

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

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ecz. Şölen URLU**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Serdar ÜNLÜ

ANKARA  
Temmuz 2007

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

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ecz. Şölen URLU**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Serdar ÜNLÜ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2007-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA  
Temmuz 2007

## KISALTMALAR

<b>ADAPT</b>	: Alzheimer Disease Anti-inflammatory Prevention Trial
<b>APC</b>	: Adenoma Prevention with Celecoxib
<b>APPROVe</b>	: Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX
<b>CLASS</b>	: The Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study
<b>CMIA</b>	: Kemilüminesans Manyetik İmmunanaliz
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz Enzimi
<b>COX-1</b>	: Siklooksijenaz-1 Enzimi
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz-2 Enzimi
<b>CRESCENT</b>	: The Celecoxib Rofecoxib Efficacy and Safety in Comorbidities Evaluation Trial
<b>Diglim</b>	: Dietilenglikoldimetileter
<b>DMF</b>	: Dimetil Formamit
<b>2-DPC</b>	: Di-2-piridil karbonat
<b>EIA</b>	: Enzimimmünanaliz
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EMA</b>	: The European Medicines Agency (Avrupa İlaç Ajansı)
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>FPIA</b>	: Floresan Polarizasyon İmmunanaliz
<b>HETE</b>	: Hidroeikozatetraenoik asit
<b>HpETE</b>	: Hidroperoksiieikozatetraenoik asit
<b>IDB</b>	: İyodobenzen diasetat
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>LO</b>	: Lipoksijenaz
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>LTB<sub>4</sub></b>	: Lökotrien B <sub>4</sub>
<b>LTA<sub>4</sub></b>	: Lökotrien A <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b>	: Lökotrien C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b>	: Lökotrien D <sub>4</sub>
<b>LTE<sub>4</sub></b>	: Lökotrien E <sub>4</sub>

<b>MEIA</b>	: Mikropartikül Enzim İmmünanaliz
<b>NSAİİ</b>	: Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar.
<b>PAF</b>	: Platelet Aktive Edici Faktör
<b>PG</b>	: Prostaglandin
<b>PGD<sub>2</sub></b>	: Prostaglandin D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	: Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PGF<sub>2</sub></b>	: Prostaglandin F <sub>2</sub>
<b>PGG<sub>2</sub></b>	: Prostaglandin G <sub>2</sub>
<b>PGH<sub>2</sub></b>	: Prostaglandin H <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	: Prostatiklin
<b>PPA</b>	: Polifosforik Asit
<b>PreSAP</b>	: The Prevention of Spontaneous Adenomatous Polyps Trial
<b>RIA</b>	: Radyoimmünanaliz
<b>TARGET</b>	: Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial
<b>TXA<sub>2</sub></b>	: Tromboksan A <sub>2</sub>
<b>TXB<sub>2</sub></b>	: Tromboksan B <sub>2</sub>
<b>VIGOR</b>	: The Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research Study

<b>I. İÇİNDEKİLER</b>	<b>i</b>
<b>II. ŞEKİLLER</b>	<b>iv</b>
<b>III. TABLOLAR</b>	<b>iv</b>
<b>I. İÇİNDEKİLER</b>	
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Enflamasyon</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Siklooksijenaz Enzimi</b>	<b>7</b>
2.2.1 Siklooksijenaz Enzimleri Arasındaki Yapısal Farklılıklar	8
2.2.2 Non-steroidal Antienflamatuvar İlaçlarla Siklooksijenaz Enzim İnhibisyonu	13
2.2.2.1 Spesifik COX-2 İnhibitörlerinin Sınıflandırılması	16
2.2.2.1.1 COX-2 İnhibitörleri ve Kardiovasküler Yan Etkileri	27
<b>2.3 Tromboksan, Prostasiklin ve Antiplatelet Aktivite</b>	<b>33</b>
2.3.1 Tromboksan Sentaz İnhibitörleri:	36
<b>2.4 Mikrodalga Destekli Kimyasal Sentez</b>	<b>39</b>
2.4.1 Mikrodalga Işınımı:	39
2.4.1.1 Mikrodalga Dielektrik Isıtma	40
2.4.1.2 Dielektrik Özellikleri	41
2.4.1.3 Konvansiyonel Termal Isıtmaya Karşı Mikrodalga	43
2.4.1.3.1 Mikrodalga Etkileri	43
2.4.1.3.1.1 Termal Etkiler (Kinetik Etkiler)	43
2.4.1.3.1.2 Spesifik Mikrodalga Etkileri	43
2.4.1.3.1.3 Termal Olmayan (Atermal) Mikrodalga Etkileri	44
2.4.2 Mikrodalga Destekli Kimyasal Sentezlere Örnekler	45
<b>2.5 TİYAZOL ve 5-KLORO-2-OKSO-3H-BENZOKSAZOL TÜREVLERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER</b>	<b>49</b>
2.5.1 TİYAZOL ve TÜREVLERİ	49
2.5.1.1 Genel Bilgiler	49
2.5.1.2 Tiyazol Halkası Elde Ediliş Yöntemleri	50
2.5.2 2-OKSO-3H-BENZOKSAZOL ve TÜREVLERİ	53
2.5.2.1 2-Okso-3H-benzoksazol İle İlgili Genel Bilgiler	53
2.5.2.2 2-Okso-3H-benzoksazol Yapısının Genel Sentez Yöntemleri	53
2.5.2.2.1 5-Kloro-2-okso-3H-benzoksazol Yapısının Genel Sentez Yöntemleri	59
2.5.2.3 2-Okso-3H-benzoksazol Yapısının Kimyasal Tepkimeleri	61
2.5.2.3.1 Benzen Halkasına Sübstitüsyon Tepkimeleri	61
2.5.2.3.2 3 Numaralı Konumdan Sübstitüsyon Tepkimeleri	62
2.5.2.4 Analjezik Ve Antienflamatuvar Özellik Gösteren 5-Kloro-2-okso-3H-benzoksazol Yapısındaki Bileşikler	65
<b>2.6 COX ENZİMİ İNHİBİTÖR ETKİ TAYİNLERİ İÇİN İN VİTRO TEST SİSTEMLERİ</b>	<b>68</b>
2.6.1 Test sistemleri arasındaki farklılıklar	69

2.6.2 SİKLOOKSİJENAZ (COX) AKTİVİTE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ	70
2.6.2.1 Polarografi (Oksigraf)	70
2.6.2.2 Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü	71
2.6.2.3 Prostaglandin ölçümü	71
2.6.3 İmmüanaliz Yöntemleri	72
2.6.3.1 Yarışmalı immüanaliz	74
2.6.3.2 Yarışmalı Olmayan (Sandviç) İmmüanaliz Yöntemi	75
2.6.3.3 Homojen ve Heterojen İmmüanaliz metotları	75
2.6.3.3.1 Radyoimmüanaliz (RIA)	75
2.6.3.3.2 Enzim İmmüanaliz (EIA)	75
2.6.3.3.3 Floresan Polarizasyon İmmüanaliz (FPIA)	75
2.6.3.3.4 Mikropartikül Enzim İmmüanaliz (MEIA)	76
2.6.3.3.5 Kemilüminesans Manyetik İmmüanaliz (CMIA)	76
2.6.4 ELISA	76
2.6.4.1 Doğrudan ELISA	77
2.6.4.2 Dolaylı ELISA	78
2.6.4.3 Sandviç ELISA	79
2.6.4.4 Yarışmalı / İnhibitör ELISA	81
<b>3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR</b>	<b>82</b>
<b>3.1 Kimyasal Çalışmalar</b>	<b>82</b>
3.1.1 Materyal ve Yöntem	82
3.1.1.1 Kimyasal Bileşikler	82
3.1.1.2 Sentez Yöntemleri	82
3.1.1.3 Analitik Kontroller	84
3.1.1.3.1 Erime Derecesi Tayini	84
3.1.1.3.2 İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Analizler	84
3.1.1.3.2.1 Materyal	84
3.1.1.3.2.2 Yöntem	85
3.1.1.3.3 Spektrometrik Kontroller	85
3.1.1.3.3.1 IR Spektrumları	85
3.1.1.3.3.2 <sup>1</sup> H-NMR Spektrumları	85
3.1.1.3.3.3 Elementel Analizler	85
<b>3.2 Biyolojik Etkinlik Çalışmaları</b>	<b>86</b>
3.2.1 COX-1 Enzimi İnhibitör Aktivite Testi	86
3.2.1.1 Materyal	86
3.2.1.2 Yöntem	87
3.2.1.2.1 Örneklerin Hazırlanması	87
3.2.1.2.1.1 Reajanların Hazırlanması	88
3.2.1.2.2 Analiz Prosedürü	88
3.2.1.2.3 Hesaplamalar	90
3.2.2 COX-2 Enzimi İnhibitör Aktivite Testi	91
3.2.2.1 Materyal	91
3.2.2.2 Yöntem	92
3.2.2.2.1 Örneklerin Hazırlanması	92
3.2.2.2.1.1 Reajanların Hazırlanması	93
3.2.2.2.2 Analiz Prosedürü	93

3.2.2.2.3	Hesaplamalar	95
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>Kimyasal Çalışmalar</b>	<b>97</b>
4.1.1	5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol (Bileşik 1)	97
4.1.2	5-Kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol (Bileşik 2)	98
4.1.3	5-Kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol (Bileşik 3)	99
4.1.4	5-Kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol (Bileşik 4)	101
4.1.5	5-Kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol (Bileşik 5)	102
4.1.6	5-Kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol (Bileşik 6)	103
4.1.7	Etil [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 7)	104
4.1.8	Etil {5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 8)	106
4.1.9	Etil {5-kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 9)	107
4.1.10	Etil {5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 10)	108
4.1.11	Etil {5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 11)	110
4.1.12	Etil {5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 12)	111
4.1.13	[5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 13)	112
4.1.14	{5-Kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetik asit (Bileşik 14)	114
4.1.15	{5-Kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetik asit (Bileşik 15)	115
4.1.16	{5-Kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetik asit . 1,5 H <sub>2</sub> O (Bileşik 16)	116
4.1.17	{5-Kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetik asit (Bileşik 17)	118
4.1.18	{5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3 <i>H</i> -benzoksazol-3-il}asetik asit (Bileşik 18)	119
<b>4.2</b>	<b>Biyolojik Etki Çalışması</b>	<b>120</b>
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>123</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ</b>	<b>132</b>
<b>7.</b>	<b>ÖZET</b>	<b>134</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>135</b>
<b>9.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>136</b>

## II. ŞEKİLLER

Şekil 1: Araşidonik Asit Metabolizması	6
Şekil 2: Siklooksijenaz aktivitesi sonucu üretilen prostanooidlerin biyolojik etkinlikleri	8
Şekil 3: Fare COX-2 enziminin yapısı	9
Şekil 4: COX-2 enziminin aktif yapısı ve şematik gösterimi	10
Şekil 5: Non-steroidal antienflamatuvar ilaçların COX-1 ve COX-2 enzimine etkileri	15
Şekil 6: COX izoenzimlerinin kardiyovasküler biyolojideki rolleri	31
Şekil 7: Tromboksan A <sub>2</sub> katabolik yolağı	34
Şekil 8: Elektromanyetik dalga spektrumu	39
Şekil 9: Polarografik Yöntem ile Ölçülen Oksijen Tüketim Hızı	70
Şekil 10: Antikor yapısı ve işlevsel bölgeleri	72
Şekil 11: Poliklonal antikorların çoklu özgüllüğü	73
Şekil 12: Monoklonal antikorların değişmez özgüllükleri	74
Şekil 13: Enzimler ve kromojen substratları	77
Şekil 14: Doğrudan ELISA diyagramı	78
Şekil 15: Dolaylı ELISA, Sandviç ELISA ve Yarışmalı ELISA diyagramı	80
Şekil 16: Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapısı	126

## III. TABLOLAR

Tablo 1: COX-1 ve COX-2 enziminin kıyaslanması	11
Tablo 2: NSAİ'lerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları	14
Tablo 3: 1,3-Diaril Heterosiklik halka iskeletine sahip bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör etkileri	20
Tablo 4: 1,3-Diaril Heterosiklik halka iskeletine sahip bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör etkileri	21
Tablo 5: NSAİ ilaçların selektif COX-2 inhibitörlerine modifikasyonu sonucu oluşan bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör etkinlikleri	26
Tablo 6: Işınım çeşidi ve bağ enerjilerinin kıyaslanması	40
Tablo 7: 1,2,4-Triazol yapısının fenaçillenmesinde mikrodalga ve konvansiyonel ısıtmalı reaksiyonlar için çözücü etkisi	49
Tablo 8: TXB <sub>2</sub> test plan sayfası	89
Tablo 9: PGE <sub>2</sub> test plan sayfası	94
Tablo 10: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 inhibitör aktivite sonuçları	121
Tablo 11: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-2 inhibitör aktivite sonuçları	122
Tablo 12: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite sonuçları	127
Tablo 13: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin erime derecesi, % verim, % COX-1 ve % COX-2 inhibisyonları	133



## 1. GİRİŞ

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAİ), analjezik, antipiretik, antienflamatuvar aktivite gösteren, akut ve kronik enflamasyon bozukluklarında kullanılan dünyada çok geniş kullanım alanına sahip ilaçlardır. Non-steroidal antienflamatuvar ilaçların kullanımı binlerce yıl önce salisilik asit içeren bitki özlerinin ağrı, enflamasyon ve ateş tedavisinde kullanılmasına dayanmaktadır<sup>1</sup>. 1899 yılında salisilik asitin asetillenmesiyle oluşan asetilsalisilik asit (Aspirin®) ilk non-steroidal antienflamatuvar ilaç olarak kullanıma sunulmuştur<sup>2</sup>.

1971 yılında Vane ve arkadaşları aspirin ve diğer tüm non-steroidal antienflamatuvar ilaçların prostaglandin biyosentezini inhibe ederek etki gösterdiklerini bulmuşlardır. Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar terapötik etkinliklerini çeşitli biyoaktif lipitlerin oluşumuna neden olan araşidonik asit yolağındaki siklooksijenaz enzimini (COX) inhibe ederek göstermektedirler<sup>1</sup>.

1988 yılında Needleman ve arkadaşları lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenmeyen ve deksametoksazon ile inhibe edilemeyen prostaglandin oluşumundan iki çeşit siklooksijenaz enzimini sorumlu tutmuşlardır. Bu enzimler; bazal prostaglandinlerin oluşumundan sorumlu olan COX-1 ve enflamasyon reaksiyonlarına aracılık eden indüklenebilir özellikteki COX-2 enzimleridir<sup>2,3</sup>. 1991 yılında ise indüklenebilir bir form olan COX-2 enzimi klonlanmış ve böylece COX-2 enziminin varlığı ispatlanmıştır<sup>3</sup>.

COX-1 enzimi, birçok dokuda üretilmekte, gastrik mukozanın devamlılığı, renal kan akışının düzenlenmesi ve platelet agregasyonu gibi yararlı olaylarda prostaglandinlerin oluşumunu sağlamaktadır.<sup>4-8</sup>

İndüklenebilir form olan COX-2 enzimi ise sitokinler, büyüme faktörleri, tümör geliştirici ajanlar, bakteriyal endotoksinler gibi pro-enflamatuvar uyaranlara cevaben enflamasyonlu hücrelerde indüklenmektedir<sup>9</sup>. COX-2 enziminin bazal seviyede çok az olması ve patolojik durumlarda artması COX-2 enziminin kötü enzim olduğu yönünde değerlendirilmesine yol açmaktadır<sup>2</sup>.

COX-2 enzimi sitokin ve enflamatuvar uyaranlarla indüklendiği için non-steroidal antienflamatuvar ilaçların antienflamatuvar

etkilerinin COX-2 inhibisyonundan, gastrik, barsak mukozal hasarı ve böbrek toksisitesi gibi istenmeyen yan etkilerinin ise COX-1 inhibisyonundan kaynaklandığı (COX-2 hipotezi) ileri sürülmüştür<sup>10</sup>.

COX-1 ve COX-2'nin değişik doku dağılımı, gastrointestinal ve hematolojik yan etki göstermeksizin analjezik ve anti-enflamatuvar etki gösteren selektif COX-2 inhibisyonunun önemini ortaya çıkarmıştır<sup>5</sup>.

Selektif COX-2 inhibisyonun önem kazanması sonucu 500'den fazla COX-2 inhibitörü bileşik sentezlenmiştir<sup>2</sup>.

Selektif COX-2 inhibitörleri yapı olarak çoğunlukla merkezi siklik halkaya bağlı 1,2-diaril sübstitüsyonu içerselerde 1,3-diaril sübstitüsyonu içeren selektif COX-2 inhibitörleri de literatürlerde bulunmaktadır<sup>11-15</sup>.

Rofekoksib (Vioxx®) ve selekoksib (Celebrex®) ilk selektif COX-2 inhibitörleri olarak klinik kullanıma sunulmuş<sup>1</sup> ardından valdekoksib klinik kullanıma girmiştir. Lumirakoksib ve parekoksib ise hala onay bekleyen selektif COX-2 inhibitörü bileşiklerdir.

Klinik gelişmelerle aynı zamanda ortaya çıkan selektif COX-2 inhibitörleri (koksibler) ile ilgili sonuçlar, COX-2 hipotezinin aksine, COX-2 enziminin sadece ağrı ve enflamasyona eşlik eden prostaglandinlerin mediyatörü olmadığını, aynı zamanda bu enzimin damar fonksiyonu, trombozis, aynı zamanda kan basıncını da etkileyen bir enzim olduğunu göstermiştir<sup>16</sup>.

Selektif COX-2 inhibitörlerinin gastrointestinal güvenlik profillerini belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda bu bileşiklerin kardiyovasküler yan etki potansiyelleri ortaya çıkmıştır. VIGOR ve APPROVE çalışmalarının sonucu rofekoksibin, CABG-1 ve CABG-2 çalışmalarının sonucu valdekoksibin piyasadan kalkmasına sebep olmuştur. CLASS, APC ve ADAPT çalışmasının sonuçlarından yola çıkılarak ise selekoksibin kullanımına sınır getirilmiştir<sup>17</sup>.

Endotelde prostasiklin üretimi baskın olarak COX-2 enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Selektif COX-2 inhibitörleri, COX-1 tarafından üretilen tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) sentezini etkilemezken COX-2 kaynaklı prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) üretimini baskılamaktadır. COX-2 kaynaklı

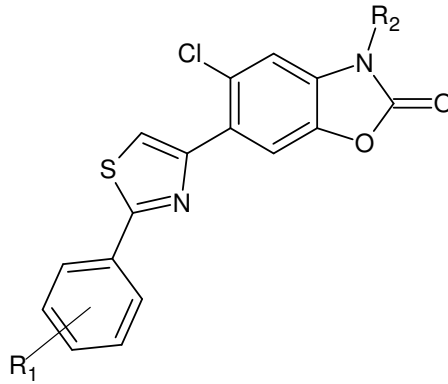
prostasiklin inhibisyonu, artmış TXA<sub>2</sub> / PGI<sub>2</sub> oranından dolayı trombotik uyarılara karşı trombotik cevabı arttırmakta dolayısıyla istenmeyen kardiyovasküler olaylara karşı eğilim artmaktadır<sup>17</sup>.

Prostasiklin oluşumunu etkilemeden, prostasiklin antagonisti olarak bilinen TXA<sub>2</sub> miktarını azaltan ilaçların, TXA<sub>2</sub> artışı ile seyreden hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir<sup>50</sup>. Bu amaçla, tromboksan A<sub>2</sub> sentaz enzimini inhibe eden çeşitli TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörleri sentezlenmiş ve klinik olarak değerlendirilmişlerdir<sup>18</sup>.

TXA<sub>2</sub> sentezinin baskılanmasıyla kardiyoprotektif etki görülmekte bu ise selektif COX-2 inhibitörleri ile tedaviye yeni bir boyut kazandırmaktadır<sup>19, 20</sup>.

Literatür bilgileri ışığında, bu çalışmada 1,3-diaril tiyazol yapısına sahip selektif COX-2 inhibitör özellik göstermesi beklenen 18 adet bileşik sentezlenmesi ve sentezlenen bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Sentezlenmesi planlanan bileşiklerin merkezi halkasını, tiyazol halkası, aril sübstitüyonlarını ise 5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol ve sübstitüe fenil türevleri oluşturmaktadır. Sentezlenmesi planlanan bileşiklerden (5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol)-3-ilalkanoik asitlerin, TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörlerinin farmakofor gruplarına sahip olması dolayısıyla hem TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörü hem de selektif COX-2 inhibitörü özellik göstermesi beklenmektedir. Sentezlenmesi planlanan bileşiklerin yapıları aşağıda gösterilmiştir.



R<sub>1</sub> = H, 2-Cl, 4-Cl, 4-OCH<sub>3</sub>, 2-F, 4-F

R<sub>2</sub> = H, CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>COOH

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Enflamasyon

Enflamasyon (İltihap);

Canlı ve damarlı dokularda yerel zedelenmeye karşı gelişen ve organizmayı korumaya yönelik bir dizi reaksiyonların tümü olarak adlandırılmaktadır<sup>21</sup>.

Enflamasyon, hem hücre zedelenmesini ortaya çıkaran nedeni ortadan kaldırmak hem de hücresel zedelenme sonucu oluşan nekrotik hücreler ve dokuları ortamdaki uzaklaştırmak için gerekli bir koruyucu yanıttır<sup>22</sup>.

Enflamasyonun klinik olarak dört ana belirtisi olan rubor (kırmızılık), calor (sıcaklık), tumor (şişlik) ve dolor (ağrı) birinci yüzyılda Celsus tarafından tanımlanmıştır<sup>21</sup>.

Enflamasyon, akut ve kronik enflamasyon olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır;

**Akut enflamasyon:** Nispeten kısa süreli (birkaç dakika-birkaç gün gibi), plazma sıvı ve protein eksüdasyonu ve belirgin nötrofil lökosit birikimi ile karakterize olan enflamasyondur.

**Kronik enflamasyon:** Karakteristik histolojik bulgusu lenfosit ve makrofaj toplanması olan, doku yıkımı ve onarımı ile karakterize daha uzun süreli (günler-yıllar gibi) enflamasyondur.

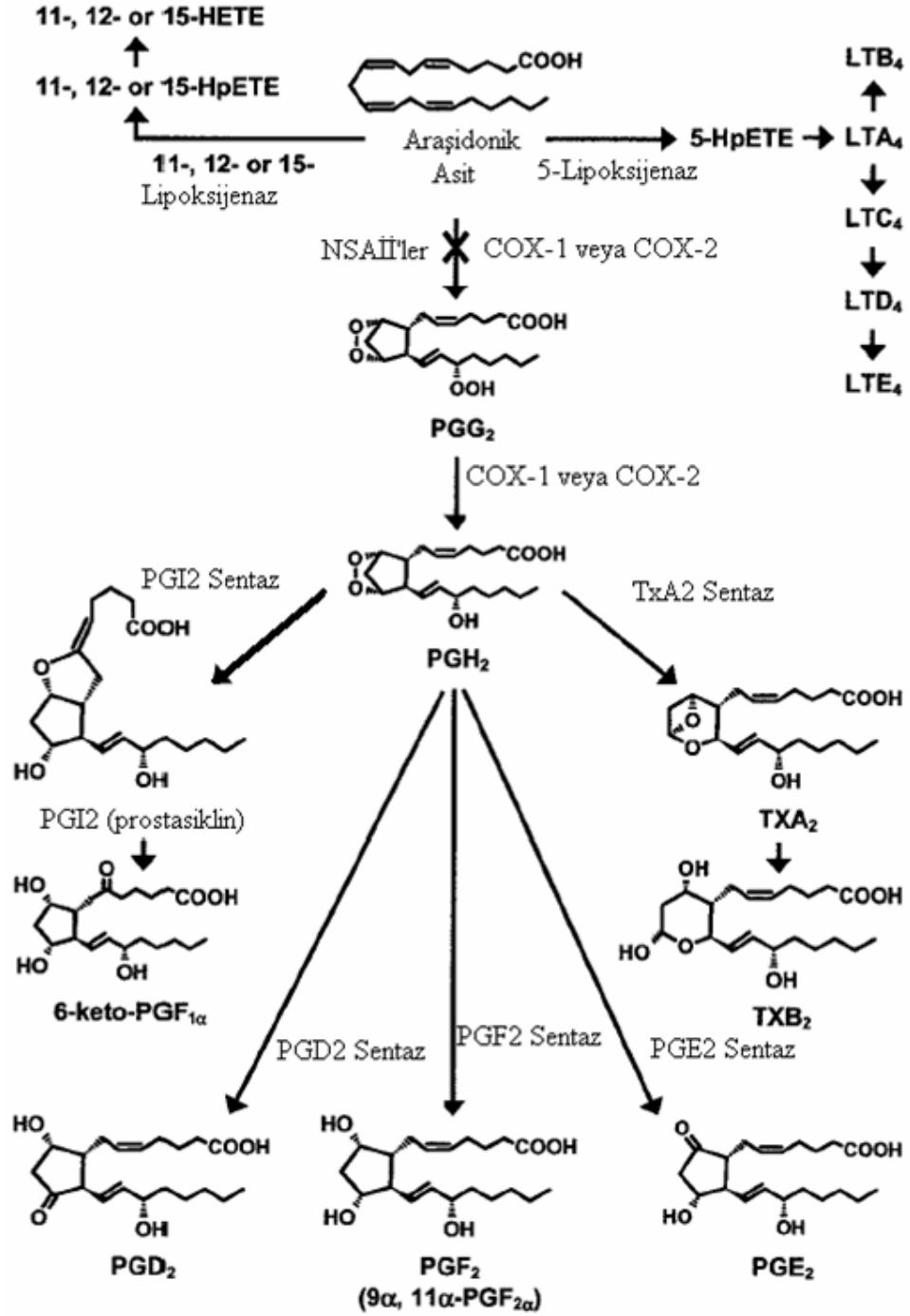
En sık rastlanılan ve en temel patolojik reaksiyon olan enflamasyonun nedenleri arasında; canlı etkenler, fiziksel etkenler, kimyasal etkenler, immünite reaksiyonu yapan etkenler, anoksemi, bazı hormonal etkiler, tümörler ve bilinmeyen nedenler sayılabilmektedir<sup>21</sup>.

Araşidonik asit metabolizmasından kaynaklanan ürünler, enflamasyon ve hemostaz olmak üzere birçok biyolojik olay üzerine etkili

bulunmuştur. Bu ürünler kısa zamanlı hormonlar olup, yapıldıkları yerlerde lokal olarak etki etmekte daha sonra çok hızlı olarak spontan veya enzimatik şekilde yok edilmektedir<sup>23</sup>.

Araşidonik asit 20 karbonlu poliansatüre bir yağ asitidir ve primer olarak diyetdeki linoleik asitten türer ve vücutta yalnızca ester şeklinde hücre membran proteinlerinin bir komponenti olarak bulunur. Araşidonik asit fosfolipitlerden hücrenel fosfolipazlar yoluyla salınmaktadır ve araşidonik asit metabolizması, siklooksijenaz ve lipoksijenaz olarak bilinen iki biyokimyasal yolda ilerlemektedir.

## Araşidonik Asit Yolağı



Şekil 1: Araşidonik Asit Metabolizması

## 2.2 Siklooksijenaz Enzimi

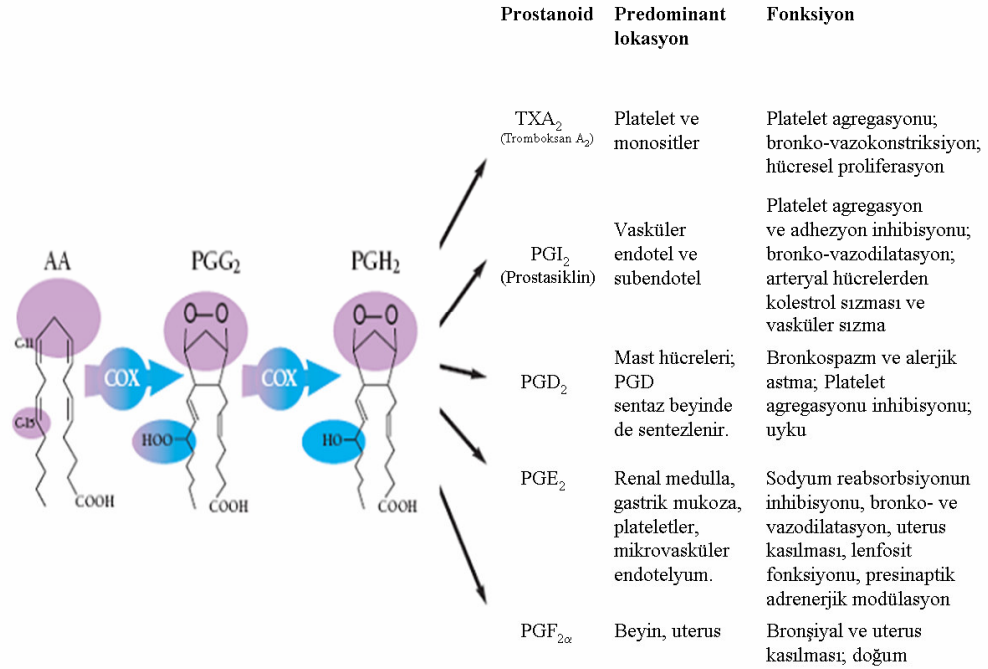
Aspirin ve diğler non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar ağrı ve enflamasyonla birlikte seyreden çeşitli iskelet kas sistemi bozukluklarında kullanılan dünya çapında çok geniş kullanım alanına sahip ilaçlardır<sup>4, 7, 24</sup>.

Bu geniş kullanım alanlarına rağmen, 1971 yılına kadar non-steroidal antienflamatuvar ilaçların (NSAİİ) etki mekanizması pek bilinmemekteydi. 1971 yılında Sir John Vane, non-steroidal antienflamatuvar ilaçların etkilerini, bu ilaçların prostaglandin sentezindeki siklooksijenaz yolağını inhibe ederek gösterdiklerini bulmuştur<sup>4, 7, 24, 25</sup>. Bu bulgu daha sonraları prostaglandinlerin enflamasyon alanında tespit edilmesi ve enflamasyon belirtilerinin oluşmasında önemli rol oynaması ile desteklenmiştir. NSAİİ ilaçların biyomoleküler hedefleri 1976 yılına kadar koyun veziküler bezinden saf ve enzimatik olarak aktif COX izole edilene kadar belirlenememiştir<sup>7</sup>.

1990'lı yılların başlangıcında ise, indüklenebilir form olan COX-2 izoenziminin keşfi tüm dikkatleri siklooksijenaz enzimi üzerine çekmiştir<sup>4</sup>.

Siklooksijenaz enzimi (COX) ya da diğler adıyla prostaglandin endoperoksit H sentaz; membran bağımlı bifonksiyonel bir enzim olup siklooksijenasyon ve peroksidasyon olarak bilinen ve prostaglandinlerin (PG) ve tromboksanların (Tx) oluşumuyla sonuçlanan prostaglandin sentez yolağındaki ilk iki basamağı katalizlemektedir. İlk basamakta COX; hücrel fosfolipitlerden fosfolipaz A<sub>2</sub> enzimi varlığında salınan ve bir yağ asiti olan araşidonik asiti siklize etmekte, araşidonik asite iki molekül oksijen katarak siklik hidroperoksit PGG<sub>2</sub>'yi oluşturmaktadır. Ardından COX, PGG<sub>2</sub>'yi PGH<sub>2</sub>'ye redüklemektedir. Biyosentezde yer alan PGH<sub>2</sub> dayanıksız bir endoperoksit olduğu için spesifik sentaz ve izomerazlar tarafından PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostasiklin) TxA<sub>2</sub>'ye dönüştürülmektedir<sup>26</sup>. Bu yolaklar Şema-1'de gösterilmiştir.

Prostaglandinlerin insan vücudunda fizyolojik olayları kontrol etmek, ağrı ve enflamasyon durumlarına aracılık etmek gibi çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır. Hangi prostaglandinlerin üretileceğı doku tipine bağılı olarak değışmektedir. Siklooksijenaz katalizi sonucu elde edilen prostanoidlerin biyolojik aktiviteleri Şekil 1'de gösterilmiştir<sup>27</sup>.



**Şekil 2: Siklooksijenaz aktivitesi sonucu üretilen prostanoidlerin biyolojik etkinlikleri**

### 2.2.1 Siklooksijenaz Enzimleri Arasındaki Yapısal Farklılıklar

Siklooksijenaz enzimleri; endoplazmik retikulumun ve (özellikle COX-2 için çekirdek zarfının) lümenal yüzeyinde yerleşmiş "hem" içeren membran proteinleridir<sup>9</sup>.

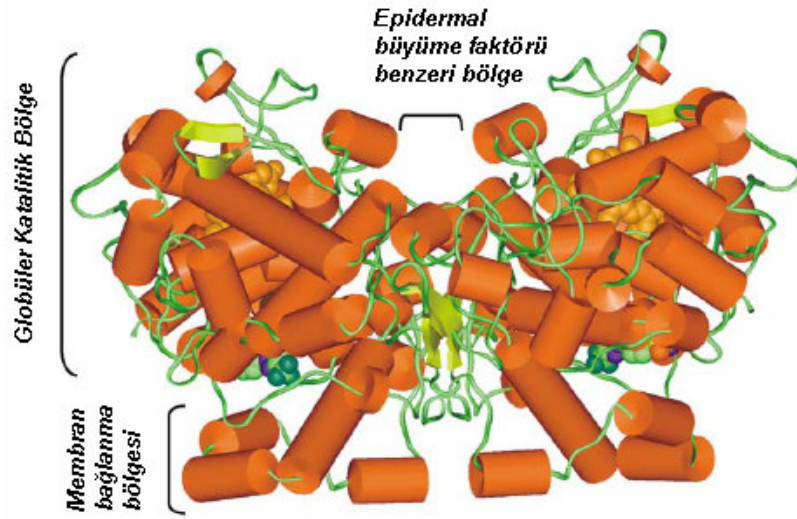
Bu iki enzimin 3 boyutlu yapıları X-ray kırınımı ile belirlenmiştir. Bu enzimler homodimer olarak bulunmakta ve her monomer 3 kısımdan oluşmaktadır<sup>9</sup>.

- 1) N-terminal epidermal büyüme faktörü benzeri kısım.
- 2)  $\alpha$  – helikal membran bağlanma bölgesi.
- 3) Peroksidaz ve siklooksijenaz aktif bölgesini içeren C-terminal globüler katalitik bölge.



Siklooksijenaz aktif bölgesi her iki izoenzimde de katalitik çekirdekten membran bağlanma bölgesine uzanan uzun dar bir hidrofobik kanal içermektedir.

Araşidonat bağlanma bölgesi, Arjinin 120'den Tirozin 385'in yakınına kadar uzanmakta ve kanalın üst yarı kısmında bulunmaktadır. Aspirin tarafından asetillenmiş Serin 530 ise kanalın ortasında bulunmaktadır<sup>9</sup>.

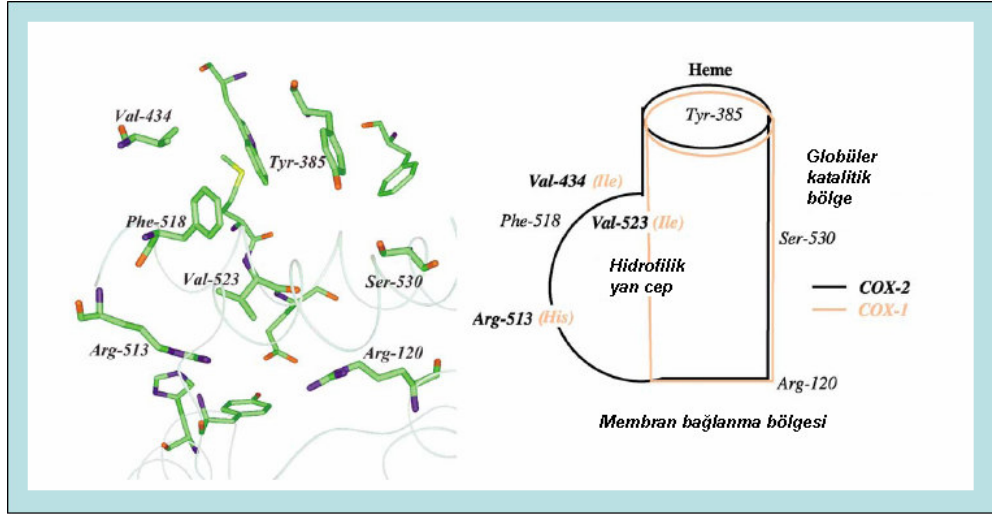


Şekil 3: Fare COX-2 enziminin yapısı

Araşidonik asitin prostaglandinlere dönüşümünü sağlayan siklooksijenaz enziminin iki izoformu bulunmaktadır; COX-1 ve COX-2.

COX-1 ve COX-2 enzimi; siklooksijenaz aktif bölge yapısı, katalitik mekanizma, ürünler ve kinetik açıdan benzerlik gösterebilir, izoenzimler arasındaki iki yapısal fark bu iki izoenzimin farmakolojik ve biyolojik açıdan önemlerini ortaya koymaktadır. Öncelikle, COX-2 enzim aktif bölgesinin COX-1'den daha büyük olması, COX-2 enzime spesifik NSAİ ilaç geliştirmenin önemini ortaya çıkarmaktadır. İkinci olarak ise COX-1 ve COX-2'nin benzer kinetik özellikli olmalarına rağmen COX-1 enziminin düşük araşidonat konsantrasyonlarında negatif allosterizm gösterirken, COX-2 enziminin bu özelliği gösteremiyor olması aynı hücrede sentez edilen izoenzimlerden COX-2'nin COX-1'e nazaran, yeni salınan araşidonat için çok daha etkili bir şekilde yarışacağını göstermektedir<sup>28,29</sup>.

COX-2 enziminin siklooksijenaz aktif bölgesi, COX-1 enziminden şekil olarak biraz farklı olmakla birlikte %20 daha fazla büyüktür. Aktif merkezin büyüklüğü ve şeklindeki farklılık COX-1 ve COX-2 enzimi arasındaki 3 amino asidin farklılığından kaynaklanmaktadır. Bu farklılık, COX-1'in aktif bölgesinin birinci kabuğunda yer alan İzolösin 523'ün COX-2 enziminde Valin 523 ile, COX-1'deki ikinci kabuğu çevreleyen, İzolösin 434'ün COX-2 enziminde Valin 434 ve COX-1'deki Histidin 513'ün COX-2'de Arjinin 513 ile yer değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. Diğer önemli yapısal fark ise siklooksijenaz enziminin membran bağlayıcı bölgesindeki son dört heliks'in konumlarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. COX-2 enzimidaki helikal kısım, membran bağlanma bölgesinde daha geniş alan sağlamak üzere üste doğru dirsek oluşturmuştur ve sonuç olarak COX-2 enzimidaki Arjinin 120 enziminin yerini almıştır<sup>28</sup>.



**Şekil 4: COX-2 enziminin aktif yapısı ve şematik gösterimi**

COX-1 ve COX-2 enziminin gen yapısı, gen regülasyonu, protein yapısı, kinetik ve inhibisyon özellikleri açısından kıyaslanmaları Tablo 1'de gösterilmiştir<sup>2,9</sup>.

**Tablo 1: COX-1 ve COX-2 enziminin kıyaslanması**

<b>Parametre</b>	<b>COX-1</b>	<b>COX-2</b>
Gen büyüklüğü	22 kb	8,3 kb
Eksonlar	11	10
Kromozom	9q32-q33,3	1q25,2-q25,3
mRNA	2,8 kb	4,1 kb
mRNA regülasyonu	Konstitütif	İndüklenebilir(>50 kat)
İndükleyiciler	-	Sitokin, LPS, Forbol esteri
Aminoasitler	576	587
Moleküler ağırlık	70 kDa	70-72 kDa
Yerleşke	Çekirdek zarı, ER	Çekirdek zarı, ER
Kofaktörler	1 molHem	1 molHem
Glikozilasyon	-N, 3.bölge	-N, 3 ya da 4.bölge
Aspirin asetilasyon bölgesi	Ser529	Ser529
Substrat spesifitesi	Araşidonik asit, γ-linolenik asit	Araşidonik asit, γ-linolenik asit, α-linolenik; eikozapentenoik asit
Aktivite	23 mmol AA/mg/dk	11 mmol AA/mg/dk

COX-1 enzimi birçok dokuda konstitütif olarak üretilmekte fizyolojik olaylarda yer alan prostanooidlerin miktarını arttırmaktadır. Gastrointestinal kanalda prostasiklin ve PGE<sub>2</sub> gastrik asit sekresyonunu azaltarak gastrik mukoza damarlarında vazodilatör etki göstermektedir. Ayrıca prostasiklin ve PGE<sub>2</sub> koruyucu bariyer olarak görev yapan mukus ve duodenal bikarbonat üretimini stimüle etmektedir. Vazodilatör prostaglandinler (prostasiklin, PGE<sub>2</sub> ve PGD<sub>2</sub>) böbrekte kan akışının düzenlenmesi, vasküler direncin azaltılması, böbrek kan damarlarının genişlemesi ve organ perfüzyonun artırılmasında anahtar rol oynamaktadırlar. COX-1 enzimi beyindeki tüm nöronlarda özellikle ön beyinde bol miktarda bulunmaktadır. COX-1 enzimi fetal ve amniyotik hücrelerde üretilmekte ve hamileliğin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda COX-1 enzimi hamileliğin erken safhalarında uterus epitelinde üretilmekte ve yumurtanın implantasyonu ve plasenta oluşumu için anjiyogenezis de önemli rol oynayabilmektedir<sup>10</sup>. Plateletlerde üretilen COX-1 ise platelet agregasyonundan sorumlu tromboksanların oluşumunda anahtar rol oynamaktadır<sup>3</sup>.

COX-2 enzimi ise, enflamasyonlu ve neoplastik dokularda üretilmekte, büyüme faktörleri, vasküler endotelial büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve sitokinler gibi proinflamatuvar ve mitojenik uyarılarla indüklenmektedir<sup>4-6,8</sup>. Ayrıca makrofajlardaki COX-2 üretimi platelet aktive edici faktör (PAF) ve PGE<sub>2</sub> tarafından da uyarılabilmektedir<sup>10</sup>. COX-2 tarafından üretilen prostaglandinler enflamasyon reaksiyonlarında büyük rol oynayarak karakteristik

enflamasyon belirtilerinin (kızarıklık, ağrı, ödem, ateş ve fonksiyon kaybı) oluşmasına yol açmaktadırlar<sup>9</sup>.

Bu durum; gastrointestinal ve böbrek fonksiyonlarının yürütülmesinden COX-1 enziminin, enflamasyon, ağrı, ateş oluşumundan ise COX-2 enziminin sorumlu olduğu hipotezinin ortaya çıkmasına neden olmuştur<sup>2,3</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu iki izoform arasındaki ilişkinin bu kadar basit olmadığını ortaya çıkarmıştır<sup>9</sup>. COX-1 enzimi enflamasyon oluşumuna katkıda bulunabilirken, COX-2 enzimi de belirli dokularda konstitütif olarak bulunmakta ve birçok organın normal fonksiyonunu sürdürmesinde rol oynamaktadır<sup>9,25</sup>.

İndüklenebilir ya da konstitütif izoform olan COX-2 enziminin üreme, bağışıklık, renal fizyoloji, nörotransmisyon, kemik rezorpsiyonu ve pankreatik sekresyon, yara iyileşmesi gibi çeşitli biyolojik olaylarda spesifik fonksiyonları bulunmaktadır<sup>28</sup>.

COX-2'nin keşfi siklooksijenaz biyolojisini anlamakta çok büyük bir ilerleme olsa bile bu durum herşeyi açıklamaya yeterli olmamaktadır. Örneğin; asetaminofenin (parasetamol) etki mekanizması ve aspirinin analjezik ve antipiretik etkisini antienflamatuvar etki göstermeksizin nasıl gösterdiği hala tam olarak bilinmemektedir.

Asetaminofen terapötik konsantrasyonlarda COX-1 ve COX-2 enzimlerini çok zayıf bir şekilde inhibe etmektedir. Asetaminofen zayıf antienflamatuvar etki göstermesine rağmen, güçlü antipiretik ve analjezik özelliği asetaminofenin non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar sınıfına girmesine yol açmıştır.

2002 yılında Dan Simmons ve arkadaşları asetaminofenin moleküler hedefi olan, COX-1 ve COX-2'den farklı, yeni bir siklooksijenaz enziminin varlığından bahsetmiştir. COX-1 varyantı olan bu enzime COX-3 denilmiştir<sup>30-35</sup>. COX-3 enziminin insan serebral korteksi ve kalbinde<sup>26</sup> bol miktarda bulunduğu ve asetaminofen ve benzeri bileşiklere duyarlı olduğuna dair bilgilere literatürlerde rastlanmaktadır<sup>30-35</sup>.

İndüklenebilir COX-2 varyantı olduğu düşünülen COX-4 enziminin varlığı ise tartışmalıdır<sup>33</sup>.

### 2.2.2 Non-steroidal Antienflamatuvar İlaçlarla Siklooksijenaz Enzim İnhibisyonu

Narkotik olmayan analjeziklere bu grup ilaçların farmakolojik etki profiline uygun düşen bir adla **non-steroidal (steroid olmayan) antienflamatuvar ilaçlar (NSAİİ'ler)** veya kısaca **antienflamatuvar analjezikler** denilmektedir. Bu grup analjeziklerin antienflamatuvar etkinliği, antienflamatuvar steroidler olan glukokortikoidlerinkine göre daha zayıftır. Analjezik etkinlikleri de antienflamatuvar etkileri olmayan, güçlü narkotik analjeziklerinkine göre daha zayıftır<sup>36</sup>.

NSAİİ'ler yüzeysel yapıların ağrılarında, özellikle ağrı hafif ve orta derecede ve künt nitelikte ise, yeterli analjezi yapmaktadırlar. Başağrısı, myalji, artralji, dişağrısı gibi genellikle lokal iltihabi reaksiyona bağlı olan ağrı çeşitlerinde kullanılmaktadırlar. NSAİİ'lerin pek çoğu, hem analjezik hem antipiretik hem de antienflamatuvar etkinlik göstermektedirler. Bazılarında ise sadece analjezik ve antipiretik etkiler bulunmaktadır (asetaminofen gibi)<sup>36</sup>.

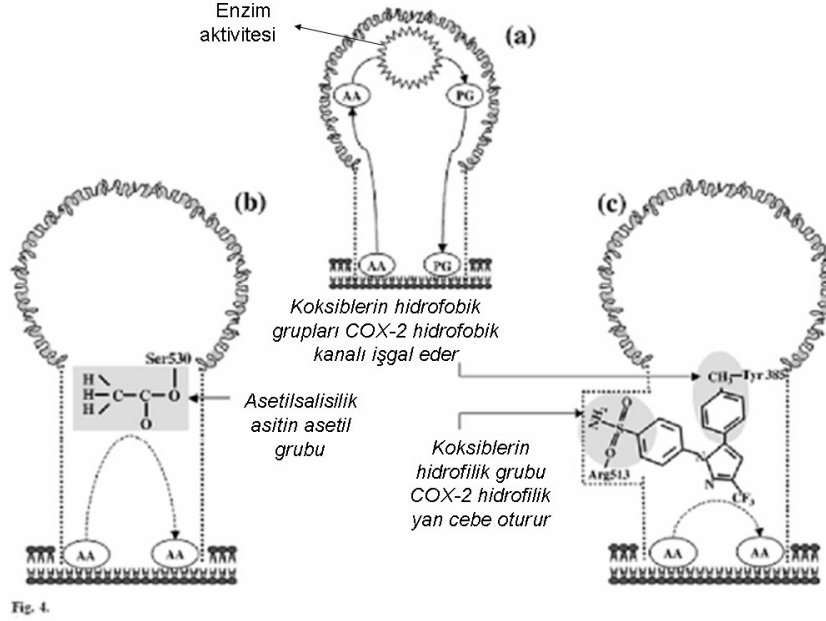
NSAİİ'lerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları Tablo 2'de gösterilmiştir<sup>37</sup>.

**Tablo 2: NSAİ'lerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları**

<b>Kimyasal Gruplar</b>	<b>Jenerik İlaçlar</b>
1. Salisilatlar	Salisilik asit, asetil salisilik asit (aspirin), sodyum salisilat, metil salisilat, diflunisal
2. Paraaminofenol türevleri	Asetaminofen (parasetamol)
3. Pirazolon türevleri	Aminopirin, propifenazon, dipiron (metamizol), oksifenbutazon, fenilbutazon
4. Profenler(Fenilpropiyonik türevleri)	İbuprofen, flurbiprofen, naproksen, fenbufen, tiaprofenik asit, ketoprofen, fenoprofen kalsiyum
5. Fenilasetik asit türevleri	Nabumeton, diklofenak sodyum, fenklofenak, etodolak
6. İndolasetik asit türevleri	İndometazin, asemetazin, sulindak, ketorolak trometamol, tolmetin
7. Fenamik asit türevleri	Mefenamik asit, flufenamik asit, etofenamit
8. Oksikam türevleri	Piroksikam, tenoksikam
9. Diğerleri	Prokuazon, azapropazon, metotrimoprazin

Tedavide kullanılan NSAİ ilaçların çoğu, COX-1 ve COX-2 arasında belirgin bir seçicilik göstermeyen COX inhibitörleridir (özgül olmayan COX inhibitörleri)<sup>36</sup>.

Aspirin, insanda COX-1 enziminin kovalent ve geri dönüşümsüz inhibisyonunu Ser-529 aminoasitini asetilleyerek gerçekleştirmektedir. Asetillenmiş serin yan zinciri, araşidonik asitin enzimin katalitik bölgesine girmesini engellemektedir. Benzer şekilde aspirin, insan COX-2 enzimidaki Ser-516 aminoasitini de asetillemektedir. Fakat bu durum COX-1 inhibisyonuyla kıyaslandığında 10-100 kat daha zayıftır<sup>38</sup>.



**Şekil 5: Non-steroidal antienflamatuvar ilaçların COX-1 ve COX-2 enzime etkileri**

NSAİ ilaçlarla tedavinin en büyük yan etkisi, gastrointestinal rahatsızlık, perforasyon, ülser ve kanamadır. NSAİ ilaçlarla prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu, platelet disfonksiyonu ve buna bağlı olarak kanamaya neden olmaktadır<sup>39</sup>. NSAİ ilaçlarla tedavi olan hastaların %5' inde sıvı tutulumu gibi renal yan etkiler de görülmüştür<sup>39</sup>.

NSAİ ilaçların yararlı etkilerinin COX-2 inhibisyonuna ve zararlı etkilerinin COX-1 inhibisyonuna bağlı olduğuna inanılması, COX-2'yi selektif veya spesifik (özgül) olarak inhibe eden bir ilacın, bu iki izoformun ikisini de inhibe eden (dual etkili) NSAİ'lerden daha güvenli olacağına düşünülmesine sebep olmuştur<sup>36</sup>.

Selektif COX-2 inhibitörleri, COX-1 enzimini yarışmalı bir şekilde çok yüksek konsantrasyonda inhibe ederken, COX-2 enzimini zamana bağlı, yavaş, geri dönüşümlü, enzimle sıkıca bağlı kompleks oluşturarak inhibe etmektedir<sup>38</sup>. Selektif (özgül) COX-2 inhibitörlerine; COX-2'yi tercih edenler adı da verilmektedir. Meloksikam, nimesulid ve etodolak tedavide kullanılmakta olan COX-2'ye seçici ilaçlardır<sup>36</sup>.

COX-2'nin özgül inhibitörleri ise klinikte kullanıldıkları maksimum dozlarda bile COX-1'i inhibe etmediği kabul edilen inhibitörlerdir. Bunlar terapötik doz düzeyinde gastrointestinal sistemdeki koruyucu COX-1'i inhibe etmedikleri için, klasik NSAİ'lerin aksine gastrointestinal yan tesirler oluşturmadan antienflamatuvar etki göstermektedirler<sup>36</sup>.

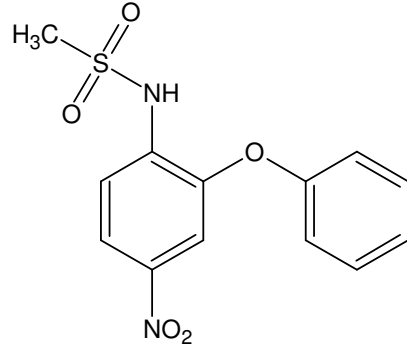
#### 2.2.2.1 Spesifik COX-2 İnhibitörlerinin Sınıflandırılması

Spesifik COX-2 inhibitörleri kimyasal yapılarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler:

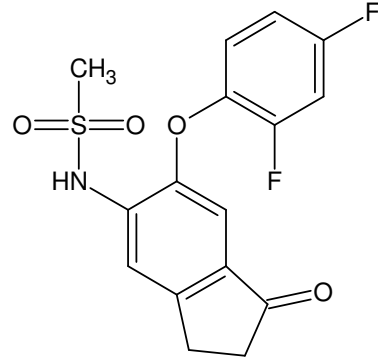
- 1) Heteroatom zinciri taşıyan diaril heterosiklik bileşikler
- 2) Diaril heterosiklik ve karbosiklik bileşikler
  - a) Orto-diaril heterosiklik ve karbosiklik bileşikler
  - b) 1,3-diaril heterosiklik bileşikler
  - c) 1,2-Diaril Stilben ve 1,1-Diaril Alken Türevleri
  - d) Dual COX-2/5 Lipoksijenaz (5-LO) İnhibitörü Olan Diaril Heterosiklik Bileşikler
  - e) Diaril Bisikloheterosiklik Bileşikler
- 3) Non-steroidal Antienflamatuvar ilaçların selektif COX-2 İnhibitörlerine modifikasyonu sonucu elde edilen bileşikler
- 4) Antioksidatif komponentli bileşikler

Heteroatom zinciri taşıyan diaril heterosiklik bileşiklerden Nimesulid, Flosulid ve NS-398 asidik sulfonamitlere örnek olarak verilebilmektedir. Heteroatom zinciri taşıyan asidik sulfonamitlerde ana hedef orto substitüent modifikasyonu ve halkanın para pozisyonuna elektron çekici bir grup getirilmesine dayanmaktadır<sup>1</sup>. Metilsülfon grubu olmaksızın da heterosiklik halka ve fenil halkasının arasına heteroatom veya karbonil köprüsünün girmesiyle COX-2 inhibitor potens ve selektivite gözlenmektedir<sup>1</sup>.

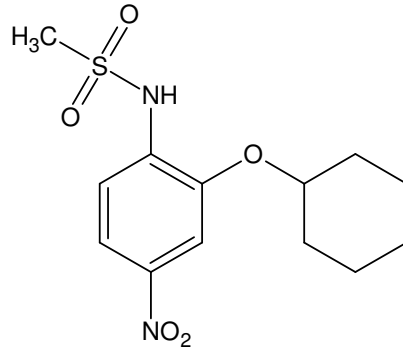




Nimesulid

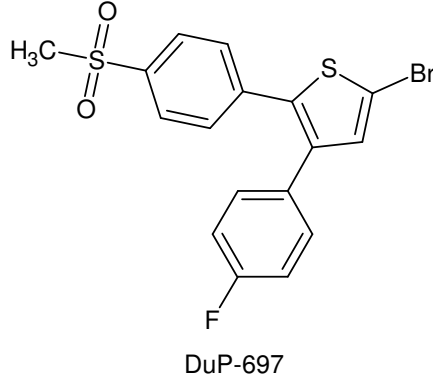


Flosulid

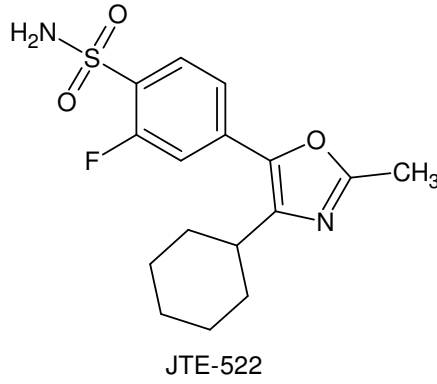


NS-398

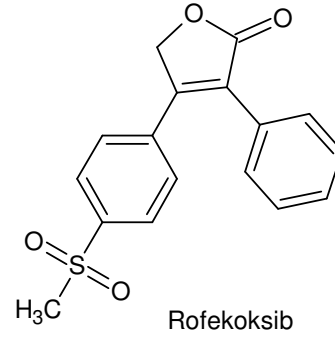
Diaril heterosiklik bileşikler merkezdeki halkaya visinal iki fenil halkasının bağlanmasıyla karakterizedir<sup>2</sup>. Bu bileşiklerden bazıları tiyazol, oksazol, furan, pirol, imidazol, pirazol, izoksazol, piridin, ve tiyofen gibi merkez halka üzerine temellenmişlerdir<sup>40</sup>. Optimal aktivite için aromatik halkalardan birisi metilsülfonil ya da sülfonamid yapısı içermelidir<sup>3,41</sup>. Metilsülfonil grubunun sülfonamidle yer değiştirmesi, selektivitede azalmaya neden olurken fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklerde artış gözlenmiştir. Bu grup bileşikler; 2,3-diariltiyofen türevi olan DUP-697'nin selektif COX-2 inhibisyonu göstermesi sonucu tasarlanmaya başlanmıştır<sup>1</sup>.



Orto-diaril heterosiklik bileşikler cis-stilben iskeleti taşıyan ve taşımayan diaril heterosiklik bileşikler olarak sınıflandırılabilirler<sup>1</sup>. Cis-stilben iskeleti taşıyan bileşikler tiyazol, tiyadiazol, 4,5-disübstitüe oksazol ve 4,5-disübstitüeimidazol ve 2(5*H*)-furanon halkası taşımaktadır. Bu grup bileşiklerden oksazol türevi JTE-522 ve 2(5*H*)-furanon türevi olan rofekoksib klinik olarak değerlendirilmişlerdir<sup>1</sup>.

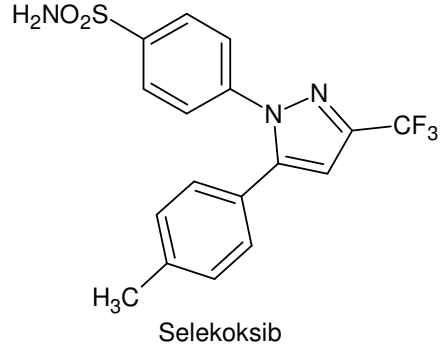


$IC_{50}(\text{COX-2}) = 0.30 \mu\text{M}$   
 $IC_{50}(\text{COX-1}) = 100 \mu\text{M}$



$IC_{50}(\text{COX-2}) = 0.5 \mu\text{M}$   
 $IC_{50}(\text{COX-1}) = 19.0 \mu\text{M}$

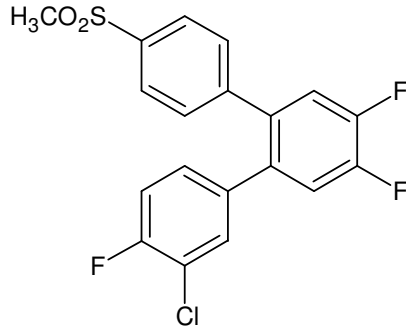
Cis-stilben iskeleti taşımayan orto-diaril heterosiklik bileşiklere selekoksib gibi di- ya da tri-sübstitüepirazol türevleri örnek olarak verilebilirler<sup>1</sup>. Cis-stilben iskeleti taşımayan orto-diaril heterosiklikler merkezi halka olarak 1,2-diarilpirol, 1,2-diarilimidazol, 2-(3*H*)-oksazolun ve izoksazol çekirdekleri taşıyabilirler<sup>1</sup>.



$IC_{50}$  (COX-2)=0.04  $\mu$ M

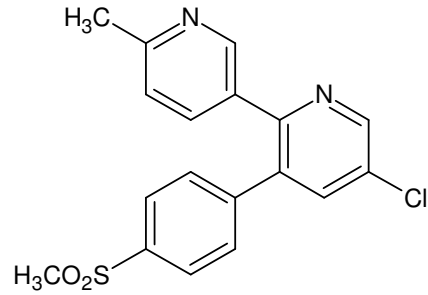
$IC_{50}$  (COX-1)=13  $\mu$ M

Orto-diaril karbosiklik bileşiklerin çoğunluğunu ise cis-stilben iskeleti taşıyan 1,2-diarilbenzen ya da 1,2- ya da 3,4-disübstitüepiridin türevleri oluşturmaktadır<sup>1</sup>.



$IC_{50}$  (COX-2)=0.01  $\mu$ M

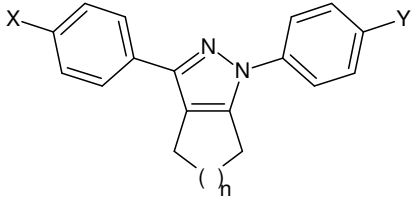
$IC_{50}$  (COX-1)>100  $\mu$ M



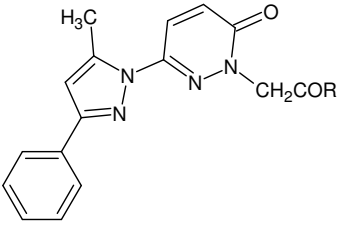
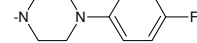
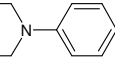

Selektif COX-2 inhibitörleri çoğunlukla merkezi siklik halkaya bağlı 1,2-diaril sübstütüsyonu içerselerde, 1,3-diaril sübstütüsyonu içeren selektif COX-2 inhibitörlerine de literatürde rastlanmaktadır<sup>11</sup>.

1,3-diaril heterosiklik iskeletine sahip bileşiklerde merkezi halkayı sikloalkanopirazol<sup>11</sup>, pirazol<sup>12,14</sup>, 3(2*H*)-piridazinon<sup>13</sup> ve 4,5,6,7-tetrahidro-2*H*-izoindol<sup>15</sup> oluşturmaktadır.

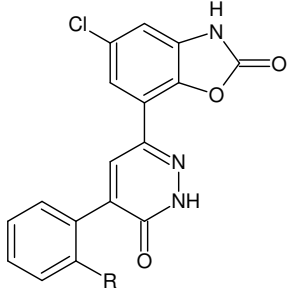
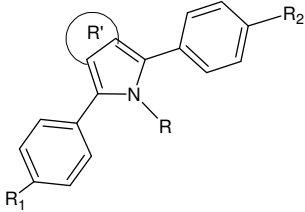


**Tablo 3: 1,3-Diaril Heterosiklik halka iskeletine sahip bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör etkileri**

	Bileşik	X	Y	n	IC <sub>50</sub> COX-2(μM)	IC <sub>50</sub> COX-2(μM)
	1	H	H	1	6.20	>10
	2	Cl	H	1	2.59	10
	3	H	H	2	0.57	0.49
	4	Cl	H	2	0.62	10
	5	H	H	3	0.17	0.12
	6	Cl	H	3	0.14	1.0

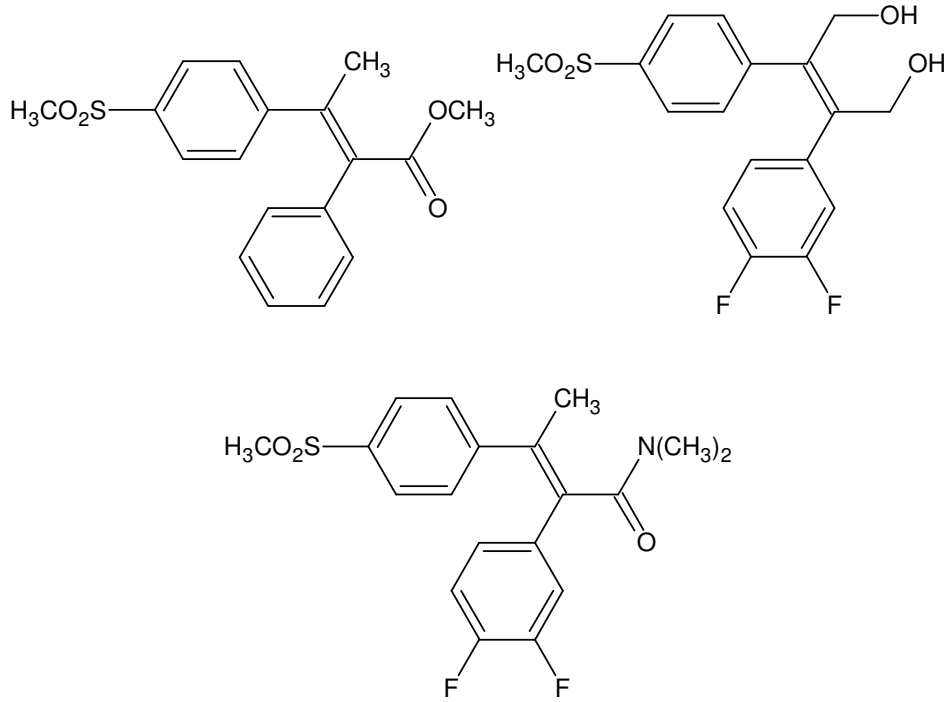
  

	Bileşik	R	COX-1 inhibisyonu (%) 10 μM	COX-2 inhibisyonu (%) 10 μM	
	1	-N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N-		0	14
	2	-N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N-		0	3
	3	-N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N-		1.5	14
	4	-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>		1.4	8
	5	-NH-		1.6	5

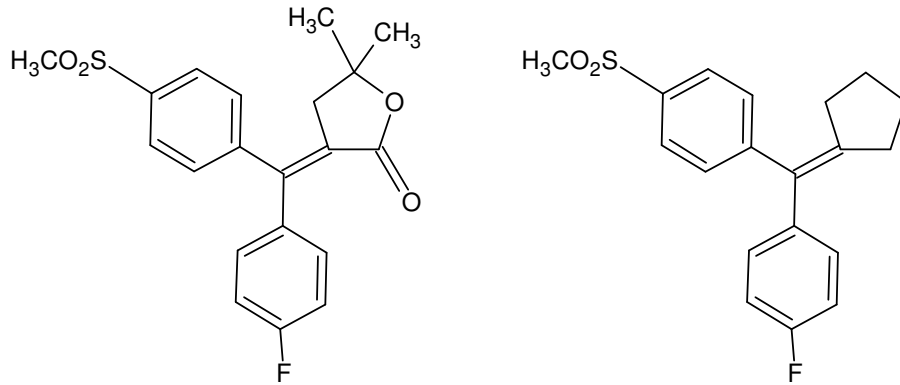
**Tablo 4: 1,3-Diaril Heterosiklik halka iskeletine sahip bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör etkileri**

	<b>Bileşik</b>	<b>R</b>				<b>COX-1 inhibisyonu (%) 10 µM</b>	<b>COX-2 inhibisyonu (%) 10 µM</b>
	<b>1</b>	H				59	37
	<b>2</b>	Cl				61	28
	<b>Bileşik</b>	<b>R'</b>	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub>COX-2 (nM)</b>	<b>IC<sub>50</sub>COX-1 (nM)</b>
	<b>1</b>		H	F	F	4.5	500
	<b>2</b>		H	F	F	0.6	230

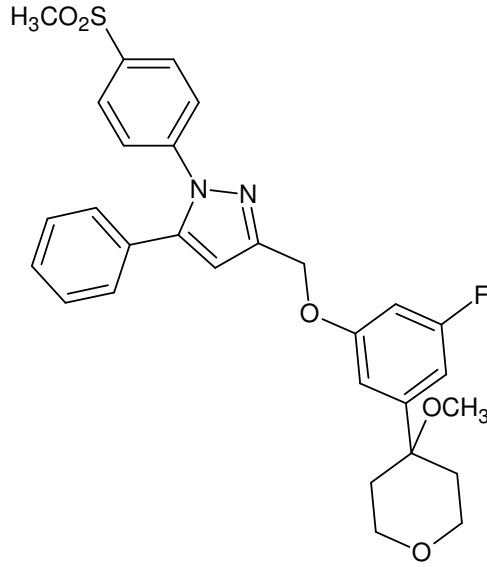
Yapı-etki ilişkisi çalışmalarında COX-2 selektif inhibitör etki için merkezi halka ve visinal aril gruplarının gerekli olduğu belirtilse de furanon halkasının redüksiyonu ile oluşan açık, diol fonksiyonu taşıyan bileşiklerin de COX-2 inhibitör etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu amaçla cis-stilben türevleri ve alkilenmiş stirenler de potansiyel COX-2 selektif ön-ilaç olarak araştırılmaya başlanmıştır<sup>1</sup>.



Geminal diaril ve tetrasüstitüolefin yapısı taşıyan 1,1-diaril-etenil türevleri de COX-2 selektif inhibitör aktivite göstermektedir. Geminal diaril kısımları lakton, siklopentan gibi halka sistemleri oluşturabilmektedir<sup>1</sup>.



3. ve 2. konumlarından 5-Lipoksijenaz (5-LO) spesifik farmakofor gruplarıyla süstitüe edilen 1,5-diaril-pirazol<sup>1,14</sup> ve 4,5-diaril-oksazol<sup>1</sup> türevleri COX-2 inhibitör aktiviteyle birlikte 5-Lipoksijenaz (5-LOX) inhibitör etki gösteren diaril heterosiklik bileşiklere örnek olarak gösterilmektedir.

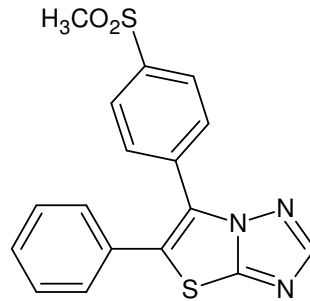
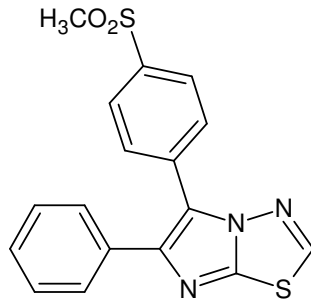


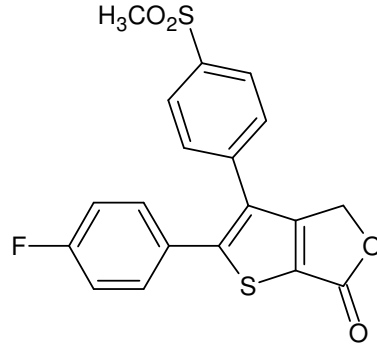
$IC_{50}$  (COX-2)=0.05  $\mu$ M

$IC_{50}$  (COX-1)>10  $\mu$ M

$IC_{50}$  (5-LO)=0.003  $\mu$ M

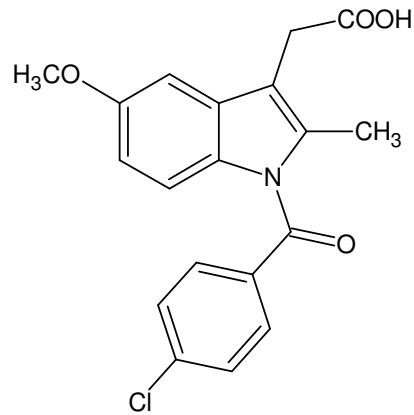
5-6 üyeli heterosiklik ve karbosiklik halkalardan başka merkezdeki halka olarak bisiklo ya da kaynaşmış halka olan sistemlere literatürde rastlanmaktadır<sup>1</sup>. Ancak bu bileşikler COX-2 potens ve selektivite göstermelerine rağmen zayıf farmakokinetik özellikleri, bu bileşikler için dezavantaj oluşturmaktadır. Bu bileşiklere örnek olarak imidazotiyazol, tiyazolotriazol ve bisiklolakton gibi türevler örnek olarak verilebilir<sup>1</sup>.





İn-vitro potens çalışmaları non-steroidal antienflamatuvar ilaç türevi birçok bileşiğin COX-1 inhibitör aktivite göstermeksizin düşük nanomolar aralıktaki  $IC_{50}$  değerleri ile COX-2 inhibisyon aktivite gösterdiklerini ortaya çıkarmıştır<sup>1</sup>.

Bugüne kadar çalışılan non-steroidal antienflamatuvar bileşikler içerisinde indometasinin, COX-2 spesifik inhibitör geliştirme açısından en esnek bileşik olduğu bulunmuştur. Örneğin indometazindeki 4-klorobenzoil grubunun 2,4,6-triklorobenzoil ya da 4-bromobenzoil grubu ile yerdeğiştirmesi<sup>1,42</sup> ya da 3-asetik asit süstitüentinin dallanmış alkil ya da karboksilik asit homolog türevleri ile yerdeğiştirmesi<sup>1,3</sup> COX-2 potens ve selektivitede artışa neden olmaktadır. İndometazindeki karboksilik asit kalıntısının uygun ester ya da amit türevlerine çevrilmesi ya da karboksilik asitin biyoizosterlerinin hazırlanmasının da COX-2 inhibitör aktivite artışında önemli rol oynadığı bulunmuştur<sup>1,3,42</sup>.



İndometasin

$IC_{50}$  (COX-2)=0.01  $\mu$ M

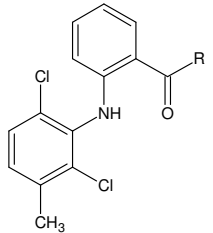
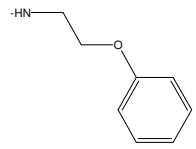
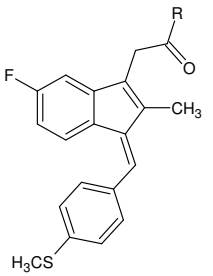
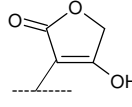
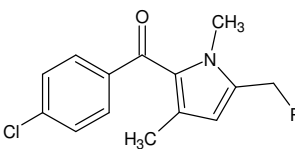
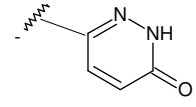
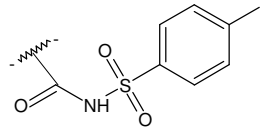
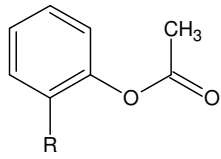
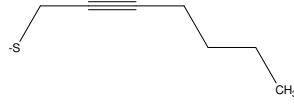
$IC_{50}$  (COX-1)=0.006  $\mu$ M



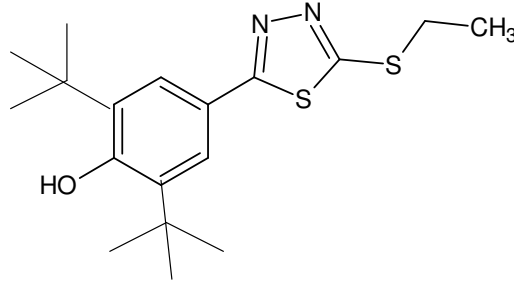
Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlardaki karboksilat kalıntısının nötralizasyonu ya da biyoizosterik yer değiştirmesi, non-steroidal antienflamatuvar ilaçların selektif COX-2 inhibitörü bileşiklere modifikasyonu için genel metodolojiyi temsil etmektedir. Örneğin, meklofenamik asidin amitleştirilmesi ya da sulindakin karboksilat grubunun tetronik asit ile yer değiştirmesi ya da zomepirakin karboksilat grubunun piridazinon veya açılısülfonamid grubu ile yer değiştirmesi, spesifik COX-2 inhibisyonu yapan bileşiklerin geliştirilmesini sağlamıştır<sup>1,3</sup>.

COX-1 selektif non-steroidal antienflamatuvar ilaç olan aspirinin COX-2 selektif inhibitör bileşiğe dönüştürülmesi literatürde belirtilmiştir. Aspirindeki karboksilat kalıntısının alkil ya da alkinil sülfid grupları ile yer değiştirmesi izoenzim spesifitesini tersine çevirirken hept-2-inil türevinin (APHS) getirilmesi ile COX-2 potenste artış görölmüştür<sup>1</sup>.

**Tablo 5: NSAİ ilaçların selektif COX-2 inhibitörlerine modifikasyonu sonucu oluşan bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör etkinlikleri**

Bileşik	R	IC <sub>50</sub> COX-2 (µM)	IC <sub>50</sub> COX-1 (µM)	Literatür
	-OH (Meklofenamik asit)	0.05	0.04	1,3
		0.15	66	1,3
	-OH (Sulindak sülfıt)	0.1	0.05	1,3
		0.03	10	1,3
	-COOH (Zomepirak)	2.0	0.3	1,3
		0.7	>1000	1,3
		0.9	242	1,3
	-COOH (Aspirin)	66	12	1
	-SCH <sub>3</sub>	250	>5000	1
		0.8	>17	1
	(APHS)			

COX enzim katalizinin, özellikle tirozin kalıntısı üzerinde radikal ara ürün oluşumunu içerdiği düşünülmektedir<sup>2</sup>. Sübstitüe fenol türevleri, fenoksi radikali oluşturma özelliklerine sahip oldukları için sübstitüe fenol inhibitörü bileşikler radikal süpürücü ajan olarak kullanılabilir<sup>2</sup>. COX enzimi radikal araçları katalizör etkisinde kullanılmasından dolayı bir di-ter-bütilfenol gibi radikal süpürücü ajan COX enziminin katalizör fonksiyonunu bozabilir<sup>3</sup>.



COX-1 IC<sub>50</sub> > 100 Mmol

COX-2 IC<sub>50</sub> = 0,14 Mmol

#### 2.2.2.1.1 COX-2 İnhibitörleri ve Kardiyovasküler Yan Etkileri

Selektif COX-2 inhibitörü geliştirmek amacıyla DuP-697 ve NS-398 lider bileşik olarak ele alınmıştır. Her ne kadar bu bileşikler daha ileri klinik çalışmalarda kullanılsa da günümüzde deneysel çalışmalar için kullanılmaktadır. Bu bileşikler temel alınarak çeşitli COX-2 inhibitörü bileşikler (koksibler) sentez edilmiş ve sonuçta selekoksib (Celebrex<sup>®</sup>) 1998 yılında, rofekoksib (Vioxx<sup>®</sup>) 1999 yılında, valdekoksib (Bextra<sup>®</sup>) 2001 yılında klinik kullanıma girmiştir<sup>38,43</sup>. Etilokoksib (Arcoxia) Avrupa İlaç Ajansı (the European Medicines Agency (EMA)) tarafından<sup>33</sup> onaylanmış, lumirakoksib<sup>17</sup> ve valdekoksibin enjekte edilebilir ilaç formu olan Parekoksib<sup>43</sup> ise Gıda İlaç İdaresi (Food and Drug Administration (FDA)) tarafından hala onay beklemektedir.

Piyasaya sunulan COX-2 inhibitörlerinden; selekoksib ve rofekeksib 1. kuşak COX-2 inhibitörleri olarak sınıflandırılırken, valdekoksib, lumirakoksib ve etirokoksib 2. kuşak COX-2 inhibitörleri olarak sınıflandırılmaktadır<sup>19</sup>.

Rofekoksibin kardiyovasküler yan etkileri, gastrointestinal güvenlik profilini belirlemek için yapılan **VIGOR (Vioxx Gastrointestinal**

**Outcomes Research)** çalışması ile ortaya çıkmıştır<sup>16,17,44-46</sup>. VIGOR çalışması, 8076 romatoid artritli hasta grubunda gerçekleştirilen, 50 mg/gün rofekoksib ya da günde 2 kez 500 mg naproksen kullanımını gerektiren 9 aylık bir çalışmadır. VIGOR çalışmasında, rofekoksib kolunda naproksen koluna nazaran daha az gastrointestinal yan etki gözlenirken, naproksen kolunda da rofekoksib koluna nazaran daha az miyokard enfarktüsü insidansı gözlenmiştir. Fakat bu çalışmada plasebo grubunun olmayışı, gözlenen kardiyovasküler riskin rofekoksibin kendisinden mi yoksa naproksenin kardiyoprotektif etkisinden mi kaynaklandığı konusunda soru işaretleri uyandırmıştır<sup>16,17,19,44, 46, 47</sup>. VIGOR çalışmasının sonuçları, Vioxx'un belirgin iskemik kalp hastalığı olan hastalarda kullanılmaması için 2002 yılında etiketlenmesine sebep olmuştur.

Rofekoksibin piyasadan çekilmesine ise **APPROVe (Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx)** çalışması neden olmuştur. APPROVe çalışması plaseboya karşın günlük 25 mg rofekoksib kullanımını gerektiren bir çalışmadır. Bu çalışma ile rofekoksibin kolorektal kanserde görülen adenom polipleri engelleme durumu ortaya çıkarılmak istenmiştir ancak uzun süre ilaç tüketiminden kaynaklanan kardiyovasküler yan etkiler ortaya çıkmıştır<sup>16,17,19,44-46</sup>. Çalışmanın başlarında rofekoksib kolunda hipertansiyon görülmüş ancak kronik rofekoksib kullanımından 18 ay sonra kalp krizi ve trombotik felçlerdeki artış istatistiksel olarak belirgin hale gelmiştir. Bu çalışmanın sonucu rofekoksibin Eylül 2004 yılında piyasadan çekilmesine neden olmuştur<sup>16,17,19,47</sup>.

Selekoksisin gastrointestinal güvenlik çalışmalarında **CLASS (Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study)** rofekoksibin aksine kardiyovasküler olaylarda risk artışı gözlenmemiştir<sup>16,44,47</sup>. CLASS çalışması günde 2 kez 400 mg selekoksisin ve günde 3 kez 800 mg ibuprofen ya da günde 2 kez 75 mg diklofenak alan 8059 hasta ile gerçekleştirilen bir çalışmadır<sup>17</sup>. CLASS çalışmalarında düşük doz aspirin kullanımına izin verilirken<sup>16,17</sup> hasta popülasyonunda kardiyovasküler olaylardaki taban sınırı VIGOR çalışmasında nazaran daha düşük tutulmuştur<sup>16</sup>. CLASS çalışmasının amacı kardiyovasküler toksisiteyi incelemek olmasa da, bu çalışma kardiyovasküler olaylardaki değişikliği saptamak açısından yeterli olmamıştır<sup>17</sup>.

Selekoksisin uzun dönem kanserden koruma çalışmaları **APC (Adenoma Prevention with Celecoxib)** günde 2 kez 200 mg ve günde 2 kez 400 mg selekoksisin kullanımını gerektiren 2035 hasta ile gerçekleştirilen bir çalışmadır<sup>17</sup>. APC çalışmasında ise kardiyovasküler olaylarda doza bağlı olarak artış gözlenmiştir<sup>16,45-47</sup>.

APC çalışmasına paralel bir başka çalışma ise, günlük 400 mg selekoksib grubu ya da plasebo grubu içeren 1561 hasta ile gerçekleştirilen **PreSAP çalışması ( The Prevention of Spontaneous Adenomatous Polyps Trial)** çalışmasıdır. PreSAP çalışmasında plasebo grubuna kıyasla selekoksib grubunda kardiyovasküler olaylarda herhangi bir risk artışı gözlenmemiştir<sup>17,44,45,47</sup>. APC çalışmasındaki bulgular; **ADAPT (Alzheimer Disease Anti-Inflammatory Prevention Trial)** çalışmasındaki selekoksib grubunun kardiyovasküler yan etki potansiyeli açısından tekrar değerlendirilmesine neden olmuştur<sup>17</sup>.

ADAPT çalışması selekoksib ve naproksenin yaşa bağlı kognitif çökme ve Alzheimer hastalığının başlangıcını engellemesi ya da geciktirmesi potansiyelini test etmek amacıyla yapılan bir çalışmadır. ADAPT çalışması günde 2 kez 220 mg naproksen, günde 2 kez 220 mg selebreks veya plasebo grubu içeren yaklaşık 2400 hasta ile başlayan bir çalışmadır. 5 ya da 7 yıl sürmesi planlanan ve 2625 hasta ile gerçekleştirilen ADAPT çalışmasında, naproksen grubunda plaseboya kıyasla kardiyovasküler olaylarda risk artışı gözlenmesi dolayısıyla 3 yıl sürmüştür<sup>17</sup>. Naproksen grubunda kardiyovasküler olaylarda risk artışı gözlenirken, selekoksib grubunda ise ilginç bir şekilde kardiyovasküler ve serebrovasküler olaylarda risk artışı gözlenmemiştir<sup>17,45,47</sup>.

Bu sonuçlardan yola çıkarak Nisan 2005'te FDA selekoksibin piyasada kalmasına izin vermiş ancak firmasından gastrointestinal ve kardiyovasküler risk taşıdığına dair Celebrex'e uyarı koymasını istemiştir<sup>17</sup>.

COX-2 inhibitörler arasında en selektif olan lumirakoksib için ise; gastrointestinal ülser komplikasyonlarını değerlendirme açısından **TARGET (Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial)** çalışması yapılmıştır<sup>16,17</sup>. TARGET çalışması günlük 400 mg lumirakoksib, günde 2 kez 500 mg naproksen ya da günde 3 kez 800 mg ibuprofen kullanımını gerektiren 18325 hasta ile gerçekleştirilen 1 yıllık bir çalışmadır<sup>17</sup>. TARGET çalışmasında düşük doz aspirin kullanılmasına izin verilmiştir. TARGET çalışmasında, CLASS çalışmasına benzer bir şekilde aspirin kullanmayan hastaların ülser komplikasyonlarında belirgin istatistiksel azalmalar gözlenmiştir<sup>17</sup>. Her ne kadar naproksene kıyasla lumirakoksib grubunda kardiyovasküler olaylarda risk artışı gözlenmiş olsa da istatistiksel açıdan belirgin bir fark gözlenmemiştir<sup>16,17,47</sup>.

Valdekoksib ve ön ilaç formu olan parekoksibin operasyon sonrası ağrı tedavisini esas alan **CABG-1 ve CABG-2** çalışmaları ile taşıdıkları kardiyovasküler risk potansiyeli belirlenmiştir<sup>16,46</sup>. Koroner bypass ameliyatı geçiren hastalar öncelikle parekoksible ya da plasebo ile

intravenöz olarak tedaviye başlamış ve sonra oral valdekoksib ya da plasebo ile devam etmişlerdir<sup>16</sup>. CABG çalışmasının sonuçları, artmış trombotik risk durumlarında koksiblerin protrombotik etkileri ile uyumlu sonuç göstermiştir<sup>16</sup>.

Valdekoksib ve ön ilaç formu olan parekoksibin anafilaksi, anjiyoödem, eritema multiform, ekfoliyatif dermatit, Stevens-Johnson sendromu ve toksik epidermal nekroliz gibi hayatı tehdit eden deri reaksiyonları göstermesi ve NSAİ ilaçlara kıyasla hiçbir yararının olmaması FDA'nın 2005 yılında Bextra'yı piyasadan çekmesine neden olmuştur<sup>17,45</sup>.

CRESCENT (The Celecoxib Rofecoxib Efficacy and Safety in Comorbidities Evaluation Trial) çalışması ile araştırmacılar, rofekoksib (25 mg/gün), selekoksib (200 mg/gün), ve naproksen (500mg günde iki kere) ile tedavi gören hipertansiyon, osteoartrit ve Tip-II diyabetli hastalarda, rofekoksib kullananlarda 6 haftalık tedavi sonrası sistolik kan basıncının arttığını (130.3mgHg'den 134.5 mgHg'ye) gözlemlemişlerdir<sup>44</sup>.

Rofekoksib ve selekoksibin kimyasal özellikleri vasküler risk açısından endotelial fonksiyonda farklı etki göstermektedir. Sülfon grubu taşıyan COX-2 selektif rofekoksibin ve etirokoksibin doku dağılımı sülfonamid grubu taşıyan ve fizyolojik pH'da yüklü bulunan selekoksibe nazaran daha azdır<sup>48</sup>. Rofekoksib enzimatik olmayan mekanizma ile prooksidan özellik göstermekte ve rofekoksibin sülfon grubu fosfolipit tabakasındaki açıl yan zinciri etkileşerek serbest radikallerin ve iyonların permeabilitesinin artmasına sebep olmaktadır<sup>48</sup>.

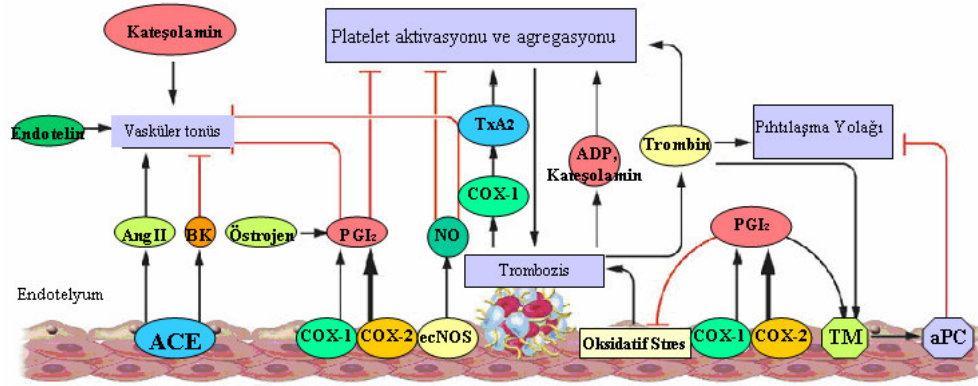
COX-2 inhibitörleri ve artmış kardiyovasküler riskleri değerlendirme açısından çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür:

1) COX-2 inhibitörleri ile yapılan bir meta analizde COX-2 inhibitörlerinin plaseboya nazaran hipertansiyon riskini arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu bulguya dayanarak, COX-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler etkilerini, kan basıncını değiştirerek gösterdikleri düşünülmektedir<sup>44</sup>.

2) İnsan epitelyumunda Prostaglandin I<sub>2</sub> (prostasiklin) baskın olarak COX-2 aktivitesiyle üretilmektedir. Prostasiklin, platelet agregasyonu inhibisyonuna neden olarak vazodilatasyona ve damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunun engellenmesine neden olmaktadır. COX-1 enzimi tarafından üretilen Tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) ise, platelet

agregasyonuna, vazokonstriksiyona ve düz kasların proliferasyonuna neden olmaktadır<sup>17</sup>. Aspirin ve benzeri NSAİ ilaçlar hem COX-1 hem de COX-2 enzimini inhibe ettikleri için TXA<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub> miktarı birlikte azalmaktadır. Selektif COX-2 inhibitörü bileşikler ise TXA<sub>2</sub> sentezine dokunmadan PGI<sub>2</sub> sentezini inhibe ettikleri için TXA<sub>2</sub> miktarı göreceli olarak artmaktadır. Artmış TXA<sub>2</sub> miktarından dolayı kan basıncı artmakta, aterosenez ve plak kopmasına karşı artmış trombotik cevap görülmektedir<sup>44</sup>.

3) Diğer bir hipotez ise antienflamatuvar ilaçların bazı dozlarının vasküler endoteli ya da aterosklerozun enflamatuvar komponentlerini geliştirici etkisi ile kardiyovasküler olayları engelleyebileceğine dayanmaktadır<sup>44</sup>. Bir çalışmada Chenevard ve arkadaşları COX-2 inhibitörlerinin ciddi koroner arter hastalıklarında endotelial kaynaklı vazodilatasyonu artırdığını ve düşük dereceli kronik enflamasyon ve oksidatif stresi azalttığını bulmuşlardır<sup>44</sup>.



Düz Kas Hücreleri

ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim, ADP: Adenozin difosfat, aPC: Aktive edilmiş protein C, BK: Bradikinin, ecNOS: Endotelial hücre NOS, TM: Trombomodulin

**Şekil 6: COX izoenzimlerinin kardiyovasküler biyolojideki rolleri**

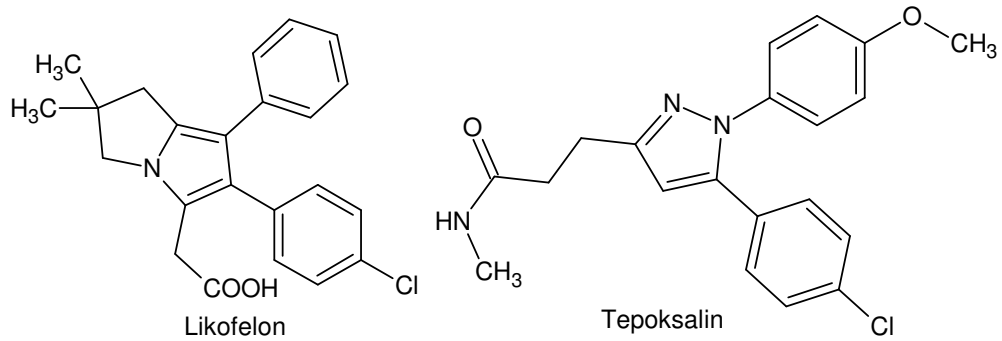
COX-2 enziminin böbrek ve üreme sisteminde konstitütif olarak üretilmesi, gastrik mukozada yara iyileştirici özellik göstermesi ve kardiyovasküler yan etki riski taşıması, araştırmacıları yeni antienflamatuvar ilaç geliştirmeye teşvik etmiştir<sup>9</sup>. COX inhibisyonu sonucu araşidonik asit yolağının 5-LOX yolağına kayması ve bunun sonucu olarak enflamasyon mediyatörleri olan lökotrienlerin ve sisteinil lökotrienlerin miktarının artması daha dual COX-2/5-LOX inhibitörleri geliştirmenin önemini ortaya çıkarmıştır<sup>10</sup>.

Lökotrienler, romatoid artrit, enflamasyonlu iç hastalıkları, ülseratif kolit, astım, psöriyazis ve alerjik rinit gibi çeşitli enflamatuvar ve alerjik hastalıklarda mediyatör olarak rol oynamaktadır<sup>9</sup>. COX-2 ve 5-LOX enzimlerinin dual inhibisyonu ile gastrointestinal yaralara ve alerjik reaksiyona neden olmaksızın artmış antiinflamatuvar etki beklenmektedir<sup>9</sup>.

Dual etki gösteren ilk ilaç Tepoksalin'dir (5-(4-klorofenil-N-hidroksi-1-(4-metoksifenil)-N-metil-1*H*-pirazol-3-propanamid)). Tepoksalinin domuz akciğerindeki COX-IC<sub>50</sub> değeri 0,80 µM, 5-LOX değeri 0,15 µM'dir. Tepoksalin sıçanlarda gastrik lezyon oluşumunu %50 arttırırken, köpeklerde herhangi bir gastrik ülserojenik etki göstermemiştir<sup>10</sup>.

Dual etki gösteren bir diğer bileşik Likofelon'dur. (2-((6-(4-klorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3 dihidro-1*H* pirolozin-5-il)asetikasit).

Likofelonun inek ve insan plateletlerinde IC<sub>50</sub> COX değerleri sırasıyla 0,16-0,21 µM iken, inek ve insan granülositlerindeki IC<sub>50</sub> 5-LOX değerleri 0,18-0,23 µM'dir. Tek doz ya da tekrar eden dozlarda likofelon kullanımı sonrası ya çok az gastrointestinal hasar görülmüş ya da hiç görülmemiştir<sup>10</sup>.



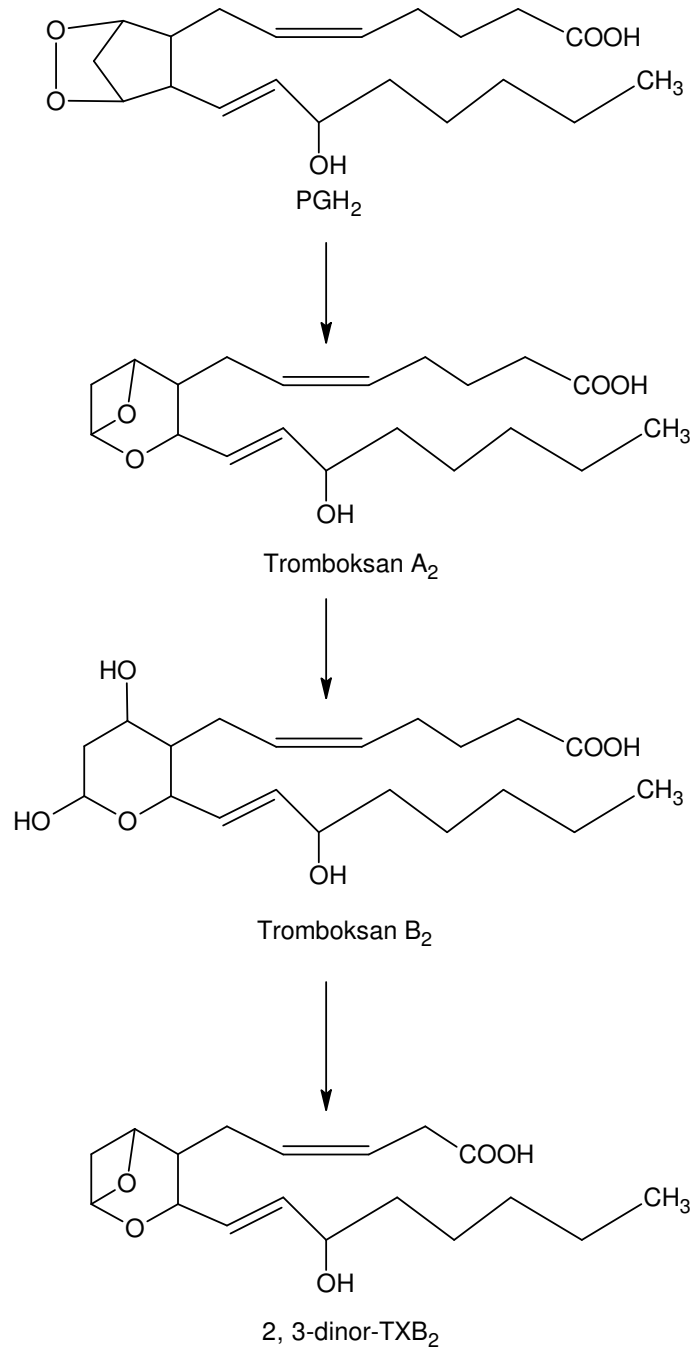
Deneyisel çalışmalar, COX-2 enziminin prokarsinojenleri karsinojenlere dönüştürerek tümör büyüme ve gelişiminde yer aldığını, ayrıca selektif COX-2 inhibitörlerinin (koksibler) tümör büyümesini özellikle antianjiyojenik ve proapoptotik mekanizmalar başta olmak üzere çeşitli mekanizmalarla durdurmakta olduğunu göstermiştir. Büyük klinik çalışmalarda ise koksiblerin kolorektal kanserde kemopreventif etkisi olduğu bulunmuştur<sup>10</sup>.



Aynı zamanda epidemiyolojik çalışmalar, NSAİ ilaçların kronik beyin enflamasyonu, artmış kompleman sistemi ve mikrogliaların aktivasyonu ile karakterize bir hastalık olan Alzheimer hastalığının başlangıcından koruduğunu ve bu ilaçların Alzheimer hastalığına karşı kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca çalışmalar, NSAİ ilaçların Alzheimer hastalığının patogeneğinde önemli rol oynayan amiloid patolojisini baskıladığını da ortaya çıkarmıştır<sup>49</sup>.

### **2.3 Tromboksan, Prostaglandin ve Antiplatelet Aktivite**

Tromboksan A<sub>2</sub>, sikloksijenaz yolağından üretilen biyolojik olarak aktif arasıdonat türevidir. Tromboksan A<sub>2</sub>, başlıca aktive olmuş plateletlerde ve makrofajlarda PGH<sub>2</sub>'den, tromboksan sentaz aracılığı ile üretilmektedir. TXA<sub>2</sub> dayanıklı olmayan epoksi bağından dolayı (T<sub>1/2</sub>=30s) enzimatik olmayan şekilde, daha dayanıklı fakat biyolojik olarak aktif olmayan metaboliti olan Tromboksan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>)'ye dönüştürülür. Kanda dolaşan TXB<sub>2</sub>'nin üriner metaboliti 2,3 dinor- TXB<sub>2</sub> olarak saptanmıştır<sup>18,50</sup>. Bu yolların oluşumu Şekil 7'de gösterilmiştir.



**Şekil 7: Tromboksan A<sub>2</sub> katabolik yolağı**

Tromboksan A<sub>2</sub>'nin başlıca iki aktivitesi bulunmaktadır. Platelet fonksiyonunun stimülasyonu ve platelet agregasyonunun

indüklenmesiyle oluşan düz kasların kasılması, vazokonstriksiyon ve bronkokonstriksiyon

Ayrıca TXA<sub>2</sub> damar düz kaslarının mitogenezinde anahtar rol oynamakta ve böbrek tübül hücrelerinde cis-platin indüklü apoptozise aracılık etmektedir<sup>18</sup>.

TXA<sub>2</sub>'nin biyosentetik prekürsörü olan PGH<sub>2</sub> de, TXA<sub>2</sub> ile aynı reseptöre etki ederek damar düz kasları ve plateletlerde aynı agonist etkiyi göstermektedir<sup>18</sup>.

TXA<sub>2</sub>'nin (2,3dinor- TXB<sub>2</sub> ve TXB<sub>2</sub>) aşırı üretiminin idrarla ve kanla tespit edilebildiği hastalarda ciddi periferel damar hastalıkları, kalp krizi, stabil olmayan anjina, gebeliğe bağlı hipertansiyon ve preeklampsi, astım, lupus nefritis, trombosis ve trombotik hastalıklar, pulmoner hipertansiyon, septik şok, aterosklerozis ve Raynaud fenomeni gibi patofizyolojik durumlar görülmektedir<sup>18,50</sup>.

Portal hipertansiyon, preeklampsi ve iskemik kalp rahatsızlıkları gibi hastalıklarda Tromboksan A<sub>2</sub> biyosentezindeki artış, prostasiklin miktarındaki artışı da beraberinde getirmektedir<sup>18</sup>.

Prostasiklin (PGI<sub>2</sub>), PGH<sub>2</sub>'den prostasiklin sentaz aracılığı ile damar ve bronşiyal endotelyumda sentez edilen bir araşidonat türevidir<sup>18</sup>.

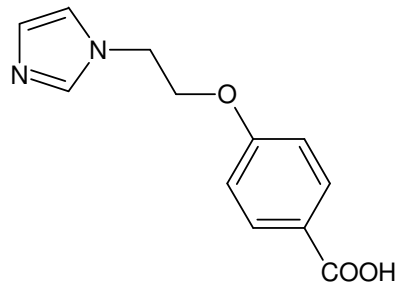
Prostasiklin, platelet agregasyonunun güçlü bir inhibitörü ve aynı zamanda güçlü bir vazodilatördür<sup>18,50</sup>. Bu özelliklerinden dolayı prostasiklin TXA<sub>2</sub> antagonisti olarak da düşünülebilir.

Bu nedenle, prostasiklin oluşumunu etkilemeden TXA<sub>2</sub> miktarını azaltan ilaçların, TXA<sub>2</sub> artışı ile seyreden hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmüştür<sup>18</sup>.

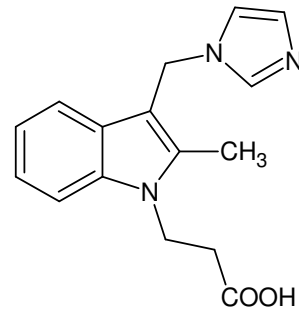
Bu amaçla, TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörleri, TXA<sub>2</sub> reseptör antagonistleri dual etkili bileşikler (TXA<sub>2</sub> sentaz/ TXA<sub>2</sub> antagonist) ve prostasiklin agonistleri klinik olarak değerlendirilmişlerdir.

### 2.3.1 Tromboksan Sentaz İnhibitörleri:

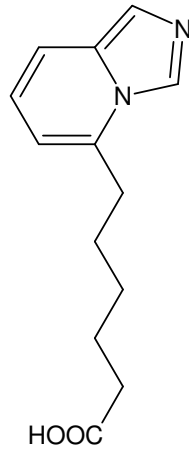
Tromboksan sentaz inhibitörleri, Tromboksan A<sub>2</sub> sentezini selektif olarak inhibe etmektedirler. Dazoksiben (UK 37248), dazmagrel (UK 38485), pırmagrel (CGS 13080), ozagrel (OKY 046), CS-518, OKY 1581, isobogrel (CV 4151) ve furegrelat (U63557A) klinik olarak değerlendirilmiş TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörleridir<sup>18</sup>.



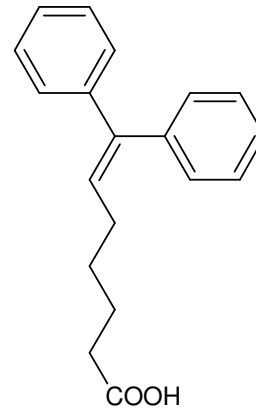
dazoksiben (UK 37248)



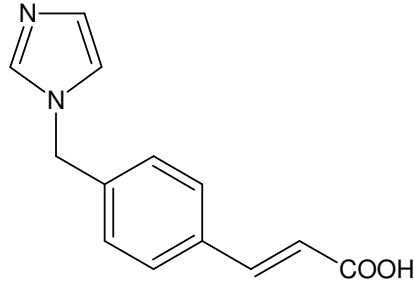
dazmagrel (UK 38485)



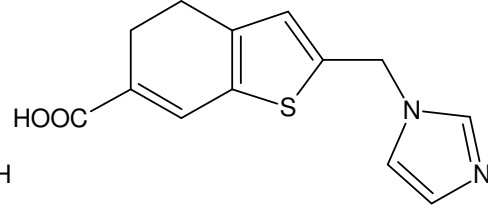
pırmagrel (CGS 13080)



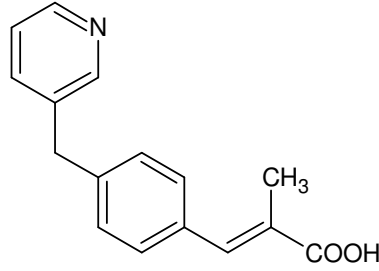
isobogrel (CV-4151)



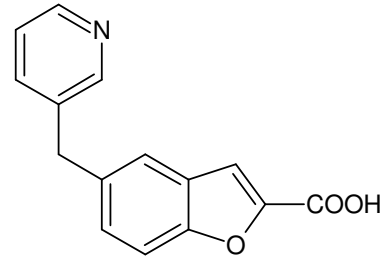
ozagrel (OKY 046)



CS-518



OKY 1581

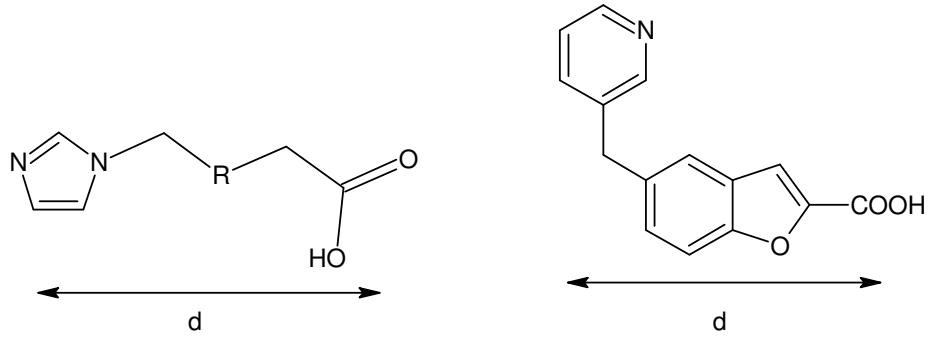


furegrelat (U 63557 A)

TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörleri 2 alt sınıfa ayrılabilir:

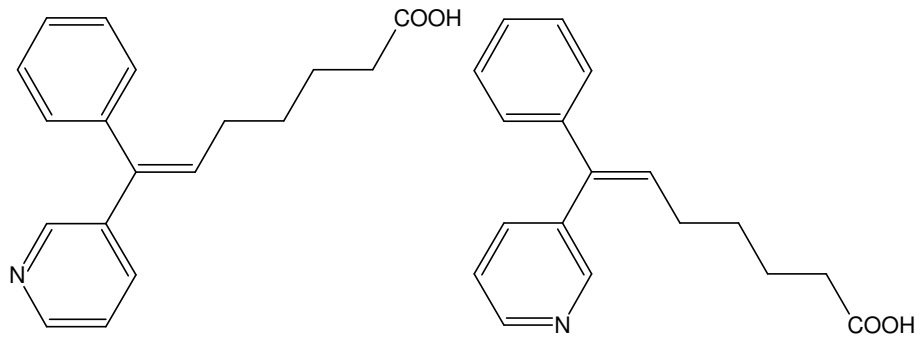
- İmidazol türevi TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörü bileşikler: Dazoksiben (UK 37248), dazmagrel (UK 38485), pirmagrel (CGS 13080), ozagrel (OKY 046), CS-518,
- Piridin türevi TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörü bileşikler: OKY 1581, isobogrel (CV 4151) ve furegrelat (U63557A)

TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörlerindeki temel özellik 3-süstitüe piridin ya da N-süstitüe imidazol halkasındaki N atomu ile karboksilik asit grubu arası mesafenin 0,85-1 nm arasında olmasıdır. Bu bileşiklerde heterosiklik halka üyesi N atomu, TXA<sub>2</sub> sentaz enziminin katalitik bölgesindeki hem grubunun demir atomu ile kompleks oluşturmaktadır<sup>18</sup>.



İmidazol türevi TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörlerinin lider bileşiği dazoksiben iken piridinik TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörlerinin lider bileşiği isbogrel olmuştur<sup>18</sup>.

Piridinik asit türevi TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörü isobogrelin inhibitör etkisi stereobağımlı olarak bulunmuştur. İsobogrelin (E)-izomeri (Z)-izomerinden daha etkindir. Çünkü isobogrelin piridin halkasının azotu ile karboksilik asit arasındaki uzaklık E izomerinde 8,92 nm, Z izomerinde 4,92 nm bulunmuştur<sup>18</sup>.



(E) izomer: 8.92 nm

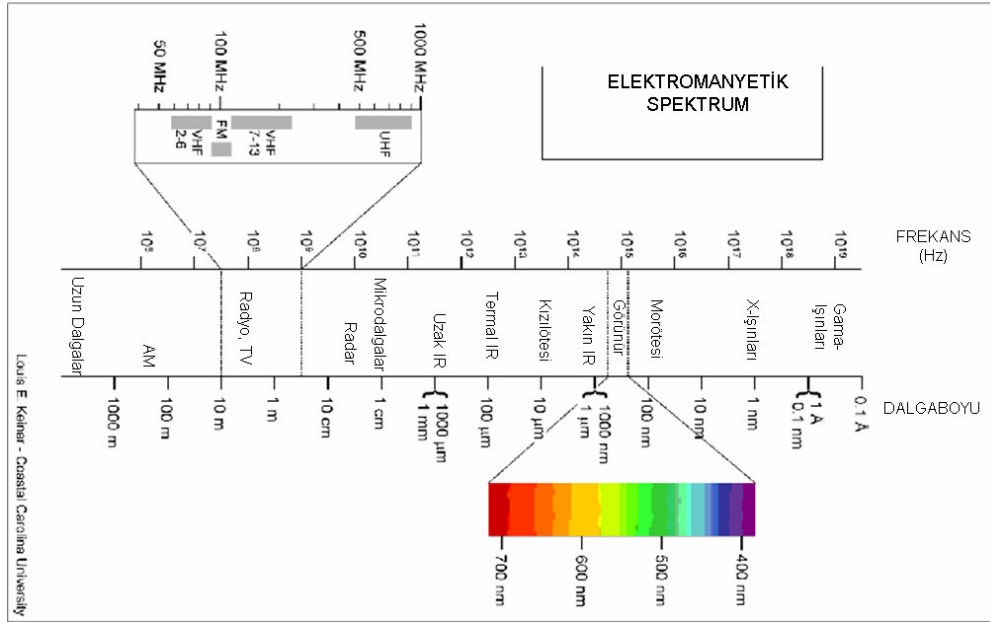
(Z) izomer: d=4.92 nm

İsobogrel (CV-4151)

## 2.4 Mikrodalga Destekli Kimyasal Sentez

### 2.4.1 Mikrodalga Işınımı:

Mikrodalga ışınımı, frekansı 0,3-300 GHz arasında olan, dalga boyu 1 cm'den 1 m'ye kadar uzanan elektromanyetik ışınımır. Elektromanyetik spektrumda mikrodalga bölgesi infrared ve radyo frekansları arasında yer almaktadır<sup>51</sup>.



Şekil 8: Elektromanyetik dalga spektrumu

1 cm ile 25 cm arasındaki dalga boyları radar iletileri için, kalan dalga boyları ise telekomünikasyon için kullanılmaktadır. Kimyasal sentezler için kullanılan ve evlerde kullanılan mikrodalgalar 2,45 GHz frekansta çalışmaktadır<sup>51</sup>.

2,45 GHz frekanstaki mikrodalga fotonunun enerjisi moleküler bağları birbirinden ayıramayacak kadar hatta Brownian hareketinden bile küçüktür. Bu sonuç ultraviyole ve görünür radyasyonun aksine, mikrodalğanın kimyasal reaksiyonları doğrudan elektromanyetik enerji absorpsiyonu ile başlatamayacağını göstermektedir<sup>51</sup>.

**Tablo 6: Işınım çeşidi ve bağ enerjilerinin kıyaslanması**

Işınım Çeşidi	Frekans (MHz)	Kuantum Enerjisi (eV)	Bağ Çeşidi	Bağ Enerjisi (eV)
Gamma ışınları	$3.0 \times 10^{14}$	$1.24 \times 10^6$	CC tekli bağ	3.61
X ışınları	$3.0 \times 10^{13}$	$1.24 \times 10^5$	CC çift bağ	6.35
Ultraviyole	$1.0 \times 10^9$	4.1	CO tek bağ	3.74
Görünür ışık	$6.0 \times 10^8$	2.5	CO çift bağı	7.71
Kızılötesi ışık	$3.0 \times 10^6$	0.012	CH bağı	4.28
Mikrodalga	2450	0.0016	OH bağı	4.80
Radyofrekansı	1	$4.0 \times 10^{-9}$	Hidrojen bağı	0.04-0.44

#### 2.4.1.1 Mikrodalga Dielektrik Isıtma

Mikrodalga destekli kimyasal çalışmalardaki artış, mikrodalga dielektrik ısınma etkilerine dayanmaktadır. Mikrodalga dielektrik ısıtması, spesifik maddelerin mikrodalga enerjisini absorblama ve ısıya dönüştürme yeteneklerine bağlıdır. Mikrodalgalar elektrik ve manyetik alan bileşenleri içeren elektromanyetik dalgalardır. Mikrodalga ile yapılan sentezlerde, dalga madde etkileşiminde elektromanyetik alanın elektrik bileşeni önem teşkil etmektedir<sup>51</sup>.

Elektromanyetik alanın elektrik bileşeni ısınmaya iki mekanizmayla neden olmaktadır:

- 1) Dipolar polarizasyon
- 2) İyonik iletim

Elektrik alan bileşeninin matriksle olan etkileşimi dipolar polarizasyon mekanizmasıdır. Bir maddenin, mikrodalga ile ışınlandığında ısı üretebilmesi için dipol momentinin bulunması gerekmektedir. Mikrodalga frekansına maruz kaldığında, numunenin dipolleri uygulanan elektrik alanında sıraya dizilir. Uygulanan elektrik alanı sallandığında dipol alan kendisini değişen elektrik alanına göre tekrar düzene sokmaya çalışır. Bu işlemde enerji, moleküler sürtünme ve dielektrik kaybı nedeniyle ısı formunda kaybolur. İşlem sırasında üretilen ısı miktarı, matriksin uygulanan alan frekansına göre kendini düzene sokma yeteneğiyle doğrudan ilgilidir. Eğer dipolün kendisini tekrar düzene sokmak için yeterli



zamanı yoksa (yüksek frekanslı ışınım) ya da uygulanan alanla tekrar yönelme çok çabuksa (düşük frekanslı ışınım), ısınma gerçekleşmez<sup>51</sup>.

Kullanılan sistemlerdeki 2,45 GHz'lik frekans, alanda yönelmek için moleküler dipol zamanı verir, fakat değişen alanı takip etmez. Bu yüzden dipol, elektrik alanı ile tekrar yönelmeye çalışırken değişen elektrik alanı, alan ve dipol yönlendirmesi arasında faz farkı oluşturur. Bu faz farkı, moleküler sürtünme ve çarpışma ile dipolden enerjinin kaybolmasına ve dielektrik ısınmanın artmasına sebep olur. Özet olarak, alan enerjisi ortama aktarılır ve elektrik enerjisi kinetik ve termal enerjiye son olarak da ısıya dönüştürülür<sup>51</sup>.

Polar moleküller arasında ısı, mikrodalga ışınımı ile rotasyonel hızın artmasından kaynaklanan sürtünme güçleri ile oluşmaktadır<sup>51</sup>.

Gazlarda dönen moleküller arasındaki uzaklık çok fazla olduğu için, gazlar mikrodalga ile ısıtılamaz. Benzer şekilde su molekülleri buz halindeyken kristal kafeste zorlamalıdır ve sıvı fazda olduğu gibi hareket edememektedir. Bu nedenle, buz da mikrodalga saydamdır<sup>51</sup>.

Diğer ısıtma mekanizması iyonik iletim mekanizmasıdır. İyonik iletim esnasında örnekteki çözülmüş yüklü parçacıklar (genellikle iyonlar) mikrodalga ışınımının etkisiyle ileri geri hareket ederler ve komşularındaki molekül ya da atomla çarpışırlar. Bu çarpışma harekete, dolayısıyla ısıya neden olmaktadır. Örneğin aynı miktarda distile su ve çeşme suyu içeren iki örnek sabit radyasyon gücü ile mikrodalga ışınım ile ısıtılırsa, iyonik içeriğinden dolayı çeşme suyunda daha hızlı ısınma olacaktır. İyonik iletim etkileri, mikrodalga alanında iyonik sıvıların ısıtılmasında önemlidir. İletkenlik prensibi, ısı oluşturma kapasitesi bakımından dipolar rotasyon mekanizmasından çok daha güçlü bir etkidir<sup>51</sup>.

#### 2.4.1.2 Dielektrik Özellikleri

Belirli bir maddenin mikrodalga ışınımı ile ısınma karakteristikleri maddenin dielektrik özelliklerine bağlıdır. Belirli bir maddenin uygulanan frekans ve ısıda elektromanyetik enerjiyi ısıya çevirmesi tanjant ( $\tan\delta$ ) taki kayıp yeteneğiyle ilgilidir. Kayıp faktörü  $\tan\delta = \epsilon''/\epsilon'$  ile açıklanır<sup>51</sup>.

$\epsilon'' \rightarrow$  dielektrik kaybı (elektromanyetik radyasyonun ısıya dönüştürülme verimliliğinin belirtisi)

$\epsilon' \rightarrow$  dielektrik sabiti (elektrik alanındaki moleküllerin polarize olabilmelerinin sabiti )

Yüksek  $\tan\delta$ 'lı reaksiyon ortamı; etkili absorpsiyon ve dolayısıyla hızlı ısınma için gereklidir<sup>51</sup>.

Su gibi dielektrik sabiti yüksek maddelerin  $\tan\delta$ 'ı büyük olmayabilir. Etanolün dielektrik sabiti suya nazaran daha küçüktür. Fakat tanjantındaki kayıp daha yüksek olduğu için mikrodalga alanında sudan çok daha hızlı ısıtma gerçekleştirir<sup>51</sup>.

Çözeltiler mikrodalga absorblama özelliklerine göre; yüksek ( $\tan\delta > 0,5$ ), orta ( $\tan\delta 0,1 - 0,5$ ), ya da düşük ( $\tan\delta < 0,1$ ) absorblayıcılar olarak sınıflandırılabilirler. Karbon tetraklorür, benzen ve dioksan gibi dipol momenti olmayan çözeltiler, mikrodalgayı az ya da çok geçirir. Düşük  $\tan\delta$  değerleri, özel bazı çözeltilerin mikrodalga ile reaksiyonlarını imkansız hale getirmektedir. Substratlar ya da bazı rejanlar/katalizörler polar olduğu için reaksiyon ortamının tüm dielektrik özellikleri mikrodalga ile yeterli ısınma sağlamaya izin vermektedir. Ayrıca alkol ya da iyonik sıvılar gibi polar maddeler, düşük absorblama özelliği olan reaksiyon ortamlarının absorpsiyon seviyelerini yükseltmek için reaksiyon ortamına ilave edilebilmektedirler<sup>51</sup>.

Mikrodalga ışınımı ile maddelerin etkileşimi 3 farklı işleme dayanır:

Emilme, iletim, yansıtma.

Polar organik çözeltiler gibi yüksek dielektrikli maddeler mikrodalgayı kuvvetle absorblar ve bu nedenle reaksiyon ortamı çabuk ısınır. Non-polar maddeler mikrodalga ile küçük etkileşimler gösterir ve mikrodalga reaktörlerinin yapımında kullanılır. Eğer mikrodalga ışınımı madde yüzeyinden yansıtılırsa, sistemde ya çok az enerji kalır ya da hiç kalmaz ve maddenin ısısı sınırlı olarak artar<sup>51</sup>.

### 2.4.1.3 Konvansiyonel Termal Isıtmaya Karşı Mikrodalga

Geleneksel organik sentez yöntemlerinde kullanılan ısı kaynaklarının kullanımı (yağ banyosu, ısıtma mantoları gibi), penetre olması gereken maddelerin ısı yayması ve termal iletkenliğine bağlı olduğu için enerji aktarımında yavaş ve yetersiz bulunmuştur. Geleneksel sentez yöntemlerinde reaksiyon kabının ısı, reaksiyon ortamından daha yüksek olmaktadır. Örnek içerisindeki sıcaklık değişimi, bölgesel olarak aşırı ısınmaya neden olarak ürünün, substratın ya da reajanın bozulmasına yol açabilmektedir<sup>51</sup>.

Bunun aksine, mikrodalga ışınımı reaksiyon ortamında bulunan molekülleri mikrodalga enerjisi ile birleştirerek hızlı ve verimli ısıtma sağlamaktadır. Mikrodalga reaksiyonlarında kullanılan kaplar mikrodalga saydam maddelerden yapıldıkları için (Borosilikat camı, kuvars ya da teflon) ışınım kabın kenarlarından geçerek konvansiyonel ısıtmaya kıyasla sıcaklık değişimini tersine çevirir. Eğer mikrodalga boşluğu iyi ayarlanabilirse, sıcaklık artışı örnek içine doğru aynı şekilde olur. Hızlı ve verimli iç ısı transferi kabın çeperinde minimum etkiye neden olur<sup>51</sup>.

#### 2.4.1.3.1 Mikrodalga Etkileri

Mikrodalga destekli reaksiyonlardaki verimleşen hız artışı için, tartışmalı da olsa üç farklı ihtimal öngörülebilir<sup>51</sup>:

##### 2.4.1.3.1.1 Termal Etkiler (Kinetik Etkiler)

Birçok bilim adamı gözlenen hız artışının büyük çoğunluğunun; polar moleküllerin mikrodalga alanına tabi tutulması ile ulaşılan yüksek reaksiyon ısı sonucunda oluşan termal / kinetik etkiden kaynaklandığını düşünmektedir. Oda ısı ya da standart yağ banyosu koşulları ile yüksek sıcaklıkta mikrodalga ısıtma işlemi kıyaslandığında çarpıcı hız artışı görülmektedir. Mingos ve Baghurst; 27°C'de %90 dönüşümle 68 günde gerçekleşen bir reaksiyonun 227°C'de aynı oranda dönüşümle 1,61 saniyede gerçekleştiğini göstermiştir. Mikrodalga kimyasında gözlenen aşırı sıcaklık ve hızlı ısınma, hız artışının termal / kinetik etkilerden kaynaklandığını göstermektedir.

##### 2.4.1.3.1.2 Spesifik Mikrodalga Etkileri

Termal kinetik etkilerinin yanısıra mikrodalga dielektrik ısıtma mekanizmasından kaynaklanan mikrodalga etkileri de düşünölmeye değır bulunmuştur.

Mikrodalga ışınımına maruz kalan sıvının kaynama noktası, mikrodalga ile ısıtmada karşılaşılan en temel sorunlardan birisidir. Mikrodalga ile ısıtılan sıvılar atmosferik basınçtaki kaynama noktalarının üzerinde kaynarlar. Birçok çözeltili için süper ısınma noktaları, klasik kaynama noktalarına göre 40°C daha yukarıda olabilmektedir. Bu nedenle mikrodalga – ısıtmalı reaktörde kaynama sıcaklığı atmosferik kaynama sıcaklığından daha yüksek olmaktadır. Bu durum da mikrodalga gücünün, çözeltilinin tüm hacmine dağılmasından kaynaklanmaktadır. Kaynamanın sadece belirli noktalarda oluştuğu termal ısıtmanın aksine mikrodalga reaksiyonlarında kaynama sıvı-gaz ara yüzeyinde oluşmaktadır. Mikrodalga ışınımına maruz kalmış kaynamakta olan çözeltilinin sıcaklığı; çözeltilinin fiziksel özelliklerine, reaktörün geometrisine, kütle-ısı akışına ve elektrik alanının dağılımına bağlıdır. Süper ısınma, ortama kaynama taşı ilavesi ve reaksiyon ortamının karıştırılması ile engellenebilir.

Süper ısınma etkisine paralel bir şekilde, duvar etkisi de sıcaklık değişimine neden olmaktadır. Mikrodalga ile enerji, sıvı içerisine dağıtıldığı için duvar yüzeyi ısınmaz. Bu yüzden reaktör yüzeyinin iç duvarının sıcaklığı sıvının sıcaklığından daha düşüktür. Mikrodalga ile ısınmada tüm hacim ısınması gerçekleştiği için termal değişimler göz önünde bulundurulmayabilir. Spesifik mikrodalga etkilerinin en önemlilerinden biri; polarlığı az olan reaksiyon ortamında, güçlü mikrodalga absorblayıcısı olan heterojen katalizörün ya da reajanın selektif olarak ısınmasıdır. Selektif ısınma bir ya da daha fazla bileşenden oluşan bir numunenin mikrodalga ile birleşen komponentinin selektif olarak ısınmasıdır. Absorblama özelliği olmayan komponentler, ısınan komponentten ısı aktarımı ile ısınmaktadırlar. Bazı araştırmacılar, homojen karışımlarda mikrodalga enerjisinin, çözeltili içerisindeki spesifik mikrodalga absorblayıcı reajanlar ya da substratlar ile etkileşerek mikroskobik sıcak noktalar oluşturduklarını belirtmişlerdir.

#### 2.4.1.3.1.3 Termal Olmayan (Atermal) Mikrodalga Etkileri

Termal olmayan etkilerin çoğu, reaksiyon ortamındaki spesifik moleküller ve elektrik alanının birbirini etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Elektrik alanının varlığı dipolar moleküllerin yönelim etkilerine neden olmaktadır. Elektrik alanı polar reaksiyon mekanizmalarında, temel halden geçiş haline geçme durumları gibi

polaritenin arttığı durumlarda aktivasyon enerjisini azaltarak reaktivitede artışa neden olmaktadır.

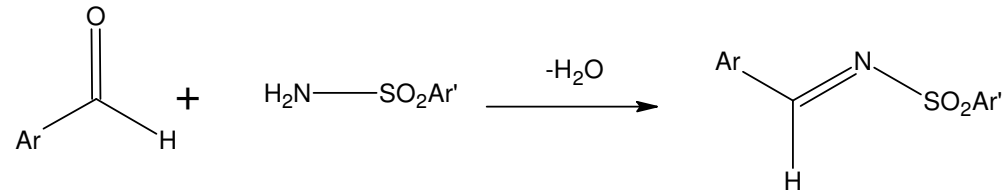
Birçok örnek mikrodalga ışınımının konvansiyonel ısıtmaya nazaran selektivitede (kemo, regio ve stereoselektivite) değişikliğe neden olduğunu göstermiştir. Atermal ya da spesifik mikrodalga etkileri ile ilgili olarak, mikrodalga ile ısıtma işleminin gerçekleştiği anda reaksiyon karışımının dışarıdan soğutulması konsepti de gündeme gelmiştir. Reaksiyon kabı mikrodalga ile ışınım sırasında dışarıdan soğutulmaktadır ve bu durum daha yüksek seviyede mikrodalga gücünün, reaksiyon ortamına aşırı ısınmayı engelleyerek gönderilmesine neden olmaktadır.

#### 2.4.2 Mikrodalga Destekli Kimyasal Sentezlere Örnekler

Konvansiyonel olmayan enerji kaynağı olarak mikrodalğanın organik kimyada kullanımı, son yıllarda oldukça yaygınlık göstermiştir. Gedye'nin 1986 yılında yayımlanan mikrodalga çalışmasının ardından mikrodalga destekli organik kimyasal sentez çalışmalarında hızlı bir artış görülmüştür. Yapılan çalışmaların çoğunluğunu, solvansız koşullardaki mikrodalga reaksiyonları oluşturmuştur. Mikrodalga ışınımı ve solvansız reaksiyon koşullarının bir araya gelmesi reaksiyon süresinde azalmaya, verimde ve bazen de selektivite de artmaya neden olmuştur<sup>52</sup>

Mikrodalga etkilerini açıklamak için, mikrodalga ve klasik ısıtma işlemleri aynı reaksiyon ortamında aynı koşullar altında (zaman, sıcaklık, basınç vb.) karşılaştırılmıştır<sup>52</sup>.

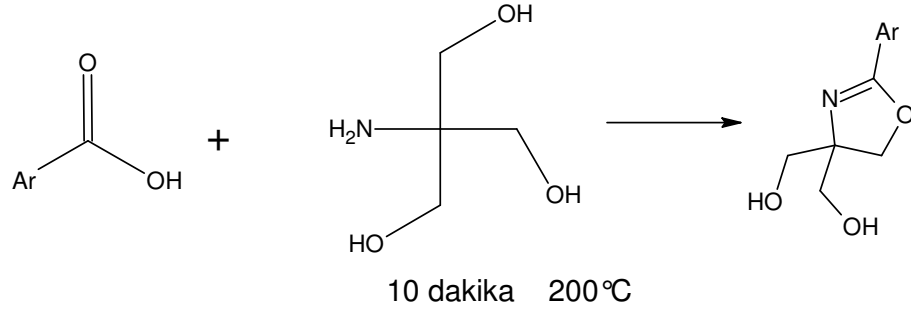
Varma ve arkadaşları, primer ve sekonder aminler ile aldehit ve ketonlardan solvansız koşullar altında K10 kili ile yüksek verimle imin ya da enamın sentezlenebileceğini belirtmişlerdir. Benzer bir şekilde N-sülfoniliminlerin solvansız koşullarda sentezi de spesifik mikrodalga etkileri ile açıklanmıştır<sup>52</sup>.



Ar=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Ar'=pCH<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> 6 dakika 190 °C

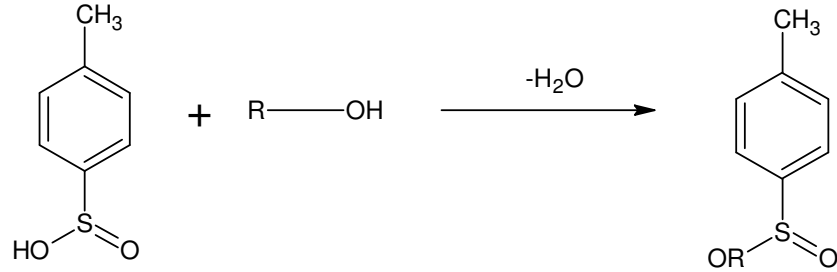
MW (Mikrodalga ile verim) 91% Δ (Konvansiyonel ısıtma ile verim) 40%

Mikrodalga ışınımla oksazolin halkası katalizsiz ve solvansız ortamda karbonil grubuna iki nükleofilik katım sonucu amit ara ürünü oluşturarak sentez edilebilmektedir.<sup>52</sup>



MW (Mikrodalga ile verim) 80-95%  $\Delta$ (Konvansiyonel ısıtma ile verim) <5%

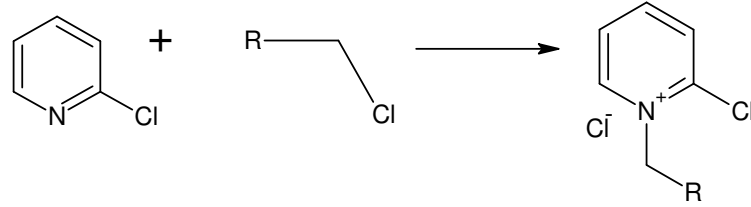
Alifatik alkollerin p-toluensülfonik asit ile reaksiyonları silikajel varlığında ve solvansız koşullarda mikrodalga ışınımla yüksek verimde p-toluensülfonat esterleri oluşturmaktadır.<sup>52</sup>



$R=(CH_3)_2CHCH_2$  70 °C

MW (Mikrodalga ile verim)	1,5 dakika	95%
$\Delta$ (Konvansiyonel ısıtma ile verim)	30 dakika	10%

2-halopiridinlerin mikrodalga destekli N-alkilasyonu, uyumluluk ve polar geçiş durumlarını açıklayan mikrodalga etkilerine iyi bir örnektir<sup>52</sup>.



R=CO<sub>2</sub>Et 165-170 °C

MW (Mikrodalga ile verim) 40 dakika 80%

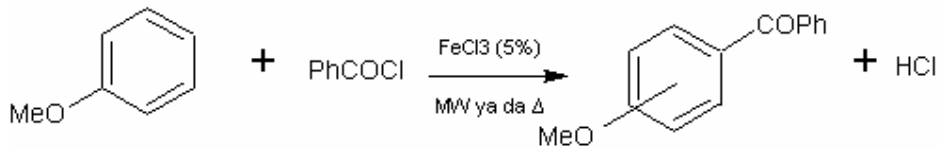
Δ (Konvansiyonel ısıtma ile verim) 23 saat 46%

R=CN 165-170 °C

MW (Mikrodalga ile verim) 40 dakika 56%

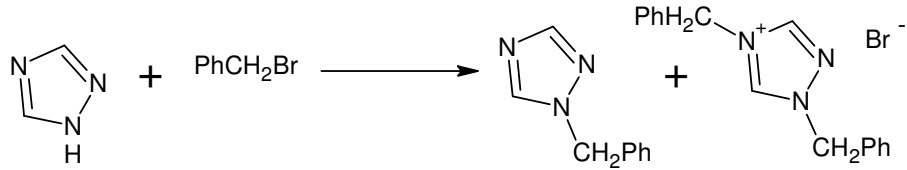
Δ (Konvansiyonel ısıtma ile verim) 50 saat 10%

Aromatik eterlerin mikrodalga ışınımı ile metalik katalizör FeCl<sub>3</sub> varlığında solvensiz benzoillenmesi gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ve diğer parametreler dikkatle kontrol edildiğinde elde edilen ürünlerin verimleri ve izomerik oranlarında mikrodalga'nın ısısal olmayan etkileri görülmüştür<sup>52</sup>.



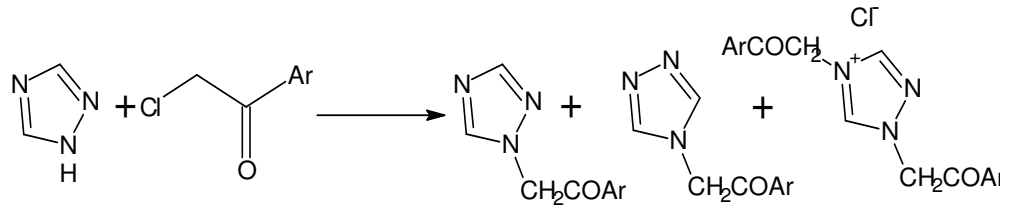
1 dk 165 °C verim = 95 % para/orto = 94 / 6

Solvansız koşullarda mikrodalga ışınımı kullanılarak 1,2,4-triazol'ün 1 numaralı konumundan regiospesifik benzillenmesi gerçekleştirilmiştir. Konvansiyonel ısıtmayla ise düşük verimde sadece 1,4-dialkilenmiş ürün oluşmuştur<sup>52</sup>.



Molar oran 1:1		N <sub>1</sub>	N <sub>1,4</sub>
5 dakika 165 °C MW	: verim	70%	100 % N <sub>1</sub>
Δ	: verim	14%	100 % N <sub>1,4</sub>

Benzer şekilde 1,2,4-triazol'ün selektif fenaçilleme reaksiyonunda, aynı şartlar altında mikrodalga ve konvansiyonel ısıtmaya çözücünün etkisi araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Pentanol ve DMF gibi solvanlarda mikrodalga etkisi gözlenmezken ksilen gibi nonpolar bir solvanda regioselektivite aktivasyon durumundan etkilenmiştir. Reaksiyon mikrodalga ışınımı altında ksilen içerisinde veya solvansız ortamda tamamen regioselektif hale gelmiştir<sup>53</sup>. (Tablo 7)



Ar = 2', 4',-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>1,4</sub>
---	----------------	----------------	------------------



**Tablo 7: 1,2,4-Triazol yapısının fenaçillenmesinde mikrodalga ve konvansiyonel ısıtılı reaksiyonlar için çözücü etkisi**

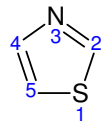
Çözücü	Aktivasyon Durumu	Çevirim %	N <sub>1</sub> / N <sub>4</sub> / N <sub>1,4</sub>
Pentanol	MW	90	95 / 5 / 0
	Δ	90	95 / 5 / 0
DMF	MW	90	95 / 5 / 0
	Δ	90	95 / 5 / 0
o-ksilen	MW	82	100 / 0 / 0
	Δ	95	32 / 28 / 40
Solvan yok	MW	92	100 / 0 / 0
	Δ	100	36 / 27 / 27

## 2.5 TİYAZOL ve 5-KLORO-2-OKSO-3H-BENZOKSAZOL TÜREVLERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

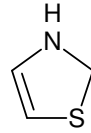
### 2.5.1 TİYAZOL ve TÜREVLERİ

#### 2.5.1.1 Genel Bilgiler

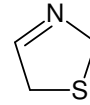
Tiyazol halkasının numaralandırılması ve tiyazol halkasının redüklenmiş formları aşağıda görülmektedir<sup>54</sup>.



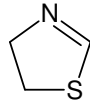
**1** tiyazol



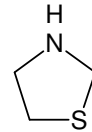
**2** 2,3-dihidrotiyazol



**3** 2,5-dihidrotiyazol



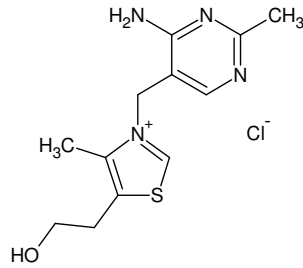
**4** 4,5-dihidrotiyazol



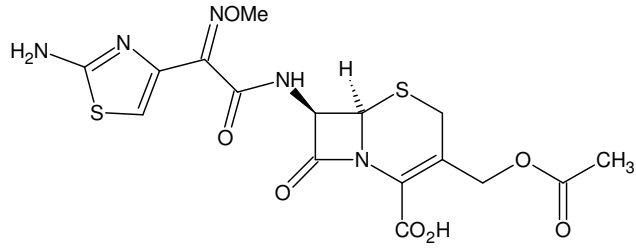
**5** tiyazolidin

İlk kez Hantzsch, tiyazol halkasının tiyoüre ve  $\alpha$ -halo karbonil bileşiklerinin reaksiyonu sonucu elde edildiğini tespit etmiştir. Her ne kadar tiyazolün kendisi doğada bulunmasa da tiyazol halkası peptit alkaloidleri, siklopeptitler gibi doğal ürünlerin yapısında bulunmaktadır. Doğal olarak bulunan bazı tiyazol türevleri antibiyotik ve antifungal etkiler göstermektedir. Deniz canlılarından elde edilen doğal tiyazol ürünlerinde de antineoplastik ve sitotoksik aktivite gözlemlenmiştir. Tiyazol ve dihidrotiyazol içeren siklopeptitlerde de sitotoksik aktivite bulunmuştur<sup>54</sup>.

Tiyazol halkası içeren en önemli doğal ürün tiyamin (Vitamin B<sub>1</sub>)'dir. İndüklenmiş tiyazol halkası penisilin türevi antibiyotiklerde bulunmaktadır. Sefalosporin olan sefotaksim ise yan zincir olarak tiyazol-4-il sübstütasyonu taşımaktadır<sup>54</sup>.



Tiyamin

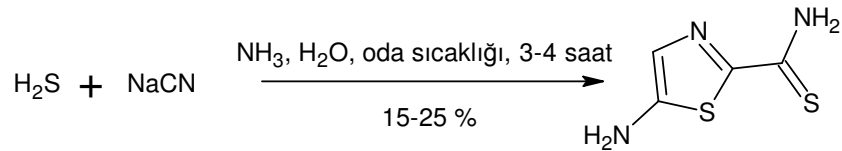


Sefotaksim

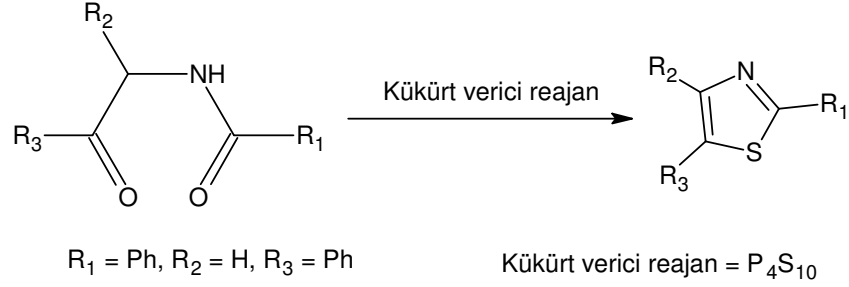
Tiyazol halkası, <sup>1</sup>H-NMR'da DMSO-d<sub>6</sub> içerisinde 9,15 (H<sub>2</sub>), 7,97 (H<sub>4</sub>) ve 7,75 (H<sub>5</sub>) ppm'de pik verir. Tiyazol halkası için eşleşme sabitleri J<sub>2,5</sub>=1,95 ve J<sub>4,5</sub>=3,15'tir<sup>54</sup>.

### 2.5.1.2 Tiyazol Halkası Elde Ediliş Yöntemleri

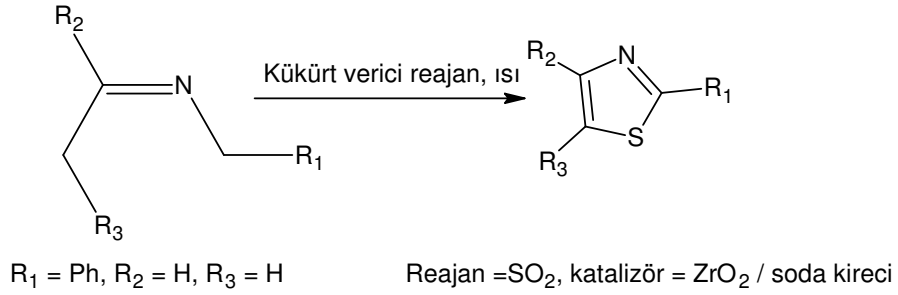
Hidrojen sülfürün, sudaki doymuş sodyum siyanür üzerine eklenmesi sonucu 5-aminotiyazol-2-karbotiyoamid bileşiği düşük verimle edilmektedir. Reaksiyon ortamına amonyak ilavesi reaksiyonu hızlandırmaktadır<sup>54</sup>.



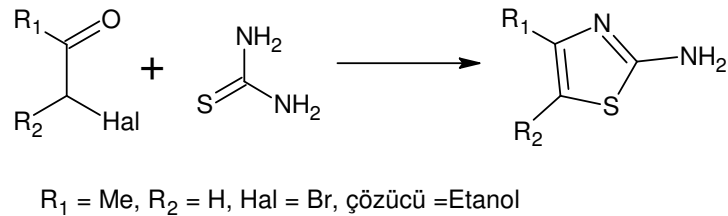
$\alpha$ -Açilaminoketonların sülfür verici bir rejanla tepkimesi tiyazol halkası oluşturmaktadır<sup>54</sup>.



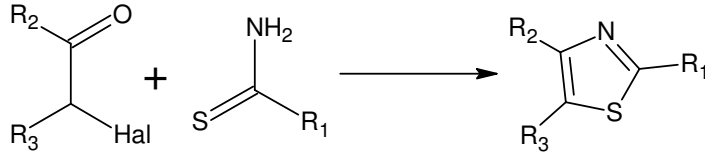
N-Alkiliminlerin gaz fazındaki elementel kükürtle 300 °C'nin üzerinde veya sülfür dioksit ile metal oksit katalizörü varlığında 450 °C'de reaksiyonu sonucu tiyazol türevleri oluşmaktadır<sup>54</sup>.



1887 Yılında Hantzsch  $\alpha$ -halo ketonların tiyoüre ile yüksek verimde tiyazol-2-amin türevlerini oluşturduğunu belirtmiştir. Reaksiyon genellikle su yada alkol içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon tiyoüre ile tiyoamitlere nazaran daha kolay yürümektedir<sup>54</sup>.



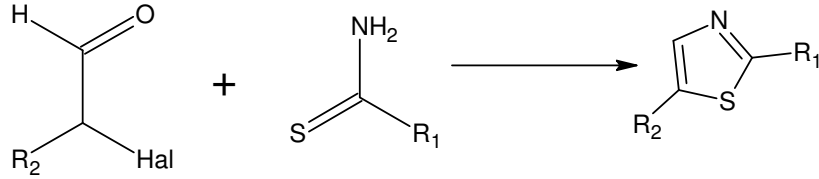
$\alpha$ -Halo ketonların ve tiyoamitlerin ( $R_1$ =alkil ya da aril) reaksiyonu sonucu tiyazol türevleri oluşmaktadır.  $\alpha$ -Kloro keton yerine  $\alpha$ -bromo keton kullanımı reaksiyon verimini yükseltmektedir<sup>54</sup>.



$R_1 = \text{Ph}$ ,  $R_2 = \text{Ph}$ ,  $R_3 = \text{H}$ , Hal = Br, çözücü = susuz etanol

$R_1 = \text{Ph}$ ,  $R_2 = \text{Me}$ ,  $R_3 = \text{Me}$ , Hal = Cl, çözücü = NaOAc, EtOH

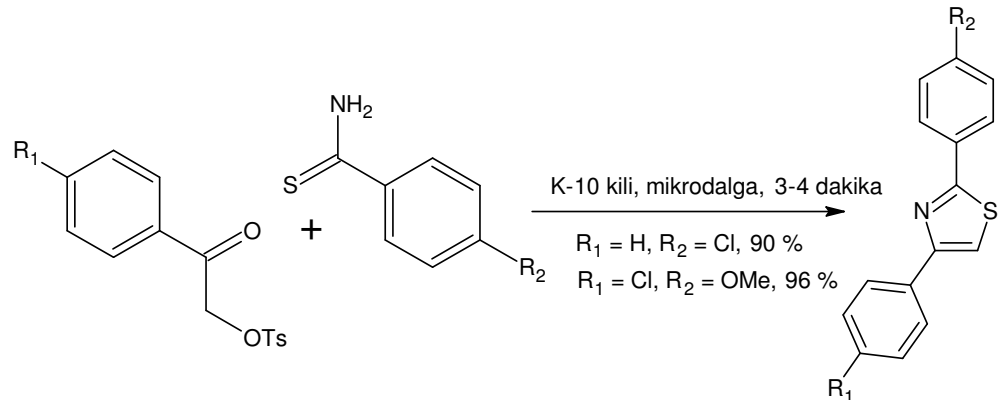
Tiyoamitlerle 2-halo-sübstitüe aldehitlerin reaksiyonundan da tiyazol türevleri oluşmaktadır<sup>54</sup>.



$R_1 = \text{Ph}$ ,  $R_2 = \text{H}$ , Hal = Br, çözücü = susuz etanol, piperidin

$R_1 = \text{Ph}$ ,  $R_2 = \text{Ph}$ , Hal = Br, çözücü = 1, 4-dioksan

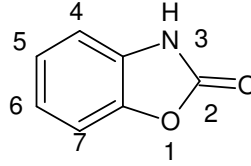
2,4-Diariltiyazol türevleri,  $\alpha$ -tosiloksi-sübstitüe ketonlar ve tiyobenzamitler ile asidik K-10 kili varlığında solvensiz ortamda sentezlenebilmektedir. Bu reaksiyonda mikrodalga kullanımı reaksiyonu hızlandırmakta ve ürün verimini arttırmaktadır<sup>54</sup>.



## 2.5.2 2-OKSO-3H-BENZOKSAZOL ve TÜREVLERİ

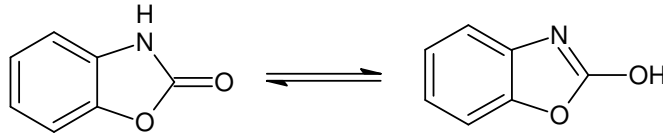
### 2.5.2.1 2-Okso-3H-benzoksazol İle İlgili Genel Bilgiler

2-Okso-3H-benzoksazol, benzen ve 2-oksazolinon halkalarının kaynaşmasından oluşmuş heterosiklik bir bileşiktir. 2-Okso-3H-benzoksazol, 2-benzoksazolinon ve 2(3H)-benzoksazolon olarak da isimlendirilebilmektedir<sup>55</sup>.



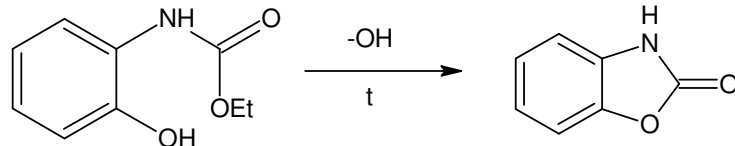
2-Okso-3H-benzoksazol, erime derecesi 139-140 °C olan bir bileşiktir<sup>56</sup>. 2-Okso-3H-benzoksazolün sulu çözeltilerinde pH<5'te noniyonize, pH>11.5'de iyonize halde bulunduğu bildirilmiştir<sup>57</sup>.

2-Okso-3H-benzoksazol, 2-hidroksibenzoksazol ile tautomerizm gösterir. Spektral ve kimyasal bulgulara dayanılarak bu tautomer dengenin laktam formu lehine olduğu belirtilmiştir<sup>58</sup>.

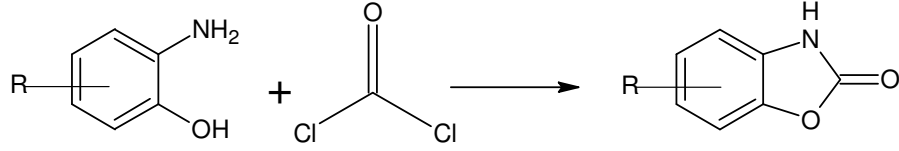


### 2.5.2.2 2-Okso-3H-benzoksazol Yapısının Genel Sentez Yöntemleri

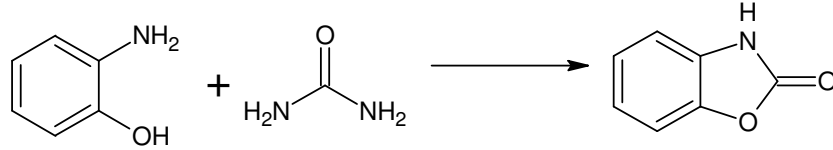
2-Okso-3H-benzoksazol halkası ilk kez 1876 yılında Groenvik tarafından etil N-o-hidroksifenilkarbamattan hareketle sentez edilmiştir<sup>59</sup>.



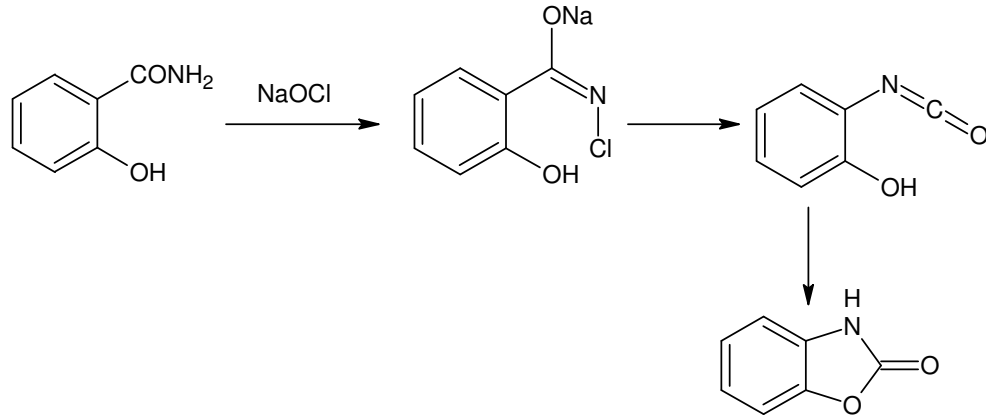
Close ve arkadaşları *o*-aminofenol ve fosgenle hareketle, etilasetat içerisinde ve susuz potasyum asetat varlığında % 90 verimle 2-okso-3*H*-benzoksazol elde etmiştir<sup>56</sup>.



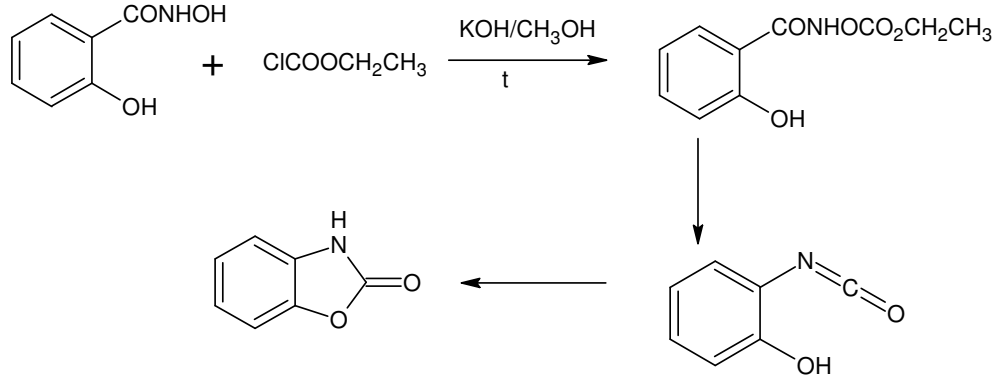
*o*-Aminofenol veya tuzlarının üre ile reaksiyona sokularak 2-okso-3*H*-benzoksazol elde edilmesi ilk defa Sandmeyer tarafından gerçekleştirilmiştir<sup>60</sup>.



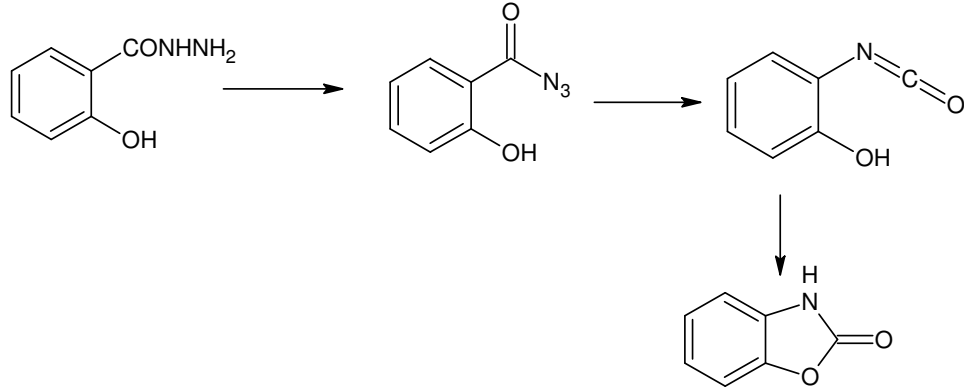
Graebe ve Rostovzeff salisiamitten hareketle Hoffman tepkimesi şartlarında oluşturulan izotiyosiyanat türevi üzerinden 2-okso-3*H*-benzoksazol elde edilebileceğini belirtmişlerdir<sup>61</sup>.



Ostaszynski ve arkadaşları, salisilhidroksamik asit ve etilkloroformat ile Lossen çevrilmesi sonucu 2-okso-3*H*-benzoksazol elde etmişlerdir <sup>62</sup>.



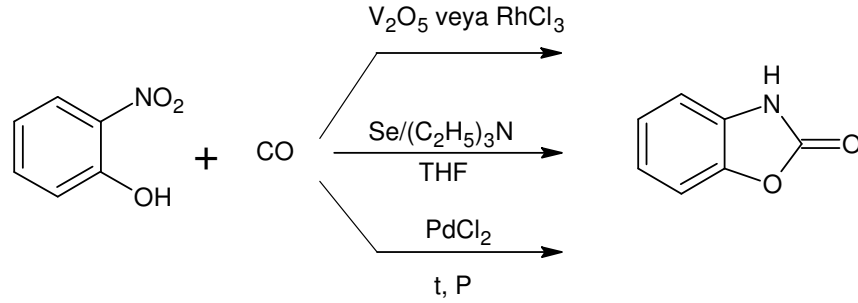
Curtius tepkimesi şartlarında, salisilhidrazitten hareketle 2-okso-3*H*-benzoksazol hazırlanabilmektedir <sup>55</sup>.



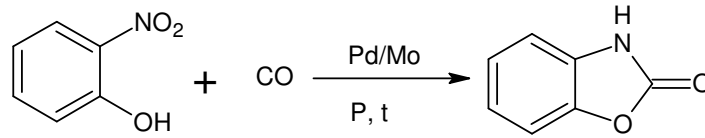
2-Okso-3*H*-benzoksazol eldesinde salisilik asit ve türevlerinden yararlanılmış, ancak bu yöntemler verimin düşüklüğü ve saflaştırma işlemlerindeki güçlükler nedeniyle önemini yitirmiştir.

Yamahara ve Takamatsu 1973 yılında, o-nitrofenol ve karbon monoksitten hareketle vanadyum oksit veya rodyum klorür varlığında % 88 verimle <sup>63</sup>, Nagase 1983 yılında o-nitrofenol ve karbon monoksitten hareketle selenyum ve trietilamin varlığında %97 verimle <sup>64</sup>, White ise 1986 yılında yüksek ısı ve basınçta o-nitrofenol ve karbon

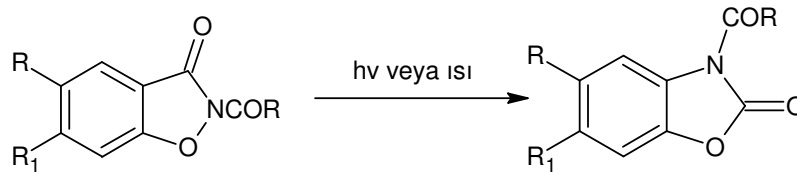
monoksitten hareketle palladyum klorür ve piridin varlığında %91 verimle<sup>65</sup> 2-okso-3*H*-benzoksazol elde etmiştir.



Kervennal ve Cognion ise o-nitrofenölü, piridin-1,2-diklorobenzen karışımında, Pd-Mo varlığında, karbon monoksit ile 200 bar basınç ve 200°C sıcaklıkta sıcaklıkta tepkimeye sokarak 2-okso-3*H*-benzoksazol sentezlemiştir<sup>66</sup>.

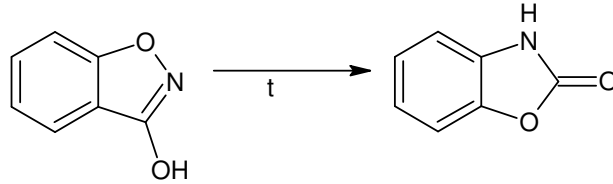


Boeshagen ve Geiger, 3-okso-1,2-benzoksazol'un ısı sonucu %50-80 verimle, fotokimyasal olarak ise %80-90 verimle 2-okso-3*H*-benzoksazol'a çevrildiğini bildirmişlerdir<sup>67</sup>.

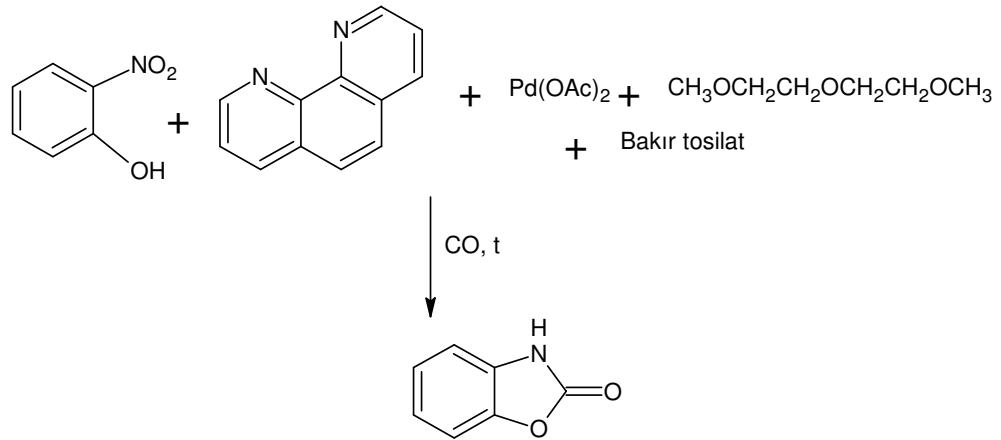




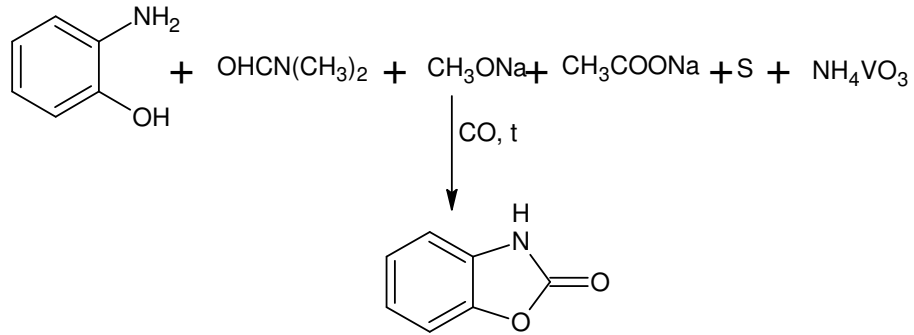
Benzer bir çalışmada 3-hidroksi-1,2-benzoksazolün basınç altında 450°C'de ısıtılmasıyla 2-okso-3*H*-benzoksazol'a çevrildiği bildirilmiştir<sup>68</sup>.



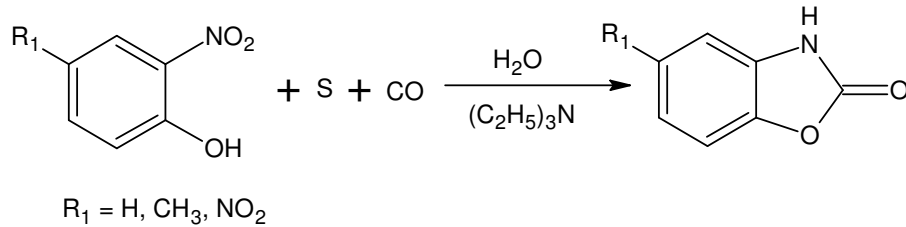
Drent, *o*-nitrofenol, fenentrolin, palladyum asetat, bis (2-metoksieter) (diglim) ve bakır tosilat karışımının otoklavda 75 bar basınç altında 145°C'de karbon monoksit ile 4 saat ısıtılması sonucu %100 verimle 2-okso-3*H*-benzoksazol elde edildiğini ileri sürmüştür<sup>69</sup>.



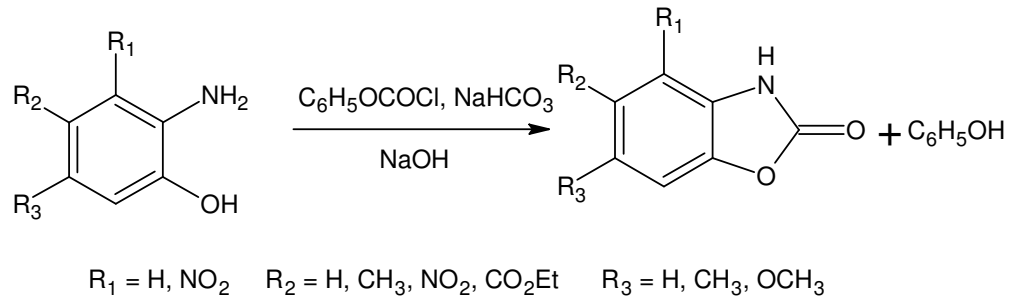
Macho ve arkadaşları, o-nitro veya o-aminofenolün karbon monoksitle 10-300 bar ve 80-240°C'de katalitik bir sistem ile katalitik bir sistem (kükürt, karbon oksisülfür, hidrojen sülfür veya karbon disülfür, alkali metal hidroksit, alkoksit gibi bir baz ve vanadyum pentoksit, amonyum metavanadat gibi bir vanadyum bileşiğinden oluşan) varlığında oksidatif karbonilasyonu ile 2-okso-3*H*-benzoksazol elde edilebileceğini bildirmiştir<sup>70</sup>.



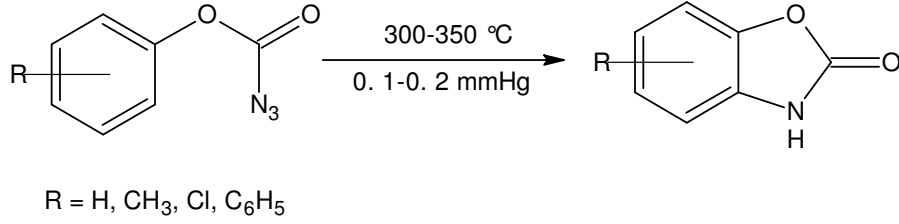
1988 Yılında yapılan bir çalışmada ise sübtitüe nitrobenzenin trietilamin varlığında su, elementel kükürt ve karbon monoksit ile redüktif karbonilasyonu ile 2-okso-3*H*-benzoksazol elde edilebileceği belirtilmiştir<sup>71</sup>.



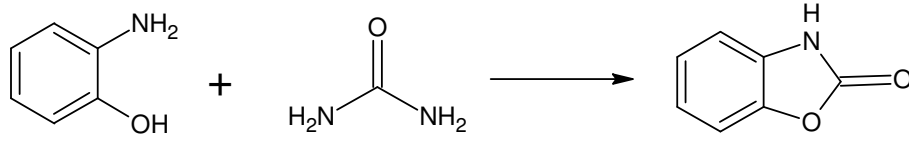
2-Okso-3*H*-benzoksazol türevleri o-aminofenollerin fenil kloroformatla tepkimesi ile de elde edilebilmektedir<sup>72</sup>.



Meth-Cohn ve Rhouati, azidoformatlardan hareketle geliştirdikleri 'sprey piroliz' yöntemiyle molekül içi nitren atağını içeren bir mekanizma ile 2-okso-3*H*-benzoksazol sentez ettiklerini bildirmişlerdir<sup>73</sup>.



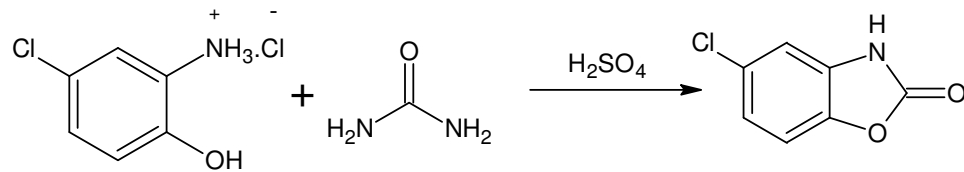
Khajavi ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada 2-aminofenol ve üreden hareketle mikrodalga ışınımı varlığında %89 verimle 2-okso-3*H*-benzoksazol elde etmişlerdir. Mikrodalga ışınımına maruz kalma işlemi reaksiyonun kontrolü açısından iki basamak şeklinde ve basamaklar arasında soğutma süresi uygulanarak gerçekleştirilmiştir<sup>74</sup>.



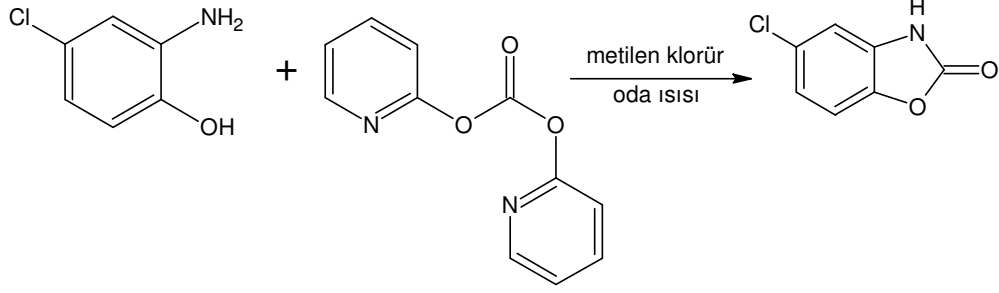
1. Basamak = 210 Watt, 1 dakika
2. Basamak = 385 Watt, 2, 5 dakika

#### 2.5.2.2.1 5-Kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol Yapısının Genel Sentez Yöntemleri

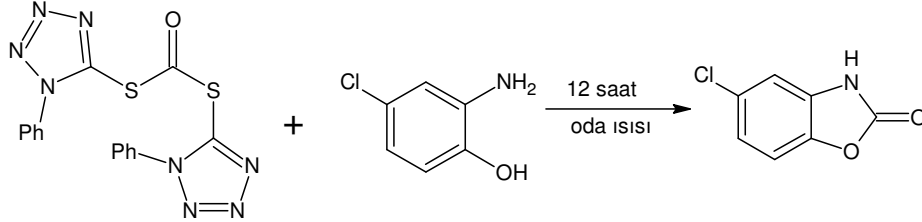
2-Amino-4-klorofenol hidroklorürün üre ile %60'lık sülfürik asit varlığında tepkimesi sonucu % 95 verimle kas gevşetici etkili 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol (klorzoksazon) elde edildiği bildirilmiştir<sup>75</sup>.



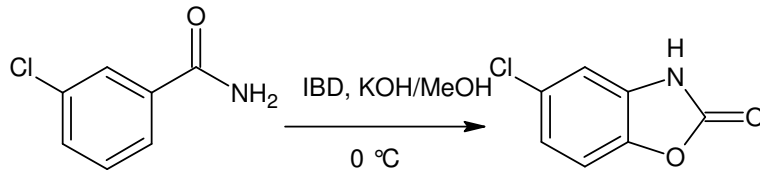
1986 Yılında yapılan bir çalışmada 4-kloro-2-aminofenolün ekivalan miktarda di-2-piridil karbonat (2-DPC) ile metilen klorür içinde tepkimesi sonucu %94 verimle 5-kloro-2-okso-3H-benzoksazolün elde edildiği bildirilmiştir<sup>76</sup>.



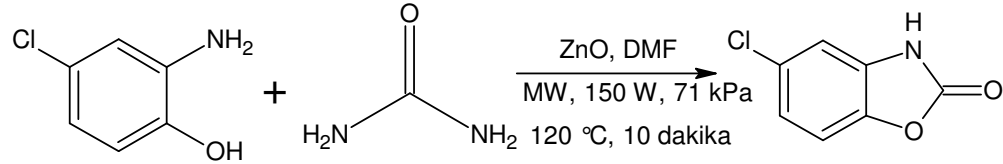
1989 Yılında yapılan bir çalışmada, *S,S'*-bis(1-fenil-1*H*-tetrazol-5-il) ditiyokarbonat ve 4-kloro-2-aminofenolün oda ısısında reaksiyonu sonucu %92 verimle 5-kloro-2-okso-3H-benzoksazolün elde edildiği bildirilmiştir<sup>77</sup>.



Prakash ve arkadaşları, 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada 5-klorosalisilamidin iyodobenzen diasetat (IDB) ile tepkimesi sonucu %68 verimle 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazolün elde edildiğini bildirmişlerdir<sup>78</sup>.



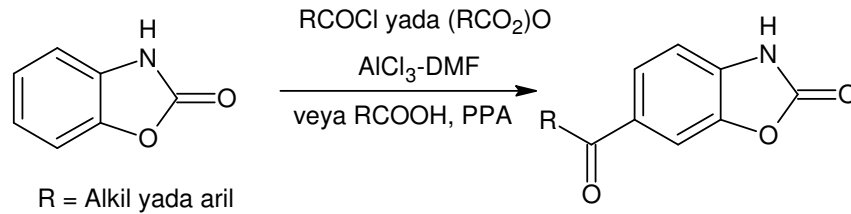
Varma ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada, 4-kloro-2-aminofenol ve ürenin çinkooksit katalizörü varlığında mikrodalga ışınımı altında tepkimesi sonucu %75 verimle 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol elde edildiğini belirtmişlerdir<sup>79</sup>.



### 2.5.2.3 2-Okso-3*H*-benzoksazol Yapısının Kimyasal Tepkimeleri

#### 2.5.2.3.1 Benzen Halkasına Sübstitüsyon Tepkimeleri

2-Okso-3*H*-benzoksazoldaki benzen halkası üzerine açıl grubunun elektrofilik sübstitüsyonunun, Friedel-Crafts açilasyonu şartlarında (polifosforik asit (PPA) içinde karboksilli asitlerle veya  $\text{AlCl}_3$ -DMF veya  $\text{AlCl}_3$ - $\text{CS}_2$  içerisinde asit klorür veya anhidritlerle) molekülün 6 numaralı konumundan gerçekleştiği belirlenmiştir<sup>80</sup>.

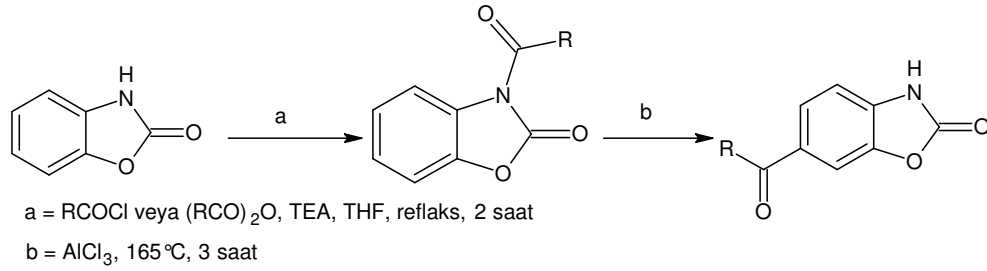


2-Okso-3*H*-benzoksazolun benzen halkasının Friedel-Crafts açılleme tepkimelerinde; açılleyici ajan olarak asit klorürü veya anhidritleri, katalizör olarak Lewis asitleri, özellikle alüminyum klorür, çözücü olarak da karbon sülfür, nitrobenzen veya diklorometan kullanılmaktadır<sup>80</sup>. Açılleme tepkimelerinde  $\text{AlCl}_3$ -DMF/ 2-okso-3*H*-benzoksazol oranının 7-11 olduğu durumlarda verimde ve hızda artış görülmektedir<sup>80</sup>.

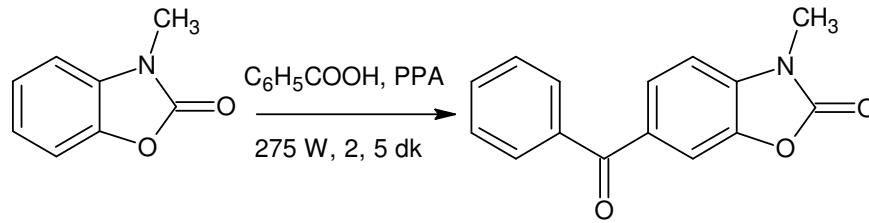
2-Okso-3*H*-benzoksazolun açıllemesi, Friedel-Crafts açılleme tepkimesinden başka çözücü ve katalizör olarak PPA kullanılarak da gerçekleştirilmektedir. Alifatik, aromatik ve arilalifatik karboksilli asitlerle yapılan açılleme tepkimeleri polifosforik asit içerisinde yüksek verimle yürümektedir<sup>81</sup>. PPA polimer bir yapıya sahiptir, organik maddeler için iyi

bir çözücüdür ve aromatik süstitüsyon tepkimesine girme eğilimi göstermez. Akışkanlığının az olması nedeniyle PPA ile 90°C'nin altında çalışılması zordur. Ayrıca PPA'nın tepkimesi sonrası hidrolizi güçtür. Bu kullanım zorluklarına rağmen PPA açılme tepkimelerinde en çok tercih edilen çözücüdür.

$AlCl_3$ -DMF rejanı kullanımı sırasında  $AlCl_3$  tüketiminin fazla olması ve en iyi koşullarda bile 6-benzoil-2-okso-3*H*-benzoksazolun verimin düşük olması nedeniyle, H. Uçar ve arkadaşları 2-okso-3*H*-benzoksazolu 6. konumundan açillemek için önce 2-okso-3*H*-benzoksazolu 3 numaralı konumundan asit anhidrit veya açil halojenür varlığında trietilamin ve THF içerisinde açilemiş, daha sonra N-açil türevini  $AlCl_3$  ile 165°C'de 3 saat ısıtarak 6-açil türevini yüksek verimle elde etmiştir<sup>82</sup>.



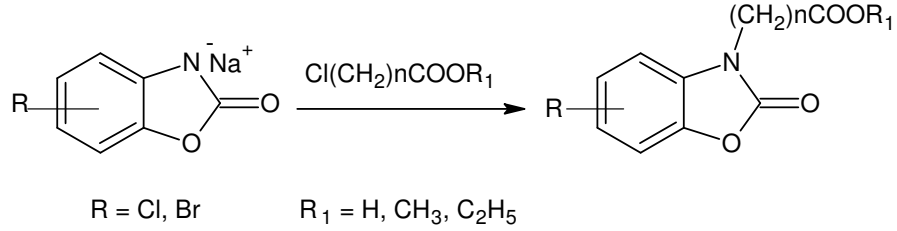
1999 Yılında yapılan bir çalışmada, Liacha ve arkadaşları 3-metil-2-okso-(3*H*)-benzoksazol ve benzoik asitten hareketle, mikrodalga reaktörü içerisinde 275 Watt kullanarak 2,5 dakika sonunda %65 verimle 6-benzoil-3-metil-2-okso-(3*H*)-benzoksazol elde etmişlerdir<sup>83</sup>.



### 2.5.2.3.2 3 Numaralı Konumdan Süstitüsyon Tepkimeleri

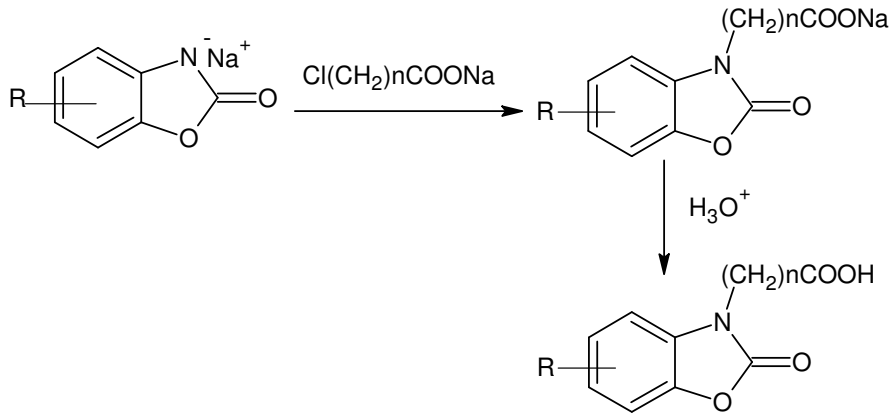
Alkil (2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoat türevlerinin sentezinde genel olarak kullanılan yöntem 2-okso-3*H*-benzoksazolun

sodyum tuzunun oluşturulması ve daha sonra bu tuzun haloalkanoik asit esterleri ile uygun çözücü içerisinde tepkimeye sokulmasıdır<sup>80</sup>.

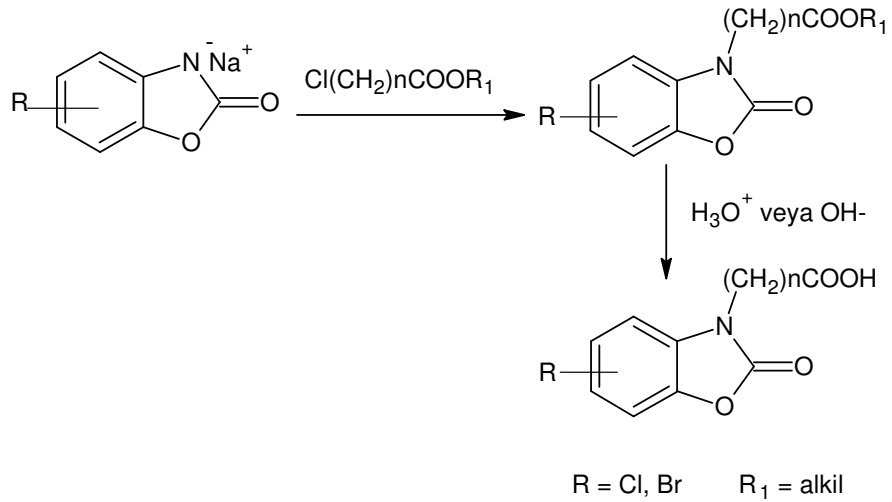


(2-Okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoik asit türevleri üç farklı yöntemle elde edilebilirler.

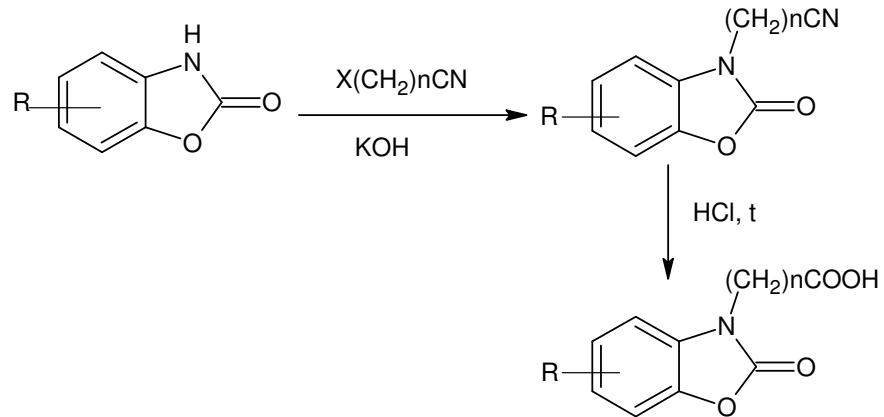
2-Okso-3*H*-benzoksazolun sodyum tuzunun haloalkanoik asit türevlerinin sodyum tuzları ile tepkimeye sokulmasıyla (2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoik asit türevleri elde edilebilmektedir<sup>84</sup>.



Haloalkanoik asit esterleri ile 2-okso-3*H*-benzoksazolun sodyum tuzunun tepkimesinden elde edilen (2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il) alkanooik asit esterlerinin hidroliz edilmesiyle (2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il) alkanooik asit türevleri elde edilebilmektedir<sup>85</sup>.



Değişik yöntemlerle elde edilen 3-(2-siyanoalkil)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin asit ortamda hidrolizi ile (2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)alkanoik asit türevleri elde edilmiştir<sup>86</sup>.

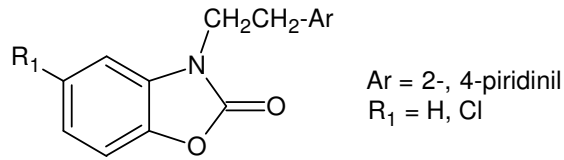




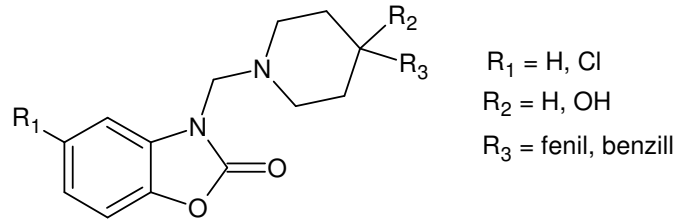
#### 2.5.2.4 Analjezik Ve Antienflamatuvar Özellik Gösteren 5-Kloro-2-okso-3H-benzoksazol Yapısındaki Bileşikler

5-Kloro-2-okso-3H-benzoksazol (klorzoksazon) kas gevşetici bir ilaç olarak klinikte kullanılmaktadır. Klorzoksazon aromatik halkası üzerinde ve 3 numaralı konumunda farklı halojen ve alkil grupları taşıyan çeşitli türevler sentez edilmiş, kas gevşetici etkinliğe sahip olmalarının yanında toksisitelerinin düşük olduğu saptanmıştır<sup>87</sup>.

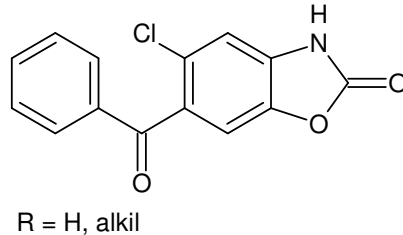
Yapılan bir çalışmada 3-(2-, 4-piridinil)- 2-okso-3H-benzoksazol türevlerinin analjezik ve yüksek antienflamatuvar etkinliğe sahip oldukları belirtilmiştir<sup>88</sup>.



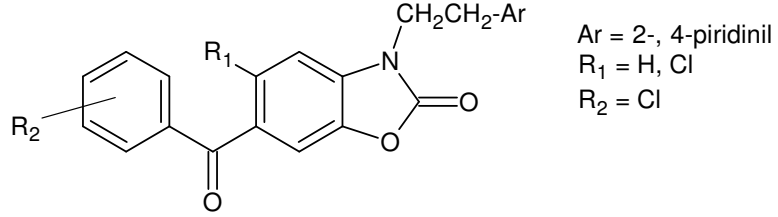
Azot atomu üzerinde piperazinil alkil ve piperidinilmetil grubu taşıyan 2-okso-3H-benzoksazol bileşiklerinin analjezik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir<sup>88</sup>.



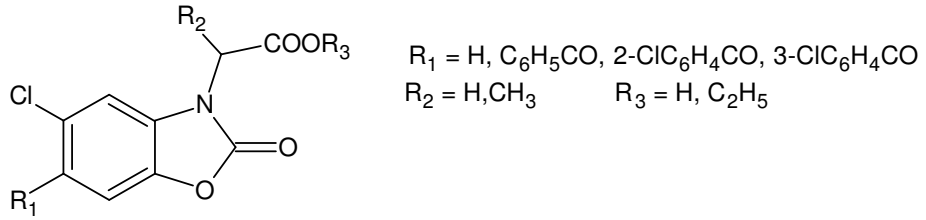
1985 Yılında yapılan bir çalışmada sentezlenen 6-benzoil-5-kloro-3-alkil-2-okso-3H-benzoksazol türevlerinin antienflamatuvar ve antitrombotik etkinliğe sahip olduğu belirtilmektedir<sup>89</sup>.



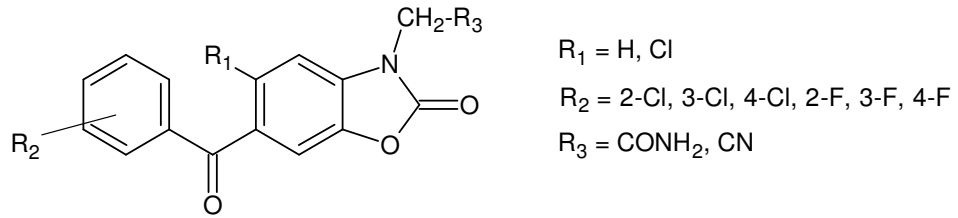
6-Benzoil-3-piridiniletil-2-okso-3*H*-benzoksazol yapısını içeren bileşiklerin çoğunun yüksek analjezik ve antienflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir<sup>88</sup>.



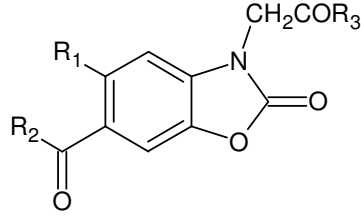
Yapılan bir çalışmada 2-(5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)propanoik asit ve (6-açıl-5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)asetik asit türevlerinin güçlü analjezik etkinlik gösterdiği literatürde kayıtlıdır<sup>90,91</sup>.



6 Numaralı konumunda benzoil içeren (2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)asetamid ve asetonitril türevlerinin analjezik etkinliklerinin olduğu bildirilmiştir<sup>92</sup>.



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 kuvvetli analjezik etkinlik gösterdiği bulunmuştur<sup>84,93</sup>.

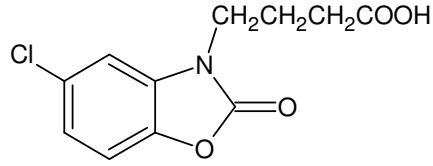


R<sub>1</sub> = H, Cl

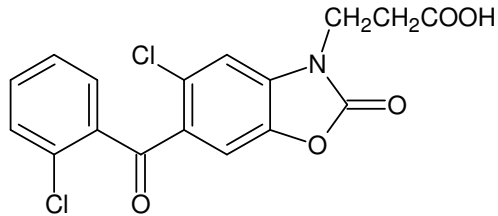
R<sub>2</sub> = fenil

R<sub>3</sub> = OH, OCH<sub>3</sub>, morfolinil, pirolidinil, N-piridinil

2001 Yılında yapılan bir çalışmada 4-(5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)butanoik asidin yüksek analjezik ve antienflamatuvar etkinlik gösterdiği bildirilmiştir<sup>94</sup>.



2003 Yılında yapılan bir diğer çalışmada 6-benzoil-(5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il)propanoik asidin yüksek analjezik ve antienflamatuvar etki gösterdiği bulunmuştur<sup>95</sup>.



## 2.6 COX ENZİMİ İNHİBİTÖR ETKİ TAYİNLERİ İÇİN İN VİTRO TEST SİSTEMLERİ

NSAİ ilaçların COX-1 ve COX-2 selektivitelerini araştırmak için çeşitli in vitro test yöntemleri geliştirilmiştir<sup>96-98</sup>.

Geliştirilen test sistemleri:

- Kullanılan enzimin kaynağı (insan ya da hayvan)
- Enzim hazırlama yöntemi (saflaştırılmış enzim doğal veya rekombinant enzim, tam hücre)
- Araşidonik asit kaynağı (endojen ya da ekzojen)
- Farklı inkübasyon zamanları (COX-1 ve COX-2 için)
- Ortamdaki protein konsantrasyonuna göre çeşitlilik göstermektedir<sup>96,98</sup>.

İdeal bir test sistemi aşağıdaki özellikleri içermelidir<sup>98</sup>;

- Bütün insan hücrelerinde bulunan doğal enzimleri kullanarak yapılmalıdır.
- Kullanılan hücreler antienflamatuvar etki ve NSAİ'lerin yan etkileri için hedef hücreler olmalıdır.
- COX-2 konstitütif olarak üretilmektense, indüklenmeli ve enflamasyon oluşumunu taklit etmelidir.
- Prostaglandin sentezi, ekzojen olarak eklenen araşidonik asit yerine endojen olarak salınan araşidonik asitten ölçülmelidir.

- Ortamdaki protein konsantrasyonu, ilacın proteinlere bağlanmasını doğru hesaplayabilmek açısından plazma protein konsantrasyonunu taklit etmelidir.
- Test sisteminin olurluğu ve tekrar yapılabilirliği hesaplanmalıdır.
- Enzim aktif bölgesi ile ilaç etkileşimini araştırmak için, saflaştırılmış enzimler kullanılmalıdır. Görüntüleme ve yapı aktivite ilişkisi çalışmaları için insan hücre hatları (konstitütif olarak üretilen COX-1 ya da COX-2) veya insan rekombinant enzimleri kullanılmalıdır. Selektif COX-2 inhibisyonun klinik anlamlılığını araştırmak için ise tam hücredeki insan rekombinant enzimleri ya da insan tam kan testleri kullanılmalıdır.

#### 2.6.1 Test sistemleri arasındaki farklılıklar

İnsan rekombinant enzim modelinde aynı ekspresyon sistemi, hem COX-1 hem de COX-2 için kullanılabilir<sup>96</sup>. Doğal enzim yerine rekombinant enzim kullanılan test sisteminde COX-2 konstitütif olarak üretilmekte yani indüklenmemektedir<sup>98</sup>.

İnsan tam kan testinde ise COX-1 aktivitesi için pıhtılaşmış insan tam kanı, COX-2 aktivitesi için lipopolisakkaritle indüklenmiş insan tam kanı kullanılmaktadır<sup>98,99</sup>.

Tam kandaki plazma proteinleri, NSAİ ilaçlar varlığında in vivo ile in vitro arasındaki ilişkiyi kıyaslamaya imkan vermektedir. İnsan tam kan testi ile COX-2 indüklenmediği için, COX-1 ve COX-2'nin inkübasyon zamanlarındaki farklılık test açısından zorluk oluşturmaktadır<sup>98</sup>.

COX-1 inhibitör aktivite testi için, inek aortik endotelial hücreleri, saflaştırılmış koç seminal vezikülü, yıkanmış insan plateletleri, stimüle edilmemiş domuz makrofajları, fare rekombinant enzimi, insan rekombinant enzimi, pıhtılaşan insan tam kanı, insan gastrik mukoza parçaları, stimüle edilmemiş insan kondrositleri, insan sinoviyositleri ve insan plateletleri kullanılmaktadır.

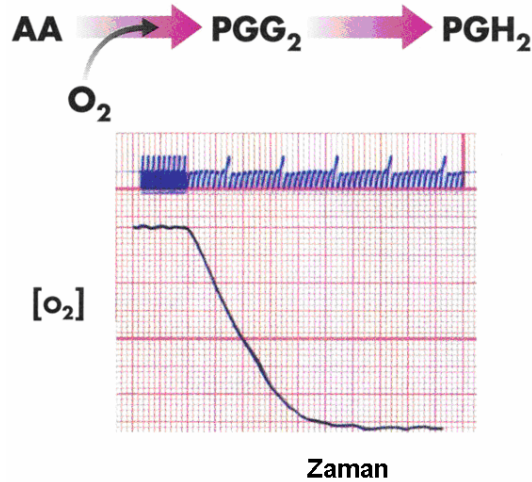
İnhibitör aktivite testi için, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış fare makrofajları, saflaştırılmış koyun plasentası, interlökin-1 (IL-1) ile uyarılmış sıçan mezenşiyal hücreleri, domuz makrofajları, fare rekombinant enzimi insan hücre hattı, insan rekombinant enzimi, LPS ile uyarılmış insan tam kanı (monositleri), IL-1 ile uyarılmış insan kondrositleri ve IL-1 ile uyarılmış insan sinoviyositleri kullanılmaktadır<sup>98</sup>.

## 2.6.2 SİKLOOKSİJENAZ (COX) AKTİVİTE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

Siklooksijenaz aktivitesini belirlemek için çeşitli yöntemler belirlenmiştir<sup>97</sup>.

### 2.6.2.1 Polarografi (Oksigraf)

Siklooksijenaz aktivitesi, oksijen elektrot ile teçhizatlanmış oksigraf ile oksijen tüketiminin görüntülenerek ölçülmesi ile belirlenmektedir. Reaksiyon karışımı EDTA, hematin, fenol ve COX içeren Tris tampon (pH 8.0) içermektedir. Reaksiyon araşidonat ile başlamakta ve grafik kağıdına çizilmektedir<sup>97</sup>.



Şekil 9: Polarografik Yöntem ile Ölçülen Oksijen Tüketim Hızı

Bu yöntem oksijen tüketimini ölçtüğü için kesin, COX aktivitesini doğrudan ölçtüğü için sürekli ve inhibitör enzim mekanistik çalışmalarını ayrıntılı verdiği için mükemmel bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Fakat cihazın birçok laboratuvarında bulunmaması ve yöntem

için ~50 ünite enzim gerekmesi bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır<sup>97</sup>.

#### 2.6.2.2 Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü

Siklooksijenaz enzimi siklooksijenaz ve peroksidaz aktivitesi olan bifonksiyonel bir enzimdir. Hidroperoksi endoperoksit (PGG<sub>2</sub>) komponentinin alkol olan PGH<sub>2</sub>'ye redüklenmesi peroksidaz katalizi sonucu gerçekleşmektedir. Hidroperoksidin redüklendiği esnada, yükseltgenecek ikinci bir substrata ihtiyaç duyulmaktadır. Fenol, COX aktivite testlerinde kullanılan indirgeyici substratlardan birisidir. İndirgeyici substratlar, okside olduklarında renk oluşturmakta ve bu renk UV/Vis ya da luminesans ölçüm ile belirlenmektedir. Peroksidaz aktivitesi için çeşitli yöntemler öne sürülmüştür<sup>97</sup>.

a) Hidrojen peroksit ya da araşidonik asitin substrat olarak kullandığı N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD) oksidasyonunu takip eden kolorimetrik belirleme ile peroksidaz aktivitesi ölçülebilmektedir.

b) Siklooksijenaz peroksidaz aktivitesi redükleyici substrat olarak luminol kullanıldığında luminesans meydana getirmekte ve luminesans luminometre ile ölçülmektedir.

c) Peroksidaz aktivitesi 5-fenil-4-pentil hidroperoksit (PPHP)'nin 5-fenil-4-pentil alkole indigenmesi ile ölçülebilmektedir. Ters faz C<sub>18</sub> kolonda HPLC ile analiz yapılmakta ve PPA ve PPHP konsantrasyonları internal standart kullanılarak hesaplanmaktadır.

#### 2.6.2.3 Prostaglandin ölçümü

Siklooksijenaz reaksiyonunda üretilen prostaglandinlerin miktarı, enzim immüanaliz ile de ölçülmektedir. Reaksiyon karışımı EDTA, hematin, fenol ve COX içeren Tris tampondur (pH 8.0). Reaksiyon araşidonik asitle başlatılmakta ve belirli bir sıcaklıkta belirli derecede inkübe edildikten sonra asitlendirilmektedir. PGH<sub>2</sub>'yi daha dayanıklı olan PGH<sub>2α</sub>'ya indirgemek için doymuş kalay klorür eklenmekte ve prostaglandin miktarı ölçülmektedir. Bu yöntem genel inhibitör görüntüleme için mükemmel bir araç ve 1 üniteden daha az enzim gerektirdiği için hassas bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Numunelerin

enzim kaynağına bağlı olarak saflaştırma gerektirebilmesi ve tek zaman noktalı test sistemi olması bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır<sup>97</sup>.

### 2.6.3 İmmunanaliz Yöntemleri

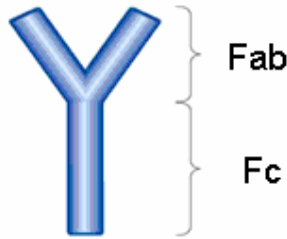
İmmunanaliz; serum, idrar gibi biyolojik sıvıdaki bir madde miktarını antijen-antikor kompleksi kullanarak ölçmeye yarayan biyokimyasal bir testtir<sup>100,101</sup>. Antijen-antikor kompleksi immün-kompleks olarak da bilinmektedir<sup>100</sup>. İmmün, vücudun antikor oluşturmaya neden olan bağışıklık cevabını, analiz ise test kelimesini ifade etmektedir<sup>100</sup>.

**Antikor** yabancı maddelere cevap olarak vücut tarafından üretilen bir proteindir. Antikorlar vücudun kendisini korumak için ürettiği bağışıklık cevabıdır<sup>100</sup>.

**Antijen** bağışıklık yanıtı oluşmasına neden olan, vücudun uzaklaştırmak ya da azaltmak istediği maddedir<sup>100</sup>.

#### **Antikorların yapısı:**

Antikorlar (Ab) immunoglobulin de denilen bir tür proteindirler<sup>100</sup>.



**Şekil 10: Antikor yapısı ve işlevsel bölgeleri**

Fab bölgesi: Farklı antikorlar arasında değişiklik gösteren ve antijen bağlanma bölgesini içeren kısımdır.

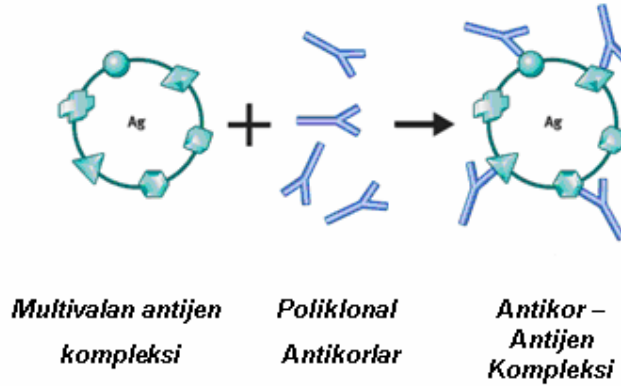
Fc bölgesi: Antikor sınıflarında sabit olan bir yapıdır.



Antikor reajanları, poliklonal ya da monoklonal antikorlardan geliştirilmektedir.

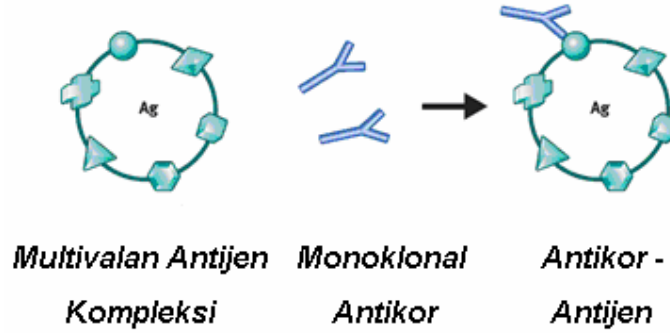
**Poliklonal Antikor:** Poliklonal antiserum (istenen antikorları içeren kan serumu) koyun, tavşan, keçi gibi hayvanlardan elde edilmektedir. Antiserum, herbiri değişik antijen bağlanma bölgesine ya da epitoplara bağlanan antikor karışımını içeren bir karışımdır<sup>100</sup>.

Antiserum genellikle aynı antijene bağlanan antikor karışımını içermektedir ancak antikorlar farklı epitoplara da bağlanabilmektedir<sup>100</sup>.



**Şekil 11: Poliklonal antikorların çoklu özgüllüğü**

**Monoklonal Antikor:** Multivalan antijendeki tek bir epitopa yüksek derecede özgüllük göstermektedir. Monoklonal antikorlar, fare miyeloma hücre hatları ve hibridoma teknolojisi kullanılarak tek bir hücre tarafından üretilmektedirler. Hibridomalar, aynı antijenden çok sayıda üreten ve laboratuvar koşullarında kolayca geliştirilebilen antikor üreten tümör hücreleridir<sup>100</sup>.



**Şekil 12: Monoklonal antikorların değişmez özgülükleri**

Hibridoma hücre hatlarının ölümsüz olması ve aynı antikorları devamlı ve sayısız üretebilmeleri monoklonal antikorlar için avantaj oluşturmaktadır. Hayvanları bağışıklama ile elde edilen poliklonal antiserumun, hayvandan hayvana değişmesi ve tek hayvan kullanıldığı durumlarda, hayvan öldüğü zaman antiserum elde edilememesi poliklonal antikor kullanımı açısından dezavantaj oluşturmaktadır<sup>100</sup>.

Tüm immüanalizler mevcut antijen ya da antikor miktarını ölçmek için işaretli bir madde kullanmaktadır. İşaret, test sisteminin bir parçası olarak hareket etmekte ve kandaki ya da reajan çözeltisindeki değişikliğin ölçülmesine olanak sağlamaktadır<sup>100</sup>. İşaret radyoaktif bir bileşik, çözeltinin renginde değişikliğe neden olan bir enzim ya da ışık üreten bir madde olabilmektedir<sup>100</sup>.

İmmüanalizler uygulama yöntemlerine göre; yarışmasız, yarışmalı, homojen ve heterojen immüanalizler olarak sınıflandırılabilir<sup>100</sup>.

### 2.6.3.1 Yarışmalı immüanaliz

Yarışmalı immüanalizde test örneğindeki işaretlenmemiş madde (genellikle antijen), işaretli antijen ile yarışma kapasitesine göre ölçülmektedir. İşaretlenmemiş antijen, antikorun bağlanma bölgesini işgal ettiği için, işaretlenmiş antijenin bağlanmasını engellemektedir. Bu yüzden yarışmalı inhibisyonda test örneğindeki antijen miktarı ölçülen işaretli madde miktarı ile ters orantılıdır<sup>100</sup>.

### 2.6.3.2 Yarışmalı Olmayan (Sandviç) İmmunanaliz Yöntemi

Bu yöntem genellikle en yüksek hassasiyeti ve spesifiteyi göstermektedir. Bu yöntemde ölçülecek madde miktarı iki antikor arasında bağlı bulunduğu için bu yöntem sandviç test yöntemi de denilmektedir. Bu yöntemde işaretli madde miktarı (genellikle antikor) örnek içindeki mevcut antijen miktarı ile doğru orantılıdır.

### 2.6.3.3 Homojen ve Heterojen İmmunanaliz metotları

Bağlanmış antikor, işaretli antijen kompleksinin ayrılmasını gerektiren immunanaliz yöntemine heterojen, ayrılmasını gerektirmeyen yöntem ise homojen immunanaliz yöntemi denilmektedir<sup>100</sup>.

İmmunanaliz yöntemlerini 5 farklı şekilde sınıflandırmak mümkündür<sup>102</sup>.

#### 2.6.3.3.1 Radyoimmünanaliz (RIA)

Kompetitif ya da non-kompetitif olabilen radyoimmünanalizde antikor ya da antijen, radyoaktif bir madde işaretlenmektedir.

#### 2.6.3.3.2 Enzim İmmunanaliz (EIA)

Bu yöntemde antikor ya da antijen, substratı ölçülebilir bir sonuca dönüştüren ( renk değişimi gibi) enzimle işaretlenmektedir.

#### 2.6.3.3.3 Floresan Polarizasyon İmmunanaliz (FPIA)

Floresan işaretli antijen, işaretsiz antijenle yarışmaktadır. Büyük moleküllerin hareket etme hızının yavaş olmasından ve yavaş hareket eden büyük moleküllerin ışığı polarize edebilme özelliklerinden yararlanarak çözeltideki büyük antikor-antijen-floresan partiküllerinin sayısı ölçülebilmektedir.

#### 2.6.3.3.4 Mikropartikül Enzim İmmunanaliz (MEIA)

Katı faz mikropartikülü, ilgili antijene karşı üretilmiş antikor ile kaplanmakta ve bu kompleks antikoru yakalamak için kullanılmaktadır. Miktarı saptanacak antikor enzim immunanalizdeki gibi bir enzimle işaretlenmektedir.

#### 2.6.3.3.5 Kemilüminesans Manyetik İmmunanaliz (CMIA)

Antijene ya da antikora konjuge edilen kemilüminesans bir madde substratıyla birleştiğinde ışık üretmektedir. Bu yöntem mikro partikül enzim immunanaliz yöntemine benzemektedir, fakat kemilüminesans reaksiyon yüksek duyarlılık ve ölçme kolaylığı sağlamaktadır.

#### 2.6.4 ELISA

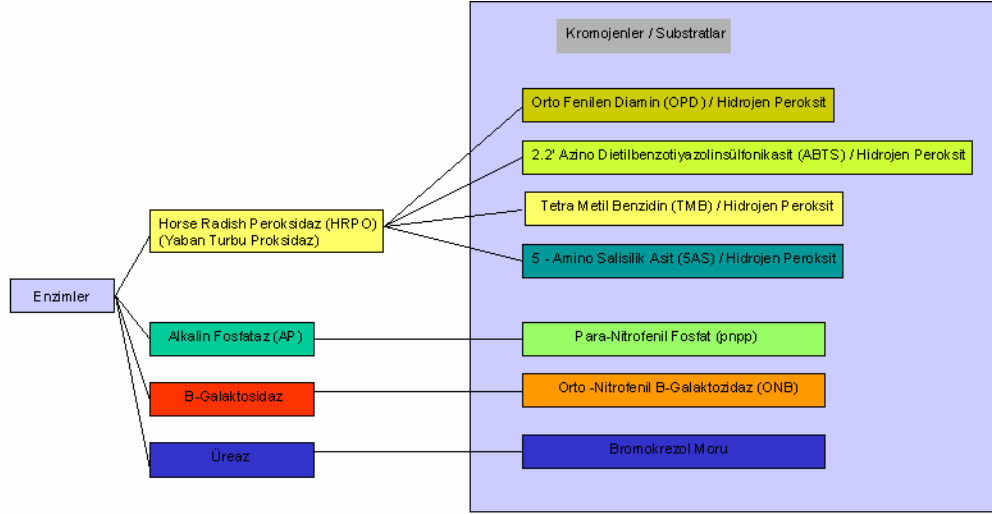
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay); peptit, protein, antikor ve hormon gibi maddeleri tespit etmek ve miktarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem enzim immunanaliz de (EIA) denilmektedir<sup>103</sup>. ELISA, antikorların spesifitesini basit enzim testlerinin duyarlılığıyla birleştiren bir yöntemdir<sup>104</sup>.

ELISA yönteminde antijen katı bir yüzeye sabitlenmekte ve antijen enzime bağlı bir antikor ile bir kompleks oluşturmaktadır. Enzim kompleksi saptanabilir bir ürün üreten substrat ile inkübe edildikten sonra spesifik antikor-antijen etkileşiminin tespiti gerçekleştirilebilmektedir<sup>103</sup>.

ELISA testleri, genellikle antikor ve proteinlerin pasif olarak bağlandıkları 96 ya da 384 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmektedir. Mikroplakanın yüzeyine yerleştirilen ELISA rejanları, bağlanmış ve bağlanmamış maddelerin yıkanarak uzaklaştırılmasını kolaylaştırırken, ELISA testini spesifik bağlanmaları ölçme açısından güçlü bir yöntem şekline getirmektedir.

ELISA yönteminde saptanacak enzim, ya doğrudan primer antikora ya da primer antikorun tanıyacağı sekonder antikora bağlanabilmektedir<sup>103</sup>.

Genellikle kullanılan enzimler yaban turpu peroksidaz (horseradish peroksidaz) ya da alkalin fosfataz işaretli enzimlerdir<sup>103</sup>. Enzimler renksiz substratı renkli ürünlere çevirirler, örneğin alkalin fosfataz p-nitrofenilfosfatı (pNPP) sarı renkli p-nitro fenole çevirmektedir<sup>104</sup>. ELISA yönteminde kullanılan enzimler ve kromojen substratları Şekil 13'te gösterilmiştir.



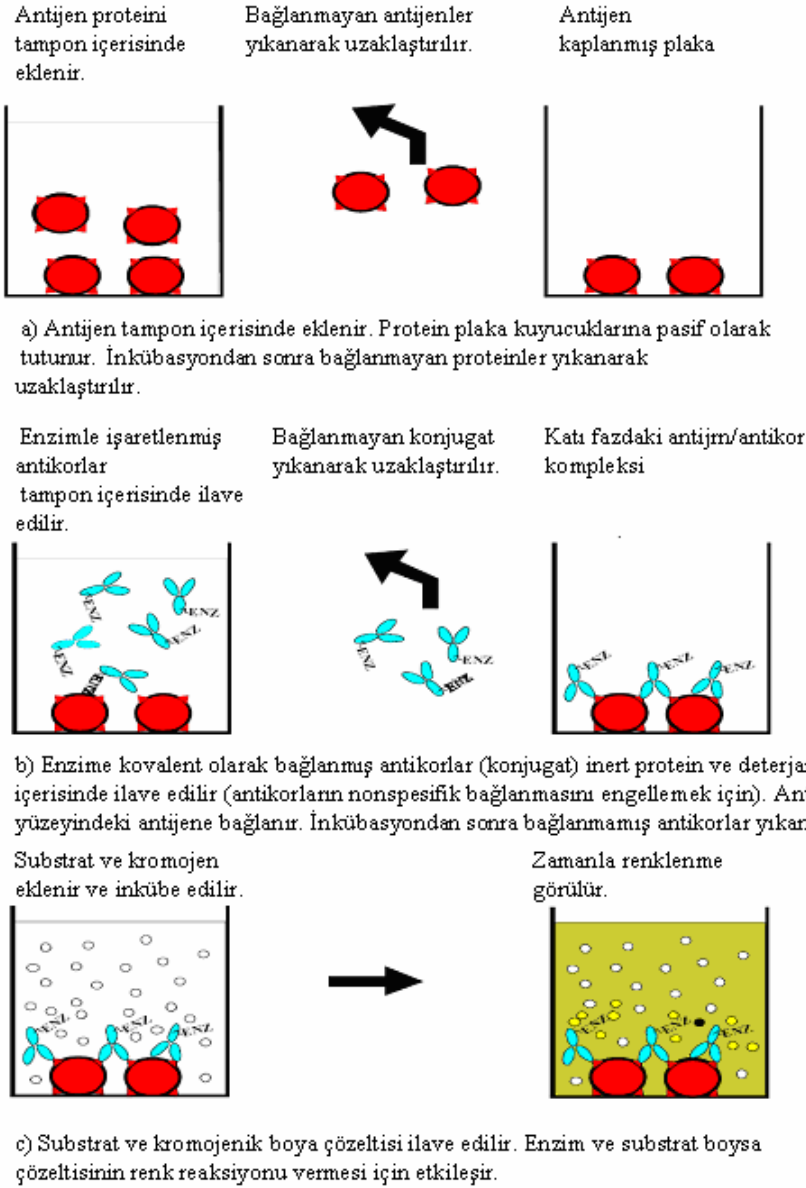
**Şekil 13: Enzimler ve kromojen substratları**

Başlıca dört farklı tür ELISA bulunmaktadır:

#### 2.6.4.1 Doğrudan ELISA

Doğrudan ELISA, 1940'lı yıllarda Coons ve arkadaşlarının doku antijenlerini işaretlemek için floresan işaretli antikorlar kullanmalarıyla ortaya çıkmıştır. Doğrudan ELISA, ELISA yöntemleri arasında çok geniş kullanım alanına sahip olmamakla birlikte dokuların ve hücrelerin immunkimyasal boyamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hızlı bir yöntem olması, tek bir antikor kullanılması ve sekonder antikorun çapraz reaktivitesinin olmaması, bu yöntem için avantaj oluşturmaktadır<sup>103</sup>.

Primer antikorun işaretleme sonucu immunreaktivitesinin azalabilmesi, her primer antikorun işaretlenmesinin zaman alması ve pahalı olması, primer antikor seçiminde esnekliğin olmaması ve düşük sinyal amplifikasyonu bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır<sup>103</sup>.



Şekil 14: Doğrudan ELISA diyagramı

#### 2.6.4.2 Dolaylı ELISA

Dolaylı ELISA yöntemi iki basamaklı bir yöntem olup saptama için ikinci bir antikor kullanır. Bu yöntem Weller ve Coons tarafından 1954 yılında bulunmuştur ve hala yaygın bir yöntem olarak

kullanılmaktadır. Dolaylı ELISA'da primer antikor, antijen ile inkübe edilir ve ardından primer antikoru tanıyan işaretli ikinci bir antikor ile inkübe edilir<sup>103</sup>.

İşaretli sekonder antikorların çeşitinin çok ve ucuz olması, primer antikorların tek bir türde yapılması ve aynı işaretli antikorların saptama için kullanılabilir olması, primer antikorun immunreaktivitesinin işaretleme ile etkilenmemesi, primer antikorların işaretli sekonder antikorların bağlanacağı çeşitli epitoplarının olmasından dolayı duyarlı olması ve aynı primer antikor için değişik görselleştirme belirteçlerinin kullanılabilmesi, bu yöntem için bir avantaj oluşturmaktadır<sup>103</sup>.

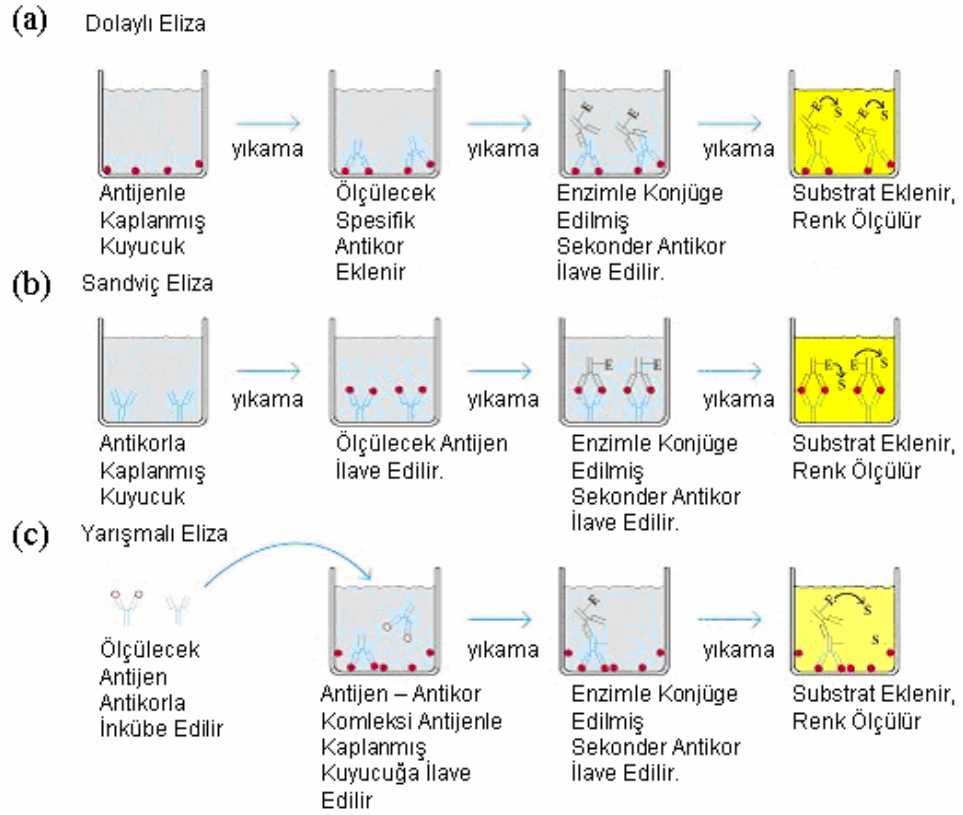
Sekonder antikorun çapraz reaktivitesinin oluşabilmesi ve yöntemin fazladan bir inkübasyon basamağının olması bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır<sup>103</sup>.

#### 2.6.4.3 Sandviç ELISA

İki antikor kullanılarak gerçekleştirilen en kullanışlı immünoanaliz yöntemlerinden birisi sandviç ELISA'dır. Eğer saflaştırılmış antijen standardı mevcutsa bu test ile bilinmeyen numunedeki antijen miktarı kesin olarak saptanabilmektedir. Bu yöntemde, yakalama (capture) antikoru denilen bir antikor saflaştırılır ve plaka kuyucuğunun alt kısmındaki katı faza bağlanır. Antijen eklenir ve bağlanmış antikor ile bir kompleks oluşturması sağlanır. Bağlanmayan ürünler yıkama ile uzaklaştırılır ve işaretli ikinci antikor (saptama antikoru) antijene bağlanır ve sandviç oluşturulur. Kolorimetrik substrat ilavesinden sonra işaretli ikinci antikorun miktarı ölçülür<sup>104</sup>.

Bu yöntemin çok spesifik olması ve antijenin kullanılmadan önce saflaştırma gerektirmemesi bu yöntem için avantaj oluşturmaktadır<sup>104</sup>.

Tüm antikorların kullanılamaması bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır<sup>104</sup>.



Şekil 15: Dolaylı ELISA, Sandviç ELISA ve Yarışmalı ELISA diyagramı

Sandviç ELISA'nın duyarlılığı aşağıdaki faktörlere bağlıdır<sup>104</sup>.

- Katı faza bağlanan primer antikorların molekül sayısı (Antikor çözeltisinin konsantre edilmesi ya da seyreltilmesiyle ayarlanabilir)
- Primer antikorun antijene ilgisi (Sadece başka antikor kullanmak suretiyle antikorun antijene ilgisi değişir)
- Sekonder antikorun antijene ilgisi
- Sekonder antikorun spesifik aktivitesi (İşaretli maddenin tipi ve molekül sayısıyla belirlenir)



#### 2.6.4.4 Yarıřmalđ / İnhibitör ELISA

Bu yöntem ELISA diğer 3 yöntem ELISA'yđ kapsamaktadır. Bu yöntem ile antikor ya da antiğen miktarđ ölçülebilmektedir. Yarıřmalđ ELISA'yđ tanımlamak için C-ELISA, inhibitör ELISA'yđ tanımlamak için de I-ELISA kısaltmaları kullanılabilir. Eğer test örneği yakalayıcı antiğen ve saptama antikorunu konjugat karışımına ilave edilirse buna yarıřmalđ ELISA denilir. Eğer test örneği konjugat ilavesinden önce yakalayıcı antikorla bir süre inkübe edilirse buna inhibitör ELISA denilir<sup>105</sup>.

Bu yöntem özetlenecek olursa, plakanın tabanı primer antikor ile kaplandıktan sonra işaretlememiş standart veya test örnekleriyle inkübe edilir. Bu reaksiyon dengeye ulaştıktan sonra konjuge immunojen eklenir ve bu konjugat primer antikorun işaretlememiş immunojenlerle işgal edilmemiş kısımlarına bağlanır. Son olarak da plakaya substrat ilave edilir ve renk değişikliği ölçülür<sup>104</sup>.

## 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

### 3.1 Kimyasal Çalışmalar

#### 3.1.1 Materyal ve Yöntem

##### 3.1.1.1 Kimyasal Bileşikler

Bu çalışmada kullanılan tüm çözücüler teknik ve analitik niteliktedir. Bileşiklerin sentezinde kullanılan 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol, fosforpentasülfür, tiyobenzamit, 2-klorobenzamit, 4-klorobenzamit, 4-metoksitiyobenzamit, 2-florobenzamit, 4-florobenzamit, Aldrich, bromoasetik asit, metalik sodyum Merck, etilbromoasetat Acros, yapılan analizlerde kullanılan dimetilsülfoksit-d<sub>6</sub> (DMSO- d<sub>6</sub>) Aldrich, potasyum bromür ve Silikajel 60 F<sub>254</sub> (Kat. No: 5554) Merck firmasının ürünleridir.

##### 3.1.1.2 Sentez Yöntemleri

#### 6-(Bromoasetil)-5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol

18,35 g (0,108 mol) 5-Kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol ve 16,68 g (0,120 mol) bromoasetik asit bir balona alındı ve üzerine 200 g polifosforik asit (PPA) ilave edilerek balon içeriği homojen oluncaya kadar mekanik olarak karıştırılır. Balon mikrodalga reaktörüne yerleştirilir. Balon içeriğinin 300 Watt enerjide 10 dakikalık süre içerisinde 100°C'ye getirilmesinin ardından, balon içeriği 300 Watt enerjide 10 dakika içerisinde 120°C'ye getirilir ve 50 dakika boyunca 300 Watt enerjide 120°C'de karıştırılmaya bırakılır. Süre sonunda balon içeriği 1L buzlu su içerisine porsiyonlar halinde boşaltılır. Çöken madde süzülür, kurutulur ve daha ileri saflaştırma yapılmadan sonraki basamakta kullanılır. Elde edilen ham ürün verimi 31,37 g ( %70,35).

#### Tiyobenzamit Türevleri

0,0128 mol Uygun benzamit türevi [2-klorobenzamit (2 g) , 4-klorobenzamit (2 g), 2-florobenzamit (1,78 g), 4-florobenzamit (1,78 g)], 0,0034 mol (1,51 g) fosforpentasülfür ile 25 ml benzen içerisinde, kalsiyum

klorür başlığı takılmış geri çeviren soğutucu altında 30 dakika boyunca karıştırılarak ısıtılır. Süre sonunda balon içeriği başka bir balona dekante edilerek çözünmeyen safsızlıklardan kurtarılır. Benzen rotavaporda kuruluğa kadar uçurulur. Balon içeriğine su ilave edilir. Çöken madde süzülerek alınır ve kurutulur.

#### 5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol türevleri

0,01 mol 6-(Bromoasetil)-5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol 20 ml dietilenglikoldimetileter (diglim) içerisinde çözülür. Üzerine 0,011 mol uygun tiyobenzamit ilave edilir. Reaksiyon ortamında çökme gerçekleşene kadar (1-2 saat), reaksiyon ortamı oda ısısında karıştırılır. Süre sonunda su ilavesiyle ürünün tamamen çökmesi sağlanır. Çöken madde süzülür, kurutulur ve uygun çözücünden kristallendirilir.

#### Etil [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol-3-il]asetat türevleri

0,011 mol Metalik sodyumun 10 ml susuz etanol ile reaksiyonu sonucu elde edilmiş sodyum etoksit çözeltisine 0,01 mol 5-kloro-2-okso-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-3H-benzoksazol türevi ve 20 ml susuz alkol ilave edilir. Tamamen çözünme gerçekleşinceye kadar balon içeriği ısıtılır. Çözünme gerçekleştikten sonra 0,011 mol etil bromoasetat ilave edilerek 3-7 saat geri çeviren soğutucu altında kaynatılır. Çözelti soğutulduktan sonra çöken madde süzülür, kurutulur ve uygun çözücünden kristallendirilir.

#### [5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol-3-il]asetik asit türevleri

##### 1.Yöntem:

0,033 mol Metalik sodyumun 50 ml susuz etanol ile reaksiyonu sonucu oluşan sodyum etoksit çözeltisi rotavaporda kuruluğa kadar uçurulur. Balon içeriği 70 ml N,N-dimetilformamitte çözülür ve üzerine 0,01 mol 5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol türevi ilave edilir. Maddenin tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra balon içerisine 0,02 mol bromoasetik ilave edilir. Balon içeriği mikrodalga reaktöründe 300 Watt enerjide 80-130 °C'de 20-60 dakika tutulur. Süre sonunda çözelti soğutulur ve çöken madde süzülür. Çöken madde N,N-

dimetilformamit ile soğukta yıkanır ve çökelek tekrar süzülür. Çökelek 100 ml suya alınarak derişik hidroklorik asit ile asitlendirilir. Oluşan çökelek süzülür, kurutulur ve uygun çözücünden kristallendirilir.

## 2.Yöntem:

0.002 mol Etil [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol-3-il]asetat türevi 50 ml derişik hidroklorik asit içerisinde geri çeviren soğutucu altında 20 dakika ila 3 saat arası kaynatılır. Çöken madde süzülür, su ile yıkanır, kurutulur ve uygun çözücünden kristallendirilir.

### 3.1.1.3 Analitik Kontroller

#### 3.1.1.3.1 Erime Derecesi Tayini

Bileşiklerin erime dereceleri "Thomas-Hoover Capillary Melting Point Apparatus 9200" erime derecesi tayin cihazında saptanmıştır.

#### 3.1.1.3.2 İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Analizler

##### 3.1.1.3.2.1 Materyal

Plaklar: Çalışmamızda Silikajel 60 F<sub>254</sub> hazır plakları kullanılmıştır.

Çözücü sistemleri: Sentezlenen bileşiklerin kromatografik özelliklerini saptadığımız çözücü sistemleri aşağıda belirtilmiştir.

S-1: Sikloheksan: Etilasetat (60:40)

S-2: Benzen: Metanol (90:10)

S-3: Metanol

#### 3.1.1.3.2.2 Yöntem

Sürüklenme şartları: Kromatografi kuvvetlerine çözücü sistemleri konulduktan sonra oda sıcaklığında doygunluk sağlandı. Hazır plaklara sentez edilen bileşikler ile başlangıç maddelerinin uygun çözücüdeki çözeltileri tatbik edilip oda sıcaklığında bildirilen çözücü sistemlerinde sürüklenerek  $R_f$  değerleri saptanmıştır.

Lekelerin Belirlenmesi: Kromatogramlarda sentez edilen bileşikler ve sentez başlangıç maddelerine ait lekeler, UV lambası (254 nm ve 366 nm) ve Dragendorff belirteci kullanılarak belirlenmiştir.

#### 3.1.1.3.3 Spektrometrik Kontroller

##### 3.1.1.3.3.1 IR Spektrumları

Spektrumlar, potasyum bromür ile 10 ton/cm<sup>2</sup> basınçta hazırlanan yaklaşık %1 oranında madde içeren diskler kullanılarak, Bruker Vektor 22 (Opus Spectroscopic Software Version 2.0) IR spektrofotometresinde alındı ve dalga sayısı (cm<sup>-1</sup>) cinsinden değerlendirilmiştir.

##### 3.1.1.3.3.2 <sup>1</sup>H-NMR Spektrumları

Spektrumlar bileşiklerin DMSO-d<sub>6</sub> içindeki çözeltilisinde, tetrametilsilan (TMS) internal standart olarak kullanılarak, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarındaki Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digital FT-NMR spektrometresinde alınıp,  $\delta$  (ppm) skalasında değerlendirilmiştir.

##### 3.1.1.3.3.3 Elementel Analizler

Bileşiklerin elementel analizleri CHNS-932 (LECO) Elementel Analiz Cihazı ile Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında yaptırılmıştır.

## 3.2 Biyolojik Etkinlik Çalışmaları

### 3.2.1 COX-1 Enzimi İnhibitör Aktivite Testi

Tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), fizyolojik koşullarda yarı ömrünün çok kısa ( $t_{1/2}$  =30 saniye) olması nedeniyle enzimatik olmayan bir şekilde dayanıklı fakat, inaktif kan metaboliti olan Tromboksan B<sub>2</sub>'ye (TXB<sub>2</sub>) dönüştürülmekte<sup>18,50</sup> ve TXB<sub>2</sub> miktarı trombin ile indüklenmiş COX-1 miktarının göstergesi olarak ölçülmektedir<sup>106</sup>.

COX-1 inhibitör aktiviteyi ölçmek için son bir hafta içerisinde non-steroidal antiinflamatuar ilaç almamış, sağlıklı insandan antikoagülan içermeyen tüplere kan alınarak, bileşikler ile 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmış<sup>107</sup> ve serumdaki TXB<sub>2</sub> miktarı kompetitif ELISA esasına göre ölçülmüştür.

#### 3.2.1.1 Materyal

Son bir hafta içerisinde non-steroidal antiinflamatuar ilaç almamış, sağlıklı ve gönüllü bir insandan antikoagülan içermeyen tüplere kan alınmıştır.

COX-1 testi enzim inhibitör aktivite için, Assay Designs Correlate-EIA™ Thromboxane B<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay Kit (Katalog No: 900-002) (96 kuyucuklu) kullanılmıştır. 4 °C'de saklanan kit kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Kit içerisinde bulunan re ajanlar aşağıda belirtilmiştir<sup>108</sup>.

- Keçi anti-Tavşan IgG Mikrotitre Plaka, 96 kuyucuklu, Katalog No: 80-0060 (Tavşan IgG'inin Fc kısmına spesifik, keçi antikoru ile kaplanmış kırılıp ayrılabilen şeritli plaka)
- TXB<sub>2</sub> EIA Konjugatı, 6 ml, Katalog No: 80-0005 (TXB<sub>2</sub> ile konjuge edilmiş mavi renkli alkalın fosfataz çözeltisi)
- TXB<sub>2</sub> EIA Antikoru, 6 ml, Katalog No: 80-0006 (TXB<sub>2</sub>'ye karşı sarı renkli tavşan poliklonal antikor çözeltisi)

- Analiz Tamponu, 30 ml, Katalog No: 80-0010 (Koruyucu olarak proteinler ve sodyum azid içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi)
- Konsantre Yıkama Tamponu, 30 ml, Katalog No: 80-1286 (Deterjan içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi)
- Tromboksan B<sub>2</sub> Standartı, 0.5 ml, Katalog No: 80-0007 (TXB<sub>2</sub>'nin 100,000 pg/mL'lik çözeltisi)
- pNpp Substratı, 20 ml, Katalog No: 80-0075 (Tampon içinde p-nitrofenil fosfat çözeltisi)
- Durdurma Çözeltisi, 5 ml, Katalog No: 80-0247 (Su içinde trisodyum fosfat çözeltisi)
- TXB<sub>2</sub> Test Plan Sayfası, 1 adet, Katalog No: 30-0003

### 3.2.1.2 Yöntem

#### 3.2.1.2.1 Örneklerin Hazırlanması

Sentezlenen bileşiklerin DMSO içinde 5,11 mM konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmış ve bileşiklerin stok çözeltilerinden 1 µL her bir ependorf içine aktarılmıştır. Üzerine son bir hafta içerisinde non-steroidal antiinflamatuvar ilaç almamış, sağlıklı insandan alınan kandan 500 µL ilave edilerek hafifçe karıştırılmış ve ardından bu karışım 37 °C'lik su banyosunda 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda numuneler buza alınmış ve 4 °C'de 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kitin analiz tamponu kullanılarak uygun dilüsyonu şeklinde hazırlanmıştır.

### 3.2.1.2.1.1 Reajanların Hazırlanması

#### TXB<sub>2</sub> Standartlarının Hazırlanması:

100,000 pg/mL konsantrasyondaki TXB<sub>2</sub> standart çözeltisi oda sıcaklığına getirilir. Hazırlanan 7 adet ependorflardan ilkinde 900 µL diğer 6 ependorfa da 666 µL analiz tamponu ilave edilir. Birinci ependorfa 100,000 pg/mL konsantrasyondaki TXB<sub>2</sub> standart çözeltisinden 100 µL ilave edilir ve 1. ependorf vortex ile karıştırılır. 1. ependorftan 2. ependorfa 333 µL ilave edilir ve 2. ependorf vortex ile karıştırılır. 2. ependorftan 3. ependorfa 333 µL ilave edilir ve 3. ependorf vortex ile karıştırılır. Bu işlem diğer ependorflara aynı şekilde uygulanır. 1'den 7'ye kadar olan ependorflardaki TXB<sub>2</sub> konsantrasyonu sırasıyla 10,000, 3,333, 1,111, 370, 123, 41.1 ve 13.7 pg/mL olacaktır<sup>108</sup>.

#### Yıkama Tamponunun Hazırlanması:

Konsantre yıkama tamponundan 5 mL alınır ve üzerine 95 mL deiyonize su eklenerek yıkama tamponu hazırlanır<sup>108</sup>.

### 3.2.1.2.2 Analiz Prosedürü

Reajanlar analize başlamadan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiş ve standartlar ile numuneler çift olarak çalışılmıştır<sup>108</sup>.

1) Analiz test plan sayfası hazırlanarak kullanılmayacak kuyucuklar kisten ayrılır hava almayacak şekilde 4 °C'de saklanır.



Oluşturulan TXB<sub>2</sub> test plan sayfası aşağıdaki gibidir:

**Tablo 8: TXB<sub>2</sub> test plan sayfası**

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

TA: Total aktivite, NSB: Spesifik olmayan bağlanma, Bo: En fazla bağlanma, SC: Güçlü COX-1 inhibitörü bileşik, St: Standart, Ör: Örnek

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

3) Standart kuyucuklarına hazırlanan farklı konsantrasyondaki standartlar ilave edilir.

4) Örnek kuyucuklarına 100 µL hazırlanan örneklerden ilave edilir.

5) NSB kuyucuğuna 50 µL analiz tamponu eklenir.

6) TA ve kör hariç her bir kuyucuğa 50 µL mavi renkli konjugat eklenir.

7) K r, TA ve NSB kuyucukları hariç her bir kuyucuğa 50  L sarı renkli antikor ilave edilir. (Bu esnada k r ve TA kuyucukları boŐ oldukları için rensiz, NSB mavi renkli, kalan tüm kuyucuklar ise yeşil renkli olmaktadır.)

8) Plaka, 200 rpm'de 2 saat boyunca çalkalayıcı da çalkalanır.

9) Tüm kuyucuklar, her bir kuyucuk için 400  L yıkama çözeltisi kullanılarak 3 defa yıkanır.

10) Kuyucuklarda yıkama tamponu kalması ihtimaline karşın plaka bir peçete üzerine ters çevrilerek kalan yıkama çözeltisinden kurtarılır.

11) TA kuyucuğuna 5  L mavi konjugat eklenir.

12) Her bir kuyucuğa 200  L pNpp substrat çözeltisi eklenir ve plaka 45 dakika boyunca, oda sıcaklığında, çalkalamadan bekletilir.

13) Süre sonunda her kuyucuğa 50  L durdurma çözeltisi ilave edilir ve beklemeden 405 nm'de k r kuyucuğuna karşı okuma yapılır.

#### 3.2.1.2.3 Hesaplamalar

1) Ortalama net optik dansite (OD) her bir standartın ve örneğin optik dansite ortalamalarından NSB kuyucuklarının optik dansite ortalamalarının çıkarılması ile bulunur.

**Ortalama Net OD=Standartların veya  rneğlerin OD ortalamaları-  
NSB OD ortalaması**

2) Yüzde bağlanma değerleri, bulunan net OD değerlerinin Bo kuyucuklarının optik dansite ortalamalarına bölünmesi ve 100 ile çarpılması ile bulunur.

**% Bağlanma=Net OD/ Net Bo ODx100**

3) Sigma-plot programı kullanılarak standartların yüzde bağlanmaları ve TXB<sub>2</sub> konsantrasyonları ile logaritmik bir eğri çizilir ve örneklerin TXB<sub>2</sub> konsantrasyonları pg/mL olarak hesaplanır.

4) Bileşiklerin % inhibisyonu, kandaki TXB<sub>2</sub> konsantrasyonundan örneklerin TXB<sub>2</sub> konsantrasyonunun çıkarılmasıyla oluşan değer, kandaki TXB<sub>2</sub> konsantrasyonuna bölünmesiyle hesaplanır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Kan TXB}_2 \text{ kons.} - \text{Örnek TXB}_2 \text{ kons.}) \times 100}{\text{Kan TXB}_2 \text{ kons.}}$$

### 3.2.2 COX-2 Enzimi İnhibitör Aktivite Testi

COX-2 inhibitör aktivite için lipopolisakkarit (LPS) ile kanda monositlerden COX-2 katalizörlüğünde PGE<sub>2</sub> sentezi indüklenmekte ve oluşan PGE<sub>2</sub> miktarı COX-2 aktivitesinin göstergesi olarak ölçülmektedir<sup>106,107</sup>. Son bir hafta içerisinde non-steroidal antiinflamatuar ilaç almamış, sağlıklı insandan heparinli tüplere alınan kan, bileşikler ve LPS ile 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış<sup>106,107</sup> ve serumdaki PGE<sub>2</sub> miktarı kompetitif ELISA esasına göre ölçülmüştür.

#### 3.2.2.1 Materyal

Son bir hafta içerisinde non-steroidal antiinflamatuar ilaç almamış, sağlıklı ve gönüllü insandan heparinli tüplere kan alınmıştır.

COX-2 testi enzim inhibitör aktivite için, Assay Designs Correlate-EIA™ Prostaglandin E<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay Kit (Katalog No: 900-001) (96 kuyucuklu) kullanılmıştır. 4 °C'de saklanan kit (konjugat ve standart -20 °C'de saklanmıştır) kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Kit içerisinde bulunan re ajanlar aşağıda belirtilmiştir<sup>109</sup>.

- Keçi anti-Fare IgG Mikrotitre Plaka, 96 kuyucuklu, Katalog No: 80-0050 (Fare IgG'ye spesifik, keçi antikoruna ile kaplanmış kırılıp ayrılabilen şeritli plaka)
- PGE<sub>2</sub> EIA Konjugatı, 6 ml, Katalog No: 80-0002 (PGE<sub>2</sub> ile konjuge edilmiş mavi renkli alkalın fosfataz çözeltisi)

- PGE<sub>2</sub> EIA Antikoru, 6 ml, Katalog No: 80-0003 (PGE<sub>2</sub>'ye karşı sarı renkli monoklonal antikor çözeltisi)
- Analiz Tamponu, 30 ml, Katalog No: 80-0010 (Koruyucu olarak proteinler ve sodyum azid içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi)
- Konsantre Yıkama Tamponu, 30 ml, Katalog No: 80-1286 (Deterjan içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi)
- Prostaglandin E<sub>2</sub> Standartı, 0.5 ml, Katalog No: 80-0004 (50,000 pg/mL'lik PGE<sub>2</sub> çözeltisi)
- pNpp Substratı, 20 ml, Katalog No: 80-0075 (Tampon içinde p-nitrofenil fosfat çözeltisi)
- Durdurma Çözeltisi, 5 ml, Katalog No: 80-0247 (Su içinde trisodyum fosfat çözeltisi)
- PGE<sub>2</sub> Test Plan Sayfası, 1 adet, Katalog No: 30-0002

### 3.2.2.2 Yöntem

#### 3.2.2.2.1 Örneklerin Hazırlanması

Sentezlenen bileşiklerin DMSO içinde 5,11 mM konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmış ve bileşiklerin stok çözeltilerinden 1 µL her bir ependorf içine aktarılmıştır. Üzerine 0.51 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış olan stok lipopolisakkarit (LPS) çözeltisinden 10 µL ilave edilmiştir. Son olarak da üzerine son bir hafta içerisinde non-steroidal antiinflamatuvar ilaç almamış, sağlıklı insandan alınan kandan 500 µL ilave edilerek hafifçe karıştırılmış ve ardından bu karışım 37 °C'lik su banyosunda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda numuneler buza alınmış ve 4 °C'de 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kitin analiz tamponu kullanılarak uygun dilüsyonu şeklinde hazırlanmıştır.

### 3.2.2.2.1.1 Reajanların Hazırlanması

#### PGE<sub>2</sub> Standartlarının Hazırlanması:

50,000 pg/mL konsantrasyondaki PGE<sub>2</sub> standart çözeltisi oda sıcaklığına getirilir. Hazırlanan 7 adet ependorftan ilkinde 950 µL diğer 6 ependorfa da 500 µL analiz tamponu ilave edilir. Birinci ependorfa 50,000 pg/mL konsantrasyondaki PGE<sub>2</sub> standart çözeltisinden 50 µL ilave edilir ve 1. ependorf vortex ile karıştırılır. 1. ependorftan 2. ependorfa 500 µL ilave edilir ve 2. ependorf vortex ile karıştırılır. 2. ependorftan 3. ependorfa 500 µL ilave edilir ve 3. ependorf vortex ile karıştırılır. Bu işlem diğer ependorflara da aynı şekilde uygulanır. 1'den 7'ye kadar olan ependorflardaki PGE<sub>2</sub> konsantrasyonu sırasıyla 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1 ve 39.1 pg/mL olacaktır<sup>109</sup>.

#### Yıkama Tamponunun Hazırlanması:

Konsantre yıkama tamponundan 5 mL alınır ve üzerine 95 mL deiyonize su eklenerek yıkama tamponu hazırlanır<sup>109</sup>.

### 3.2.2.2.2 Analiz Prosedürü

Reajanlar analize başlamadan 30 dakika önce, oda sıcaklığına getirilmiş ve standartlar ile numuneler çift olarak çalışılmıştır<sup>109</sup>.

1) Analiz test plan sayfası hazırlanarak kullanılmayacak kuyucuklar kitten ayrılır hava almayacak şekilde 4 °C'de saklanır.

Oluşturulan PGE<sub>2</sub> test plan sayfası aşağıdaki gibidir:

**Tablo 9: PGE<sub>2</sub> test plan sayfası**

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

TA: Total aktivite, NSB: Spesifik olmayan bağlanma, Bo: En fazla bağlanma, DuP: Güçlü COX-2 inhibitörü bileşik, St: Standart, Ör: Örnek

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

3) Standart kuyucuklarına hazırlanan farklı konsantrasyondaki standartlar ilave edilir.

4) Örnek kuyucuklarına 100 µL hazırlanan örneklerden ilave edilir.

5) NSB kuyucuğuna 50 µL analiz tamponu eklenir.

6) TA ve kör hariç her bir kuyucuğa 50 µL mavi renkli konjugat eklenir.

7) K r, TA ve NSB kuyucukları hariç her bir kuyucuğa 50  L sarı renkli antikör ilave edilir. (Bu esnada k r ve TA kuyucukları boŐ oldukları için rensiz, NSB mavi renkli, kalan tüm kuyucuklar ise yeşil renkli olmaktadır.)

8) Plaka, 200 rpm'de 2 saat boyunca çalkalayıcı da çalkalanır.

9) Tüm kuyucuklar her bir kuyucuk için 400  L yıkama çözeltisi kullanılarak 3 defa yıkanır.

10) Kuyucuklarda yıkama tamponu kalması ihtimaline karşın plaka bir peçete üzerine ters çevrilerek kalan yıkama çözeltisinden kurtarılır.

11) TA kuyucuğuna 5  L mavi konjugat eklenir.

12) Her bir kuyucuğa 200  L pNpp substrat çözeltisi eklenir ve plaka 45 dakika boyunca, oda sıcaklığında, çalkalamadan bekletilir.

13) Süre sonunda her kuyucuğa 50  L durdurma çözeltisi ilave edilir ve beklemeden 405 nm'de k r kuyucuğuna karşı okuma yapılır.

#### 3.2.2.2.3 Hesaplamalar

1) Ortalama net optik dansite (OD) her bir standartın ve örneğin optik dansite ortalamalarından NSB kuyucuklarının optik dansite ortalamalarının çıkarılması ile bulunur.

**Ortalama Net OD=Standartların veya  rneklelerin OD ortalamaları-NSB OD ortalaması**

2) Yüzde bağlanma değerleri, bulunan net OD değerlerinin Bo kuyucuklarının optik dansite ortalamalarına bölünmesi ve 100 ile çarpılması ile bulunur.

**% Bağlanma=Net OD/ Net Bo ODx100**

3) Sigma-plot programı kullanılarak standartların yüzde bağlanmaları ve PGE<sub>2</sub> konsantrasyonları ile logaritmik bir eğri çizilir ve örneklerin PGE<sub>2</sub> konsantrasyonları pg/mL olarak hesaplanır.

4) Bileşiklerin % inhibisyonu, kandaki PGE<sub>2</sub> konsantrasyonundan örneklerin PGE<sub>2</sub> konsantrasyonunun çıkarılmasıyla oluşan değer, kandaki PGE<sub>2</sub> konsantrasyonuna bölünmesiyle hesaplanır.

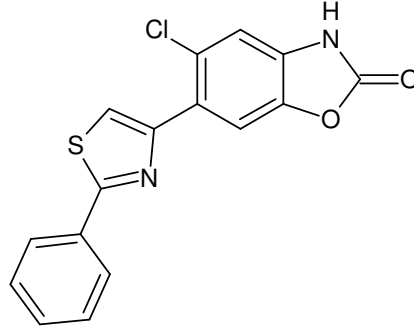
$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Kan PGE}_2 \text{ kons.} - \text{Örnek PGE}_2 \text{ kons.}) \times 100}{\text{Kan PGE}_2 \text{ kons.}}$$



## 4. BULGULAR

### 4.1 Kimyasal Çalışmalar

#### 4.1.1 5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol (Bileşik 1)



5,38 g (0,018 mol) 6-(Bromoasetil)-5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol ile 2,76 g (0,02 mol) tiyobenzamitten hareketle, 40 ml dietilenglikoldimetileter içerisinde genel sentez yöntemine göre elde edilip, etanolden kristallendirildi. Verim 1.64 g (%27,71)

Beyaz renkte, toz şeklinde kristallerdir. E.d. 237-38°C'dir. Suda çözünmez, etanolde az, N,N-dimetilformamit ve asetonunda çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde R<sub>f</sub> değerleri sırasıyla 0,48; 0,82; 0,79'dur. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde yeşil renk verir.

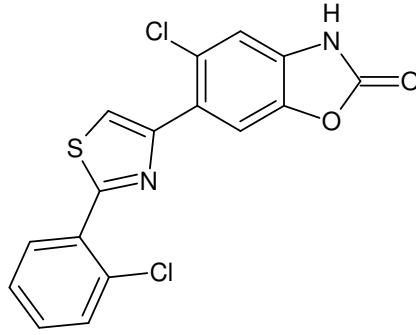
IR spektrumunda, 3275 (N-H gerilim, laktam), 3132 (C-H gerilim, aromatik), 1775 (C=O gerilim, laktam), 1479 (C=N gerilim, tiyazol), 761 ve 715 (monosüstitüe benzen) cm<sup>-1</sup>'de bandlar görülür.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12 (s, 1H, -NH-), 8,10 (s, 1H, tiyazol-H<sup>5</sup>), 8,05-8,00 (m, 2H, H<sup>2</sup>-H<sup>6</sup>), 7,85 (s, 1H, H<sup>7</sup>), 7,57-7,50 (m, 3H, H<sup>3</sup>-H<sup>4</sup>-H<sup>5</sup>), 7,30 (s, 1H, H<sup>4</sup>) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz:

C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	58,45	2,76	8,52	9,75
Bulunan	58,73	2,95	8,66	9,94

4.1.2 5-Kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol  
(Bileşik 2)



2,61 g (0,009 mol) 6-(Bromoasetil)-5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol ile 1,71 g (0,01 mol) 2-klorotiyobenzamitten hareketle, 20 ml dietilenglikoldimetileter içerisinde genel sentez yöntemine göre elde edilip, sikloheksan ile kaynatılarak temizlendi. Verim 1,06 g (%32.43)

Beyaz renkte, toz şeklinde kristallerdir. E.d. 270-72°C'dir. Suda, sikloheksanda çözünmez, etanolde az, N,N-dimetilformamit ve asetonda çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde R<sub>f</sub> değerleri sırasıyla 0,41; 0,82; 0,71'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde yeşil renk verir.

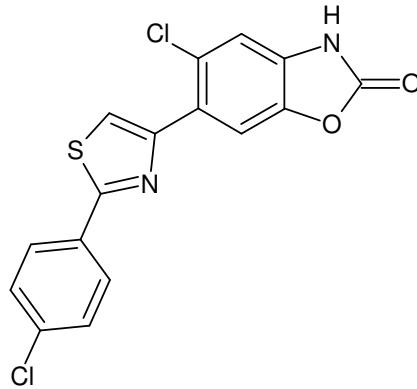
IR spektrumunda, 3444 (N-H gerilim, laktam), 3136 (C-H gerilim, aromatik), 1783 (C=O gerilim, laktam), 1473 (C=N gerilim, tiyazol), 753 (1,2-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12 (s, 1H, -NH-), 8,33-8,27 (m, 1H,  $\text{H}^4$ ), 8,27 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 7,86 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,70-7,65 (m, 1H,  $\text{H}^6$ ), 7,56-7,50 (m, 2H,  $\text{H}^3$ - $\text{H}^5$ ), 7,31 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz:

$\text{C}_{16}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	52,91	2,22	7,71	8,83
Bulunan	53,02	2,39	7,80	8,86

4.1.3 5-Kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol  
(Bileşik 3)



2,90 g (0,01 mol) 6-(Bromoasetil)-5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol ile 1,88 g (0,011 mol) 4-klorotiyobenzamitten hareketle, 20 ml dietilenglikoldimetiler içerisinde genel sentez yöntemine göre elde edilip, etanolden kristallendirildi. Verim 0,93 g (%25,72)

Beyaz renkte, toz şeklinde kristallerdir. E.d. 280-82°C'dir. Suda çözünmez, etanolde az, N,N-dimetilformamit ve asetonda çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde  $R_f$  değerleri sırasıyla 0,36; 0,82; 0,79'tur. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde yeşil renk verir.

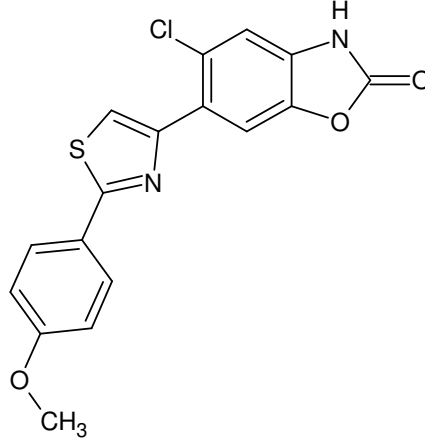
IR spektrumunda, 3405 (N-H gerilim, laktam), 3148 ve 3066 (C-H gerilim, aromatik), 1759-1738 (C=O gerilim, laktam), 1476 (C=N gerilim, tiyazol), 836 (1,4-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12 (s,1H, -NH-), 8,13 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 8,07-8,01 (d, 2H,  $J=8,8$ ,  $\text{H}^2$ - $\text{H}^6$ ), 7,85 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,62-7,57 (d, 2H,  $J=8,4$ ,  $\text{H}^3$ - $\text{H}^5$ ), 7,30 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), ppm'de pikler görülür.

#### Elementel analiz

$\text{C}_{16}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	52,91	2,22	7,71	8,83
Bulunan	52,59	2,31	7,75	8,74

4.1.4 5-Kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol (Bileşik 4)



2,90 g (0,01 mol) 6-(Bromoasetil)-5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol ile 1,83 g (0,011 mol) 4-metoksitiyobenzamitten hareketle, 20 ml dietilenglikoldimetileter içerisinde genel sentez yöntemine göre elde edilip, etanolden kristallendirildi. Verim 0,67 g (%18,71)

Beyaz renkte, iğne şeklinde kristallerdir. E.d. 221-23°C'dir. Suda, sikloheksanda çözünmez, etanol, metanol, 2-propanolde az, benzen ve asetonda çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde  $R_f$  değerleri sırasıyla 0,35; 0,82; 0,77'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde yeşil renk verir.

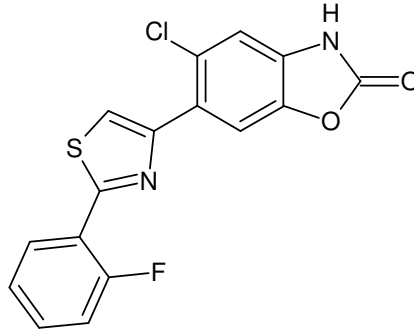
IR spektrumunda, 3193 (N-H gerilim, laktam), 3027 (C-H gerilim, aromatik), 2966 ve 2840 (C-H gerilim, alifatik), 1758 (C=O gerilim, laktam), 1479 (C=N gerilim, tiyazol), 1253 (C-O gerilim), 836 (1,4-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,98 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 7,95-7,91 (d, 2H,  $J=8,4$ ,  $\text{H}^2$ - $\text{H}^6$ ), 7,82 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,27 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), 7,08-7,04 (d, 2H,  $J=8,4$ ,  $\text{H}^3$ - $\text{H}^5$ ), 3,81 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ) ppm'de pikler görülür.

## Elementel analiz

C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	56,91	3,09	7,81	8,94
Bulunan	57,16	3,15	7,97	8,94

### 4.1.5 5-Kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol (Bileşik 5)



2,90 g (0,01 mol) 6-(Bromoasetil)-5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol ile 1,70 g (0,011 mol) 2-florotiyobenzamitten hareketle, 20 ml dietilenglikoldimetileter içerisinde genel sentez yöntemine göre elde edilip, metanolden kristallendirildi. Verim 0,68 g (%19,75)

Pembemsi renkte, küresel kristallerdir. E.d. 267-68°C'dir. Suda çözünmez, etanolde, 2-propanolde az, N,N-dimetilformamit ve asetonda çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde R<sub>f</sub> değerleri sırasıyla 0,37; 0,82; 0,78'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde yeşil renk verir.

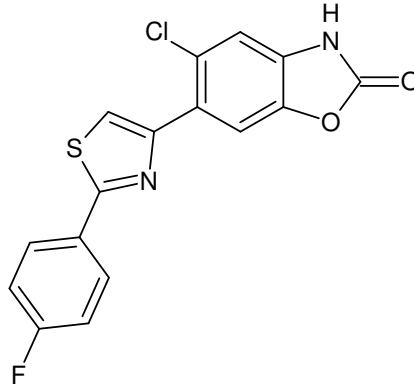
IR spektrumunda, 3476 (N-H gerilim, laktam), 3193 ve 3142 (C-H gerilim, aromatik), 1775 (C=O gerilim, laktam), 1474 (C=N gerilim, tiyazol), 753 (1,2-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12 (s, 1H, -NH-) 8,36-8,31 (t, 1H,  $\text{H}^4$ ), 8,23 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 7,87 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,61-7,54 (m, 1H,  $\text{H}^6$ ), 7,49-7,37 (m, 2H,  $\text{H}^3$ - $\text{H}^5$ ), 7,30 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$\text{C}_{16}\text{H}_8\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{S}$ için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	55,42	2,33	8,08	9,25
Bulunan	54,96	2,51	8,15	8,83

4.1.6 5-Kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol  
(Bileşik 6)



2,90 g (0,01 mol) 6-(Bromoasetil)-5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol ile 1,70 g (0,011 mol) 4-florotiyobenzamitten hareketle, 20 ml dietilenglikoldimetiler içerisinde genel sentez yöntemine göre elde edilip, etanol ile yıkanarak temizlendi. Verim 0,88 g (%25,37)

Pembemsi renkte, toz şeklinde kristallerdir. E.d. 261-64°C'dir. Suda çözünmez, etanolde az, asetonda çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde  $R_f$  değerleri sırasıyla 0,34; 0,83; 0,75'tir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde yeşil renk verir.

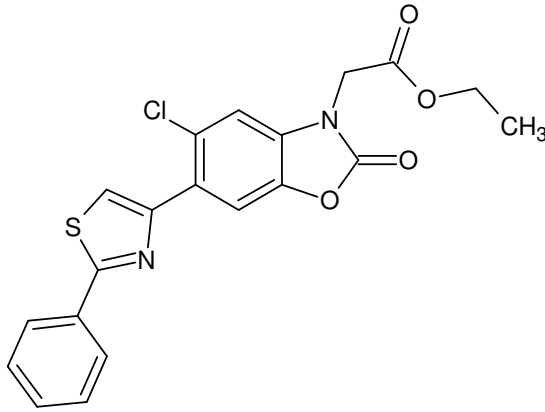
IR spektrumunda, 3133 (N-H gerilim, laktam), 3034 (C-H gerilim, aromatik), 1789-1741 (C=O gerilim, laktam), 1480 (C=N gerilim, tiyazol), 838 (1,4-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12 (s, 1H, -NH-) 8,10-8,04 (m, 3H,  $\text{H}^{2'}$ - $\text{H}^{6'}$ -tiyazol- $\text{H}^5$ ), 7,85 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,40-7,33 (m, 2H,  $\text{H}^{3'}$ - $\text{H}^{5'}$ ), 7,30 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$\text{C}_{16}\text{H}_8\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{S}$ için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	55,42	2,33	8,08	9,25
Bulunan	55,08	2,61	8,11	9,04

4.1.7 Etil [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol-3-il]asetat (Bileşik 7)





1 g ( $3,04 \times 10^{-3}$  mol) 5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol ve 1,116 g ( $6,68 \times 10^{-3}$  mol) etil bromoasetattan hareketle genel sentez yöntemine göre elde edilip, 2-propanol-etanol karışımından kristallendirildi. Verim 0,98 g (77,71)

Sarı renkte, iğne şeklinde kristallerdir. E.d.171-73°C'dir. Etanol ve 2-propanolde az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde  $R_f$  değerleri sırasıyla 0,54; 0,88; 0,75'tir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

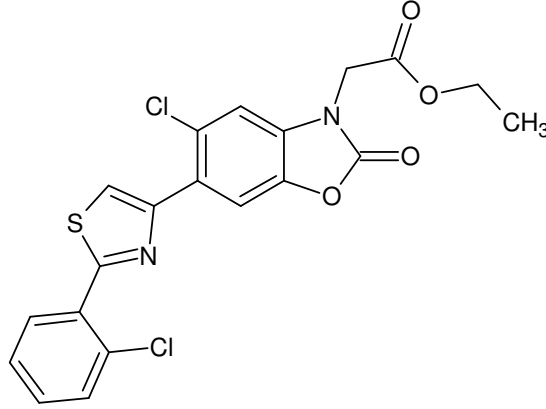
IR spektrumunda, 3074 (C-H gerilim, aromatik), 2983 (C-H gerilim, alifatik), 1772 (C=O gerilim, laktam), 1744 (C=O gerilim, ester), 1485 (C=N gerilim, tiyazol), 1204 (C-O gerilim, ester), 766 ve 684 (monosüstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,08 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 8,00-7,97 (m, 2H,  $\text{H}^2$ - $\text{H}^6$ ), 7,91 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,68 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), 7,53-7,47 (m, 3H,  $\text{H}^3$ - $\text{H}^4$ - $\text{H}^5$ ), 4,80 (s, 2H, N- $\text{CH}_2$ -CO), 4,197 (q, 2H, CO- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ), 1,21 (t, 3H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ) ppm'de pikler görülür.

#### Elementel analiz

$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	57,90	3,64	6,75	7,73
Bulunan	57,86	3,64	6,90	7,83

4.1.8 Etil {5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 8)



0,7 g ( $1,92 \times 10^{-3}$  mol) 5-Kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol ve 0,704 g ( $4,22 \times 10^{-3}$  mol) etil bromoasetattan hareketle genel sentez yöntemine göre elde edilip, 2-propanol-etanol karışımından kristallendirildi. Verim 0,66 g (%76,56).

Beyaz renkte, amorf şekilde kristallerdir. E.d. 179-81 °C'dir. Etanol ve 2-propanolde az, metanol ve asetonunda çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde  $R_f$  değerleri sırasıyla 0,52; 0,86; 0,74'tür. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

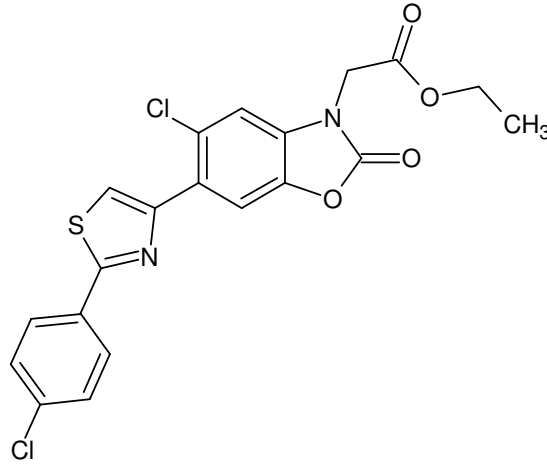
IR spektrumunda, 3147 (C-H gerilim, aromatik), 2982 (C-H gerilim, alifatik), 1779 (C=O gerilim, laktam), 1741 (C=O gerilim, ester), 1486 (C=N gerilim, tiyazol), 1230 (C-O gerilim, ester), 759 (1,2-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,32-8,26 (m, 2H, H<sup>4'</sup>-tiyazol-H<sup>5</sup>), 7,95 (s, 1H, H<sup>7</sup>), 7,71 (s, 1H, H<sup>4</sup>), 7,68-7,63 (m, 1H, H<sup>6'</sup>), 7,55-7,48 (m, 2H, H<sup>3'</sup>-H<sup>5'</sup>), 4,82 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 4,20 (q, 2H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,23 (t, 3H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm'de pikler görülür.

## Elementel analiz

C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	53,46	3,14	6,23	7,14
Bulunan	53,45	3,28	6,26	7,23

### 4.1.9 Etil {5-kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 9)



1 g ( $2,75 \times 10^{-3}$  mol) 5-Kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol ve 1,010 g ( $6,04 \times 10^{-3}$  mol) etil bromoasetattan hareketle genel sentez yöntemine göre elde edilip, etanol-2-propanol karışımından kristallendirildi. Verim 0,27 g (%21,86)

Sarı renkte, iğne şeklinde kristallerdir. E.d.178-79°C'dir. Suda çözünmez, etanol ve 2-propanolde az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde R<sub>f</sub> değerleri sırasıyla 0,52; 0,85; 0,78'tir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

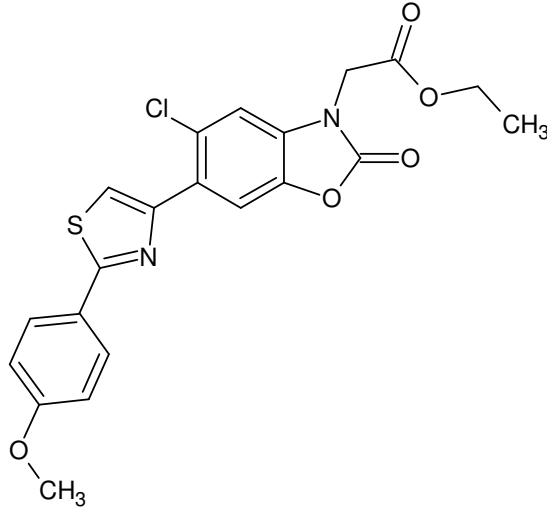
IR spektrumunda, 3068 (C-H gerilim, aromatik), 2985 (C-H gerilim, alifatik), 1776 (C=O gerilim, laktam), 1742 (C=O gerilim, ester), 1484 (C=N gerilim, tiyazol), 1212 (C-O gerilim, ester), 838 (1,4-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  8,13 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 8,02-8,00 (d, 2H,  $J=8,4$ ,  $\text{H}^2$ - $\text{H}^6$ ), 7,93 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,69 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), 7,58-7,55 (d, 2H,  $J=8,8$ ,  $\text{H}^3$ - $\text{H}^5$ ), 4,80 (s, 2H, N- $\text{CH}_2$ -CO), 4,19 (q, 2H, CO- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ), 1,21 (t, 3H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	53,46	3,14	6,23	7,14
Bulunan	53,14	3,09	6,42	7,26

4.1.10 Etil {5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 10)



2 g ( $5,57 \times 10^{-3}$  mol) 5-Kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol ve 2,048 g ( $12,26 \times 10^{-3}$  mol) etil bromoasetattan hareketle genel sentez yöntemine göre elde edilip, etanolden kristallendirildi. Verim 1,626 g (%65,62).

Beyaz renkte, iğne şeklinde kristallerdir. E.d. 165-67°C'dir. Etanol ve 2-propanolde az, asetonda çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde  $R_f$  değerleri sırasıyla 0,44; 0,84; 0,73'tür. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

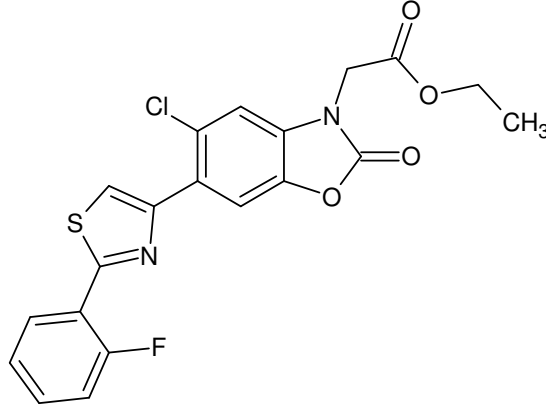
IR spektrumunda, 2963 (C-H gerilim, alifatik), 1791 (C=O gerilim, laktam), 1749 (C=O gerilim, ester), 1489 (C=N gerilim, tiyazol), 1261-1231 (C-O gerilim, -OCH<sub>3</sub> ve ester), 828 (1,4-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8,01 (s, 1H, tiyazol-H<sup>5</sup>), 7,94-7,92 (d, 3H, J=8,4, H<sup>2'</sup>-H<sup>6'</sup>-H<sup>7</sup>), 7,69 (s, 1H, H<sup>4</sup>), 7,06-7,04 (d, 2H, J=8,8, H<sup>3'</sup>-H<sup>5</sup>), 4,80 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CO), 4,19 (q, 2H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,81 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 1,21 (t, 3H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm'de pikler görülür.

#### Elementel analiz

C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	56,69	3,85	6,30	7,21
Bulunan	56,16	3,75	6,46	7,30

4.1.11 Etil {5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 11)



1 g ( $2,88 \times 10^{-3}$  mol) 5-Kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol ve 1,05 g ( $6,34 \times 10^{-3}$  mol) etil bromoasetattan hareketle genel sentez yöntemine göre elde edilip, 2-propanolden kristallendirildi. Verim 0,24 g (%19,26)

Beyaz renkte, iğne şeklinde kristallerdir. E.d.173-74°C'dir. Suda çözünmez, etanol ve 2-propanolde az, aseton ve toluende çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde  $R_f$  değerleri sırasıyla 0,50; 0,84; 0,77'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

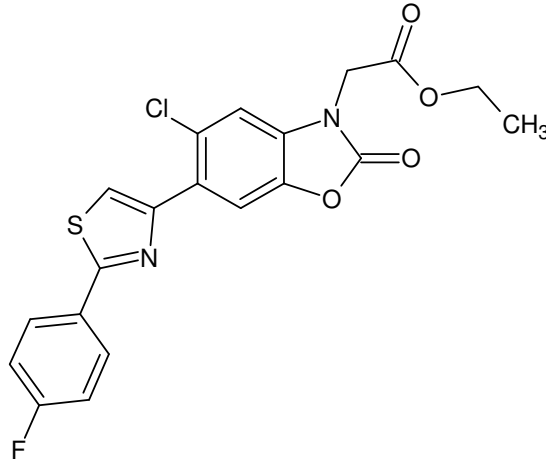
IR spektrumunda, 3152 (C-H gerilim, aromatik), 2972 (C-H gerilim, alifatik), 1780 (C=O gerilim, laktam), 1742 (C=O gerilim, ester), 1483 (C=N gerilim, tiyazol), 1228 (C-O gerilim, ester), 759 (1,2-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,32 (t, 1H,  $\text{H}^4$ ), 8,24 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 7,96 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,71 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), 7,59-7,52 (m, 1H,  $\text{H}^6$ ), 7,47-7,35 (m, 2H,  $\text{H}^3$ - $\text{H}^5$ ), 4,81 (s, 2H, N- $\text{CH}_2$ -CO), 4,19 (q, 2H, CO- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ), 1,21 (t, 3H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ) ppm'de pikler görülür.

## Elementel analiz

C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> ClFN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	55,50	3,26	6,47	7,41
Bulunan	55,24	3,23	6,59	7,43

### 4.1.12 Etil {5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetat (Bileşik 12)



2 g ( $5,76 \times 10^{-3}$  mol) 5-Kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol ve 2,11 g ( $12,68 \times 10^{-3}$  mol) etil bromoasetattan hareketle genel sentez yöntemine göre elde edilip, 2-propanol-etanol karışımından kristallendirildi. Verim 0,38 g (%15,24)

Turuncu renkte kristallerdir. E.d. 97-99°C'dir. 2-propanolde az, aseton ve etanolde çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-1, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde R<sub>f</sub> değerleri sırasıyla 0,51; 0,85; 0,80'dir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan, 366 nm'de floresan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile renk vermez.

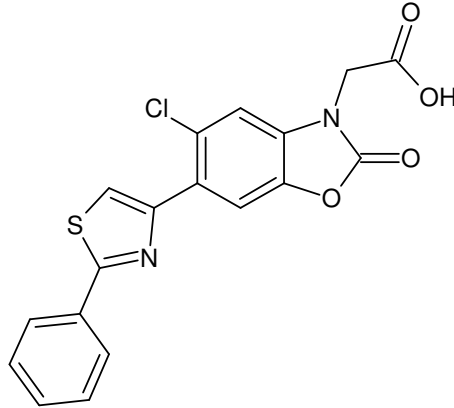
IR spektrumunda, 3083 (C-H gerilim, aromatik), 2985 (C-H gerilim, alifatik), 1773 (C=O gerilim, laktam), 1744 (C=O gerilim, ester), 1488 (C=N gerilim, tiyazol), 1207 (C-O gerilim, ester), 842 (1,4-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  8,10 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 8,08-8,02 (m, 2H,  $\text{H}^{2'}$ - $\text{H}^{6'}$ ), 7,93 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,70 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), 7,35 (t, 2H,  $\text{H}^{3'}$ - $\text{H}^{5'}$ ), 4,81 (s, 2H, N- $\text{CH}_2$ -CO), 4,20 (q, 2H, CO- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ), 1,22 (t, 3H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{ClFN}_2\text{O}_4\text{S}$ için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	55,50	3,26	6,47	7,41
Bulunan	55,43	3,41	6,51	7,50

4.1.13 [5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol-3-il]asetik asit (Bileşik 13)



3,18 g (0,009 mol) 5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol ve 1,52 g (0,022 mol) bromoasetik asitten hareketle genel sentez yöntemindeki yöntem 1'e göre elde edilip (300 Watt, 80-95°C'de, 60 dakika), asetik asitten kristallendirildi. Verim 0,84 g (%26,41)



Beyaz renkte, toz şeklinde kristallerdir. E.d. 257-258°C'dir. Suda çözünmez, etanolde az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde R<sub>f</sub> değerleri sırasıyla 0,25; 0,74'tür. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde mavi renk verir.

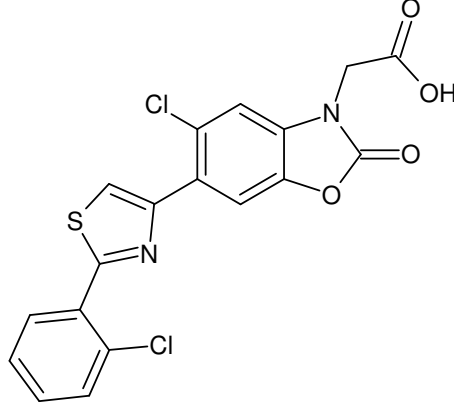
IR spektrumunda, 3236-2825 (O-H gerilim), 1757 (C=O gerilim, laktam), 1740 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1482 (C=N gerilim, tiyazol), 762 ve 688 (monosüstitüe benzen) cm<sup>-1</sup>'de bandlar görülür.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,11 (s, 1H, tiyazol-H<sup>5</sup>), 8,03-7,98 (m, 2H, H<sup>2</sup>-H<sup>6</sup>), 7,93 (s, 1H, H<sup>7</sup>), 7,70 (s, 1H, H<sup>4</sup>), 7,55-7,49 (m, 3H, H<sup>3</sup>-H<sup>4</sup>-H<sup>5</sup>), 4,69 (s, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), ppm'de pikler görülür.

#### Elementel analiz

C <sub>18</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	55,89	2,87	7,24	8,29
Bulunan	55,70	3,02	7,32	8,36

4.1.14 5-Kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetik asit (Bileşik 14)



1,07 g (0,0029 mol) 5-Kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol ve 0,80 g (0,0058 mol) bromoasetik asitten hareketle genel sentez yöntemindeki yöntem 1'e göre elde edilip (300 Watt, 130°C'de, 20 dakika), asetik asitten kristallendirildi. Verim 0,36 g (%29,50)

Beyaz renkte, toz şeklinde kristallerdir. E.d. 248-249°C'dir. Suda çözünmez, asetik asitte az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde R<sub>f</sub> değerleri sırasıyla 0,25; 0,74'tür. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde mavi renk verir.

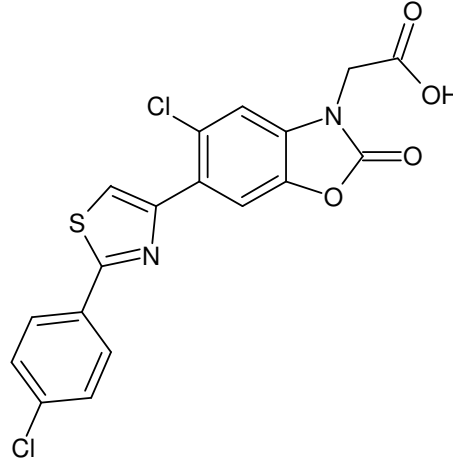
IR spektrumunda, 3194-2861 (O-H gerilim), 1756 (C=O gerilim, laktam), 1729 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1483 (C=N gerilim, tiyazol), 762 (1,2-disüstitüe benzen) cm<sup>-1</sup>'de bandlar görülür.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,34-8,29 (m, 2H, H<sup>4'</sup>-tiyazol-H<sup>5</sup>), 7,96 (s, 1H, H<sup>7</sup>), 7,73 (s, 1H, H<sup>4</sup>), 7,71-7,66 (m, 1H, H<sup>6'</sup>), 7,56-7,50 (m, 2H, H<sup>3'</sup>-H<sup>5</sup>), 4,72 (s, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), ppm'de pikler görülür.

## Elementel analiz

C <sub>18</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	51,32	2,39	6,65	7,61
Bulunan	51,21	2,60	6,69	7,62

### 4.1.15 {5-Kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetik asit (Bileşik 15)



1 g (0,0027 mol) 5-Kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol ve 0,76 g (0,0055 mol) bromoasetik asitten hareketle genel sentez yöntemindeki yöntem 1'e göre elde edilip (300 Watt, 130°C'de, 20 dakika), asetik asitten kristallendirildi. Verim 0,14 g (%12,31)

Beyaz renkte, toz şeklinde kristallerdir. E.d. 305-307°C'dir. Suda çözünmez, asetik asitte az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-3 çözücü sisteminde R<sub>f</sub> değeri ;0,66'dır. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde mavi renk verir.

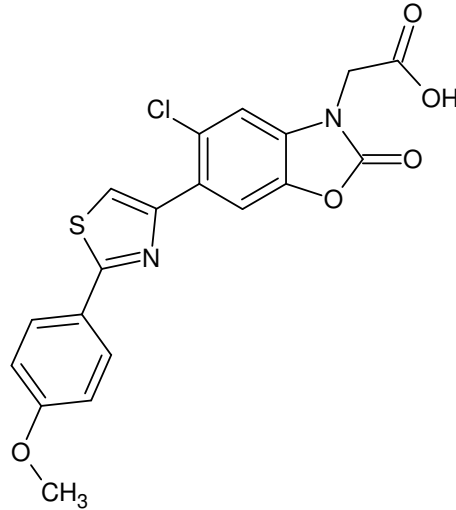
IR spektrumunda, 3505 (O-H gerilim), 1757 (C=O gerilim, laktam), 1729 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1483 (C=N gerilim, tiyazol), 836 (1,4-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  8,17 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 8,06-8,04 (d, 2H,  $J=8,4$ ,  $\text{H}^2$ - $\text{H}^6$ ), 7,95 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,72 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), 7,61-7,59 (d, 2H,  $J=8,4$ ,  $\text{H}^3$ - $\text{H}^5$ ), 4,71 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), ppm'de pikler görülür.

#### Elementel analiz

$\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	51,32	2,39	6,65	7,61
Bulunan	51,22	2,56	6,71	7,66

#### 4.1.16 {5-Kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol- 3-il}asetik asit . 1,5 $\text{H}_2\text{O}$ (Bileşik 16)



1,13 g (0,0025 mol) 5-Kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazoldan hareketle genel sentez yöntemindeki yöntem 2'ye göre elde edilip, asetik asit:su (3:1) karışımından kristallendirildi. Verim 0,39 g (%35,15)

Beyaz renkte kristallerdir. E.d. 229-231 °C'dir. Suda çözünmez, asetik asitte az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde R<sub>f</sub> değerleri sırasıyla 0,24; 0,73'tür. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde mavi renk verir.

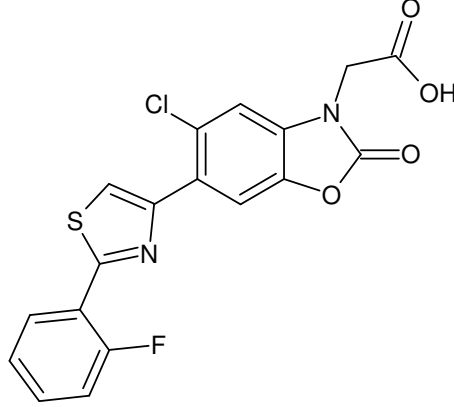
IR spektrumunda, 3505 (O-H gerilim), 3162 ve 3072 (C-H gerilim, aromatik), 2935 ve 2833 (C-H gerilim, alifatik), 1764 (C=O gerilim, laktam), 1726 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1486 (C=N gerilim, tiyazol), 1243 (C-O gerilim, -O-CH<sub>3</sub>), 834 (1,4-disübstitüe benzen) cm<sup>-1</sup>'de bandlar görülür.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,01 (s, 1H, tiyazol-H<sup>5</sup>), 7,95-7,93 (d, 2H, J=8,8, H<sup>2</sup>-H<sup>6</sup>), 7,92 (s, 1H, H<sup>7</sup>), 7,70 (s, 1H, H<sup>4</sup>), 7,07-7,05 (d, 2H, J=8,4, H<sup>3</sup>-H<sup>5</sup>), 4,70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 3,82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm'de pikler görülür.

#### Elementel analiz

C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S.1,5 H <sub>2</sub> O için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	51,41	3,63	6,31	7,22
Bulunan	51,66	3,82	6,49	7,27

4.1.17 5-Kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetik asit (Bileşik 17)



0,61 g (0,0014 mol) 5-Kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazoldan hareketle genel sentez yöntemindeki yöntem 2'ye göre elde edilip, asetik asit:su (3:2) karışımından kristallendirildi. Verim 0,24 g (%42,35)

Beyaz renkte, toz şeklinde kristallerdir. E.d. 246-248°C'dir. Suda çözünmez, asetik asit, etanol, 2-propanolde az çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-2, S-3 çözücü sistemlerinde R<sub>f</sub> değerleri sırasıyla 0,23; 0,75'tir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde mavi renk verir.

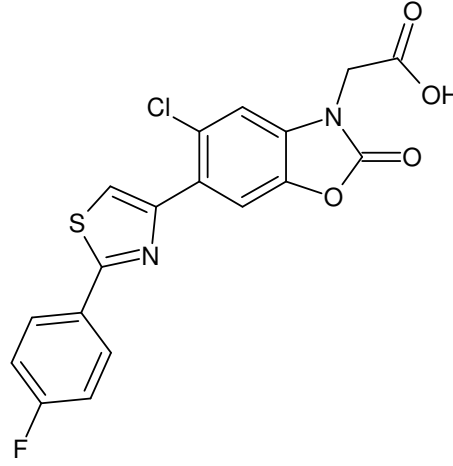
IR spektrumunda, 3194-2833 (O-H gerilim), 1756 (C=O gerilim, laktam), 1728 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1482 (C=N gerilim, tiyazol), 759 (1,2-disüstitüe benzen) cm<sup>-1</sup>'de bandlar görülür.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,36-8,30 (t, 1H, H<sup>4</sup>), 8,25 (s, 1H, tiyazol-H<sup>5</sup>), 7,96 (s, 1H, H<sup>7</sup>), 7,72 (s, 1H, H<sup>4</sup>), 7,60-7,53 (m, 1H, H<sup>6</sup>), 7,48-7,36 (m, 2H, H<sup>3</sup>-H<sup>5</sup>), 4,71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>COOH) ppm'de pikler görülür.

#### Elementel analiz

C <sub>18</sub> H <sub>10</sub> ClFN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S :	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	53,41	2,49	6,92	7,92
Bulunan	53,13	2,44	7,05	8,00

#### 4.1.18 {5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetik asit (Bileşik 18)



0,85 g (0,0019 mol) 5-Kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazoldan hareketle genel sentez yöntemindeki yöntem 2'ye göre elde edilip, asetik asit:su karışımından kristallendirildi. Verim 0,39 g (%49,18)

Beyaz renkte, toz şeklinde kristallerdir. E.d. 284-286°C'dir. Suda çözünmez, asetik asit, etanolde az, asetonda çok çözünür.

İnce tabaka kromatografisinde, S-3 çözücü sisteminde R<sub>f</sub> değeri 0,65'tir. UV ışığında 254 nm'de floresan olmayan leke şeklinde gözlenir. Dragendorff belirteci ile sarı zeminde mavi renk verir.

IR spektrumunda, 3194-2861 (O-H gerilim), 1757 (C=O gerilim, laktam), 1729 (C=O gerilim, karboksilli asit), 1484 (C=N gerilim, tiyazol), 841 (1,4-disübstitüe benzen)  $\text{cm}^{-1}$ 'de bandlar görülür.

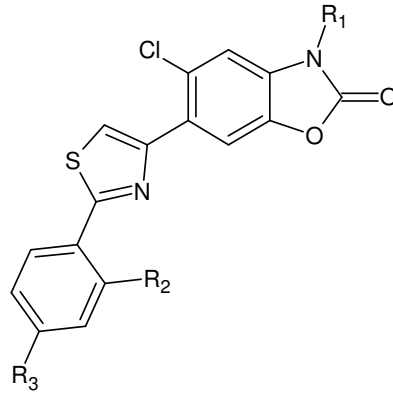
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda (DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$ , 8,10 (s, 1H, tiyazol- $\text{H}^5$ ), 8,8-8,3 (t, 2H,  $\text{H}^2$ - $\text{H}^6$ ), 7,93 (s, 1H,  $\text{H}^7$ ), 7,70 (s, 1H,  $\text{H}^4$ ), 7,38-7,32 (t, 2H,  $\text{H}^3$ - $\text{H}^5$ ), 4,70 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ) ppm'de pikler görülür.

Elementel analiz

$\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{ClFN}_2\text{O}_4\text{S}$ için:	%C	%H	%N	%S
Hesaplanan	53,41	2,49	6,92	7,92
Bulunan	53,24	2,54	6,92	7,97

#### 4.2 Biyolojik Etki Çalışması

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





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

Bileşikler	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	% B/Bo	TXB <sub>2</sub> pg/mL	% COX-1 inhibisyonu
1	-H	-H	-H	12,513	2710	40,479
2	-H	-Cl	-H	11,967	2928	35,690
3	-H	-H	-Cl	10,822	3489	23,369
4	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	11,29	3239	28,86
5	-H	-F	-H	10,38	3752	17,581
6	-H	-H	-F	9,1575	4817	6,3035
7	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	11,7065	3100	31,902
8	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-Cl	-H	9,7815	4427	14,144
9	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-Cl	9,6515	4274	6,1168
10	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	9,5755	4366	6,732
11	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-F	-H	9,443	4442	0,4942
12	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-F	9,339	4546	3,327
13	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-H	12,175	3054	32,912
14	-CH <sub>2</sub> COOH	-Cl	-H	10,796	3582	21,326
15	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-Cl	12,227	2820	38,063
16	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-OCH <sub>3</sub>	11,602	3088	32,177
17	-CH <sub>2</sub> COOH	-F	-H	8,325	5589	0
18	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-F	11,186	3446	24,302
SC-558				90,583	7	99,846
KAN				9,313	4553	0

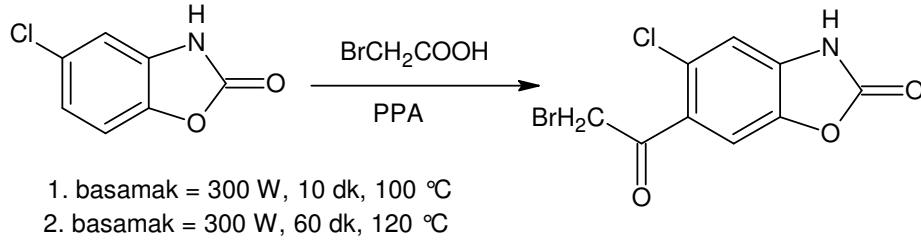
**Tablo 11: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-2 inhibitör aktivite sonuçları**

Bileşikler	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	% B/Bo	PGE <sub>2</sub> pg/mL	% COX-2 inhibisyonu
1	-H	-H	-H	14,357	1788	0
2	-H	-Cl	-H	19,616	1226	8,507
3	-H	-H	-Cl	18,530	1323	6,156
4	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	18,28	1342	4,738
5	-H	-F	-H	14,941	1709	0
6	-H	-H	-F	16,360	1570	2,201
7	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	15,025	1732	0
8	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-Cl	-H	13,189	2106	0
9	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-Cl	24,207	1032	25,97
10	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	23,789	1172	28.209
11	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-F	-H	26,294	829	38,134
12	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-F	22,704	1113	23,171
13	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-H	14,858	1798	0
14	-CH <sub>2</sub> COOH	-Cl	-H	18,196	1351	4,738
15	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-Cl	20,033	1187	11,380
16	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-OCH <sub>3</sub>	22,370	1045	21,977
17	-CH <sub>2</sub> COOH	-F	-H	21,035	1115	16,753
18	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-F	14,19	1875	0
<b>Dup-697</b>				91,486	0	100
<b>KAN</b>				18,197	1340	0

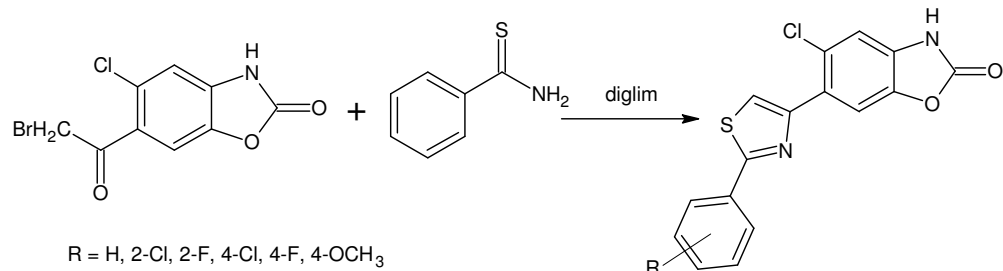
## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol hareket maddesinden başlayarak 5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol ve [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]alkanoik asit ve bu asitlerin esteri olan 18 yeni bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiş, yapıları kanıtlanmış COX-1 ve COX-2 inhibitör etkinlikleri açısından değerlendirmeleri yapılmıştır.

Bileşiklerin sentezi 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazolden hareketle gerçekleştirilmiştir. 5-Kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol ve bromoasetik asitin mikrodalga ışınımı ile tepkimesi sonucu 6-bromoasetil-5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol sentez edilmiştir. 6-Bromoasetil-5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazolun konvansiyonel ısıtma ile eldesinin güç olması mikrodalga ışınımı ile reaksiyonun tercih edilmesine neden olmuştur.



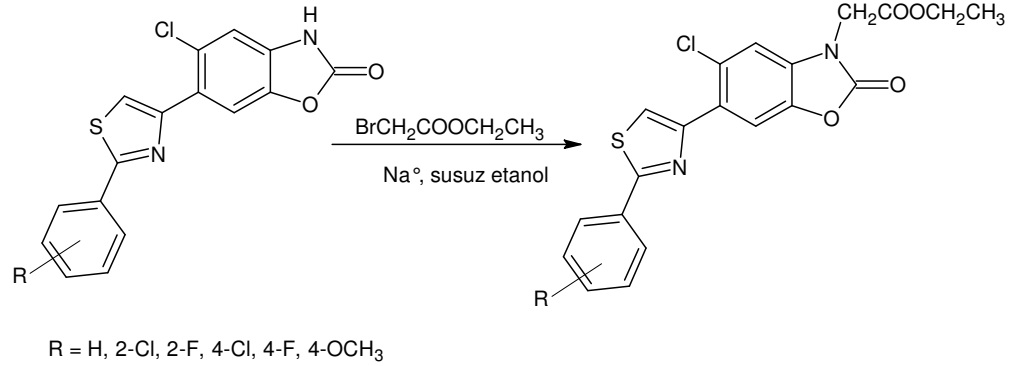
6-Bromoasetil-5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol uygun tiyobenzamit türevleri ile dietilenglikoldimetiler (diglim) içerisinde oda ısısında reaksiyona sokulmuş ve 5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevleri elde edilmiştir.



Elde edilen 5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin IR spektrumlarında amit grubuna ait NH gerilim bantları 3133-3444, aromatik CH gerilim bantları 3034- 3193, C=O bantları 1741-1789, tiyazole ait C=N gerilim bantları 1473-1480  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir.

Bileşiklerin DMSO- $\text{d}_6$  içinde alınan  $^1\text{H}$ -NMR spektrumlarında 12 ppm'de NH, 7,98-8,23 ppm arası tiyazol  $\text{H}^5$ , 7,82-7,87 ppm arası 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol  $\text{H}^7$  ve 7,27-7,31 ppm arası 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol  $\text{H}^4$  protonlarına ait sinyaller görülmüştür.

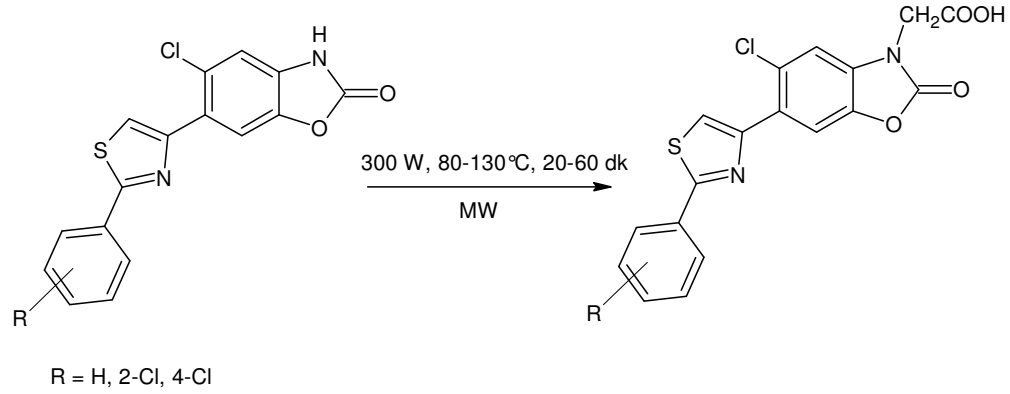
Sentezlenen 5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin susuz etanol içerisinde metalik sodyum ile tuzları hazırlanmıştır. Hazırlanan sodyum tuzlarının etilbromoasetat ile susuz alkol içinde tepkimesinden etil [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat türevleri elde edilmiştir.



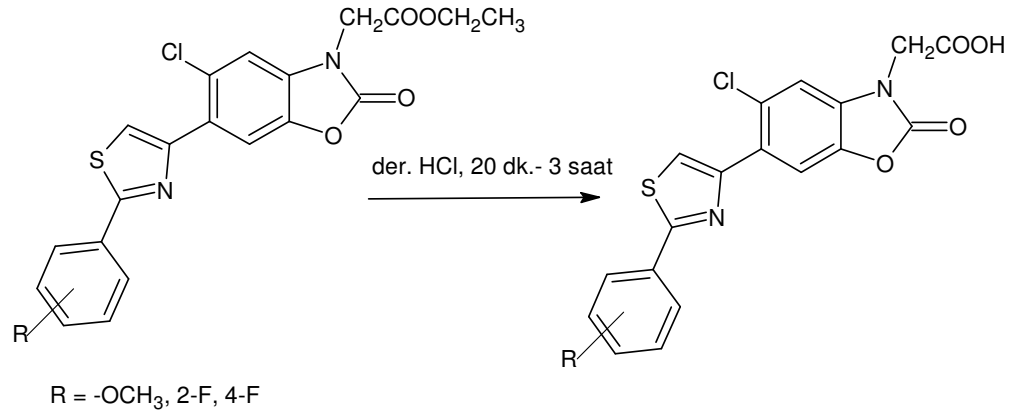
Etil [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat türevlerinin IR spektrumlarında, aromatik CH gerilim bantları 3152-3068, alifatik CH gerilim bantları 2985-2963, laktam halkasına ait C=O gerilim bantları 1791-1772, ester C=O gerilim bantları 1741-1749, tiyazole ait C=N gerilim bantları 1489-1483, ester C-O gerilim bantları 1204-1231  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir.

Bileşiklerin DMSO- $\text{d}_6$  içinde alınan  $^1\text{H}$ -NMR spektrumlarında 8,28-8,08 ppm arası tiyazol  $\text{H}^5$ , 7,96-7,91 ppm arası 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol  $\text{H}^7$  ve 7,71-7,68 ppm arası 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol  $\text{H}^4$ , 4,82-4,80 ppm arası NH- $\text{CH}_2$ -CO, 4,20-4,19 ppm arası CO- $\text{CH}_2$ -CH<sub>3</sub>, 1,23-1,21 ppm arası  $\text{CH}_2$ -CH<sub>3</sub> protonlarına ait sinyaller görülmüştür.

[5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit türevlerinin hazırlanmasında iki farklı yöntem uygulanmıştır. İlk yöntemde 5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinin sodyum tuzları hazırlanmış ve oluşan sodyum tuzlarının bromoasetik asit ile dimetilformamit (DMF) içerisinde mikrodalga ışınımı ile tepkimesi sonucu [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit türevleri elde edilmiştir.



Bu yöntemde verimin düşük olması [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit türevlerinin hazırlanmasında ikinci yöntemin tercih edilmesine neden olmuştur. İkinci yöntemde, etil [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat türevlerinin ester bağı asidik ortamda hidroliz edilerek [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit türevleri elde edilmiştir. Bu yöntemde nükleofilin gücü değişmediği için reaktifin gücünün artırılması yöntemine gidilmiş ve bromoasetik asit yerine etilbromoasetat kullanılmıştır. Böylece daha verimli sonuçlar elde edilmiştir.

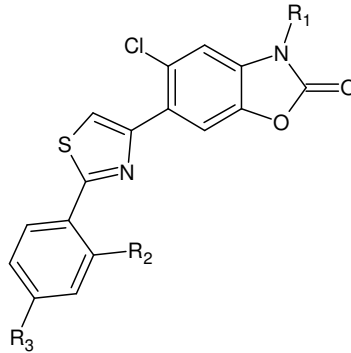


Elde edilen [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol-3-il]asetik asit türevlerinin IR spektrumlarında, OH gerilim bandı 3505-2825, laktam halkasına ait C=O gerilim bantları 1764-1756, karboksilli asit C=O gerilim bantları 1740-1728, tiyazole ait C=N gerilim bantları 1484-1482  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir.

Bileşiklerin DMSO- $\text{d}_6$  içinde alınan  $^1\text{H-NMR}$  spektrumlarında 8,30-8,01 ppm arası tiyazol  $\text{H}^5$ , 7,96-7,92 ppm arası 5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol  $\text{H}^7$  ve 7,73-7,70 ppm arası 5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol  $\text{H}^4$ , 4,72-4,69 ppm arası  $\text{CH}_2\text{COOH}$  protonlarına ait sinyaller görülmüştür.

Kimyasal sentez çalışmalarında, daha önce sentezi yapılmamış olan ve tarafımızdan sentez edilen tüm bileşiklerin enstrümental analiz verileri değerlendirilmiş, elementel analiz sonuçlarının da kimyasal yapılarıyla uyum içerisinde olmalarıyla yapıları kanıtlanmıştır.

Hazırlanan bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör etkinlik tayinlerinde *in vivo* test yöntemlerini en iyi taklit eden insan tam kanı kullanılmıştır. Bileşiklerin COX-1 inhibitör etkinlik tayininde pıhtılaşmış insan tam kanı, COX-2 inhibitör etkinlik tayininde ise lipopolisakkarit ile indüklenmiş insan tam kanı kullanılmıştır. COX-1 inhibitör aktivite çalışmasında SC-558 referans alınarak bileşiklerin 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda COX-1 inhibisyonu yapma oranları belirlenmiştir. COX-2 inhibitör aktivite çalışmasında ise DuP-697 referans alınarak bileşiklerin 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda COX-2 inhibisyonu yapma oranları belirlenmiştir. Bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite sonuçları Tablo 12'de gösterilmiştir.



Şekil 16: Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapısı

**Tablo 12: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite sonuçları**

Bileşikler	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	% COX-1 İnhibisyonu	% COX-2 İnhibisyonu
1	-H	-H	-H	40,479	0
2	-H	-Cl	-H	35,690	8,507
3	-H	-H	-Cl	23,369	6,156
4	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	28,86	4,738
5	-H	-F	-H	17,581	0
6	-H	-H	-F	6,3035	2,201
7	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	31,902	0
8	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-Cl	-H	14,144	0
9	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-Cl	6,1168	25,97
10	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	6,732	28.209
11	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-F	-H	0,4942	38,134
12	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-F	3,327	23,171
13	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-H	32,912	0
14	-CH <sub>2</sub> COOH	-Cl	-H	21,326	4,738
15	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-Cl	38,063	11,380
16	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-OCH <sub>3</sub>	32,177	21,977
17	-CH <sub>2</sub> COOH	-F	-H	0	16,753
18	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-F	24,302	0
SC-558				99,846	100
KAN				0	0

1 Numaralı bileşik olan 5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol (Bileşik1), COX-1 enzimini % 40,479 oranında inhibe ederken COX-2 enzimi üzerinde inhibitör etkinlik göstermemiştir. Bileşik 1'in asetik asit türevi olan [5-kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)- 2-okso-3*H*-benzoksazol-3- il]asetik asit (Bileşik 13), COX-1 enzimini % 32,912 oranında inhibe ederken, COX-2 enzimi üzerinde inhibisyon yapmamıştır.

Bileşik 13'ün ester formu olan bileşik 7 ise % 31,902 oranında COX-1 enzimini inhibe ederken COX-2 enzimi üzerinde inhibisyon yapmamıştır. Elde edilen veriler karşılaştırılacak olursa sübstitüe olmayan fenil halkası taşıyan tiyazol-4-il türevlerinde selektif COX-1 enzim inhibisyonu gözlenmiştir. 5-Kloro-6-(2-fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol türevlerinde 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol halkasının 3 numaralı konumunda serbest azot bulunması durumunda en iyi aktivite gözlenirken, azot atomunda asetik asit kalıntısı taşıyan bileşik 13'te aktivite azalması gözlenmiştir. Asetik asitin ester türevi olan bileşik 7'de ise asetik asit türevi bileşiğe kıyasla aktivite azalmış ancak anlamlı bir azalma meydana gelmemiştir.

2 Numaralı bileşik olan 5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol türevi ise % 35,690 oranında COX-1 enzimini inhibe ederken % 8,507 oranında COX-2 enzimini inhibe etmiştir. Bu bileşiğin asetik asit türevi olan bileşik 14 ise % 21,326 oranında COX-1 enzimini, % 4,738 oranında COX-2 enzimini inhibe etmiştir. Bileşik 14'ün etil esteri formu olan etil {5-kloro-6-[2-(2-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il}asetat türevi olan bileşik 8 ise COX-1 enzimini % 14,144 oranında inhibe ederken COX-2 enzimi üzerinde inhibitör etkinlik göstermemiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak 2. konumunda klor sübstitüsyonu taşıyan bileşiklerin selektif COX-1 inhibitör özellik gösterdiği söylenebilmektedir. 5-Kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol halkasının azot atomunun sübstitüsyon durumu değerlendirildiğinde ise sübstitüentsiz azot atomu taşıyan bileşik 2'de en yüksek inhibisyon görülmektedir. Azot Atomu üzerinde asetik asit kalıntısı taşıyan bileşik 14'te ise COX-1 enzim inhibisyonu oranı azalmakta ester kalıntısı taşıyan türev olan bileşik 8'de ise iyice düşmektedir.

3 Numaralı bileşik olan 5-kloro-6-[2-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol, COX-1 enzimi üzerinde % 23,369, COX-2 enzimi üzerinde ise % 6,156 oranında inhibisyon göstermektedir. Bileşik 3'ün asetik asit türevi olan bileşik 15 ise % 38,063 oranında COX-1 enzim inhibisyonu, % 11,380 oranında COX-2 enzim inhibisyonu göstermektedir. Bileşik 3'ün ester formu olan bileşik 9 ise % 6,1168 oranında COX-1, % 25,97 oranında COX-2 enzim inhibisyonu göstermektedir. 2-(4-Klorofenil)-tiyazol-4-il taşıyan 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol türevi bileşiklerde 3. konumda etiloksikarbonilmetil taşıyan türevde sübstitüsyon içermeyen türeve göre COX-2 selektivite artmaktadır. Azot Atomu üzerinde asetik asit kalıntısı taşıyan türevde ise sübstitüsyon içermeyen bileşiğe göre hem COX-1 hem COX-2 inhibitör aktivite artmaktadır. Ancak 2-(4-klorofenil)-tiyazol-4-il taşıyan 5-kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol türevi bileşiklerde en iyi COX-2 inhibitör etkinlik 3. konumda etiloksikarbonilmetil taşıyan türevde gözlenmektedir.



4 Numaralı bileşik olan 5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol, COX-1 enzimini % 28,86 oranında inhibe ederken COX-2 enzimini % 4,738 oranında inhibe etmektedir. 5-Kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazolun asetik asit türevi olan bileşik 16, COX-1 enzimini % 32,177 oranında inhibe ederken, COX-2 enzimini % 21,977 oranında inhibe etmektedir. 5-Kloro-2-okso-3*H*-benzoksazol halkasında ester artığı taşıyan bileşik 10 ise, % 6,732 oranında COX-1 enzim inhibisyonu gösterirken % 28.209 oranında COX-2 enzim inhibisyonu göstermektedir. Bileşik 4 COX-1 enzime seçicilik gösterirken, azot atomunda ester kalıntısı taşıyan bileşik 10 COX-2 enzime seçicilik göstermektedir. Asetik asit türevi olan bileşik 16 ise COX-1 ve COX-2 enzim inhibitör aktivite göstermektedir.

5 Numaralı bileşik olan 5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol bileşiği ise, COX-1 enzimini % 17,581 oranında inhibe ederken, COX-2 enzimi üzerinde inhibitör etkinlik göstermemektedir. Asetik asit kalıntısı taşıyan bileşik 17 ise COX-1 enzimi üzerinde inhibitör aktivite göstermezken COX-2 enzimini % 16,753 oranında inhibe etmektedir. Azot atomu üzerinde ester kalıntısı taşıyan bileşik 11 ise COX-1 enzimini % 0,4942 oranında inhibe ederken COX-2 enzimini % 38,134 oranında inhibe etmektedir. Azot atomu üzerinde süstitüsyon taşımayan bileşik 5 düşük derecede selektif COX-1 inhibitör özellik göstermektedir. Azot atomu üzerinde asetik asit kalıntısı taşıyan 17 numaralı bileşik anlamlı olmayan selektif COX-2 inhibitör özellik göstermektedir. Ester türevi olan bileşik 11 ise anlamlı selektif COX-2 inhibisyon özellik göstermektedir.

6 Numaralı bileşik olan 5-kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol türevi % 6,3035 oranında COX-1 enzim inhibitör özellik gösterirken, % 2,201 oranında COX-2 enzim inhibisyonu göstermektedir. Asetik asit türevi olan bileşik 18 COX-1 enzimini % 24,302 oranında inhibe ederken, COX-2 enzimini inhibe etmemektedir. Ester türevi olan bileşik 12 ise % 3,327 oranında COX-1 enzimini inhibe ederken, % 23,171 oranında COX-2 enzimini inhibe etmektedir. N atomunda süstitüsyon içermeyen bileşik 6 anlamlı olmayan COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite göstermektedir. 5-Kloro-6-[2-(4-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazolun asetik asit türevi olan bileşik 18 selektif COX-1 inhibitör özellik gösterirken, ester türevi olan bileşik 12 COX-2 enzime seçicilik göstermektedir.

Genel olarak bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktiviteleri kıyaslanacak olursa bileşiklerin COX-1 enzim inhibisyon özelliklerinin fazla olduğu söylenebilir. Fenil halkasında süstitüsyon taşımayan 1, 7 ve 13 numaralı bileşiklerde COX-2 inhibitör aktivite

gözlenmezken, Bileşik 1'de % 40,47, Bileşik 7'de % 31,90, Bileşik 13'de % 32,90 oranında COX-1 enzim inhibisyonu gözlenmiştir. Bileşik 1, 7, 13, ve 18 selektif COX-1 enzim inhibitörü özellik göstermektedir.

Ester türevi bileşiklerde (Bileşik 9, 10, 11, 12) COX-2 inhibitör aktivitede belirgin bir artış gözlenmiştir. Özellikle 2-F türevi olan **Bileşik 11** çok düşük oranda COX-1 inhibitör aktivite gösterirken, % 38,134 oranında COX-2 inhibitör aktivite göstermiştir. Azot atomuna asetik asit süstitüsüyonu sadece 4-OCH<sub>3</sub> türevi bileşik 16 COX-2 inhibitör aktivitede artışa neden olmuştur. Ancak bu artış COX-2 selektifliğinin değerlendirilmesi açısından belirgin bir fark oluşturmamıştır.

Yapılan çalışmada bileşiklerde yüksek oranda COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite gözlenmemiştir. Ancak Bileşik 11 diğer bileşiklere göre yüksek sayılabilecek selektif COX-2 inhibisyon özellik göstermesi bakımından önem kazanmaktadır.

TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitör aktivite, TXB<sub>2</sub> miktarı üzerinden yapılmaktadır. Hem COX-1 hem TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitör aktivite, TXB<sub>2</sub> miktarı üzerinden yapılmaktadır. Sentezlenen asetik asit türevlerinin COX-1 enzimi anlamlı derecede inhibe etmiş olması, ortaya çıkan bu durumun COX-1 enzimi üzerindeki inhibitör etkilerinden mi, yoksa TXA<sub>2</sub> sentaz enzimi üzerindeki inhibitör etkilerinden mi kaynaklandığını anlayabilmek için plateletçe zengin kanda *in vitro* TXA<sub>2</sub> sentaz inhibisyon testi yapılmasını gerektirmektedir. Sentezlenen asetik asit türevleri anlamlı COX-1 inhibitör aktivite göstermedikleri için TXA<sub>2</sub> sentaz enzimi üzerindeki inhibitör etki tayini yapmaya gerek görülmemiştir.

Selektif COX-2 inhibitör etki ve TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitör etki açısından bakıldığında asetik asit türevi bileşiklerde COX-1 ve COX-2 inhibitör etkilerin her ikisinin de arttığı bileşiklerin değerlendirilmesi gerekmektedir. **Bileşik 16**'da COX-1 inhibitör aktivite %32,177 iken COX-2 inhibitör aktivite %21,977 olarak bulunmuştur. COX-1 inhibitör etki tayini yönteminde TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitör etki nedeni ile de TXB<sub>2</sub> miktarında azalma oluşabileceği düşünüldüğünden bu bileşiğin hem TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörü hem de selektif COX-2 inhibitörü etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Ancak inhibitör etki şiddetindeki artış yeterli görülmediği için bu bileşik için TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitör etki tayini çalışması yapılmamıştır.

Bu çalışmanın devamı olacak şekilde, **Bileşik 16** yapısı göz önünde bulundurularak, selektif COX-2 inhibitör etkisi daha yüksek, COX-1'i inhibe etmeden TXA<sub>2</sub> sentazı inhibe edebilecek bileşiklerin tasarımı ve

inhibitör etkilerinin (COX-1, COX-2, TXA<sub>2</sub> sentaz) ortaya konulması çalışmaları düşünülmektedir.

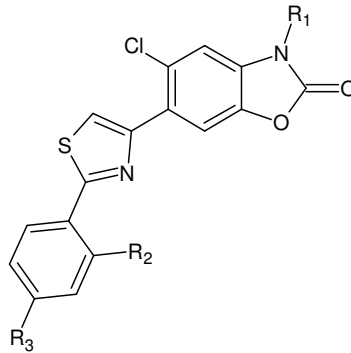
## 6. SONUÇ

Bu çalışmada altı tanesi 5-kloro-6-(2-sübstitüe fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol, altı tanesi [5-kloro-6-(2-sübstitüe fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetat ve altı tanesi [5-kloro-2-okso-6-(2-sübstitüe fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il]asetik asit olan 18 yeni bileşik sentezlenmiş ve sentezlenen bileşiklerin yapıları IR, <sup>1</sup>H-NMR spektrumları ile aydınlatılmış ve elementel analiz sonuçları ile desteklenmiştir.

Bileşiklerin 10 µM konsantrasyonda, COX-1 ve COX-2 enzimi inhibitör aktivitelerine bakılmış ve bileşiklerin COX-1 ve COX-2 enzimlerine seçicilikleri değerlendirilmiştir.

Etil {5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il}asetat (**Bileşik 11**) selektif COX-2 inhibitör aktivite artışını değerlendirmek açısından {5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3*H*-benzoksazol-3-il}asetik asit (**Bileşik 16**) ise COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivitedeki artışı belirlemek bakımından önem kazanmıştır.

Sentezlenen 18 bileşiğin kimyasal yapıları, erime dereceleri, % verimleri ve COX enzimi inhibitör aktivite testi sonuçları Tablo 13'te gösterilmiştir.



Bu çalışmanın devamı olarak, Bileşik 16 yapısı göz önünde bulundurularak, selektif COX-2 inhibitör etkisi daha yüksek, COX-1'i inhibe etmeden TXA<sub>2</sub> sentazı inhibe edebilecek bileşiklerin tasarımı ve inhibitör etkilerinin (COX-1, COX-2, TXA<sub>2</sub> sentaz) ortaya konulması çalışmaları düşünülmektedir.

**Tablo 13: Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin erime derecesi, % verim, % COX-1 ve % COX-2 inhibisyonları**

Bileşik	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Erime Derecesi (°C)	%Verim	% COX-1 inhibisyonu	% COX-2 inhibisyonu
1	-H	-H	-H	237-38	27,71	40,479	0
2	-H	-Cl	-H	270-72	32,43	35,690	8,507
3	-H	-H	-Cl	280-82	25,72	23,369	6,156
4	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	221-223	18,71	28,86	4,738
5	-H	-F	-H	267-68	19,75	17,581	0
6	-H	-H	-F	261-64	25,37	6,3035	2,201
7	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	171-73	77,71	31,902	0
8	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-Cl	-H	179-81	76,56	14,144	0
9	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-Cl	178-79	21,86	6,1168	25,97
10	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	165-67	65,62	6,732	28.209
11	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-F	-H	173-74	19,26	0,4942	38,134
12	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-F	97-99	15,24	3,327	23,171
13	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-H	257-58	26,41	32,912	0
14	-CH <sub>2</sub> COOH	-Cl	-H	248-249	29,50	21,326	4,738
15	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-Cl	305-307	12,31	38,063	11,380
16	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-OCH <sub>3</sub>	229-231	35,15	32,177	21,977
17	-CH <sub>2</sub> COOH	-F	-H	246-48	42,35	0	16,753
18	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-F	284-86	49,18	24,302	0
SC-558						99,846	100
KAN						0	0

## 7. ÖZET

### BAZI 5-KLORO-6-( SÜBSTİTÜE TİYAZOL-4-İL)-2-OKSO -3H- BENZOKSAZOL YAPISINDAKİ BİLEŞİKLERİN SENTEZİ VE COX İNİHİTÖR AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada 5-kloro-2-okso-3H-benzoksazolden hareketle 5-kloro-6-(2-sübstitüe fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol ve [5-kloro-6-(2-sübstitüe fenil-1,3-tiyazol-4-il)-2-okso-3H-benzoksazol-3-il] asetik asit ve bu asitlerin esteri olan 1,3-diaril yapısına sahip 18 yeni bileşiğin sentezlenmesi, yapılarının kanıtlanması ve COX-1 ve COX-2 inhibitör etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Sentezlenen bileşiklerde merkezi halkayı tiyazol, aril sübstitüsyonları ise 3-sübstitüe-5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol ve 2. ya da 4. konumunda sübstitüent taşıyan fenil halkası oluşturmuştur. 5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol halkasının 3. konumundaki sübstitüsyonları asetik asit ve ester kalıntısı, fenil halkasındaki sübstitüsyonları ise flor, klor, metoksi gibi küçük gruplar oluşturmuştur.

Sentezlenen 1,3-diaril-tiyazol türevlerinin literatür verilerine dayanarak selektif COX-2 inhibisyonu göstermesi düşünülmüştür. Asetik asit kalıntısı taşıyan 1,3-diaril türevlerinin ise selektif COX-2 inhibisyonun yanında TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitör aktivite de göstermesi beklenmiştir.

Elde edilen bileşiklerin yapıları IR ve <sup>1</sup>H-NMR spektrumları ile aydınlatılmış ve elementel analiz verileri ile desteklenmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin COX-1 ve COX-2 inhibitör aktiviteleri 10 µM konsantrasyonda enzim immünoanaliz yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Sentezlenen bileşiklerden etil {5-kloro-6-[2-(2-florofenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetat (**Bileşik 11**) selektif COX-2 inhibitör aktivite artışını değerlendirmek açısından {5-kloro-6-[2-(4-metoksifenil)-1,3-tiyazol-4-il]-2-okso-3H-benzoksazol-3-il}asetik asit (**Bileşik 16**) ise COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivitedeki artışı belirlemek açısından önemli bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** 1,3-diaril heterosiklik bileşikler, selektif COX-2 inhibisyonu, 5-kloro-2-okso-3H-benzoksazol

## 8. SUMMARY

The aim of this study is to synthesize 18 new 1,3-diaryl heterocyclic compounds starting from 5-chloro-2-oxo-3*H*-benzoxazole and to prove their structure and to evaluate their COX-1 and COX-2 inhibitory activities. The synthesized compounds are originated from 5-chloro-6-(2-substitue phenyl-1,3-thiazole-4-yl)-2-oxo-3*H*-benzoxazole and [5-chloro-6-(2-substitue phenyl-1,3-thiazole-4-yl)-2-oxo-3*H*-benzoxazole-3-yl] acetic acid and the ester forms of these acids.

The synthesized 1,3-diaryl compounds possess thiazole ring as central heterocyclic ring and possess 5-chloro-2-oxo-3*H*-benzoxazole and 2 or 4 substitue phenyl as diaryl substitutions. The third position of 5-chloro-2-oxo-3*H*-benzoxazole is substituted with acetic acid or ester moiety and the phenyl ring is substituted with small groups such as fluorine, chlorine and methoxy.

Based on the literature, the synthesized compounds are considered to have selective COX-2 inhibitory activity. The compounds possessing acetic acid moiety are expected to have TXA<sub>2</sub> synthase activity as well as selective COX-2 inhibitory activity.

Complete structural assignments of all compounds were established by <sup>1</sup>H-NMR and IR spectroscopic data and the results of these data are supported with elementary analysis.

The activities of the compounds for possible COX-1 and COX-2 inhibitory activity were performed by enzyme immunoassay method at 10 μM concentration.

Ethyl {5-chloro-6-[2-(2-florophenyl)-1,3-thiazole-4-yl]-2-oxo-3*H*-benzoxazole-3-yl}acetate (**Compound 11**) have been found out considerable for evaluating the increase in selective COX-2 inhibition and {5-chloro-6-[2-(4-methoxyphenyl)-1,3-thiazole-4-yl]-2-oxo-3*H*-benzoxazole-3-yl}acetic acid (**Compound 16**) have been found out considerable for evaluating the increase in COX-1 and COX-2 inhibitory activity.

**Key words:** 1,3-diaryl heterocyclic compounds, selective COX-2 inhibition, 5-chloro-2-oxo-3*H*- benzoxazole.

## 9. KAYNAKLAR

1. Kalkutgar A.S., Zhao Z., *Discovery and Design of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors as Non-Ulcerogenic, Anti-Inflammatory Drugs with Potential Utility as Anti-Cancer Agents*. Current Drug Targets, 2001(2): p. 79-106.
2. Dannhart G., Laufer S., *Structural Approaches to Explain the Selectivity of Selectivity COX-2 Inhibitors: Is There a Common Pharmacophore?* Current Medicinal Chemistry, 2000(7): p. 1101-1112.
3. Dannhart G., Kiefer W., *Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects*. Eur. J. Med. Chem., 2001(36): p. 109-126.
4. Manathip O., Moreland L.W., *Specific Cyclooxygenase 2 Inhibitors: A New Choice of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Therapy*. Arthritis Core Res., 1999. **12**(9): p. 351-362.
5. Marnett L.J., Kalgutkar A.S., *Design of selective inhibitors of cyclooxygenase-2 as nonulcerogenic anti-inflammatory agents*. Current Opinion in Chemical Biology, 1998(2): p. 482-490.
6. Ryn J.V., Trummelitz G., Pairet M., *COX-2 Selectivity and Inflammatory Processes*. Current Medicinal Chemistry, 2000(7): p. 1145-1161.
7. Burian M., Geisslinger G., *COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites*. Pharmacology & Therapeutics, 2005. **107**: p. 139-154.
8. Gasparini G., Longo R., Sarmiento R., Morabito A., *Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents?* Lancet Oncol, 2003. **4**: p. 605-15.
9. Charlier C., Michaux C., *Dual inhibition of cyclooxygenase-2(COX-2) and 5-lipoxygenase(5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2003(38): p. 645-659.
10. Bertolini A., Ottani A., Sandrini M., *Dual Acting Anti-Inflammatory Drugs: A Reappraisal*. Pharmacological Researches, 2001. **44**(6): p. 437-450.
11. Sui Z., Guan J., Ferro M.P., McCoy K., Watcher M.P, et al., *1,3-Diarylcycloalkanopyrazoles and Diphenyl Hydrazides as Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2*. Bioorganic & Medical Chemistry Letters, 2000(10): p. 601-604.
12. Banoglu E., Akoglu Ç., Ünlü S., Küpeli E., Yeşilada E., Şahin M.F., *Amide Derivatives of [6-(5-Methyl-3-phenylpyrazole-1-yl)-3(2H)*



- pyridazinone-2-yl]acetic Acids as Potential Analgesic and Anti-Inflammatory Compounds. Potential Analgesic and Anti-Inflammatory Compounds, 2004(337): p. 7-14.*
13. Ökçelik B., Ünlü S., Banoglu E., Küpeli E., Yeşilada E., Şahin M.F., *Investigations of New Pyridazinone Derivatives for the Synthesis of Potent Analgesic and Anti-Inflammatory Compounds with Cyclooxygenase Inhibitory Activity. Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem., 2003(336): p. 406-412.*
  14. Barbey S., Goossens L., Taverne T., Cornet J., Choessel V., et al., *Synthesis and Activity of a New Methoxytetrahydropyran Derivative as Dual Cyclooxygenase Inhibitor. Bioorganic & Medical Chemistry Letters, 2002(12): p. 779-782.*
  15. Portevin B., Tordjman C., Pastoureau P., Bonnet J., Nanteuil G.D., *1,3-Diaryl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole Derivatives: A New Series of Potent and Selective COX-2 Inhibitors in Which a Sulfonyl Group Is Not a Structural Requisite. J. Med. Chem., 2000(43): p. 4582-4593.*
  16. Fries S., Grosser T., *The Cardiovascular Pharmacology of COX-2 Inhibition. Hematology, 2005: p. 445-451.*
  17. Konstantinopoulos P.A., Lehmann D.F., *The Cardiovascular Toxicity of Selective and Nonselective Cyclooxygenase Inhibitors: Comparisons, Contrasts, and Aspirin Confounding. J Clin Pharmacol, 2005(45): p. 742-750.*
  18. Dogne J.M., Leval X.D., Delarge J., David J., Masereel B., *New trends in Thromboxane and Prostacyclin Modulators. Current Medicinal Chemistry, 2000(7): p. 609-628.*
  19. Manoria P., Manoria P.C., *COX-2 Inhibitors and Heart. Indian Heart J, 2005(57): p. 772-777.*
  20. Egan K. M., Wang M., Lucitt M. B., Zulas A. M., Pure E., et al., *Cyclooxygenases, Thromboxane, and Atherosclerosis. Plaque Destabilization by Cyclooxygenase-2 Inhibition Combined With Thromboxane Receptor Antagonism. Circulation, 2005(111): p. 334-342.*
  21. *İltihap ve iyileşme, [www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1215/ünite03.pdf](http://www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1215/ünite03.pdf).*
  22. Kuralay F., Çavdar Z., *İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış. Genel Tıp Derg, 2006. 16(3): p. 143-152.*
  23. Akgün H., Balkan A., Bilgin A. A., Çalış Ü., Gökhan N., et al., *Farmasötik Kimya. 2004, Hacettepe Üniversitesi Yayınları.*
  24. Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-L.D.J., *Non Steroidal Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents. Current Medicinal Chemistry, 2002(9): p. 89-98.*

25. Miller S. B., *Prostaglandins in Health and Disease: An Overview*. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2006. **36**(1): p. 37-49.
26. Claria J., *Cyclooxygenase-2 Biology*. Current Pharmaceutical Design, 2003. **9**: p. 2177-2190.
27. Mardini I.A., Fitzgerald G.A., *Selective Inhibitors of Cyclooxygenase -2: A Growing Class of Anti-Inflammatory Drugs*. Molecular Innovations, 2001. **1**(1): p. 30-38.
28. Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M., *CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology*. Annu. Rev. Biochem., 2000(69): p. 145-82.
29. Capone M.L., Tacconelli S., Francesco L.D., Sacchetti A., Sciulli M.G., Patrignani P., *Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans*. Prostaglandins & other Lipid Mediators, 2007(82): p. 85-94.
30. Kis B, Snipes J.A., Busija D. W, *Acetaminophen and the Cyclooxygenase-3 Puzzle: Sorting out Facts, Fictions, and Uncertainties*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005. **315**(1): p. 1-7.
31. Chandrasekharan N. V, Dal H., Turepu Roos K. L, Evanson N. K, Tomsik J, et al., *COX-3, cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression*. PNAS, 2002. **99**(21): p. 13926-13931.
32. Botting R. M, *Mechanism of Action of Acetaminophen: Is there a Cyclooxygenase 3?* Clinical Infectious Diseases, 2000. **31**: p. S202-10.
33. Botting R, Ayoub S.S., *Cox-3 and the mechanism action of paracetamol/acetaminophen*. Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids. 2005. **72**: p. 85-87.
34. Editorial, *COX-3: Fact or fancy?* Joint Bone Spine, 2004. **71**: p. 451-453.
35. Botting R., *COX-1 and COX-3 inhibitors*. Thrombosis Research, 2003. **110**: p. 269-272.
36. Kayaalp O., *Rasyonel tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 10 ed, ed. K. O. 2002, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti.
37. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Ders Kitabı, ed. Ç.İ. Bökesoy T.A., Melli M.,: Gazi Kitabevi, Ankara Kitabevi.
38. Meyer-Kirchrath J., Schrör K., *Cyclooxygenase-2 Inhibition and Side-effects of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in the Gastrointestinal Tract*. Current Medicinal Chemistry, 2000(7): p. 1121-1129.

39. Brooks P., Emery P., Evans J.F., Fenner H., Hawkey C.J., et al., *Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2*. *Rheumatology*, 1999(38): p. 779-788.
40. Talley J. J., *Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors*. *Progress in Medicinal Chemistry*, 1999. **36**: p. 201-234.
41. Penning T.D., Talley J.T., Bertenshaw S.R., Carter J.S., Collins P.W., *Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib)*. *J. Med. Chem.*, 1996(40): p. 1347-1365.
42. Kalkutgar A.S., Crews B.C., Saleh S., Prudhomme D., Marnett L.J., *Indolyl esters and amides related to indomethacin are selective COX-2 inhibitors*. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 2005(13): p. 6810-6822.
43. Gajraj N. M., *Cyclooxygenase-2 Inhibitors*. *Anest Analg*, 2003. **96**: p. 1720-38.
44. Borer J.S., Simon L.S., *Cardiovascular and gastrointestinal effects of COX-2 inhibitors and NSAIDs: achieving a balance*. *Arthritis Research & Therapy*, 2005. **7**(4): p. S14-S22.
45. Bolten W.W., *Problem of the atherothrombotic potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Ann. Rheum Dis*, 2006. **65**: p. 7-13.
46. Wong D., Wang M., Cheng Y., Fitzgerald G.A., *Cardiovascular hazard and non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005. **5**: p. 204-210.
47. Chaiamnuay S., Allison J.J., Curtis J.R., *Risk versus benefits of cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal antiinflammatory drugs*. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2006. **63**(19): p. 1837-1851.
48. Walter M.F., Jacob R.F., Day C.A., Dahlborg R., Weng Y., Mason R.P., *Sulfone COX-2 inhibitors increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs*. *Atherosclerosis*, 2004(177): p. 235-243.
49. Morihara T., Cole G.M., Tani H., Tanaka T., Kudo T., et al., *Multiple anti-Alzheimer disease activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Psychogeriatrics*, 2006. **6**: p. 1-3.

50. Dogne J.M., Hanson J., Leval X., Masereel B., Kolh P., Pirotte B., *New Developments on Thromboxane Modulators*. Mini-Reviews in Medical Chemistry, 2004(4): p. 649-657.
51. Kappe C. O., Stadler A., *Microwave Theory*, in *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*. 2005. p. 9-28.
52. Perreux L., Loupy A., *A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations*. Tetrahedron, 2001(57): p. 9199-9223.
53. Loupy A., Perreux L., Liagre M., Burle K., Moneuse M., *Reactivity and Selectivity under microwaves in organic chemistry. Relation with medium effects and reaction mechanisms*. Pure Appl. Chem, 2001. **73**(1): p. 161-166.
54. Kikelj D., Urleb U., *Thiazoles, Science of Synthesis*. Vol. 11. 2002. 627-833.
55. Lespagnol C., Marcincal-L.A., *La Benzoxazolinone et ses Derives Consideres Sous l'angle de la Chimie Therapeutique*. Bull. Chim. Ther., 1967. **2**(5): p. 395.
56. Close W.J., Tiffany B.D., Spielman M.A., *The Analgesic Activity of Some Benzoxazolinone Derivates*. J. Am.Chem Soc., 1949(71): p. 1265.
57. Kalcheva V.B., Doicheva B.B., Angelova V. Kh., Simov D.A., *Proton Stability Constants of Substituted Benzoxazolones*,. Dokl. Bolg. Akad. Nauk., 1974. **26**(11): p. 1493.
58. Hartley W.N., Dobie J.J., Paliatseas G., *Absorbtion Spectra of Benzoxazolones in Alchol*. J. Chem Soc., 1900: p. 839.
59. Groenvik, M.E., *Sur L'action de L'ether Chloroxycarbonique L'amidophenol*. Bull. Soc. Chim. France, 1876. **25**: p. 177.
60. Sandmeyer T., *Ueber die Einwirkung von Imidokohlensaureester au Aromatische Orthoverbindungen*. Chem. Ber, 1886(19): p. 8656.
61. Graebe C., Rostovzeff S., *Ueber die Hofmann' sche Reaction (Ueberführung der Amide in Amine)*. Chem. Ber, 1902(35): p. 2751.
62. Ostaszynski A., Plenkiewicz H., Urbanski T., *Preperation of Benzoxazolones from Halosalicylhyroxamicacids and Ethyl Chloroformate*. Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Chim, 1971. **19**(1): p. 15.
63. Yamahara T., Takamatsu h., *Benzoxazolones*. 1973, Kokai: japan, C.A.79,66345d.
64. Nagase K.K, *Benzoxazolones*. 1984: Japan , Kokai Koho JP, 58,225,072(83,225,072).

65. White A.W., *2-Benzoxazolinones*. 1986: US, C.a: 104, 186398e, 4,558,136.
66. Kervennal J., Cognion j.W., *Benzoxazolone and Its Derivatives From o-nitrophenols and Carbon Monoxide*. 1984, Eur.Pat. Appl.
67. Boeshagen H., Geiger W., *A New Reaaregement of Acylated 3-Hydroxy-1,2-benzisoxazoles*. Chem. Ber., 1970. **103**(1): p. 123.
68. Kinstle T.H, Darlage L.J., *Thermel Conversion of 3-Hydroxy-1,2-benzisoxazoles to Benzoxazolinone*. J. Heterocyclic Chem., 1969. **6**(1): p. 123.
69. Drent E., *A Process for The Preparation of 2-Benzoxazolinones by carbonilation of Ortho-nitrophenols,*. 1988, Eur. Patent. Appl.,.
70. Macho V., Schmidtova M., Vojcek L., *A New Method for Preparation of Benzoxazolone and Its Derivatives*. 1998: Slovakia.
71. Miyata T., Kanbe N., Murai S., Sonoda N., Nishiguchi I. et. al., *A new Synthesis of Benzimidazolones, Benzoxazolones, and Benzothiazolone from o-Substituted Nitrobenzenes Using Sulfur and Carbon Monoxide*. 1988: Nippon Kagaku Kaishi.
72. Maleski R.J., Osborne C.E., Cline S.M., *A Simple Synthesis of 2(3H)-Benzoxazolones Using Phenyl Chloroformate*. J. Heterocyclic Chem., 1991. **28**: p. 1937.
73. Meth-Cohn O., Rhouati S., *Cyclisation of Azidoformates. Cyclisation of Aryl Azidoformates*. J.Chem. Soc. Chem. Comm., 1981. **5**(241).
74. Khajavi M. S., Hajihadi M., Naderi R., *Synthesis of Heterocyclic Compounds from o-Substituted Anilines under Microwave Irradiation*. J. Chem Research, 1996: p. 92-93.
75. Heise H., Mees B., *Benzoxazolones and Benzothiazolones*. 1973, 2,131,366, 78, 124576x.
76. Sungakk Kim, Young K.W., *Preperation of Cyclic Carbonates and 2-Oxazolidones using Di-2-Pyridylcarbonate*. Heterocycles, 1986. **24**(6): p. 1625-1630.
77. Takeda K., Tsuboyama K., Takayanagi H., Shirokami R., Takeura M. et al., *Novel Reactions of S,S-Bis(1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)Dithiocarbonate*. Chem. Pharm. Bull, 1989. **37**(9): p. 2334-2337.
78. Prakash O., Batra H., Kaur H., Sharma P.K., Sharma V., et al., *Hypervalent Iodine Oxidative Rearrangement of Anthranilamides, Salicylamides and Some B-Substitued Amides: A New and Convenient Synthesis of 2- benzimidazolones and Related Compounds*. Synthesis, 2001. **4**: p. 541-543.

79. Kim Y.J., Varma R.S., *Microwave-Assisted Preparation of Cyclic Ureas from Diamines in the Presence of ZnO*. Tetrahedron Letters, 2004. **45**(39): p. 7205-7208.
80. Renard P., Lesieur D., Lespagnol C., *Acyl-6 Benzoxazolinone et Acides(acyl-6 oxo-2 Benzoxazoliny-3) alcanoniques*. Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther., 1980. **15**(5): p. 453.
81. Aichaoui H., Poupaert J.H., Lesieur D., Henichart J.P., *AlCl<sub>3</sub>-DMF Reagent in The Friedel-Crafts Reaction. Application to 2(3H)-Benzoxazolinones in The Haworth Reaction*. Bull. Soc. Chim. Bel., 1992. **101**(12): p. 1053.
82. Uçar H., Derpoorten K.V., Depovere P., Leiseur D., İsa M., et al., *"Fries Like" Rearrangement: a Novel and Efficient Method for the Synthesis of 6-Acyl-2(3H)-benzoxazolones and 6-Acyl-2(3H)-benzothiazolones*. Tetrahedron, 1998. **54**: p. 1763-1772.
83. Liacha M., Yous S., Poupaert J.H., Depreux P., Aichaoui H., *Friedel-Crafts Acylation of 2(3H)-Benzoxazolone: Investigation of the Role of the Catalyst and Microwave Activation*. Monatshefte für Chemie, 1999. **130**: p. 1393-1397.
84. Doğruer D.S., Ünlü S., Yeşilada E., Şahin M.F., *N-(2-pyridinyl)-2-[2(3H)-benzazolone-3-yl]acetamides: Synthesis, Antinociceptive and Anti-Inflammatory activity*. Il farmaco, 1997. **52**(12): p. 745.
85. Pilli G., Erdogan H., Sunal V., *Some New Benzoxazolinone Derivatives with Analgesic and Anti-Inflammatory activities*. Arznein-Forsch / Drug Res, 1993. **43**(11): p. 1351.
86. Weinstok J., Gaitanopoulos D.E., Stringer O.D., Franz R.G., Hieble J.P., et al., *Synthesis and Evaluation of Non-catechol D-1 and D-2 dopamine receptor agonist: Benzimidazol-2-one, Benzoxazol-2-one, and the highly potent benzothiazol-2-one 7-ethylamines*. J. Med. Chem., 1987. **30**: p. 1166.
87. Sam J., Plampin J.N., *Benzoxazoles: Potent skeletal muscle relaxants*. J. Pharm. Sci., 1964. **53**(5): p. 538.
88. Safak C., Erdogan H., Palaska E., Sunal R., Duru S., *Synthesis of 3-(2-Pyridylethyl) Benzoxazolinone Derivatives: Potent Analgesic and Anti-Inflammatory Compounds Inhibiting Prostaglandin E<sub>2</sub>*. J. Med. Chem., 1992. **35**: p. 1296.
89. Erdoğan H., Ünlü S., Sunal R., *Analgesic Activity of Some 3-(Arylpiperidinomethyl)-2-Benzoxazolinone derivatives*. Arch. Pharm, 1989. **332**: p. 75.
90. Ünlü S., Erdogan H., Sunal R., *Synthesis of Some(2-Benzoxazolinone-3-yl) Alkanoic-Acid Derivatives and their analgesic properties*. H.U.J Faculty Pharmacy, 1992. **12**(1): p. 23.

91. Ünlü S., Erdogan H., Sunal R., Gümüsel B., *Antiinflammatory activities of Some 2-Benzoxazolinone derivatives*. J. Fac. Pharm. Gazi, 1992. **9**(2): p. 75.
92. Pilli(Ayyıldız) H.G., Özkanlı F., Safak C., Erdoğan H., Ünlü S., et al., *2-(6-Acyl-2-Benzoxazolinone-3-yl) Acetamide and 2-(6Acyl-2-Benzoxazolinone-3-yl) Acetonitrile Derivatives wtih Analgesic Activities*. Pharmazie, 1994. **49**: p. 63.
93. Doğruer D.S., Ünlü S., Yeşilada E., Şahin M.F., *Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Activity of Some(2-Benzoxazolone-3-yl) and (2-Benzothiazalone-3-yl) Aceticacid Derivatives*. Il farmaco, 1998. **53**: p. 80.
94. Gülcan H.O., *3-Süstitüe-5-kloro-2-Benzoxazolinon Türevi Bileşiklerin Sentezi ve Analjezik Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar*, in Gazi Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, *Bilim Uzmanlığı Tezi*. 2001, Gazi U.: Ankara.
95. Ünlü S., Önkol T., Dündar Y, Ökçelik B., Küpeli E., et al., *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**: p. 353-361.
96. Dannhart G., Ulbrich H., *In-vitro test system for the evaluation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors based on a single HPLC run with UV detection using bovine aortic coronary endothelial cells (BAECs)*. Inflamm. res., 2001(50): p. 262-269.
97. Maxey K., Johnson J., *Detecting and Measuring Cyclooxygenases*, in *Cayman Chemical, Currents Issue 10*, Spring 2001.
98. Pairet M., Ryn J., *Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Inflamm. res., 1998. **2**(47): p. S93-S101.
99. Blain H., Boileau C., Lopicque F., Nedelec E., Loeuille D., et al., *Limitation of the in vitro whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinic use*. j Clin Pharmacol, 2002. **53**: p. 255-265.
100. *Introduction to Immunoassays, Chapter 1*, [www.abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning\\_immunoassay\\_01.pdf](http://www.abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning_immunoassay_01.pdf).
101. *Immunoassay*, [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com). 2007.

102. *Immunoassay Detection Technologies, Chapter 2*,  
[www.abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning\\_immunoassay\\_02.pdf](http://www.abbottdiagnostics.com/Science/pdf/learning_immunoassay_02.pdf).
103. *Introduction to ELISAs*,  
<http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403#introelisa>.
104. *Introduction to Antibodies - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, <http://www.chemicon.com/resource/litlibrary/ant101.pdf>.
105. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*,  
<http://www.naweb.iaea.org/nafa/aph/public/ras-ai-elisai.pdf>.
106. Patrignani P., Panara M.R., Greco A., Fusco O., Natoli C., *Biochemical and Pharmacological Characterization of the Cyclooxygenase Activity of Human Blood Prostaglandin Endoperoxide Synthases*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994. **271**(3): p. 1705-1712.
107. Brideau C., Kargman S., Liu S., D'Illo A.L., Ehrich E.W., Rodger I.W., et al., *A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemically efficacious cyclooxygenase inhibitors*. *Inflamm. res.*, 1996(45): p. 68-74.
108. *Assay Designs Correlate-EIA™ Thromboxane B2 Enzyme Immunoassay Kit Catalog No. 900-002 Kitapçığı*.
109. *Assay Designs Correlate-EIA™ Prostaglandin E2 Enzyme Immunoassay Kit Catalog No. 900-001 Kitapçığı*.