan Selektif COX-2 İnhibitörleri

COX-2 inhibitörlerinin en gözde sınıfı olan bu grup, merkezde bir heterosiklik/karbosiklik halka ve bu halkaya visinal konumlardan bağlanmış iki fenil sübstitüenti taşıması ile karakterizedir. Heterosiklik yapı üç boyutlu olarak aromatik halkalara uygun oryantasyonun sağlanmasından ve enzime bağlanmadan sorumludur. Heterosiklik halka olarak pirol, furan, tiyofen, imidazol, oksazol, izoksazol, tiyazol, pirimidin olabilir. Bu özelliklere sahip iki bileşik bu grupta öne çıkar; 1,5-diarilpirazol türevi selekoksib ve 3,4-diarilfuranon türevi rofekoksibtir.[26]



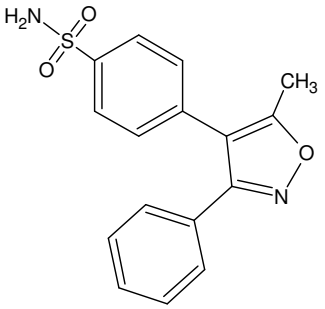
Selekoksib

IC_{50} (COX-2) = 0,04 µM
IC_{50} (COX-1) = 13 µM



Rofekoksib

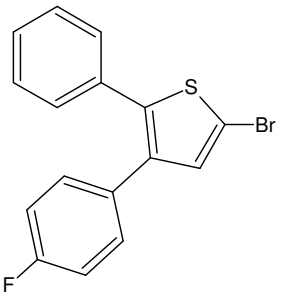
IC_{50} (COX-2) = 0,5 µM [2]
IC_{50} (COX-1) = 19 µM



Valdekoksib

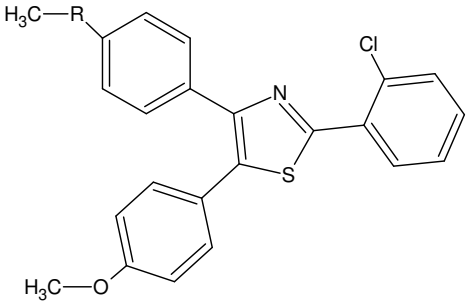
IC_{50} (COX-2) = 0,005 µM

IC_{50} (COX-1) = 140 µM



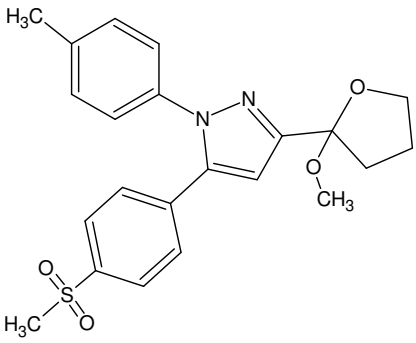
DuP 697

Bu visinal halkalardan birisinin para konumunda metilsülfonil ya da sülfonamit grubu taşıması COX-2 selektivitesi için önemlidir. Bu para-sülfonil grubunun sülfoksit ya da sülfite redüklenmesi izoenzim selektivitesini tersine çevirmektedir. Aminosülfonil/sülfonamit taşımayan ikinci halka doymuş olabilmektedir.[2]



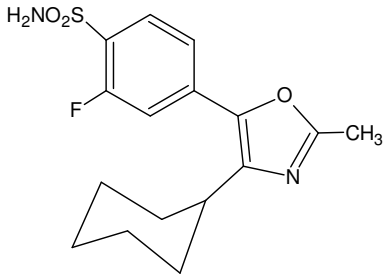
R= SO_2 (SC 8092)	R= S (SC 8076)
IC_{50} (COX-2) = 0,06 µM	IC_{50} (COX-2) = 100 µM
IC_{50} (COX-1) > 100 µM	IC_{50} (COX-1) = 0,1 µM

Merkez halkanın C-3 konumunda aromatik/heterosiklik halka taşıyan türevler de sentezlenmiştir. 3-(2-Metoksitetrahidrofuran-2-il)-pirazol türevleri arasında en aktif bileşik fenilin 4. konumunda metil grubu bulunmasıyla selekoksibe yapıca en fazla benzerlik gösteren türevdir.[29]



IC_{50} (COX-2) = 1,2 µM
IC_{50} (COX-1) > 100 µM

Sülfonamit grubu taşıyan bileşiklerde metilsülfonil grubu taşıyanlara göre COX-2 selektivitesi azalırken oral biyoyararlanım artmıştır. Bu sınıftaki maddelerin çoğu, diğer aromatik halkada flor, klor gibi halojen bulundururlar. Halojenlerin metilsülfonil grubu ile aynı halkada olduğu maddeler de aktivite açısından denenmiştir.[2]



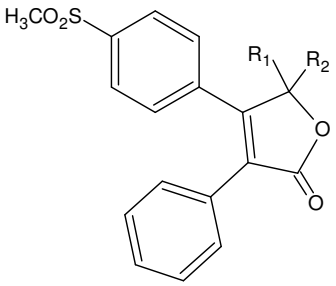
JTE-522

IC_{50} (COX-2) = 0,3 µM

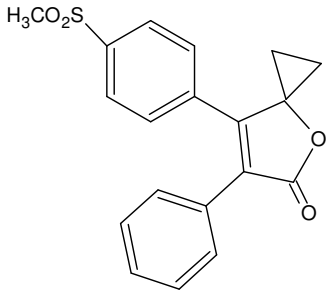
IC_{50} (COX-1) = 100 µM

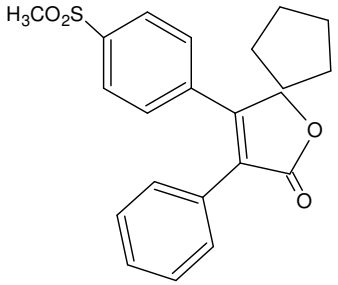
Bu sınıftaki bileşiklerin bir kısmında visinal halkalar ile merkez halka arasında doymuşluk vardır ve bu çifte bağdan ötürü cis stilben iskeleti taşıyan/taşımayan şeklinde de kendi içinde sınıflandırılabilirler.

Merkez halka üzerinde de bir ya da birden fazla sübstitüsyon olabilir ya da spirolakton analoğu olabilir.[2]

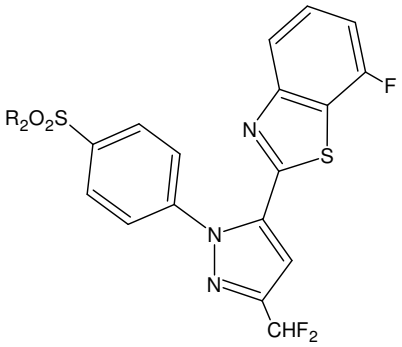


R_1=R_2= H	R_1=R_2= CH_3
IC_{50} (COX-2) = 0,5 µM	R_1=R_2= OCH_3
IC_{50} (COX-1) = 19 µM	





Visinal halkalardan aminosülfonil/sülfonamit taşımayan ikinci halkanın (fenil) yerine daha büyük bir grup olan benzotiyazol halkası ile değiştirilmesi selektivitede artış ile sonuçlanmıştır.[2]



IC_{50} (COX-2) = 0,012 μM

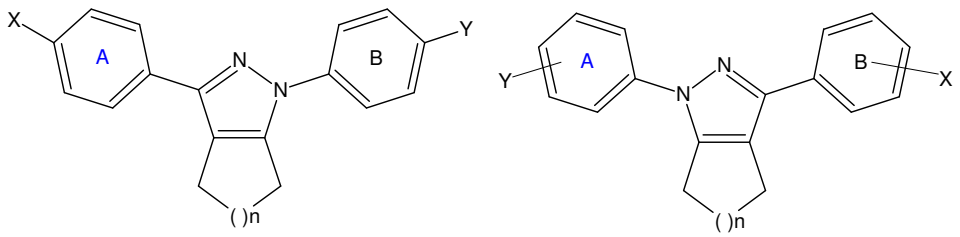
IC_{50} (COX-1) > 100 μM

Bu kimyasal sınıftaki COX-2 inhibitörlerinin selektivitesi ve potensi küçük modifikasyonlara duyarlıdır ve bu durum yalnızca sterik ya da elektronik etkiler ile açıklanamamıştır.[2]

b) <u>Meta Diarilheterosiklik Türevi Selektif COX-2 İnhibitörleri</u>

Sikloalkan halkası ile kaynaşmış pirazol halkasına 1,3-diaril sübstitüsyonunun yapıldığı türevlerin selektif COX-2 inhibitör etkili olduğu bilinmektedir.[20,31] Sikloheptan halkası (n=3) ile kaynaşmış türevler en etkin COX-2 inhibitörü bulunmuştur, ardından da siklohekzan halkası taşıyan türevler gelmektedir. A halkasının 4. konumdan klor ile sübstitüe edilmesi ile elde edilen bileşik, COX-2 inhibitör aktivitede önemli bir değişiklik yapmamış (1b, e, i), buna ilaveten B'de de aynı sübstitüsyonun yapılması

aktiviteyi ortadan kaldırmıştır (1c, j). Visinal diarilheterosiklik yapısındaki selektif COX-2 inhibitörü bileşiklerde merkez halkaya sübstitüe olan aromatik/heterosiklik halkaların para konumlarındaki klor, sülfonilmetil veya flor, sülfonilmetil şeklindeki sübstitüsyonlar aktiviteyi arttırırken, 1,3-diaril bileşiklerde bu fonksiyonel yapılar ile sübstitüsyon yapıldığında aktivite ortadan kalkmıştır (1f, g, n). X'in klor, Y'nin metil ya da metoksi grubu olduğu bileşiklerde (1k ve 1m) yüksek COX-2 inhibitör aktivite ve orta derecede seçicilik söz konusudur. Hiçbir dihidropirazol türevi maddede aktivite görülmemiştir, bu sonuçlara göre halkaların düzlemselliği de aktivitede önemlidir.[32]



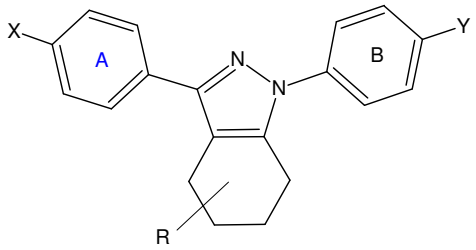
Tablo 2: Bazı diarilsikloalkanopirazol türevlerinin COX-2 ve COX-1 IC_{50} değerleri

Bileşik	X	Y	n	COX-2 IC_{50} (µM)	COX-1 IC_{50} (µM)
1a	H	H	1	6,20	>10
1b	Cl	H	1	2,59	10
1c	Cl	Cl	1	>10	>10
1d	H	H	2	0,57	0,49
1e	Cl	H	2	0,62	10
1f	Cl	SO_2Me	2	>10	>10
1g	F	SO_2Me	2	>10	>10
1h	H	H	3	0,17	0,12
1i	Cl	H	3	0,14	1
1j	Cl	Cl	3	10	>10
1k	Cl	Me	3	0,64	>10
1m	Cl	OMe	3	1,56	>10

Tablo 2' in devamı.

1n	Cl	SO_2Me	3	>10	10
1p	OMe	H	3	1,24	10

Kaynaşmış halkanın siklohekzan olduğu türevlerde halkada flor sübstitüenti aktivitede artış yapmamış, flor atomunun yerini hidroksil grubunun alması ise COX-2'ye karşı aktiviteyi arttırmış ve bu da selektiviteyi sağlamıştır.[32]

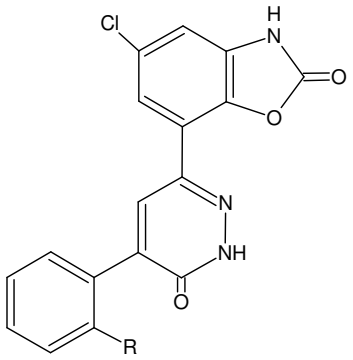


Tablo 3: Bazı siklohekzanopirazol türevlerinin COX-2 ve COX-1 IC_{50} değerleri

X	Y	R	COX-2 IC_{50} (µM)	COX-1 IC_{50} (µM)
Cl	OMe	H	1,56	>10
Cl	OMe	F	2,10	>10
Cl	OMe	OH	0,46	>10
Cl	OMe	-N(OH)Ac	2,40	>10
Cl	OMe	-NHOAc	>10	>10

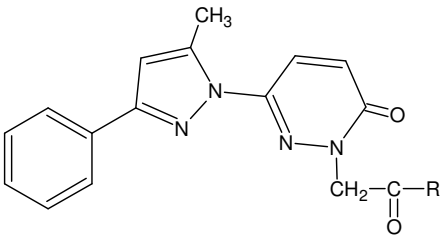
Bu yapılar ile 1,3-diaril iskeletine sahip bileşiklerin 1,2-diarillere alternatif bir farmakoforik model olduğu sonucuna varılmıştır.[32]

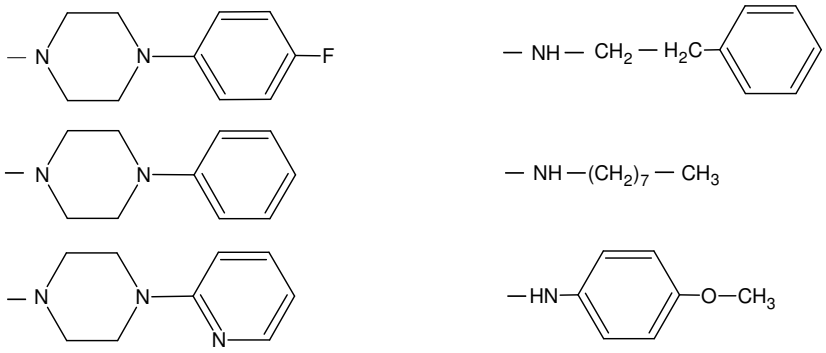
2-Okso-3*H*-benzoksazol, 3(2*H*)-piridazinonun analjezik ve antienflamatuvar etkilerinden ötürü tercih edildiği bir çalışmada, 2-okso-3*H*-benzoksazol aril sübstitüentlerinden birisi olarak yerleştirilmiş ve 1,3-diarilsübstitüe piridazinon halkasının selektif COX-2 inhibitör etkisi araştırılmıştır.[31]



Bu iki türevin inhibisyon oranları *in vitro* tam kanda ELISA testi yapılarak R=H iken COX-1 için %59, COX-2 için %37; R=Cl iken COX-1 için %61, COX-2 için %28 bulunmuştur. Ayrıca bu iki bileşik 100 mg/kg, tek doz farelere uygulanmış ve p-benzokinon ile oluşturulan kıvranma testi ve karragenin ile oluşturulan pençe ödemi testleriyle sırasıyla analjezik ve antienflamatuvar aktivitesi *in vivo* değerlendirilmiştir. Aspirine eşit ya da daha güçlü analjezik etkili ve karragenin ile oluşturulan ödemin ikinci fazında kayda değer ölçüde antienflamatuvar etkili bulunmuştur.[31]

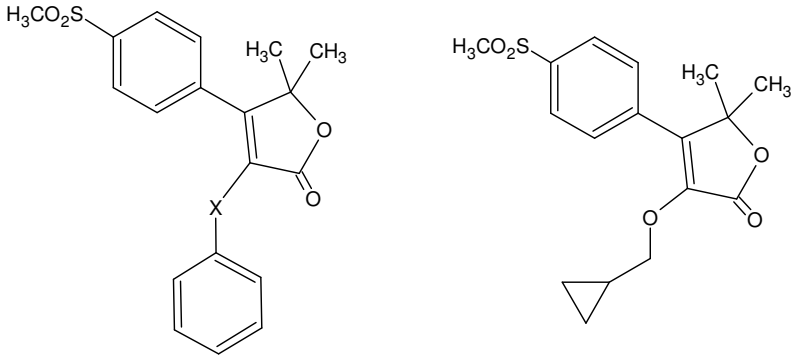
Aşağıdaki 1,3-diarilpirazol iskeleti taşıyan maddeler de ise, R= 4-florofenilpiperazinil, fenilpiperazinil, 2-piridilpiperazinil, oktilamino, 4-metoksifenilamino iken p-benzokinon ile oluşturulan kıvranma testinde aspirinden daha analjezik etkili bulunmuştur. Aynı türevler, 100mg/kg dozda karragenin ile oluşturulan pençe ödemi testinde indometasin kadar etkin, N-oktilamin türevi ise indometasinden daha etkin antienflamatuvar bulunmuştur. Ancak *in vivo* aktif bulunan bu maddelerin hiçbiri *in vitro* 10 µM konsantrasyonda insan tam kanında yapılan ELISA testinde COX-1 ve COX-2'yi inhibe etmemiştir. Bu sonuç, bu maddelerin analjezik ve antienflamatuvar etkilerini COX inhibisyonundan farklı bir yolak ile gösterdiğini düşündürmektedir.[30]





c) <u>Heteroatom Köprüsü Taşıyan Diaril Heterosiklik Türevi Selektif COX-2 İnhibitörleri</u>

Merkezi halka ile metilsülfonil fonksiyonu taşımayan fenil grubu arasında oksijen, kükürt atomu ya da karbonil grubu taşıyan bileşikler de COX-2 selektivitesi gösterirler ve bu sınıf altında incelenebilirler. Ariloksi grubu yerine alkiloksi olduğunda da etkili bileşiklere ulaşılabilmektedir.[2]



X=O IC_{50} (COX-2) = 0,02 μM IC_{50} (COX-2) = 0,14 μM
IC_{50} (COX-1) > 50 μM IC_{50} (COX-1) > 100 μM

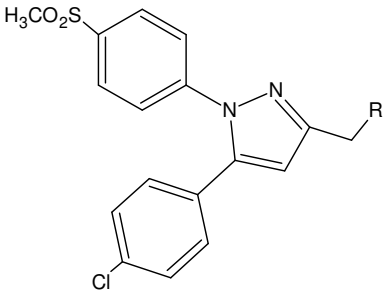
X=S IC_{50} (COX-2) = 0,07 μM
IC_{50} (COX-1) > 50 μM

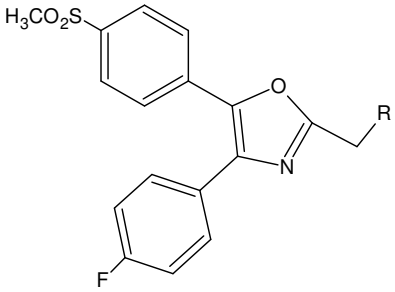
X=CO IC_{50} (COX-2) = 0,6 μM
IC_{50} (COX-1) > 50 μM

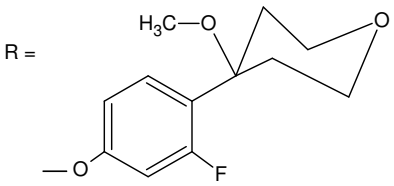
d) <u>Diaril Heterosiklik Yapıda Dual COX-2/5-LOX İnhibitörleri</u>

Diarilheterosiklikler sınıfında olan bazı bileşikler üzerinde dual inhibitör yaratmaya yönelik bir çeşitleme yapılmış ve araşidonik asit metabolizmasındaki diğer bir enzim olan 5-LOX'un inhibisyonundan sorumlu fonksiyonel gruplar ile türevlendirilerek, selektif COX-2 inhibitörü etkileri mevcut 5-LOX'u da inhibe etme yeteneğinde olan bileşikler elde edilmiştir. 1,5-Diarilpirazol türevi ve 4,5-diariloksazol türevi bileşikler sırasıyla 3 ve 2. konumlarından 5-LOX'a spesifik farmakoforlar olan hidroksamat, tiyoeter ve piran grupları ile sübstitüe edilmiştir.[2]

LT ve PG'lerin proenflamatuvar özellikleri göz önüne alındığında, her iki eikozanoid sentezinin de inhibisyonu ile gastointestinal hasara ve alerjik reaksiyolara neden olmayan, antienflamatuvar etkili yeni ilaçların geliştirilmesi amaçlanmaktadır.[5]



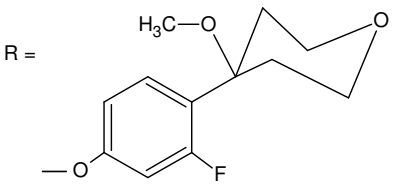




IC_{50} (COX-2) = 0,1 µM

IC_{50} (COX-1) = 38 µM

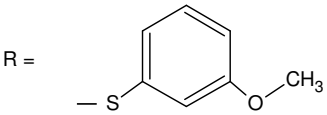
IC_{50} (5-LO) = 0,15 µM

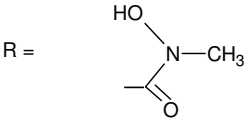


IC_{50} (COX-2) = 0,1 µM

IC_{50} (COX-1) > 100 µM

IC_{50} (5-LO) = 0,02 µM



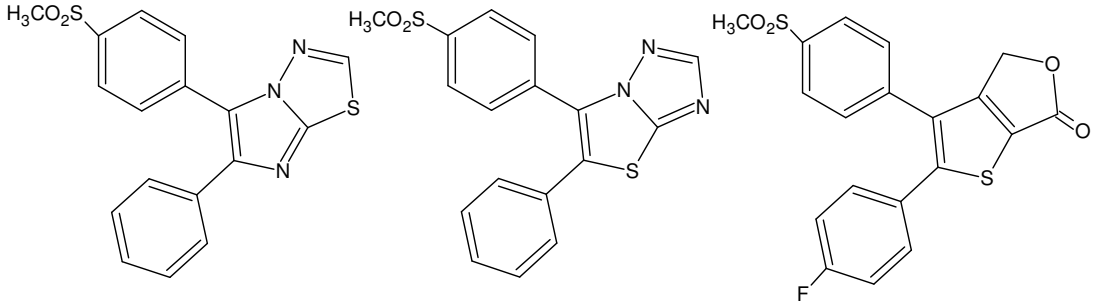


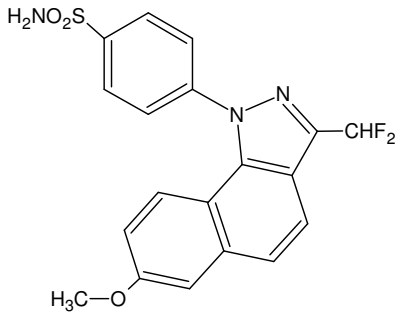
IC_{50} (COX-2) = 0,1 μM	IC_{50} (COX-2) = 5,1 μM
IC_{50} (COX-1) = 38 μM	IC_{50} (COX-1) > 100 μM
IC_{50} (5-LOX) = 0,15 μM	IC_{50} (5-LOX) = 0,05 μM

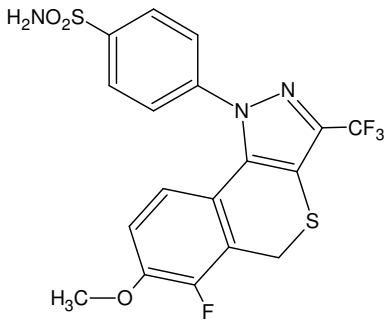
Dual COX-2/5-LOX inhibitörü moleküller, bu örnekler ile sınırlı değildir. Di-ter-bütilfenol türevi moleküller de dual inhibitör olup antioksidan etkili bileşikler başlığı altında verilecektir.

e) Diaril Bisikloheterosiklik Yapıda Selektif COX-2 İnhibitörleri:

Beş veya altı üyeli heterosiklik ya da karbosiklik yapıların dışında bisiklik ya da kaynaşmış halkaların merkezi halka olarak kullanıldığı yapılar da selektif COX-2 inhibitörü etkilidirler. Ancak bu bileşikler farmakokinetik özellikler açısından zayıftır, özellikle yetersiz oral biyoyararlanım problemleri vardır. Oral aktiviteye sahip bileşiklerde merkez halka olarak imidazotiyazol, tiyazolotriazol vardır. Oral aktiviteyi arttırmak amacıyla yapılan çalışmalar ile bisiklolakton, benzindazol, benzopiranopirazol, imidazo[1,2-α]azin türevi bileşikler araştırılmıştır.[2]





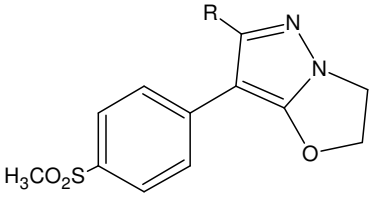
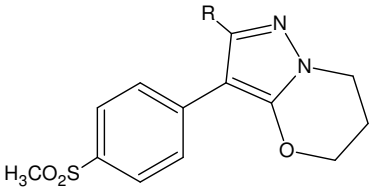


IC_{50} (COX-2) < 0,1 µM
IC_{50} (COX-1) = 0,8 µM

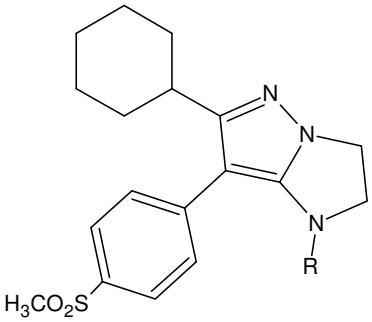
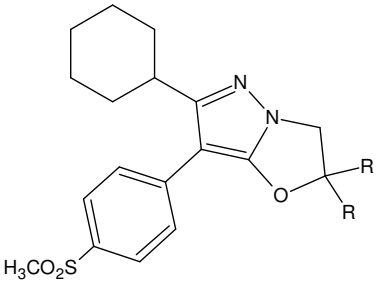
IC_{50} (COX-2) < 0,1 µM
IC_{50} (COX-1) > 100 µM

Ranatunge ve arkadaşları pirazolo[5,1-b]oksazolidin türevlerini sentezlemişler ve 5. konumun aktivitede önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. R grubu siklohekzil iken selektif COX-2 inhibisyonu göstermiş ancak fenil grubu olduğunda COX-2 inhibisyonu değişmezken COX-1 inhibitör etkinlikte artış olmuştur. Aynı konuma benzil grubu getirildiğinde ise COX-1 ve COX-2 aktivite tamamen ortadan kalkmıştır. (R = siklohekzil iken IC_{50} (COX-2) =1,3 µM ve IC_{50} (COX-1) > 100 µM).[33]

Tablo 4: Bazı bisiklik pirazol türevlerinin insan tam kanında yapılan *in vitro* analiz sonuçları

		İnsan tam kanının % inhibisyonu	
		COX-2	COX-1
	R	100 µM	10 µM
	Siklohekzil	25	90
	Fenil	40	90
	Benzil	0	0
	Siklohekzil	35	25

Tablo 4' ün devamı.

	Hidrojen	65	80
	Asetil	20	10
	Metil	0	38
	Metil	0	12, 5

Bisiklik halkanın altı üyeli olmasıyla meydana gelen pirazolo[5,1-b]oksazin türevlerinde önemli ölçüde COX-2 inhibisyonunda azalma görülmüştür. Bu sonuç, COX-2 aktivitesinde kaynaşmış altılı halkaların uygun olmadığını göstermiştir.[33]

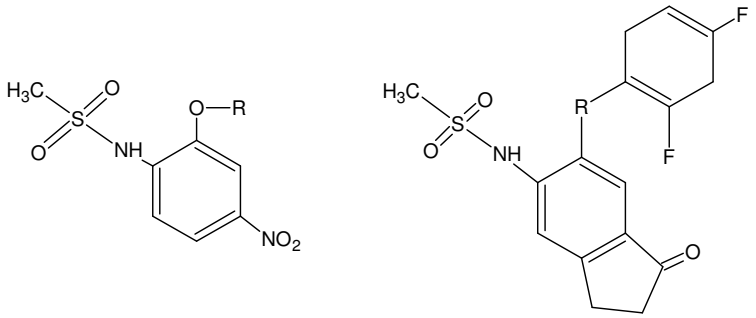
Pirazolo[5,1-b]oksazolidin türevlerinde azot atomunun oksijen atomuyla değiştirilmesiyle imidazolidino[1,2-d]pirazoller elde edilmiştir. R hidrojen iken 10 µM'da iyi COX-2 inhibitör aktivite gösterirken, N-metil ve N-açil olduğunda her iki COX için de aktivitede kayıp olduğu bildirilmiştir.[33]

En aktif bileşik olan 5-sikloheksil-pirazolo[5,1-b]oksazolidin türevinin bisiklik halkasında yapılan iki metil grubu sübstitüsyonunun inhibitör özelliği ortadan kaldırdığı bildirilmiştir.[33]

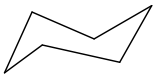
2- Diaril ya da Aril/Heteroaril Eter ve Tiyoeter Türevi Selektif COX-2 İnhibitörleri

Bu sınıf üzerinde yapılan çalışmalar, NS-398'in selektif COX-2 inhibitörü olduğu bulunduktan sonra hız kazanmıştır. Bu bileşik, enflamasyonlu hücrelerde PG sentezini inhibe etmiş hayvan modellerinde istenmeyen gastrointestinal etkiler göstermemiştir. Ayrıca böbrek ve midede PG üretimini etkilememiştir.[10,26]

Nimesulid ve flosulid de bu sınıfa dahil bileşiklerdendir. Yapısal olarak benzerlik gösteren iki bileşik metansülfonamit yapısı ve sırasıyla diarileter ve tiyoeter köprüsünü taşırlar. Bu sınıfta ön plana çıkan yapısal özellik aromatik halkanın orto konumundan eter/tiyoeter köprüsüyle sübstitüe olması ve para konumunda elektron çekici grup taşımasıdır. Ayrıca bu bileşiklerin tümünde sülfonamit yapısı bulunması nedeniyle sülfamoil asidik yapısının bulunması gerekliliği bildirilmiştir.[26]

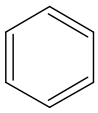


NS 398 R =



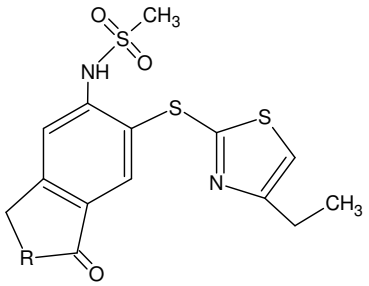
Flosulid R = O

Nimesulid R =



L 745 377 R = S

Flosulid'deki oksijen atomunun kükürt ile yer değiştirmesi antienflamatuvar potenste ve gastrointestinal güvenilirlikte artışa neden olmaktadır. İnsan rekombinant COX-1 ve COX-2 enzimleri ile yapılan *in vitro* çalışmalar oksijen ve kükürt analoglarının benzer aktivite gösterdiği ancak, kükürtlü bileşiğin oral biyoyararlanımının daha iyi olduğu yönündedir. L-745,337'deki diflorofenil halkasının 4-sübstitüetiyazol ile değiştirildiği bileşiklerde antienflamatuvar aktivitede artış meydana geldiği bildirilmiştir.[10,26]

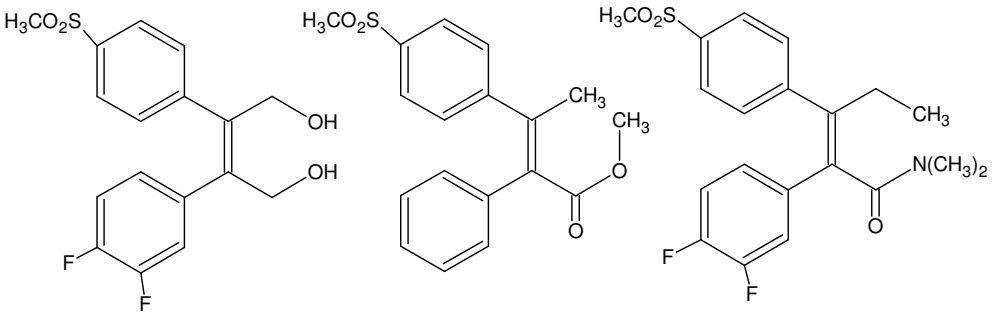


R= CH_2
R= O

Bu grup altında değerlendirilecek birçok bileşik sentezlenmiş ve aktivitesi değerlendirilmiştir. Aromatik halkaların para konumunda elektron çekici grubun fizyolojik aktivite için gerekli olduğu ve siyano ve asetil sübstitüentleri ile optimum aktivite sağlandığı bildirilmiştir.[10,26]

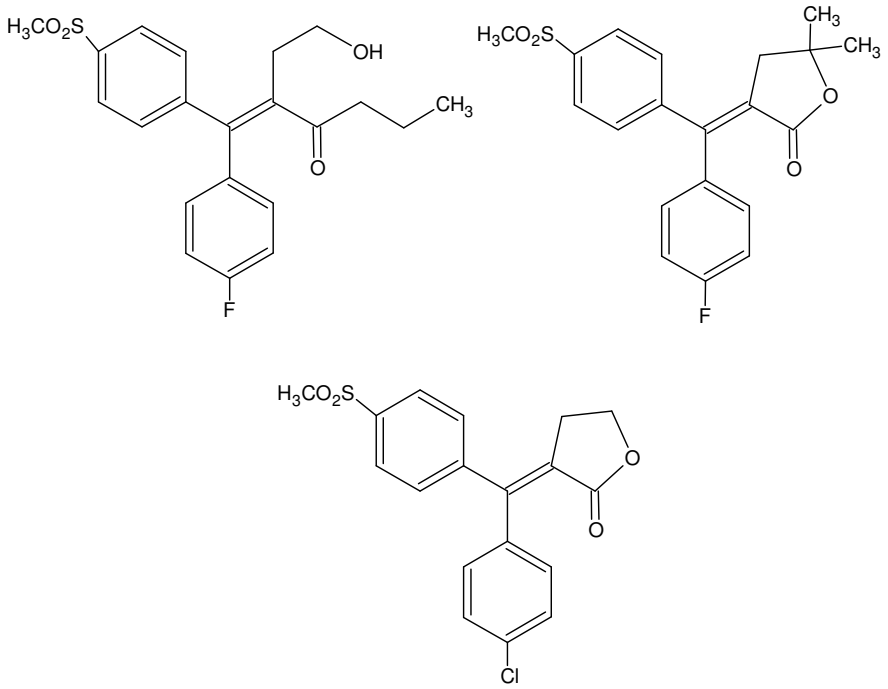
3- *Cis*-1,2-Diarilstilben ve 1,1-Diarilalken Türevi Selektif COX-2 İnhibitörleri

Yapı aktivite çalışmaları iki visinal fenil grubu ile merkezi halka taşıyan yapıların uzaysal yöneliminin önemini ortaya koysa da, 1,2-diaril stilben türevleri nanomolar düzeylerde COX-2 inhibisyonu ve >100 selektivite oranı göstermiştir. Bu türevlerde merkez halka eksik olmasına rağmen, merkezi halka taşıyan selektif inhibitörlerde olduğu gibi cis-stilben iskeletinin varlığının aktiviteden sorumlu olabileceği belirtilmiştir.[2]



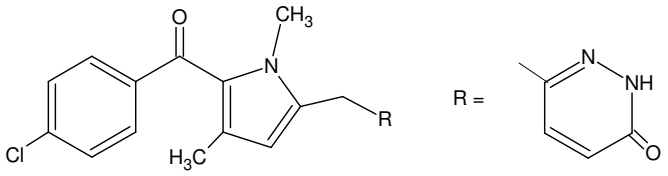
1,1-Diariletenil türevlerinde de selektif COX-2 inhibitör aktivite görülmüştür. Tetrasübstitüe olefinik bu yapılarda, geminal diaril grubu ve yapının kalanında da farklı kimyasal fonksiyonlar vardır, örneğin heterosiklik ya da karbosiklik bir halkanın parçası olabilmektedirler. Diaril heterosiklikler ile karşılaştırıldığında, bu bileşiklerin *in vivo*

antienflamatuvar aktivite açısından daha düşük potens gösterdikleri bildirilmiştir.[2]



4- <u>Diaril ve Aril/Heteroaril Keton Türevi Selektif COX-2 İnhibitörleri</u>

İki aril halkasının ya da aril/heteroaril halkalarının birbirine keton grubu ile bağlı olduğu antienflamatuvar ilaçlar eskiden beri kullanılmaktadır. Bu sınıfa dahil COX-1 inhibitörü zomepirakın, karboksilik asit kısmının oksopiridazinilmetil grubu ile değiştirilmesi ile selektif COX-2 inhibitörü bir bileşik elde edilmiştir.[2,10]



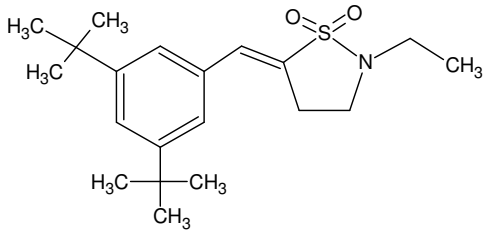
Zomepirak R=COOH

IC_{50} (COX-2) = 2 μM	IC_{50} (COX-2) = 0,7 μM
IC_{50} (COX-1) = 0,3 μM	IC_{50} (COX-1) > 1000 μM

5- Antioksidatif Grup Taşıyan Selektif COX-2 İnhibitörleri

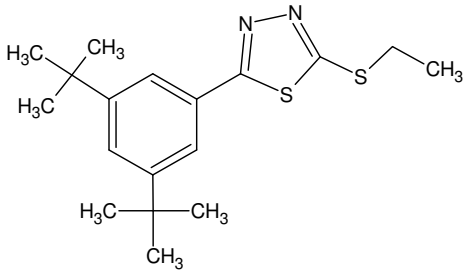
Bu bileşikler, etkilerini antioksidan mekanizma ile gösterirler. COX enzimi katalizi radikal ara ürünleri de içerdiğinden di-ter-bütilfenol gibi radikal yakalayıcı çekirdekler siklooksijenaz aktivitesini engellerler.[8] Fenol yapısının tiyazolon, oksazolon, tiyadiazol ve oksadiazol türevleriyle birleştirilmesi antienflamatuvar etkili, ülsere neden olmayan yeni COX-2 inhibitörlerini türetmiştir.[26]

Benzilidenoksazol, benzilidentiyazol, tiyazol, imidazol türevlerinin COX/ 5-LOX dual inhibitör etkisi vardır. 2-hidroksi, 2-merkapto, 2-iminotiyazol ve oksazollere ditersiyerbütilfenol bağlanmış ve hayvanlarda oral aktivitesi gözlenmiştir.[10] S-2472 için klinik çalışmalar sürdürülmektedir.



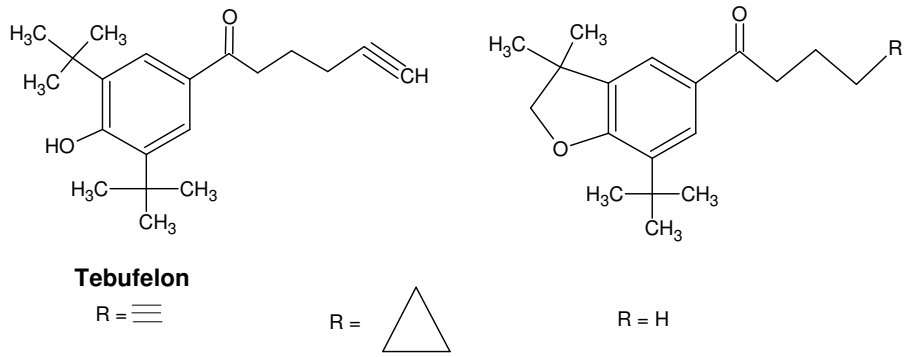
S-2474

Bu sınıfın aşağıda yapısı verilen en etkili bileşiklerinden biri tiyadiazol türevidir. Saflaştırılmış enzim sistemlerinde yapılan analizler ile IC_{50} (COX-1) >100 µM IC_{50} (COX-2) =0,14 µM bulunmuştur.[26]



IC_{50} (COX-2) =0,14 µM
IC_{50} (COX-1) > 100 µM

Tebufelon'un metaboliti dihidrodimetilbenzofuran (DHDMBF) fenolik hidroksil taşımamasına rağmen dual COX/5-LOX etkili bulunmuştur.[2] Bu metabolitten haraketle sentezlenen moleküllerde selektivite, non selektif inhibisyondan belirgin derecede COX-2 lehine kaymıştır.



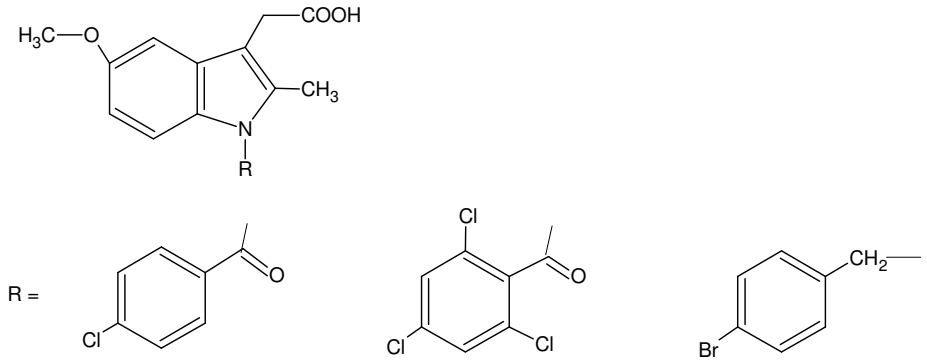
IC_{50} (COX-2) = 0,02 μM IC_{50} (COX-2) = 0,22 μM IC_{50} (COX-2) = 0,09 μM

IC_{50} (COX-1) = 0,06 μM IC_{50} (COX-1) = 7 μM IC_{50} (COX-1) = 10 μM

6- <u>Bilinen NSAİ Üzerinde Yapılan Çalışmalarla Elde edilen ve Farklı Kimyasal Yapılarda Selektif COX-2 İnhibitörleri</u>

NSAİ'nin karboksilat kısmının nötralizasyonu ile ya da biyoizosteri olan yapılarla değiştirilmesiyle elde edilen bileşiklerle selektif COX-2 inhibisyonu sağlamak genel bir yöntem olarak uygulanmaktadır.[2]

İndometasin nonselektif COX inhibitörü bir bileşikken, azota bağlı 4-klorobenzoil grubunun 2,4,6-triklorobenzoil ve 4-bromobenzil grubu ile değiştirilmesi selektiviteyi ortadan kaldırmaktadır.[2]

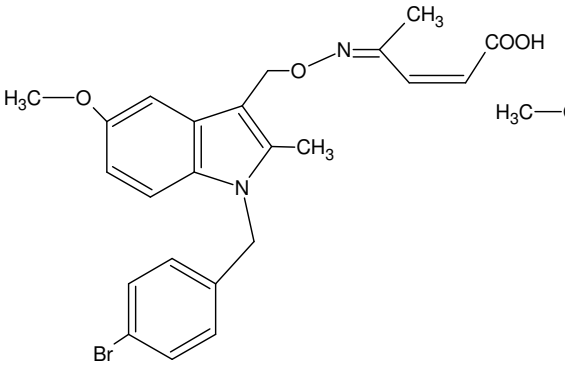


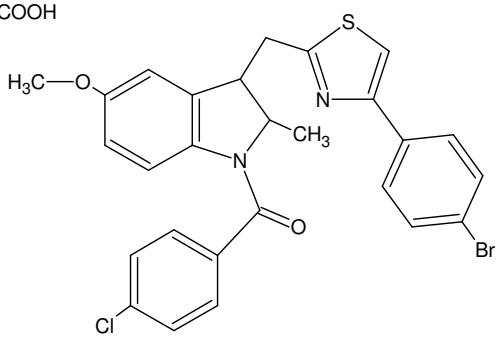
İndometasin

IC_{50} (COX-2) = 0,01 µM IC_{50} (COX-2) = 0,5 µM IC_{50}(COX-2) = 0,009 µM

IC_{50} (COX-1) = 0,006 µM IC_{50} (COX-1) > 100 µM IC_{50}(COX-1) = 41 µM

İndometasin türevlerinde asetik asit artığı yerine dallanmış ya da uzun zincirli karboksilik asitlerin getirilmesi, karboksilik asidin ester ya da amit grubu ile nötralizasyonu, karboksilik asit biyoizosteri olan iminoksi, sübstitüe tiyazol ile değiştirilmesi selektiviteyi COX-2'ye kaydırmıştır.[2]

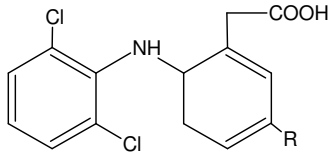


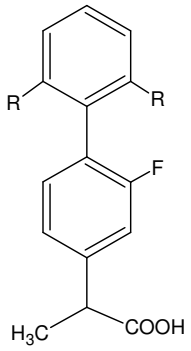


IC_{50} (COX-2) = 0,07 µM IC_{50} (COX-2) = 0,0003 µM

IC_{50} (COX-1) = 52 µM IC_{50} (COX-1) > 100 µM

COX-2'nin COX-1'e göre daha geniş aktif bölgesinin olduğu kristalografik çalışmalar ve amino asitlerin değişimiyle yapılan analizler ile saptanmasından sonra bilinen NSAİ'ye sterik etki yapacak grupların takılması COX-2 inhibitör etkileri üzerinde değişiklik olmaksızın COX-1 inhibitör aktiviteyi azaltmıştır. Bu strateji, diklofenak ve flurbiprofen üzerinde başarılı sonuçlar vermiştir. Diklofenakın arilasetik asit grubu taşıyan halkasının meta konumuna metil ve flurbiprofende 4-fenil halkasında orto konumlara etoksi grubunun sübstitüsyonu enzim spesifitesini ortadan kaldırmıştır.[2]





Diklofenak R= H

R= CH_3 IC_{50} (COX-2) = 0,007 µM

IC_{50} (COX-1) > 10 µM

Flurbiprofen R= H

IC_{50} (COX-2) = 0,01 µM

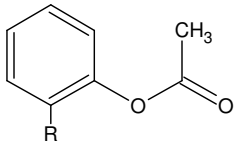
IC_{50} (COX-1) = 0,01 µM

R= OC_2H_5

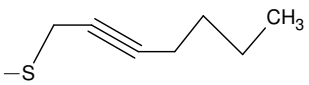
IC_{50} (COX-2) = 0,1 µM

IC_{50} (COX-1) = 7,7 µM

NSAİ arasında COX izozimlerini kovalent bağlanarak inhibe eden tek molekül olan aspirin üzerinde de COX-2 selektif bileşik yaratma çalışmaları yapılmıştır. Karboksilat kısmına metilsülfit, heptilsülfit, hept-2-inil grupları getirilerek selektivitede değişiklik sağlanmıştır. Hept-2-inil grubunun sübstitüsyonuyla elde edilen molekül, aspirin gibi, serin 530 hidroksil grubunu asetilleyerek aktivite göstermektedir.[2]



R =



Aspirin R = -COOH

IC_{50} (COX-2) = 66 µM

IC_{50} (COX-1) = 12 µM

R = $-SCH_3$

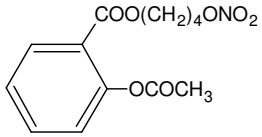
IC_{50} (COX-2) = 250 µM

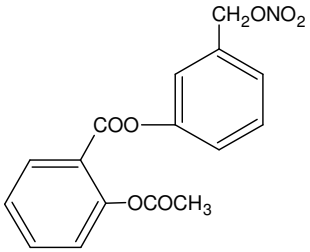
IC_{50} (COX-1) > 5000 µM

IC_{50} (COX-2) = 0,08 µM

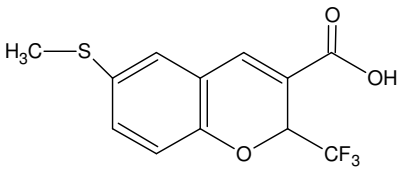
IC_{50} (COX-1) > 17 µM

Mukozal bütünlüğün korunmasında tıpkı PG'ler gibi önemli fonksiyonu olan nitrik oksit (NO), mide ve diğer bazı organlarda sitoprotektif etkilidir. PG'ler gibi mukus sekresyonunun uyarılmasından ve mukozal kan akımının sağlanmasında önemi vardır.[9] Bu özellikleri nedeniyle NO salabilen aspirin türevleri tasarlanmış ve PG'lerin inhibisyonuna bağlı olarak gözlenen gastrointestinal toksisitenin de bu şekilde dengelenebileceği düşünülmüştür.[15,20,23]



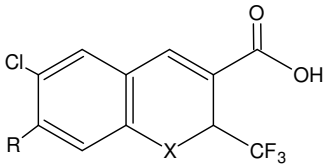


İndometasin ve sülindak yapılarından NSAİ'de COX inhibisyonunda anahtar kısım olan alkanoik asidin çıkarıldığı ve diarilheterosiklik yapılarda bulunan COX-2 selektivitesinde önemli olan metilsülfon grubunun konulduğu yeni bileşikler ılımlı COX-2 selektivitesi gösterirken, aroilnaftalen ve kromen analogları, diarilheterosiklik türevi COX-2 inhibitörleri ile karşılaştırılabilir düzeyde COX-2 inhibitörü aktivite göstermiştir. Bu yapılardaki karboksilat ve trifloromet il fonksiyonel gruplarının COX inhibisyonu için, piran halkasındaki heteroatomun ise COX-2 selektivitesi için önemli olduğu yapı-aktivite çalışmaları ile gösterilmiştir.[2]



IC_{50} (COX-2) < 0,1 μM

IC_{50} (COX-1) = 78 μM



R= t-bütil, X= O

IC_{50} (COX-2) < 0,1 μM

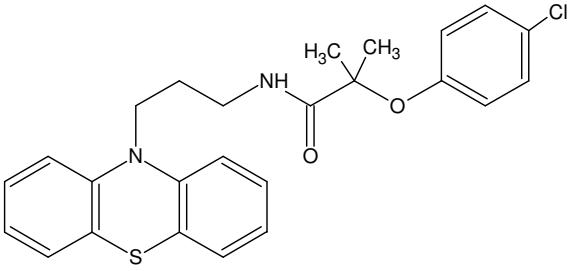
IC_{50} (COX-1) = 61 μM

R= Cl, X= S

IC_{50} (COX-2) < 0,1 μM

IC_{50} (COX-1) = 0,8 μM

Bilgisayar destekli ve kombinatoryal kimya çalışmalarının kullanılarak geliştirilen fenotiyazin türevi bileşik, mikromolar düzeyde elli kat daha selektif COX-2 inhibitörü aktivite göstermiştir. Bu bileşik, arilsülfonamit tipi selektif COX-2 inhibitörlerinden farklı yeni bir seri için lider bileşik olabilir. Geminal dimetil sübstitüsyonlarının ve halobenzen halkasının aktivitede önemli olduğu ve COX-2 aktif bölgesinde arjinin 120 ve membran içerisinde dört amfifilik heliks kısmı ile etkileştiği düşünülmektedir.[10]



COX-2'nin enflamasyon bölgesiyle sınırlı olmadığının anlaşılmasıyla, bulunduğu yerlerdeki fizyolojik işlevlerinden ötürü inhibisyonu sonucunda hipertansiyon, sıvı tutulumu, kardiyovasküler ve hatta gastrointestinal sistem üzerinde yan etkilere sahip olacağı öngörülebilir hale gelmiştir. Ancak, araştırıcılar tarafından bu ilaçların terapötik etkilerinin COX-2 inhibisyonundan, yan etkilerinin COX-1 inhibisyonundan kaynaklandığı genel düşüncesi halen geçerliliğini korumakta ve selektif COX-2 inhibitörleri üzerine yapılan çalışmalar devam etmektedir.[24]

2.3.1 Selektif COX-2 İnhibitörlerinin Kardiyovasküler Etkileri

Koksiblerin GI sistem toksisitesinin NSAİ'ye göre az olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Aynı amaçla yapılmış olan iki uzun dönem çalışmasının beklenmedik bir şekilde sonuçlanması, araştırmacıları bu grubun kardiyovasküler yan etkileri üzerine yoğunlaştırmıştır. VIGOR (the **Vi**oxx **G**astrointestinal **O**utcomes **R**esearch Study) çalışmasında, romatoit artritli 8076 hastada 50 mg/ gün rofekoksib ve 500 mg naproksenin günde 2 kez kullanımı 9 ay boyunca izlenmiş, diğer NSAİ'nin kullanımına izin verilmemiştir. Rofekoksib grubunda GI delinme, ülser ve kanama komplikasyonları, naproksen grubunda gözlenenin yarısından da azdır. Ancak rofekoksib naproksene kıyasla miyokard enfarktüsü açısından beş kat riskli bulunmuştur. CLASS (the **C**elecoxib **L**ong-term **A**rthritis **S**afety **S**tudy) çalışması ise 8059 osteoartritli hastadan oluşan deney grubuna günde iki kez 400 mg selekoksib ve kontrol grubunda günde üç kez 800 mg ibuprofen ya da günde iki kez 75 mg diklofenak verilmiş ayrıca günlük <325 mg dozda aspirin kullanımına müsaade edilmiştir. Çalışmanın ilk altı aylık kısmında, deneye son verme bulgusu olan komplike ülser insidansında iki grup arasında bir fark gözlenmemiş ancak ikinci sonlandırma bulgusu olan semptomatik ülser insidansı diklofenak ile farklı değilken, ibuprofene kıyasla selekoksibte önemli derecede düşüktür. Kardiyovasküler olaylar açısından değerlendirildiğinde ise, selekoksib ile NSAİ arasında anlamlı bir farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır. Selektivite açısından selekoksib ile benzer düzeyde olan diklofenakın kardiyovasküler risk taşıdığı da epidemiyolojik çalışmalar ile kanıtlanmıştır.[4,22,24,34]

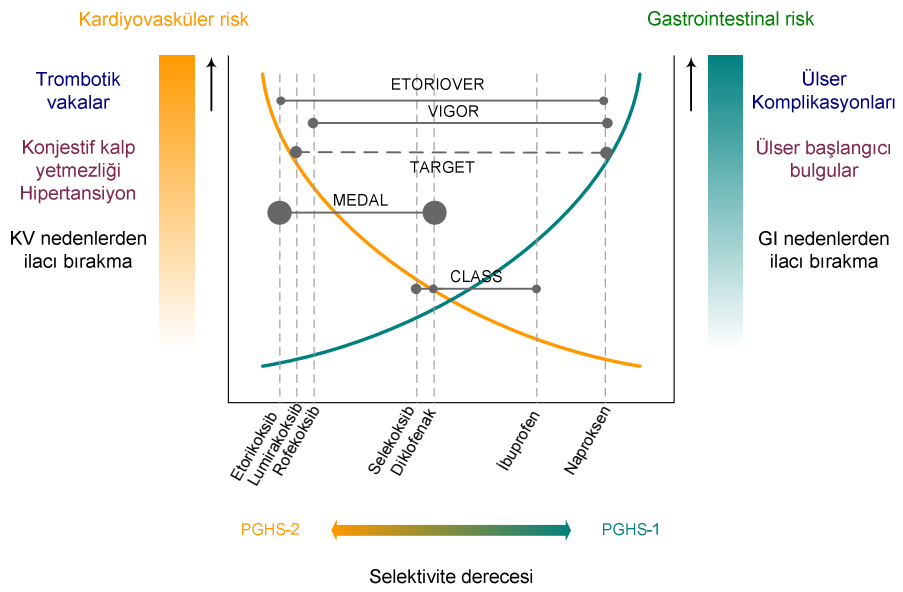
Rofekoksibin kardiyovasküler risk açısından daha kapsamlı incelenmesine olanak veren APPROVe (**A**denomatous **P**olyp **Pr**evention **o**n **V**IOXX) çalışmasında 2600 hastada 25 mg/gün rofekoksib kullanımının tekrarlayan kolon polipleri üzerindeki etkisi plaseboya karşı test edilmiştir. Kan basıncındaki yükseliş rofekoksib grubunda erken dönemde gözlenirken, MI ve trombotik inme insidansında bir yıldan sonra artış göstermiştir. Rofekoksib grubunda tromboembolik ciddi yan etkiler plaseboya göre 1,9 kat daha fazla olarak belirlenmiştir. Bu sonuçların duyurulmasının ardından 30 Eylül 2004'te Vioxx®'un üreticisi olan Merck ilacı gönüllü olarak piyasadan çekmiştir.[4,17]

Vioxx'un piyasadan çekilmesi araştırmacıları benzer bir çalışma ile koksiblerin kardiyovasküler güvenilirliğini yeniden test etmeye yönlendirmiştir. APC (the **A**denoma **P**revention with **C**elecoxib) isimli çalışmada günde iki kez 200 ya da 400 mg selekoksib kullanılmış ve kardiyovasküler olayların üç misli arttığı sonucuna varılmıştır.[4]

Bir süredir aspirin kullanan koroner arter bypass geçirecek hastalarda valdekoksib ve parekoksib kullanılmış ve artmış kardiyovasküler insidans gözlenmiştir. Valdekoksibin üreticisi Pfizer ilacı 7 Nisan 2005'te piyasadan toplatmıştır.[4]

TARGET (**T**herapeutic **A**rthritis **R**esearch and **G**astrointestinal **E**vent **T**rial) çalışması 400 mg/ gün lumirakoksib, günde iki kez 500 mg naproksen ya da günde üç kez 400 mg ibuprofen kullanan osteoartritli 18325 hastayı kardiyovasküler güvenilirlik açısından bir yıl boyunca birbiriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca hastaların bir kısmında düşük doz aspirin kullanımına izin verilmiştir. Üç grup arasında vasküler risk açısından önemli bir fark bulunmamıştır ve gözlenen vaka sayısı da düşüktür. Aspirin kullanan hastalar, kullanmayanlara göre 1,47 kat riskli bulunmuştur.[4,22,35]

GI güvenilirlik açısından etorikoksib ve diklofenakın karşılaştırıldığı EDGE (**E**toricoxib **D**iclofenac **G**astrointestinal **E**valuation) adlı araştırmada karşılaştırılabilir düzeyde veriler elde edilmiştir. Hipertansiyon ilişkili yan etkilerden dolayı ilaca devam edememe olayı etorikoksib grubunda diklofenaka kıyasla daha fazladır.[4] COX-2 selektivitesi yüksek iki ilaçla yürütülen MEDAL (**M**ultinational **E**toricoxib and **D**iclofenac **A**rthritis **L**ong-term) programında hem kardiyovasküler hem de gastrointestinal komplikasyonlar açısından önemli derecede farklılık bulunmamıştır. Yine de etorikoksibde kalp yetmezliği, hipertansiyon gibi kardiyovasküler nedenler ağırlıkta iken, diklofenakta GI olaylar baskındır. COX inhibisyonuyla ilişkisi anlaşılamamakla beraber hepatik disfonksiyon ve ilaca devam edememe durumu diklofenakta daha yaygındır. Şekil 6'da, yükselen COX-2 selektivitesi artmış KV risk ile, yükselen COX-1 selektivitesi artmış GI risk ile ilişkilendirilmiştir. Yuvarlakların görece büyüklükleri çalışmalardaki deneklerin çeşitliliğini göstermektedir. "ETORIOVER" adı etorikoksibin faz II ve III denemelerine genel bir bakışa atfen kullanılmıştır.[22]



Şekil 6: VIGOR, CLASS, MEDAL, TARGET, ETORIOVER deneylerinin kardiyovasküler ve gastrointestinal risk açısından karşılaştırılması

Koksib kullanımının kardiyovasküler risk artışı yaptığına dair olan çalışmalar incelendiğinde göz önünde bulundurulması gereken noktalar vardır. VIGOR'da rofekoksibe karşı grup olarak seçilen naproksen aspirine yakın derecede kardiyoprotektif etkilidir.[22] Ayrıca oluşturulan denek grubu yüksek kardiyovasküler risk taşıyan hastalardan seçilmiştir. CLASS çalışmasında da düşük doz aspirin kullanımına izin verilmesi ilaçların kardiyovasküler yan etkileri açısından güvenilir bir değerlendirme yapmayı engellemiştir. Genel olarak tüm programlarda COX selektiviteleri çok uç noktalarda olan moleküllerin karşılaştırılması, yan etki profilini genişletmiştir, kardiyovasküler yan etkiler MI, inme, konjestif kalp yetmezliğine; gastrointestinal yan etkiler de mide kanamalarına kadar varabilmektedir. Karşılaştırılan moleküllerin farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olması da sonuçlardaki farklılığa katkıda bulunan bir etmen olabilir. Özellikle rofekoksibin sülfon grubu ile zayıf doku dağılımı gösterirken (25 mg için dağılım hacmi 80 L), selekoksibteki sülfonamit fizyolojik pH'da yüklü olabilir ve geniş doku dağılımı gösterir (200 mg için dağılım hacmi 400 L).[1] Bu kimyasal farklılıklar, vasküler risk açısından anahtar gösterge olan endotel fonksiyonlar üzerinde bu ajanların gösterdiği birbirinden ayrı etkilerin nedeni olabilir.[34] Deneklerin bazı programlarda yüksek, bazı programlarda düşük kardiyovasküler risk taşıyan hastalardan oluşturulması da sonuçlar arası tutarsızlığa neden olan etmenlerdendir.[22]

Hem klasik NSAİ, hem de selektif COX-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler açıdan oluşturduğu tehditleri kapsayan bir hipotez, bu yan etkilerin COX-2 türevi olan PGI_2'nin ve bir miktar da PGE_2'nin baskılanmasından kaynaklandığıdır. PGI_2 trombozisi, hipertansiyonu, aterogenezisi artıran endojen uyarıyı kontrol altında tutan bir mediyatördür. Bu uyaranlardan en önemlisi platelet COX-1'inin ürünlerinden TxA_2'dir. Olay "iki mediyatör arasında bozulan denge" şeklinde nitelendirilecek kadar basit değildir; karmaşık bir biyolojik sistemde yer alan bu dengeyi koruyan başka mediyatörler de vardır.[4,5,9,18,36] Bu nedenle, düşük doz aspirin ile platelet TxA_2'sinin supresyonu bu mekanizma ile oluşan kardiyovasküler tehlikeyi tam olarak ortadan kaldıramaz, sadece zayıflatır.[22]

Selektiviteleri birbirinden hayli farklı olmasına rağmen rofekoksib ve selekoksib, MI insidansı bakımından çok benzer bulunmuştur. Bu durum, ilaçların COX-1 mediyatörü olan TxA_2'yi farklı derecelerde etkilemeleri ile açıklanabilir. Valdekoksib, etorikoksib ve rofekoksib gibi platelet fonksiyonları üzerinde etkisiz olması beklenen selekoksib ve diklofenak, platelet COX-1'ini orta derecede (%20-30) inhibe ettiği için plateletlerin TxA_2 üretme kapasitesinin ve platelet aktivasyonunun inhibisyonu arasındaki ilişki doğrusal değildir. Platelet gibi özel durumu olan hücreler dışında, PG oluşumunun ve PG-bağımlı fonksiyonların inhibisyonu arasındaki ilişki diğer hücrelerde doğrusaldır.[22]

COX-2 inhibitörleri ile gözlenen trombotik olayların bir sınıf etkisi olduğu açıktır. Aslında tüm NSAİ PGI_2'yi, TxA_2 ve benzer yönde etki eden mediyatörleri etkilemeksizin inhibe ederler. Kardiyovasküler riskin doza bağlı olabileceği de düşünülmektedir. İlacın yarı ömrü, dozlama aralığı da ayrıca önemlidir.[4] Rofekoksib ve selekoksibte görülen kardiyovasküler yan etkiler iki ilacın yüksek dozları ve uzun yarı ömürleri ile ilişkili olabilir (sırasıyla 14 ve 11 saat). Rofekoksibin doz bağımlı toksisitesine dair kanıtlar mevcuttur. Düşük dozlarda kullanılan selektif COX-2 ilaçların en az klasik NSAİ kadar etkin olması ve önemli artmış kardiyovasküler yan etki göstermeksizin azalmış ülser komplikasyonları insidansı, bu ilaçları yüksek dozla ortaya çıkan bir risk taşıdığını göstermektedir. Bu hipoteze göre, COX enzimlerini 24 saat boyunca inhibe eden uzun yarı ömre sahip ilaçların, kısa ömre sahip ilaçlara göre daha yüksek oranlarda toksik etkilere neden olduğu tahmin ediliyor. $t_{1/2}$= 13 saat olan naproksen selekoksib ve rofekoksibe benzerken, ibuprofen ve diklofenakın $t_{1/2}$= ~2 saattir. Eğer doz ve yarı ömür selektif COX-2 inhibitörlerinin VIGOR ve CLASS'ta gözlenen artan toksisitelerinin cevabı ise, bu sınıf ilaçların yararlılığını devam ettirir.[36] Çünkü bu yan etkiler, sadece COX-2 selektivitesine bağlanacak kadar basit bir mekanizmaya sahip değildir.

Kardiyovasküler yan etkiler için düşünülen diğer bir hipotez de, yapısında sülfon grubu içeren rofekoksibin aterotrombotik olaylarda artışa sebep olması ve aynı risk durumunun sülfonamit taşıyan selekoksib için gösterilememesi, rofekoksib ile görülen bu yan etkinin enzimatik olmayan bir mekanizma ile ilgili olabileceği fikrine dayanmaktadır. Bu hipotezi test etmek için aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların önemli bir göstergesi olan LDL'nin (low-density lipoprotein) oksidasyonu üzerinde sülfon türevi COX-2 inhibitörlerinin (rofekoksib, etorikoksib), sülfonamit türevlerinin (selekoksib ve valdekoksib) ve klasik NSAİ'nin (ibuprofen, naproksen, diklofenak) etkisi incelenmiştir. LDL oksidasyonunun endotel disfonksiyon ve enflamasyon mekanizmalarına katkıda bulunan aterosklerotik plak dayanıksızlığına neden olan bir etmen oluğu bilinmektedir. Ölçüm sonuçları, oksidasyonu arttıran iki ajanın rofekoksib ve etorikoksib olduğunu göstermektedir. LDL'nin oksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit miktarı da rofekoksib ve etorikoksib ile yükselmiştir. Aynı bulgular, sülfon taşıyan iki ayrı bileşik (metilfenilsülfon ve dimetil sülfon) ile ortaya çıkmamıştır. Bu sonuçlar, sülfon koksiblerinin enzimatik olmayan bir mekanizma ile LDL'de serbest radikal oluşumunu artırarak oksidasyona destek verdiklerini göstermektedir.[34]

İzoprostanlar, araşidonik asitten serbest radikal modifikasyonu ile nonenzimatik olarak oluşan PG izomerleridir. COX-2 inhibitörleri arasında izoprostan oluşumundaki farklılıklar ölçülmüş ve yine rofekoksib ve etorikoksibin izoprostan seviyelerini arttırdığı, selekoksibin ise yüksek konsantrasyonlarda dahi etkisiz olduğu görülmüştür.[34]

Sülfon türevi COX-2 inhibitörlerinin oksidasyonu artırıcı etkilerinin mekanizması, moleküllerin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak membranı oluşturan lipit tabakasının fosfolipit molekülleri ile spesifik etkileşimleriyle açıklanmaktadır. İlaç molekülleri ile muamele edilmiş fosfolipit tabakasının dar açılı X-ışını difraksiyonu yöntemi kullanılarak bu moleküllerin membran yapısı üzerine etkileri izlenmiştir. Sülfonlu ajanın kullanımını takiben fosfolipit açil zincirinin moleküler düzenlemesinin bozulması sonucu, membrandan serbest radikallerin difüzyonunda artış meydana gelir. Biyolojik membranların yapısını oluşturan lipit tabakasındaki değişikliklere ilaç moleküllerinin kimyasal özelliklerinin katkısını incelemek için sülfon türevleriyle (metil fenil sülfon ve dimetil sülfon) yapılan çalışmalarda bu sülfon türevlerinin etkisiz olması, rofekoksib ve etorikoksibin oksidasyonu arttırıcı aktivitelerinin sülfon grubuyla ilişkili elektron transferi ile değil de, lipit yapısında meydana getirdiği fizikokimyasal değişiklikler ile ilişkili olduğunu göstermektedir.[34]

EMEA (**E**uropean **M**edicines **A**gency) ilaç piyasasında olan selekoksib, etorikoksib ve parekoksibin kullanımına kısıtlama getirilmesini

önermiştir. Bu ilaçlar iskemik kalp hastalıkları ve/veya serebrovasküler hastalık (inme), periferik arter hastalığı olan kişilerde kontrendikedir. Hipertansiyon, hiperlipidemi, diabet ve sigara kullanımı gibi kalp hastalıklarına dair risk faktörüne sahip kişilerde de dikkatli kullanılmalıdır. Tedavi, mümkün olan en düşük etkin dozda ve en kısa kullanım süresinde tamamlanmalıdır. Klasik NSAİ'nin kardiyovasküler yan etkilerinin değerlendirildiği uzun süreli, prospektif, kontrollü çalışmalar olmamasına rağmen MI insidansının yüksek olduğuna ilişkin veriler mevcuttur ve FDA (**F**ood and **D**rug **A**dministration), bu ilaçlarla ilgili olarak benzer kısıtlamalar getirmiştir.[4] Selektif COX-2 inhibitörü bir maddeye onay şartı olarak şimdiye kadar bilinen yararlarından farklı olan başka bir etkinin tanıtılmasını istemektedir.[22]

AHA (**A**merican **H**eart **A**ssociation) kardiyovasküler rahatsızlıkları olan hastalarda NSAİ kullanırken aspirin, asetaminofen, asetillenmemiş salisilatlardan başlayıp, tadaviden cevap alınmadıkça COX-2 selektivitesi yükselen ilaçlara geçmeyi önermiştir.[22]

Selektif COX-2 inhibitörleriyle ilgili çalışmalar doğrultusunda klasik NSAİ'ye cevap vermeyen ya da gastrointestinal açıdan riskli olan hastalarda koksiblerin kullanımı kişiye özgü ilaç rejiminin bir örneği olacaktır. Selektif COX-2 inhibitörleri yüksek gastrointestinal toksisite ve düşük kardiyovasküler risk taşıyan hastalar için hala en uygun tercihtir.[4] Sonuç olarak, tüm tartışmalı yanların rağmen bu konunun üzerinde yapılan çalışmalar NSAİ'ye çok yol aldırmıştır, en önemlisi klasik NSAİ'ye göre daha iyi tolere edilebilen yeni bir sınıfın doğuşu gerçekleşmiştir. Eğilimli hastalar açısından kardiyovasküler risk taşıdığının altı çizilmesine rağmen COX-2 halen araştırmacıların ilgisini çeken bir konudur.[4,24]

2.3.2 COX-2 İnhibitörleri ile Yeni Terapötik Hedefler

COX-2 inhibitörleri ile son yıllarda yapılan çalışmalar, kanser ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar için yeni terapötik yaklaşımlar doğurmuştur.[5,8,24,26]

Olgun kan damarları COX-1 üretirken, yeni anjiyogenik hücreler indüklenebilir COX-2 sentezler ve salıverirler. COX-2 ürünü olan PGE_2'nin reseptörüyle bağlanmasıyla hücre proliferasyonu, göçü, apoptozis ve anjiyogenezisi kontrol eden sinyal yolakları aktifleşir ve bu şekilde tümör gelişimini ilerletebilir.[37] Büyüme faktörü kökenli tümörün COX-2 ürünü PGE_2'nin üretimini indüklenmesiyle anjiogenezisi artırdığına

dair bir hipotez vardır. Bu hipotez, PG'lerin proanjiyogenik özellikte maddeler olması ve tümör hücresinin beslenmesi için gerekli yeni kan damarlarının oluşumunu indükleyerek tümör büyümesine yardımcı olduğu bulgusuyla desteklenmektedir.[26] Normalde pasif olan COX-2 geninin aşırı sentezlenmrsi ve salıverilmesi, COX-2'nin artan üretimi, PG'lerin yükselmiş üretimleri malign tümör gelişiminin karakteristik özellikleridir. Karsinogenezis; mutajenezis (organizmanın genetik materyalinin değişmesi), mitojenezis (mitozun indüklenmesi), transkripsiyon (DNA'dan RNA'ya genetik bilginin aktarımı), translasyon (mRNA'lardaki koda uygun olarak ribozomlarda protein sentezlenmesi), anjiyogenezis (tümörün inaktif durumdan malign duruma geçişi ve yeni kan damarlarının yapımı), metastazda artış (orijinlendiği yerden diğer dokulara geçiş), apoptoziste azalışın (proglanmış hücre ölümü) olduğu çok basamaklı bir süreçtir. COX-2'nin blokajı ve regülasyonunun azaltılması karsinogenezisin birçok basamağını inhibe eder ve kanser riskini azaltır.[38]

Son yıllarda yürütülen çalışmalar ile, NSAİ'nin kolon, akciğer, prostat, mide, meme, özofagal neoplazi gibi birçok kanser tipinin gelişimini engellediği ortaya koyulmuştur.[8,37,38] Retrospektif analizlerle düzenli aspirin kullanan hastalarda kolorektal kanser gelişiminde %40-50 risk azalması olduğu saptanmıştır.[7] Düşük dozlarda düzenli klasik NSAİ'nin kullanımı (her gün 325 mg aspirin, 200 mg ibuprofen) kolon, akciğer, prostat ve meme dokusunda kanser riskini azaltmıştır. Antienflamatuvar amaçla kullanılan dozlara göre düşük olan bu dozlar NSAİ'nin neden olduğu özellikle GI üzerindeki yan etkileri de azaltmaktadır. Bu bulgular, NSAİ'nin antienflamatuvar aktiviteleri dışında antikanser aktiviteye sahip olduğuna da işaret etmektedir.[2,37,38]

COX ya da metabolitlerinin kolorektal tumorigeneziste (yeni tümör oluşumu) önemli rolü olduğuna dair hipotez, hayvan modelleriyle yürütülen çalışmalarda COX inhibitörlerinin tümör gelişimini inhibe ettiğini gösteren sonuçlar ile desteklenmektedir. Farelerle yapılan bir çalışmada oluşturulan kolorektal adenoma ve adenokarsinomanın selekoksib ile %93, nimesulid ile %68 ve sülindak sülfit ile % 62 oranında inhibe edildiği bildirilmiştir.[2] Klinik çalışmalar ile kolonda polip oluşumu ve ailesel adenomatöz polipozis sendromu olanlarda tümör gelişimini engellediği görülmüştür.[39]

İmmünohistokimyasal analizler, insanlarda epitel kökenli kanserlerde COX-2'nin yapısal olarak üretildiğini göstermiştir. COX-2 sentezi ve salıverilmesi birçok tümör tipinde neoplaztik hücrelerin toplamının %40-80'inde tespit edilmiştir. Kolon, meme, akciğer, prostat, mesane, özofagus, pankreatik, deri, mide kanserlerinde COX-2 sentezi ve salıverilmesinde artış bildirilmiştir.[7] Bu sonuçlar COX-2'nin, hiperproliferatif

hastalıkların erken döneminden invaziv karsinoma ve metastazın geç safhalarına kadar kanser gelişiminin çoğu aşamasında önemli role sahip olduğu görüşünün kuvvetlenmesine neden olmuştur.[2]

Daniels ve arkadaşlarının bir çalışması sonucu, TxA_2'nin de anjiyogenezisin önemli mediyatörlerinden olduğu öne sürülmüştür. TxA_2 reseptör antagonistlerinin antianjiyogenik; TxA_2 reseptör agonistlerinin proanjiyogenik aktivite göstermesi de bu bulguyu desteklemektedir.[2]

COX-2 gibi 5-LOX enziminin de apoptozis, proliferasyon, anjiyogenezis, invazyon ve metastazın indüklenmesinde önemli bir role aracılık ettiği biliniyor.[40] Araşidonik asitten 5-LOX katalizörlüğünde sentezlenen lökotrienler doğrudan ya da büyüme faktörleri aracılı mitojenik yolakta ara ürün olarak hücre proiferasyonunu arttırmaktadır. Prostat, kolon, pankreas, akciğer kanserlerinde de LOX yolağı enzimlerinin ve/veya LT'lerin aşırı üretimi gösterilmiştir.[8] Bu nedenle zaten antienflamatuvar etkinlikleri ile ilgi duyulan COX-2/5-LOX dual inhibitörlerinden kanserde de hem koruyucu hem de tedavi edici olarak kullanılabilecek yeni ajanlar yaratmak üzerinde çalışmalar devam etmektedir.[40]

Alzheimer hastalığından korunmada ve tedavisinde antienflamatuvar ajanların kullanılabileceği görüşü, Alzheimer hastalığının patolojik göstergeleri olan senil plak ve nörofibril düğümlerdeki karakteristik lezyonların aktive olmuş mikroglia hücreleriyle bağlantılı olduğunun ortaya konulmasından kaynaklanmaktadır. Senil plak, β-amiloid proteinlerin ekstraselüler agregasyonu ile oluşur ve beyinde enflamasyon bölgelerinde β-amiloid birikintileri görülmüştür. Kümelenmiş β-amiloid proteinleri tüm sistem için çok güçlü bir aktivatördür. Aktive olan mikrogliaların PG'ler, sitokinler, kemokinler, proteazlar, adezyon molekülleri ve serbert radikaller gibi birçok nöroenflamatuvar mediyatörleri uyardığı ve nöronal hücrelerin ölümüne neden olduğu *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir.[7,41] Bu nöroenflamatuvar mediyatörlerin de Alzheimer'dan etkilenen beyin bölgelerinde arttığı bilinmektedir.[41,42] *In vitro* çalışmalar ile NSAİ'nin mikroglia hücrelerinde nöroenflamatuvar mediyatörlerin aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca düzenli NSAİ kullananların ölüm sonrası beyinleri incelendiğinde kullanmayanlara göre önemli derecede az aktive olmuş mikroglia hücresi saptanmıştır.[42]

COX-2 sentezi ve salıverilmesinin piramidal tabaklarda artışı ile demansın orta aşamadan ileri aşamaya geçisi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. COX-2'nin yapısal olarak beyinde yüksek miktarlarda varlığı gösterilmiştir, ancak nöronlardaki fonksiyonları bilinmemektedir. COX-2

inhibitörlerinin uzun süre kullanımı ile bu fonksiyonların inhibe olmasına bağlı olarak ortaya çıkacak fizyolojik etkiler net değildir. COX-2'nin çeşitli nörotoksik uyarılarla nöronlarda, astrositlerde ve glia hücrelerinde indüklendiğine işaret eden çalışmalar vardır. Artmış COX-2'nin nöronal PG sentezinde artışa neden olması astroglial hücrelerden üretilen diğer proenflamatuvar ajanların seviyelerinde artışı harekete geçirir ve nöronal ölüme neden olur.[41]

COX-1 ve COX-2, Alzheimer hastalığının patojenezinde farklı hücresel süreçlerde yer almaktadır. COX-1 beyinde bazal durumda bulunmazken, Alzheimer hastalığında COX-1 sentez ve salıverilmesinde artış olduğu öne sürülmüştür. COX-1 sentez ve salıverilmesinin sadece mikroglia hücrelerinde, COX-2'nin ise mikroglialarda hiç artışı olmaksızın nöronal hücrelerde ve Alzheimer'ın patolojisinde zayıf noktalar olan piramidal nöronlarda sentezi ve salıverilmesinde artış olduğuna dair bulgular vardır. Ayrıca COX-2'nin Alzheimer hastalığının enflamatuvar nöromediyatörleri ile indüklenmediği görülmüştür. Alzheimer'lı beyinde, COX-1 pozitif mikroglial hücreler, amiloid plaklar ile birincil derecede ilişkili görülmüştür. Ayrıca Alzheimer'lı beynin iğsi görünümlü korteksinde COX-1 immünopozitif mikrogliaların yoğunluğunda artış bulunmuştur. *In vivo* analizlerde ise astrositlerde COX sentezi ve salıverilmesine dair bulgular saptanmamıştır. Bu sonuçlara göre bazı araştırmacılar, Alzheimer hastalığı için yeni terapötik yaklaşımlarının COX-1 inhibisyonunu hedef alması gerektiğini, COX-2 inhibisyonunun bu süreçte yer almadığını savunmaktadır.[7,42]

Nöropatik, epidemiyolojik ve transjenik hayvan modellerinde yapılan çalışmalar NSAİ'nin Alzheimer hastalığına karşı koruyucu ve tedavisinde de yarar sağladığını göstermektedir. Ancak bu sonuç klinik çalışmalar ile doğrulanmamıştır. Klinik olarak sadece iki pilot çalışmada indometasin ve diklofenak için umut verici sonuçlar bulunmuştur. Nimesulid, selekoksib ve rofekoksib ile yapılan dört klinik çalışmadan da hiçbir sonuç alınamamıştır. Bu durum, ele alınan teorinin baştan yanlış olduğu, NSAİ'nin sadece uzun dönem kullanımda koruyucu etki yarattığı veya seçilen ilaç ve dozun uygun olmadığı konusundaki soruları akla getirmektedir.[42]

Sonuç olarak, Alzheimer kronik enflamatuvar bir hastalık olduğu için NSAİ'nin tedavideki yeri üzerine yapılan araştırmalar devam etmektedir.[1,43]

2.4 Tromboksan ve Antiplatelet Aktivite

Koagülasyonun (pıhtılaşma) damar dışında gerçekleşmesi durumu hemostaz ve damar içinde meydana gelmesi olayı tromboz (damar içinde pıhtı ve trombus oluşumu); oluş şekilleri bakımından birbirine benzeyen ancak ilki fizyolojik, ikincisi ise istenmeyen ve patolojik bir süreçtir.[44]

Arterlerin ve venlerin çeperinde trombus ve gelişmesini inhibe eden ilaçlara (antikoagülan ve antiplatelet) ve oluşmuş pıhtıyı eriten ilaçlara (trombolitik) "antitrombotik ilaçlar" denir.[44] Antikoagülan ilaçlar kanın koagülasyonu üzerine etkiyerek damar içi pıhtılaşmayı engellerken, antiplatelet etkili ilaçlar trombositlerin (platelet) adezyon ve/veya agregasyonunu engelleyerek aynı amaç için kullanılır. Antiplatelet ilaçlar özellikle koroner arter hastalıklarında koruyucu etkilerinden dolayı son yıllarda yoğun araştırma yapılan bir ilaç grubudur.[45] Antikoagülan ilaçların kan damarlarında 72 saatten daha önce oluşan trombus üzerine etkileri yoktur. Trombolitikler (fibrinolitik olarak da bilinir) damar içinde oluşan trombusu eriten ilaçlardır.[46]

Trombositlerin tromboz oluşumu ile ilgili temel iki fonksiyonu, ancak aktive edildikleri zaman damar lezyonu olan bölgeye yapışmaları ve birbirlerine tutunarak kümelenmeleridir. Kümeleşen trombositlerin diğer trombositleri uyarmada kullandıkları bir mekanizma da, siklooksijenaz yolağında değinildiği gibi aktive olmuş plateletlerde ve makrofajlarda araşidonik asitten COX-1 ile siklik endoperoksit PGH_2'nin oluşması ve bundan da tromboksan sentaz ile güçlü bir trombosit uyarıcısı olan TxA_2'yi sentezlenmesidir.[44]

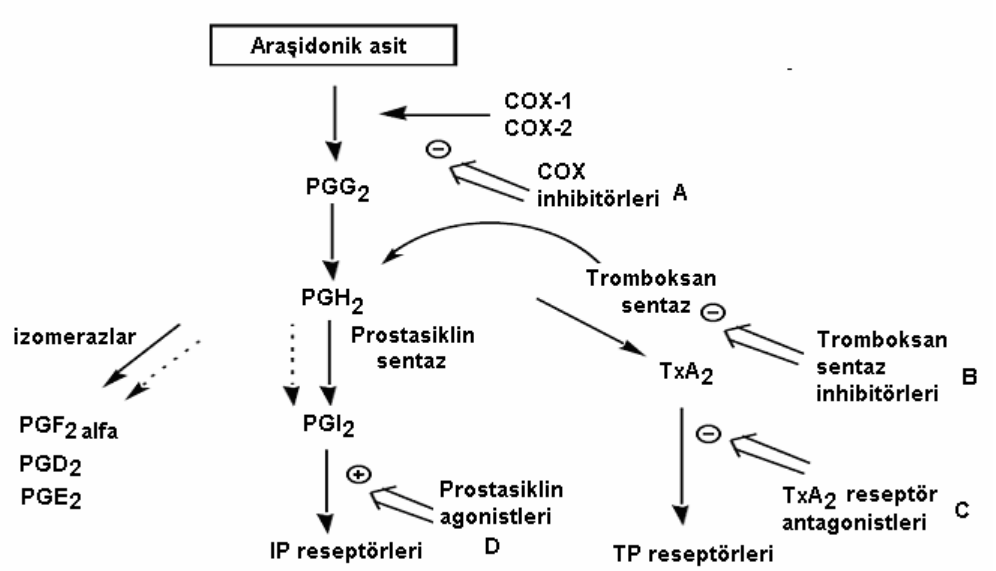
TxA_2'nin platelet agregasyonu, vazokonstriksiyon ve bronkokonstriksiyonu da içeren platelet stimülasyonu ve düz kas kontraksiyonu olarak iki ana fonksiyonu vardır. TxA_2'nin biyosentetik prekürsörü olan PGH_2 de aynı reseptörler üzerinden platelet ve düz kaslar üzerinde agonist etkisi gösterir.[6,47]

Ciddi periferik vasküler rahatsızlıklar, miyokard enfarktüsü, stabil olmayan angina, gebeliğe bağlı hipertansiyon, astma, lupus nefritis, trombozis, koroner trombotik sendromlar gibi bir seri hastalıkta, hastaların idrar ve kanında TxA_2'nin metabolitleri olan sırasıyla 2,3-dinor TxB_2 ve TxB_2'nin artışına bağlı olarak, bu hastalıklarda TxA_2'nin aşırı üretildiği gösterilmiştir. Bu klinik durumların çoğunda ve özellikle portal hipertansiyon, preeklamsi ve iskemik kalp rahatsızlıklarında artmış TxA_2

biyosentezine PGI_2'nin artışı da eşlik eder. Bu metabolit de vasküler ve bronşiyal endotelde PGH_2'de prostasiklin sentaz ile oluşur. PGI_2 platelet agregasyonu ve vasküler ve bronşiyal düz kas kontraksiyonunun en güçlü fizyolojik inhibitörlerinden birisi olduğu için, TxA_2'nin fonksiyonel antagonisti olduğu kabul edilmiştir.[6,47]

Selektif COX-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler sistem ile ilişkili problemlerine dair hipotezlerden birisi insan damar içi endotelinde ağırlıklı olarak COX-2 aktivitesi ile etkinleşen PGI_2'nin selektif COX-2 inhibisyondan ötürü azalırken, trombositlerde COX-1 ile etkinleşen TxA_2'nin etkinliğinin devam etmesiydi. Bu hipotez doğruysa COX-2 inhibe edildiğinde yükselmiş kan basıncı, hızlanmış aterogenezis ve artmış trombotik cevapla karşılaşmak olasıdır.[4,5,9,18,36]

Bu nedenle, prostasiklinin oluşumunu ya da fonksiyonlarını etkilemeksizin TxA_2'nin biyolojik etkilerini azaltan ilaçların, TxA_2 üretimin arttığı durumlarda terapötik açıdan yarar sağlaması beklenebilir. Bu sonuçtan hareketle, Tromboksan A_2 sentaz enzimini inhibe etmek ya da TxA_2'nin etkileştiği TP reseptörlerini bloke etmek iki anahtar hedeftir.[6] Bu amaçla tromboksan sentaz inhibitörleri, TxA_2/PGH_2 reseptör antagonistleri, dual etkili bileşikler (tromboksan sentaz inhibitörü/TxA_2 reseptör antagonisti) ve prostasiklin agonistleri sınıfına ait birçok bileşik sentez edilmiştir.[6,47]



Şekil 7: TxA_2 oluşum ve etkilerini azaltan ilaçlar [6]

A: Siklooksijenaz inhibitörleri

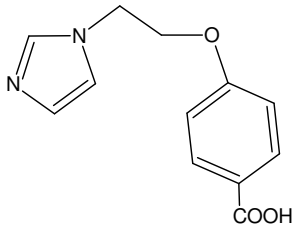
B: Tromboksan sentaz inhibitörleri

C: TxA_2 reseptör antagonistleri

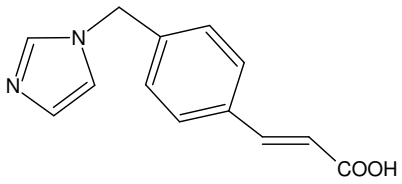
B ve C: Dual etkili Tromboksan sentez inhibitörleri / TxA_2 reseptör antagonistleri

D: PGI_2 agonistleri

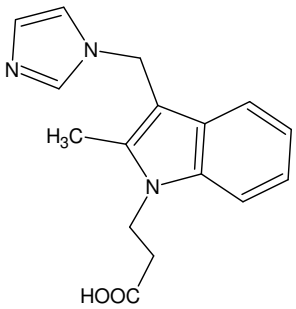
Tromboksan sentaz inhibitörleri (TxSI) seçici olarak TxA_2 biyosentezini inhibe ederler. Dazoksiben (UK 37248), dazmagrel (UK 38485), pirmagrel (CGS 13080), OKY 1581, ozagrel (OKY 046), isobogrel (CV 4151), furegrelat (U63557A) ve CS–518 gibi birçok tromboksan sentaz inhibitörü çeşitli anjina tipleri, periferik vasküler rahatsızlıklar, Raynaud's sendromu, pulmoner hipertansiyon ve ameliyat sonrası serebral vazospazm gibi çeşitli kardiyovasküler rahatsızlığı olan hastalarda ve sağlıklı gönüllülerde klinik olarak test edilmiştir.[6,47]



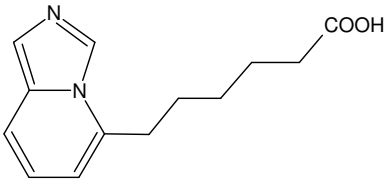
Dazoksiben



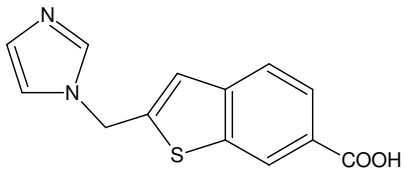
Ozagrel



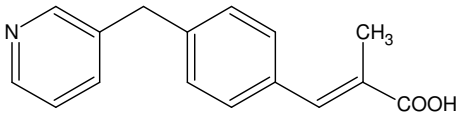
Dazmagrel



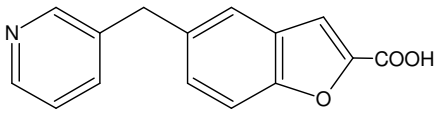
Pirmagrel



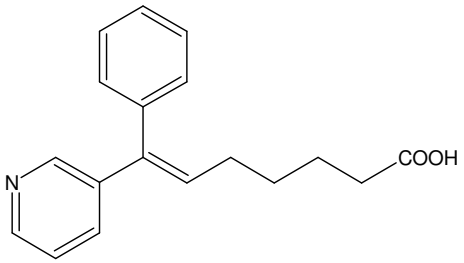
CS-518



OKY 1581



Furegrelate

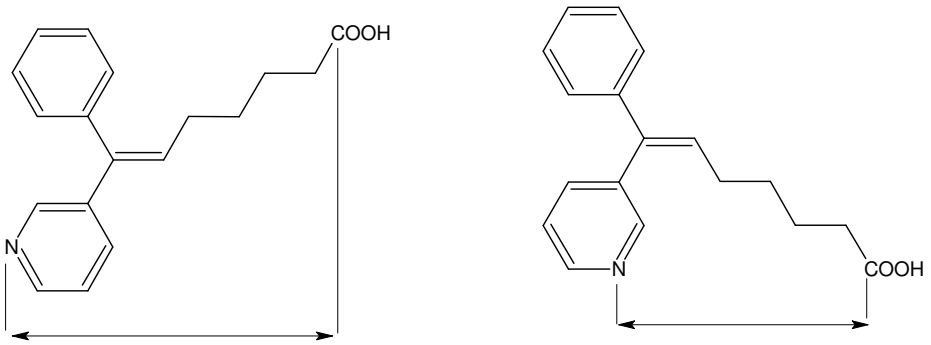


İsobogrel

Şimdiye kadar bu amaçla sentezlenmiş moleküllerin birçoğu değişmeyen imidazol-1-il veya pridin-3-il çekirdeği içerdiği için yapısal olarak iki farklı sınıf tanımlanmıştır; imidazolden ve piridinden türeyen TxSI'ler. Yapı-etki ilişkileri üzerine yapılan çalışmalarda, TxSI'ların gerekli yapısal özellikleri temel bir azot atomu (3 numaralı konumdan sübstitüe edilmiş piridin ya da N-sübstitüe imidazol) ve azot atomundan 0.85 -1 nm uzaklıkta bulunan bir karboksilik asit grubudur. Bu heterosiklik halkalardaki azot atomunun Tromboksan sentaz enziminin katalitik bölgesindeki hem grubunun demir atomu ile bir kompleks oluşturduğu düşünülmektedir.[6]

d= 0.85-1 nm

Piridinik TxSI'ndan isobogrelin (CV4151) öncü bileşik olduğu kabul edilmiş ve inhibitör aktivitesinin stereoizomerizmine bağlı olduğu bulunmuştur. Gerçekten de isobogrelin E izomeri, Z izomerinden çok daha etkindir. Bu durum E izomerde piridin halkasının N atomu ile karboksilik asit karbonu arasındaki mesafenin 8.92 A° iken, Z izomerinde yalnızca 4.92 A° olması ile açıklanmıştır.[6]



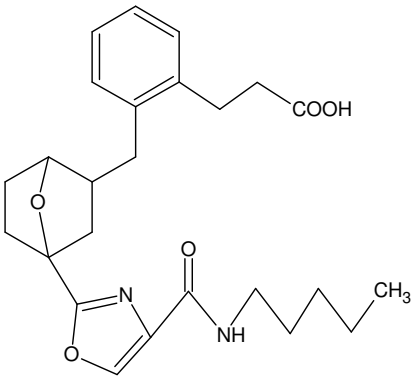
(E) izomer: d= 0.892 nm (Z) izomer: d=0.492nm

İsobogrel (CV-4151)

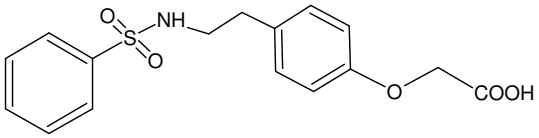
Klinik çalışmalarda, bu bileşikler kronik stabil anjina ve vazospastik anjinada etkin bulunmamış, sadece stabil olmayan anjina hastalarında semptomatik yarar sağlamıştır. Bu sonuç, ilaçların kullanıldığı dozda tromboksan sentazı yetersiz inhibe etmesi ve TxSI'nin kimyasal olarak daha stabil ve TxA_2 ile aynı reseptörler üzerinden benzer biyolojik etkileri gösteren PGH_2'nin birikimine neden olması ile açıklanabilmektedir. Bu nedenle dual etkili TxA_2 reseptör antagonistleri/tromboksan sentaz inhibitörlerin kullanımı çözüm olabilir.[6,48]

TxA_2 reseptör antagonistleri (TxRA), TxA_2 ve PGH_2 etkilerini reseptör seviyesinde engeller. TxSI'nın aksine, TxRA prostasiklin ve diğer PG'lerin sentezini etkilemez. Klinikte astma ve çeşitli kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılır. Kimyasal olarak iki sınıfta incelenebilirler;

- TP reseptör ligandları ile ilişkili prostanoid TxRA,
- Fenilsülfonamido fonksiyonu ile karakterize non-prostanoid TxRA.[47]

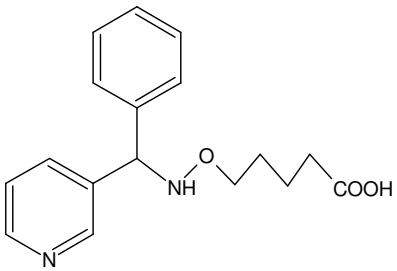


İfetroban

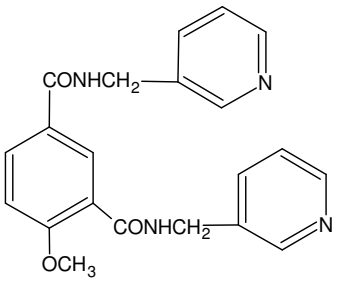


Sulotroban

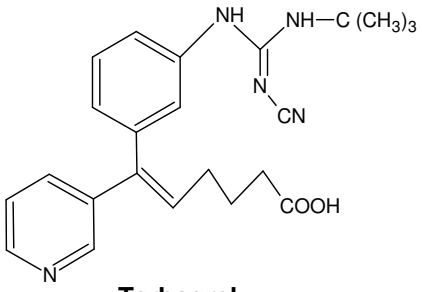
TxSI ve TxRA birlikte kullanıldığı gibi iki etkiyi aynı molekülde birleştirmeye yönelik çalışmalar da vardır. Ridogrel, pikotamit, terbogrel bu düşünceden ortaya çıkan bileşiklerdir. Pikotamit, antitrombotik ve antiplatelet ajan olarak kullanılmaktadır.[47]



Ridogrel



Pikotamit



Terbogrel

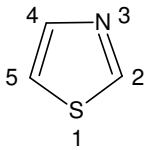
IC_{50} TxSI = 0,004 µM [48]

IC_{50} TxRA = 0,011 µM

Farmakoforik fonksiyonları belirlemek üzere yapılan üç boyutlu bir çalışmada dual aktivite için iki hidrojen bağı akseptör bölgesi, bir aromatik halka, bir negatif iyonize olabilen grup ve bir hidrofobik grubun önemli olduğu ortaya konulmuştur.[48]

2.5 Tiyazol

Yaygın olarak tiyazol olarak adlandırılan heterosiklik halkanın IUPAC kurallarınca adı 1,3-tiyazoldür. Numaralandırılması aşağıdaki formül üzerinde gösterilmiştir.[49]



Tiyazol

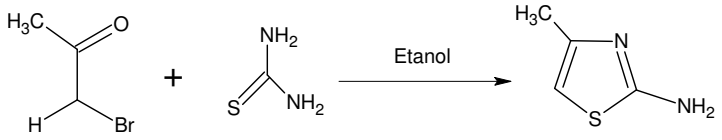
Tiyazol kaynama noktası 118,2 °C olan renksiz bir sıvıdır. Termal stabilitesi yüksektir, 530 °C'de bozunur. Hidroklorür tuzunun erime derecesi 138 °C'dir ve su ve birçok solvanda çözünür. Tiyazol:su, 0,28:0,72 mol oranında azeotrop yapar ve denge sıcaklığı 65 °C'dir. Piridinden daha zayıf bazdır, birçok metal tuzuyla kompleks yapar.[49]

Tiyazolün elektronik yapısı farklı yöntemlerle belirlenmiş ve kükürtün net π yükü pozitif, net σ yükü bazen pozitif bazen negatif; azotun toplam net yükü negatif; C-2 atomunun pozitif ancak sıfıra çok yakın ve halkanın toplam net π yükü negatif olarak hesaplanmıştır. Net σ yükleri esas alınarak da halka protonlarının asiditesi $H_4 < H_5 \leq H_2$ şeklinde sıralanmaktadır.[49]

Tiyazolün aromatik karakteri tiyofen ve piridin arasındadır. ^{1}H-NMR'da ($CDCl_3$) 8.89 (H_2), 7.99 (H_4), 7.43 (H_5) ppm'de pik verir. Kütle spektrumunda da halkanın aromatik karakterini ifade eden kuvvetli bir moleküler pik verir.[49]

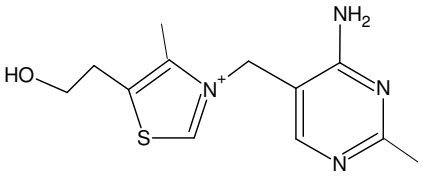
Tiyazol türevlerinin reaktivitesi, kuantum kimyasal hesaplamaları ile elektrofilik reaksiyonlar için C-2 ≤ C-4 < C-5, nükleofilik reaksiyonlar için C-2 ≤ C-4 < C-5 ve radikalik reaksiyonlar için C-4 ≤ C-5 < C-2 şeklinde bulunmuştur.[49]

α-Halokarbonil bileşiklerinin tiyoüre ile tepkimesinden tiyazolü elde eden Hantzsch, bilinen ilk tiyazol sentezini gerçekleştiren araştırmacıdır.[49]



Doğada tiyazolün kendisi bulunmamasına rağmen alkoloid ve siklopeptit gibi birçok doğal üründe tiyazol halkası vardır. Bu ürünlerden bazılarının antifungal ve antibiyotik aktivitesi vardır. Deniz ürünlerinden izole edilen tiyazol türevlerinin de antineoplastik ve sitotoksik aktivitesi saptanmıştır. Ayrıca tiyazol ve dihidrotiyazol içeren siklopeptitlerin sitotoksik aktivitesi bulunmuştur. Bu yapılarla ilişkili doğal ürünlerin hücre büyümesini güçlü şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir.[49]

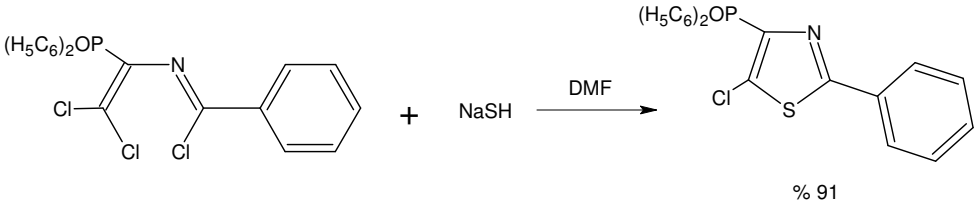
Tiyazol içeren en önemli doğal ürün tiamindir (vitamin B1). Penisilin antibiyotiklerde indirgenmiş tiyazol halkası içerir. Daha birçok ilaçta tiyazol halkası bulunmaktadır.[49]



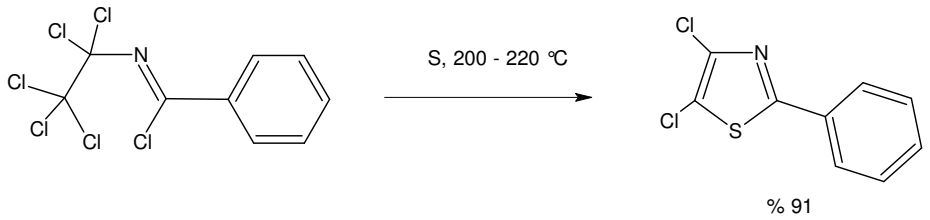
Tiamin

2.5.1 <u>Tiyazol Halkasının Genel Sentez Yöntemleri</u>

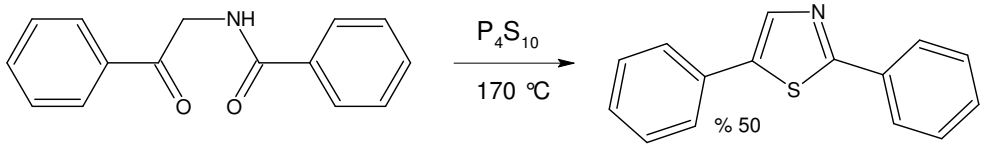
N-viniliminlerin imino grubunun α-karbonuna bağlı ve vinil kısmınının β- karbonuna bağlı halojen taşıyan türevlerinin kükürt verici bir ajanla tiyazol halkası oluşturdukları bildirilmiştir.[49]



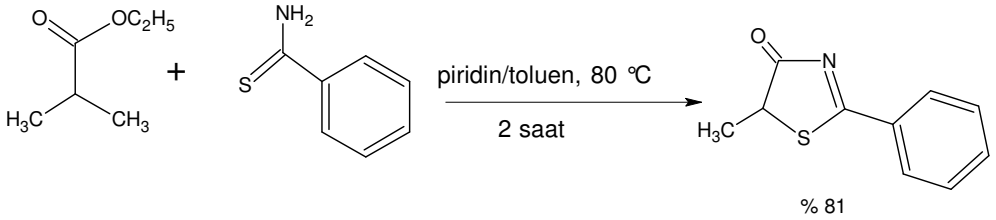
2,5-Disübstitüe-4-klorotiyazol türevlerinin N-(polikloroalkil)imidoil klorürlerin elementel kükürt ile 200 °C'nin üzerinde ısıtılmasıyla elde edildiği kayıtlıdır.[49]



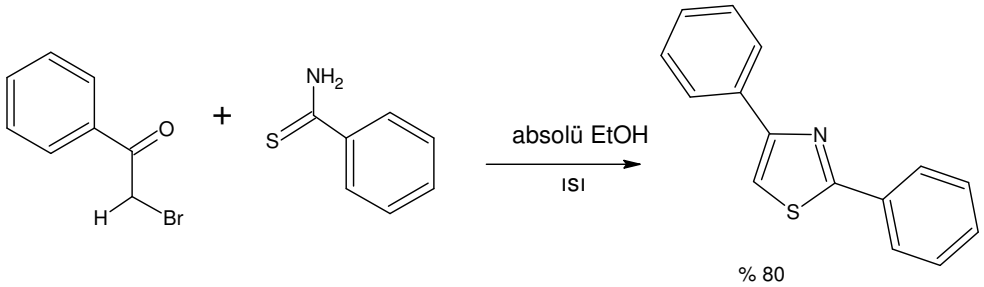
α-Açilaminoketonlar ve α-açilaminoesterler, fosfor pentasülfür gibi kükürt verici bileşiklerle tiyazol halkası kapatırlar.[49]

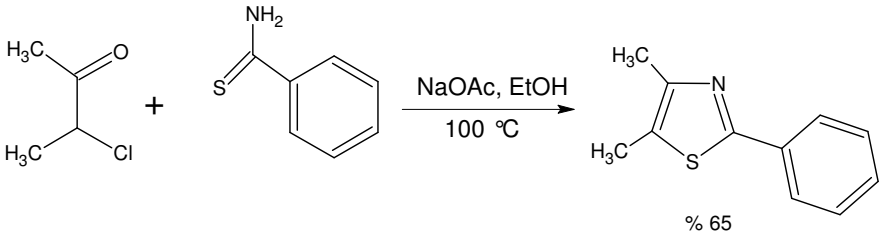


α- Karbonunda halojen bulunan karboksilik asit türevleri ile tiyobenzamit, tiyazol-4(5*H*)-on türevlerini vermektedir.[49]

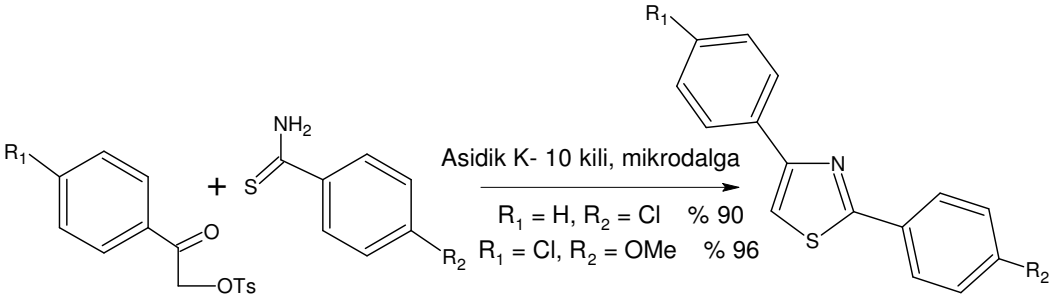


α-Haloketonların tiyobenzamit ile tepkimesinden de tiyazol elde edilir. α-bromoketon tepkimeleri α-kloroketona göre daha yüksek verimle yürüdüğü bildirilmiştir.[49]

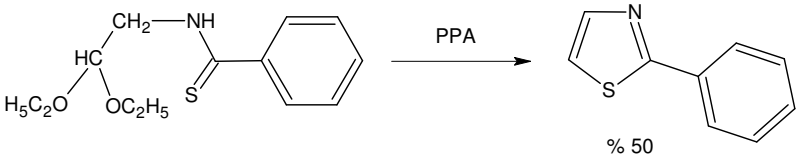




2,4-Diariltiyazollerin, α-tosiloksi-sübstitüeketonlar ve tiyobenzamitlerden mikrodalga reaktöründe solvansız ortamda 3-4 dakikada sentezlediği bildirilmiştir.[49]



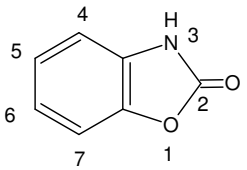
α-Tiyoaçilamino ketonlardan asit katalizli halkalaşma reaksiyonu ile tiyazol elde edildiği kayıtlıdır.[49]



2.6 2-Okso-3*H*-benzoksazol

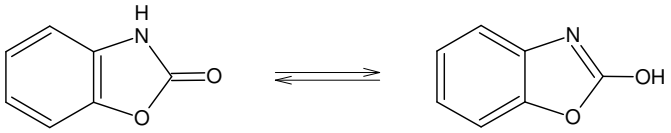
2.6.1 2-Okso-3*H*-benzoksazol ile İlgili Genel Bilgiler

2-Okso-3*H*-benzoksazol, benzen ve 2-oksazolinon halkalarının kaynaşmasından oluşmuş heterosiklik bir bileşiktir. 2-Benzoksazolinon ve 2(3*H*)-benzoksazolon olarak da adlandırılmıştır. Numaralandırılması aşağıda gösterildiği gibidir.[50]



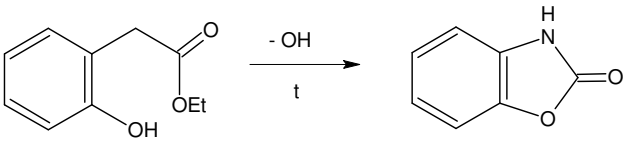
2-Okso-3*H*-benzoksazol erime derecesi 139-140 °C olan beyaz renkli bir bileşiktir. Sulu çözeltilerinde pH < 5'te noniyonize, pH > 11,5'te iyonize halde bulunur.[51]

2-Okso-3*H*-benzoksazolün, 2-okso-3*H*-benzoksazol ve 2-hidroksibenzoksazol şeklinde iki totomerik formu vardır. Hartley ve arkadaşları spektral ve kimyasal bulgulara dayanarak bu totomer dengenin laktam formu lehine olduğunu bildirmişlerdir.[52]

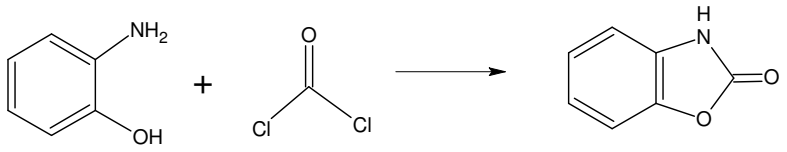


2.6.2 2-Okso-3*H*-benzoksazol Bileşiğinin Genel Sentez Yöntemleri

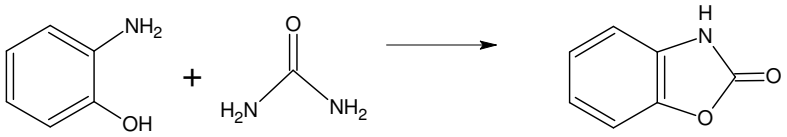
2-Okso-3*H*-benzoksazol ilk kez 1876'da Groenvik tarafından etil N-*o*-hidroksifenilkarbamattan hareketle sentezlenmiştir.[53]



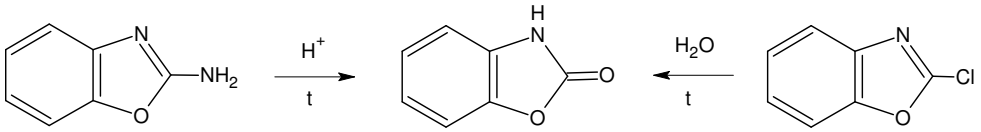
1887 yılında von Chelmicki, *o*-aminofenolün kuvvetli bazik ortamda fosgenle tepkimesinden 2-okso-3*H*-benzoksazolü düşük verimle elde etmiştir.[54] Von Meyer *o*-aminofenolü piridin içinde fosgenle muamele ederek % 82 verimle sentezlemiştir.[55] Close ve arkadaşları ise *o*-aminofenol ve fosgenden hareketle, etilasetat içerisinde ve susuz potasyum asetat varlığında % 90 verimle 2-okso-3*H*-benzoksazolü elde etmiştir.[56]



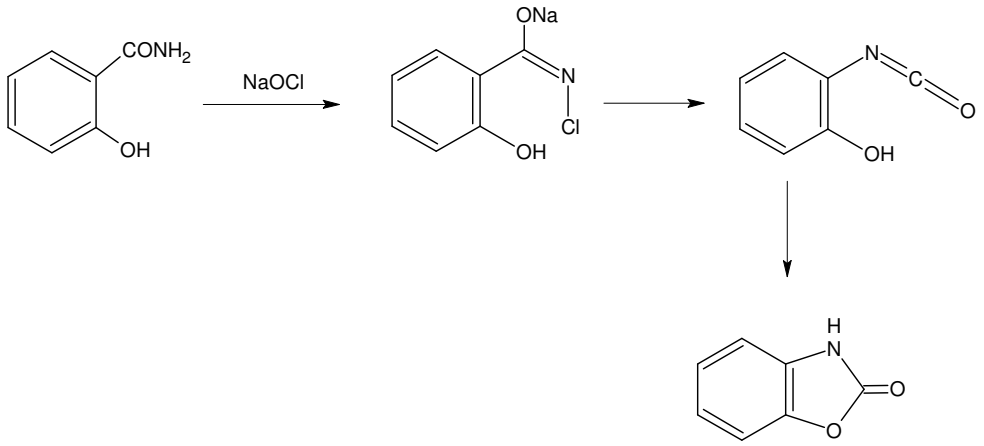
2-Okso-3*H*-benzoksazol sentezini *o*-aminofenol veya tuzlarının üre ile tepkimeye sokarak gerçekleştiren ilk araştırmacı Sandmeyer'dir.[57]



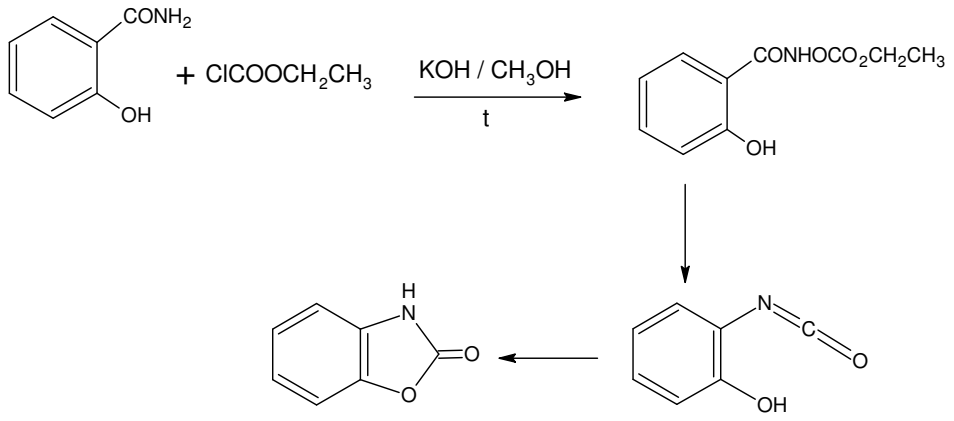
2-Okso-3*H*-benzoksazol, 2-aminobenzoksazolün asit ortamda[58], 2-klorobenzoksazolün sulu ortamda[59] ısıtılmalarıyla elde edildiği bildirilmiştir.



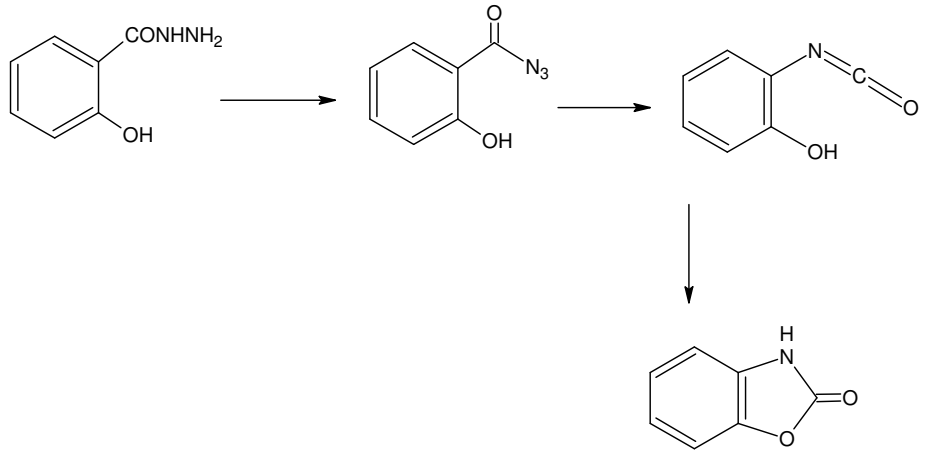
Graebe ve Rostovzeff, salisilamitten hareketle Hofmann tepkimesi şartlarında oluşturulan izosiyanat türevi üzerinden 2-okso-3*H*-benzoksazol elde edilebileceğini belirtmişlerdir.[60]



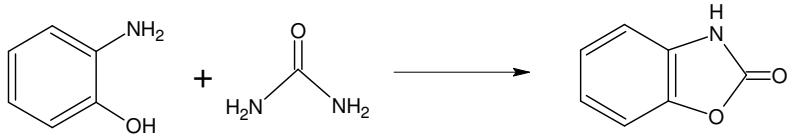
Ostaszynski ve arkadaşları, salisilhidroksamik asit ve etil kloroformat ile Lossen çevrilmesi sonucu 2-okso-3*H*-benzoksazol elde etmişlerdir.[61]



Curtius tepkimesi şartlarında, salisilhidrazitten hareketle 2-okso-3*H*-benzoksazol hazırlanabilmektedir.[50]



1996'da Khajavi ve arkadaşları tarafından 2-okso-3*H*-benzoksazolün mikrodalga enerjisiyle 3mL N,N-dimetilasetamit içerisinde 0,02 mol 2-aminofenol ve 0,022 mol üreden hareketle %89 verimle iki basamak şeklinde sentezlendiği belirlenmiştir.[62] 1. basamakta 210 Watt enerji 11 dakika uygulanmış, oda sıcaklığına kadar soğuması beklendikten sonra 2. basamakta 2,5 dakika süreyle 385 Watt enerji verilmiştir.

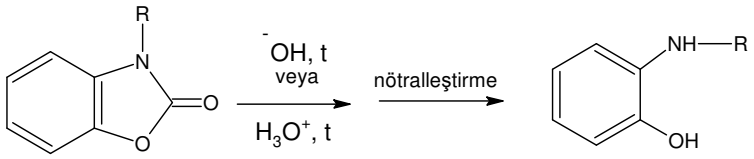


1. basamak = 210 watt, 1 dk

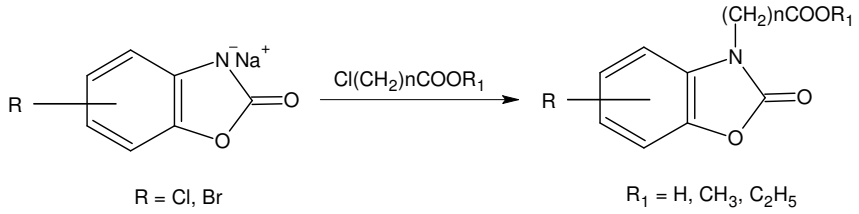
2. basamak = 385 watt, 2,5 dk

2.6.3 <u>2-Okso-3*H*-benzoksazolün Kimyasal Tepkimeleri</u>

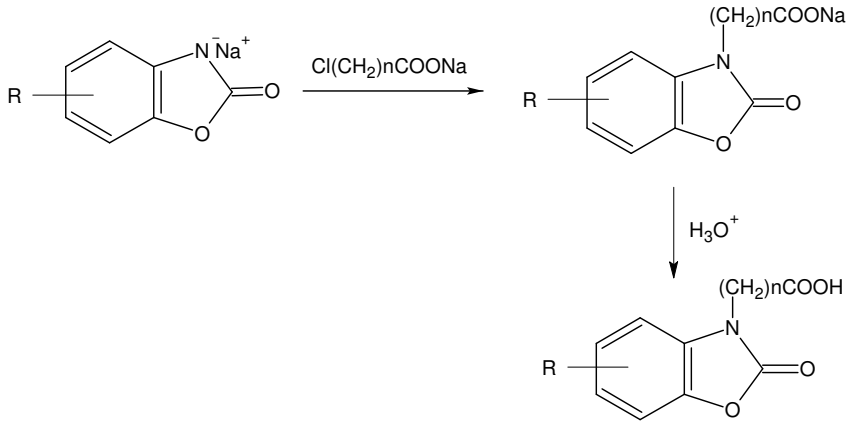
2-Okso-3*H*-benzoksazolün hidroliz ajanlarına karşı dayanıklı olduğu, fakat derişik alkali hidroksit[63] ve derişik asit[64] çözeltileriyle uzun süre ısıtılmakla *o*-aminofenol türevlerine dönüştüğü bildirilmiştir.



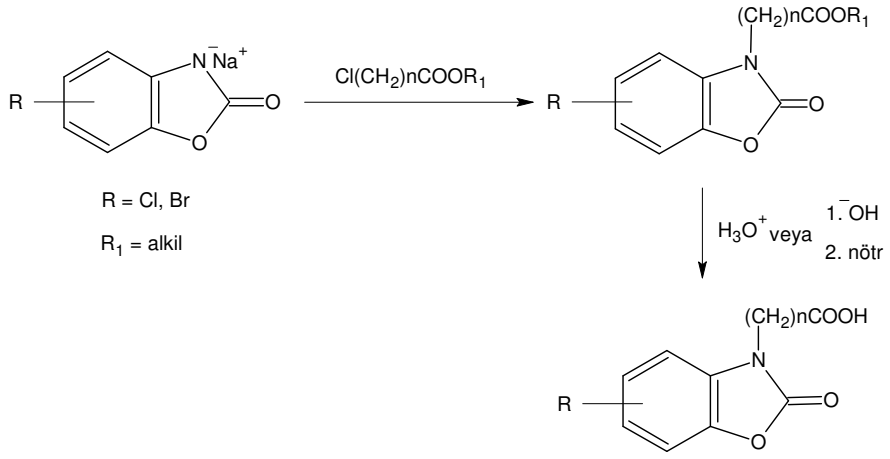
2-Okso-3*H*-benzoksazol üç numaralı konumundan katım ve sübstitüsyon tepkimelerine girebilir. Alkil (2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoat türevlerinin sentezinde genel olarak kullanılan yöntem, 2-okso-3*H*-benzoksazolün sodyum tuzunun oluşturulması ve daha sonra bu tuzun haloalkanoik asit esterleri ile uygun çözücü içerisinde tepkimeye sokulmasıdır.[65]



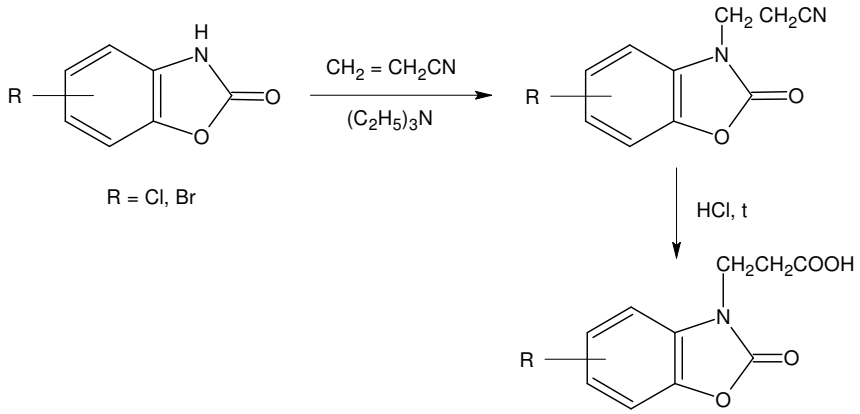
(2-Okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoik asit türevleri, 2-okso-3*H*-benzoksazolün sodyum tuzunun haloalkanoik asit türevlerinin sodyum tuzları ile tepkimeye sokulmasıyla elde edilebilir.[66]



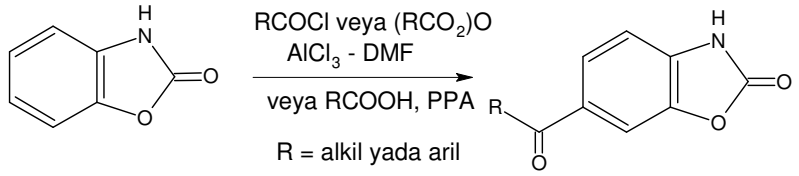
(2-Okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoik asit türevleri, haloalkanoik asit esterleri ve 2-okso-3*H*-benzoksazolün sodyum tuzunun tepkimesinden elde edilen (2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoik asit esterlerinin hidrolizinden de elde edilir.[65]



2-Okso-3*H*-benzoksazolün Michael katımı şartlarında akrilonitril ile tepkimesinden 2-okso-3-(2-siyanoetil)-3*H*-benzoksazol elde edilir. Bu ürünün de derişik hidroklorik asit ile ısıtılması 3-(2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)propanoik asit elde edilmiştir.[67]

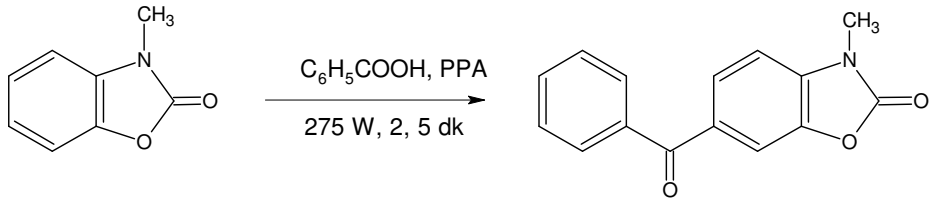


2-Okso-3*H*-benzoksazol, klasik elektrofilik sübstitüsyon reaksiyonlarına ilgi gösterir. Friedel Crafts açilleme şartlarında (PPA içinde karboksilli asitlerle veya $AlCl_3$/ DMF veya $AlCl_3/CS_2$ içinde asit klorür ya da anhidritlerle) 6. konumdan açillenir.[68,69]



2-Okso-3*H*-benzoksazolün açillenmesi, Friedel-Crafts açilleme tepkimesinden başka çözücü ve katalizör olarak polifosforik asit (PPA) kullanılarak da gerçekleştirilmektedir.[69] PPA polimer bir yapıya sahiptir, organik maddeler için iyi bir çözücüdür, aromatik sübstitüsyon tepkimelerine girme eğilimi göstermez. Akışkanlığı az olduğu için 90 °C'nin altında çalışılması zordur ve tepkime sonrasında hidrolizi güçtür. Kullanım zorluğuna neden olan bu özelliklerine rağmen PPA açilleme tepkimelerinde çok tercih edilen bir çözücüdür. Alifatik, aromatik ve arilalifatik karboksilli asitlerle yapılan açilleme tepkimeleri PPA içerisinde yüksek verimle yürümektedir.[70]

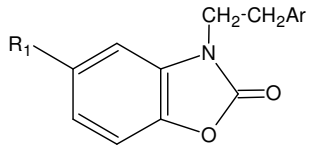
Liacha ve arkadaşları, 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada 3-metil-2-okso-3*H*-benzoksazol ve benzoik asitten hareketle, mikrodalga enerjisini kullanarak 275 Wattta 2,5 dakika sonunda %65 verimle 6-benzoil-3-metil-2-okso-3*H*-benzoksazol elde etmişlerdir.[71]



2.6.4 Analjezik ve Antienflamatuvar Etkili 2-Okso-3*H*-benzoksazol Yapısındaki Bileşikler

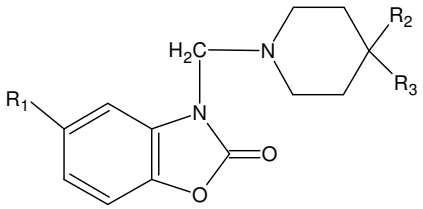
2-Okso-3*H*-benzoksazolün analjezik etkinlikleri üzerine yapılan araştırmalar, Close ve arkadaşları tarafından sentezlenen üç numaralı konumda alkil, aril, asetil, beş numaralı konumda alkil, metoksi ve 6 numaralı konumda alkil ve halojen ile sübstitüe edilmiş 2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin aspirine eşdeğer ya da daha etkin analjezik etkili olduğunun belirlenmesi ile başlamıştır.[56]

3-(2-,4-Piridinil)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin analjezik etkinlikleri aspirinden oldukça yüksek bulunmuştur. Antienflamatuvar etkinlikleri de karagenin ile oluşturulan pençe ödemi testinde yüksek bulunmuştur.[72]



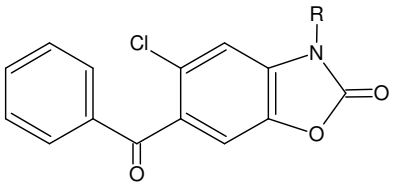
Ar = 2-, 4-piridinil
R_1 = H, Cl

Azot atomu üzerinde piperazinilalkil ve piperidinilmetil grubu taşıyan 2-okso-3*H*-benzoksazol bileşiklerinin analjezik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.[73]



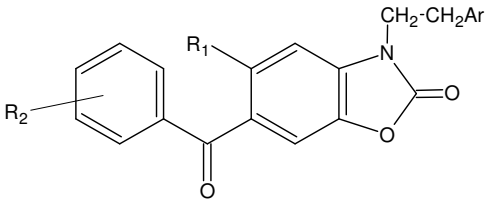
R_1 = H, Cl
R_2 = H, OH
R_3 = fenil, benzil

1985 yılında yapılan bir çalışmada sentezlenen 6-benzoil-5-kloro-3-alkil-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin antienflamatuvar ve antitrombotik etkinliğe sahip olduğu belirtilmektedir.[74]



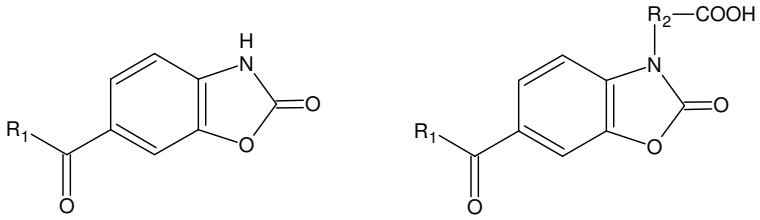
R = H, alkil

6-Benzoil-3-piridiniletil-2-okso-3*H*-benzoksazol yapısını içeren bileşiklerin çoğunun yüksek analjezik ve antienflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. Türevlerin hemen hemen hepsi aspirinden daha yüksek analjezik etkiye sahipken, antienflamatuvar etkileri de indometasinden 2-3 kat fazla bulunmuştur.[72]



Ar = 2 - , 4 - piridinil
R_1 = H, Cl
R_2 = Cl

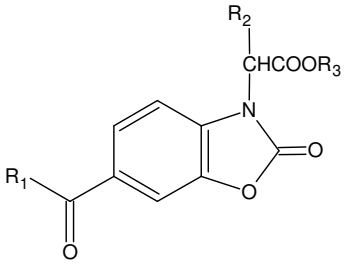
Renard ve arkadaşları, 1980 yılında 6-açil-2-okso-3*H*-benzoksazol türevleri yanında (6-açil-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoik asit türevlerini sentezlemişlerdir. 6-Açil-2-okso-3*H*-benzoksazol türevleri yüksek analjezik etki gösterirken, alkanoik asit türevlerinin antienflamatuvar etkinliğinin ketoprofenden daha yüksek olduğu bildirilmiştir.[69]



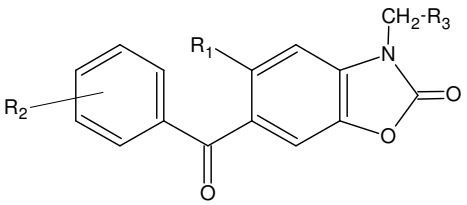
R_1 = C_6H_5, 2(Cl)C_6H_4, 4(CH_3O)C_6H_4, 2-tiyenil

R_2 = CH_2, CH_2CH_2, $CHCH_3$

6-Açil-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoik asit türevlerinden sonra esterleri de analjezik ve antienflamatuvar aktivite açısından değerlendirilmiş ve alkanoik asit türevlerinin bu asitlerin etil esterlerinden daha aktif olduğu bildirilmiştir.[65]



Altı numaralı konumunda benzoil grubu içeren (2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)asetamit ve asetonitril türevlerinin analjezik etkinliklerinin olduğu bildirilmiştir.[75]

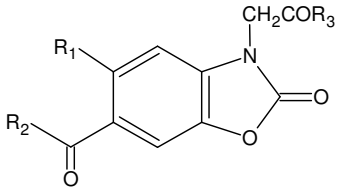


R_1 = H, Cl

R_2 = 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-F, 3-F, 4-F

R_3 = $CONH_2$, CN

N-(2-piridil)-2-(2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)asetamit ve N-(1-pirolidinil)-2-(2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)asetamit türevlerinin aspirine eşit ya da daha kuvvetli analjezik etkinlik gösterdiği bulunmuştur.[66,76]

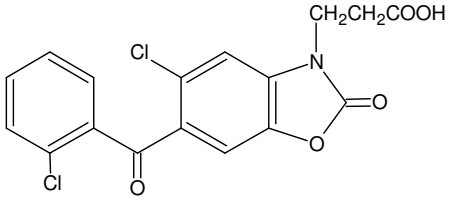


R_1 = H, Cl

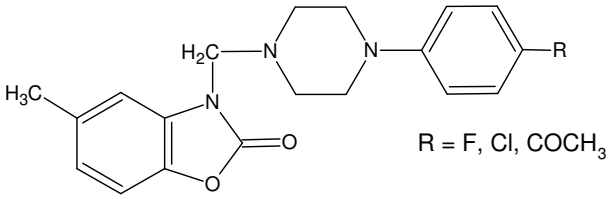
R_2 = fenil

R_3 = OH, OCH_3, morfolinil, pirolidinil, N- piridinil

2003 yılında yapılan bir diğer çalışmada 6-benzoil-(5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)propanoik asitin yüksek analjezik ve antienflamatuvar etki gösterdiği belirtilmiştir.[77]



2005 yılında yayınlanan bir çalışmada 5-metil-3-sübstitüepiperazinometil-2–okso-3*H*-benzoksazol türevlerini sentezlenmiş ve analjezik, antienflamatuvar etkilerini değerlendirmişlerdir. Elektron çekici gruplar ile paradan sübstitüe fenil türevleri en iyi aktiviteyi gösteren bileşiklerdir.[78]



R = F, Cl, $COCH_3$

2.7 Mikrodalga Sentezleri

2.7.1 Mikrodalga Sentezleri ve Medisinal Kimya

İlaç endüstrisinin en önemli hizmetlerinden biri de araştırma-geliştirme verimliliğini arttırmaktır. Gelecek on yılda endüstri, birçok ilacın patent süresinin dolduğunu görecektir. Endüstri, yarışını sürdürmek için, ekonomisini dengeleyecek, hisselerinin değerini ve kuruluşunun büyümesini arttıracak stratejilerini sürdürme ihtiyacı duyacaktır. Genomiks ve proteomiks üzerinde yapılan çalışmalar, ilaç hedeflerinin sayısında bir patlama yaratmıştır. Günümüz ilaç terapisi yaklaşık 500 civarında biyolojik hedefe dayanırken, 10 yıl içerisinde bu hedeflerin sayısı 10000'e ulaşabilir. Farmasötik kuruluşlar potansiyel ilaç adaylarının sayısını arttırmak amacıyla, proteomiks ve genomiks araştırmalarına hız vermekte, biyolojik görüntüleme ve kombinatoryal kimya tekniklerine yatırım yapmaktadırlar. Ancak, ilaç keşfetme sürecinde, lider bileşik optimizasyonunda medisinal kimyanın darboğazı sürmektedir. İstenen biyolojik özelliklere sahip molekül gelişimi zaman alıcı ve pahalıdır. Bu nedenlerden ötürü, hızlı senteze olanak sağlayan teknolojilere ve kimyasal maddenin fonksiyonel niteliklerini belirleyen görüntüleme tekniklerine ilgi artmaktadır.

Geleneksel sentezlerdeki zorluk, istenen ürünü, istenen verim ve saflıkta sentezlemek ve sentez şartlarını optimize edebilmektedir. Bir sentez esnasında en az bir ya da daha fazla basamakta ısıtma gerektiği için, reaksiyon koşullarının oturtulması genelde zor ve zaman alıcıdır. Kontrollü koşullar altında mikrodalga destekli ısıtma ile, çarpıcı şekilde reaksiyon süresinin günlerden saatlere, dakikalara, hatta saniyelere düşmesi medisinal kimya ve ilaç keşfetme uygulamaları için mikrodalga enerjisinin çok değerli bir uygulama olduğunu göstermiştir. Birçok reaksiyon parametresi, birkaç saat içinde uygun kimyayı optimize etmek üzere değerlendirilebilir ve bu yeni, etkili teknoloji kullanılarak paralel ya da basamaklar halinde sentezi gerçekleştirilebilir. Ayrıca, mikrodalga ile sentez, genel olarak kimyanın genişlemesine, özellikle de biyolojik açıdan yararlı medisinal kimyanın gelişmesine olanak verecek yeni reaksiyon yolları keşfetme olanağı sağlar.[79]

2.7.2 Mikrodalga Enerjisi Destekli Organik Sentezler

Tarihçe;

Bunsen beklerinin reaksiyon kaplarına uygulanması, Robert Bunsen'in 1855 yılındaki icadı ile sentetik kimyadaki yerini almıştı. Bunsen beklerinin yerini ilerleyen yıllarda yağ banyoları, mantolu ısıtıcılar ve sıcak tablalar almıştır. Geçtiğimiz birkaç yıl içerisinde de bilim çevresinde kimyasal reaksiyonların ısıtılması ve yürütülmesinde mikrodalga enerjisinin kullanımı popüler bir konu olmuştur.

Mikrodalga enerjisi, ilk olarak 1940'larda Percy Spencer tarafından gıda maddelerinin ısıtılması için kullanıldı. 1950'lere kadar özellikle gıda-işleme, kurutma, polimer endüstrisi başta olmak üzere birçok teknik uygulamada kimya ve diğer ilgili endüstrilerde kullanım bulmuştur. İlerleyen yıllarda analitik kimyadan, biyokimya (protein hidrolizi, sterilizasyon), patoloji (doku işleme, doku fiksasyonu) ve medikal tedavilere (diyatermi) kadar varan geniş bir alanda kullanılmıştır. Şaşırtıcı şekilde, mikrodalganın organik sentezlere uygulanması 1980'lerin ortalarını bulmuştur. Mikrodalga ile ısıtmanın organik kimyasal transformasyonları hızlandırmasında kullanımına ait ilk çalışma 1986 yılında yayınlanan R. Gedye, R. J. Giguere ve G. Mejetich'e aittir. O günlerde ilk denemeler, sıcaklık ya da basınç kontrolü olmaksızın, ev tipi mikrodalga fırınlarda kapalı teflon ya da cam kap içinde yapılmıştır. Zaman zaman kapalı kap ortamında kontrolsüz ısınan organik solvanlar yüzünden şiddetli patlamalar meydana gelmiştir. 1990'larda birçok araştırma grubu patlama tehlikesini ortadan kaldırmak için solvansız mikrodalga kimyası üzerinde durmaya başlamışlardır. Burada, reajanlar ya mikrodalga geçirgen bir madde (silika, alumina, kil) ya da kuvvetli absorblayıcı inorganik bir destek (grafit gibi) üzerine önceden adsorbe ettirilirler. Kuru ortamda gerçekleştirilen birçok reaksiyon literatürlere konu olurken, homojen olmayan ısıtma ve karıştırma, reaksiyon sıcaklığının tam olarak saptanamaması gibi teknik sorunlar ve bu sorunlardan dolayı gerçekleştirilemeyen ürün çoğaltma çözümsüz kalmıştır.

Alternatif olarak, mikrodalga destekli sentezler açık kapta standart organik solvanlar kullanılarak da gerçekleştirilir. Eğer solvanlar açık kapta atmosferik basınçta mikrodalga radyasyonu kullanılarak ısıtılırsa, reaksiyonun ulaşabileceği en yüksek sıcaklığı solvanın kaynama noktası belirler. Yüksek reaksiyon hızlarına ulaşmak için, açık kap mikrodalga sentezlerinde kaynama noktası yüksek ve mikrodalga enerjisini absorblayan solvanlar kullanılır. Ancak bu nitelikteki solvanların kullanımı, ürünün izolasyonu ve solvanın geri kazanımı konusunda sorun yaratmıştır. 1990'ların ortalarında Christopher R. Strauss'un modern

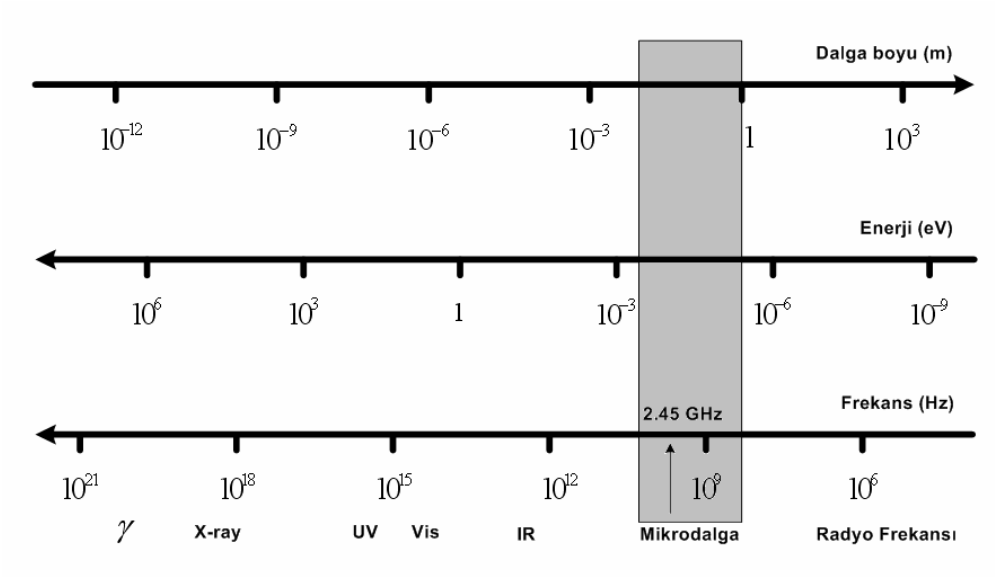
mikrodalga reaktörlerinde sıcaklık ve basıncın görüntülenmesini sağlayan tekniği ile, standart solvanlarla kapalı kap mikrodalga sentezi sorun olmaktan çıkmıştır. Kapalı kap teknolojisi ile mikrodalga kullanarak hızlı ısıtmanın kombinasyonu mikrodalga destekli organik sentezlerin gerçekleştirilmesinde, laboratuvarlarda sıklıkla tercih edilen bir yöntem olacaktır.

1980'lerin sonları ve 1990'ları da kapsayan zaman içerisinde bu teknolojinin yavaş yükselişinin nedeni, yöntemin kontrol edilebilirliği ve tekrarlanabilirliğindeki yetersizlik ve mikrodalganın dielektrik ısıtmasının temellerinin tam kavranamamış olmasındandı. Mikrodalga radyasyonuyla organik solvanların alev alabilme riski ve uygun sıcaklık ve basıncı kontrol etme olanağı veren ileri teknoloji mikrodalga reaktörlerinin olmaması temel kaygılardı. Ancak reaktörlerde yapılan yenilikler ile, zaman, sıcaklık ve basınç kontrol edilebiliyor, tekrarlanabilir sentez prosedürleri oturtulabiliyor ve ürün arttırma gerçekleştiriliyor. Mikrodalga enerjisi sadece reaksiyon süresini kısaltmakla kalmıyor, yan reaksiyonların azalmasına, ürün veriminin artmasına ve yüksek tekrarlanabilirliğe de imkan tanıyor. 2001'den bu yana, mikrodalga enerjisi destekli organik sentezler ile ilgili yayınlarda çarpıcı şekilde artış söz konusudur ve birkaç yıl içerisinde çoğu kimyacı bu teknolojiyi kullanıyor olacaktır.[79]

2.7.3 Mikrodalga Teorisi

2.7.3.1 Mikrodalga Radyasyonu

Mikrodalga radyasyonu 0,3-300 GHz frekans aralığındaki elektromanyetik radyasyondur ve bu da 1 cm ile 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 (Radio Detection and Ranging) 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 etkileşime girmemek için 2,45 GHz'lik bir frekansta çalışırlar ve bu da 12,25 cm'lik bir dalga boyuna karşılık gelir. Diğer frekanslarda da kullanılan mikrodalga ısıtma uygulamaları vardır, fakat bunlar sentetik kimyada kullanılan reaktörlerde olmamaktadır.[80] Gerçekten de 2,45 GHz'den farklı frekanslarda mikrodalga ısıtması ile gerçekleşen organik sentezlere ait yayın örnekleri çok nadirdir.[81]



Şekil 8: Elektromanyetik spektrum

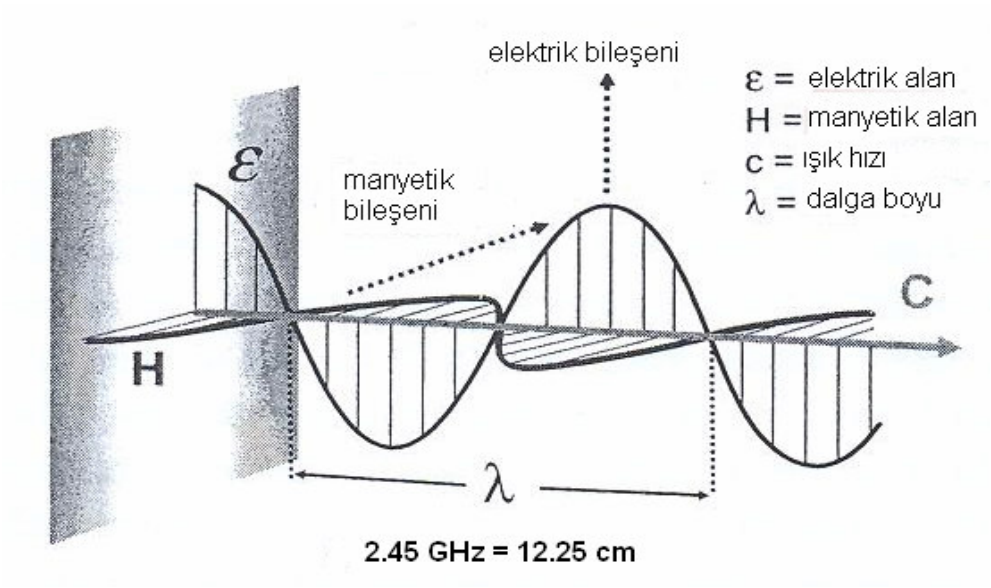
Tabloda sunulan veriler karşılaştırıldığında, 2,45 GHz (0,0016 eV)'deki mikrodalga fotonunun enerjisinin, moleküler bağları kırmak için çok düşük olduğu, bu nedenle mikrodalgaların, ultraviyole ve görünür radyasyonda olduğunun aksine, elektromanyetik enerjiyi doğrudan absorblayarak kimyasal reaksiyonları indükleyemeyecekleri açıktır.[79]

Tablo 5: Radyasyon tiplerinin ve bağ enerjilerinin karşılaştırılması [80]

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 Işık	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

2.7.3.2 Mikrodalganın Dielektrik Isıtması

Mikrodalga kimyası, “mikrodalga dielektrik ısıtma” etkileri kullanılarak, maddelerin etkin bir şekilde ısıtılmasına dayanır.[82] 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.[79]



Şekil 9: Mikrodalganın elektrik ve manyetik alan bileşenleri

Elektromanyetik alanın elektrik bileşeni, iki ana mekanizmayla ısınmaya neden olur: dipolar polarizasyon (kutuplaşma) ve iyonik iletim. Elektrik alan bileşeninin matriks ile etkileşimi, dipolar polarizasyon mekanizması olarak adlandırılır.[82] Mikrodalga ile ışınlandığında, ısı üretebilen bir madde dipol momente sahip olmalıdır. Mikrodalga frekanslarına maruz bırakıldığında, örneğe ait dipoller uygulanan elektrik alanda sıralanırlar. Uygulanan alan dalgalanma gösterdiğinde (salınım yaptığında), 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 ısının 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 ışıma) ya da çok hızlı sıralanıyorsa (düşük frekanslı ışıma) ısınma gerçekleşmez. 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. Isı, polar moleküller arasında oluşan sürtünme kuvveti tarafından üretilir. Gazlar mikrodalga ışıması 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.[79]

İkinci ana ısıtma mekanizması ise, iyonik iletim mekanizmasıdır.[82] 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 önemlidir. İletkenlik ilkesi, ısı üretme kapasitesi dikkate alındığında dipolar rotasyon mekanizmasından daha kuvvetli bir etkidir.[79]

Mikrodalga ısıtma sistemi dört temel bölüm ile yapılmaktadır, bunlar güç uygulayıcı, mikrodalgayı üreten vakum tüpleri –magnetron olarak adlandırılır-, hedef malzemenin ısıtılması için aplikatör (örneğin fırın), jenaratörden gelen mikrodalgaları aplikatöre ileten dalga rehberidir.[83] Mikrodalga enerjisi 2,45 GHz için yaklaşık %50'lik bir dönüşüm verimiyle elektrik enerjisinden elde edilir. Magnetron elektrik enerjisini mikrodalgaya dönüştürür.[84]

2.7.3.3 Maddelerin Dielektrik Özellikleri

Belirli bir materyalin (örneğin bir çözücü), mikrodalga ışıma şartları altındaki ısınma özelliği, o maddenin dielektrik özelliklerine bağlıdır. Belirli bir maddenin, elektromanyetik enerjiyi verilen frekans ve sıcaklıkta ısıya dönüştürme yeteneği, kayıp tanjant, tan δ tarafından belirlenir. Kayıp faktörü, tan $\delta = \varepsilon''/\varepsilon'$ oranı ile ifade edilir. ε'', dielektrik kaybıdır, elektromanyetik radyasyonun ısıya dönüşümündeki verimin göstergesidir. ε' ise dielektrik sabitidir, elektrik alandaki moleküllerin kutuplanabilirliğini tarif eder ve malzemenin mikrodalga enerjisinin içerisinden geçmesi esnasında alıkoyma yeteneğinin bir ölçüsüdür.[83,85] Yüksek tan δ'lı bir reaksiyon ortamı, etkili bir absorbsiyon ve sonuçta hızlı ısıtma için gereklidir. Su gibi yüksek dielektrik sabiti olan maddeler (25 ºC'deki ε'=80.4), yüksek tan δ değerine sahip olmayabilirler. Aslında, etanol daha düşük dielektrik sabitine sahip olmasına karşın (25 ºC'deki ε'=24.3), yüksek kayıp tanjant değerinden dolayı, mikrodalga alanda sudan daha hızlı ısınır (tan δ etanol= 0.941, tan δ su= 0.123). Belli bazı solvanlar için kayıp tanjant değerleri tablo 6'da özetlenmiştir. Genel olarak solvanlar yüksek (tan δ>0.5), orta (tan δ 0.1-0.5), düşük (tan δ<0.1) mikrodalga absorblayıcı olarak sınıflandırılabilirler. Sürekli dipol momenti olmayan karbon tetraklorür, benzen ve dioksan gibi diğer solvanlar, az ya da çok mikrodalga geçirgendir. Şu vurgulanmalıdır ki, düşük tan δ değeri, belirli bir solvanın mikrodalga ısıtmalı reaksiyonlarda kullanılmasına engel olmaz. Substratlardan veya reajan/katalizörlerden herhangi biri muhtemelen polar olacağından, reaksiyon ortamının toplam dielektrik özellikleri, birçok durumda mikrodalga ile etkili bir ısınmaya izin verecektir. Ayrıca, alkol veya iyonik sıvılar gibi polar katkılar, düşük absorbsiyon yapan reaksiyon karışımlarına, ortamın absorbans seviyesini yükseltmek için eklenebilir.[79]

Tablo 6: Çeşitli solvanların kayıp tanjant değerleri (2,45 GHz, 20 ºC)

Solvan	tan δ	solvan	tan δ
Dimetilsülfoksit	0.825	Su	0.123
Metanol	0.659	Asetonitril	0.062
2-Propanol	0.799	Kloroform	0.091
1-Bütanol	0.571	Etil asetat	0.059
Asetik asit	0.174	Aseton	0.054
Toluen	0.040	Hekzan	0.020
Etanol	0.941	N,N-Dimetilformamit	0.161
1-Metil-2-pirolidon	0.275	Formik Asit	0.722

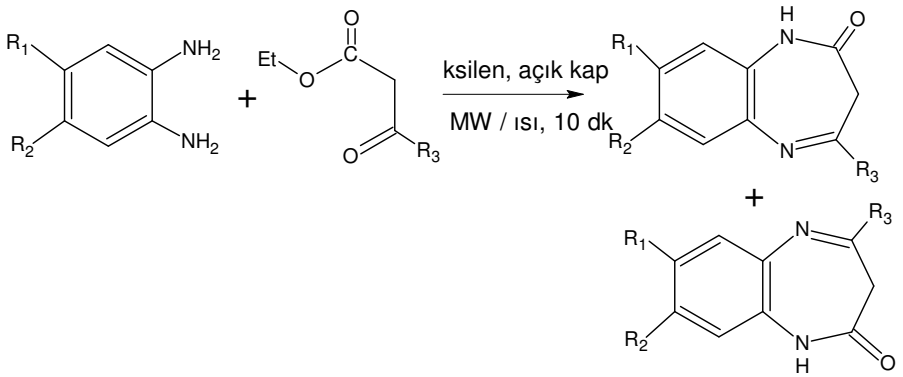
Mikrodalga ışımasının madde ile etkileşimi, üç farklı süreç ile karakterizedir; emilim, iletim ve yansıma. Polar organik solvanlar gibi yüksek dielektriği olan maddeler, mikrodalgaları güçlü absorbe ederler ve sonuç olarak ortam hızlı bir şekilde ısınır. Non-polar maddeler, mikrodalga enerjisi ile sadece küçük etkileşimler gösterirler ve bu nedenle reaktörlerin yapı malzemeleri olarak kullanılabilirler. Cam, plastik, kağıt, porselen gibi materyaller mikrodalga geçirgendir. Metaller ise mikrodalgayı yansıtırlar. 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.[79]

2.7.4 Mikrodalga Etkileri

Mikrodalga destekli kimya üzerine yapılan kapsamlı çalışmalar ve yayınlar mevcutken ve yüksek frekanslı elektromanyetik radyasyon ve mikrodalga-madde etkileşimlerinin temel prensipleri anlaşılmış olmasına rağmen mikrodalga enerjisinin kimyasal prosesleri nasıl geliştirdiği tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle birçok araştırma grubu tarafından mikrodalga etkileri diye anılan bir durumun varlığı düşünülmüştür.[86] Bu mikrodalga etkileri, aktivasyon enerjisinde düşüşe neden olan spesifik dalga-madde etkileşimlerinin ya da polar maddelerin mikrodalga alanda yönelme etkilerinden ötürü Arrhenius eşitliğinin preeksponansiyel faktörü A'daki artışın sonucu olabilir.[86] Diğer bir araştırma grubunun görüşü ise ısısal olmayan etkilerin varlığının olmadığı yönündedir ve tüm hız artışlarını mikrodalga ile sağlanan hızlı ısıtma ve yüksek sıcaklıklara ulaşma, mikroskobik ya da makroskobik sıcak noktaların oluşması ve reaksiyon karışımında tek bir bileşenin selektif olarak ısınması gibi nedenlere bağlanmaktadır.[79]

Mikrodalga sentezlerinin ilk kullanımlarından bu yana gözlenen bu hız artışları ve bazen de değişen ürün dağılımları mikrodalganın ısısal olmayan/ özel etkileri şeklinde değerlendirilmişti. Bu fikir klasik ısıtma yöntemleri ya da mikrodalga ısıtması kullanılarak yapılan bir reaksiyonda sıcaklık aynı iken sentez sonuçlarının farklı olması gibi gözlemler sonucunda ortaya atılmıştı. Bu duruma örnek teşkil eden bir tepkime Saufiauni ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmadır.[87] Bir seri 1,5-diazepin-2-on türevini, uygun o-arildiamin türevleri ve β-ketoesterler ile ksilen içinde reflaks sıcaklığında ev tipi mikrodalga fırın kullanarak açık kapta, 10 dakikada yüksek verimle sentezlemişlerdir. Deney klasik ısıtma yöntemleri kullanılarak tekrarlandığında aynı sıcaklığa erişilmesine rağmen reaksiyon yürümemiştir. Çalışmanın yayınında yazar, gözlenen ürün ve verimi açıklamak için özel etkilerin -ki mutlaka ısısal olması

gerekmez- gerekliliğini vurgulamıştır. Bu sonuçlar özel mikrodalga etkilerine kanıt olarak alınabilir. Ancak Gedye ve Wei adlı araştırmacılar ise aynı reaksiyonu klasik ısıtma yöntemleriyle ve mikrodalga enerjisiyle ısıttıklarında benzer ürün verimliliğini gözlemlemişlerdir.[81] Literatürler spesifik/ısısal olmayan mikrodalga etkilerinin var ya da yok olduğu konusunda çelişkili durumlara işaret eden örneklerle doludur. Bu nedenle mikrodalga, üzerinde kapsamlı çalışmaların yapılması gereken dikkate değer bir çalışma alanıdır.



MW : %80-98 (11 örnek)

Δ : %0 (11 örnek)

Mikrodalga destekli kimyasal reaksiyonlarda gözlenen hız artışları için mantıksal üç yaklaşım;[79,88]

- Termal etkiler (Kinetik)
- Spesifik mikrodalga etkileri
- Isısal olmayan (nontermal) mikrodalga etkileridir.

2.7.4.1 <u>Termal Etkiler (Kinetik)</u>

Günümüzde birçok bilim adamı, mikrodalga ile yapılan reaksiyonlarda gözlenen ani hız artışlarının nedenlerinin sadece termal/kinetik etkilere dayandığını düşünüyor. Orta derecede mikrodalga absorblayıcı bir solvan olan 1-metil-2-pirolidon (NMP K.N. 202-204 °C tan δ=0.275) mikrodalga ile hızla ısıtılabilir (mikrodalganın ani ısıtması). NMP magnetronun maksimum gücü ile 200 °C'ye 40 saniye içinde çıkabilir.[89]

Mikrodalga destekli organik sentezlerde son zamanlardaki bir yaklaşım, reaksiyonları kapalı kapta single mode denen ve tek bir sentezin gerçekleştirileceği şekilde dizayn edilmiş mikrodalga reaktörlerinde yüksek şiddette enerjiyle yürütmektir.[88] Bu kapalı kap koşullarında, düşük kaynama noktalı ve yüksek mikrodalga absorblayıcı polar solvanlar (örneğin metanol tanδ= 0.650) hızla kendi kaynama noktalarını da aşan sıcaklıklara (>100 °C) çıkabilirler. Çok yüksek kayıp tanjant değerine sahip iyonik solvanlar birkaç saniye içinde 200 °C'lik sıçramalar yapabilirler.

Arrheniuss eşitliğini ($k= A.e^{-Ea / RT}$) esas alan Mingos ve Baghurst adlı iki araştırmacı, 27 °C'de 68 günde %90 verimle yürüyen bir tepkimeyi 227 °C'de 1.61 saniyede aynı verimle gerçekleştirmişlerdir.[82] Mikrodalga kimyasında kısa sürede çok yüksek sıcaklıklara ulaşmak mümkün olduğu için, rapor edilen birçok hız artışının nedeni termal/ kinetik etkilere bağlanabilir. Herhangi bir spesifik ya da ısısal olmayan etkinin olmadığı durumda, reaksiyon mikrodalga veya klasik ısıtma yöntemi kullanılarak, açık kap, reflaks koşullarında yürütüldüğünde, aynı reaksiyon hızına ulaşılmıştır.[87] Termal etki için vurgulamak gerekirse, Arrhenius denklemindeki pre-eksponansiyonel faktörü (A) ve aktivasyon enerjisi (Ea) değişmezken, sadece sıcaklık değişmektedir.

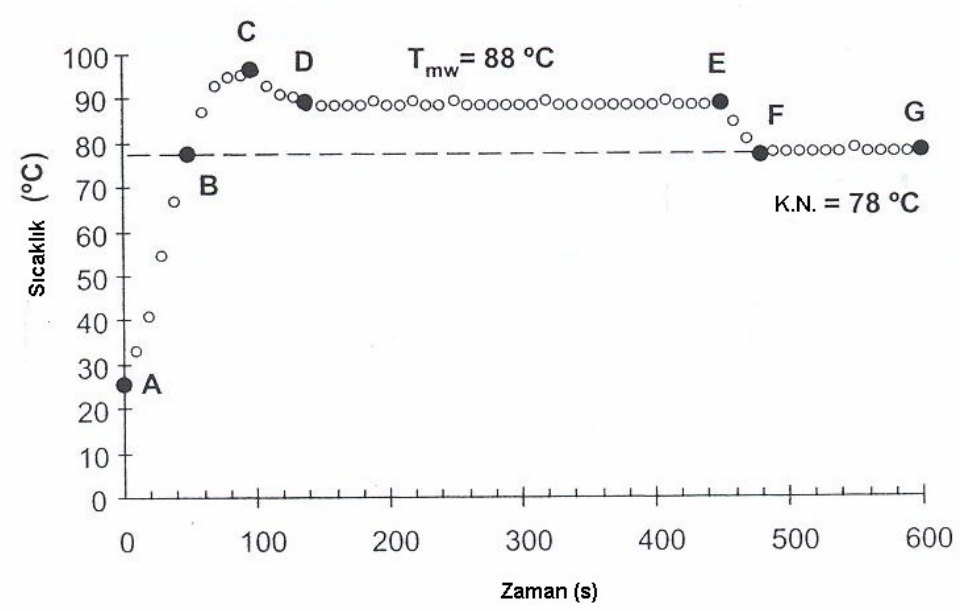
Tablo 7: Tipik 1. derece reaksiyon için sıcaklığın zamanla ilişkisi ($A= 4x10^{10}$ $mol^{-1}s^{-1}$, E_a= 100 kj mol^{-1}) [82]

Sıcaklık °C	Hız sabiti, k (s^{-1})	Zaman (%90 çevrilme)
27	$1,55 \times 10^{-7}$	68 gün
77	$4,76 \times 10^{-5}$	13,4 saat
127	$3,49 \times 10^{-3}$	11,4 dk
177	$9,86 \times 10^{-2}$	23,4 s
227	1,43	1,61 s

2.7.4.2 Özel (Spesifik) Mikrodalga Etkileri

Mikrodalganın termal/kinetik etkilerinden başka, dielektrik ısıtma mekanizmasının doğasından kaynaklanan etkiler de düşünülmelidir. Bu etkiler "özel mikrodalga etkileri" olarak anılmakta ve konvasiyonel ısıtma yöntemleriyle başarılamayan ya da tekrarlanamayan kimyasal transformasyonlardaki ivmelenme olarak tanımlanmaktadır. Mikrodalga ısıtması uygulanacak sıvının kaynama noktası, mikrodalga ile ısıtmada

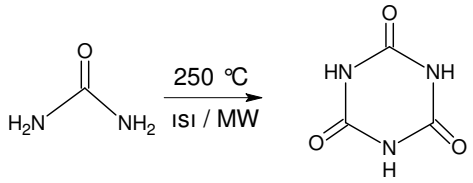
karşı karşıya kalınan temel sorunlardan birisidir. Mikrodalga ve klasik ısıtma koşullarında gaz fazına geçişin entalpisinin aynı olduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmalar ile ayrıca, ara yüzeyde sıvı ve buhar fazın sıcaklığının yanı sıra, buharlaşma oranının da şiddetli şekilde deney koşullarına bağlı olduğu gösterilmiştir. 1992 yılında Baghurst ve Mingos, mikrodalga ile ısıtılan sıvıların atmosferik basınçtaki denge kaynama noktalarından yüksekte kaynadığını göstermişlerdir.[90] Birçok solvan için, bu süper ısınma sıcaklıkları klasik kaynama noktalarını 40 °C'nin de üzerinde aşabilir.[91] Bu durum, mikrodalga enerjisinin solvanın tamamına yayılabilmesindendir. Termal enerjinin aşırısını kaybetmenin başlıca yolu kaynama iledir. Mikrodalga ısıtmalı sistemde bu sadece sıvı-gaz arayüzeyinde gözlenirken, klasik ısıtmada cam kabın yüzeyinde oyuk, çizik vb kısımlarda olur.[90] Mikrodalga uygulanmasıyla kaynayan solvanın sıcaklığı; solvanın fiziksel özellikleri, reaktör geometrisi, kütle akışı, ısı akışı, elektrik alan dağılımı gibi birçok faktöre bağlıdır. Ancak süper ısıtma kaynama taşı ya da karıştırma ile engellenebilir.[91] Şekil 10'da etanolün açık kap mikrodalga ısıtması grafiklendirilmiştir. Başlangıçta sıcaklık AB boyunca yükselir, etonolün kaynama noktasını (78 °C) aşar, C noktasına ulaştıktan sonra gaz/sıvı arayüzeyinde kaynamaya başlar. D noktasında bir platoya ulaşır ve bu sıcaklıkta (± 1 °C) saatlerce kalabilir. E noktasında reaksiyon kabına bir kaynama taşı ilavesiyle sıcaklık normal kaynama noktasına döner (FG). Önemli bir nokta da, süper ısınma sıcaklığı civarında, homojen organik reaksiyonların kinetiğinin Arrhenius davranışından pozitife saptığıdır.[91] Böylece, normalde sadece basınç altında mümkün olabilecek 10 – 100 kat hızlı reaksiyon hızlarına ulaşılabilir.



Şekil 10: Etanolün açık kap mikrodalga ısıtması [91]

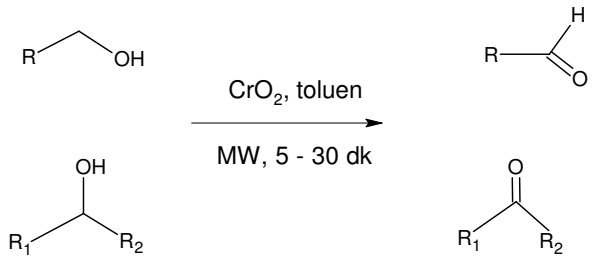
Atmosferik basınç altındaki süper ısıtma, duvar etkileri denilen bir konu ile yakından ilişkilidir. Mikrodalga ısıtmasında enerji sıvının içine yayıldığı için duvar yüzeyi genelde ısınmaz. Bu nedenle, reaktör duvarının iç yüzeyinin sıcaklığı, sıvının sıcaklığından düşüktür. Klasik bir yağ banyosu ısıtmasında sıcaklığa duyarlı reajanlar örneğin katalizörler sıcak reaktör yüzeyinden ötürü dekompoze olabilirler (Duvar etkisi). Bu etkinin ortadan kaldırılması katalizörün ömründe artışa ve dolayısıyla konvensiyonel ısıtmaya göre daha yüksek verime neden olur.

Mikrodalganın dielektrik ısıtmasının karakteristiklerinden birisi de kütlesel ısıtmadır, yani tüm reaksiyon karışımını hızlı ve ani ısıtmasıdır (volumetrik ısınma). Bu etkinin gösterildiği bir tepkime örneği, ürenin siyanurik asite dekompozisyonudur.[92] Siyanurik asit ürenin 250 °C civarına ısıtılması tepkimesiyle elde edilir. Klasik ısıtma koşullarında reaksiyon çok yavaş ve verim yan ürün çeşitliliğinden ötürü düşüktür. Bunun nedeni, siyanurik asitin ısındıkça reaktör duvarını kaplayan bir katıya dönüşmesi ve reaksiyon karışımının geri kalanına ısı transferini engelleyen yalıtkan bir kabuk oluşturmasıdır (Siyanurik asit 300 °C'de erimeksizin dekompoze olur). Yağ banyosu düzeneğinde duvar sıcaklığının artması kısmi dekompozisyon ile sonuçlanır ve siyanurik asit veriminde önemli bir gelişme olmaz. Buna karşılık volumetrik mikrodalga ısıtması ile, %83 gibi yüksek verimle iki dakikada üre ya da biüre yan ürünleri oluşmaksızın siyanurik asit elde edilir.



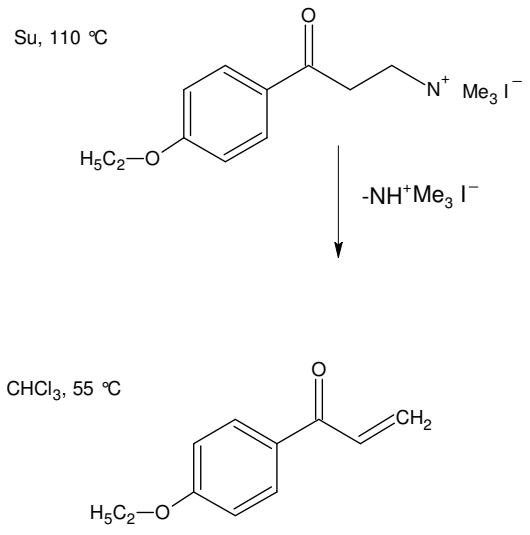
Spesifik mikrodalga etkilerinin muhtemel en önemli sonuçlarından birisi de zayıf polar reaksiyon ortamında güçlü mikrodalga absorblayıcı katalizör ya da reajanların selektif ısınmasıdır. Selektif ısınma, birden fazla bileşen içeren reaksiyon ortamında, bir reajanın mikrodalga enerjisi ile eşleşip seçimli olarak ısınmasıdır. Mikrodalgayı absorblamayan nonpolar maddeler doğrudan ısınmazlar, ısınan maddelerden ısı transferi ile ısınırlar. Mikrodalga geçirgen bir solvan içinde polar reajanlardan oluşan reaksiyon karışımı gibi sıvı-sıvı karışımlarından oluşan homojen sistemlerde geçerli olmak üzere, mikrodalga enerjisinin mikrodalga absorblayıcı solvan ya da reajanlar ile spesifik etkileşimleriyle "moleküler radyatörler" in oluştuğu (mikroskobik sıcak noktalar) bazı çalışmacıların kurguladığı bir teoridir. Bu moleküler radyatörlerin varlığını deneysel olarak ispatlamak zordur. Diğer yandan, büyük bir molekülün polar fonksiyonel gruplarını seçimli olarak aktive etmek mümkün değildir. Bu polar grupları içeren moleküllerin mikrodalga dielektrik ısıtması, reaksiyon hızında artışla sonuçlanabilir. Fakat dielektrik ısıtma prosesi, bu polar gruplardan komşu moleküllere hızla enerji transferini içerir ve enerjinin molekülün bir kısmında depolaması mümkün değildir.[79]

Katı-sıvı heterojen karışımların –örneğin Paladyum/ kömür (Pd/C) katalizörünü içeren organik solvan karışımı- mikrodalga destekli tranformasyonları organik ve medisinal kimyacıların sık çalıştıkları reaksiyon ortamlarından birisidir. Katalizör mikrodalgayı güçlü şekilde absorbe ettiği için, özellikle de düşük tan δ değerine sahip bir solvan seçildiyse, katalizör yüzeyininin sıcaklığı reaksiyon karışımının toplamda sıcaklığından önemli ölçüde yüksek olur. Katı-sıvı karışımlarda seçici ısıtma ile ilgili bir çalışma aşağıda görülmektedir. Primer ve sekonder alkoller krom dioksit (CrO_2) ile mikrodalga koşularında oksitlenmiştir. Yalnız CrO_2'in iki dk süre ile mikrodalga maruziyeti sonucunda yüzey sıcaklığı 360 °C'ye ulaşırken, zayıf mikrodalga absorblayıcı toluen içinde suspande edildiğinde reaksiyon sıcaklığı 140 °C'de kalmıştır. Dikkat çeken bir nokta da, katı maddenin sıcaklığının toluenin kaynama noktasını aşmasına rağmen, reaksiyon kabında kaynamanın gözlenmemesidir.[93]



Bu sonuçlar, heterojen sistemlerde mikrodalga destekli organik sentezlerde selektif ısıtma etkilerinin var olduğuna dair açık kanıtlardır. Ancak şu da vurgulanmalıdır ki, IR pirometresi ile kabın dış yüzeyinden, fiber-optik prop ile içerden sıcaklığın tespiti, sadece solvanın ortalama sıcaklığını verir; katı reajanın yüzeyindeki reaksiyon sıcaklığını doğru şekilde vermez.

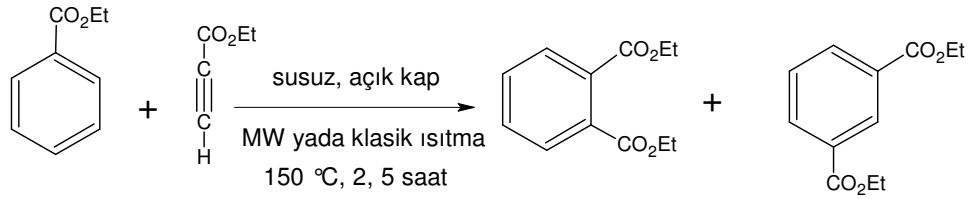
Sıvı-sıvı sistemlerdeki selektif ısıtma, Strauss ve arkadaşları tarafından iki faz su/kloroform sisteminde bir Hofmann eliminasyon tepkimesi üzerinde çalışılmıştır.[94] Aşağıda su/kloroform karışımının selektif dielektrik ısıtması gösterilmiştir. Solvanların farklı dielektrik özelliklerinden ötürü, sulu ve organik fazın sıcaklığı sırasıyla 110 °C ve 55°C ölçülmüştür. Bu sıcaklık farklılığı ürünün dekompozisyonunu engellemiştir.



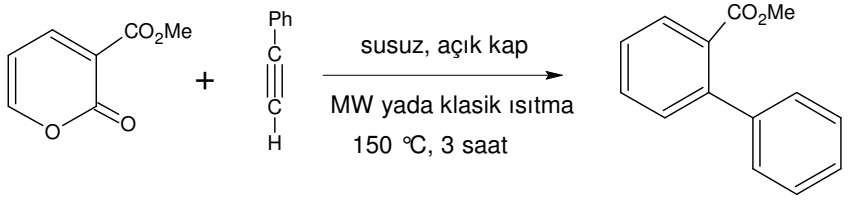
2.7.4.3 Mikrodalga Isısal olmayan (Nontermal) Etkileri

Isısal olmayan mikrodalga etkileri, mikrodalganın termal/kinetik ya da özel etkileri ile açıklanamayan, kimyasal transformasyonlardaki ivmelenmesi olarak tanımlanabilir. Özünde çoğu nontermal etki, reaksiyon ortamında elektrik alan ile özel bazı moleküllerin etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Dipolar moleküllerin yönelmesini etkileyen elektrik alanın varlığı ve bu nedenle Arrhenius eşitliğindeki preeksponansiyel faktörü A'nın ve aktivasyon enerjisinin değişimi gibi konuların üzerinde durulmuştur. Ayrıca benzer bir etki, polaritenin temel halden yüksek enerjili geçiş basamağına geçerken arttığı ve bunun sonucunda aktivasyon enerjisinin azalıp reaktivitenin arttığı polar reaksiyon mekanizmalarında da gözlenebilir. Birçok araştırmacı mikrodalga ile yürütülen reaksiyonların sonuçlarını açıklamak için bu ve benzeri görüşleri kullanmıştır.[86] Loupy ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada bu nokta üzerinde durulmuştur.[95] İki geri dönüşümsüz Diels-Alder siklokatım tepkimesi karşılaştırılmış ve birinci tepkimede klasik ve mikrodalga ısıtmalı şartlarda gerçekleştirildiğinde ürün ve selektivite açısından fark bulunmamıştır. Siklokatımın detaylı hesaplamaları ortaya konulduğunda tepkimenin eş zamanlı olduğu ve geçiş basamağına yükselirken yük artışının olmadığı bir mekanizma ile yürüdüğü saptanmıştır. Diğer yandan, ikinci tepkimede ürün veriminde önemli derecede farklılık gözlenmiştir. Bu tepkimenin geçiş basamağının geometrisi ve dipol momenti hesaplandığında, temel halden geçiş basamağına geçişte önemli ölçüde yük artışı olduğu görülmüştür. Çalışmacılar bu deneysel sonuçları, polar moleküller ile elektrik alanın etkileşimlerinden kaynaklanan ısısal olmayan mikrodalga etkileşimlerine delil niteliğinde görmüşler ve bu durumun geçiş basamağının stabilizasyonuna ve dolayısıyla aktivasyon enerjisinde azalmaya neden olduğu sonucuna varmışlardır.[95]

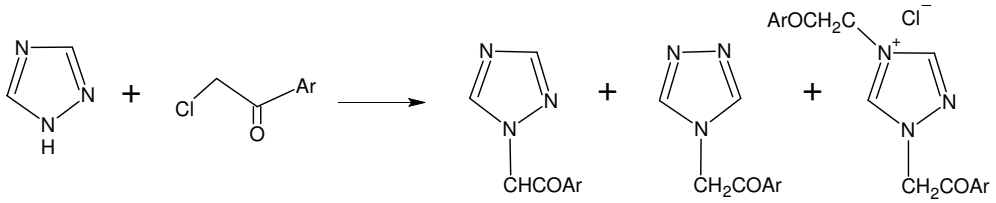
a)



b)



Mikrodalga ısıtmalı reaksiyon örneklerinin pek çoğunda, klasik ısıtma yöntemleri ile karşılaştırıldığında regioselektivite, kemoselektivite ve stereoselektivitede değişim görülmüştür. Loupy ve arkadaşları 2,2',4'-trikloroasetofenon ile 1,2,4-triazolün selektif alkilasyonunda solvanın etkisini araştırmışlardır (Tablo 8).[96]



Ar = 2',4'-Cl-C_6H_3 N_1 N_4 $N_{1,4}$

Tablo 8: Mikrodalga destekli sentezlerde solvan etkisi. Radyasyon koşulları 20 dk, 140 °C

Solvan	Isıtma	Çevrilme %	N_1 / N_4 / $N_{1,4}$ [a]
Pentanol	MW	90	95 / 5 / 0
	Δ	90	95 / 5 / 0
DMF	MW	90	95 / 5 / 0
	Δ	90	95 / 5 / 0
o-ksilen	MW	82	100 / 0 / 0
	Δ	95	32 / 28 / 40
Solvansız	MW	92	100 / 0 / 0
	Δ	100	32 / 27 / 27

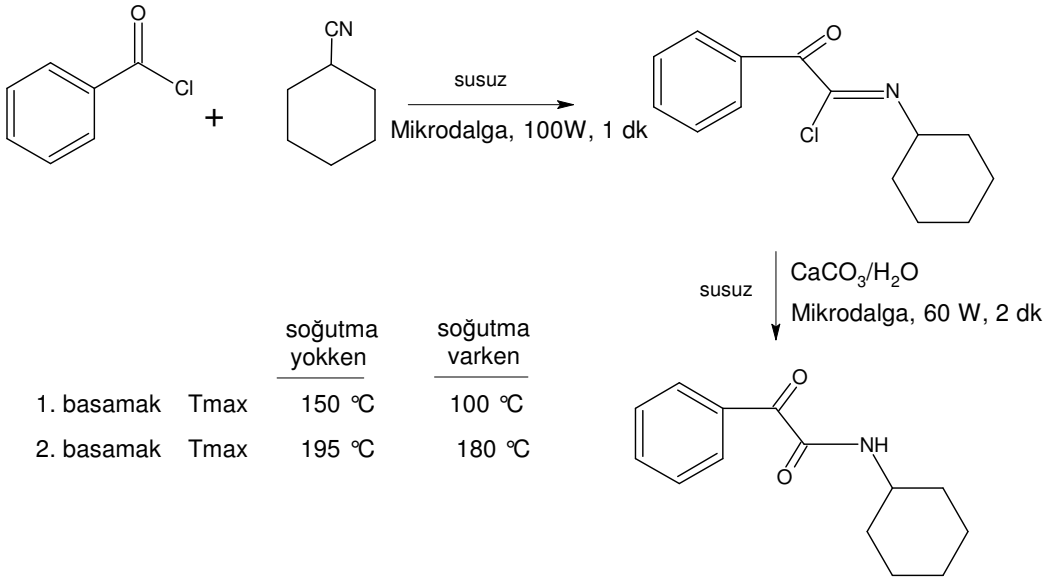
[a] GC ve ^{1}H-NMR ile belirlenmiştir

Polar solvanlar ile (DMF, pentanol) ısıtma yönteminin bir etkisi olmadığı gözlenirken, nonpolar olan ksilende regioselektivite önemli derecede etkilenmiştir. Reaksiyon mikrodalga ile ısıtıldığında hem ksilen ile hem de solvansız olduğu şartlarda regioselektif hale gelmiştir.[96]

Isısal olmayan ya da özel mikrodalga etkileri ile ilişkili son zamanlardaki bir yaklaşım da, reaksiyon karışımını mikrodalga ile ısıtırken eş zamanlı olarak dış yüzeyden soğutmadır. Bunu sağlamak için kabın dış yüzeyi basınçlı hava ile soğutulur. Bu sayede, reaksiyona yüksek seviyede mikrodalga radyasyonu doğrudan uygulanırken, devamlı olarak latent sıcaklığın uzaklaştırılması ile sıcaklığın aşılması engellenir. Araştırmacılar tarafından tartışılan bir konu da, mikrodalga enerjisinin numuneye transferinin, molekülün kinetik gevşemesinin (boşalımının) meydana gelişinden daha hızlı olması ve bu nedenle reaksiyonda denge koşullarının sağlanamamasıdır. Buna göre, ne kadar şiddetli mikrodalga uygulanırsa, o kadar yüksek ani sıcaklık elde edilecektir.[79]

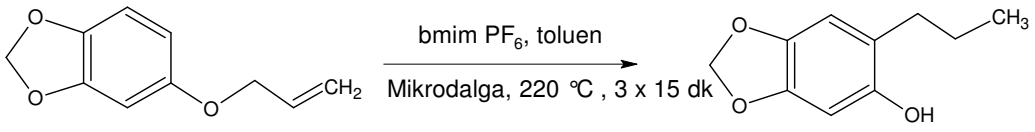
Eş zamanlı soğutmanın uygulanmasına dair yayımlanmış çalışmalar nadirdir. Aşağıda görülen örnekte, çalışmacılar dış soğutma varken ve yokken mikrodalga ısıtması ile yürütülen kondensasyon tepkimesinin sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Birinci basamakta dış soğutma yapılmaksızın sabit 100 Watt radyasyon uygulanmış (ölçülen

sıcaklık 150 ℃) ve ürün elde edilememiştir. İkinci basamakta ise mikrodalga ile eş zamanlı olarak dış soğutma yapılmış (ölçülen sıcaklık 100 ℃) ve ürün %69 verimle elde edilmiştir.[97]



		soğutma yokken	soğutma varken
1. basamak	Tmax	150 ℃	100 ℃
2. basamak	Tmax	195 ℃	180 ℃

Mikrodalga sentezlerinde ilginç diğer bir konu da Ley ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur. Birçok örnekle aynı süre kesintili olarak mikrodalga radasyonunun, devamlı uygulanan mikrodalgaya göre daha yüksek verim ile sonuçlandığını bulmuşlardır. Aşağıda görülen Claisen rearanjmanında 220 ℃'de 15'er dakikalık üç mikrodalga uygulaması (aralıklı soğutma ile), 45 dakikalık sürekli ısıtmaya göre daha iyi verimle yürümüştür (bmimPF6=1-bütil-3-metilimidazolium hekzaflorofosfat).[98]

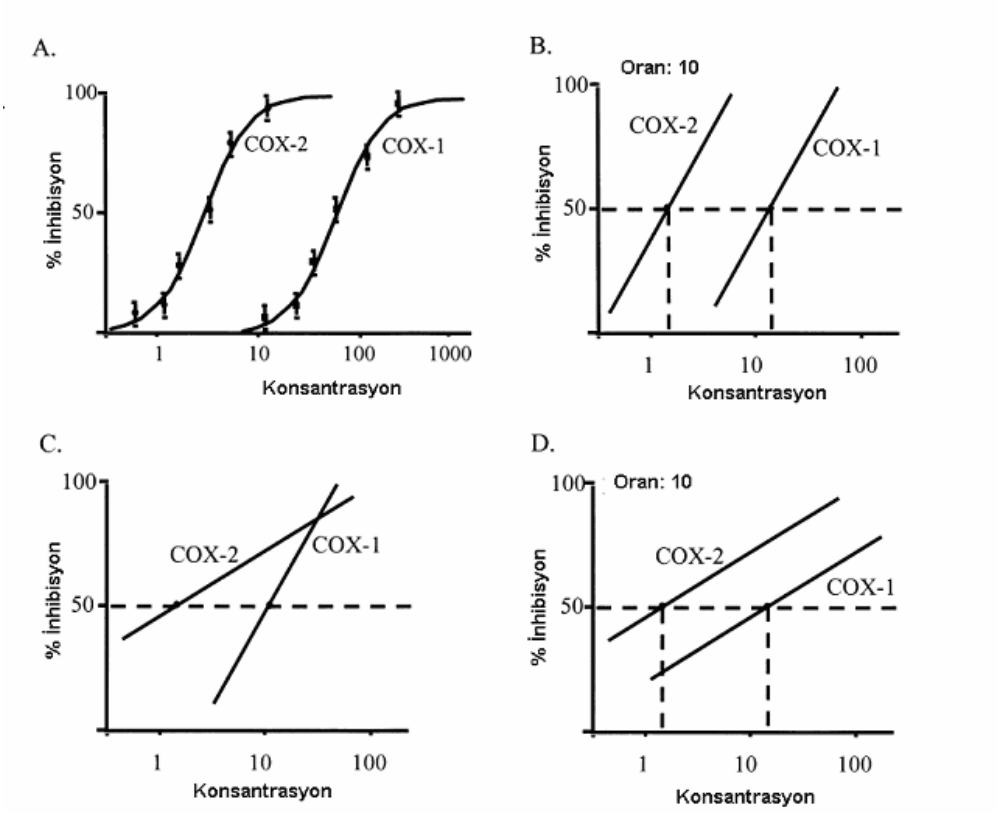


MW (220 °C)	Verim %
3 x 15 dk	97
30 dk devamlı	78
45 dk devamlı	86
2+2+2+1+1+15+15+15	85

Mikrodalga etkileri, halen açıklığa kavuşmamış ve çelişkili noktalarıyla dikkate değer bir tartışma konusudur. Bilim dünyası, mikrodalga etkilerinin reaksiyondaki rolüne dair ortak bir fikre varamamıştır.[79]

2.8 COX Enzimleri İnhibisyonunun *In Vitro* Analizi

Nonsteroidal antienflamatuvar ilaçların COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivitelerini tayin etmek için birçok *in vitro* analiz yöntemi geliştirilmiştir. İnhibitör aktiviteleri, IC_{50} değeri (aktiviteyi %50 oranında inhibe eden konsantrasyon) şeklinde; selektiviteleri ise COX-1 ve COX-2 için IC_{50} değerlerinin oranı şeklinde ifade edilir. IC_{50} COX-1/IC_{50} COX-2 oranı arttıkça selektivite COX-2 lehine artar, oran düştükçe ise COX-1 selektivitesi artar. Burada önemli olan, oranın ancak COX-1 ve COX-2 için doz-cevap eğrileri paralel iken hesaplanacağıdır. Ancak bu pratikte her zaman mümkün değildir.[99] Ayrıca, doz - cevap eğrisi paralel dahi olsa, eğrinin eğimine bağlı olarak, selektivite oranları aynıyken, farklı biyolojik değerlendirmelere sahip olabilir. Dik eğime sahip olanlar, yatay eğime sahip olanlara göre COX-1 ve COX-2 inhibisyonu arasında daha iyi ayırım sağlar (Şekil 11B, 11D). Bu nedenle, COX-2/COX-1 oranı sadece tahmini bir fikir vermesi açısından kullanılır ve *in vivo* analizler için COX-1 ve COX-2 inhibisyon seviyesini tahmin etmede yetersiz bir veridir. Şekil 11'de A COX-1 ve COX-2 inhibisyonu için doz–cevap eğrisidir. Eğrinin lineer kısmı IC_{50} değerlerini hesaplamak için kullanılır(B). Selektivite oranının hesaplanması için eğriler paralel olmalıdır (B ve C'yi karşılaştırınız). Selektivite oranları COX-1 IC_{50} değerinin COX-2 IC_{50} değerlerine bölümüyle elde edilir (B ya da D).[100]



Şekil 11: COX-1 ve COX-2 inhibisyonu için doz–cevap eğrisi

Tam hücrede insan rekombinant enzimi ya da insan tam kan deneyi kullanılarak elde edilen analiz sonuçlarına göre, NSAİ nonselektif, tercihen COX-2 inhibitör ya da COX-2 selektif inhibitör olarak sınıflandırılabilir.

2.8.1 COX İnhibitör Etki Tayini İçin *In vitro* Test Sistemleri

NSAİ'nin COX-2 selektivitelerini araştırmak üzere çeşitli *in vitro* analizler geliştirilmiştir. Kullanılan test sistemlerini çeşitlendiren deneysel koşullardaki farklılaşmadır (Tablo 9).[99] Kullanılan enzimin kaynağı (insan ya da hayvan), enzimin hazırlanma şekli (saflaştırılmış enzime karşı doğal, rekombinant enzime karşı tam hücre), araşidonik asitin kaynağı ve konsantasyonu (endojen ya da eksojen), kullanılan hücre çeşidi (intakt normal hücre, hücre hatları, transfekte hücreler), kullanılan COX-2 indükleyicisi ajan (lipopolisakkarit, interelökin-1, forbol miristat asetat ve başka sitokinler), analiz edilen maddenin COX-2 indükleyicisi ile

ve araşidonik asit ile inkübasyon süresi, ortamın protein konsantrasyonu gibi etmenlerdeki farklılıklar analiz türlerini çeşitlendirmektedir.[99]

Tablo 9: NSAİ'nin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivitelerini değerlendirmekte kullanılan *in vitro* analizler

COX-1	COX-2
Koç seminal kesesi	Koyun plasentası
Sığır aort endotel hücreleri	LPS ile uyarılmış fare makrofajları
İnsan yıkanmış plateletleri	IL-1 ile uyarılmış sıçan mesangiyal hücreleri
Uyarılmamış domuz makofajları	LPS ile uyarılmış fare makrofajları
Fare rekombinant enzimi	Fare rekombinant enzimi
İnsan hücre hatları(histiositik lemfoma hücreleri)	İnsan hücre hatları (osteokarsoma hücre hattı 143.98.2)
İnsan rekombinant enzimi: saflaştırılmış/mikrozomal/homojenize edilmiş/ tam hücre	İnsan rekombinant enzimi: saflaştırılmış/mikrozomal/homojeni ze edilmiş/ tam hücre
İnsan gastrik mukosa parçaları	LPS ile uyarılmış insan monositleri
İzole insan plateletleri	LPS ile uyarılmış insan monositleri
Pıhtılaşmış insan tam kanı	LPS ile uyarılmış insan tam kanı

Koç seminal kesesi / koyun plasentası:

Seminal kese, prostaglandin sentezinin gerçekleştiği yer olması yönüyle tarihsel öneme sahiptir. Bu modelin başlıca dezavantajı seçilen ortamın insan değil hayvan kaynaklı olması ve tam hücre yerine saflaştırılmış hücrelerin kullanılmasıdır. Analizin yapıldığı organlar NSAİ'nin antienflamatuvar etkileri ve yan etkileri için hedef organlar değildir. Ayrıca, COX-2'nin koyun plasentasında inhibisyonu, özellikle ilaçla inkübasyon süresi ve araşidonik asit konsantrasyonu gibi faktörler bakımından deneysel koşullara yüksek oranda bağlıdır. Bu deneysel farklılıklar IC_{50} değerlerinde ve selektivite oranlarında önemli ölçüde farklılıklara neden olabilir. Buna rağmen, bu test sistemi NS-398, meloksikam, nimesulid, flosulid gibi selektif ya da tercihli COX-2 inhibitörlerin analizinde başarılı sonuçlar vermiştir.[99]

Sığır aortik endotel hücreleri / LPS- uyarılmış fare makrofajları:

Bu modelin avantajı, ilaç ve araşidonik asit ile hem COX-1 hem de COX-2 için inkübasyon süresinin aynı olmasıdır. İnkübasyon sürelerinin eşitliği COX-2 inhibisyonu zamana bağımlı olduğu için özellikle önemlidir. Başlıca olumsuz yanı ise, insan hücreleri değil hayvan hücrelerinin kullanılmasıdır. Buna rağmen, bu modelden elde edilen değerler ile insan hücrelerinin kullanıldığı analizlerin değerleri karşılaştırıldığında birkaç farklı sonuç dışında paralel sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu modelde oksikamların COX-1 üzerine olan etkileri olduğundan fazla bulunmuştur.[99]

Mitchell ve arkadaşları gerçekleştirdikleri bir *in vitro* analiz ile sığır aortik endotel hücrelerinin baskın olarak COX-1, endotoksin ile uyarılmış fare makrofajlarının ise baskın olarak COX-2 içerdiğini göstermişler ve bu hücreleri üç farklı şekilde kullanarak NSAİ'nin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmayı intakt hücre, parçalanmış hücre ve saflaştırılmış enzim preparatları (koyun seminal kesesini COX-1 kaynağı olarak, koyun plasentasını COX-2 kaynağı olarak) kullanarak planlamışlardır. Bu üç farklı ortam arasında hem hayvanlar hem de insanlar için biyolojik aktivite ile en uyumlu olanın intakt hücrelerle mümkün olduğu ve saflaştırılmış enzimlerle çalışmanın antienflamatuvar aktivitenin değerlendirilmesinde sadece tarama çalışmalarında kullanılabilecek mantıklı bir başlangıç noktası olabileceği sonucuna varmışlardır.[101]

Yıkanmış insan plateletleri / IL-1 ile uyarılmış sıçan mesangiyal hücreleri:

İnsan plateletlerinin sadece COX-1 eksprese ettiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. COX-2 de böbreklerde makrofaj benzeri fonksiyonları olan mesangiyal hücrelerde IL-1β ile uyarılabilir. İnsan plateletleri ve IL-1 ile uyarılmış sıçan mesangiyal hücreleri flosulidin COX-2 selektivitesinin analizinde kullanılmıştır. Bu modelin başlıca sakıncası iki farklı türe ait hücrelerin kullanılmasıdır. Ayrıca bu test sistemi ile diklofenak için COX-2/COX-1 oranının 0,07 bulunması COX-2'ye, COX-1'e nazaran daha duyarlı olduğuna işarettir.[99]

Uyarılmamış / LPS ile uyarılmış domuz makrofajları:

Uyarılmamış domuz makrofajları COX-1 için, LPS ile uyarılmış domuz makrofajları ise COX-2 aktivitesi için kullanılmıştır. İki aktivite için de aynı kökenli intakt hücrelerin kullanılması ve eşit inkübasyon sürelerinin olması sonuçların güvenilirliği açısından olumlu bir özelliktir, ancak sonuç olarak hücreler insan değil hayvan hücresidir.[99]

Fare rekombinant enzimleri:

Bu modelde COX-1 ve COX-2 için aynı sentez ve salıverilme sistemleri ve eşit inkübasyon süreleri uygulanır. Transfekte hücrelerde COX-2 temel olarak eksprese edildiği için, bir indüksiyon fazına gerek yoktur. Bu yöntemdeki olumsuzluklar ise insan yerine fare rekombinant enzimlerinin kullanılması ve ilacın hücreye penetrasyonu ve dağılımının göz önüne alınamamasıdır. Ayrıca bu model farklı laboratuvarlarda uygulandığında, protein konsantrasyonunda geniş bir heterojenlik söz konusudur. Bu da NSAİ gibi plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanan moleküller için kritik bir durumdur.

Genel olarak ele alındığında, rekombinant fare enzimleri ile yapılan analiz sonuçları uyumlu gözükmektedir. Standart NSAİ COX-1 üzerinde daha aktiftir, nimesulid COX-2 üzeride biraz daha etkin bulunmuştur, NS-398 ve SC-58125 açıkça COX-2 selektiftir, tek şüpheye düşüren sonuç nabumetonun aktif metaboliti olan 6-metoksinaftilasetik asit (6-MNA) için bulunmuştur; COX-2 selektif etkili bulunan bu madde için aynı sonuç diğer analiz sistemleri ile doğrulanmamıştır.[99]

İnsan hücre hatları:

Histiositik lenfoma hücreleri U-937 ve megakaryositik hücre hattı DAMI COX-1 aktivitesi için, osteosarkoma hücre hattı 143.98.2 ve monositik hücre hattı Mono Mac 6 COX-2 aktivitesi için kullanılmıştır. Bu modelde insan tam hücreleri kullanılmaktadır. Fakat ölümsüzleştirilmiş hücrelerin kullanılması ilaç penetrasyonu ve dağılımı gibi birçok konuda normal hücrelere göre farklı sonuçlar doğurabilir. Bu test modeli COX-1'e kıyasla COX-2'ye daha duyarlıdır.[99]

İnsan rekombinant enzimleri:

İnsan rekombinant enzimleriyle yapılan analizlerde, insan enzimlerinin kullanılması ve COX-1 ve COX-2 için aynı sentez ve salıverilme sistemlerinin uygulanması yöntemin olumlu özelliğidir. Dezavantaj olarak söylenebilecek iki husus da, doğal enzimlerin değil rekombinant enzimlerin kullanılması ve COX-2'nin indüklenmemesi, yapısal olarak senezlenmesi ve salıverilmesidir. İlave olarak, gen sentezi ve salıverilmesiu için kullanılan hücrelerin NSAİ'nin antienflamatuvar advers etkilerini hedef alan hücreler olmaması, normal hücrelerden farklı niteliklere sahip hücre hatları olması da eklenebilir. Bunlara rağmen uygulanabilirliği yüksek bir analizdir ve bu analiz ile farklı laboratuvarlardan edinilen sonuçlar birbiriyle uyumludur.[100]

İnsan gastrik mukoza parçaları / LPS-uyarılmış insan monositleri:

İnsan gastrik mukoza parçaları ve LPS ile uyarılmış insan lökositleri sırasıyla COX-1 ve COX-2 aktiviteleri için kullanılmıştır. Bu modelde inkübasyon süreleri COX-1 (30 dk) ve COX-2 (24 saat) için farklıdır. Buna bağlı olarak, ön-ilaçların COX-2 inhibitör aktiviteleri, olduğundan daha yüksek çıkma eğilimindedir. Ek olarak, lökosit testlerinde protein olmadığı için, test bileşikleri olduğundan daha aktif COX-2 inhibitörü bulunur. Test bileşikleri mümkün olan en düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında dahi %70 COX-2 inhibitör aktivite bulunduğu için, sağlıklı bir COX-2 IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Bu model NSAİ'nin terapötik ve temel yan etkileri için hedef hücreler ile analizleri kombine ederek yeni *in vitro* modellerin gelişiminde farklı yönelimlere yol açmaktadır.[99]

İzole insan plateletleri / LPS-uyarılmış insan monositleri:

Bu analizde normal insan hücreleri kullanılır. Ancak ortamda bir protein olmadığı için ilaç-protein bağlanması ihmal edilmiş olur. COX-1 için plateletleri, COX-2 için LPS ile uyarılmış monositleri kullanan tam kan modeli ile izole hücreden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında tam kanın plazma içermesi gibi önemli bir üstünlüğüne bağlı olarak çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ortamda proteinin olmadığı izole hücrelerde çalışıldığında tüm NSAİ'nin COX-2 aktivitesi COX-1'e kıyasla daha yüksek çıkmıştır. İndometasin yüksek COX-2 selektif, diklofenak da standart selektif COX-2 inhibitörü olan flosulid ve NS-398'den daha selektif COX-2 inhibitör bulunmuştur.[99]

Laufer ve arkadaşları insan kanından izole edilmiş mononükleer hücreleri kullanarak çeşitli NSAİ'nin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivitelerini araştırmışlardır. Bu hücreler 18 saati aşan sürelerde LPS ile inkübe edilmiş ve COX-2 sentezi ve salıverilmesini göstermek için RT-PCR kullanarak (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) COX-2 mRNA oluşumuna bakmışlardır ve COX-2 proteininin varlığını görmek için de Western blot kullanmışlardır. COX-1 aktivitesi için ise izolasyon ve saflaştırma işlemlerinin ardından insan plateletleri kullanılmış ve COX-1 stimülasyonu için 10 µM kalsiyum iyonofor A23187 ilave edilmiş ve uygun bir immün analiz ile aktivite ölçülmüştür. Bu çalışmada hem COX-1 hem de COX-2 aktivitesine aynı kaynaklı hücrelerde bakılmış, bu sayede farklı türlerle çalışmanın getirdiği olumsuzluklardan kaçınılmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip ve *in vivo* biyolojik aktivite sonuçları ile de uyumludur.[102]

İnsan tam kan analizi:

Bu modelde pıhtılaşmış tam kan COX-1 aktivitesi ve LPS ile indüklenmiş tam kan COX-2 aktivitesi için kullanılır. Çalışmaya göre deneysel koşullar çeşitlilik gösterir. COX-1 için en önemli farklılıklar, tam kan ilaç ile inkübe edilebilir / edilmeyebilir ve pıhtılaşma kendiliğinden ya da bir uyaranla yapılabilir. COX-2 için, LPS'nin farklı konsantrasyonları kullanılır ve ilaç/LPS ile inkübasyon süresi 5-24 saat arasında çeşitlilik gösterir. Ayrıca, aspirinin geriye kalan COX-1 aktivitesini bloke etmek için eklendiği çalışmalar da mevcuttur.[1,99]

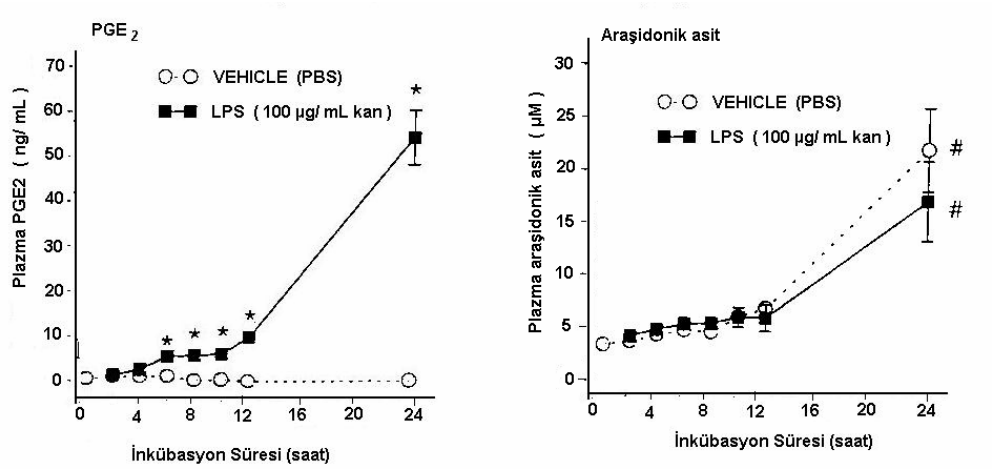
İnsan tam kan deneyinin birçok avantajı vardır; öncelikle tam kan NSAİ'nin antienflamatuvar etkileri için monositleri, yan etkileri için de plateletleri içerir. İkincisi, plazma proteinleri tam kanda mevcut olduğu için

NSAİ'nin *in vivo* etkileşimlerini incelemek için daha iyi bir temsili ortam sağlar. Üçüncüsü, her iki aktivite analizi için kullanılacak tam kan aynı gönüllüden/hastadan, aynı anda alınır. Bir diğeri de, analiz önceden NSAİ almış gönüllüden/hastadan alınan kanla yapıldığında (*ex vivo*), *in vivo* ve *in vitro* bulguların karşılaştırılmasına imkan verir.[9]

Dezavantaj olarak değerlendirilebilecek iki husus da, COX-2'nin indüklenmesi gerektiği için COX-1 ve COX-2'nin inkübasyon sürelerinin farklılaşması ve monosit ve plateletlere göre NSAİ'nin yararlı ve zararlı etkilerini tespit etmede daha iyi bir temsili ortamı sağlayacak gastrik mukoza hücreleri ve sinoviyositlerin kullanılmamasıdır.

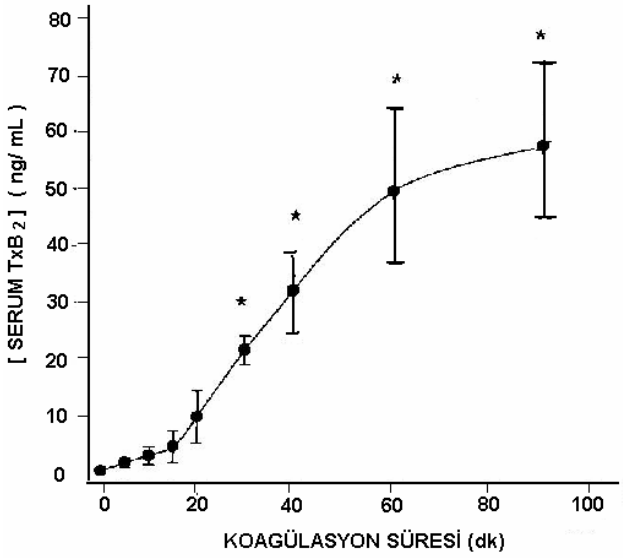
Brideau ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada, LPS ile stimüle edilmiş tam kandan PGE_2, kendi haline pıhtılaşmaya bırakılmış tam kandan da TxB_2 seviyesi sırasıyla COX-2 ve COX-1 aktivitesini değerlendirmek üzere ölçülmüştür.[103] Deneyin yapılışında COX-1 için tam kan antikoagülan içermeyen tüplere alınır ve pıhtılaşmaya terk edildiği zaman oluşan pıhtı yumağından sarı renkli sıvı ayrılır. Buna göre COX-1 aktivitesi için serumla çalışılmış olur. COX-2 aktivitesi araştırılırken ise plazma ile çalışılır; tam kan heparinize tüplere alınır, böylece pıhtılaşması engellenmiş kandan santifüjle ayrılan sıvı plazmadır ve başta fibrinojen olmak üzere pıhtılaşmada etkin proteinleri içerir.

Yapılan analizde COX-2 bazal koşullar altında tam kanda tespit edilememiştir ve bu nedenle aktivite çalışmasının yapılabilmesi için indüklenmelidir. Hazırlık niteliğindeki ön çalışmalarda en uygun LPS konsantrasyonu 100 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Daha düşük konsantrasyonlardaki LPS daha az miktarda PGE_2'yi indüklemiş ve bu durumda da COX inhibitörlerinin etkilerini çalışmak için uygun konsantrasyon sağlanmamıştır (Şekil 12). Şekilde aynı zamanda LPS'nin zamana bağlı cevabı da görülmektedir. İlginç şekilde LPS (100 µg/mL) ya da PBS (phosphate buffered saline) ile inkübe edilen plazmadaki serbest araşidonik asit miktarı 2-12 saat sonrasında ılımlı bir artış göstermiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda serbest araşidonik asitteki artış on katı bulmuştur. LPS'ye cevap olarak üretilen PGE_2'nin zamanla değişimi araşidonik asit ile benzerdir. PBS hiçbir zaman PGE_2 üretiminde artış meydana getirmemiştir. Bu durumda örnekler içindeki serbest araşidonik asitin PGE_2'ye çevrildiği düşünülmüştür. Karşılaştırmak açısından, PBS ile muamele görmüş tam kanda yüksek miktarlarda serbest araşidonik asit mevcutken, PGE_2 seviyesinde hiçbir şekilde artış olmamıştır. LPS ile inkübasyon COX-1'de de artışa neden olmamaktadır. Bu durumda PGE_2 üretimi baskın olarak COX-2 izoformuna bağlanabilir. Bu da neden COX-2 aktivitesi için tam kanda PGE_2'nin ölçüldüğünü açıklar.[103]



Şekil 12: İnsan tam kanında LPS (100 µg/mL) inkübasyonunu takiben PGE_2 ve serbert araşidonat salımının zamanla değişimi.

COX-1 aktivitesinin incelendiği tam kan ile test bileşiklerinin inkübasyon süresi için 1 saat uygun bulunmuştur. Çünkü TxB_2 seviyesi koagülasyonun birinci saatinde platoya ulaşmaktadır, bu da test bileşiklerinin platelet COX-1'i ile etkileşmesi için yeterli bir süredir (Şekil 13).[103]



Şekil 13: Koagülasyonu takiben insan tam kanında TxB_2 üretimi.

Aynı çalışmada *ex vivo* tam kan deneyi ile 25 mg'lık indometasin dozunun sağlıklı gönüllülerdeki *in vitro* COX-2 etkinliği izlenmiş ve bu sonuçlar *in vivo* COX-2 aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. İlacın verilişinden 1,5 saat sonra plazmada indometasin dozu 3,3 µM olarak tespit edilmiştir ve bu dozla *ex vivo* analiz ile %87 PGE_2 inhibisyonu ölçülürken, aynı doz ile *in vitro* COX-2 inhibisyonu %90 bulunmuştur. Bu çalışma için bu sonuçlar, *in vitro* ve *ex vivo* sonuçların birbiriyle uyumlu ve paralel olduğu şeklinde yorumlanabilir.

2.8.1.1 <u>İdeal Bir *In vitro* Analizin Taşıması Gereken Nitelikler</u>

- ✓ Analiz tam hücrelerde bulunan doğal enzimler ile yapılmalıdır.
- ✓ NSAİ'nin antienflamatuvar etki ve yan etkilerinin hedeflediği hücreler kullanılmalıdır.
- ✓ COX-2 enzimi kendiliğinden salınmamalı, bunun yerine indüklenerek oluşturulmalıdır. Bu şekilde enflamasyon süreci taklit edilmiş olur.
- ✓ Prostaglandin sentezi eksojen olarak eklenen araşidonik asit yerine, endojen depolardan salınan araşidonik asitin çevrilmesinden ölçülmelidir.
- ✓ Ortamın protein konsantrasyonu ilaç–protein etkileşimlerini göz ardı etmemek için plazma protein konsantrasyonunu taklit edecek düzeyde olmalıdır.[9,100]

2.8.1.2 <u>Uygun Analizin Seçimi</u>

Kullanılacak test sistemini seçerken, yalnızca ideal bir analizin taşıması gereken nitelikleri düşünmek yeterli değildir; analiz uygulanabilirlik, tekrarlanabilirlik gibi pratik yönlerden de düşünülmelidir. Bu durum neden COX-1 için insan gastrik mukoza dokusu, COX-2 için de IL-1 ile stimüle edilmiş insan sinoviyal dokusu gibi ideal test sistemlerinin rutin kullanımlar için valide edilemediğini açıklamaktadır.

Analiz seçiminde, çalışmanın amacının saptanması da önemlidir. Eğer amaç, ilaç ve enzim aktif sahası arasındaki ilişkiyi moleküler düzeyde incelemekse, saflaştırılmış enzimlerin kullanıldığı bir yöntem tercih edilmelidir. Tarama ya da yapı-aktivite ilişkileri çalışmaları için, insan hücre hatları (COX-1 ya da COX-2'yi yapısal olarak eksprese eden) ya da insan rekombinant enzimleri uygundur. Eğer amaç, selektif COX-2 inhibisyonunun klinik uygunluğunu belirlemekse, tam hücrelerde insan rekombinant enzimleri ve insan tam kan modelleri kullanılır.[9,100]

2.8.2 COX Enziminin İnhibisyonunun Tayininde Kullanılan İmmünolojik Teknikler

İmmünolojik teknikler, antijen-antikor etkileşmesine dayanan analiz yöntemleridir. Bu yöntemlerde bilinen bir antijen olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antikor veya bilinen bir antikor olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antijen saptanabilir. Ayrıca örnek materyal içerisindeki özgül antijen veya antikor miktarları niceliksel testlerle hesaplanabilir.

2.8.2.1 İmmün Analizlere Giriş

İmmün analiz, ölçülebilir bir sonuç oluşturmak yoluyla antikor ya da antijen komplekslerini kullanan bir testtir. Antijen ve antikor buluşunca meydana gelen antikor:antijen kompleksi, "immun-kompleks" olarak da bilinir.[104]

2.8.2.1.1 Antikor- Antijen Kavramları

Organizmaya girdiğinde, kendisine karşı bir bağışık yanıt oluşmasına yol açan ve bu cevap sonucunda oluşan ürün ile özgül olarak birleşebilen maddelere antijen denir. Antijenler "Ag" şeklinde gösterilirler. İmmünojen sözcüğü de antijen ile eş anlamlı olarak kullanılır. Antijen molekülü yüzeyinde bulunan ve özgül antikoru ile birleşmeyi sağlayan kimyasal uçlara epitop denir.[105]

İmmünglobulinler (antikorlar), oluşmalarına neden olan antijenlerle özgül olarak birleşebilme, reaksiyonlara yol açabilme özelliğinde olan glikoprotein yapısında moleküllerdir. İmmünglobulinler total plazma proteinlerinin % 20'sini oluştururlar.[106]

Bir Ig molekülü elektron mikroskobunda incelendiğinde Y harfi şeklinde görülür. Y'nin her iki kısa kolunun ucunda olmak üzere birbirinin aynı iki antijen bağlama bölgesi (ABB) bulunur (Şekil 14).

Şekil 14: Antikor yapısı ve fonksiyonel kısımları [104]

2.8.2.1.2 Antikor- Antijen Birleşmesinin Özellikleri

- Antijen - antikor birleşmesi özgüldür. Bir antijen, sadece oluşumuna neden olduğu antikor ile birleşebilir. Özgüllük nedeniyle antijen veya antikordan biri mevcutken, diğerini araştırmak, tanımak ve saptamak mümkün olabilir.

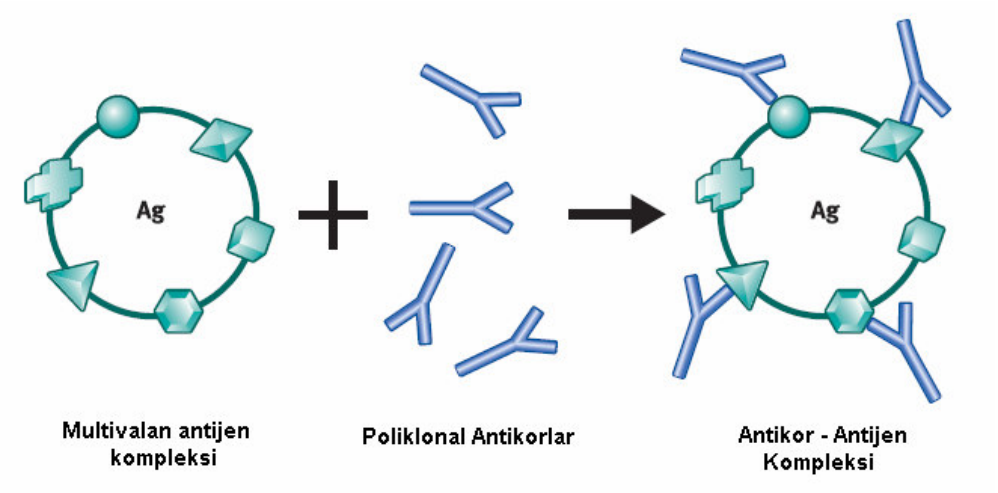
- Antijen - antikor birleşmesi, antijen yüzeyindeki epitop ile antikorun Fab kısmındaki değişken bölge (V bölgesi) arasında olur.

- Ag - Ab birleşmesi kimyasal bir olaydır. Ancak bu birleşmede çok kuvvetli olmayan, düşük enerjili bağlar rol oynar ve olay geri dönebilir özelliktedir.

- Bir antijende çok sayıda epitop bulunduğu için bu epitoplar, başka antijenlerin epitoplarıyla benzeşebilir ve bu durumda bir antijen için oluşmuş antikorlar başka antijenin epitoplarıyla da bağlanabilir (Çapraz Reaksiyon). Ancak, bu bağlanma özgül antijen ile olduğu kadar kuvvetli bir bağlanma değildir.[106]

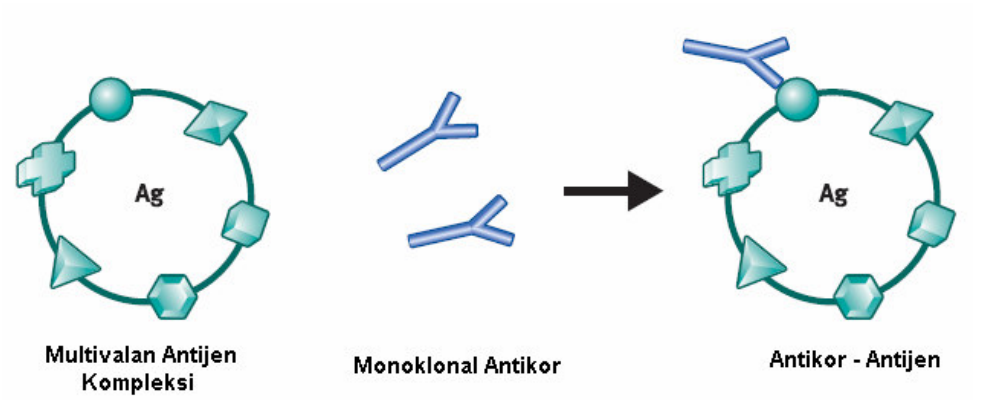
2.8.2.1.3 Poliklonal ve Monoklonal Antikorlar

Ticari olarak bulunan enzim setlerinde mevcut olan antikor reajanları, poliklonal ya da monoklonal antikorlardan hazırlanır. Poliklonal antiserum (istenen antikorları içeren kandan ayrılan) özellikle koyun, keçi ve fare gibi hayvanlardan üretilir. Hayvanlar bu antiserumu, anijene maruz bırakıldıklarında bir savunma mekanizması olarak üretirler. Antiserum, farklı ABB'lerini tanıyan antikorlar karışımıdır.[104]



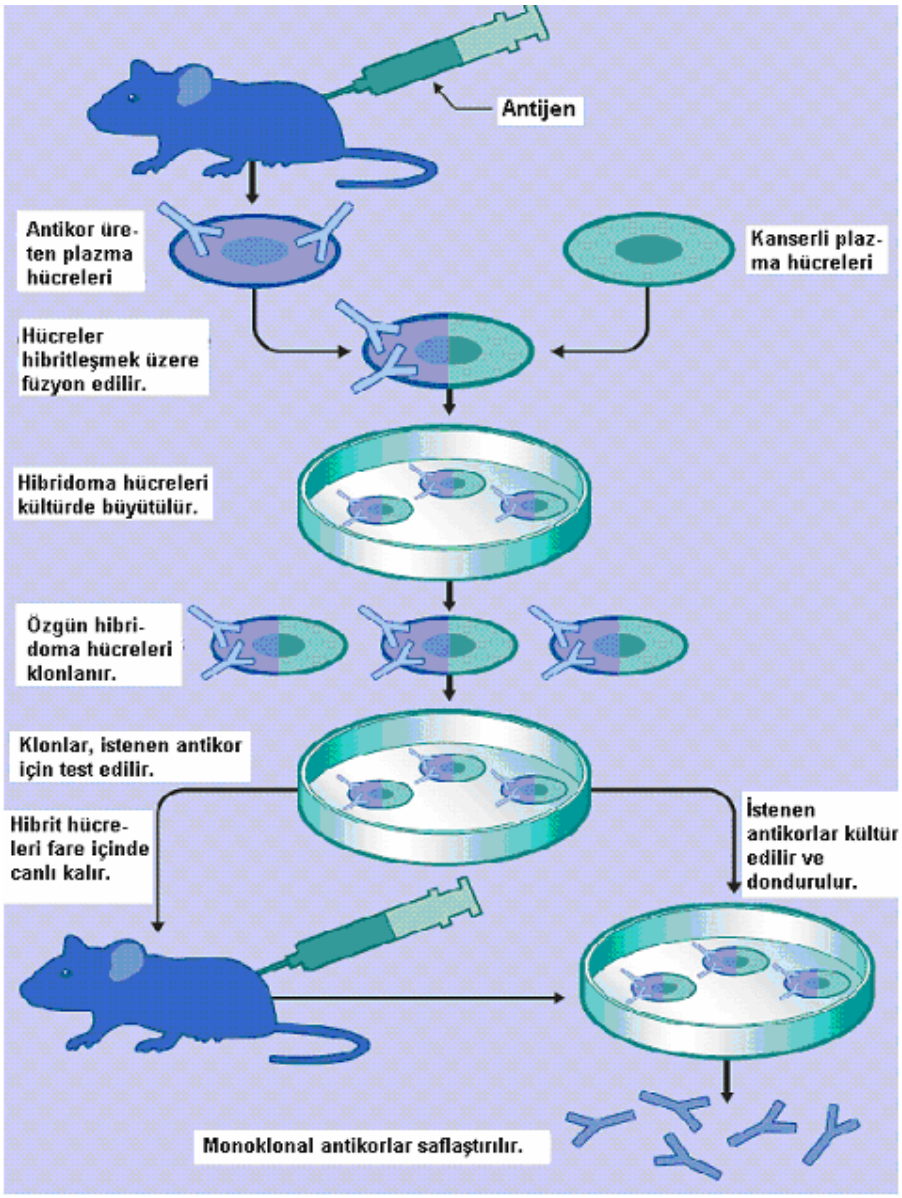
Şekil 15: Poliklonal antikorların çoklu antijen spesifiteleri

Monoklonal antikorlar, multivalan bir antijen üzerindeki tek bir epitopa yüksek selektivite göstermeleriyle poliklonal antikorlardan farklılaşırlar. Tek tip bir hücre hattından, hibridoma teknolojisini ve fare miyeloma hücre hatlarını kullanarak üretilirler.[104]



Şekil 16: Monoklonal antikorların tek tip spesifiteleri

Fare istenen antijen ile immünize edildikten sonra antikor üreten B hücreleri dalağından izole edilir ve B hücreler bir miyeloma hücre hattıyla füzyona sokulur. İki hücrenin füzyonu sonucunda ölümsüz, sürekli çoğalma yeteneğinde olan hibrit hücreler oluşur. Bu şekilde tek bir antijen epitopunu tanıyan çok sayıda antikor elde edilmiş olur.[107]



Şekil 17: Monoklonal antikorların eldesi

2.8.2.2 <u>İmmün Analizlerin Çeşitleri</u>

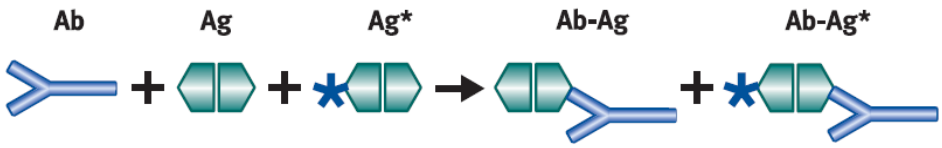
İmmün analizler, dört kategoride incelenebilir; kompetitif, nonkompetitif, homojen ve heterojen immün analizler.[104]

Tüm immün analizlerde, antikor ya da antijen oluşum miktarını ölçebilmek için işaretli materyal kullanımı gerekir. İşaretli reajan, analizin bir aşamasında kullanılan ve kan:reajan solusyonunda ölçülebilir bir sinyal oluşturan moleküldür. Bu işaretli molekül radyoaktif bir madde (RIA: Radio Immun Assay), floresan bir madde (FPIA:Fluorescence Polarization Immun Assay), kemiluminesan bir madde (CLIA: ChemiLuminescent Immun Assay), substratının ilavesiyle renk değişimi, ışık emisyonu gibi sinyaller verecek bir enzim (EIA: Enzyme Immun Assay) olabilir. İşaret antikor ya da antijen üzerine konabilir. İmmün analiz teknolojisinde bağlı antijen-antikor kompleksini işaretli serbest reajandan ayırmak için farklı yöntemler kullanılır.[108]

2.8.2.2.1 <u>Kompetitif Immün Analizler</u>

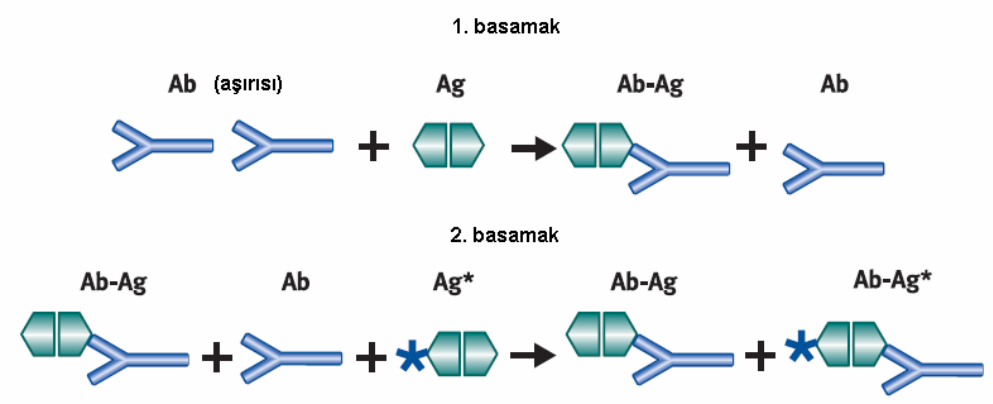
Kompetitif uygulamada, test edilen numune içindeki işaretlenmemiş analitin (çoğunlukla antijen), işaretli antijen ile yarışma yeteneği ölçülür. İşaretlenmemiş antijen, antikorların ABB'lerini işgal ederek işaretli antijenin bağlanma yeteneğini bloke eder. Kompetitif immün analizlerde ölçülen işaretli antijen miktarının az olması test örneğinde işaretlenmemiş antijenin daha çok olduğu anlamına gelir, yani bu basamakta oluşan ürünün miktarı, test örneğindeki antijenin konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Tek basamakta uygulanan kompetitif analizde, hem işaretli antijen (Ag*) hem de numune içindeki analit sınırlı antikor için yarışır.



Şekil 18: Tek basamaklı kompetitif immün analiz

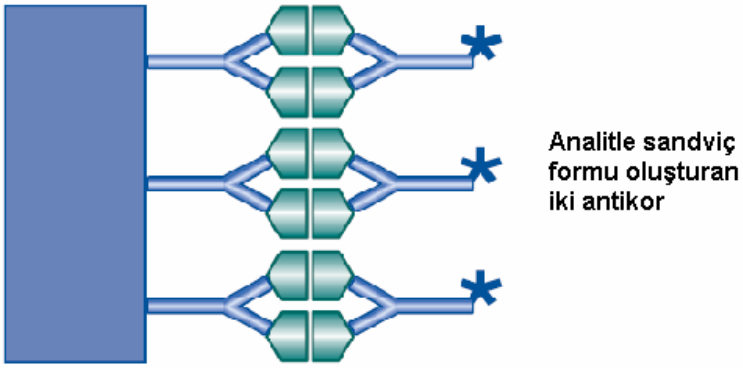
İki basamakta uygulanan kompetitif analizde, antijen konsantrasyonuna kıyasla reaksiyon solusyonunda antikor konsantrasyonunun aşırısı vardır. Antikor reajanı, ilk aşamada ilgilenilen antijeni içeren numune ile inkübe edilir, ardından ikinci basamakta işaretli antijen eklenir. Bu şekilde iki basamaklı uygulama, analizin hassasiyetini katlarca kez artırır.[104]



Şekil 19: İki basamaklı kompetitif immün analiz

2.8.2.2.2 Non-Kompetitif Immün Analizler (Sandviç yöntemi)

Nonkompetitif analiz en yüksek düzeyde hassasiyet ve özgüllük sağlayan yöntemdir. Sandviç yöntemi olarak da anılır, çünkü analit iki antikor reajanı arasında bağlıdır.



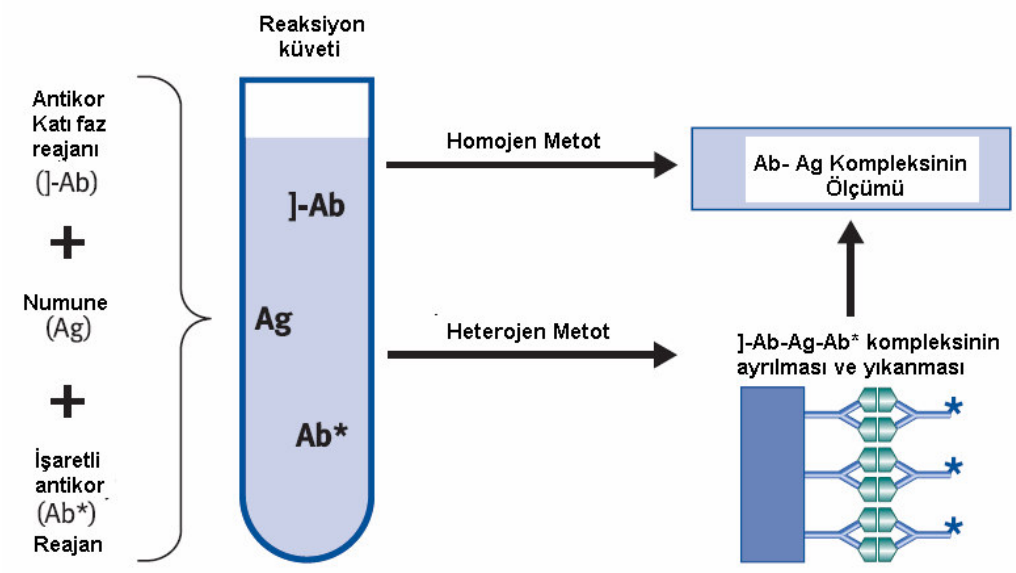
Şekil 20: Nonkompetitif (sandviç) analiz

Bu yöntem de, kompetitif analizde olduğu gibi tek ya da iki basamakta uygulanabilir. İki basamaklı uygulamada sandviç formunu ayıracak ve kalan bağlanmamış işaretsiz reajanları ve diğer maddeleri uzaklaştırmayı sağlayacak bir yıkama basamağı vardır.

Nonkompetitif analizde, kompetitif immün analizin tersine işaretli analitin miktarı (genellikle antikor), örnek içindeki antijen miktarı ile doğru orantılıdır. Çünkü bilinmeyen örnek içerisinde antijen yok ise, işaretli antikor antijene bağlanamayacaktır.[104]

2.8.2.2.3 Homojen ve Heterojen İmmün Analizler

Bağlı Ab–Ag* kompleksini ayırmak için fazladan bir basamağa ihtiyaç duyan yöntem heterojen immün analiz olarak bilinir. Homojen immün analizde Ab–Ag* kompleksini serbest Ag*'den ayırmak gerekmediği için uygulaması daha kolay ve hızlıdır.



Şekil 21: Homojen ve heterojen immün analizler

Antijen-antikor kompleksini kantitatif olarak ölçmenin çok çeşitli yolları vardır;[109]

1- Radyo İmmünanaliz

2- Enzim İmmünanaliz

3- Fluoresans İmmünanaliz

4- Kemilüminesans İmmünanaliz

5- Biyolüminesans İmmünanaliz

6- Nefelometrik ve Türbidimetrik İmmünanaliz

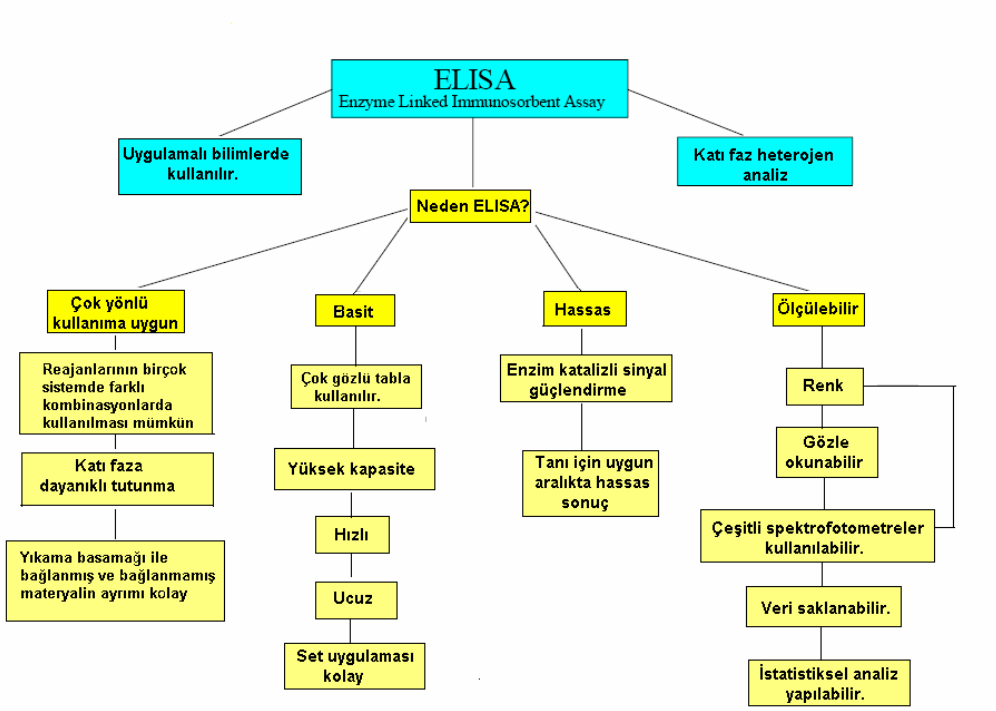
7- Aglutinasyon

8- Türbidimetri ve Nefelometri

9-Western Blotting

Bu yöntemler arasında en yaygın kullanılanlarından biri enzim immün analizin (EIA) bir çeşidi olan ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)'dır.[110]

ELISA'nın başlıca dört avantajı Şekil 22 üzerinde gösterilmiştir.[111]



Şekil 22: ELISA'nın avantajları

2.8.2.3 İmmün Analizler Arasından: ELISA

ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanmasının antikorlara alkalen fosfataz veya yabanturpu peroksidazı gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir.

ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarı, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorun miktarı ölçülebilir.

ELISA; peptit, protein, antikor ve hormonların kalitatif ve kantitatif tayini için geliştirilmiştir.

ELISA uygulaması 96 kuyucuklu polistiren plastik tablalarda yapılır. Antijen/antikor bu tabakaya immobilize edilmiştir. Bu, analizde bağlanmış materyal ile bağlanmamışları birbirinden ayırmayı sağlayan ve analizi kolaylaştıran başlıca faktördür. Ardından işaretleme hangi enzim ile yapılmışsa onun substratı olan bir maddenin ilavesi ile saptanabilir bir ürün meydana getirilir. Tespitin güvenilirliğini sağlayan en önemli etken de, yüksek özgüllüğe sahip antijen-antikor etkileşimidir.[112]

Ölçülebilir bir ürün yaratacak enzim primer antikora doğrudan bağlı olabilir ya da primer antikoru tanıyacak sekonder antikoru tanıyabilir. Ayrıca enzim, primer antikor biotin ile işaretliyse streptavidin gibi bir proteine de bağlanabilir. Bu analiz için en çok kullanılan enzimler yabanturpu peroksidazı ve alkalin fosfatazdır. ß- galaktozidaz, asetil kolinesteraz, katalaz gibi diğer başka enzimler de kullanılmaktadır, ancak sınırlı substrat seçeneklerinden dolayı yaygın kabul görmemişlerdir. Yabanturpu peroksidazı ve alkalin fosfatazın ELISA'da işaret olarak tercihen kullanılması substrat çeşitliliğinden ve meydana gelen ölçülebilir maddenin spektrofotometre, florometre, luminometre gibi birçok enstrümanla tayin edilebilmesinden ileri gelmektedir.[112]

ELISA'nın temelini oluşturan dört ana yöntem vardır;[111]

1- Doğrudan ELISA
2- Dolaylı ELISA
3- Sandviç ELISA
4- Kompetitif ELISA

Ancak uygulamada bu yöntemler birbirleriyle kombine halde kullanılır, örneğin kompetitif dolaylı, kompetitif sandviç, doğrudan sandviç kompetitif, dolaylı sandviç kompetitif gibi.

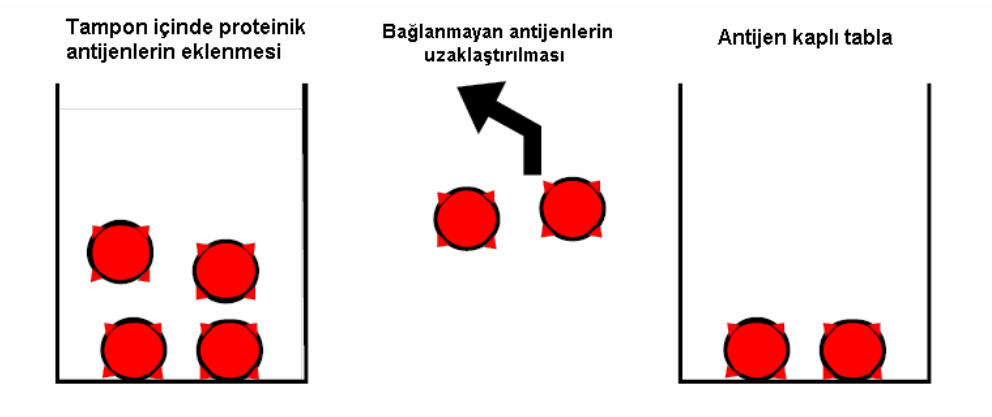
2.8.2.3.1 Doğrudan ELISA

Doğrudan ELISA'da, plastik tabla hedef antijen ile kaplanmıştır ve işaretli antikorun ilavesiyle oluşan bağlanma miktarı ölçülebilir. Bu yöntemde sekonder antikorun kullanılmaması işlemi bir basamak azalttığı için görece daha hızlıdır ve sekonder antikorun antijen içeren numunedeki komponentlerle çapraz-reaksiyon vermesine dair potansiyel problemler de söz konusu değildir.[111,113]

Doğrudan ELISA'da kullanılan her bir antikorun işaretlenmesi gerekliliği, bu yöntemi zaman alıcı ve yüksek maliyetli bir yöntem yapar. Ayrıca her antikor da işaretlenmeye uygun olmayabilir. Sekonder antikorun kullanılmasıyla mümkün olan sinyal yükseltmesi de bu yöntem için mümkün değildir.[111,113]

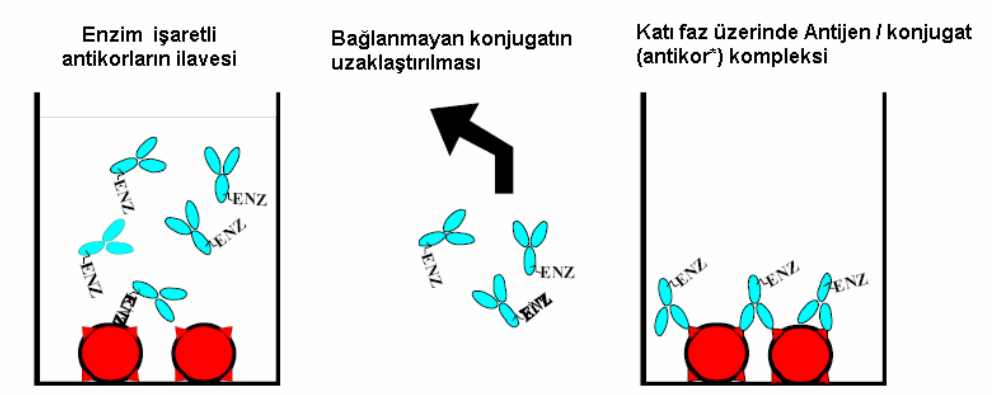
Yöntem, basamaklar halinde aşağıdaki şekilde uygulanır;

a) Antijen plastik tabladaki her bir kuyucuğa dayanıklı şekilde adsorbe ettirilir. Bir süre inkübasyonun sonunda bağlanmayan proteinler yıkama ile uzaklaştırılır (Şekil 23).



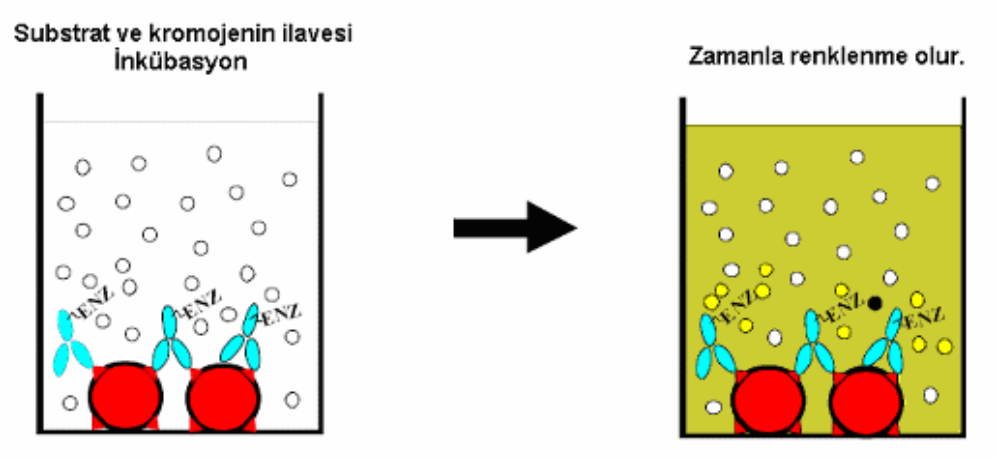
Şekil 23: Doğrudan ELISA'nın uygulanışında a basamağı

b) Enzimle kovalent bağlanmış antikorlar (konjugat olarak bahsedilir), inert proteinler ve antikorun plastik kuyucuklara non-spesifik bağlanmalarını engelleyecek bir solusyon içinde eklenir. İnkübasyonun ardından bağlanmayan konjugatlar yıkama ile uzaklaştırılır (Şekil 24).



Şekil 24: Doğrudan ELISA'nın uygulanışında b basamağı

c) Substrat ve kromojen, boya çözeltisi içinde eklenir. Enzim ile substratı bir renk reaksiyonu verir. Reaksiyon durdurulur ve spektrofotometrede şiddeti ölçülür (Şekil 25).



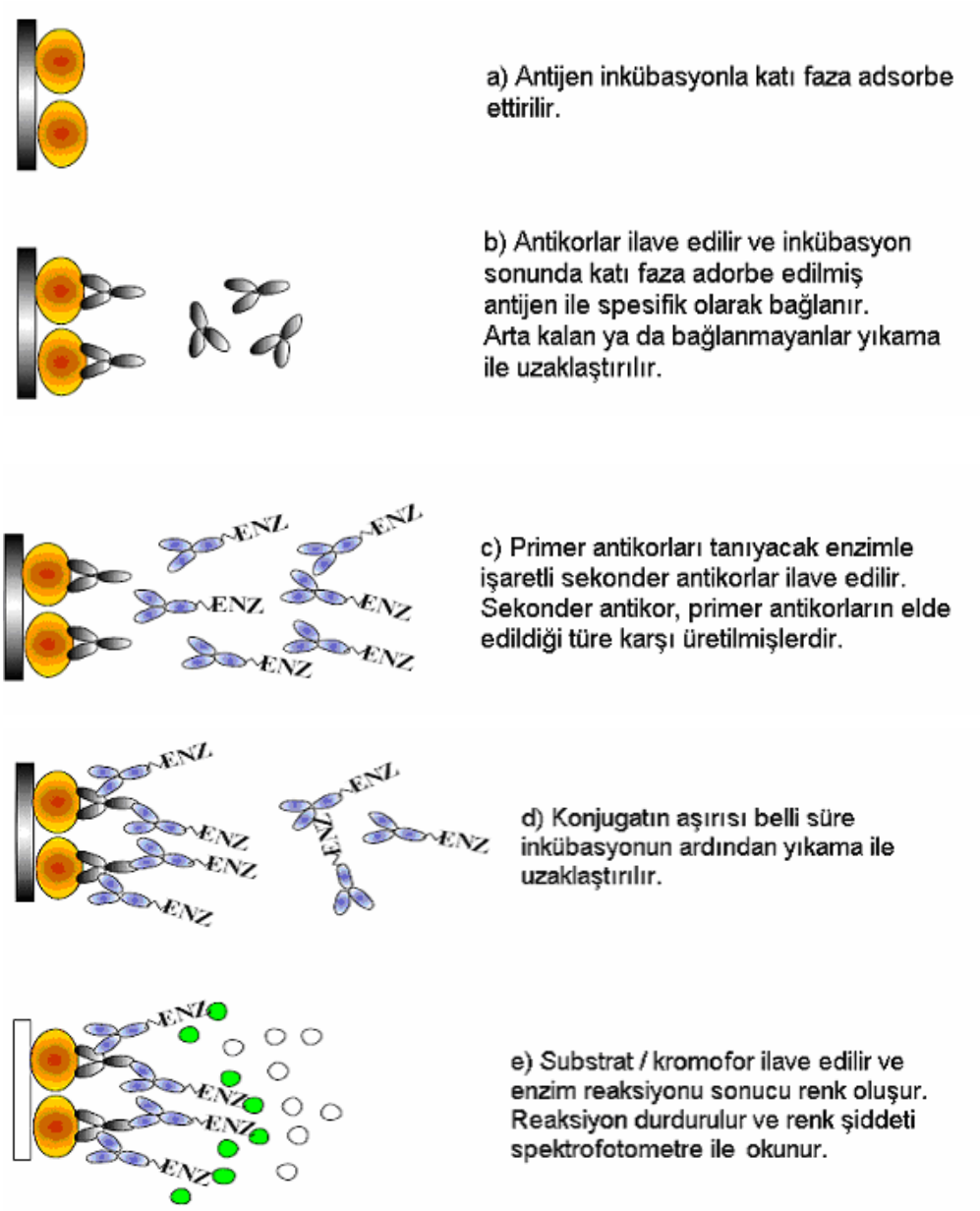
Şekil 25: Doğrudan ELISA'nın uygulanışında c basamağı

2.8.2.3.2 Dolaylı ELISA

Dolaylı ELISA işaretlenmemiş primer antikorlarla birlikte işaretli sekonder antikorları kullanır. İşaretli sekonder antikor elde edildiği türdeki tüm antikorları tanıyabildiği için (örneğin anti-fare), geniş çeşitlilikte primer antikor ile kulanılabilir (örneğin, tüm fare monoklonal antikorları).[111,113]

Sekonder antikor kullanımı ilave bir basamak demek olduğu için, sinyalde yükselme ve analiz hassaslığında artış demektir.

Dolaylı ELISA basamak basamak şekil 26'daki gibi uygulanır;



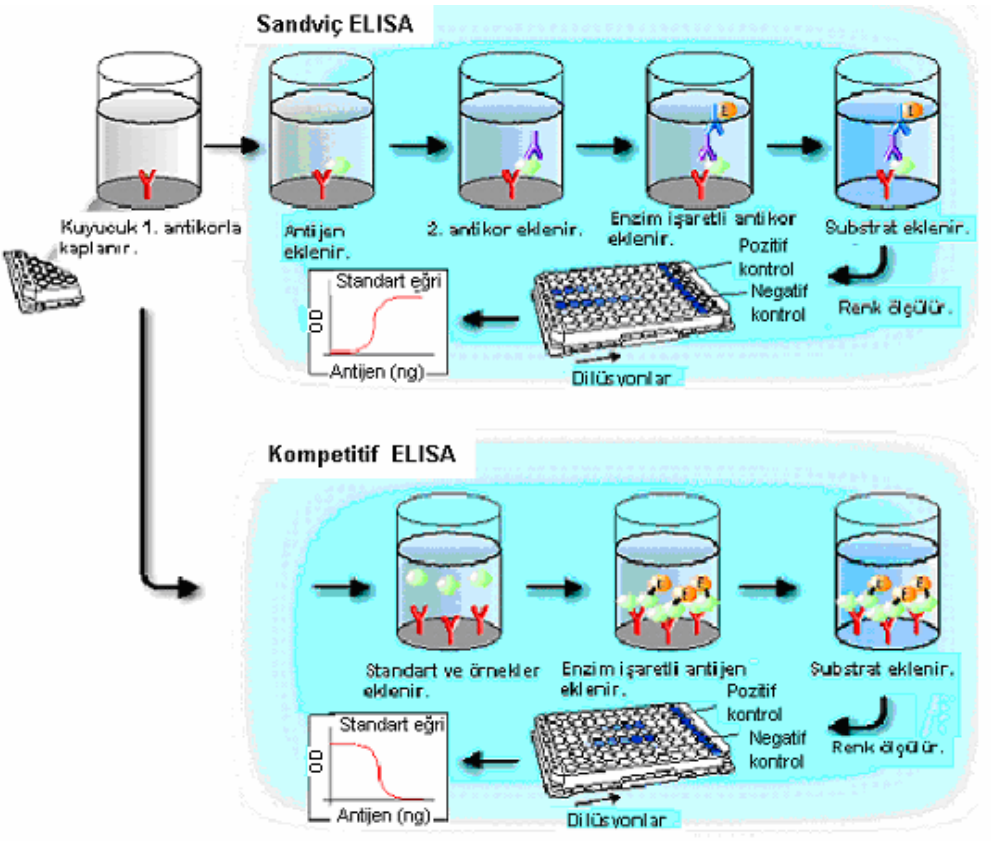
Şekil 26: Dolaylı ELISA'nın uygulaması

2.8.2.3.3 Sandviç ELISA

Sandviç ELISA, hızlı ve hassas ölçüme imkan sağlayan bir yöntemdir. Eğer saflaştırılmış antijen standardı varsa, bilinmeyen numune içindeki antijen miktarı tam olarak ölçülebilir. Sandviç ELISA'da aynı antijen üzerinde çakışmayacak iki antijene ihtiyaç vardır. Bunun için ya antikorun iki farklı epitopunu tanıyacak iki monoklonal antikor ya da bir grup afinite-saflaştırılmış poliklonal antikor kullanılır.

Bu analizde bir antikor (yakalayıcı antikor), tablanın tababına adsorbe ettirilir. İlave edilen numune içindeki antijen tabandaki antikor ile kompleks yapar. Bağlanmayanlar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra, işaretli ikinci antikor (tayin antikoru) eklenir. Matrikse bağlanan işaretli ikinci antikorun miktarı kolorimetrik bir substrat kullanılarak ölçülür.

Yöntemin ana avantajı, ölçülecek antijenin analizde kullanılmadan önce saflaştırılmasının gerekmemesi ve analizin özgüllüğünün yüksek olmasıdır. Dezavantajı ise, her antikorun kullanılamamasıdır. Sadece eşleşmiş çiftler halinde olan monoklonal antikorlar kullanılabilir, bu antikorlar aynı antikor üzerinde farklı kısımları tanıdıkları için birbirlerine engel olmazlar.[114]



Şekil 27: Kompetitif ve sandviç ELISA

2.8.2.3.4 Kompetitif ELISA

Eşleşmiş çiftler halinde olan antikorların kullanımı hedef için uygun değilse kompetitif ELISA kullanılabilir. Kompetitif ELISA'da saflaştırılmamış primer antikorlar kullanılabilir ve analiz pek çok farklı konfigürasyonda yapılabilir.

Kompetitif ELISA'da, bir reajan yabanturpu peroksidazı gibi bir enzimle konjuge edilir. Enzim immünojene ya da primer antikora bağlanabilir. Ancak birçok uygulamada antijen işaretlenmiştir. İşaretli olmayan antijen ile işaretli antijen primer antikora bağlanmak için yarışırlar.

İşaretli olmayan saflaştırılmış primer antikor tablanın tabanına kaplanır. Bu primer antikor işaretlenmemiş standartla ve

bilinmeyen numune (antijen içeriyor) ile inkübe edilir. Reaksiyon dengeye geldikten sonra enzimle konjuge edilmiş immünojen ilave edilir. Bu konjugat, primer antikorların işaretlenmemiş immünojen ile işgal edilmeyen kısımlarına bağlanır. Bu nedenle, örnek ya da standartta ne kadar çok immünojen varsa, konjuge immünojenin bağlanan miktarı o kadar düşük olacaktır. Tablaya substratın ilavesinini ardından oluşan renk şiddeti ölçülür.

Kompetitif ELISA'da ters orantılı bir grafik elde edilir. Çünkü örnek ya da standart içindeki antijen miktarı ne kadar fazla ise, renk değişim miktarı o ölçüde azdır.[111,114]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kimyasal Çalışmalar

3.1.1 Materyal ve Yöntem

3.1.1.1 Kimyasal Bileşikler

Yapılan sentez çalışmalarında başlangıç maddesi olarak 2-aminofenol (Merck), üre (Merck), 2-bromoasetik asit (Merck), tiyobenzamit (Lancaster), 2-klorobenzamit (Aldrich), 2-florobenzamit (Aldrich), 4-klorobenzamit (Aldrich), 4-florobenzamit (Aldrich), 4-metoksitiyobenzamit (Aldrich), fosforpentasülfür (Merck), etil bromoasetat (Acros), metalik sodyum (Merck) kullanılmıştır.

Spektral analizler için potasyum bromür (Merck), dimetilsülfoksit-d_6 (Aldrich), tetrametil silan(TMS) (Merck); ince tabaka kromatografisi için ise Silikajel 60 F_{254} (Merck, Kat. No: 5554) hazır plaklar kullanılmıştır.

3.1.1.2 Yöntem

3.1.1.2.1 2-Okso-3*H*-benzoksazol

43,652 gr (0,4 mol) 2-aminofenol ve 48,05 gr (0,8 mol) üre 500 mL'lik balona konuldu ve içine weflon magnet atıldıktan sonra Milestone Microsynth mikrodalga organik sentez reaktörüne yerleştirildi. Balon içeriği 400 watt enerji verilerek 5 dakikalık süreç içinde 140 °C'ye getirildi ve sıcaklık 10 dakika boyunca sabit tutuldu. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya döküldü ve çökelek süzülerek alındı. Verim 46,18 gr'dır (%85,5). Bileşiğin erime noktası 140 °C'dir.[62]

3.1.1.2.2 6-(2-Bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol

13,5 gr (0,1 mol) 2-okso-3*H*-benzoksazol ve 16,68 gr (0,12 mol) bromosetik asit 250 mL'lik bir balona alındı ve üzerine balonun

yarısına kadar (yaklaşık 200 gr) polifosforik asit (PPA) ilave edildi. Mikrodalga reaktörüne yerleştirilen balon 300 Watt enerji uygulanarak 35 dakikada 110 °C'ye ısıtıldı ve bu sıcaklık sabitlenip 25 dakika daha reaksiyona devam edildi. Süre sonunda balon içeriği buzlu suya porsiyonlar halinde döküldü. Elde edilen çökelek süzülerek alındı, kurutuldu ve etanol ile yıkanarak temizlendi. Daha ileri temizlemeye gidilmeden diğer bileşiklerin sentezi için kullanıldı.

3.1.1.2.3 Tiyobenzamit Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi

0,0128 mol uygun benzamit türevi ve 0,0034 mol fosfor pentasülfür 20 ml kurutulmuş benzen içinde, kalsiyum klorür başlığı takılmış geri çeviren soğutucuda 30 dakika ısıtıldı. Süre sonunda balon içeriği başka bir balona dekante edildi ve benzen uçuruldu. Balon içeriğine su ilave edildi. Çöken madde süzülerek alındı ve kurutuldu.[115]

3.1.1.2.4 6-(2-Sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 1-6)

0,01 mol (2,56 gr) 6-(2-bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol ve 0,011 mol uygun tiyobenzamit türevi yaklaşık 25 mL dietilenglikol dimetil eter (diglim) ile 100mL'lik bir balon içerisinde çözüldü. Oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı ile katı madde oluşumu gözlenene kadar karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisiyle başlangıç maddesinin bittiği görüldükten sonra reaksiyon sonlandırıldı. Sonuç ürün su ilavesiyle tamamen çöktürüldü ve süzülerek izole edildi. Uygun çözücüden kristallendirildi.

6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 4) ve 6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 6) Scifinder Scholar taramaları sonucunda sırasıyla 876863-98-8 ve 924472-45-7 numaraları ile kayıtlı bulunmuştur. Aurora Screening Library, Enamine Screening Library ve Ambinter Stock Screening Collection firmaları tarafından satıldığı tespit edilmekle beraber tarafımızdan sentezlenmiştir.

3.1.1.2.5 Etil 2-[6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-Okso-3*H*-Benzoksazol-3-il]asetat Türevlerinin Sentez Yöntemi (Bileşik 7-12)

İstenen ürüne göre 0,005 mol 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevi, 0,0055 mol metalik sodyum ve susuz etanolden elde edilen sodyum etoksit çözeltisine eklendi. 0,01 mol etil bromoasetatın ilavesinden sonra balon içeriği geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Reaksiyon İTK ile takip edildi. Su ilavesiyle ürün çöktürüldü ve süzülerek alındı. Uygun kristalizasyon çözücüsü ile kristallendirilerek temizlendi.

3.1.1.2.6 2-[6-(2-Sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi (Bileşik 13-18)

1. Yöntem: İstenen sonuç ürüne uygun olan 0,002 mol etil 2-[6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat türevi bir balona alındı ve yaklaşık 30 mL %37'lik HCl ilavesinden sonra geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Berrak olan reaksiyon ortamında katı madde meydana gelmesi ile ürün oluşumu belirlendi, İTK ile kontrol edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Su ilavesiyle çökmenin tamamlanması sağlandı ve ham ürün süzülerek alındı. Uygun çözücüden kristallendirildi.

2. Yöntem: 0,033 mol metalik sodyum susuz etanol içinde çözüldü, elde edilen sodyum etoksit çözeltisinden etanol kuruluğa kadar uçuruldu, sodyum etoksit 25 mL N,N-dimetilformamit (DMF) içerisinde çözüldü. Üzerine 0,01 mol 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevi ve 0,02 mol bromoasetik asit eklendi. Mikrodalga reaktörüne yerleştirildi. 300 watt enerji verilerek 125 °C'ye 2 dakikada ulaştırıldı, 30 dakika bu sıcaklıkta reaksiyona devam edildi. Reaksiyon ortamında oluşan çökelek süzüldü, DMF ile yıkandı. Çökelek su içine alınıp asitlendirilerek ürün çöktürüldü. Uygun çözücüden kristallendirildi.

3.2 Analitik Kontroller

3.2.1 Erime Derecesi Tayini

Bileşiklerin erime dereceleri “Thomas-Hoover Melting Point Apparatus 9200” erime derecesi tayin cihazında saptandı.

3.2.2 İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller

3.2.2.1 Materyal

Plaklar: Çalışmamızda Sİlikajel 60 F_{254} hazır plaklar kullanılmıştır.

Çözücü sistemleri: Sentezlediğimiz 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: Kromatografi küvetlerine çözücü sistemleri konulduktan sonra oda sıcaklığında 24 saat doygunluk sağlandı. Hazır plaklara sentezlenen bileşikler ile başlangıç maddelerinin uygun çözücüdeki çözeltileri tatbik edilip, oda sıcaklığında yukarıda belirtilen çözücü sistemlerinde sürüklenerek R_f değerleri belirlendi.

Lekelerin Belirlenmesi: Kromatogramlarda 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/cm^2 basınçta hazırlanan yaklaşık %1 oranında madde içeren diskler kullanılarak, Bruker Vector 22 IR (Opus Spectroscopic Software Version 2.0) spektrometresinde alındı ve dalga sayısı (cm^{-1}) cinsinden değerlendirilmiştir.

3.2.3.2 ^{1}H-NMR Spektrumları

Spektrumlar, bileşiklerin dimetilsülfoksit-d_6 (DMSO-D_6) içerisindeki çözeltilerinden, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digital FT-NMR spektrometresinden yararlanılmıştır.

3.2.4 Elementel Analizler

Bileşiklerin C, H ve N elementlerinin analizleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda CHNS-932 (Leco) elementel analiz tayin cihazında yaptırılmıştır.

3.3 Biyolojik Etkinlik Çalışmaları

3.3.1 COX-1 Enzimi İnhibitör Aktivite Testi

Bir hafta nonsteroidal antienflamatuvar ilaç kullanmamış sağlıklı gönüllülerin kanları antikoagülan içermeyen tüplere alınır. Kan test bileşikleri ile 37 °C'de 1 saat inkübe edilir. Kendi haline bırakılmış kanda, pıhtılaşma için salınan trombin, trombositlerden COX-1 aracılığı ile TxA_2 salınımını indükler ve TxA_2 de hızla biyolojik olarak inaktif ancak stabil bir metabolit olan TxB_2'ye dönüşür.[1,6,47] Bu yöntemde COX-1 inhibisyonunu tespit etmek üzere immünolojik bir teknik olan ELISA kullanılarak kandaki TxB_2 miktarı ölçülür. ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanmasının antikorlara ya da antijenlere alkalen fosfataz, yabanturpu peroksidazı gibi bir enzimin bağlanması ve bu enzimin substratı olan bir maddenin ilavesinin ardından renkli bir ürün elde edilmesi ve oluşan bu renk şiddetinin ölçülmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir.

COX-1 inhibitör aktivitesi için pıhtılaşmış tam kandan elde edilen serum kullanılır. Kan antikoagülan içermeyen tüplerde pıhtılaşmaya terk edildiği zaman oluşan pıhtı yumağından ayrılan sarı renkli sıvı serumdur. Buna göre serumda kanın pıhtılaşmasında görevli pıhtılaşma faktörleri ve proteinleri ve özellikle fibrinojen yoktur. Bu sebeple seruma fibrinojensiz plazma da denir. inkübasyon süresi için 1 saat uygun bulunmuştur. Çünkü TxB_2 seviyesi koagülasyonun birinci saatinde platoya ulaşmaktadır, bu da test bileşiklerinin platelet COX-1'i ile etkileşmesi için yeterli bir süredir.[103]

Yöntemde, ticari olarak piyasada mevcut olan bir enzim seti kullanılmıştır. Sette mevcut bulunan enzim ile işaretli TxB_2* ve kanda pıhtılaşmanın indüklemesi sonucu açığa çıkan ve test bileşiklerinin inhibitör aktivitesine göre salınan TxB_2, yine sette mevcut bulunan TxB_2 monoklonal antikorlarına bağlanmak için yarışırlar. Antikor-TxB_2 ve antikor-TxB_2* immun kompleksleri oluşur. Kandaki serbest TxB_2'nin afinitesi daha fazla olduğundan, öncelikle inhibisyon oranınca kanda mevcut TxB_2 bağlanacak ve kalan antikorlara da işaretli TxB_2* bağlanacaktır. İşaretli TxB_2*'ye uygun bir substratın ilavesinin ardından oluşan renk şiddeti Versamax microplate okuyucusu (Molecular Devices®) UV spektrometresi ile ölçülür. Değişik konsantrasyonlarda TxB_2 içeren standartlarla numunenin renk şiddeti karşılaştırılarak TxB_2'nin miktarı hesaplanır ve bu miktar inhibe olmamış enzim miktarıyla ilişkilidir. Kandaki toplam TxB_2 miktarından UV ölçümü sonucu hesaplanan TxB_2

miktarının çıkarılması ve kandaki toplam TxB_2 miktarına oranlanması da % inhibisyon değerini verir.[116]

3.3.1.1 Materyal

COX-1 inhibitör aktivitenin tayini için "Assay Designs'Correlate-EIA™ Thromboxane B_2 Enzyme Immunoassay Kit (Katalog No: 900-002)" kullanılmıştır. 18 bileşik çift kontrollü olarak aynı set ile değerlendirilmiştir. Set içerisindeki tüm materyaller kullanılacağı ana kadar saklama koşullarına uygun olarak 4 °C'de, işaretli TxB_2* ve standartların hazırlanmasında kullanılan TxB_2 -20 °C'de saklanmış, kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Set içerisinde bulunanlar aşağıda verilmiştir.[116]

- Keçi anti-tavşan IgG Mikrotitre Tabla, 96 kuyucuklu, Katalog No 80-0050: Tavşan Ig G'ye karşı elde edilmiş keçi sekonder antikorları ile kaplı bir plastik tabladır. Sekonder antikorlar, tavşan primer antikorlarının keçiyi immünize etmesiyle elde edilirler. Tavşandaki tüm antijen türevlerini tanırlar. Ayrıca bir enzim ile konjuge edilerek uygun substrat ilavesiyle oluşturulan renk reaksiyonundan kantitatif analiz yapılmasına olanak verirler.

- Alkalin fosfataz ile konjuge edilmiş TxB_2, 6 ml, Katalog No: 80-0005 (Konjugat olarak bahsedilir, mavi renklidir.)

- TxB_2 EIA Antikoru, 6 ml, Katalog No: 80-0006 (TxB_2'ye karşı sarı renkli tavşan poliklonal antikor çözeltisi)

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

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

- TxB_2 standartı, 0.5 ml, Katalog No: 80-0007 (TxB_2'nin 100.000 pg/mL'lik çözeltisi)

- pNpp substrat, 20 ml, Katalog No: 80-0075 (Tampon içinde p-nitrofenilfosfat çözeltisi)

-Durdurma çözeltisi, 5 ml, Katalog No: 80-0247 (Trisodyum fosfatın sudaki çözeltisi)

- Tabla üzerine numune ve standartların tatbik düzenini gösteren test plan sayfası, Katalog No: 30-0003

3.3.1.2 Yöntem

3.3.1.2.1 Numunelerin Hazırlanması

Sentezlenen test bileşiklerinin DMSO içerisinde 5,11 mM konsantrasyonda çözeltileri hazırlanır. Bir hafta öncesine kadar nonsteroidal antienflamatuvar ilaç kullanmamış sağlıklı gönüllüden heparinsiz tüplere alınan kan deney tüplerine 500 µL miktarlarda konulur. Üzerlerine test bileşiklerinin 5 mM'lık stok çözeltilerinden 1 µL tüplere konur ve COX-1 indüksiyonunu sağlamak üzere su banyosunda 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda numuneler buza alınır ve ardından tüpler 13.000 rpm 4 °C'de 5 dakika ultrasantrifüjlenir. Ayrılan süpernatanttan 10 µL alınır ve final konsantrasyonu sağlayacak miktarda analiz tamponu ile tamamlanarak tabla kuyucuklarına konulacak sonuç numuneler elde edilir. Bu çözeltilerde 10 µM test maddesi vardır. Setin kullanma kılavuzundaki talimatlar tamamlandıktan sonra UV spektrometresi ile renk şiddeti ölçülür.

3.3.1.2.2 Set İçindeki Reajanların Hazırlanması

3.3.1.2.2.1 TxB_2 Standartlarının Hazırlanması

Setten çıkan TxB_2 çözeltisi 100.000 pg/mL konsantrasyondadır. Standartların hazırlanacağı 7 adet tüp numaralandırılır. Birincisine 900, kalan altı tüpe ise 666 µL analiz tamponu konur. İlk tüpe 100.000 pg/mL konsantrasyondaki TxB_2 çözeltisinden 100 µL konur ve vortekslenir. Bu tüpten 333 µL alınır ve 2. tüpe konur, vortekslenir. Aynı şekilde bu tüpten 333 µL alınır ve 3. tüpe konur, ardından vortekslenir. Bu işlem 7. tüpe kadar yapılır. Bu durumda

tüplerdeki TxB_2 konsantrasyonu 1. tüpten 7.ye doğru sırasıyla 10.000; 3.333; 1.111; 370; 123; 41,1 ve 13,7 pg/ml olması sağlanır. Standartlar 60 dakika içinde kullanılmalıdır.[116]

3.3.1.2.2.2 Yıkama Tamponunun Hazırlanması

5 mL konsantre yıkama tamponu 95 mL deiyonize suyla seyreltilerek yıkama çözeltisi hazırlanır.[116]

3.3.1.2.3 Analiz Prosedürü

1-Set içerisindeki reajanlar kullanmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilir. Standartlar tek dilüsyon, cift kuyucuk; test bileşikleri çift dilüsyon, 4 kuyucuk çalışılmıştır.[116]

Tablo 10: TxB_2 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-560: Referans olarak kullanılan güçlü COX-1 inhibitörü madde

Ör: Örnek

2- 100 µL analiz tamponu NSB ve Bo kuyucuklarına konur. (0 pg/mL standart)

3- 7 adet standart 100 µL miktarda uygun kuyucuklara konur.

4- Numuneler 100 µL miktarında uygun kuyucuklara konur.

5- 50 µL analiz tamponu NSB kuyucuğuna konur.

6- 50 µL mavi konjugat (alkalin fosfataz ile işaretli TxB_2* çözeltisi) TA ve kör dışındaki tüm kuyucuklara konur.

7- Kör, TA ve NSB haricindeki tüm kuyucuklara 50 µL sarı renkli antikor (TxB_2'ye özgül monoklonal antikor) konur.

Bu aşamada kör ve TA kuyucuğu renksiz, NSB mavi, diğer kuyucuklar ise yeşil renktedir.

8- Tabla oda sıcaklığında 2 saat boyunca 500 rpm de çalkalanır.

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

10- Son yıkamanın ardından tabla tam olarak suyundan arındırılır.

11- 5 µL mavi renkli konjugat TA kuyucuğuna konur.

12- 200 µL pNpp substratı tüm kuyucuklara konur ve oda sıcaklığında 45 dakika bekletilir.

13- Her kuyucuğa 50 µL durdurma çözelisi konur ve hemen 405 nm'de köre karşı okuma yapılır.

3.3.1.2.4 Hesaplamalar

1-Her standart ve numunenin ölçülen optik dansitelerinin ortalaması alınır. Bu ortalama değerlerden NSB kuyucuğununun ortalaması çıkarılarak her standart ve numune için Net Optik Dansite (Net OD) bulunur.

Ortalama Net OD=Standart/numunelerin Ortalama OD değeri – NSB Ortalama OD değeri

2- En fazla bağlanmanın olduğu Bo kuyucuğunun net optik dansitesinin bulunması için okunan OD değerlerinin ortalamasının hesaplanması ve bu değerden NSB kuyucuğunun ortalama OD'sinin çıkarılması gerekir.

Net Bo = Bo Ortalama OD – NSB Ortalama OD

3- İlk iki işlem ile bulunan değerler birbirine oranlanıp 100 ile çarpıldığında yüzde bağlanma değeri elde edilir.

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

4- Sigma plot programı kullanılarak standartların TxB_2 konsantrasyonlarına karşı % B/Bo değerleri grafiğe geçirilir ve logaritmik bir eğri çizilir. Bu eğri yardımıyla numunelerin pg/ mL olarak TxB_2 miktarı bulunur.

5- Sigma plot programında yalnız kan plazmasını içeren kuyucuktaki TxB_2 miktarı da hesaplanmıştır. Bu değer, inhibisyon yokken sadece pıhtılaşmanın indüklemesiyle salınan TxB_2'yi göstermektedir. Bu değerden numunelerin TxB_2 miktarını çıkarıp, kandaki değere oranlayarak bileşiklerin ne kadar inhibisyon yaptığı bulunur.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kan } TxB_2 \text{ kons.} - \text{Numune } TxB_2 \text{ kons.}}{\text{Kan } TxB_2 \text{ kons.}} \times 100$$

3.3.2 COX-2 Enzimi İnhibitör Aktivite Testi

Son bir hafta non steroidal antienflamatuvar ilaç kullanmamış sağlıklı gönüllülerin kanları antikoagülan içeren tüplere alınır. Kan lipopolisakkarit (LPS) ve test bileşikleri ile 37 °C'de 24 saat inkübe edilir.[1,103,117] COX-2'nin LPS ile indüklenmesi sonucu salınan PGE_2 miktarı, immunolojik bir teknik olan ELISA ile ölçülür.

Yöntemde, ticari olarak piyasada mevcut olan bir enzim seti kullanılmıştır. Sette mevcut bulunan enzim ile işaretli PGE_2* ve kanda LPS indüksiyonundan sonra açığa çıkan ve test bileşiklerinin inhibitör aktivitesine göre salınan PGE_2, yine sette mevcut bulunan PGE_2 monoklonal antikorlarına bağlanmak için yarışırlar. Antikor-PGE_2 ve antikor-PGE_2* immun kompleksleri oluşur. Kandaki serbest PGE_2'nin afinitesi daha fazla olduğundan, öncelikle inhibisyon oranınca kanda mevcut PGE_2 bağlanacak ve kalan antikorlara da işaretli PGE_2* bağlanacaktır. İşaretli PGE_2*'ye uygun bir substratın ilavesinin ardından oluşan renk şiddeti Versamax microplate okuyucusu (Molecular Devices®) UV spektrometresi ile ölçülür. Değişik konsantrasyonlarda PGE_2 içeren standartlarla numunenin renk şiddeti karşılaştırılarak PGE_2'nin miktarı hesaplanır ve bu miktar inhibe olmamış enzim miktarıyla ilişkilidir. Kandaki toplam PGE_2 miktarından UV ölçümü sonucu hesaplanan PGE_2 miktarının çıkarılması ve kandaki toplam PGE_2 miktarına oranlanması da % inhibisyon değerini verir.[118]

3.3.2.1 Materyal

COX-2 inhibitör aktivitenin tayini için "Assay Designs'Correlate-EIA™ Prostaglandin E_2 (PGE_2) katalog no: 900-001" kullanılmıştır. 18 bileşik çift kontrollü olarak aynı set ile değerlendirilmiştir. Set içerisindeki tüm materyaller kullanılacağı ana kadar saklama koşullarına uygun olarak 4 °C'de, işaretli PGE_2* ve standartların hazırlanmasında kullanılan PGE_2 -20 °C'de saklanmış, kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Set içerisinde bulunanlar aşağıda verilmiştir.[118]

- Keçi anti-Fare IgG Mikrotitre Tabla, 96 kuyucuklu, Katalog No 80-0050: Fare Ig G'ye karşı elde edilmiş keçi sekonder antikorları ile kaplı bir plastik tabladır. Sekonder antikorlar, fare primer antikorlarının keçiyi immünize etmesiyle elde edilirler. Faredeki tüm antijen türevlerini tanırlar. Ayrıca bir enzim ile konjuge edilerek uygun substrat ilavesiyle

oluşturulan renk reaksiyonundan kantitatif analiz yapılmasına olanak verirler.

- Alkalin fosfataz ile konjuge edilmiş PGE_2, 6 ml, Katalog No: 80-0002 (Konjugat olarak bahsedilir, mavi renklidir.)

- PGE_2 EIA Antikoru, 6 ml, Katalog No: 80-0003 (PGE_2'ye özgül monoklonal antikor)

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

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

- PGE_2 standartı, 0,5 ml, Katalog No: 80-0004 (PGE_2'nin 50.000 pg/mL'lik çözeltisi)

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

- Durdurma çözeltisi, 5 ml, Katalog No: 80-0247 (Trisodyum fosfatın sudaki çözeltisi)

- Tabla üzerine numune ve standartların tatbik düzenini gösteren test plan sayfası, Katalog No: 30-0002

3.3.2.2 Yöntem

3.3.2.2.1 Numunelerin Hazırlanması

Sentezlenen test bileşiklerinin DMSO içerisinde 5,11 mM konsantrasyonda çözeltileri hazırlanır. Bir hafta öncesine kadar nonsteroidal antienflamatuvar ilaç kullanmamış sağlıklı gönüllüden heparinli tüplere alınan kan deney tüplerine 500 µL miktarlarda konulur. COX-2 indüksiyonunu sağlamak için 0,51 mg/mL konsantrasyonda

hazırlanmış stok LPS çözeltisinden 10 µL ve test bileşiklerinin 5 mM'lık stok çözeltilerinden 1 µL tüplere konur ve su banyosunda 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonuda numuneler buza alınır ve ardından tüpler 13000 rpm 4 °C'de 5 dakika ultrasantrifüjlenir. Ayrılan süpernatanttan 10 µL alınır ve final konsantrasyonu sağlayacak miktarda analiz tamponu ile tamamlanarak tabla kuyucuklarına konulacak sonuç numuneler elde edilir. Bu çözeltilerde 10 µM test maddesi vardır. Setin kullanma kılavuzundaki talimatlar tamamlandıktan sonra UV spektrometresi ile renk şiddeti ölçülür.

3.3.2.2.2 Set İçindeki Reajanların Hazırlanması

3.3.2.2.2.1 PGE_2 Standartlarının Hazırlanması

Setten çıkan PGE_2 çözeltisi 50.000 pg/mL konsantrasyondadır. Standartların hazırlanacağı 7 adet tüp numaralandırılır. Birincisine 950, kalan altı tüpe ise 500 µL analiz tamponu konur. İlk tüpe 50.000 pg/mL konsantrasyondaki PGE_2 çözeltisinden 50 µL konur ve vortekslenir. Bu tüpten 500 µL alınır ve 2. tüpe konur, vortekslenir. Aynı şekilde bu tüpten 500 µL alınır ve 3. tüpe konur, ardından vortekslenir. Bu işlem 7. tüpe kadar yapılır. Bu durumda tüplerdeki PGE_2 konsantrasyonu 1. tüpten 7.ye doğru sırasıyla 2.500; 1.250; 625; 313; 156; 78,1 ve 39,1 pg/mL olur. Standartlar 60 dakika içinde kullanılmalıdır.[118]

3.3.2.2.2.2 Yıkama Tamponunun Hazırlanması

5 mL konsantre yıkama tamponu 95 mL deiyonize suyla seyreltilerek yıkama çözeltisi hazırlanır.[118]

3.3.2.2.3 Analiz Prosedürü

1- Set içerisindeki reajanlar kullanmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilir. Standartlar tek dilüsyon, cift kuyucuk; test bileşikleri çift dilüsyon, dört kuyucuk çalışılmıştır.[118]

Tablo 11: PGE_2 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-697: Referans olarak kullanılan güçlü COX-2 inhibitörü madde

Ör: Örnek

2- 100 µL analiz tamponu NSB ve Bo kuyucuklarına konur. (0 pg/mL standart)

3- 7 adet standart 100 µL miktarda uygun kuyucuklara konur.

4- Numuneler 100 µL miktarında uygun kuyucuklara konur.

5- 50 µL analiz tamponu NSB kuyucuğuna konur.

6- 50 µL mavi konjugat (alkalin fosfataz ile işaretli PGE_2* çözeltisi) TA ve kör dışındaki tüm kuyucuklara konur.

7- Kör, TA ve NSB haricindeki tüm kuyucuklara 50 µL sarı renkli antikor (PGE_2'ye özgül monoklonal antikor) konur.

Bu aşamada kör ve TA kuyucuğu renksiz, NSB mavi, diğer kuyucuklar ise yeşil renktedir.

8- Tabla oda sıcaklığında 2 saat boyunca 500 rpm de çalkalanır.

9- Yıkama çözeltisi ile her kuyucuk 3 kez yıkanır.

10- Son yıkamanın ardından tabla tam olarak suyundan arındırılır.

11- 5 µL mavi renkli konjugat TA kuyucuğuna konur.

12- 200 µL pNpp substratı tüm kuyucuklara konur ve oda sıcaklığında 45 dakika bekletilir.

13- Her kuyucuğa 50 µL durdurma çözelisi konur ve hemen 405 nm'de köre karşı okuma yapılır.

3.3.2.2.4. Hesaplamalar

1-Her standart ve numunenin ölçülen optik dansitelerinin ortalaması alınır. Bu ortalama değerlerden NSB kuyucuğununun ortalaması çıkarılarak her standart ve numune için Net Optik Dansite (Net OD) bulunur.

Ortalama Net OD = Standart / numunelerin Ortalama OD değeri – NSB Ortalama OD değeri

2- En fazla bağlanmanın olduğu Bo kuyucuğunun net optik dansitesinin bulunması için okunan OD değerlerinin ortalamasının hesaplanması ve bu değerden NSB kuyucuğunun ortalama OD'sinin çıkarılması gerekir.

Net Bo = Bo Ortalama OD – NSB Ortalama OD

3- İlk iki işlem ile bulunan değerler birbirine oranlanıp 100 ile çarpıldığında yüzde bağlanma değeri elde edilir.

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

4- Sigma plot programı kullanılarak standartların PGE_2 konsantrasyonlarına karşı % B/Bo değerleri grafiğe geçirilir ve logaritmik bir eğri çizilir. Bu eğri yardımıyla numunelerin pg/ mL olarak PGE_2 miktarı bulunur.

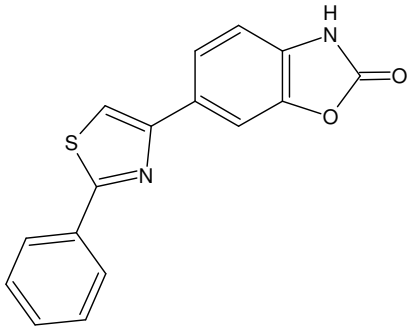
5- Sigma plot programında yalnız kan plazmasını içeren kuyucuktaki PGE_2 miktarı da hesaplanmıştır. Bu değer, inhibisyon yokken sadece LPS stimülasyonu ile salınan PGE_2'yi göstermektedir. Bu değerden numunelerin PGE_2 miktarını çıkarıp, kandaki değere oranlayarak bileşiklerin ne kadar inhibisyon yaptığı bulunur.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kan } PGE_2 \text{ kons.} - \text{Numune } PGE_2 \text{ kons.}}{\text{Kan } PGE_2 \text{ kons.}} \times 100$$

4. BULGULAR

4.1 Kimyasal Çalışmalar

4.1.1 6-(2-Fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 1)



2,56 gr (0,01 mol) 6-(2-bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol ve 1,38 gr (0,011 mol) tiyobenzamitten 25 ml diglim içinde genel sentez yöntemlerinde verildiği şekilde sentezlendi. Reaksiyon süresi 30 dakikadır. Ürün etanolden kristallendirildi. Kristal verimi 0,41g'dır (%27,9).

Pembemsi renkte, toz şeklinde kristallerdir. Erime noktası 266 °C'dir. Kloroformda çözünmez, asetonitrilde çözünür, etanol, aseton ve diglimde sıcakta çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,26; 0,54; 0,87'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde koyu yeşil renk verir.

.

IR spektrumunda 3173 (N-H gerilim, laktam), 3102 (C-H gerilim, aromatik), 1749 (C=O gerilim, laktam), 1480 (C=N gerilim, tiyazol) cm^{-1}'de bandlar görülür.

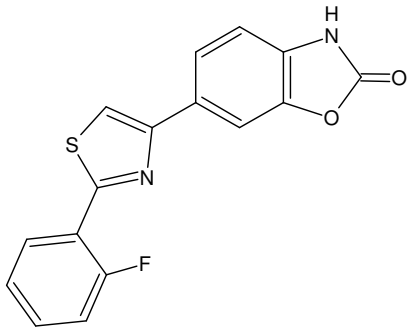
^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) δ 11,8 (s, 1H, -NH), 8,10 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,03 - 7,96 (m, 2H, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$), 7,92 (s, 1H, benzoksazol H^7), 7,87 (d, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,4}$= 8,4 Hz), 7,56 - 7,46 (m,

3H, fenil $H^{3''}$, $H^{4''}$, $H^{5''}$), 7,15 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 7,6 Hz) ppm'de pikleri görülür.

Elementel analiz $C_{16}H_{10}N_2O_2S$ M.A. 294,33

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	65,29	3,42	9,52	10,89
Bulunan	65,35	3,56	9,57	10,88

4.1.2 <u>6-[2-(2-Florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 2)</u>



2,56 gr (0,01 mol) 6-(2-bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol ve 1,706 gr (0,011 mol) 2-florotiyobenzamitten 25 ml diglim içinde genel sentez yöntemlerinde verildiği şekilde sentezlendi. Reaksiyon süresi üç saattir. Metanol-2-propanolden kristalendirildi. Kristal verimi 1,2 g'dir (%38,4).

Pembemsi renkli iğne şeklinde kristallerdir. Erime derecesi 249 °C'dir. Aseton, etanol, metanol, 2-propanol ile sıcakta çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,25; 0,50; 0,88'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde koyu yeşil renk verir.

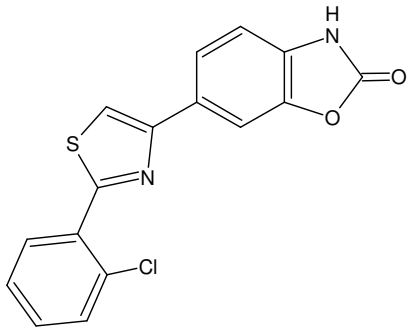
IR spektrumunda 3436 (N-H gerilim, laktam), 3199, 3121 (C-H gerilim, aromatik), 1755 (C=O gerilim, laktam), 1475, (C=N gerilim, tiyazol) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) δ 11,8 (s, 1H, -NH), 8,40 (t, 1H, fenil $H^{4''}$), 8,285 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 7,99 (d, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$= 1,2 Hz), 7,93 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,4}$= 7,6 Hz ve $J_{5,7}$= 1,6 Hz), 7,61 –7,54 (m, 1H, fenil $H^{6''}$), 7,5–7,4 (m, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 7,19 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8 Hz) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz $C_{16}H_9FN_2O_2S$ M.A. 312,32

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	61,53	2,90	8,97	10,27
Bulunan	61,17	2,90	8,99	10,22

4.1.3 <u>6-[2-(2-Klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik3)</u>



2,56 gr (0,01 mol) 6-(2-bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol ve 1,886 gr (0,011 mol) 2-klorotiyobenzamitten 25 ml diglim içinde genel sentez yöntemlerinde verildiği şekilde sentezlendi. Bir saat sonunda ürün reaksiyon ortamında çöktü. Su ilavesiyle çökme tamamlandı ve süzülerek alındı. Ürün benzenden kristallendirildi. Kristal verimi 1,086 g'dır. (%33).

Pembe renkli, pamuksu görünümlü kristallerdir. Erime noktası 241 °C'dir. Kloroform ve benzende az çözünür. Etanol, metanol, aseton, 2-propanol ve etil asetatta sıcakta çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,27; 0,52; 0,87'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde siyah renk verir.

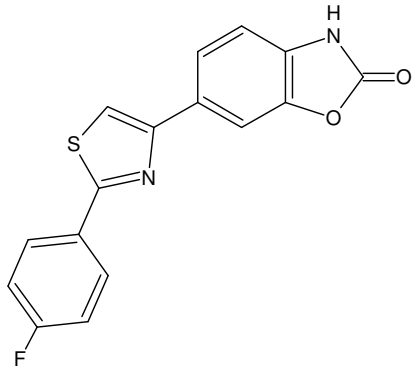
IR spektrumunda 3215 (N-H gerilim, laktam), 3089 (C-H gerilim, aromatik), 1749 (C=O gerilim, laktam), 1473 (C=N gerilim, tiyazol) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) δ 11,79 (s, 1H, -NH), 8,38- 8,32 (m, 1H, fenil $H^{4''}$), 8,31 (s, 1H, tiyazol $^{5'}$), 7,98 (s, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$= 0,8), 7,92 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,4}$= 8,4 Hz ve $J_{5,7}$= 1,6 Hz), 7,7 – 7,642 (m, 1H, fenil $H^{6''}$), 7,58 – 7,51 (m, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 7,19 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8 Hz) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz $C_{16}H_9ClN_2O_2S$ M.A. 328,77

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	58,45	2,76	8,52	9,75
Bulunan	58,29	2,72	8,56	9,74

4.1.4 <u>6-[2-(4-Florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 4)</u>



2,56 gr (0,01 mol) 6-(2-bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol ve 1,706 gr (0,011 mol) 2-florotiyobenzamitten 25 ml diglim içinde genel sentez yöntemlerinde verildiği şekilde sentezlendi. Reaksiyon süresi bir saattir. Süre sonunda su ilavesiyle madde tamamen çöktürüldü ve

süzülerek alındı. Metanol/2-propanol karışımından kristallendirildi. Kristal verimi 0,79 g'dır (%25,5).

Turuncu renkli toz şeklinde kristallerdir. Erime derecesi 268 °C'dir. Petrol eteri, n-hekzanda çözünmez. Metanolde az çözünür, etanol, 2-propanol ile sıcakta çözünür. Asetonda çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,26; 0,49; 0,89'dur. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde koyu yeşil renk verir.

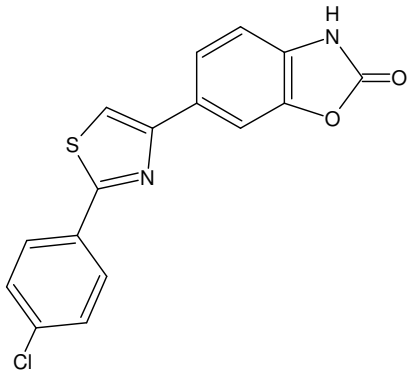
IR spektrumunda 3224 (N-H gerilim, laktam), 3110, 3079 (C-H gerilim, aromatik), 1722 (C=O gerilim, laktam), 1479 (C=N gerilim, tiyazol) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) δ 11,8 (s, 1H, -NH), 8,14 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,12 – 8,06 (m, 2H, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$), 7,96 (d, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$=1,6 Hz), 7,9 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,4}$= 8 Hz ve $J_{5,7}$= 1,6 Hz), 7,42 – 7,34 (m, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 7,18 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8 Hz) ppm'de pikleri görülür.

Elementel analiz $C_{16}H_9FN_2O_2S$ M.A. 312,32

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	61,53	2,90	8,97	10,27
Bulunan	61,29	2,94	9,02	10,30

4.1.5 <u>6-[2-(4-Klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 5)</u>



2,56 gr (0,01 mol) 6-(2-bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol ve 1,886 gr (0,011 mol) 4-klorotiyobenzamitten 25 ml diglim içinde genel sentez yöntemlerinde verildiği şekilde sentezlendi. Reaksiyon süresi üç saattir. Etanolden kristallendirilerek temizlendi. Kristal verimi 1,84 g'dır (%56).

Kremrengi parlak toz şeklinde kristallerdir. Erime derecesi 210 °C'dir. Kloroform ile az çözünür. Etanol ve asetonda sıcakta çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,26; 0,52; 0,88'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde koyu yeşil renk verir.

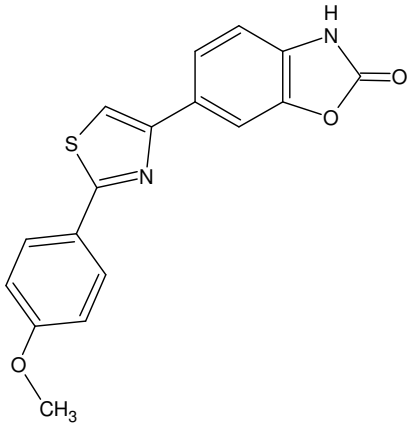
IR spektrumunda 3222 (N-H gerilim, laktam), 3109, 3079 (C-H gerilim, aromatik), 1723 (C=O gerilim, laktam), 1475 (C=N gerilim, tiyazol) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) 8,173 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,06 (d, 2H, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$), 7,95 (d, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$= 1,6 Hz), 7,90 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,4}$= 7,6 Hz ve $J_{5,7}$= 1,6 Hz), 7,60 (d, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 7,18 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8,4 Hz) ppm'de pikleri görülür.

Elementel analiz $C_{16}H_9ClN_2O_2S$ M.A. 328,77

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	58,45	2,76	8,52	9,75
Bulunan	58,36	2,79	8,62	9,63

4.1.6 6-[2-(4-Metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 6)



2,56 gr (0,01 mol) 6-(2-bromoasetil) -2-okso-3*H*-benzoksazol ve 1,837 gr (0,011 mol) 4-metoksitiyobenzamitten 25 ml diglim içinde genel sentez yöntemlerinde verildiği şekilde sentezlendi. Doksan dakika sonunda ürün çöktü. Suyla tamamen çöktürülüp süzülerek izole edildi. Metanolden kristallendirilerek temizlendi. Kristal verimi 0,64 g'dir (%19,8).

Parlak beyaz toz kristallerdir. Erime derecesi 255 °C'dir. Asetonitril ve asetonda az çözünür. Etanol, metanol, 1-bütanol, etil asetat, asetonda sıcakta çözünür. Siklohekzanda çözünmez.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,19; 0,50; 0,88'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde açık kahverengi renk verir.

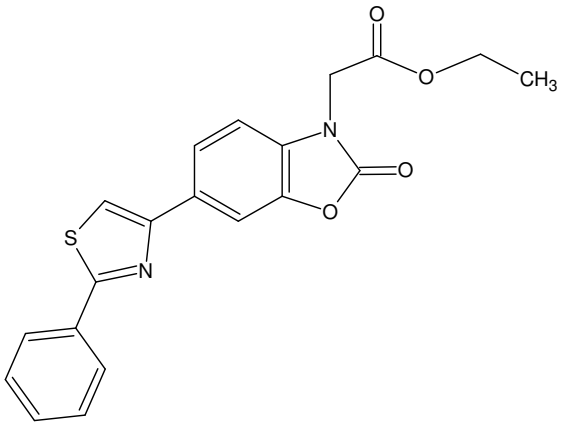
IR spektrumunda 3491 (N-H gerilim, laktam), 3114 (C-H gerilim, aromatik), 1760 (C=O gerilim, laktam), 1482 (C=N gerilim, tiyazol), 1254 (C-O gerilim), cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) δ 11,8 (s, 1H, -NH), 8,05 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 7,98- 7,96 (d, 2H, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$), 7,94 (d, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$= 1,2 Hz), 7,89 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,4}$= 8 Hz ve $J_{5,7}$= 1,6 Hz), 7,17 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8,4 Hz) 7,10 - 7,073 (d, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 3,84 (s, 3H, Φ-O-C$\underline{H_3}$) ppm'de pikleri görülür.

Elementel analiz $C_{17}H_{12}N_2O_3S$ M.A. 324,36

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	62,95	3,73	8,64	9,89
Bulunan	62,46	3,79	8,68	9,78

4.1.7 Etil 2-[6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 7)



1 gr (0,0034 mol) 6-[(2-fenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol, 0,085 gr (0,00369 mol) metalik sodyum, 0,75 ml (0,0068 mol) etil bromoasetat ile absolü etanol içinde genel sentez yöntemine uygun olarak elde edildi. Reaksiyon doksan dakika sonunda tamamlandı. Reaksiyon ortamında oluşan çökelek süzülerek alındı. Etanolden kristallendirildi. Verim 0,79 g'dır (%61,2).

Sarı renkte pamuksu kristallerdir. Erime noktası 179 °C'dir. Aseton ile çözünür. Metanol ile az çözünür.

Sarı renkte pamuksu kristallerdir. Erime derecesi 179 °C'dir. Asetonda çözünür. Metanolde az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,49; 0,83; 0,88'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteci ile sarı zeminde açık kahverengine boyanır.

IR spektrumunda 3095 (C-H gerilim, aromatik), 2985 (C-H gerilim, alifatik), 1770 (C=O gerilim, laktam) ve 1740 (C=O gerilim, ester), 1482 (C=N gerilim, tiyazol), 1391, 1369 (C-H deformasyon, alifatik), 1226 (C-O gerilim, ester) cm^{-1}'de bandlar görülür.

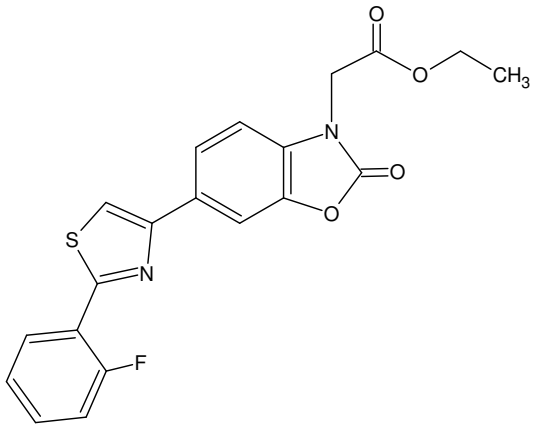
^{1}H-NMR spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8,18 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,06–8,02 (m, 3H, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$ ve benzoksazol H^7), 7,97 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,7}$= 1,6 Hz ve $J_{5,4}$= 8 Hz), 7,56–7,5 (m, 3H, fenil $H^{3''}$, $H^{4''}$, $H^{5''}$), 7,42 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8,4 Hz), 4,81 (s, 2H, -N-C$\underline{H_2}$-CO-), 4,19 (q, 2H, -COO-C$\underline{H_2}$-), 1,22 (t, 3H, -CH_2-C$\underline{H_3}$) ppm'de pikler görülür.

.

Elementel analiz $C_{20}H_{16}N_2O_4S$ M.A. 380,42

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	63,14	4,24	7,36	8,43
Bulunan	62,90	4,31	7,30	8,48

4.1.8 Etil 2-[6-(2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il] asetat (Bileşik 8)



1,9 gr (0,00608 mol) 6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol, 0,154 gr (0,00669 mol) metalik Na ve 1,35 ml (0,0121 mol) etil bromoasetat ile absolü etanol içinde genel sentez yöntemine uygun olarak elde edildi. Reaksiyon süresi 4,5 saattir. Su ilavesiyle çöken ürün, süzülerek alındı ve etanolden kristallendirildi. Kristal verimi 1,63 g'dır (%67,4).

Parlak sarı renkli iğne şeklinde kristallerdir. Erime derecesi 189 °C'dir. Kloroform ve asetonda çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,48; 0,83; 0,89'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde kahverengi renk verir.

IR spektrumunda 3100 (C-H gerilim, aromatik), 2980 (C-H gerilim, alifatik), 1774 (C=O gerilim, laktam) ve 1732 (C=O gerilim, ester), 1478 (C=N gerilim, tiyazol), 1370 (C-H deformasyon, alifatik), 1229 (C-O gerilim, ester) cm^{-1}'de bandlar görülür.

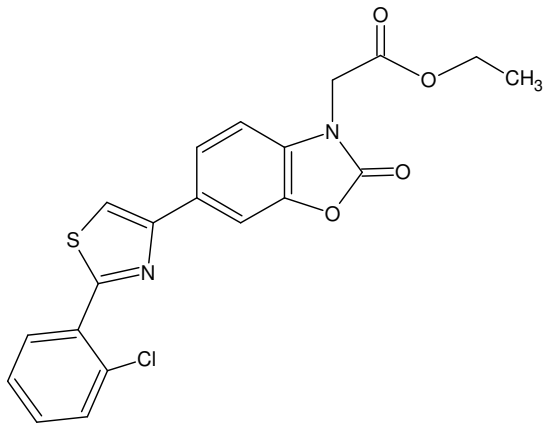
^{1}H-NMR spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8,39 (t, 1H, fenil $H^{4''}$), 8,30 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,08 (d, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$ = 1,6 Hz), 7,99 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,7}$= 1,6 Hz ve $J_{5,4}$= 8,4 Hz), 7,59–7,52 (m, 1H, fenil $H^{6''}$), 7,47–7,37 (m, 3H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$ ve benzoksazol H^4), 4,80 (s, 2H,

-N-C<u>H</u>$_2$-CO-), 4,18 (q, 2H,-COO-C<u>H</u>$_2$-), 1,21 (t, 3H, -CH$_2$-C<u>H</u>$_3$) ppm'de pikleri görülür.

Elementel analiz $C_{20}H_{15}FN_2O_4S$ M.A.398,41

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	60,29	3,79	7,03	8,05
Bulunan	60,11	3,80	7,14	8,03

4.1.9 <u>Etil 2-[6-(2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 9)</u>



0,38 gr (0,00156 mol) 6-(2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol, 0,029 gr (0,00127 mol) metalik sodyum ve 0,26 ml (0,00231 mol) etil bromoasetat kullanılarak genel sentez yöntemine uygun olarak sentezlendi. Reaksiyon süresi iki saattir. Su ile ürün çöktürüldü ve süzülerek izole edildi. Etanolden kristallendirildi. Kristal verimi 0,31 g'dır (%64,7).

Beyaz toz şeklinde kristallerdir. Erime noktası 180 °C'dir. Asetonda çözünür, etanol ve 2-propanolda sıcakta çözünür. Siklohekzanda çözünmez.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,48; 0,84; 0,88'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde kahverengiye boyanır.

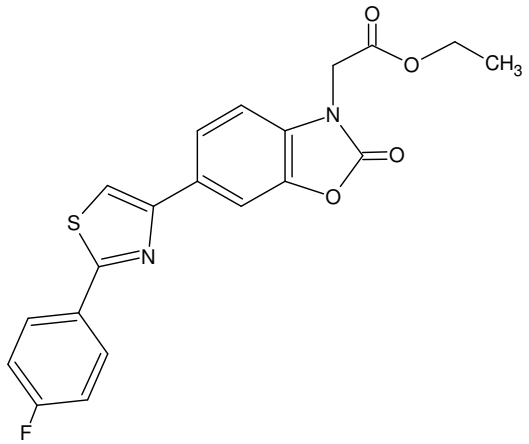
IR spektrumunda 3098 (C-H gerilim, aromatik), 2983 (C-H gerilim, alifatik), 1772 (C=O gerilim, laktam), 1734 (C=O gerilim, ester), 1476 (C=N gerilim, tiyazol), 1370 (C-H deformasyon, alifatik), 1227 (C-O gerilim, ester) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8,38–8,32 (m, 2H, fenil $H^{4''}$ ve tiyazol $H^{5'}$), 8,06 (s, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$ =1,6 Hz), 7,98 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,7}$= 1,6 Hz ve $J_{5,4}$= 8 Hz), 7,68–7,64 (m, 1H, fenil $H^{6''}$), 7,56–7,50 (m, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 7,42 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8,4 Hz), 4,80 (s, 2H, -N-C$\underline{H}_2$-CO-), 4,18 (q, 2H, -COO-C$\underline{H}_2$-), 1,21 (t, 3H, -CH_2-C$\underline{H}_3$) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz $C_{20}H_{15}ClN_2O_4S$ M.A. 414,86

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	57,90	3,64	6,75	7,73
Bulunan	57,72	3,71	6,71	7,80

4.1.10 Etil 2-[6-(2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 10)



1,86 gr (0,0059 mol) 6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol, 0,150 gr (0,00655 mol) metalik sodyum ve 1,32 ml (0,01119 mol) etil bromoasetat ile absolü etanol içinde genel sentez yöntemine uygun olarak elde edildi. Reaksiyon süresi iki saattir. Reaksiyon ortamında çöken ürün süzülerek alındı, 2-propanolden kristallendirildi. Kristal verimi 0,5 g'dır (%22,72).

Sarı renkli toz şeklinde kristallerdir. Erime derecesi 184 °C'tir. Aseton ve kloroformda çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,46; 0,82; 0,89'dur. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde koyu kahverengi renk verir.

IR spektrumunda 3097 (C-H gerilim, aromatik), 2982 (C-H gerilim, alifatik), 1764 (C=O gerilim, laktam) ve 1743 (C=O gerilim, ester), 1485 (C=N gerilim, tiyazol), 1372 (C-H deformasyon, alifatik), 1230 (C-O gerilim, ester) cm^{-1}'de bandlar görülür.

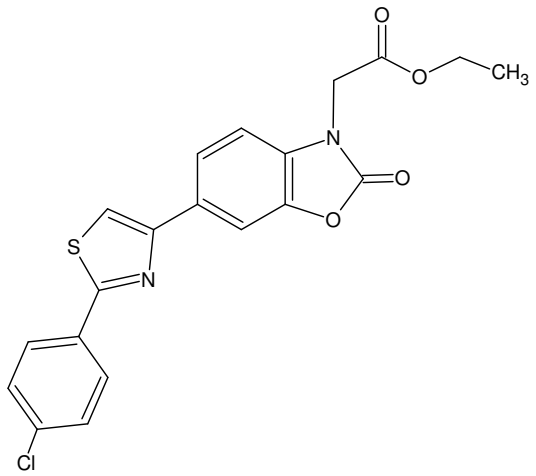
^{1}H-NMR spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8,17 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,08 (2H, dd, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$), 8,04 (d, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$ = 1,2 Hz), 7,96 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,7}$= 1,2 Hz ve $J_{5,4}$= 8,4 Hz), 7,44–7,33 (m,

3H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$, benzoksazol H^4), 4,81 (s, 2H, -N-C<u>H</u>$_2$-CO-), 4,19 (q, 2H, -COO-C<u>H</u>$_2$-), 1,22 (t, 3H, -CH$_2$-C<u>H</u>$_3$) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz $C_{20}H_{15}FN_2O_4S$ M.A. 398,41

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	60,29	3,79	7,03	8,05
Bulunan	60,17	4,01	7,01	8,12

4.1.11 <u>Etil 2-[6-(2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 11)</u>



0,5 gr (0,00152 mol) 6-(2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol, 0,038 gr (0,00167 mol) metalik sodyum ve 0,34 ml (0,00304 mol) etil bromoasetat ile genel sentez yömtemine uygun olarak elde edildi. Reaksiyon süresi 2,5 saattir. Süre sonunda ürün su ilavesiyle çöktürüldü, süzüldü ve etanolden kristallendirildi. Kristal verimi 0,26 g'dır (%41,3).

Sarı toz şeklinde renkli kristallerdir. Erime derecesi 181 °C'dir. Kloroformda çözünür, etanol ve 2-propanolde sıcakta çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,47; 0,83; 0,89'dir. UV ışığında 254

nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde koyu kahverengi renk verir.

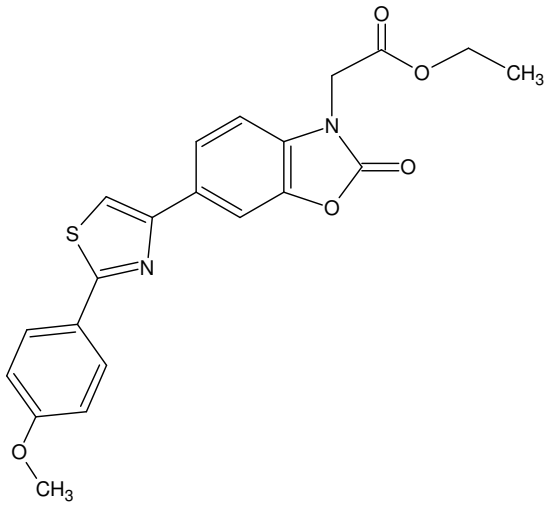
IR spektrumunda, 3125 ve 3080 (C-H gerilim, aromatik), 2980 (C-H gerilim, alifatik), 1769 (C=O gerilim, laktam) ve 1732 (C=O gerilim, ester), 1479 (C=N gerilim, tiyazol), 1413 (C-H deformasyon, alifatik), 1244 (C-O gerilim, ester) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8,20 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,07–8,02 (m, 3H, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$ ve benzoksazol H^{7}), 7,95 (dd, 1H, benzoksazol H^{5} $J_{5,4}$= 8,4 Hz ve $J_{5,7}$= 1,6 Hz), 7,58 (d, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 7,40 (d, 1H, benzoksazol H^{4} $J_{4,5}$= 8,8 Hz), 4,80 (s, 2H, -N-$\underline{CH_2}$-CO-), 4,18 (q, 2H, -COO-$\underline{CH_2}$-), 1,21 (t, 3H, -CH_2-$\underline{CH_3}$) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz $C_{20}H_{15}ClN_2O_4S$ M.A. 414,86

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	57,90	3,64	6,75	7,73
Bulunan	57,93	3,56	6,88	7,73

4.1.12 Etil 2-[6-(2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 12)



1,185 gr (0,00365 mol) 6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol, 0,092 gr (0,004015 mol) metalik sodyum ve 0,80 ml (0.0073 mol) etil bromoasetat ile absolü etanol içinde genel sentez yöntemine uygun olarak elde edildi. Reaksiyon süresi beş saattir. Su ilavesiyle ürün çöktürüldü, süzüldü, 2-propanolden kristallendirildi. Verim 0,86 g'dır (%57,5).

Sarı renkte parlak toz görünümlü kristallerdir. Erime derecesi 157-158 °C'dir. Aseton, asetonitril, eter, kloroformda çözünür. Siklohekzanda çözünmez. 2-propanol ve etanolde sıcakta çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, Ç-1, Ç-2, Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,41; 0,82; 0,88'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorf belirteçi ile sarı zeminde kahverengi renk verir.

IR spektrumunda 3145, (C-H gerilim, aromatik), 2980, 2950, (C-H gerilim, alifatik), 1781 (C=O gerilim, laktam) ve 1731 (C=O gerilim, ester), 1488 (C=N gerilim, tiyazol), 1391 (C-H deformasyon, alifatik), 1247-1026 (C-O gerilim, $-OCH_3$ ve ester) cm^{-1}'de bandlar görülür.

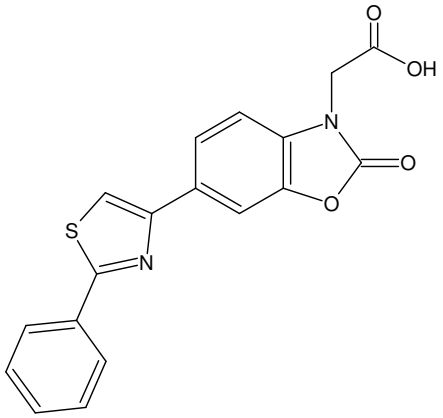
^{1}H-NMR spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8,06 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,02 (d, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$ =1,2 Hz), 7,98–7,92 (m, 3H, benzoksazol H^5 ve fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$), 7,40 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8 Hz), 7,06 (d, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 4,80 (s, 2H, -N-C$\underline{H_2}$-CO-), 4,18 (q, 2H, -COO-C$\underline{H_2}$-), 3,82 (s, 3H, Φ-O-C$\underline{H_3}$) 1,209 (t, 3H, -O-CH_2-C$\underline{H_3}$) ppm'de pikler görülür.

.

Elementel analiz $C_{21}H_{18}N_20_5S$ M.A. 410,44

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	61,45	4,42	6,83	7,81
Bulunan	61,73	4,48	6,98	7,87

4.1.13 2-[6-(2-Fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 13)



1,765 gr (0,006 mol) 6-[(2-fenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol, 0,92 gr (0,0066 mol) bromoasetik asit ve 0,30 gr (0,013 mol) metalik sodyumdan genel sentez yönteminde verildiği şekilde sentezlendi. Asetonitril ile kristallendirildi. Kristal verimi 0,54 g'dır (%25,5).

Beyaz renkli toz kristallerdir. Erime derecesi 288 °C'dir. Suda çözünmez, asetik asit, asetonitril ve etanolde sıcakta çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,02 ve 0,87'dir. UV ışığında 254

nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

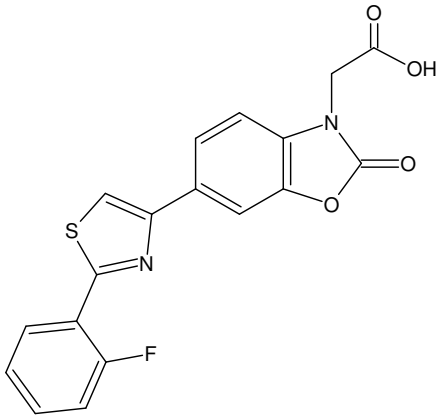
IR spektrumunda 3090-2500 (O-H gerilim, karboksilli asit), 3090 (C-H gerilim, aromatik) 2986, 2940 (C-H gerilim, alifatik), 1758 (C=O gerilim, laktam) ve 1730 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1486 (C=N gerilim, tiyazol), 1209 (C-O-C gerilim, karboksilli asit) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8,17 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,06–8,02 (m, 3H, benzoksazol H^{7} ve fenil H2", H6"), 7,97 (dd, 1H, benzoksazol H^{5} $J_{5,7}$=1,6 Hz ve $J_{5,4}$= 8 Hz), 7,56–7,50 (m, 3H, fenil $H^{3"}$, $H^{4"}$, $H^{5"}$), 7,42 (d, 1H, benzoksazol H^{4} $J_{4,5}$= 8,4 Hz), 4,69 (s, 2H, -N-C<u>H_2</u>COOH) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz $C_{18}H_{12}N_2O_4S$ M.A. 352,36

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	61,35	3,43	7,95	9,10
Bulunan	61,31	3,40	8,05	9,16

4.1.14 <u>2-[6-(2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il] asetik asit (Bileşik 14)</u>



0,55 gr (0,00138 mol) etil 2-[6-(2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat ve %37'lik 15 ml HCl'den genel

sentez yöntemlerine verilen 1. yönteme göre sentezlendi. Reaksiyon bitimine İTK sonucu göz önüne alınarak karar verildi. Su ilavesiyle çökelek miktarı artırılıp süzüldü, asetik asitten kristallendirildi. Kristal verimi 0,26 g'dir (%50,9).

Beyaz renkli toz kristallerdir. Erime derecesi 283-284 °C'dir. Suda çözünmez, aseton, asetonitril ve asetik asitte az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,02 ve 0,86'dır. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

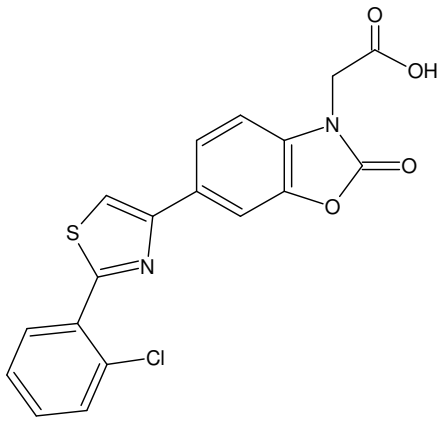
IR spektrumunda 3200 – 2500 (O-H gerilim, karboksilli asit), 3107 (C-H gerilim, aromatik), 2983, 2941 (C-H gerilim, alifatik), 1765 (C=O gerilim, laktam), 1740 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1484 (C=N gerilim, tiyazol), 1202 (C-O-C gerilim, karboksilli asit) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) δ 8,39 (t, 1H, fenil $H^{4''}$), 8,29 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,06 (d, 1H, benzoksazol H^{7} $J_{7,5}$= 1,2 Hz), 7,98 (dd, 1H, benzoksazol H^{5} $J_{5,4}$=8,4 Hz ve $J_{5,7}$= 1,6 Hz), 7,59 -,7,52 (m, 1H, fenil $H^{6''}$), 7,48–7,36 (m, 3H, benzoksazol H^{4} ve fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 4,69 (s, 2H, -N-C$\underline{H_2}$COOH) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz $C_{18}H_{11}FN_2O_4S$ M.A. 370,36

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	58,37	2,99	7,56	8,66
Bulunan	58,21	3,19	7,54	8,70

4.1.15 2-[6-(2-(2-Klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il] asetik asit (Bileşik 15)



0,94 gr (0,0028 mol) 6-[(2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol, 0,778 gr (0,0056 mol) bromoasetik asit ve 0,212 gr (0,00924 mol) metalik sodyumdan genel sentez yöntemlerinden 2. yönteme uygun olarak sentezlendi. Reaksiyon ince tabaka kromatografisinden edinilen bilgi doğrultusunda sonlandırıldı. Asetonitril - asetik asit karışımından kristallendirildi. Kristal verimi 0,283 g'dır (%26,2).

Beyaz renkli toz kristallerdir. Erime derecesi 266-267 °C'dir. Metanol, etil asetat, asetik asitte sıcakta çözünür. Etanol, asetonitril, asetonda çözünmez.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,02 ve 0,86'dır. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

IR spektrumunda 3516 - 2400 (O-H gerilim, karboksilli asit), 3126 (C-H gerilim, aromatik), 2940 (C-H gerilim, alifatik), 1765 (C=O gerilim, laktam), 1727 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1490, 1477 (C=N gerilim, tiyazol), 1214 (C-O gerilim, karboksilli asit) cm^{-1}'de bandlar görülür.

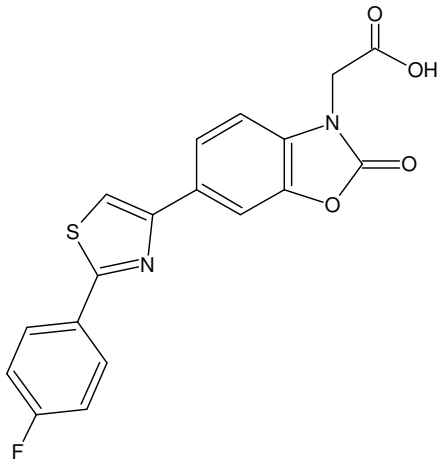
^{1}H-NMR spektrumunda (DMSO-d_6) δ 8,40–8,36 (m, 2H, fenil $H^{4''}$, 8,35 s, tiyazol $H^{5'}$), 8,07 (d, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$ =1,2 Hz), 7,99 (dd, 1H, benzoksazol H^5 $J_{5,7}$=1,2 Hz ve $J_{5,4}$= 8,2 Hz), 7,70 – 7,65 (m, 1H, fenil

$H^{6''}$), 7,58–7,52 (m, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 7,43 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8,4 Hz), 4,69 (s, 2H, -N-C<u>H_2</u>COOH) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz $C_{18}H_{11}ClN_2O_4S$ M.A. 386,81

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	55,89	2,87	7,24	8,29
Bulunan	55,50	2,866	7,369	8,229

4.1.16 <u>2-[6-(2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il] asetik asit (Bileşik 16)</u>



1,16 gr (0,0029 mol) etil 2-[6-(2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat ve 30 ml %37'lik HCl genel sentez yöntemlerinde verilen 1. yönteme uygun olarak sentezlendi. Reaksiyon bitimine İTK sonucu göz önüne alınarak karar verildi. Su ilavesiyle çökelek miktarı artırılıp süzüldü, asetik asitten kristallendirildi. Kristal verimi 0,707 g'dır (%65,6).

Beyaz renkli toz şeklinde kristallerdir. Erime derecesi 315 °C'dir. Suda çözünmez, asetonitril, aseton ve asetik asitte sıcakta çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,02 ve 0,86'dır. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

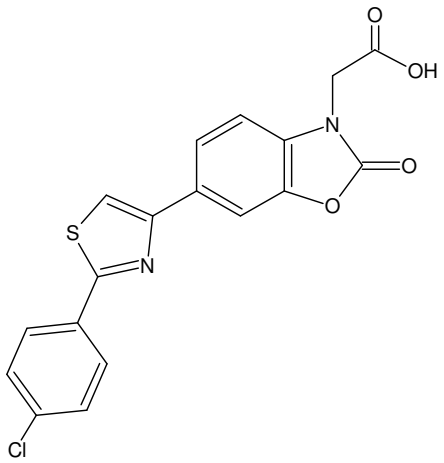
IR spektrumunda 3200 – 2500 (O-H gerilim, karboksilli asit), 3090 (C-H gerilim, aromatik), 2997 (C-H gerilim, alifatik), 1759 (C=O gerilim, laktam), 1730 (C=O gerilim, karboksilli asit laktam), 1486 (C=N gerilim, tiyazol), 1211 (C-O gerilim, karboksilli asit) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) δ 8,20 – 7,95 (t, 5H, tiyazol $H^{5'}$, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$, benzoksazol H^5, benzoksazol H^7), 7,48–7,32 (m, 3H, benzoksazol H^4, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 4,71 (s, 2H, -N-C$\underline{H_2}$COOH) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz $C_{18}H_{11}FN_2O_4S$ M.A. 370,36 gr

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	58,37	2,99	7,56	8,66
Bulunan	58,22	3,20	7,59	8,66

4.1.17 2-[6-(2-(4-Klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il] asetik asit (Bileşik 17)



0,92 gr (0,0028 mol) 6-(2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol, 0,427 gr (0,00308 mol) bromoasetik asit ve 0,148 gr (0,00647 mol) metalik sodyum kullanarak genel sentez yöntemlerinden 2. yönteme uygun olarak sentezlendi. Reaksiyon İTK'dan edinilen bulguya göre su ilavesiyle çöktürülerek sonlandırıldı. Ürün süzülerek izole edildi ve asetik asitten kristallendirildi. Kristal verimi 0,107 g'dır (%9,9).

Beyaz renkli toz görünümlü kristallerdir. Erime derecesi 296 °C'dir. Suda çözünmez, aseton ve asetonitrilde az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,02 ve 0,87'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

IR spektrumunda 3100 – 2500 (O-H gerilim, karboksilli asit), 3088 (C-H gerilim, aromatik), 2989, 2923 (C-H gerilim, alifatik), 1760 (C=O gerilim, laktam), 1732 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1483 (C=N gerilim, tiyazol), 1203 (C-O gerilim, karboksilli asit) cm^{-1}'de bandlar görülür.

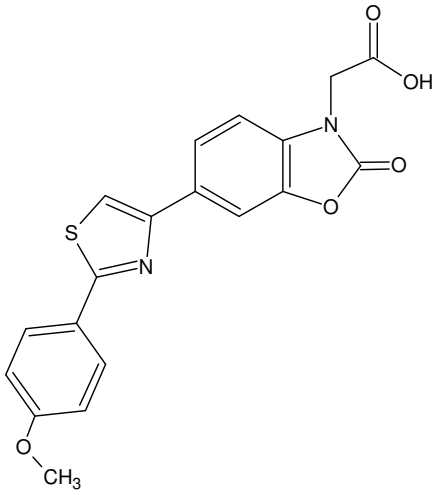
^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) δ 8,22 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,10–8,05 (t, 3H, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$, 2-okso-3*H*-benzoksazol H^{7}), 7,97 (d, 1H, benzoksazol H^{5} $J_{5,4}$= 8 Hz), 7,61 (d, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 7,42 (d, 1H,

benzoksazol H^4 $J_{4,5}$ = 8,4 Hz), 4,67 (s, 2H, -N-C<u>H$_2$</u>COOH) ppm'de pikleri görülür.

Elementel analiz $C_{18}H_{11}ClN_2O_4S$ M.A. 386,81 gr

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	55,89	2,87	7,24	8,29
Bulunan	55,53	2,87	7,29	8,25

4.1.18 <u>2-[6-(2-(4-Metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 18)</u>



710 mg (0,01072 mol) etil 2-[6-(2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat ve 25 ml %37'lik HCl içinde genel sentez yönteminde verildiği sentezlendi. Reaksiyon süresi 30 dakikadır. Reaksiyon ortamında çöken ürün su ilavesinden sonra süzüldü, asetik asitten kristallendirildi. Kristal verimi 0,32 g'dır (%48,4).

Beyaz renkli toz görünümlü kristallerdir. Erime derecesi 259-260 °C'dir. Metanol, eter, siklohekzanda çözünmez, asetonitrilde sıcakta çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde Ç-2 ve Ç-3 çözücü sistemlerinde Rf değerleri sırasıyla 0,02 ve 0,87'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

IR spektrumunda 3200 – 2500 (O-H gerilim, karboksilli asit), 3087 (C-H gerilim, aromatik), 2934, 2938 (C-H gerilim, alifatik), 1761 (C=O gerilim, laktam), 1740 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1486 (C=N gerilim, tiyazol), 1254 (C-O gerilim, $-O-CH_3$) cm^{-1}'de bandlar görülür.

^{1}H-NMR spektrumunda, (DMSO-d_6) δ 8,06 (s, 1H, tiyazol $H^{5'}$), 8,01 (d, 1H, benzoksazol H^7 $J_{7,5}$= 1,2 Hz), 7,98–7,92 (m, 3H, fenil $H^{2''}$, $H^{6''}$, benzoksazol H^5), 7,39 (d, 1H, benzoksazol H^4 $J_{4,5}$= 8 Hz), 7,06 (d, 2H, fenil $H^{3''}$, $H^{5''}$), 4,7 (s, 2H, -N-C$\underline{H_2}$COOH), 3,8 (s, 3H, Φ-O-C$\underline{H_3}$) ppm'de pikler görülür.

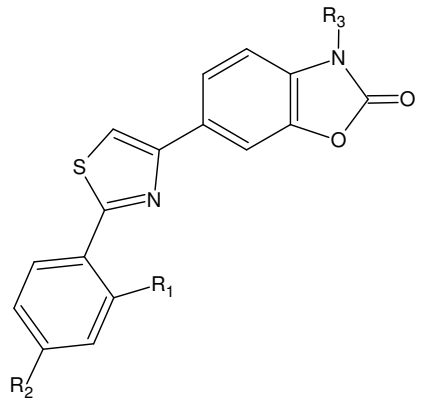
Elementel analiz $C_{19}H_{14}N_2O_5S$ M.A. 382,39

	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	59,68	3,69	7,33	8,39
Bulunan	59,62	3,61	7,44	8,45

4.2 Biyolojik Aktivite Çalışması

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 inhibitör aktivite sonuçları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 inhibitör aktivite testi sonuçları



Bileşik No	R_1	R_2	R_3	% B/B_o	TxB_2 pg/ml	% COX-1 İnhibisyonu
1	H	H	H	10,741	2758	0
2	F	H	H	10,742	2782,5	0
3	Cl	H	H	11,765	2363,5	0
4	H	F	H	9,975	3082	0
5	H	Cl	H	11,573	2510,5	0
6	H	OCH_3	H	11,637	2407,5	0
7	H	H	$CH_2CO_2C_2H_5$	9079	8555	0
8	F	H	$CH_2CO_2C_2H_5$	12,468	2157	3,96
9	Cl	H	$CH_2CO_2C_2H_5$	12,915	2076,5	7,54
10	H	F	$CH_2CO_2C_2H_5$	13,683	1874,5	16,54
11	H	Cl	$CH_2CO_2C_2H_5$	14,962	1631	27,38
12	H	OCH_3	$CH_2CO_2C_2H_5$	15,409	1571	30,05

Tablo 12' nin devamı.

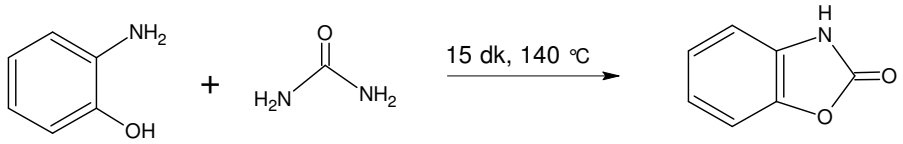
13	H	H	CH_2COOH	11,189	2555	0
14	F	H	CH_2COOH	11,189	2609,5	0
15	Cl	H	CH_2COOH	11,829	2395	0
16	H	F	CH_2COOH	12,155	2234	0
17	H	Cl	CH_2COOH	12,021	2379	0
18	H	OCH_3	CH_2COOH	12,340	2285	0
SC-560				91,432	0	100
KAN				12,148	2246	0

Bileşiklerde anlamlı bir COX-2 inhibitör aktivite saptanamamıştır.

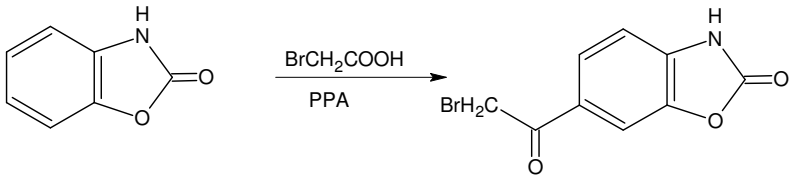
5. TARTIŞMA

Çalışmamızda altı tanesi 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol–4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol yapısında, altı tanesi 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzotiyazol-3-il]asetik asit yapısında ve 6 tanesi de etil 2-[6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat yapısında 18 adet madde sentezlenmiş olup bunlardan 16 tanesi orijinal, 6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 4) ve 6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 6) ise orijinal değildir. Sentezlenen bu 18 bileşiğinin yapıları kanıtlanmış COX-1 ve COX-2 inhibitör etkinlikleri açısından *in vitro* enzim deneyleri ile değerlendirmeleri yapılmıştır.

Bileşiklerin sentezine başlagıç maddesi olan 2-okso-3*H*-benzoksazolün sentezi ile başlanmıştır. 2-Aminofenol ve üreden mikrodalga ışınımıyla solvansız ortamda 15 dakikada sentez gerçekleştirilmiştir.



2-Okso-3*H*-benzoksazol ve bromoasetik asidin PPA varlığında mikrodalga reaktöründe tepkimesi sonucu ise 6-(2-bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol elde edilmiştir. Bu reaksiyonun yağ banyosunda PPA içerisinde yapılması sıcaklığın kontrolünü güçleştirmekte, verimi düşürmekte ve yan ürün oluşumunu arttırmaktadır.

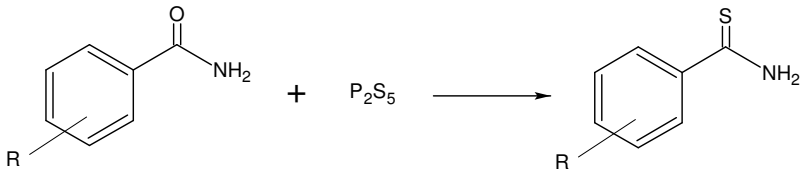


1. basamak = 300 watt, 35 dk, 0 – 110 °C

2. basamak = 300 watt, 25 dk, 110 °C

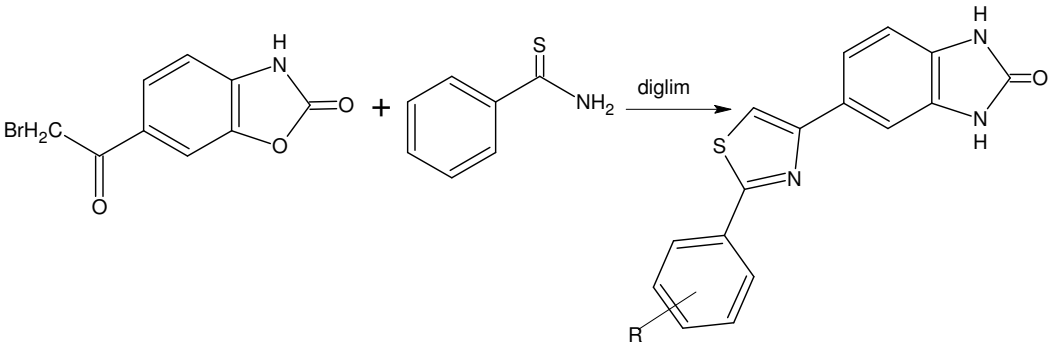
Tiyobenzamit türevleri (2-klorotiyobenzamit, 2-florotiyobenzamit, 4-klorotiyobenzamit, 4-florotiyobenzamit), ilgili

benzamit türevinin fosfor pentasülfür ile benzen içinde kalsiyum klorür tüpü takılmış geri çeviren soğutucu altında ısıtılması ile elde edilmiştir.



R = 2- F, 2-Cl, 4-F, 4-Cl

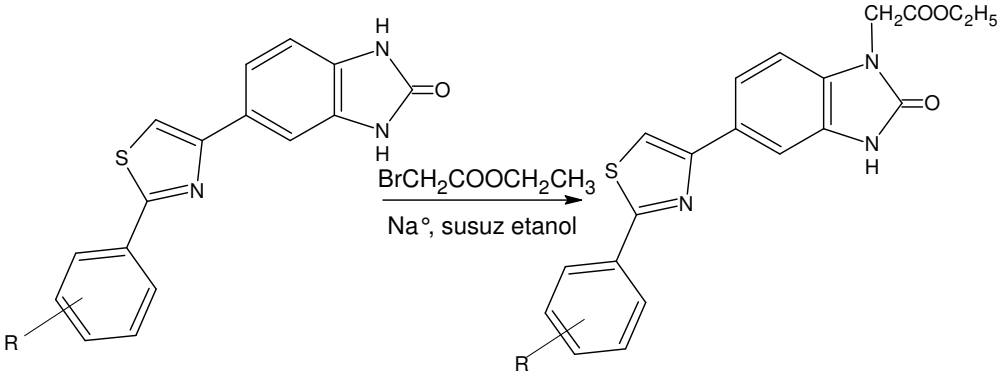
6-(2-Bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazol uygun tiyobenzamit türevleri ile diglim içerisinde oda ısısında reaksiyona sokulmuş ve 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevleri elde edilmiştir.



R = H, 2- F, 2-Cl, 4-F, 4-Cl, 4-OCH_3

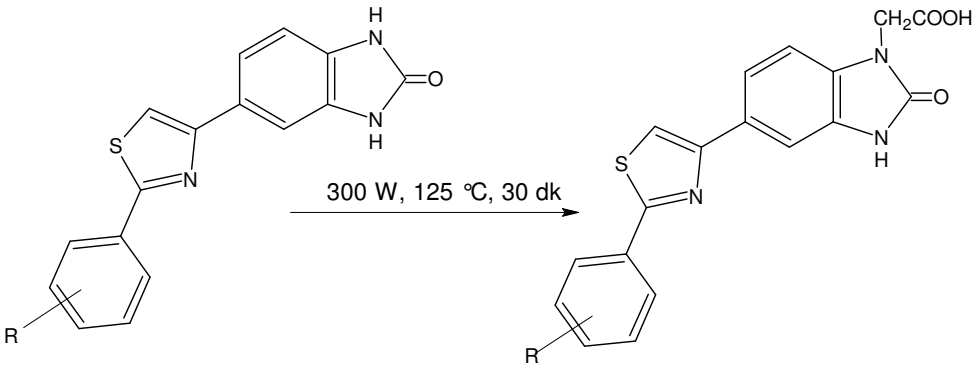
Bu maddelerden 6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 4) ve 6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik 6) Scifinder Scholar taramaları sonucunda sırasıyla 876863-98-8 ve 924472-45-7 numaraları ile kayıtlı bulunmuştur. Bu iki türevin Aurora Screening Library, Enamine Screening Library ve Ambinter Stock Screening Collection firmaları tarafından satıldığı belirlenmiş ancak erime derecelerine literatür taramaları ve satıcı firmalarla yapılan yazışmalar sonucunda dahi erişilememiştir.

Sentezlenen 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin susuz etanol içerisinde metalik sodyum ile tuzları hazırlanmış ve etil bromoasetat ile susuz alkol içinde tepkimesinden etil [6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat türevleri elde edilmiştir.



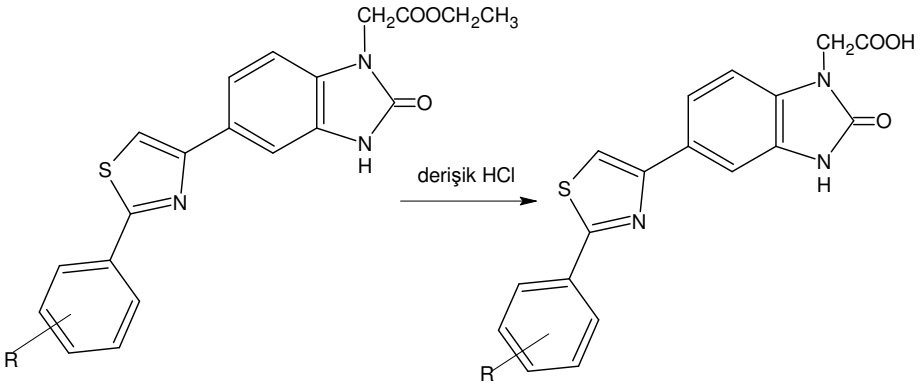
R = H, 2- F, 2-Cl, 4-F, 4-Cl, 4-OCH_3

6-(2-Sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit türevlerinin hazırlanmasında iki farklı yöntem uygulanmıştır. İlk yöntemde, 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin sodyum tuzları hazırlanmış ve oluşan sodyum tuzlarının bromoasetik asit ile DMF içerisinde mikrodalga reaktöründe tepkimesi sonucu [6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit türevleri elde edilmiştir.



R = H, 2-Cl, 4-Cl

Bu yöntemde verimin düşük olması nendeniyle etil [6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat türevlerinin ester grubu asidik ortamda hidroliz edilerek [6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit türevleri elde edilmiştir. Bu yöntemde nükleofil aynı olduğu için reaktifin gücünün arttırılması yoluna gidilmiş ve bromoasetik asit yerine etil bromoasetat kullanılmıştır.



R = 2-F, 4-F, 4-OCH_3

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

Elde edilen 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin IR spektrumlarında, amit grubuna ait NH gerilim bantları 3491-3173 cm^{-1}'de, aromatik CH gerilim bantları 3110-3079 cm^{-1}'de, C=O bandları 1789-1722 cm^{-1}'de, tiyazol halkasına ait C=N gerilim bantları 1482-1473 cm^{-1}'de gözlenmiştir.

Bileşiklerin DMSO-d_6 içinde alınan ^{1}H-NMR spektrumlarında 11,8 ppm'de NH, 8,31-8,05 ppm tiyazol $H^{5'}$, 7,99-7,92 ppm benzoksazol H^7 ve 7,93-7,46 ppm benzoksazol H^5 ve 7,19-7,15 ppm benzoksazol H^4 protonlarına ait sinyaller görülmüştür.

Elde edilen etil [6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat türevlerinin IR spektrumlarında, aromatik CH gerilim bantları 3145-3095 cm^{-1}'de, alifatik CH gerilim bantları 2985-2950 cm^{-1}'de, laktam halkasına ait C=O gerilim bantları 1781-1764 cm^{-1}'de, ester C=O gerilim bandları 1743-1731 cm^{-1}'de, tiyazol halkasına ait C=N gerilim bantları 1488-1476 cm^{-1}'de, alifatik C-H deformasyon bandları 1391-1369 cm^{-1}'de, ester C-O gerilim bandları 1247-1227 cm^{-1}'de gözlenmiştir.

Bileşiklerin DMSO-d_6 içinde alınan ^{1}H-NMR spektrumlarında 8,38-8,06 ppm arası tiyazol $H^{5'}$, 8,08-8,02 ppm benzoksazol H^7, 7,99-7,95 ppm benzoksazol H^5, 7,47-7,42 ppm benzoksazol H^4, 4,81-4,18 ppm NH-

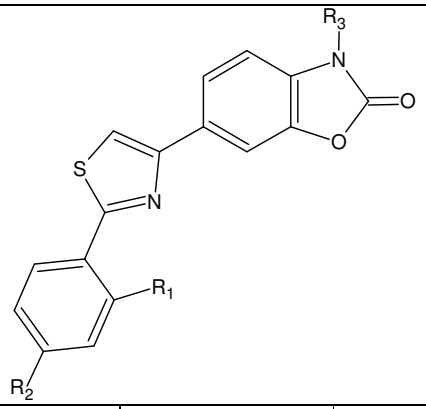
$C\underline{H_2}$-CO, 4,19-3,82 ppm CO-$C\underline{H_2}$-CH_3, 1,22-1,21 ppm -CH_2-$C\underline{H_3}$ protonlarına ait sinyaller görülmüştür.

Elde edilen [6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit türevlerinin IR spektrumlarında, OH gerilim bandı 3516-2400 cm^{-1}'de, aromatik C-H gerilim bandı 3126-3087 cm^{-1}'de, alifatik C-H gerilim bantları 2997-2923 cm^{-1}'de, laktam halkasına ait C=O gerilim bantları 1765-1758 cm^{-1}'de, karboksilli asit C=O gerilim bandları 1740-1727 cm^{-1}'de, tiyazol halkasına ait C=N gerilim bantları 1486-1477 cm^{-1}'de, karboksilli asit C-O gerilimi 1254-1202 cm^{-1}'de gözlenmiştir.

Bileşiklerin DMSO-d_6 içinde alınan ^{1}H-NMR spektrumlarında 8,40-8,06 ppm arası tiyazol $H^{5'}$, 8,10-8,009 ppm benzoksazol H^7, 7,99-7,92 ppm benzoksazol H^5, 7,43-7,32 ppm benzoksazol H^4, 4,71-4,69 ppm -$C\underline{H_2}$COOH 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-560 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 İnhibisyonu	% COX-2 İnhibisyonu
1	H	H	H	0	0
2	F	H	H	0	0
3	Cl	H	H	0	0
4	H	F	H	0	0
5	H	Cl	H	0	0
6	H	OCH_3	H	0	0
7	H	H	$CH_2CO_2CH_2CH_3$	0	0
8	F	H	$CH_2CO_2CH_2CH_3$	3,96	0
9	Cl	H	$CH_2CO_2CH_2CH_3$	7,54	0
10	H	F	$CH_2CO_2CH_2CH_3$	16,54	0
11	H	Cl	$CH_2CO_2CH_2CH_3$	27,38	0
12	H	OCH_3	$CH_2CO_2CH_2CH_3$	30,05	0
13	H	H	CH_2COOH	0	0
14	F	H	CH_2COOH	0	0
15	Cl	H	CH_2COOH	0	0
16	H	F	CH_2COOH	0	0
17	H	Cl	CH_2COOH	0	0

Tablo 13' ün devamı.

18	H	OCH_3	CH_2COOH	0	0
SC-560				**100**	-
DuP-697				-	**100**
KAN				0	0

Bileşik 1-7 ve 13-17'nin COX-1 ve COX-2 üzerine inhibitör etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Ayrıca sentezi gerçekleştirilen bileşiklerde yapılan *in vitro* COX-2 analizlerinin sonucunda kayda değer COX-2 inhibisyonu bulunamamıştır.

Bileşikleri kendi aralarında değerlendirdiğimizde, etil 2-[6-(2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (bileşik 11) ve etil 2-[6-(2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (bileşik 12) sırasıyla % 27,38 ve % 30,05 ile en yüksek inhibisyon yüzdelerine sahip selektif COX-1 inhibitörü maddeler olduğu gözlenmiştir. Bunun yanısıra bileşik 10'da da, bileşik 11 ve 12 kadar olmasa da %16,54 oranında COX-1 inhibisyonu gerçekleşmiştir. Benzoksazol halkasının azot atomu üzerinde ester fonksiyonu ve fenil halkasının para konumunda elektron çekici sübstitüentin bulunmasının aktivitede artışa neden olduğu düşünülmektedir.

Tromboksan sentaz inhibitör aktiviteyi değerlendirmek için, COX-1 inhibitör aktivite analizlerinde olduğu gibi TxB_2 miktarı ölçülmektedir. Sentezlenen asetik asit türevleri COX-1 enzimini anlamlı derecede inhibe etmemiştir. Yapılan COX-1 inhibitör aktivite analizinde TxB_2 miktarında bir azalma saptanmadığı için Tx sentaz enzimi üzerinde inhibitör etki tayini yapmaya gerek görülmemiştir.

Genel olarak bileşikler ele alınacak olursa, sadece ester türevleri aktivite spektrumu gösterdiği ve COX-1 izoformu üzerine etkili olduğu gözlenmektedir. Aktivite çalışmaları sonucu saptanan COX inhibisyon yüzdeleri kayda değer bulunmamıştır. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak daha ileri çalışmalarla selektif COX-2 inhibisyon aktivitesi gösterecek ve bunun yanında Tx sentaz inhibisyon aktivitesine de sahip bileşiklerin tasarlanması düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada altı tanesi 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol, altı tanesi etil [6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat ve altı tanesi [2-okso-6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit olan 18 bileşik sentezlenmiş ve bu bileşiklerin COX inhibitör etkileri *in vitro* enzim deneyleri ile araştırılmıştır.

2-Aminofenol ile ürenin mikrodalga reaktöründeki tepkimesinden elde edilen 2-okso-3*H*-benzoksazolün, bromoasetik asit ile PPA içindeki reaksiyonundan 6-(2-bromoasetil) türevine ulaşılmıştır. Daha sonra 6-(2-bromoasetil)-2-okso-3*H*-benzoksazolün ilgili tiyobenzamit türevleriyle tepkimesinden 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevleri elde edilmiştir. Bu türevlerin metalik sodyum ile tuzlarına geçildikten sonra etil bromoasetat ile benzoksazol halkasının azot atomu üzerinde ester fonksiyonu oluşturulmuştur. Bu ester yapıları ya derişik hidroklorik asit ile hidroliz edilerek, ya da 6-(2-sübstitüefenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin sodyum tuzları üzerinden bromoasetik asit ile tepkimesinden [6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit türevleri elde edilmiştir.

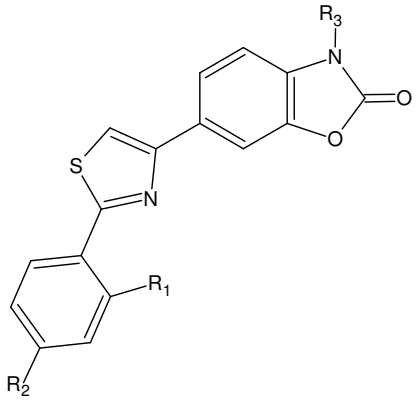
Bileşiklerin yapıları IR, ^{1}H-NMR ve elementel analiz verileri ile kanıtlanmıştır.

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

Etil 2-[6-(2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 10), etil 2-[6-(2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 11) ve etil 2-[6-(2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 12) COX-1 inhibitör etkileriyle dikkat çekmektedir. Onsekiz bileşik arasında üç bileşiğin ortak özellikleri esas alınarak, benzoksazol halkasının 3. konumunda ester ve fenil halkasının para konumunda elektron çekici grupların varlığının COX-1 inhibitör aktivitesinde önemli rolü olduğu söylenebilir.

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

Tablo 14: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin erime derecesi, % verim, % COX-1 ve % COX-2 inhibisyonları



Bileşik No	R_1	R_2	R_3	Erime Derecesi (°C)	% Verim	% COX-1 İnhibisyon	% COX-2 İnhibisyon
1	H	H	H	266	27,9	0	0
2	F	H	H	249	38,4	0	0
3	Cl	H	H	241	33	0	0
4	H	F	H	268	25,5	0	0
5	H	Cl	H	210	56	0	0
6	H	OCH_3	H	255	19,8	0	0
7	H	H	$CH_2CO_2C_2H_5$	179	61,2	0	0
8	F	H	$CH_2CO_2C_2H_5$	189	67,4	3,96	0
9	Cl	H	$CH_2CO_2C_2H_5$	180	64,7	7,54	0
10	H	F	$CH_2CO_2C_2H_5$	184	22,7	16,54	0
11	H	Cl	$CH_2CO_2C_2H_5$	181	41,3	27,38	0
12	H	OCH_3	$CH_2CO_2C_2H_5$	158	57,5	30,05	0
13	H	H	CH_2COOH	288	25,5	0	0
14	F	H	CH_2COOH	284	50,9	0	0
15	Cl	H	CH_2COOH	267	26,2	0	0
16	H	F	CH_2COOH	315	65,6	0	0

Tablo 14' ün devamı.

17	H	Cl	CH_2COOH	296	9,9	0	0
18	H	OCH_3	CH_2COOH	260	48,4	0	0
DuP-697						-	**100**
SC-560						**100**	-

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, daha ileri çalışmalarla selektif COX-2 inhibisyon aktivitesi gösterecek ve bunun yanında TxA_2 sentaz inhibisyon aktivitesine de sahip bileşiklerin tasarlanması düşünülmektedir.

7. ÖZET

BAZI 6-(SÜBSTİTÜE TİYAZOL-4-İL)-2-OKSO-3*H*-BENZOKSAZOL YAPISINDAKİ BİLEŞİKLERİN SENTEZİ VE SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Bu tez konusu kapsamında hem selektif COX-2 inhibitör hem de Tx sentaz inhibitör aktiviteyi aynı molekül yapısında taşıyarak olası kardiyovasküler yan etkilerinden arınmış moleküllerin tasarlanması, sentezi ve siklooksijenaz izoformları (COX-1 ve COX-2) üzerinde inhibitör aktivitelerinin araştırılmasını amaçladık.

Daha önce bildirilmiş 1,3-diaril sübstitüe heterosiklik ana yapısını taşıyan COX-2 inhibitörleri ve Tx Sentaz inhibitörleri temel alınarak tasarlanmış yapılarımızda, tiyazol merkez halkası etrafında aril sübstitüentleri olarak 2-okso-3*H*-benzoksazol ve sübstitüe fenil halkaları meta konumlarda yerleştirilmiştir. 2-okso-3*H*-benzoksazol halkasının 3. konumunda asetik asit ve esterleri ve fenil halkasının 2. ve 4. konumlarında –F, -Cl, -OCH_3 gibi sübstitüentlerle türevlendirmeye gidilmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin yapıları IR, ^{1}H-NMR ve elementel analiz verileri ile kanıtlandıktan sonra, 10 µM bileşik konsantrasyonunda, COX-1 ve COX-2 enzimleri üzerinde inhibitör aktiviteleri araştırılmıştır.

Sentezlenen bileşiklerden etil 2-[6-(2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat **(10)**, etil 2-[6-(2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat **(11)** ve etil 2-[6-(2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetatın **(12)** COX-1 inhibitör etkileri tespit edilmiştir. Aktivite açısından ester kalıntısı ve fenil halkasının para konumunda elektron çekici sübstitüent varlığı önemli gözükmektedir.

Anahtar kelimeler: 1,3-diaril COX-2 inhibitörleri, 2-okso-3*H*-benzoksazol, tiyazol, Tx sentaz inhibitörleri

8. SUMMARY

STUDIES ON THE SYNTHESIS AND CYCLOOXYGENASE INHIBITORY ACTIVITIES OF SOME 6-(THIAZOLE–4-YL)-2-OXO-3*H*-BENZOXAZOLE DERIVATIVES

The aim of this thesis dissertation is to perform the synthesis of compounds which may have dual COX-2 and Tx synthase inhibitory activities, therefore minimizing side effects such as the cardiovascular problems currently associated with COX-2 inhibitors and to evaluate *in vitro* COX inhibitory activities of the synthesized compounds.

The compounds were designed by inspiration from 1,3-diaryl heterocyclic COX-2 inhibitors and tromboxane synthase inhibitors. These compounds carry thiazole as a central heterocyclic ring substituted with 2-oxo-3*H*-benzoxazole and substitue phenyl moiety at meta positions. The derivatives that bear acetic acid or ester function at position 3 of 2-oxo-3*H*-benzoxazole and -F, -Cl, $-OCH_3$ substituted phenyl ring at o- or p-positions have been synthesized.

After structure elucidation of compounds by means of IR, ^{1}H-NMR and elementary analysis, the COX-1 and COX-2 inhibitory activities were screened at 10 µM concentration.

Ethyl 6-[2-(4-florophenyl)-1,3-thiazole-4-yl]-2-oxo-3*H*-benzoxazole-3-yl]acetate **(Compound 10),** ethyl 6-[2-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole-4-yl]-2-oxo-3*H*-benzoxazole-3-yl]acetate **(Compound 11)** and ethyl 6-[2-(4-methoxyphenyl)-1,3-thiazole-4-yl]-2-oxo-3*H*-benzoxazole-3-yl]acetate **(Compound 12)** have shown selective COX-1 inhibitory activities. For inhibitory activities, the ester residue and para substitue phenyl ring with electron withdrawing groups are seem to be important.

Key Words: 1,3-diaryl heterocyclic COX-2 inhibitors, 2-oxo-3*H*-benzoxazole, thiazole, Tx synthase inhibitors

9. KAYNAKLAR

1. Noor MG. Cyclooxygenase-2 inhibitors. Anesth Analg 2003; 96: 1720-38.
2. Kalgutkar AS, Zhao Z. Discovery and design of selective cyclooxygenase-2 inhibitors as non-ulserogenic, anti-inflammatory drugs with potential utility as anti-cancer agents. Current Drug Targets 2001; 2: 79-106.
3. Osiri M, Moreland LW. Spesific COX-2 inhibitors - A new choise of NSAID therapy. Arthritis Care and Research 1999; 12(5): 351-62.
4. Maria GS, Marta LC, Tacconelli S, Patrignani P. The future of traditional nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of inflammation and pain. Pharmacological Reports 2005; 57: 66-85.
5. Charlier C, Michaux C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. Eur J Med Chem 2003; 38: 645-59.
6. Masereel, B. New Trends in thromboxane and prostacyclin modulators. Curr Med Chem 2000; 7: 609-28.
7. Turini EM, Dubois RN. Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. Ann Rev Med 2002; 53: 35-57.
8. Leval X, Julemont F, Delarge J, Pirotte B, Dogne JM. New trends in dual 5-LOX/COX inhibition. Curr Med Chem 2002; 9: 941-62.
9. Van Ryn J, Trummlitz G, Pairet M. COX-2 selectivity and inflammatory processes. Curr Med Chem 2000; 7: 1145-61.
10. Dannhardt G, Laufer S. Structural approaches to explain the selectivity of COX-2 inhibitors: Is there a common pharmacophore? Curr Med Chem 2000; 7: 1101-12.
11. Chakraborti AK, Thilagavathi R. Computer-aided design of non sulphonyl COX-2 inhibitors: An improved comparative molecular field analysis incorporating additional descriptors and comparative molecular similarity indices analysis of 1,3-diarylisoindole derivatives. Bio Med Chem Lett 2003; 11: 3989-96.
12. Hengmiao C, DeMello L, Kristin M, Li J, Sakya S M, Kazuo A, Kawamura K. Synthesis and SAR of heteroaryl-phenyl-substituted pyrazole derivatives as highly selective and potent canine COX-2 inhibitors. Bio Med Chem Lett 2006; 16(8): 2076-80.
13. Shahapurkar S, et al. Quantitative structure activity relationship studies of diaryl furanones as selective COX-2 inhibitors. Eur J Med Chem 2004; 39: 899-904.
14. Beswick P, Bingham S, Bountra C. Identification of 2,3-diaryl-pyrazolo[1,5-b]pyridazines as potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Bio Med Chem Lett 2004; 14: 5445-48.

15. Kontogiorgis CA, Hadjipavlou-Litina DJ. Non-steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents. Curr Med Chem 2002; 9: 89-98.
16. Narender M, Reddy MS, Sridhar R, Nageswar Y, Rama Rao K. Aqueous phase synthesis of thiazoles and aminothiazoles in the presence of ß-cyclodextrin. Tetrahedron Lett, 2005; 46: 5953-55.
17. Comittee on safety of medicine. Immediate withdrawal of rofecoxib [internette]. 30th September 2004 [27 Mayıs 2006 okundu]. http://www.mhra.gov.uk
18. Borer JS, Simon LS. Review cardiovascular and gastrointestinal effect of COX-2 inhibitors and NSAIDs: achieving a balance. Arthritis Research&Therapy 2005; 7(Suppl.4): S 14-S 22.
19. Türker K, Melli M, Kayaalp O. 89. bölüm - Eikozanoidler ve diğer otakoidler. içinde: Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10.baskı. Ankara: Hacettepe-Taş, 2002. 1439-63.
20. Erdoğan H. Narkotik olmayan analjezik ilaçlar. içinde: Akgün H, Balkan A, Bilgin A, Çalış Ü, Gökhan N, Dalkara S, Erdoğan H, Erol D, Ertan M, Özkanlı F, Palaska E, Saraç S, Şafak C, Tozkoparan B. Farmasötik Kimya. 2. Baskı. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları; 2004. 561-619.
21. Abacıoğlu N. Aljezi, İnflamasyon, pirezis ve nonsteroidal analjezik ve antiinflamatuvar ilaçlar. içinde: Bökesoy T A, Çakıcı İ, Melli M. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Ders Kitabı. Ankara: Gazi Kitabevi; 2000: 437-95.
22. FitzGerald GA. COX-2 in play at the AHA and the FDA. Tren Pharm Sci 2007; 28(7): 303-7.
23. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. Thromb Res 2003; 110: 255–258.
24. Flower RJ. The development of COX-2 inhibitors. Naturel Reviews 2003; 2: 179-186.
25. Botting R, Ayoub SS. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. Prosta, Leuco Ess Fatty Acids 2005; 72(2): 85-87.
26. Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors - Current status and future prospects. Eur J Med Chem, 2001; 36(2): 109-26.
27. Francis B. COX-3: Fact or fancy? Joint Bone Spine. Revue du Rhumatisme 2004; 71(6): 451-3.
28. Gans KR, Galbraith W, Roman RJ, Haber SB, Kerr JS, Schmidt WK, Smith C. Anti-inflammatory and safety profile of DuP 697, a novel orally effective prostaglandin synthesis inhibitor. J Pharmacol Exp Ther 1990; 254(1): 180-7.
29. Ranatunge RR, Earl RA, Garvey DS, Janero DR, Letts LG, Martino AM, Murty MG, Richardson SK. 3-(2-Methoxytetrahydrofuran-2-yl)pyrazoles: a novel class of potent, selective cyclooxygenase - 2 inhibitors. Bio Med Chem Lett 2004; 14(24): 6049–52.

30. Banoglu E, Akoglu Ç, Ünlü S, Küpeli E, Yeşilada E, Şahin MF. Amide derivatives of [6-(5-Methyl-3-phenylpyrazole-1-yl)-3(2*H*)-pyridazinone-2yl]acetic acids as potential analgesic and anti-inflammatory compounds. Arch Pharm Pharm Med Chem 2004; 337(1): 7-14.
31. Ökçelik B, Ünlü S, Banoğlu E, Küpeli E, Yeşilada E, Şahin MF. Investigations of new pyridazinone derivatives for the synthesis of potent analgesic and anti-ınflammatory compounds with cyclooxygenase ınhibitory activity. Arch Pharm Pharm Med Chem 2003; 336(9): 406-12.
32. Sui Z, Guan J, Ferro MP, McCoy K, Wachter MP, Murray WV, Singer M, Steber M, Ritchie DM, Argentieri DC. 1,3-Diarylcycloalkanopyrazoles and diphenyl hydrazides as selective inhibitors of cyclooxygenase-2. Bio Med Chem Lett, 2000; 10(6): 601-4.
33. Ranatunge RR, Garvey DS, Janero DR, Letts LG, Matino AM, Murty MG, Richardson SK, Young DL, Zemetseva IS. Synthesis and selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitory activity of a series of novel bicyclic pyrazoles. Bio Med Chem 2004; 12(6): 1357–66.
34. Walter MF, Jacoba RF, Daya CA, Dahlborga R, Wenga Y, Masona PR. 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.
35. Konstantinopoulos PA, Lehmann FD. The cardiovascular toxicity of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors: comparisons, contrasts and aspirin confounding. J Clin Pharmacol 2005; 45: 742-50.
36. Wright JM. The double-edged sword of COX-2 selective NSAIDs. J Canad Med Ass 2002; 167(10): 1131-37.
37. Wang D, DuBois RN. Prostaglandins and Cancer. Gut 2006; 55(1): 115-22.
38. Harris ER, Beebe-Donk J, Doss H, Doss DB. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: A critical review of non-selective COX-2 blockade. Oncology Reports 2005; 13(4): 559-83.
39. Rueegg C, Zaric J, Roger S. NSAIDs and COX-2 inhibitors as anti-cancer therapeutics: hypes, hopes and reality. Annals of Medicine 2003; 35(7): 476-87.
40. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: How hot is the link? Biochem Pharmacol 2006; 72(11): 1605-21.
41. Simmons DL, Botting RM, Timothy H. COX Isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacol Rev 2004; 56(3): 387-437.

42. McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. Neurobiology of Aging 2007; 28(5): 639-47.
43. Townsend KP, Pratico D. Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. The FASEB Journal, 2005; 19: 1592-1601.
44. Kayaalp O. 45.bölüm- Antitrombotik ilaçlar. içinde: Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10.baskı. Ankara: Hacettepe-Taş, 2002: 583-614.
45. Şafak C. 45. bölüm- Antitrombositik ilaçlar. içinde: Akgün H, Balkan A, Bilgin A, Çalış Ü, Gökhan N, Dalkara S, Erdoğan H, Erol D, Ertan M, Özkanlı F, Palaska E, Saraç S, Şafak C, Tozkoparan B. Farmasötik Kimya. 2. Baskı. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları; 2004. 913-916.
46. Şafak C. 46.bölüm- Trombolitik ilaçlar. içinde: Akgün H, Balkan A, Bilgin A, Çalış Ü, Gökhan N, Dalkara S, Erdoğan H, Erol D, Ertan M, Özkanlı F, Palaska E, Saraç S, Şafak C, Tozkoparan B. Farmasötik Kimya. 2. Baskı. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları; 2004. 917-918.
47. Dogne JM, Hanson J, Leval X, Masereel B, Kolh P, Pirotte B. New developments on thromboxane modulators. Mini-Reviews Med Chem 2004; 4: 649-57.
48. Michaux C, Dogne JM, Rolin S, Masereel B, Wouters J, Durant F. A pharmacophore model for sulphonyl-urea (-cyanoguanidine) compounds with dual action, thrombxane receptor antagonists and thrombxane synthase inhibitors. Eur J Med Chem 2003; 38: 703-10.
49. Kikelj D, Urleb U. Thiazoles. Science of Synthesis 2002; 11: 627-833.
50. Lespagnol C, Marcincal-Lefebvre A. Chemotherapeutic study of benzoxazolinone and derivatives. Bull Chim Ther 1967; 2(5): 395-402.
51. Kalcheva VB, Doicheva BB, Angelova VK, Simov DA. Proton stability constants of substituted benzoxazolones. Dokl Bolg Akad Nauk 1973; 26(11): 1493-6.
52. Hartley WN, Dobie JJ, Paliatseas G. Absorbtion spectra of benzoxazolones in alcohol. J Chem Soc 1900; 839.
53. Groenvik ME. Sur L'action de L'ether chloroxycarbonique L'amidophenol. Bull Soc Chim France 1876; 25: 177.
54. Von Chelmicki St. Ueber das carbonyl-o-amidophenol und thiocarb-o-amidophenol. Chem ber 1887; 20: 177.
55. Von Meyer F. Uber Abklömmlinge des o-Aminophenols. J Pr Chem, 1915; 92: 270.
56. Close WJ, Tiffany BD, Spielman MA. The analgesic activity of some benzoxazolinone derivates. J Am Chem Soc 1949; 71: 1265-8.
57. Sandmeyer T. Ueber die einwirkung von imidokohlensaureester au aromatische orthoverbindungen. Chem Ber 1886; 19: 8656.

58. Sam J, Plampin JN. Benzoxazoles: potent skeletal muscle relaxants. J Pharm Sci 1964; 53(5): 538-44.
59. Sam J, Plampin JN, Poos GI. Methylated 2-amino-5-chlorobenzoxazoles. J Org Chem 1958; 23: 1500-3.
60. Graebe C, Rostovzeff S. Ueber die Hofmann'sche reaction (Ueberführung der Amide in Amine). Chem Ber 1902; 35: 2747-51.
61. Ostaszynski A, Plenkiewicz H, Urbanski T. Preperation of benzoxazolones from halosalicylhydroxamicacids and ethyl chloroformate. Bull Acad Pol Sci, Ser Sci Chim 1971; 19(1): 15-20.
62. Khajavi MS, Hajihadi M, Naderi R. Synthesis of heterocyclic compounds from o-substituted anilines under microwave ırradiation. J Chem Research 1996; 2: 92-3.
63. Aichaoui H, Lesieur I, Henichart, JP. Uniquivocal preparation of 4- and 5-Acyl-2-aminophenols. Synthesis 1990; 8: 679-80.
64. Branstad J O. Hydrolysis of some 2-benzoxazolinones. Acta Pharm Suecica 1970; 7(3): 303-17.
65. Pilli G, Erdoğan H, Sunal R. Some new benzoxazolinone derivatives with analgesic and anti-inflammatory activities. Arzneim Forsch/ Drug Res 1993; 43(2): 1351-4.
66. Doğruer DS, Ünlü S, Yeşilada E, Şahin MF. N-(2-pyridinyl)-2-[2(3*H*)-benzazolone-3-yl]acetamides: synthesis, antinociceptive and anti-Inflammatory activity. Il farmaco 1997; 52(12): 745-50.
67. Aliev NA, Aflyatunova RG, Giyasov K. Synthesis and byologically active substances in benzoxazolinone and benzoxazolinethione series. Fungitsidy 1980; 20: 46.
68. Yous S, Poupaert JH, Lesieur I, Depreux P, Lesieur D. $AlCl_3$-DMF reagent in the friedel-crafts reaction. Application to the acylation reaction of 2(3*H*)-benzothiazolones. J Org Chem 1994; 59(6): 1574-6.
69. Renard P, Lesieur D, Lespagnol C, Cazin M, Brunet C, Cazin JC. 6-Acylbenzoxazolinones and 6-acyl-2-oxo-3-benzoxazolinyl alkanoic acids. Chemical and pharmacological study. Eur J Med Chem 1980; 15(5): 453-6.
70. Aichaoui H, Poupaert JH, Lesieur D, Henichart JP. $AlCl_3$-DMF reagent in the friedel-crafts reaction. Application to 2(3*H*)-benzoxazolinones in the haworth reaction. Bull Soc Chim Belg 1992; 101(12): 1053-60.
71. Liacha M, Yous S, Poupaert JH, Depreux P, Aichaoui H. Friedel-crafts acylation of 2(3*H*)-benzoxazolone: investigation of the role of the catalyst and microwave activation. Monatshefte für Chemie 1999; 130(11): 1393-97.
72. Şafak C, Erdoğan H, Palaska E, Sunal R, Duru S. Synthesis of 3-(2-pyridylethyl)benzoxazolinone derivatives: potent analgesic and antiinflammatory compounds ınhibiting prostaglandin E_2. J Med Chem 1992; 35(7): 1296-9.

73. Erdogan H, Ünlü S, Sunal R. Analgesic activity of some 3-(arylpiperidinomethyl)-2-benzoxazolinone derivatives. Archiv der Pharmazie (Weinheim, Germany) 1989; 322(2): 75-7.
74. Kitaura Y, Oku T, Baba Y, Kasahara C, Hashimoto M. Benzoxazolone and benzothiazolone derivatives. PCT Int Appl. WO 85 01289,1983.
75. Pilli H G, Özkanlı F, Safak C, Erdoğan H, Ünlü S, Gümüşel B, Demirdamar R. 2-(6-acyl-2-benzoxazolinone-3-yl) acetamide and 2-(6-acyl-2-benzoxazolinone-3-yl)acetonitrile derivatives with analgesic activities. Pharmazie 1994; 49(1): 63-4.
76. Doğruer DS, Ünlü S, Yeşilada E, Şahin MF. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of some(2-benzoxazolone-3-yl) and (2-benzothiazalone-3-yl)acetic acid derivatives. Il farmaco 1998; 53(1): 80-4.
77. Ünlü S, Önkol T, Dündar Y, Ökçelik B, Küpeli E. 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.
78. Gokhan N, Koksal M, Kupeli E, Yesilada E, Erdogan H. Some new mannich bases of 5-methyl-2-benzoxazolinones with analgesic and anti-inflammatory activities. Turk J Chem 2005; 29(4): 445–54.
79. Kappe CO, Stadler A. Chapter 2: Microwave Theory. içinde: Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G. Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry Germany: Wiley-Vch; 2005. 9-28.
80. Nuechter M, Ondruschka B, Bonrath W, Gum A. Microwave assisted synthesis -a critical technology overview. Green Chemistry. 2004; 6(3): 128-41.
81. Gedye RN, Wei JB. Rate enhancement of organic reactions by microwaves at atmospheric pressure. Canadian J Chem 1998; 76(5): 525-32.
82. Baghurst DR, Mingos MP. Application of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry. Chem Soc Rev 1991; 20: 1-47.
83. Yıldız K. Metalurjik Proseslerde Mikrodalga Kullanımı [internette]. Sakarya Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği [15 Temmuz 2007 okundu]. http://www.metalurji.org.tr/dergi125/d125_2429.html.
84. Ökmen ZA. ODTÜ Gıda Müh. Bölümü [internette]. [16 Temmuz 2007 okundu]. http://www.caginpolisi.com.tr/12/9-10.html.
85. Lidstrom P, Tierney J, Wathey B, Westman J. Microwave assisted organic synthesis - a review. Tetrahedron 2001; 57(45): 9225-83.
86. Perreux L, Loupy A. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. Tetrahedron 2001; 57(45): 9199-23.

87. Bougrin K, Bennani AK, Tétouani SF, Soufiaoui M. An easy route to synthesize 1,5-arylodiazepin-2-ones. Tetrahedron Lett 1994; 35(45): 8373-76.
88. Kappe CO. Controlled microwave heating in modern organic synthesis review. Angewandte Chemie International Edition 2004; 43(46): 6250-84.
89. Stadler A, Kappe CO. High-speed couplings and cleavages in microwave heated solid phase reactions at high temperatures. Eur J Org Chem 2001; 5: 919-25.
90. Baghurst DR, Mingos MP. Superheating effects associated with microwave dielectric heating. J Chem Soc, Chem Comm 1992; 9: 674-77.
91. Chemat F, Esveld E. Microwave super-heated boiling of organic liquids: origin, effect and application. Chem Engineering Technology 2001; 24(7): 735-44.
92. Berlan J. Microwaves in Chemistry: Another way of heating reaction mixtures: theory and applications of microwave radiation. Radiation Physics and Chemistry 1995; 45(4): 581-89.
93. Bogdal D, Lukasiewicz M, Pielichowski J, Miciak A, Bednarz Sz. Microwave-assisted oxidation of alcohols using Magtrieve. Tetrahedron 2003; 59(5): 649-53.
94. Raner KD, Strauss CR, Trainor RW, Thorn JS. A new microwave reactor for batchwise organic synthesis. J Org Chem 1995; 60(8): 2456-60.
95. Loupy A, Maurel F. Sabatié-Gogová A. Improvements in Diels-Alder cycloadditions with some acetylenic compounds under solvent-free microwave-assisted conditions: experimental results and theoretical approaches. Tetrahedron 2004; 60(7): 1683-91.
96. Loupy A, Perreux L, Liagre M, Burle K, Moneuse M. Reactivity and selectivity under microwaves in organic chemistry. Relation with medium effects and reaction mechanism. Pure and applied chem 2001; 73(1): 161-66.
97. Chen JJ, Deshpande SV. Rapid synthesis of alfa-ketoamides using microwave irradiation-simultaneous cooling method. Tetrahedron Lett 2003; 44(49): 8873-76.
98. Baxendale IR, Lee A, Ley SV. A concise synthesis of carpanone using solid-supported reagents and scavengers. J Chem Soc Perkin Trans 1 2002; 16: 1850-57.
99. Pairet M, Van Ryn J, Mauz A, Schierok H, Diederen W, Türck, D. Chapter 3: Differential Inhibition COX-1 and COX-2 by NSAIDs: A summary of results obtained using various test systems. içinde: Vane J, Botting J. Selective COX-2 Inhibitors: Pharmacology, clinical effects and therapeutic potential. London: Kluwer Academic Publishers and William Harvey Press; 1998. 27-46.
100. Pairet J, Van R. Experimental models used to investigate the differantial inhibition of cyclooxygenase-1 and cylooxygenase-2 by

nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Inflammation Research 1998; 47(suppl.2): S93-S101.
101. Mitchell J A, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower R J, Vane J R. Selectivity of nonsteroidal antienflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. Pharmacology 1994; 90(24): 11693-97.
102. Laufer S, Zechmeister P, Klein T. Development of an in vitro test system for the evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors. Inflammation Research 1999; 48: 133-8.
103. Brideau C, Kargman S, Liu S, Dallob AL, Ehrich EW, Rodger IW, Chan CC. A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase ınhibitors. Inflammation Research 1996; 45: 68-74.
104. Chapter1:Introduction to Immunoassays. [okundu 2007 Haziran 27]. http://www.abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning_immunoassay.pdf
105. İmmünolojiye giriş ve antijen. [okundu 27 Temmuz 2006]. http://www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1213/unite09.pdf.
106. Ünite 11: İmmünoglobulinler. [okundu 27 Temmuz 2006]. http://www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1213/unite11.pdf
107. Zinkernagel RM. Bölüm 2: İmmünolojinin Temelleri. içinde: Kayser F H, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Tıbbi Mikrobiyoloji 9. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. 43-138.
108. Altınışık DM. İmmünolojik Teknikler ADÜTF Biyokimya Anabilim Dalı.[20 Temmuz 2006 okundu]. http://www.mustafaaltinisik.org.uk/45-uzm-03.ppt
109. İmmün analizler. [okundu 27 Temmuz 2006]. http://en.wikipedia.org/wiki/Immunoassay
110. Chapter 2: Introduction to Immunoassays. [okundu 2007 Haziran 30]. http://www.abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning_immunoassay_02.pdf
111. Crowther, JR. ELISA 1 Principles. Joint FAO/IAEA Division Vienna. http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/ras-ai-elisai.pdf
112. Proteomics-ELISA. http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403#types.
113. ELISA. http://www.komabiotech.com/FAQ/immunology/ELISA.htm#elisa
114. Introduction to antibodies. 2nd edition. Chemicon international® [okundu 2007 Haziran 30]. http://www.chemicon.com/resource/litlibrary/ant101.pdf
115. Schwarz G. 2,4-Dimethylthiazole. Organic Syntheses 1995; Coll. Vol3: 332, 1945; 25: 35
116. Assay Designs Correlate-EIA™ Thromboxane B_2 Enzyme Immunoassay Kit Catalog No. 900-002 Kitapçığı.

117. Patrignani P, Panara MR, Greco A, Fusco O, Natoli C, Iacobelli S, Cipollone F, Ganci A, Creminon C, Maclouf J, Patrono C. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. The J Pharmacol Exper Ther 1994; 271(3): 1705-12.
118. Assay Designs Correlate-EIA™ Prostaglandin E_2 Enzyme Immunoassay Kit Catalog No. 900-001 Kitapçığı.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Şeyma
Soyadı	Cankara
Doğum Yeri ve Tarihi	Ankara-1983
Eğitimi	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2001-2005) Bahçelievler Deneme Süper Lisesi (1997-2001) Konutkent İlköğretim Okulu (1993-1997) Haymana 12 Eylül İlköğretim Okulu (1989-1993)
Yabancı Dili	İngilizce
Görevi	Araştırma Görevlisi Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı (Ocak 2006- …)