

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**C1'İN (3-BENZOİL-1-METİL-4-FENİL-4-PİPERİDİNOL  
HİDROKLORÜR) COX AKTİVİTELERİ VE NO DÜZEYLERİNE  
İN VİVO VE İN VİTRO ETKİLERİNİN DİĞER NSAİİ' LERLE  
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Berna DEMİRCAN**

**Danışmanı  
Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN**

**Doktora Tezi  
Erzurum-2006**

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b>	.....	<b>III</b>
<b>ÖZET</b>	.....	<b>IV</b>
<b>SUMMARY</b>	.....	<b>VI</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	.....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	.....	<b>3</b>
2.1. Eikosanoidler	.....	<b>3</b>
2.1.1. Yapı ve Özellikleri	.....	<b>3</b>
2.1.2. Siklooksijenazlar	.....	<b>4</b>
2.1.3. COX Reaksiyonu	.....	<b>8</b>
2.2. NOS ve NO	.....	<b>10</b>
2.2.1 NO	.....	<b>10</b>
2.2.2. NOS'un Özellikleri ve İzoenzimleri	.....	<b>13</b>
2.2.3. iNOS Sentezinin Kontrolü	.....	<b>14</b>
2.2.4. NFκB'nin iNOS ve COX-2 İndüksiyonu Üzerindeki Etkileri	.....	<b>15</b>
2.3. İnflamasyon ve Fizyopatolojisi	.....	<b>15</b>
2.3.1. İnflamasyonun Kimyasal Mediyatörleri	.....	<b>18</b>
2.3.1.1. AA Metabolitleri	.....	<b>18</b>
2.3.1.2. Sitokinler	.....	<b>19</b>
2.3.1.3. Lökosit Ürünleri	.....	<b>19</b>
2.3.1.4. Histamin	.....	<b>20</b>
2.3.1.5. Kinin Sistemi	.....	<b>20</b>
2.3.1.6. NO	.....	<b>21</b>
2.3.1.7. Diğer İnflamatuar Ajanlar	.....	<b>21</b>

2.4. Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ) .....	22
2.4.1. NSAİİ'lerin Etki Mekanizması .....	22
2.4.2. NSAİİ'lerin Kullanıldığı Yerler .....	24
2.4.3. NSAİİ'lerin Yan Etkileri .....	25
2.4.4. Farklı COX Selektivitesine Sahip NSAİİ'lerin Özellikleri .....	26
2.5. C1 Maddesinin Genel Özellikleri .....	28
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>29</b>
3.1. Deney Hayvanları .....	29
3.2. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar .....	29
3.3. Karragenin İnflamasyon Modeli .....	30
3.4. Analiz Örneklerinin Hazırlanması .....	31
3.5. COX Aktivite Analizi .....	31
3.5. 1. Reaktiflerin Hazırlanması .....	31
3.5.2. Deneyin Yapılışı .....	31
3.6. Nitrik Oksit Tayini .....	33
3.7. İstatistiksel Analizler .....	33
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>34</b>
4.1. COX-1 ve COX-2 Aktivitelerinin Karşılaştırılması .....	34
4.2. COX Aktiviteleri ve NO Düzeyleri Arasındaki İlişkiler .....	34
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>38</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>46</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>47</b>

**TEŞEKKÜR**

Tezimin hazırlanmasında bilgi ve tecrübeleri ile bana büyük katkıda bulunan tez hocam Sayın Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e ayrıca doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım hocalarım; Sayın Prof. Dr. Ebubekir BAKAN, Prof. Dr. Nuri BAKAN, Prof. Dr. Leyla YILDIZ, Prof. Dr. Fatih AKÇAY, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ, Doç. Dr. Zühal UMUDUM, Doç. Dr. Hülya AKSOY, Doç. Dr. Sait KELEŞ, Yrd. Doç. Dr. Abdülkadir YILDIRIM'a, deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN, Yrd. Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, tezin ana maddesini temin ettiğimiz Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. İnci Gül'e, tezimin oluşmasındaki yardımlarından dolayı Anabilim Dalımızdan Arş. Gör. Fatma ÖZABACIGİL'e ve diğer tüm mesai arkadaşlarıma, hoşgörü ve destekleri ile daima yanımda olan aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

**C1'İN (3-BENZOİL-1-METİL-4-FENİL-4-PİPERİDİNOL  
HİDROKLORÜR) COX AKTİVİTELERİ VE NO DÜZEYLERİNE İN VİVO VE  
İN VİTRO ETKİLERİNİN DİĞER NSAİİ' LERLE KARŞILAŞTIRMALI  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Bu çalışmanın amacı bis Mannik bazı B1'in yapısal ve nonklasik izomeri olan C1'in (3-benzoil-1-metil-4-fenil-4-piperidinol hidroklorür) siklooksijenaz (COX) aktiviteleri ve nitrik oksit (NO) düzeyleri üzerindeki etkilerini karrageninle oluşturulmuş pençe ödemi inflamasyonlu 48 sıçanda araştırmak ve C1'in etkisini diğer nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlarla (NSAİİ) karşılaştırmaktır.

Deney hayvanları Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden sağlandı. Hayvanlar standart şartlar altında barındırıldı ve beslendi (normal oda sıcaklığı, adi yem ve su). Sıçanlar; kontrol, intakt, indometazin, nimesulid, rofecoxib, C1 (50 mg), C1 (100 mg), C1(200 mg) grubu olmak üzere rastgele 8 gruba (n=6) ayrıldı.

C1, 50, 100 ve 200 mg kg<sup>-1</sup> dozlarda COX-1 ve COX-2 aktivitelerini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttı (p<0.01), halbuki NO düzeylerini sadece 50 mg kg<sup>-1</sup> dozunda önemli ölçüde azalttı (p<0.05). Nimesülidin COX-1 ve COX-2 aktiviteleri üzerindeki inhibitör etkisi C1'in tüm dozlarındaki etkisinden daha az olurken bu etki NO düzeyleri için C1'in etkisinden anlamsız şekilde daha fazlaydı (p>0.05). C1, 200 mg kg<sup>-1</sup> dozda her iki COX izoenzim aktivitesini de rofekoksibe kıyasla önemli ölçüde inhibe etti (p<0.01), ancak NO için C1'in bu etkisi rofekoksibden çok farklı değildi (p>0.05). 50 ve 100 mg kg<sup>-1</sup> dozlarda C1 maddesi verilen ratlarda NO düzeyleri,

rofekoksib verilen sıçanlardan daha yüksekti ( $p<0.05$ ). İndometazin COX-1, COX-2 aktiviteleri ve NO düzeylerini 50 ve 100 mg kg<sup>-1</sup> dozlardaki C1'e kıyasla anlamlı şekilde azalttı ( $p<0.01$ ).

Sonuç olarak, C1'in antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu iddia edilebilir . COX-2 selektivitesi indometazin ve nimesülidden daha güçlü, rofekoksibden daha zayıftır. COX inhibisyonuna ilaveten, nükleer faktör kappa B (NFκB) ve diğer transkripsiyon faktörlerinin rolü C1'in antiinflamatuvar mekanizmalarını aydınlatmak için ayrıntılı şekilde araştırılmalıdır.

*Anahtar Kelimeler:* siklooksijenaz, nitrik oksit, inflamasyon, mannik bazı

**COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF C1 (3-BENZOYL-1-METHYL-4-PHENYL-4-PIPERIDINOL-HYDROCHLORIDE) WITH OTHER NSAIDS , IN VIVO AND IN VITRO, ON COX ACTIVITIES AND NO LEVELS**

The aim of this study was to investigate the effects of 3-benzoyl-1-methyl-4-phenyl-4-piperidinol-hydrochloride (C1), which is a structural and also non-classical isomer of bis Mannich base B1, on cyclooxygenase (COX) activities and nitric oxide (NO) levels in 48 rats with inflammation by using carrageenan-induced paw edema, and to compare its effect with other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).

Experimental animals were supplied from the Center of Experimental Research and Practice in Ataturk University. The animals were housed and fed in the laboratory (normal room temperature, food and water) under standard conditions. Rats were randomly assigned to eight groups (n=6); control, intact, indomethacin, nimesulide, rofecoxib, C1 (50 mg), C1 (100 mg) and C1(200 mg).

C1, at doses of 50, 100 and 200 mg kg<sup>-1</sup>, significantly decreased COX-1 and COX-2 activities as compared with the control group (p<0.01), whereas it significantly reduced NO levels only at 50 mg kg<sup>-1</sup> dose (p<0.05). While the inhibitory effect of nimesulide on COX-1 and COX-2 activities were insignificantly less than that of C1 at all doses: this effect for NO levels was insignificantly more than that of C1 (p>0.05). C1, at 200 mg kg<sup>-1</sup> dose, significantly inhibited both COX isoenzyme activities in comparison to rofecoxib (p<0.01), but its effect on NO was not significantly different from rofecoxib (p>0.05). NO levels were higher in the rats given C1, at doses of 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>, than rofecoxib-given ones (p<0.05). Indomethacin significantly reduced

COX-1 and COX-2 activities and NO levels compared to C1 at doses of 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup> (p<0.01).

In conclusion, it might be claimed that C1 has an antiinflammatory effect, and its COX-2 selectivity is stronger than those of indomethacin and nimesulide but weaker than rofecoxib. In addition to COX inhibition, the role of nuclear factor kapa B (NFκB) and other transcription factors in detail should be investigated to clarify the mechanisms of antiinflammatory effect of C1.

*Key words:* cyclooxygenase, nitric oxide, inflammation, mannich base



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamasyon; romatoid artrit, osteoartrit, bursit, ankilozan spondilit, myozit, tendinit, snovit, Chron hastalığı, psöriyazis, Alzheimer gibi bir çok hastalığın patogenezinde yer aldığı düşünülen bir olgudur.<sup>1-7</sup>

İnflamatuvar reaksiyonların mekanizması çok kompleks olup tek bir mediyatöre veya faktöre bağlanamaz.<sup>8</sup> İnflamatuvar reaksiyon oluşumunda histamin, serotonin, araşidonik asit (AA) metabolitleri, kininler, nitrik oksit (NO) gibi inflamasyon mediyatörlerinin rolü bilinmektedir.<sup>9-16</sup> İnflamasyonlu dokuda polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından serbest oksijen radikalleri olan süperoksit ( $O_2^-$ ) anyonu ve hidroksil radikali (OH) kontrolsüz şekilde aşırı miktarda üretilir.<sup>17,18</sup> Ayrıca PMNL'ler proinflamatuvar etkinlik gösteren ve doku harabiyetine neden olan lizozomal enzimlerini salıverirler.<sup>19</sup> İnflamasyon, değişik hücreler ve mediyatörler arasında karmaşık bir etkileşim biçimidir.<sup>8</sup> Antiinflamatuvar tedavi prensipleri bu medyatör ve faktörlerin inhibisyonuna dayanmaktadır.<sup>20-23</sup>

İnflamatuvar hastalıkların tedavisinde Non Steroidal Antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) yaygın biçimde kullanılmaktadır.<sup>24-27</sup> NSAİİ'lerin hem antiinflamatuvar etkileri hem de olumsuz yan etkileri siklooksijenaz (COX) inhibisyonundan kaynaklanmaktadır.<sup>28</sup> COX enzimi AA metabolitlerinin [prostaglandinler (PG), tromboksanlar ve lökotrienler (LT)] sentezindeki ilk basamağı katalizleyen enzimdir. COX enzimi konstitütif (COX-1) ve indüklenebilir (COX-2) olmak üzere iki izoformdan oluşmaktadır.<sup>29</sup> COX-1'in trombositler, böbrek tübülleri, gastrointestinal sistem (GİS) ve endotel hücrelerde fizyolojik bütünlüğü sağladığı, COX-2'nin ise sitokinler, endotoksinler, mutajenler, inflamatuvar mediyatörler, tümör promotörler ve büyüme faktörleri tarafından indüklendiği belirtilmektedir.<sup>30-35</sup> Ancak yapılan

çalışmalar COX-2'nin patofizyolojik rolüne ilaveten fizyolojik rolünün de olduğunu göstermiştir. Bu nedenle hem selektif hem de nonselektif COX inhibitörlerinin olumsuz yan etkilere sahip olmaları kaçınılmazdır.<sup>36,37</sup>

İnflamatuar mediyatörlerden olan NO'nin sentezinden sorumlu Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi tıpkı COX gibi konstitütif (cNOS) ve indüklenbilir (iNOS) olmak üzere iki izoformdan meydana gelmektedir. İnflamasyonun başlaması indüklenbilir izoenzimler olan COX-2 ve iNOS'un gen expressionunun artması ve bunun sonucunda proinflamatuvar mediyatörler olan PGE<sub>2</sub> ve NO'nin artmış sentezi ile birlikte gerçekleşmektedir. Fizyolojik konsantrasyonlarda NO'nin PG sentezini aktive ettiği, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe ettiği iddia edilmektedir.<sup>16</sup>

NSAİİ'ler bugün dünya üzerinde en çok kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçların yan etkilerinin fazlalığı nedeniyle, yan etkileri az olan ve daha güçlü antiinflamatuvar etki gösteren ilaçların bulunması, gelişmekte olan tıbbın esas problemlerinden birisidir. Bu amaçla yeni maddeler ve radikaller sentezlenmektedir.<sup>7,38</sup>

İlaçların antiinflamatuvar etkilerini araştırmak için çeşitli inflamasyon modelleri kullanılmaktadır. Formalin, dekstran, karragenin, serotonin, histamin, bradikinin ve PG'lerin sıçan ayak pençesine enjekte edilmesiyle oluşturulan inflamasyon modelleri en yaygın kullanılan modellerdir.<sup>9,39-41</sup>

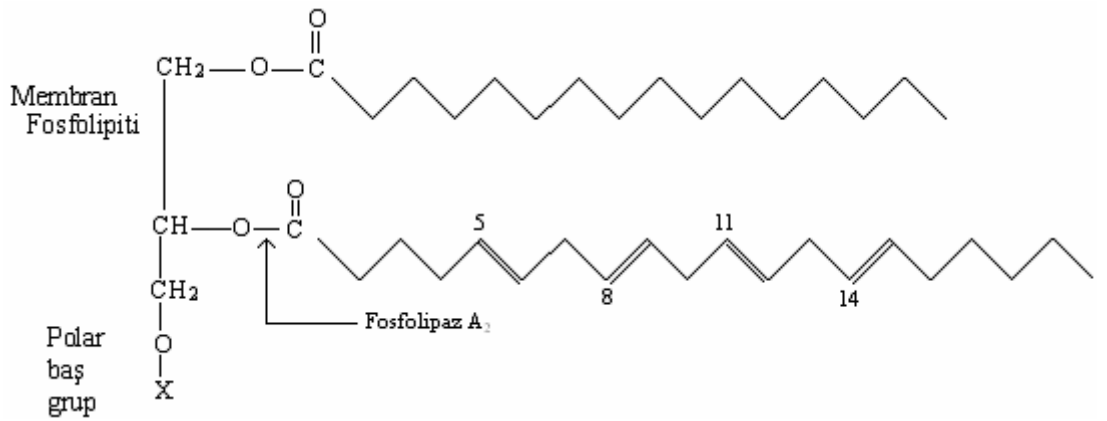
Bu çalışmada, C1 (3-benzoil-1-metil-4-fenil-4-piperidinol hidroklorür) olarak adlandırılan antiinflamatuvar etkiye sahip Mannik bazı türevi olan maddenin karragenin inflamasyon modeli aracılığıyla, inflamasyonun patogeneğinde rol oynayan COX enzim aktiviteleri ve NO düzeylerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. C1'in antiinflamatuvar etkinliğini, farklı selektiviteye sahip COX inhibitörleri ile karşılaştırarak selektivitesi hakkında fikir sahibi olmak ve COX-NO ilişkisini değerlendirmek çalışmanın diğer amacıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Eikosanoidler

#### 2.1.1. Yapı ve Özellikleri

Eikosanoidler çoklu doymamış yağ asidi olan AA'nin türevleridirler. Üç sınıf eikosanoid vardır; PG'ler, tromboksanlar ve lökotrienler.<sup>29,42</sup> Eikosanoidler parakrin hormonlardır. Eikosanoidlerin yarı ömürlerinin kısa olması parakrin etkilerinin sebebini açıklayabilir.<sup>43</sup> Bu yağ asidi türevlerinin omurgalı dokuları üzerinde pek çok önemli etkisi vardır. Bu türevlerin üreme işlevleri, inflamasyon, yara ya da hastalıkla ilgili ateş ve ağrı oluşması, trombosit agregasyonu, kan basıncının düzenlenmesi, mide asidinin salgılanması, fizyolojik ve patofizyolojik daha birçok olay üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. AA; 20 karbonlu, çoklu doymamış bir yağ asididir [20:4 ( $\Delta^{5,8,11,14}$ )] ve fosfolipaz A<sub>2</sub> enziminin katalizörlüğünde membran fosfolipitlerinden koparılır<sup>29,42-44</sup>(Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Araşidonik asitli bir fosfolipit ve fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin etki yeri<sup>29</sup>

PG'ler, AA zincirinden kaynaklanan beş-karbonlu bir halka içerir. İsimlerini ilk kez Bengt Samuelsson ve Sune Bergström tarafından izole edildikleri, prostat bezinden almışlardır.<sup>29</sup> PG'lerin prekürsörü olan AA, COX ve Lipoksijenaz (LOX) adı verilen iki tip enzimle metabolize edilir.<sup>43,45,46</sup>

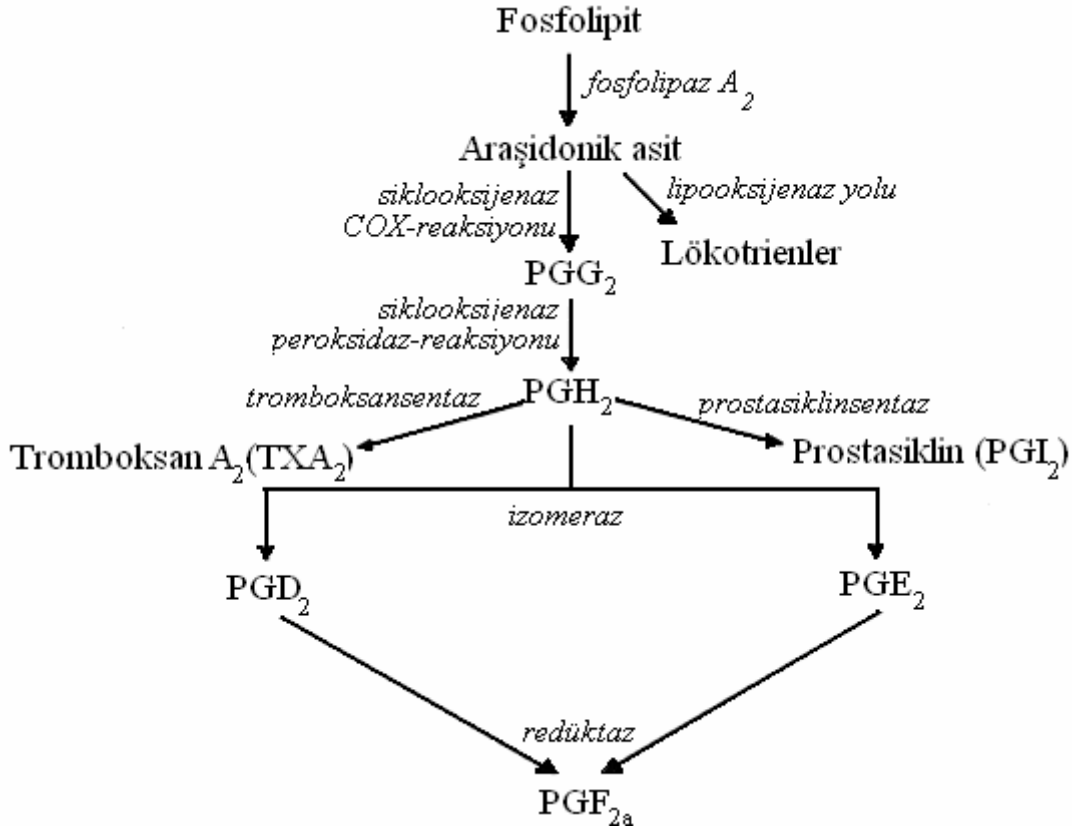
### **2.1.2. Siklooksijenazlar**

Prostaglandin H<sub>2</sub> sentaz veya prostaglandin endoperoksit H sentaz olarak da adlandırılan bu enzimler (EC 1.14.99.1) bifonksiyonel, integral membran proteinleridir.<sup>47,48</sup> 1990'lara kadar sadece bir COX enziminin mevcut olduğu düşünülüyordu. Ancak konu üzerinde yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda COX enziminin iki farklı izoformunun olduğu anlaşıldı.<sup>48-50</sup> COX-1'in çok sayıda memeli hücresinde normal fizyolojik koşullar altında exprese edildiği, özellikle trombositler, böbrek tübülleri, GİS ve endotel hücrelerinin COX-1'ce zengin olduğu ifade edilmektedir. COX-1 izoenzimi organizmada homeostazın sürdürülmesi için gereklidir. COX-2 genellikle indüklenebilir bir izoformdur. COX-2 sitokinler, endotoksinler, mutajenler, inflamatuvar mediyatörler, tümör promotörleri ve büyüme faktörlerine cevaben indüklenir.<sup>35,43,46,48,51-68</sup> Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, böbrekler, gastrik doku, uterus, damar endoteli gibi bazı dokularda COX-2'nin normal fizyolojik şartlarda da exprese edildiğini göstermiştir.<sup>43</sup>

COX enzimi hem siklooksijenaz hem de peroksidaz (POX) aktivitesi sergileyen bifonksiyonel enzimdir. COX reaksiyonu ile AA PGG<sub>2</sub>'ye (9,11-endoperoksit-15-hidroperoksit) dönüşür. PGG<sub>2</sub> POX katalizörlüğünde PGH<sub>2</sub>'ye (15-hidroperoksit) indirgenir (Şekil 2.2).

Her iki izoenzim hücre membranı, çekirdek membranı ve endoplazmik retikulum membranının lümenine bakan yüzeyinde lokalize olmuşlardır. Membranda iki katlı lipit tabakasının yalnızca tek bir tabakasına entegrederler (monotropik

düzenlenme). COX-1 ve COX-2 izoenzimleri endoplazmik retikulumda post-translasyonel işlemlere uğradıktan sonra homodimerler halinde salınırlar. Molekül kütleleri 67-72 kDa civarındadır. 1 mol monomer 1 mol hem prostetik grubunu (ferrik-protoporfirin IX ) yapısına dahil eder. COX enzimleri hem bağımlı peroksidaz enzim ailesinin üyeleridirler.<sup>47,48</sup>

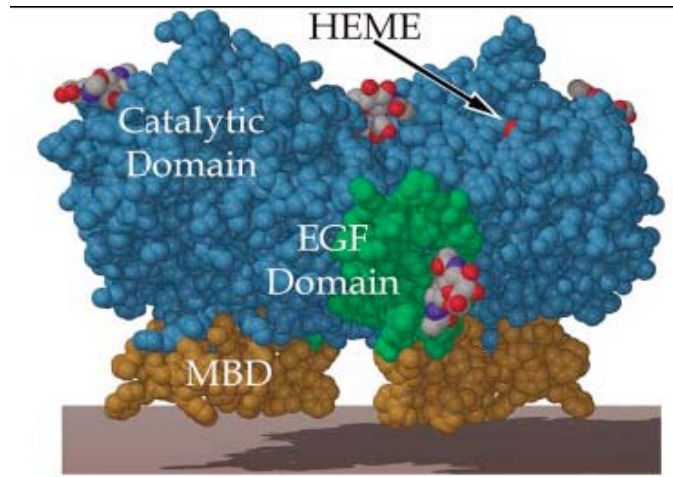


Şekil 2.2. Araşidonik asit metabolitleri<sup>62</sup>

COX, membranda glikozillenmiş formda bulunur. İki izoenzimin tersiyer ve kuaterner yapıları hemen hemen aynıdır. Her bir alt ünite üç ayrı yapısal bölümden oluşur.

- N-terminal epidermal büyüme faktörü (EGF=Epidermal büyüme faktörü) benzeri bölge
- Membrana bağlayıcı motif
- C-terminal globüler katalitik bölge

EGF benzeri bölge, katalitik bölge ile birlikte dimerde bir alt ünite oluşturur. EGF benzeri bölgenin COX'un membranda lipit çift tabaka içerisine girmesinde rol oynadığı belirtilmiştir.<sup>47</sup> (Şekil 2.3) Membrana bağlayıcı motif, birkaç hidrofobik aminoasit ihtiva eden dört adet kısa, ardışık, amfipatik  $\alpha$ -heliks yapıdan oluşur.



Şekil 2.3. COX'un homodimer yapısı<sup>47</sup>

C-terminal globüler katalitik bölge enzim proteininin % 80'ini ihtiva eder. COX'un hem COX hem de POX bölgesi ve hem'in bağlandığı bölge olan katalitik kısımda yerleşiktir.<sup>47,48,57</sup> COX-1 ve COX-2 izoenzimleri tersiyer ve kuarterner yapıları bakımından homolog sekansa sahip olmalarına rağmen, primer yapıda 3 ayrı alanda farklılıklar bulunmaktadır. Bunlar;

1. Her iki izoform aminoasit kompozisyonu ve uzunluğu bakımından farklı sinyal peptidlerine sahiptir.
2. İki izoform arasındaki zincir farklılığı membran bağlayıcı motifte bulunmaktadır.
3. COX-2 izoformu 18 amino asitlik farklı bir bölge ihtiva eder. Bu bölgenin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.

COX izoformlarının aktif bölgelerinde COX substratlarının ve inhibitörlerinin bağlanmasında önemli role sahip üç amino asit tanımlanmıştır. Bu amino asitler arjinin (Arg) 120, serin (Ser) 530 ve tirozin (Tyr) 385 olup hidrofobik kanalların üzerinde, aktif bölgelere yakın biçimde yerleşik olarak bulunmaktadırlar. Arg 120, flurbiprofen gibi NSAİİ'lerin COX izoformlarına bağlandıkları yerdir. Ser 530, aspirinin COX-1 izoformunu asetillediği bölgedir (geri dönüşümsüz inhibisyona yol açar). Tyr 385, Arg 120'ye yakın olarak yerleşmiştir ve bu nedenle NSAİİ bağlanmasına bağlı olarak fonksiyonu bloke olabilir. NSAİİ'lerin COX izoformlarını, bu izoformlara ve muhtemelen COX kanalı boyunca yer alan başka alt bölgelere bağlanarak inhibe ettiklerine inanılmaktadır. Bu bağlanma PG sentezini, AA'in enzimin aktif bölgelerine girmesini bloke etmek yoluyla ya da aktif bölgelerin şeklinde biçimsel bir değişikliğe yol açmak suretiyle inhibe eder. COX-1 ve COX-2 arasındaki önemli bir diğer yapısal fark, COX-2 kanalının COX-1 kanalından daha geniş olmasıdır. Kanalların genişliğindeki farklılıklara ek olarak aktif bölgelerinin amino asit bileşiminde iki fark bulunur. COX-1 aktif bölgesi 523 pozisyonunda bir izölösün amino asiti içermekte, buna karşılık COX-2 aktif bölgesinin aynı pozisyonu bir valin amino asiti ihtiva etmektedir. Bir metil grubunun olmayışı COX-2 yapısında aktif bölgeye bitişik bir "yan cep" oluşumuna ve COX-2 aktif bölgesinin hacminin artmasına yol açar. COX-2 de 434 pozisyonundaki valinin yerini, COX-1'in aynı pozisyonunda izölösünün alması bu hacmi

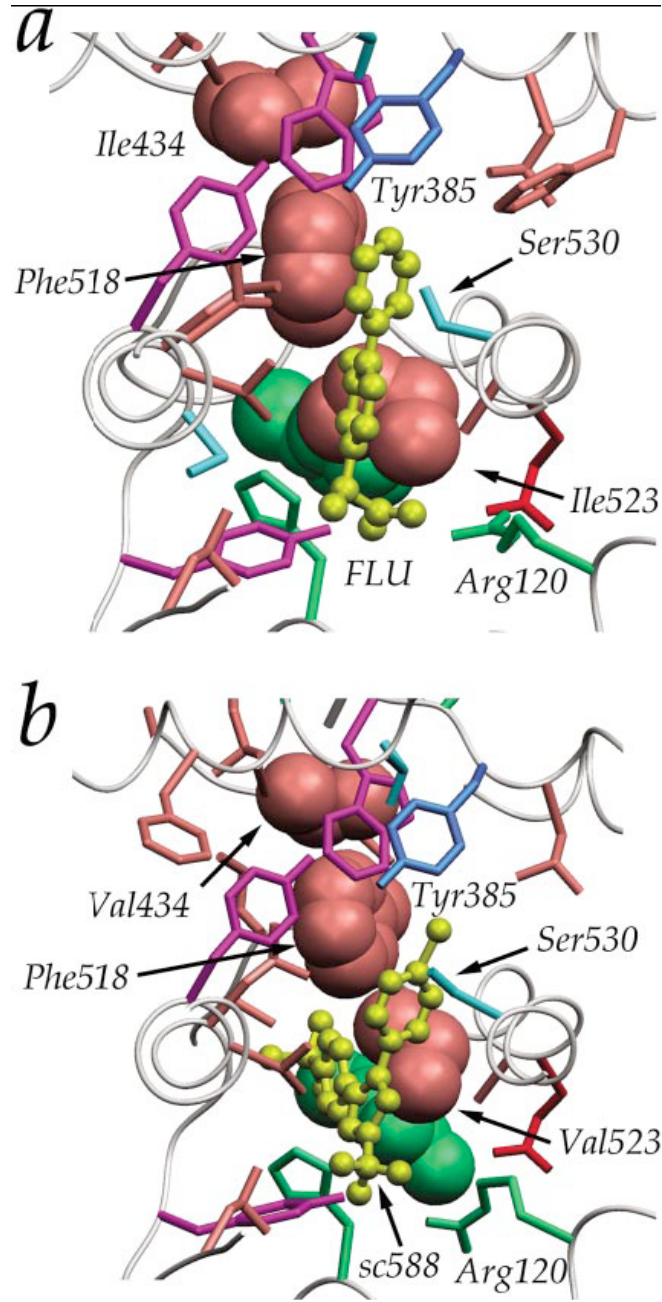
daha da artırır. Bu iki aminoasit farklılığının kombinasyonu, COX-2'de 518 pozisyonundaki fenilalaninin yön değiştirmesine ve sonuç olarak yan cebe girişin artışına olanak verir. COX-1'de 513 pozisyonunda histidinin yerini COX-2'de Arg'in alması yan cebin çevresinin kimyasını değiştirir. Arg polar ortamla etkileşime girer ve COX-2 inhibitörlerinin etkisini artırır. COX-1'e kıyasla COX-2'de daha geniş ana kanal bu izoformun NSAİİ bağlayan bölgesini % 25 oranında artırır.<sup>47,48</sup> COX-2 kanalının daha geniş hacmi Arg 120 amino asidinin neden olduğu sterik ve iyonik engelleri azaltarak nonasidik NSAİİ'lerin COX-2 ile bağlanmasını artırabilir.<sup>47</sup> COX izoformlarında, biri izoformun aktif bölgesinde, diğeri aktif bölge dışında olmak üzere mevcut olan iki amino asitte gözlenen değişiklikler bu enzim izoformlarının COX-2 selektif inhibitörlere gösterdikleri farklı hassasiyeti açıklamaktadır.<sup>48</sup>

### **2.1.3. COX Reaksiyonu**

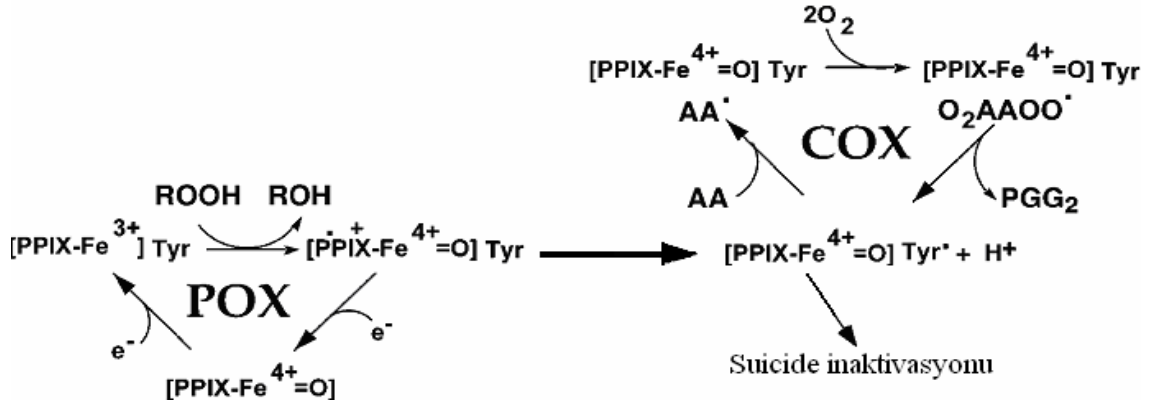
AA'in PGG'ye dönüşümü çoklu doymamış yağ asidi otooksidasyonunun analogu olan bir seri radikalik reaksiyonlar olarak açıklanabilir. COX reaksiyonunda ilk olarak bir hidroperoksit (ROOH), enzimin prostetik grubu olan hem'in yapısındaki demir (Fe) ile reaksiyona girer. ROOH, alkole (ROH) indirgenirken enzimin oksiferril hem radikal katyonu oluşur (Şekil 2.5).

Radikal katyon, Tyr 385 aminoasidine molekül içi geçiş yapar ve tirozil radikali oluşur. Buraya kadar gerçekleşen reaksiyonlar enzimin POX aktivitesi vasıtasıyla yürür. COX aktif bölgesi AA ile tamamen işgal edildiğinde tirozil radikali AA'ten 13 $\text{proS}$  hidrojenini kopararak reaksiyonu başlatır. Oluşan araşidonil radikali moleküler oksijen ( $\text{O}_2$ ) ile reaksiyona girer ve 11-peroksil radikali meydana gelir. Radikal yapı C-9 atomuna kayar ve ardından C-8'de oluşan karbon merkezli radikal C-12 ile siklik bir yapı oluşturarak endoperoksiti meydana getirir (Şekil 2.6). İkinci bir  $\text{O}_2$ 'nin reaksiyona





Şekil 2. 4. COX-1 ve COX-2 izoformlarının farklı aminoasit kompozisyonu. a; COX-1  
b; COX-2



Şekil 2. 5. COX enzimlerinin reaksiyon mekanizması

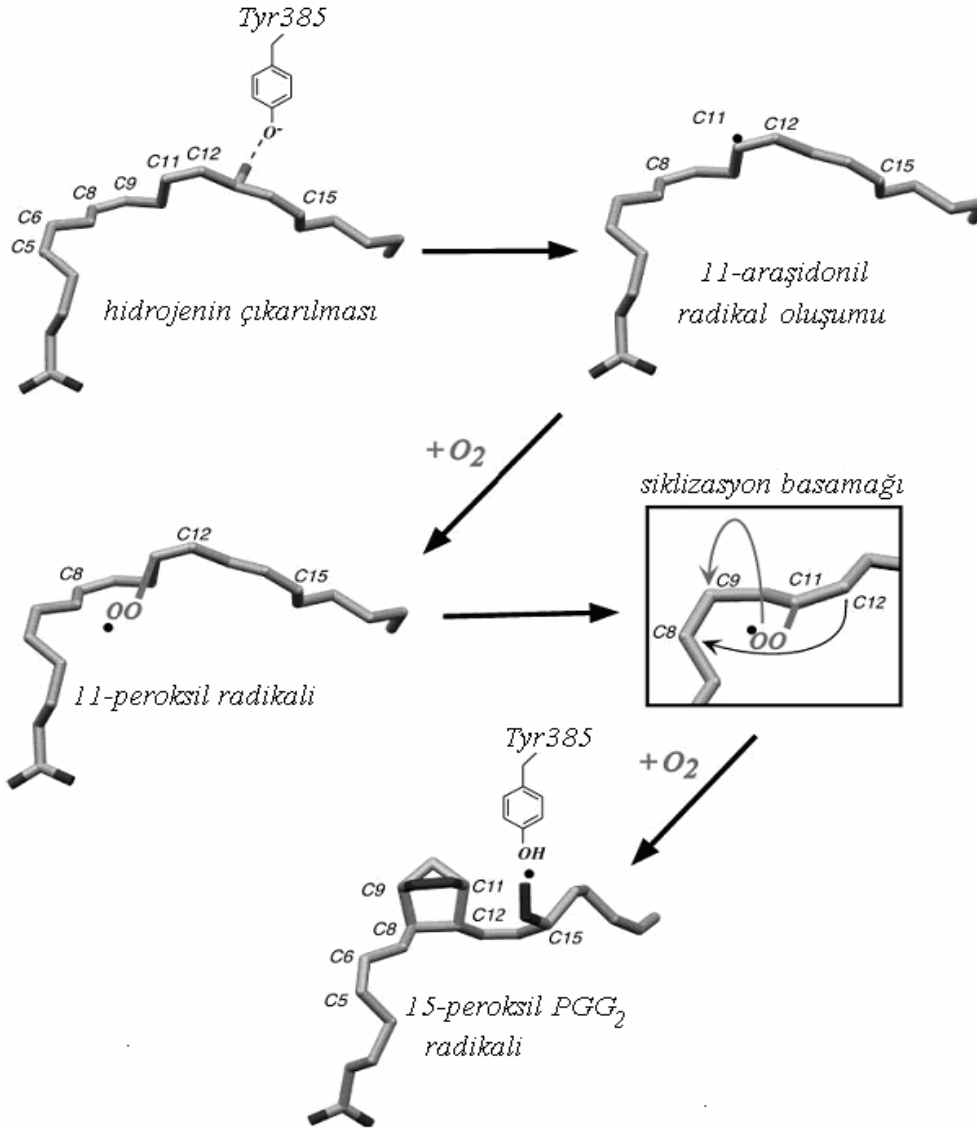
dahil olması sonucu 15-peroksil radikali oluşur ve bu radikal Tyr 385'den bir elektron kaparak PGG<sub>2</sub>'ye indirgenir. POX reaksiyonu tekrar aktive olur ve PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>'ye indirgenir. Reaksiyonlar sonucunda ortamda bulunan tirozil radikali ya yeni bir COX reaksiyonunu başlatır ya da intihar yoluyla radikalik reaksiyonlar zincirini sonlandırır. POX reaksiyonunun AA metabolizmasında COX'tan sonra ikinci basamakta gerçekleştiği düşünülmesine rağmen, (PGG<sub>2</sub>'nin PGH<sub>2</sub>'ye indirgenmesi) COX reaksiyonunun başlayabilmesi için POX aktivitesinin gerekli olduğu anlaşılmaktadır.

47,48,69

## 2.2. NOS ve NO

### 2.2.1. NO

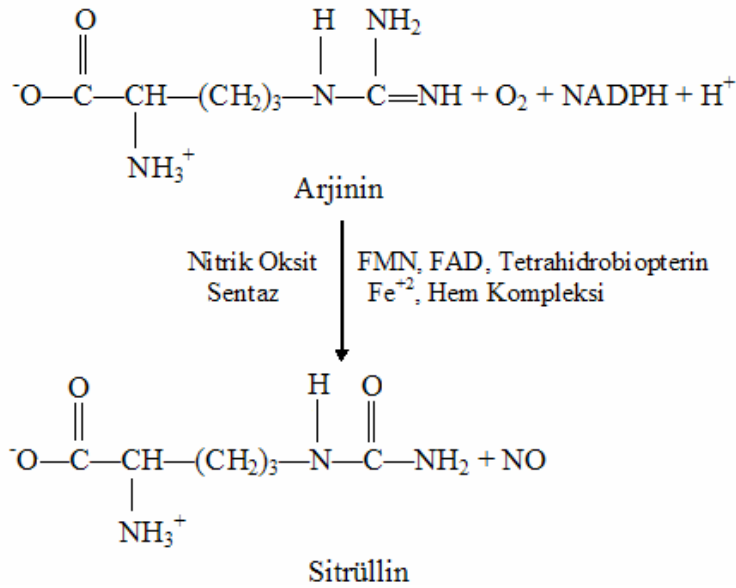
NO renksiz bir gaz olup, serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. Sentezi için kullanılan öncül biyomolekül Arg aminoasididir. NO'nun Arg'den sentezi NOS üzerinde iki basamakla gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında Arg'in guanido azotu (N<sup>w</sup>) hidroksillenerek N<sup>w</sup>-Hidroksi arjinin (N-OH-Arg) oluşur. Bu ara ürün oldukça karardır. Enzime sıkı bağlı olan bu ara ürün ikinci aşamada sitrullin ve NO'ya çevrilir. Enzimatik NO sentezinin her iki aşaması da enzimin birer monooksijenaz



Şekil 2.6. COX reaksiyonu

aktivitesi sayesinde gerçekleşir. NOS tarafından 1 mol Arg'den 1 mol NO sentezi için 2 mol O<sub>2</sub> ve 1.5 mol NADPH kullanılır. Kullanılan oksijenlerin iki atomu suya indirgenirken diğer iki oksijen atomu, NO ve sitrullin oluşumunda kullanılır (Şekil 2.6). NO yapısındaki oksijen atomunun kaynağı, ilk monooksijenaz aktivitesi ile Arg'e katılan atomdur. Sitrullindeki oksijen atomunun kaynağı ise ikinci monooksijenaz tepkimesi sırasında kullanılan oksijendir.<sup>16,29,42,44</sup>

NO çok yönlü bir biyolojik haberci molekül olup, farklı biyolojik etkilere sahip olabilen bir kimyasal türdür. Başlangıçta çeşitli biyolojik fonksiyonların regülasyonunda görev alan, hücre içi ve hücreler arası bir haberci molekül olarak tanımlanmıştır. Bu görevlere tipik örnek olarak sinir sistemindeki nörotransmitter fonksiyonu ve damar düz kaslarının gevşemesine olan etkileri sayılabilir. Daha sonraki çalışmalarda, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmaları ve inflamasyonda olduğu dokuya göç etmesinde, trombosit agregasyonunun inhibisyonunda, damar permeabilitesinin kontrolünde, penil ereksiyonda, immün sistemin fonksiyonlarında, barsak ve böbreklerde tuz ve su emiliminde de NO'un regülatör fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. NO'un ayrıca hücreleri sitotoksik etkilere karşı koruyucu etkileri de tanımlanmıştır.<sup>16</sup>



**Şekil 2. 7.** NO sentaz reaksiyonu

### 2.2.2. NOS'ın Özellikleri ve İzoenzimleri

NOS enzimleri birbirlerinin aynı olan iki alt birimden oluşan homodimerik yapıda proteinlerdir. Bu enzimler iki farklı bölge içerirler. Enzimin N-terminal bölgesi sitokrom P450 oksidaza yapı ve fonksiyon olarak benzer. Bu bölge oksidaz bölgesi olarak adlandırılır. Bu kısım hem-grubu ve substrat (Arg) bağlama bölgelerini içerir.

NOS'ların C-terminal bölgesi ise yapı ve fonksiyon olarak sitokrom P450 redüktaz enzimine benzer. Bu bölge ise redüktaz bölgesi olarak tanımlanmıştır. Koenzimlerden NADPH, FAD ve FMN bağlama bölgeleri redüktaz bölgesi üzerindedir.<sup>16</sup>

NO sentezini katalizleyen NOS enziminin iki temel izoformu bulunur;

- a) Konstitütif (cNOS)
- b) İndüklenebilir (iNOS)

Konstitütif enziminin ayrıca iki formu vardır. Bunlardan birisi endotelial NOS (eNOS) ağırlıklı olarak membranda bulunur ve ürettiği NO endotelde gevşetici rol oynar. İkinci formu ise merkezi sinir sistemi ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan NO'nun üretiminden sorumlu olup, nöronal NOS (nNOS) olarak adlandırılır.<sup>16,70-72</sup> Konstitütif enzimlerin aktiviteleri mutlak olarak kalsiyum ( $Ca^{+2}$ )/kalmodulin bağımlıdır.

NOS enzimlerinin indüklenebilir olan izoformu (iNOS) ise alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyar. Aktivitesi için hücre içi  $Ca^{+2}$  derişiminin artması gerekli değildir. Normal hücre  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunda aktif formda bulunan bu enzimin aktivitesi, artan stoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundan etkilenmez. Bu izoform ilk kez makrofajlardan saflaştırılmış ve yapısı aydınlatılmıştır. iNOS enziminin sentezini lipopolisakkaritler (LPS) gibi çeşitli bakteriyel ürünler ile interferon-gama (IFN- $\delta$ ), interlökinler (IL-1, IL-2), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi inflamatuvar sitokinler

indüklemektedir. iNOS farklı türlerde 130-131 kDA molekül ağırlığındaki stoplazmik bir proteindir. iNOS sadece fagositik lökositlere özgü bir enzim değildir, uygun indüksiyon sağlandığında bütün çekirdekli hücreler bu enzimi sentezleme yeteneğine sahiptir. iNOS makrofajlar, kondrositler, düz kas hücreleri, miyokardiyum, damar epitel hücreleri ve diğer hücreler ile dokularda sentezlenebilir. iNOS, fetal ve erişkin akciğerleri gibi normal dokularda indüksiyonu olmadan da bulunmaktadır. Bu bulgu iNOS izoformunun bazı dokularda konstitütif olabileceğini düşündürmektedir. İndüksiyondan sonra iNOS enziminin sentezi birkaç saat sürmektedir. Sitokinlerle indüksiyondan 24 saat sonra NO sentezi en yüksek seviyeye ulaşmakta ve sonra hızla düşmektedir. iNOS'un mRNA düzeyi en yüksek seviyesine 16. saatte çıkar ve NO sentezi süresince düşer. iNOS aktivitesi koenzim olarak tetrahidrobiopterin bağımlıdır. FAD ise enzimin aktivitesini artırır.<sup>16,71,72</sup>

### ***2.2.3. iNOS Sentezinin Kontrolü***

iNOS izoformunun aktivasyonu hücrelerde DNA düzeyinde kontrol edilir. LPS, IL-1, IFN- $\delta$ , TNF- $\alpha$  en önemli fizyolojik indükleyicileridir. Bu etkenler dışında protein kinaz C'yi kontrol eden forbol esterleri ile trombositen derive edilen büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleri de iNOS sentezini indükleyen ajanlardır. iNOS enziminin indüksiyonu; deksametazon, hidrokortizon ve kortizol gibi glukokortikoidler tarafından inhibe edilir.<sup>16</sup>Bazı inhibitör sitokinler ve büyüme faktörleri ise iNOS sentezini baskırlar. IL-4, monosit kemotaktik protein-1, makrofaj deaktive eden faktör makrofaj ve monositlerde iNOS sentezini azaltırlar. Büyüme faktörlerinden transforme edici büyüme faktörü beta 1,2,3 (TGF- $\beta$ 1,2,3) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ile tirozin kinaz inhibitörleri ve nükleer faktör kappa-B (NF $\kappa$ B) inhibitörleri iNOS enziminin indüksiyonunu inhibe ederler.<sup>16</sup>

#### **2.2.4. NFκB'nin iNOS ve COX-2 İndüksiyonu Üzerindeki Etkileri**

İnflamasyonun başlangıcı indüklenebilir genler COX-2 ve iNOS genlerinin ekspresyonu ve bunun sonucu olarak pro-inflamatuar mediyatörler PGE<sub>2</sub> ve NO'nin sentezi ile birlikte olmaktadır.<sup>73</sup>

Ökaryotik hücrelerde bahsedilen indüklenebilir genlerin aktivasyonu, transkripsiyonu aktive eden proteinler aracılığı ile gerçekleşir. Bu protein transkripsiyon aktivatörlerinden biri de NFκB'dir. Hücrelerin TNF-α, IL-1, IL-2 veya forbol esterleri ile karşılaşması NFκB'nin aktivasyonuna neden olur.

NFκB dimerik yapıda bir protein olup, DNA'ya bağlanabilen proteinler olan p50 ve p65 (Rel A) proteinlerinden oluşur. Fizyolojik koşullarda, NFκB hücre stoplazmasında inhibitör protein olan IκB-α tarafından inaktif halde tutulur. IκB-α proteini, NFκB'nin çekirdeğe geçişini önler.

NFκB'nin aktivasyonu için, inhibitör alt birimden (IκB-α'dan) dimerin ayrılması gerekir. Sitokinlerle uyarılan sinyal iletim yolu aracılığı ile aktive olan tirozin kinazlar inhibitör altbirimi fosforillerler. IκB-α'nın fosforilasyonu, bu proteinin proteolitik olarak yıkımına ve NFκB dimerik proteinin serbest kalmasına yol açar. Serbest NFκB, çekirdeğe geçerek çeşitli genlerin promotör bölgelerine bağlanır ve çok sayıda geni aktive eder. NFκB antikor üreten hücrelerin proliferasyonunu ve immün cevabı uyarayan sitokinlerin transkripsiyonunu indükler. Antiinflamatuar etkiye sahip olan steroid ve non-steroid ilaçların aktive ettiği genlerden biri de IκB-α genidir.<sup>16,73,74</sup> NFκB'nin bazı kanser türlerinde anti-apoptotik etki yaptığı da öne sürülmektedir.<sup>73,74</sup>

### **2.3. İnflamasyon ve Fiziopatolojisi**

İnflamasyon vücuda zarar veren tehlikeli bir uyarıyı ortadan kaldırmaya yönelik

temel fizyopatolojik bir süreçtir. İnflamasyon ilk kez M.S. 1. yy.'da Celsus tarafından tanımlanmış ve kızarıklık, sıcaklık artışı, ağrı ve şişme ile karakterize edilmiştir. İnflamasyon, canlının bütünlüğünü korumasını sağlayan bir olay olup, amacı patojenin ortadan kaldırılması, hasarlı dokunun onarımı ve normal fonksiyonların tekrar kazanılmasıdır.<sup>17</sup>

İnflamasyon akut ve kronik inflamasyon olmak üzere 2'ye ayrılır. Akut inflamasyon yukarıda bahsedilen dört klasik bulgu ile ciltte uyarı sonrası net biçimde gözlenebilir. Kronik inflamasyon ise persistan ağrı, şişme ve hücresel proliferasyon ile karakterizedir.<sup>6,75</sup> İnflamatuar cevabı başlatan uyaranlar çok çeşitlidir. Bunlar; travma, enfeksiyöz ajanlar ve onların toksik ürünleri, sıcak soğuk gibi fiziksel etkenler, kimyasal maddeler, immün cevap ve iskemidir.<sup>6,8,75,76</sup> Önemli bir savunma mekanizması olan inflamasyon vücut tarafından kontrol altında tutulmazsa kronikleşir ve artrit, organ rüptürü, kanama gibi patolojilere neden olur.<sup>17</sup>

İnflamatuar reaksiyonun önemli komponentleri; hemodinamik değişiklikler, lökosit cevapları ve inflamasyon mediyatörlerinin salgılanmasıdır. Vasküler kan akımı ve çaptaki değişiklikler doku hasarından hemen sonra başlar. Hasar sonrası nörojenik kaynaklı kısa süreli bir vazokonstrüksiyon ve ardından vazodilatasyon meydana gelir.<sup>11,13,17,21</sup> Bu vazodilatasyon ve artan kan akışı intravasküler hidrostatik basıncı artırır ve kapillerlerden doku aralığına sızıntı başlar. İlk başlarda bu sızıntının protein içeriği düşüktür, inflamasyonun ileri dönemlerinde protein içeriği artar ve "eksuda" adını alır.<sup>17,76</sup> Vasküler permeabilite artışı ile plazma proteinleri ve lökositlerin dokuya geçişi ve eksudasyon oluşması bütün akut inflamatuvar olayların temel özelliğidir. Hemodinamik değişiklikler hasar verici ajanın etkilerinin kontrolünde, oldukça yararlıdır. Bu dönemde inflamatuvar eksudanın doku aralığında birikmesi, iritan ve toksik bileşiklerin dilüe edilmesine, lökositlerin, antikorların ve kompleman



faktörlerinin inflamasyon alanına taşınmasına neden olur ve böylece inflamasyonlu bölgede hasar verici ajanın izolasyonu ve nötralizasyonu sağlanır.<sup>8,75,76</sup>

İnflamasyonlu dokuda toplanan ve inflamasyonun önemli komponenti olan lökositler bu bölgede mikroorganizmaları öldürür, nekrotik dokuyu ve yabancı antijenleri parçalar.<sup>17</sup> Ayrıca kimyasal mediyatörleri, (histamin, PG, lökotrienler, sitokinler) lizozomal enzimleri ve toksik oksijen radikallerini serbestleştirerek doku hasarına yol açarlar.<sup>45,75,77-79</sup> Nötrofiller inflamasyon alanına gelen ilk hücrelerdir, genellikle hasar sonrası 90 dakika içinde inflamasyon bölgesine ulaşırlar. Nötrofillerden sonra inflamasyon alanına ulaşan ikinci hücreler monositlerdir. Monositler fagositik hücreler olup makrofaj olarak da isimlendirilirler. Monositler nötrofillerden daha fazla miktarda yabancı cisim fagosit ederler. Monositler immün cevapta yer alırlar ve kronik inflamasyonda önemli rol oynarlar.<sup>75</sup>

İnflamasyonun ilk safhaları özellikle nötrofillerin damarların periferine yakınlaşması, dizilmesi ve yapışması olup marjinyasyon, yuvalanma ve adezyon adını alır. Ardından yabancı ayaklar oluşturan nötrofiller kapillerlerden çıkar ve bu olaya emigrasyon adı verilir. Damar duvarından ayrılan nötrofiller ve ilerleyen dönemlere ek olarak monositler inflamatuvar olayın bulunduğu alana doğru hareket eder.<sup>17,75,76</sup> Bu olay “kemotaksis” olarak adlandırılır ve kemotaksisi kolaylaştıran ve hücreleri o bölgeye çeken değişik faktörler vardır. İnfekte edici ajan veya ürünleri, AA’in LOX ürünleri özellikle lökotrien-B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), kompleman gibi plazma protein fraksiyonları ve doku parçacıkları bu faktörler arasında sayılabilir. Bu faktörlere genel olarak kemotaktik faktörler adı verilir.<sup>11,12,75</sup> Hüresel yanıtın son basamağında nötrofil ve monositler doku ve hücre artıklarını fagosit ederler.<sup>76</sup> İnflamasyon, dejenerasyon veya hücre ölümü ile başlatıldığı halde inflamasyonun semptomları dejenerasyon sonrası plazma, endotel ve hücrelerden salınan kimyasal mediyatörler ile oluşturulur.<sup>11,12,14,15,78</sup> Bu mediyatörlerden

histamin gibi bazıları intrasellüler granüllerde depolanmış halde bulunur. Mediyatörlerden AA metabolitleri gibi bir kısmı ise ihtiyaç olduğunda sentezlenir ve hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanarak biyolojik aktivitelerini yerine getirir.<sup>17</sup>

### ***2.3.1. İnflamasyonun Kimyasal Mediyatörleri***

#### ***2.3.1.1. AA Metabolitleri***

COX reaksiyonu ürünü olan PGH<sub>2</sub> diğer PG'lerin prekürsörüdür. Bu ürünler PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TxA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> olup spesifik enzimler vasıtası ile sentezlenmektedirler (Şekil 2.2).<sup>45</sup> PGD<sub>2</sub> trombositlerde ve mast hücrelerinde bulunur. Pulmoner vazokonstrüksiyona neden olur, trombosit agregasyonunu inhibe eder ve böbrekte tuz atılımını artırır.<sup>80</sup>

PG'ler inflamasyonun hemen her basamağında yer almaktadırlar. PGE<sub>1</sub>'in intradermal enjeksiyonu uzun süren eritem, hiperaljezi yapar ve vasküler permeabilite artışını potansiyelize eder.<sup>81,82</sup> PGE<sub>2</sub> ağrı reseptörlerini kimyasal ve mekanik uyarılara karşı sensitize ederek hiperaljeziye neden olur.<sup>11,77</sup> PGD<sub>2</sub> ve E<sub>2</sub>'nin düşük konsantrasyonlarda bile, histamin ve karragenin ile oluşturulan vasküler permeabilite artışını çok belirgin olarak artırdığı bildirilmiştir.<sup>82,83</sup> PGI<sub>2</sub> (prostasiklin olarak da adlandırılır) endotelde ve az miktarda damar düz kas hücrelerinde sentezlenir.<sup>80,83</sup> PGI<sub>2</sub> proinflamatuvar etkiye sahip olup pek çok sistemde PGE<sub>2</sub>'den daha güçlüdür.<sup>84</sup>

AA metabolizmasının diğer bir COX ürünü TxA<sub>2</sub>, trombosit agregasyonu ve vazokonstrüksiyonu başlatır.<sup>83</sup> TxA<sub>2</sub> trombositlerde ve dolaşımdaki lökositlerde COX'un başlıca ürünüdür.<sup>79</sup> COX ürünlerine ek olarak LOX ürünleri ve AA metabolizması sırasında açığa çıkan toksik oksijen radikalleri de inflamasyona katkıda bulunurlar.<sup>45</sup> LOX'un 5-, 12-, ve 15 lipooksijenaz adları verilen üç türü vardır. 5-LOX ürünü olan LTA<sub>4</sub> diğer beş LT'nin öncüsüdür. LTA<sub>4</sub>'den sırasıyla; LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, LTF<sub>4</sub> oluşur. 5-LOX'un aktivitesi sırasında açığa çıkan ve lipoksinler adı verilen

bileşiklerin de inflamasyonda yer aldıkları ileri sürülmüştür.<sup>80</sup> PMNL ve eozinofilik lökositler ile bazı T lenfosit tiplerinde LTB<sub>4</sub>'e yüksek afinite gösteren reseptörler bulunur. Bu reseptörlerin LTB<sub>4</sub> tarafından aktivasyonu, lökosit, monosit ve doğal öldürücü hücrelerin stimülasyonuna, kemotaksisine, migrasyonuna ve agregasyonuna neden olur. Diğer LT'ler de bu özellik yoktur. LTB<sub>4</sub> ayrıca vazokonstrüksiyona neden olur, kapiller permeabiliteyi artırır ve hiperaljeziye neden olur. Kükürtlü LT'ler olan LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> ve LTE<sub>4</sub>'ün hiperaljezi, hipersensitivite reaksiyonu, lökosit ekstrasvazasyonu, damar permeabilitesi, lökosit kemotaksisi üzerine etkileri vardır.<sup>12,80,85</sup> LTD<sub>4</sub> en güçlü bronkokonstrüktör ve kapiller permeabilite artırıcı etkiye sahip bileşiktir.<sup>80</sup> PG'ler ve LT'ler inflamatuvar yanıtta merkezi role sahiptirler.<sup>10,12,45,81,84</sup> Bu yüzden antiinflamatuvar ilaç geliştirme stratejileri AA metabolitlerinin inhibisyonu üzerinde yoğunlaşmıştır.<sup>22, 86-89</sup>

### **2.3.1.2. Sitokinler**

Sitokinler aktive olmuş lenfosit ve makrofajlar gibi hücrelerden salınan peptitler olup diğer hücrelerin fonksiyonlarını düzenlerler. Vücutta pek çok olayın yanında inflamasyonda da önemli rolleri vardır.<sup>17</sup> İnflamasyonda rol alan sitokinler TNF ve IL'lerdir.<sup>90,91</sup> TNF, nötrofil aktivasyonu ve toplanmasına neden olur ve mezenşimal hücrelerden proteolitik enzimleri serbestleştirir.<sup>17</sup> IL-8 nötrofil aktivasyonu ve kemotaksiste role sahiptir. Sitokinler inflamasyonda gözlenen ateş ve ağrıdan sorumludurlar.<sup>92</sup> PGE<sub>2</sub> sentezini artırarak veya termoregülatör merkezi direkt etkileyerek ateşe neden olurlar.<sup>91</sup>

### **2.3.1.3. Lökosit Ürünleri**

Lökositlerden salınan sitokinler, kemotaktik ajanlar, lizozomal enzimler ve serbest oksijen radikalleri inflamasyona eşlik ederler. Elastaz, kollojenaz ve katepsin gibi proteazları içeren lizozomal enzimler doku proteinlerini parçalayarak dejenerasyon

yaparlar.<sup>75</sup>

#### **2.3.1.4. Histamin**

Histidin aminoasitinin dekarboksilasyonu sonucu oluşan bir amindir.<sup>42</sup> Dokularda yaygın olarak bulunur, en zengin kaynağı bağ dokusu mast hücreleridir. Antijen-antikor kompleksi, travma, sıcaklık artışı, ilaç, toksinler ve kimyasal ajanlar histaminin salınmasına yol açarlar.<sup>93</sup> Cilt içine histamin enjeksiyonu “Lewis üçlü cevabı” adı verilen reaksiyona neden olur ve bu reaksiyon inflamasyonun patogenezinin anlaşılmasını kolaylaştırır. Bu reaksiyonda histamin tarafından damarların genişletilmesi, kapiller permeabilitenin artırılması ve afferent sinir uçlarının stimüle edilmesi rol oynar.<sup>11,39,81</sup> Histamin endotel hücresinde bir adezyon molekülü olan P selektinin sentezini artırarak lökositlerin dokuya migrasyonunu artırır.<sup>93</sup> Bazı damar yataklarında H<sub>2</sub> reseptörleri üzerinden meydana gelen dilatasyonda, histaminin vazodilatör PG’lerin sentez ve salınımını artırdığı ve insan endotel hücre kültürlerinde histaminin PGI<sub>2</sub> oluşumunu stimüle ettiği gösterilmiştir.<sup>80</sup> Histamin H<sub>2</sub> reseptörlerine bağlanarak mide asit salgısının artmasına yol açmaktadır.<sup>42</sup>

#### **2.3.1.5. Kinin Sistemi**

Kininler 9-12 aminoasit rezidüsü içeren ve belli bir farmakolojik etki kalıbı gösteren peptidlerdir.<sup>80,94</sup> Kininlerin inflamatuvar reaksiyonlarda önemli rolleri vardır.<sup>95,96</sup> Kininler barsak üzerindeki kasıcı etkilerinin yavaş veya hızlı gelişmesine göre bradikininler (BK) ve taşikininler olarak ikiye ayrılırlar.<sup>80</sup>

Kininler vazodilatasyona neden olur, vasküler permeabiliteyi artırır, ağrı ve hiperaljeziye neden olurlar.<sup>97</sup>

BK ve ilgili peptidler ağrı reseptörlerinin duyarlılığını artırarak ve direkt aktive ederek inflamatuvar ağrının oluşmasına neden olurlar.<sup>97,98-101</sup> Sıçanların ayak pençesine formalin enjekte edilerek oluşturulan inflamatuvar ağrı patogenezinde kininlerin rol

oynadığı bilinmektedir.<sup>101</sup> BK'ler PG'lerin sentezini artırarak ve yıkılmasını inhibe ederek kısmen PG'lerin üzerinden etki ederler.<sup>97,102</sup> PG'lerin sentezindeki artışı, esas olarak fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi aktive ederek yaparlar. Ancak bu etki çok yüksek dozlarda meydana geldiğinden biyolojik önemi şüphelidir.<sup>80</sup>

Kininlerin aljezik etkileri dışında vazodilatasyon ve kapiller permeabilite artışı yaptığı da bilinmektedir. Kininler bu etkilerini NO, PGE<sub>2</sub> ve histamin salınımını artırarak gerçekleştirirler.<sup>80,103</sup>

Taşikininler içerisinde Nörokinin A, Nörokinin B ve P maddesi yer alır. Nörokinin A ve B sinir uçlarında bulunur.<sup>104</sup> P maddesinin ise bir nöromediatör ve barsak hormonu olduğu gösterilmiştir.<sup>80</sup> Karragenin ile oluşturulan akut inflamasyonda inflamasyonlu pençedeki P maddesi seviyesinin, karragenin enjeksiyonundan sonra 15 dakika içinde arttığı, 30 dakika içinde pik yaptığı ve ilk 2 saat boyunca yüksek kaldığı tespit edilmiştir. P maddesi sentezini inhibe eden maddelerin karragenin ile oluşturulan inflamasyonu inhibe ettiği gözlenmiştir.<sup>21</sup>

#### **2.3.1.6. NO**

Sentezi ve fizyolojik fonksiyonlarının büyük bir kısmı daha önce anlatılan NO, vasküler düz kası gevşeterek vazodilatasyona neden oluşu, vasküler endotel hücrelerinden BK, P maddesi, histamin, serotonin ve sitokinlere cevap olarak salınmasıyla inflamasyonda rol oynayan moleküller arasında yer almaktadır.<sup>41,105-108</sup>

#### **2.3.1.7. Diğer İnflamatuar Ajanlar**

Buraya kadar bahsedilen mediyatörlerin dışında inflamatuvar reaksiyonun değişik öğelerini etkileyerek inflamasyona katkıda bulunan ve etkileri halen araştırılan başka mediyatörler de vardır. Bunlar arasında vazodilatasyon ve permeabilite artışı yapan, kemotaksis ve fagositoz özelliği olan kompleman faktörleri, kininlerin ve kompleman sisteminin aktivasyonuna neden olan pıhtılaşma sistemi, proinflamatuvar

mediyatörlerin salınımına, lökosit toplanmasına ve trombosit muhtevasının salınmasına yol açan trombosit aktive edici faktör (PAF) sayılabilir.<sup>76,109</sup>

#### **2.4. Non-Steroid Antiinflatuar İlaçlar (NSAİİ)**

İnflatuar hastalıkların tedavisinde inflamatuvar mediyatörlerin ve hücrelerinin sentezlerinin inhibisyonu esas hedeftir.<sup>20,21,99,110</sup> NSAİİ'ler inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır.<sup>111,112</sup>

NSAİİ'ler 4 kategoride sınıflandırılabilir:

1. Selektif NSAİİ'ler ; aspirin
2. Non-selektif NSAİİ'ler; ibuprofen, naproksen, S-ketoprofen, vs.
3. Nisbeten selektif COX-2 inhibitörleri; meloksikam, nimesülid, diklofenak
4. Oldukça selektif COX-2 inhibitörleri; SC-58125, rofekoksib, vs.

Tablo 2.1'de dört grup NSAİİ ve bu ilaçların COX-1/COX-2 IC<sub>50</sub> oranları verilmektedir.<sup>62</sup>

NSAİİ'lerin antiinflatuar etkilerinin yanında analjezik ve antipiretik etkileri de vardır.<sup>113,114</sup> NSAİİ'lerin antiinflatuar etkileri steroidlere göre, analjezik etkileri de narkotik analjeziklere göre zayıftır.<sup>115</sup>

##### **2.4.1. NSAİİ'lerin Etki Mekanizması**

Bu mekanizmalar; COX ve LOX ürünlerinin sentezinin inhibisyonu, toksik oksijen radikallerinin, lizozomal enzimlerin, nötrofil agregasyonunun, adhezyon ve kemotaksisin önlenmesi ve oksidasyonla fosforilasyonun kenetlenmesinin kısmi inhibisyonunu kapsar.<sup>116-121</sup> Son zamanlarda, peroksizom proliferatör aktive edici reseptör (PPAR) aktivasyonunun ve NFκB ve diğer transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonunun NSAİİ'lerin etki mekanizmasında önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür.

**Tablo 2.1.** COX-1 ve COX-2 inhibitörlerinin selektivite oranları

İnhibitör	COX-1/COX-2 IC <sub>50</sub> oranı	
Aspirin	0.01	
S-İndobufen	0.043	Selektif COX-1 inhibitörü
Valeril Salisilat	<0.24	
İbuprofen	0.50	
Naproksen	0.56	
S-Ketoprofen	0.61	
Flurbiprofen	1.00	Non-selektif COX inhibitörü
Sodyum Salisilat	1.03	
6-MNA	1.49	
İndometazin	1.90	
Piroksikam	3.12	
Meloksikam	11.16	
Nimesülid	17.69	Nispeten selektif COX-2 inhibitörü
Diklofenak	18.90	
SC-58125	143.30	
NS-398	168.00	Oldukça selektif COX-2inhibitörü
L-745,337	246.00	
Rofekoksib	410.00	

PPAR'ler nükleer reseptör ailesinin üyeleridir. 3 farklı izoformları bulunmaktadır. Bunlar PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  ve PPAR- $\delta$ 'dır. PPAR- $\alpha$  izoformu yağ asidi metabolizması ile ilgili dokularda exprese edilir. Bu reseptörler yağ asitleri, AA, PG'ler ve LT'lerin oksidatif yıkımını regüle ettikleri için, bir feed-back mekanizma öne sürülmüştür. LTB<sub>4</sub> inflamatuvar yanıtı koordine eden ve artıran güçlü bir kemotaktik ajandır. Bu teoriye göre bir proinflamatuvar eikosanoid olan LTB<sub>4</sub> konsantrasyonunun artması sonucu PPAR- $\alpha$  aktivasyonu vasıtasıyla inaktif bir metabolite katabolize olmaktadır. PPAR- $\gamma$  aktivasyonu ile adiposit farklılaşması, glukoz homeostazı regüle edilir. Bu izoformun ayrıca iNOS ekspresyonu ve COX-2 indüksiyonunu inhibe ettiği

öne sürülmüştür.

PPAR izoformlarının, antiinflamatuvar etkilerini, NFκB sinyal yolunu inhibe ederek gerçekleştirdikleri belirtilmektedir.<sup>75,122-127</sup>

NSAİİ'lerin etki mekanizmasında COX inhibisyonunun yanısıra PPAR-α ve PPAR-γ izoformlarının ve NKκB inhibisyonunun da katkısının olduğuna dair çalışmalar devam etmektedir.<sup>122,126</sup>

Bu amaçla yapılan bir çalışmada iki optik izomere sahip (R, S) bir COX inhibitörü olan flurbiprofen kullanılmıştır. R-flurbiprofen COX enzimini inhibe etmediği için inaktif izomer olarak değerlendirilmekteydi. Fareler üzerinde yapılan deneyde pençe inflamasyonu oluşturulmuş ve iki grup hayvana R- ve S-flurbiprofen verildiğinde, R izomerinin en az S izomeri kadar güçlü antiinflamatuvar etki gösterdiği ispatlanmıştır. Ayrıntılı araştırmalar sonucunda R-flurbiprofenin antiinflamatuvar etkisini NFκB ve aktivatör protein-1 (AP-1) transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu aracılığı ile gerçekleştirdiği anlaşılmıştır.<sup>122</sup>

#### **2.4.2. NSAİİ'lerin Kullanıldığı Yerler**

Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkileri nedeniyle oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Bu ilaç grubu romatoid artrit, ankilozan spondilit, psöriatik artrit, sistemik lupus eritematozus ve diğer bağ dokusu hastalıkları gibi iskelet kas sistemi hastalıkları, posttravmatik ağrılar, baş ağrısı, diş hastalıkları, üst solunum yolu enfeksiyonları, erken dönem kanser ağrısı, ürolojik hastalıklarda inflamasyonu azaltırlar ve semptomatik rahatlama sağlarlar.<sup>128-131</sup> NSAİİ'ler ağrı reseptörlerinin aktivitesini düzenleyen PG'leri inhibe ederek analjezi sağlarlar.<sup>114</sup> Antipiretik etkilerinin mekanizması ise inflamatuvar reaksiyon süresince hipotalamusta artan PG'lerin sentezini inhibe etme aracılığıyla olur.<sup>132</sup>



### 2.4.3. NSAİİ'lerin Yan Etkileri

NSAİİ'ler antiinflamatuvar dozlarda uzun süre kullanılmaları halinde başta GİS, böbrekler, karaciğer olmak üzere pek çok sistemde yan etkilere neden olurlar.<sup>133</sup> NSAİİ'lerin terapötik etkilerinin COX-2 inhibisyonundan, olumsuz yan etkilerinin ise COX-1 inhibisyonundan kaynaklandığı öne sürülmektedir.<sup>24-26,35,37,63,65-66</sup> Bu nedenle son yıllarda COX-2 selektif inhibitörler geliştirilmiş ancak yapılan çalışmalar sonucunda bu ilaçların da yan etkileri bakımından olumsuzlukları ortaya konmuştur.<sup>3, 25,36, 37,134</sup>

Selektif COX-2 inhibitörleri vasküler PGI<sub>2</sub> sentezini azaltarak protrombotik ve antitrombotik eikosenoidler arasındaki dengeyi bozabilmektedirler.<sup>134</sup> NSAİİ'ler böbrekte sıvı-elektrolit dengesinde bozulmalara ve akut renal yetmezliğe yol açabilir.<sup>36</sup>

Uzun süreli NSAİİ kullanımının en yaygın ve en ciddi komplikasyonu GİS ile ilgilidir. Bu ilaçların GİS yan etkileri gizli kan kayıplarından ülser perforasyonuna kadar değişebilir.<sup>135-139</sup> Düzenli olarak NSAİİ kullanan hastaların yaklaşık % 15-30'unda endoskopik gastrik veya duodenal ülserler gözlenmiştir. Artritli hastalarda NSAİİ'lerin GİS'te neden olduğu perforasyon, obstrüksiyon, kanama gibi yan etkilerin yıllık insidansı % 1-1.5 civarındadır.<sup>25</sup>

COX-1'in mide için koruma sağlayan PG'leri oluşturmada önemli rolü olduğuna dair güçlü deneysel kanıtlar bulunmaktadır. COX-2 selektif inhibitörlerin konvansiyonel NSAİİ'lere kıyasla gastrointestinal komplikasyon riskini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir.<sup>15,17,18,25</sup>

NSAİİ'ler karaciğer enzimlerini yükseltme potansiyeline sahiptir. İlaçların karaciğerdeki etkileri hepatoselüler, kolestatik veya ikisi birlikte olabilir.<sup>115,140</sup> Karaciğerde aspirine bağlı yan etki özel bir öneme sahip olup 'Reye' sendromu olarak adlandırılır.<sup>141</sup>

NSAİİ'lerin trombosit fonksiyonları üzerinde oluşturdıkları yan etkilerden birisi trombosit agregasyonunu inhibe ederek koagülasyonu bozmalarıdır.<sup>142</sup> Bu grubun yol açtığı diğer bir hematolojik yan etki agranülositoz ve aplastik anemidir.<sup>143</sup>

Allerjik reaksiyonlara yatkın kişilerde NSAİİ'ler (özellikle aspirin) bronkokonstrüksiyona neden olur. Bu etkisi PG sentezini inhibe ederek substratları LT yoluna kaydırmasına bağlanmaktadır.<sup>142</sup>

NSAİİ'lerin yara iyileşmesi, ürik asit ve glukoz metabolizması üzerine de değişik etkileri vardır.<sup>115</sup> NSAİİ'ler ayrıca fotosensitiviteden toksik epidermal nekroza kadar değişen dermatolojik problemlere neden olabilirler.<sup>144</sup>

#### **2.4.4. Farklı COX Selektivitesine Sahip NSAİİ'lerin Özellikleri**

NSAİİ'ler COX enziminin iki izoformuna karşı gösterdikleri selektivitelere göre 4 grupta sınıflandırılmıştır (Tablo 2.1). Bu bölümde her gruptan yalnızca bir sınıf inhibitör açıklanacaktır.

**Salisilatlar:** En yaygın kullanılan salisilat, asetilsalisilik asit' dir (ASA). Aspirin olarak da bilinen bu inhibitör antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik özelliğe sahiptir.<sup>143</sup> ASA, COX-1'i COX-2'ye göre daha güçlü inhibe eder ve neden olduğu COX inhibisyonu irreversibildir.<sup>145</sup> Artmış vücut sıcaklığını düşürür, ancak normal vücut sıcaklığını etkilemez.<sup>113,115</sup> ASA mide mukozasında epitel dökülmesi, ülser, kanama alanlarının oluşması ve gizli kan kaybına neden olur.<sup>146,147</sup> ASA'nın trombosit agregasyonunu inhibe etmesi ve karaciğerde koagülasyon faktörlerinin sentezini azaltması kanamalara neden olabilir.<sup>148</sup> ASA'ya bağlı bronşiyal astım, vazomotor rinit, ürtiker ve anjiyoödem gibi allerjik yan etkiler ortaya çıkabilir.<sup>142,149</sup> Genel olarak salisilatların nefrotoksik ve hepatotoksik etkileri de görülmüştür.<sup>150,151</sup>

**İndometazin:** İndolasetikasit türevi olan indometazin güçlü bir antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik ilaçtır. İndometazin için redistribüsyon olayı vardır ve bu yüzden yarılanma ömrü iki saat olduğu halde etkisi daha uzun sürer.<sup>115</sup> Çeşitli endojen maddelerin neden olduğu kapiller permeabilite artışını önlediği ve serbest oksijen radikallerini inaktive ettiği gösterilmiştir.<sup>144</sup> Terapötik etkilerinin güçlü olmasının yanında toksisitesi de oldukça fazladır, bu nedenle kullanımı kısıtlı bir ilaçtır.<sup>152,153</sup> Midenin yanısıra özafagus ve duodenumda da ülserasyona, hepatotoksisiteye ve epileptik hastalarda nöbetlere neden olabilir.<sup>8,115</sup>

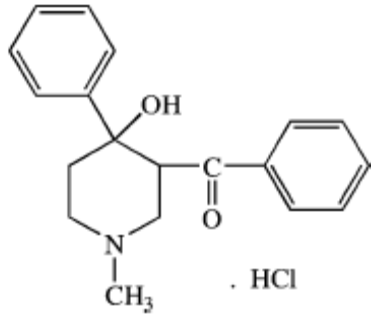
**Nimesülid:** Bir sülfonanilid türevi olan nimesülid nisbeten selektif bir COX-2 inhibitörüdür. Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkiye sahiptir.<sup>154</sup>

Yapılan in vitro çalışmalar nimesülidin COX-2 izoenzimini COX-1'den 5 kat daha güçlü inhibe ettiğini göstermiştir.<sup>155</sup> COX-2 selektivitesi ilacın düşük dozlarında geçerlidir, yüksek dozlarda COX-2 selektivitesi kaybolur ve COX-1'i COX-2'den daha güçlü biçimde inhibe eder.<sup>156</sup> Nimesülid antioksidan etkiye sahip bir ilaçtır.<sup>157</sup> Mide dokusu üzerindeki yan etkisi geleneksel NSAİİ'lere kıyasla oldukça azdır.<sup>154</sup>

**Rofekoksib:** Oldukça selektif bir COX-2 inhibitörüdür. Rofecoxib'in COX-2 selektivitesi COX-1'den 800 kat fazladır.<sup>31</sup> Bu son derece yüksek selektivite oranı nedeniyle böyle selektif COX-2 inhibitörleri inflamasyondan sorumlu izoenzimi (COX-2) tamamen inhibe edip sitoprotektif izoform olan COX-1'i inhibe etmemektedirler. Böylece konvansiyonel NSAİİ'lerin neden olduğu olumsuz yan etkilerin de artık gözlenmeyeceği düşünülmüştür. Bu düşünceyle geliştirilen selektif COX-2 inhibitörleri popülarite kazanmış ve yaygın biçimde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak özellikle son yıllarda selektif COX-2 inhibitörlerinin renal ve trombotik kardiovasküler problemlere yol açtığı, kısırlığa neden olduğunu ileri süren çalışmaların sayısı artmaktadır.

## 2.5. C1 Maddesinin Genel Özellikleri

C1 (3-benzoil-1-metil-4-fenil-4-piperidinol hidroklorür), mannik bazları olarak adlandırılan bileşiklerin bir türevidir. Mannik bazlarının antimikrobial, antikanserojen, analjezik ve antikonvulsan etki gibi çok sayıda biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Mannik bazlarının güçlü antiinflamatuvar etkilerinin olduğu da belirtilmektedir. Antiinflamatuvar aktiviteye sahip olan Mannik bazlarının tümünün kimyasal yapılarında aminometil grubu serbesttir. C1, internal aldol reaksiyonu aracılığı ile bis Mannik bazı B1 ve bis ( $\beta$ -benzoiletıl) metilamin hidroklorürden türevlendirilmiştir. C1, bis Mannik bazı B1'in yapısal izomeridir ve serbest bir aminometil grubuna sahip olmadığı için yukarıda bahsedilen Mannik bazlarından farklıdır (Şekil 2.7). Aminometil grubu halkaya dahildir ve bu nedenle C1'in bir parçasıdır.<sup>158</sup>



**Şekil 2.8.** C1'in (3-benzoil-1-metil-4-fenil-4-piperidinol hidroklorür) yapı formülü

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Deneysel Hayvanları

Bu çalışmada ortalama  $180 \pm 10$  gr ağırlığında 48 adet Albino Wistar cinsi sıçan kullanıldı. Deneysel hayvanları Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden sağlandı. Hayvanlar standart şartlar altında barındırıldı ve beslendi (normal oda sıcaklığı, adi yem ve su). Daha sonra sıçanlar; kontrol, intakt, indometazin, nimesulid, rofecoxib, C1 (50 mg), C1 (100 mg), C1(200 mg) grubu olmak üzere rastgele 8 gruba (n=6) ayrıldı.

#### 3.2. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Çalışma esnasında kullanılan araç cihazlar ve temin edildikleri yerlerle ilgili bilgiler Tablo 3.1’de verilmiştir. Deneysel hayvanlarda kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıktadır (Tablo 3.2).

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan araç ve cihazlara ait bilgiler

Cihazlar	Ait olduğu Firma
Santrifuj (soğutmalı)	Heraeus 4600, Germany
Mikro santrifuj	MSE, Micro Centaur, Sanyo, UK
Homojenizatör	OMNI International
Hassas Teraziler	Sartorius AG Gottingen Tip No: BA 3105, Germany
Distile Su Cihazı	Easypure RF compact ultrapure water system, USA
Magnetik karıştırıcı	Labincol 32, Netherlands
Karıştırıcı	Vortex-Genie, Model K550-EG Massachusetts, USA
Su Banyosu	Nüve BM 101, Nüve Malz. San. Lim ve Tic. AŞ. Ankara
pH Metre	Jenway 3010 pH Meter, UK
Derin Dondurucu	Sanyo Ultra Low, Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Otomatik pipet	Finpipette Lasystems, Finland
Spektrofotometre	Beckman DU 500, USA
ELISA Okuyucu	BIO-TEK Instruments-MQX200R, USA
Plate çalkalayıcı	IRMA Shaker, Labsan, USA

**Tablo 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ait Oldukları Firmalar**

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Firma</b>
C1	*
COX Aktivite Analiz Kiti (760151)	CAYMAN
NADPH, tetrasodyum salt, redükte form (C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>4</sub> )	SIGMA
Etilendiamintetraasetikasit, di sodyum tuzu (Na <sub>2</sub> EDTA)	MERCK
Hidroklorik asid (HCl)	MERCK
Trishidroxymethyl-aminomethan (C <sub>4</sub> M <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	MERCK
Flavin adenin dirükleotid (FAD)	SIGMA
Çinko sülfat (ZnSO <sub>4</sub> )	MERCK
Nitrat redüktaz	SIGMA
Sülfanilamid (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S)	SIGMA
Fosforit asit (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	MERCK
N-1 naftiletilendiamin (C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> .2HCl)	SIGMA
Sodyum nitrit (NaNO <sub>2</sub> )	MERCK
Rofekoksib	SIGMA
İndometazin	SIGMA
Nimesülid	BIOFARMA
Karragenin	SIGMA
Sodyum tiyopental	İ.E. ULAGAY

\* İ. Gül tarafından Atatürk Üniversitesi Eczacılık ve Fen Fakülteleri Laboratuvarlarında sentezi ve spektral analizi gerçekleştirilen sentetik madde

### 3.3. Karragenin İnflamasyon Modeli

Karragenin ile oluşturulan pençe ödemi modelinde, hayvanlara farklı dozlarda verilen C1'in ve indometazin, nimesülid, rofekoksib'in antiinflamatuvar etkileri COX aktivitesi ve NO düzeylerinin ölçümü yoluyla araştırıldı. C1 50, 100, 200 mg kg<sup>-1</sup> dozlarda, indometazin 25 mg kg<sup>-1</sup>, nimesülid 100 mg kg<sup>-1</sup> ve rofekoksib 25 mg kg<sup>-1</sup> dozlarda sıçan gruplarına per oral yoldan verildi.

İntakt grubuna hiçbir uygulama yapılmadı. Kontrol grubundaki hayvanlara aynı hacimde distile su verildi. İlaçlar verildikten 1 saat sonra tüm sıçanların sağ ayak arka pençesine % 1'lik 0.1 ml karragenin enjekte edilerek inflamasyon oluşturuldu. Karragenin enjeksiyonundan 4 saat sonra hayvanlar aşırı doz tiyopental sodyum verilerek (50 mg kg<sup>-1</sup>, ip) öldürüldü. <sup>159</sup>

### 3.4. Analiz Örneklerinin Hazırlanması

İnflamasyonun oluştuğu sağ ayaklar kesilerek doku çıkarıldı. Dokular pH 7.4 0,1 M olan Tris tamponu ile yıkanıp kurulandıktan sonra yaş doku 0,001mg'a duyarlı hassas terazide tartıldı. Gram doku başına 5 ml soğuk tamponda (1 mM EDTA ihtiva eden 0.1 M Tris-HCl tamponu, pH 7.8) homojenize edildi. Daha sonra +4°C'de, 10.000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısmı analiz numunesi olarak kullanılmak üzere alınarak analiz edilecek zamana kadar – 80°C'de derin dondurucuda tutuldu.

### 3.5. COX Aktivite Analizi

COX aktivite analiz kiti COX'un POX aktivitesini ölçmektedir. Reaksiyonun prensibi okside N,N,N,N'-tetrametil-*p*-fenilendiamin (TMPD) oluşumunun 590 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanır.

#### 3.5.1. Reaktiflerin Hazırlanması

*Analiz Tamponu:* 3 mL Analiz tamponu 27 mL HPLC-grade su ile seyreltilerek hazırlandı.

*Hem Reaktifi:* 88 µl hem çözeltisi, önceden hazırlanmış 1.912 mL analiz tamponu ile seyreltildi.

*Araşidonik asit çözeltisi:* 100 µL araşidonik asite 100 µL KOH ilave edilip Vortex'le karıştırıldı. Bu karışım 1.8 mL HPLC-grade su ile seyreltildi.

Bu reaktiflere ilaveten COX standardı, kolorimetrik substrat, DuP-697 (COX-2 inhibitörü), SC-560 (COX-1 inhibitörü) kit içerisinde kullanıma hazır olarak bulunmaktaydı.

#### 3.5.2. Deneyin Yapılışı

96 kuyucuk içeren mikropate'in, kuyucuklarına (well) numune, her bir numune için numune körü, inhibitör ve standart kuyucukları işaretlendi. Numuneler dolaptan

çıkarıldı ve çözüldükten sonra numune körü için her bir numuneden 50 µL alındı ve mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Daha sonra mikrosantrifüjde, 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant numune körü olarak kullanıldı. COX standart kuyucuğuna, numune ve numune körü kuyucuklarına 150 µL analiz tamponu ve 10 µL hem çözeltisi konuldu. Ardından sırası ile kuyucuklara standart, numune ve inaktif numunelerden (numune körü) 10 µL eklendi. İnhibitör kuyucuklarına ise 140 µL analiz tamponu, 10 µL hem çözeltisi, 10 µL numune, 10 µL SC-560 çözeltisi ilave edildi. Plate çalkalayıcıda birkaç saniye çalkalandıktan sonra 5 dakika 25<sup>0</sup>C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüm kuyucuklara önce 20 µL kolorimetrik substrat sonra 20 µL araşidonik asit çözeltisi ilave edildi. Plate birkaç saniye karıştırıcıda karıştırıldı ve 5 dakika 25<sup>0</sup>C'de inkübasyonda tutulduktan sonra 590 nm dalga boyunda absorbanslar okundu. Aşağıda verilen formül yardımı ile total COX aktivitesi ve COX-2, COX-1 aktiviteleri hesaplandı. Her numune için total COX aktivitesi hesaplandıktan sonra, SC-560 ile muamele edilmiş numunelerin COX aktiviteleri aynı formülle hesaplandı. Bu sonuçlar numunelerin COX-2 aktiviteleriydi. Total COX aktivitelerinden COX-2 aktiviteleri çıkarılarak numunelerin COX-1 aktivite sonuçları elde edildi. 25<sup>0</sup>C, 1 dakikada 1 nmol TMPD'yi okside eden enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak alınıp örneklerdeki enzim aktiviteleri gram yaş doku başına enzim ünitesi olarak verildi.

$$\text{Total COX Aktivitesi} = \frac{\Delta A_{590}/5 \text{ min.}}{0.00826\mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.21 \text{ mL (TH)}}{0.01 \text{ mL (NH)}} \div 2^*$$

TH: Total hacim, NH: Numune hacmi, ε: Ekstinksiyon katsayısı (0.00826µM<sup>-1</sup>)

\* PGG<sub>2</sub> 'nin PGH<sub>2</sub> 'ye indirgenmesi için 2 mol TMPD harcanır. Bu yüzden sonuçlar 2'ye bölündü.



### 3.6. NO Tayini

Çok kısa ömürlü bir radikal olan NO hızla  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NO}_3^-$ 'a okside olmaktadır. Bu çalışmada, ortamda bulunan  $\text{NO}_3^-$   $\text{NO}_2^-$ 'ye indirgendikten sonra NO ölçümü Griess metoduna göre gerçekleştirildi. <sup>160</sup>

Doku süpernatantından 100  $\mu\text{L}$  alınarak 400  $\mu\text{L}$  distile su ile seyreltildi. Bu karışıma 50  $\mu\text{mol}$  NADPH'dan 100  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{mol}$  FAD'den 100  $\mu\text{L}$  ve 200 U/L'lik nitrat redüktazdan 20  $\mu\text{L}$  ilave edildi. Elde edilen örnekler 37 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 1/20 oranında 300 gr/L'lik çinko sülfat ( $\text{ZnSO}_4$ ) ilave edilerek deproteinizasyon gerçekleştirildi. Karışım 1000 g'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantdan 100 $\mu\text{L}$  alındı. Süpernatanta 100  $\mu\text{L}$  Griess reaktifi (1 g/L sülfanilamid, 25 g/L fosforik asit ve 0.1 g/L N-1 naftiletildiamin) ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Oluşan pembe renkli kompleksin absorbanansı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Sonuçlar, sodyum nitrit çözeltisinin farklı konsantrasyonlarındaki bir seri dilüsyonu vasıtasıyla önceden hazırlanmış standart eğri yardımı ile hesaplandı. NO sonuçları g doku başına  $\mu\text{mol}$  cinsinden ifade edildi.

### 3.7. İstatistiksel Analizler

Sonuçlar ortalama değer  $\pm$  standart sapma ( $X \pm SD$ ) olarak ifade edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi Kruskal Wallis testi ile, ikili grup karşılaştırmaları ise Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Korelasyon analizi için Spearman-Rank testi kullanıldı. İstatistiksel işlemler için "SPSS for Windows, 11.0" istatistik paket programı kullanıldı ve  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Tablo 4.1'de deney hayvanlarına verilen antiinflamatuvar maddeler, bu maddelerin dozu, hayvan grupları ve bu gruplara ait COX-1, COX-2, NO ortalama değerleri ve standart sapmaları ( $X\pm SD$ ) özetlendi. Tablonun devamında COX aktiviteleri ve NO düzeyleri bakımından aralarında önemli farklılıklar gözlenen hayvan grupları ve bu gruplara ait  $p$  değerleri verildi.

### 4.1. COX-1 ve COX-2 Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Her grup COX-1 ve COX-2 aktiviteleri bakımından biri biriyle karşılaştırıldığında, indometazin ve kontrol grupları hariç diğer tüm grupların COX-1 aktivitelerinin COX-2 aktivitelerinden yüksek olduğu görüldü. Bu farklılık nimesülid, rofekoksib ve C1 ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) gruplarında istatistiki açıdan anlamlı iken ( $p < 0.05$ ) diğer gruplarda anlamsızdı ( $p > 0.05$ ).

### 4.2. COX Aktiviteleri ve NO Düzeyleri Arasındaki İlişkiler

Karragenin pençe ödemi oluşturulmuş sıçan gruplarında ölçülen COX-1 ve COX-2 aktiviteleri ile NO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon yoktu. (Tablo 4.2 ve 4.3)

**Tablo 4.1.** Sıçan Pençe Dokularında Ölçülen COX ve NO Ortalama ve Standart Sapma Değerleri (X±SD)

Gruplar	Doz (mgkg <sup>-1</sup> )	COX-1 (U/g doku)	COX-2 (U/g doku)	NO (µmol/g doku)
Nimesülid (n=6)	100	18.6±6.7	13.8±5.5	91.5±9.6
İndometazin (n=6)	25	6.9±3	8.5±2.5	75.9±5.4
Rofekoksib (n=6)	25	26.4±9.7	13.6±0.8	82.9±4.8
C1 (n=6)	50	15.5±4.6	10.8±3.3	97.8±15.0
C1 (n=6)	100	13.4±4.4	11.6±2.7	108.4±23.4
C1 (n=6)	200	10.3±2	9.1±2.5	96.8±17.6
Kontrol* (n=6)	-	27.5±6.8	30.7±7.4	117.9±26.5
İntakt (n=6)	-	19.4±12.3	6.1±7.2	85.6±9
<b>İstatistiksel Karşılaştırma</b>				
C1(50 mgkg <sup>-1</sup> )- C1(200 mgkg <sup>-1</sup> )		< 0.05	-	-
İntakt-C1 (100 mgkg <sup>-1</sup> )		-	-	< 0.05
Rofekoksib-C1 (200 mgkg <sup>-1</sup> )		< 0.01	< 0.01	-
Rofekoksib-C1 (50 mgkg <sup>-1</sup> )		-	-	< 0.05
Rofekoksib-C1 (100 mgkg <sup>-1</sup> )		< 0.05	-	< 0.01
Rofekoksib-İndometazin		< 0.01	< 0.01	-
İndometazin-C1 (50 mgkg <sup>-1</sup> )		< 0.01	-	<0.01
İndometazin-C1 (100 mgkg <sup>-1</sup> )		< 0.05	-	<0.01
İndometazin-C1 (200 mgkg <sup>-1</sup> )		-	-	< 0.05
Nimesülid-İndometazin		< 0.05	-	<0.01
Kontrol-İntakt		-	<0.01	<0.01
Kontrol-Nimesülid		-	< 0.01	< 0.05
Kontrol-Rofekoksib		-	< 0.01	<0.01
Kontrol-İndometazin		< 0.01	< 0.01	<0.01
Kontrol-C1 (50 mgkg <sup>-1</sup> )		< 0.01	< 0.01	< 0.05
Kontrol-C1 (100 mgkg <sup>-1</sup> )		< 0.01	< 0.01	-
Kontrol-C1 (200 mgkg <sup>-1</sup> )		< 0.01	< 0.01	-

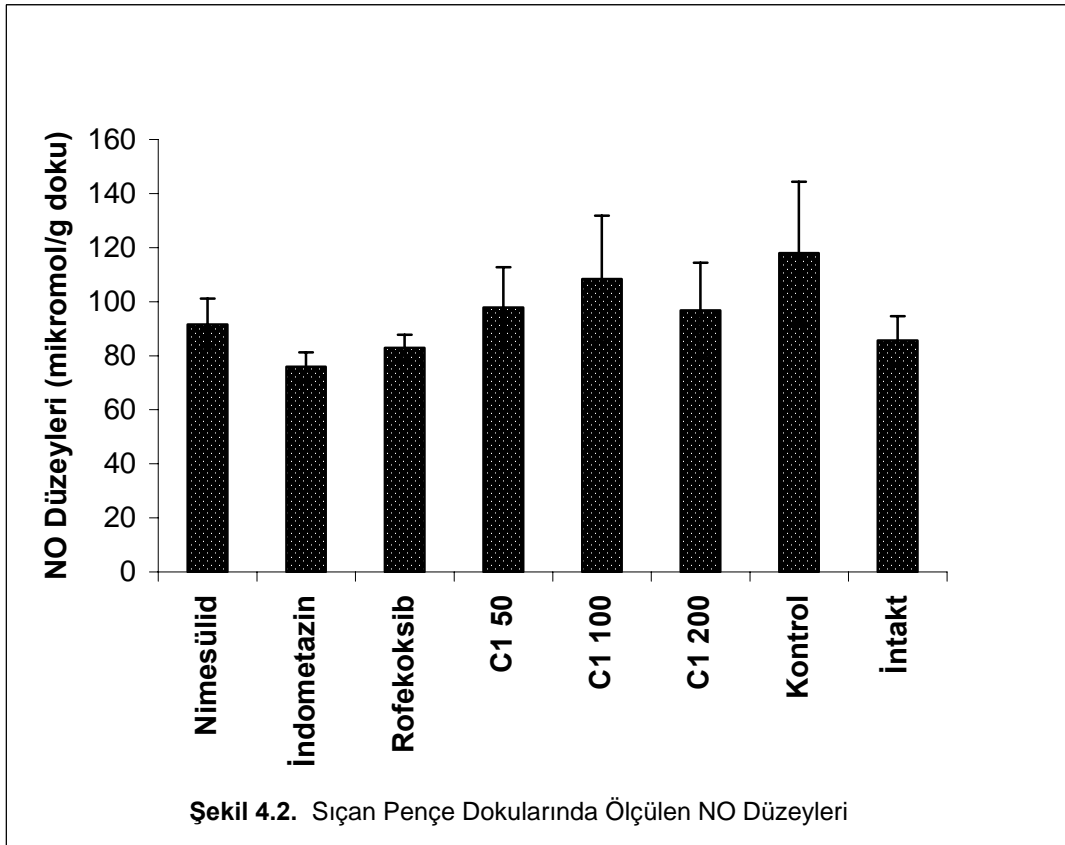
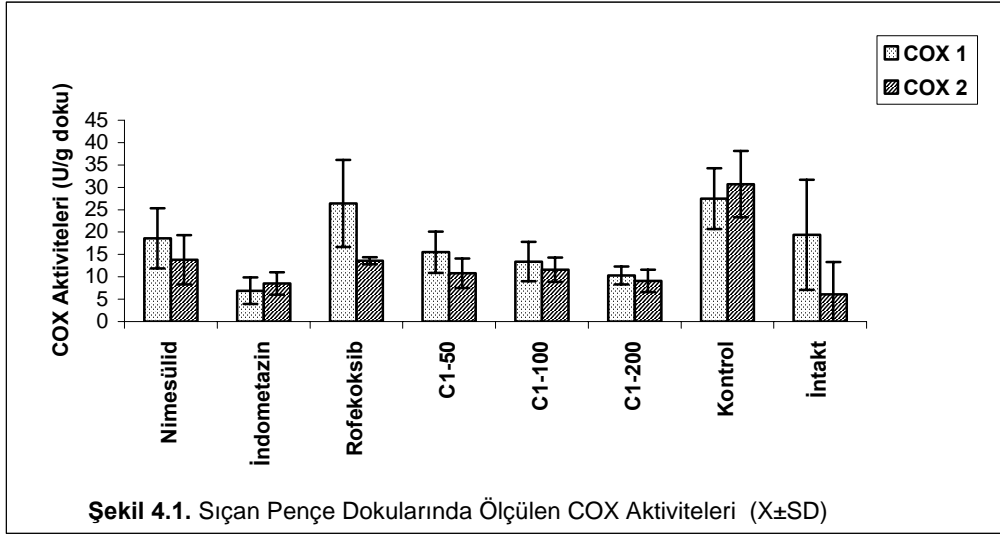
\*Kontrol grubuna eşit hacimlerde distile su verildi.

**Tablo 4.2.** Karragenin Pençe Ödemi Oluşturulmuş Sıçan Gruplarının COX-1 Aktivitelerinin NO ile Korelasyonu

<b>Gruplar</b>	<b><i>r</i></b>	<b><i>p</i></b>
NO-Nimesülid	-0.086	0.872
NO-İndometazin	-0.493	0.321
NO-Rofekoksib	-0.086	0.872
NO-C1 (50 mg kg <sup>-1</sup> )	0.086	0.872
NO-C1 (100 mg kg <sup>-1</sup> )	-0.203	0.700
NO-C1 (200 mg kg <sup>-1</sup> )	-0.714	0.111
NO-Kontrol	0.406	0.425
NO-İntakt	-0.314	0.544

**Tablo 4.3.** Karragenin Pençe Ödemi Oluşturulmuş Sıçan Gruplarının COX-2 Aktivitelerinin NO ile Korelasyonu

<b>Gruplar</b>	<b><i>r</i></b>	<b><i>p</i></b>
NO-Nimesülid	0.429	0.397
NO-İndometazin	0.319	0.538
NO-Rofekoksib	0.406	0.425
NO-C1 (50 mg kg <sup>-1</sup> )	0.143	0.787
NO-C1 (100 mg kg <sup>-1</sup> )	-0.162	0.759
NO-C1 (200 mg kg <sup>-1</sup> )	-0.377	0.461
NO-Kontrol	-0.174	0.742
NO-İntakt	0.600	0.208



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada C1 olarak kodlandırılan antiinflamatuvar etkiye sahip Mannik bazı türevi maddenin, karragenin inflamasyon modeli aracılığı ile inflamasyonun patogenezinde rol oynayan COX enzim aktiviteleri ve NO düzeylerine etkileri incelendi. C1'in etkileri indometazin, nimesülid, rofekoksib gibi farklı selektiviteye sahip NSAİİ' ların COX aktiviteleri ve NO düzeylerine etkileri ile karşılaştırılarak selektivitesi yorumlandı.

İlaçların antiinflamatuvar etkilerini araştırmak için formalin, dekstran, histamin, serotonin, bradikinin ve karrageninle oluşturulan akut inflamasyon modelleri kullanılmaktadır.<sup>75,161</sup> Karragenin, inflamasyon modellerinde kullanılan polisakkarit yapıda bir maddedir.<sup>162</sup> Karrageninle indüklenen inflamasyon reaksiyonu iki fazdan oluşur; bunlar erken ve geç faz olarak adlandırılır.<sup>163</sup> Erken fazın histamin, serotonin ve bradikinin salınımına bağlı olduğu, geç fazın ise genellikle COX ve LOX ürünlerinin oluşumuna bağlı olarak geliştiği gösterilmiştir.<sup>164,165</sup> Ayrıca karragenin inflamasyonunun geç fazında nötrofil infiltrasyonunun yanı sıra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve ·OH gibi nötrofil kaynaklı serbest radikaller de rol oynar.<sup>164</sup>

Bütün bunların yanısıra karragenine bağlı ödemde artmış damar permeabilitesinin düzenlenmesinde NO'nin de görev aldığını gösteren bulgular vardır.<sup>41,166</sup>

Salvemini ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, karragenin inflamasyonu sonucu oluşan pençe ödeminde, nötrofil infiltrasyonunda, nitrit/nitrat (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ve PGE<sub>2</sub> düzeylerinde zamana bağlı artış gözlenmiştir. Söz konusu çalışmada, ayrıca karragenin alımından kısa bir süre sonra sentezlenen NO'un cNOS tarafından

katalizlendiği, geç fazda sentezlenen NO'un ise iNOS katalizörlüğünde sentezlendiği belirtilmiştir.<sup>167</sup>

Tomlinson ve ark. karragenin inflamasyonunda COX aktivitesinin karragenin enjeksiyonundan 2 ila 6 saat sonra maksimum düzeye ulaştığını ve 24. saatte önemli ölçüde azaldığını tesbit etmişlerdir. Aynı çalışmada karragenin inflamasyonunun tüm fazlarında COX-2 izoformunun baskın enzim olduğu tesbit edilmiştir.<sup>168</sup> Salvemini ve ark., karragenin inflamasyonunda 3 ila 6 saatlerde sıçan pençe dokusunda iNOS mRNA ekspresyonunu ve iNOS proteinini tesbit ettiler.<sup>169</sup> Süleyman H ve ark'larının çalışmasında ise karragenin inflamasyon modelinde C1'in antiinflamatuvar etkisinin 4. saatte doruk noktaya ulaştığı gözlenmiştir.<sup>158</sup>

Salvemini, Tomlinson ve Süleyman'ın bu verilerine dayanarak bizde çalışmamızda COX aktivitelerini ve NO düzeylerini karragenin inflamasyonundan 4 saat sonra araştırdık.

C1'in karragenin inflamasyonunu indometazinle eşit düzeyde inhibe ettiği daha önce rapor edilmiştir. Ayrıca C1'in inflamasyonlu bölgede artmış kapiller damar permeabilitesini azalttığı ve kronik inflamasyon modelini anlamlı bir şekilde baskıladığı da gösterilmiştir.<sup>158</sup> Bu çalışmalarda C1' in en düşük antiinflamatuvar etkili dozu 50 mg kg<sup>-1</sup> olmuştur. Yine aynı çalışmada C1'in tüm dozlarda anlamlı antiinflamatuvar etki oluşturduğu ve etki gücünün doz artışına paralellik gösterdiği saptanmıştır. C1, 200 mg kg<sup>-1</sup> dozda karragenin inflamasyonunu % 90.3 olarak baskılarken, indometazin 20 mg kg<sup>-1</sup> dozda bu inflamasyonu % 89.9 oranında inhibe etmiştir. Bu sonuçlar C1'in gravimetrik (kütlesine göre) etki gücünün indometazinden düşük olduğunu göstermektedir. Fakat indometazinin 20-25 mg kg<sup>-1</sup> dozlarının toksik olduğu da göz ardı edilmemelidir. Geniş kapsamlı olmamakla beraber, sıçanlar üzerinde yapılan

araştırmalar C1'in 1000 mg kg<sup>-1</sup>'a kadar varan dozlarının hayvanlarda letal sonuçlara yol açmadığını göstermiştir.<sup>158</sup>

Çalışmamızda C1'in antiinflamatuvar etkili (50, 100 ve 200 mg kg<sup>-1</sup>) dozları kullanıldı ve etki gücü nimesülid, indometazin ve rofekoksible karşılaştırıldı. Deney sonuçları kontrol grubunda inflamasyonlu bölgede her iki enzimin de (COX-1 ve COX-2), intakt sıçan grubuna göre artmış olduğunu gösterdi. Kontrol grubundaki COX-2 enziminin intakt grubuna göre artışı anlamlı bulunurken, COX-1'in artışı anlamsız oldu. Bu bulgular inflamasyon olayında COX-2 enziminin COX-1'e göre daha fazla görev aldığını göstermektedir. Deneyde kullanılan C1 tüm dozlarda inflamasyonlu dokuda COX-1 ve COX-2 enzimini kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı, intakt sıçan grubuna göre ise anlamsız inhibe etmiştir.

C1'in COX-1 zerindeki inhibitör etkisi doza bağımlı olarak gelişmektedir. 50 ve 200 mg kg<sup>-1</sup> lık dozlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlam taşımaktadır. COX-2 enzim inhibisyonu için C1'in dozları arasında istatistiki açıdan bir fark yoktu. Bu sonuçlar C1'in 50 ve 100 mg kg<sup>-1</sup> dozlarda mide dokusu üzerindeki yan etkisinin düşük olabileceğini düşündürmektedir. COX-1 mide asit sekresyonunu azaltarak, mukus tabakasının kalınlığının azalmasını onler, ayrıca bikarbonat sekresyonunu stimule ederek ve mukozal kan akımını iyileştirerek GIS mukozasının korunmasını sağlar.<sup>35,167,168</sup> PGE<sub>2</sub> gastrik epitelyal hücrelerde cAMP yi aktive ederek mukus salgısını artırır.<sup>169</sup>100 mg kg<sup>-1</sup> dozda kullanılan nimesülid COX-1 enzimini C1'e göre daha az inhibe etmiştir, ancak bu farklılık istatistiki olarak anlamlı değildi. Kontrol grubu ile nimesülidin COX-2 inhibisyonu arasındaki anlamlı fark dışında, nimesülid grubu ile kontrol ve intakt sıçan grupları arasındaki COX-1 ve COX-2 inhibisyonları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Nimesülid analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkili, nisbeten COX-2 selektif inhibitörü bir ilaçtır.<sup>154</sup> Araştırmalar



nimesülidin COX-2 yi COX-1'e göre 5 kat daha fazla inhibe ettiğini göstermiştir.<sup>155</sup> Bu çalışmada nimesülid ile C1'in tüm dozları arasında COX enzimlerinin inhibisyonu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. COX-2'nin selektif inhibitörü olan rofekoksib deney dozunda, karrageninle artan COX-1 enzim aktivitesini kontrol grubuna kıyasla hemen hemen değiştirmezen, COX-2 aktivitesini anlamlı biçimde azaltmıştır. 200 mg kg<sup>-1</sup> dozda kullanılan C1'in COX-1 ve COX-2 aktivitelerini, rofekoksibe kıyasla istatistiki olarak anlamlı şekilde daha fazla inhibe ettiği tesbit edildi. C1'in 50 mg kg<sup>-1</sup> dozunda COX inhibisyonu rofekoksibe kıyasla anlamsız olurken, 100 mg kg<sup>-1</sup> dozda yalnızca COX-1 inhibisyonu bakımından anlamlı düşüş gözlemlendi. Rofekoksibin COX-2'yi COX-1'e kıyasla 800 kez daha fazla inhibe ettiği bilinmektedir.<sup>115</sup> Rofekoksib COX enzim fonksiyonlarına dayanarak ilaçların GİS yan etkilerini azaltmak için geliştirilmiş analjezik, antiinflamatuar ve antipiretik etkili bir ilaçtır. Çok sayıda çalışma bu ilaçların (COX-2 selektif inhibitörlerin) mide dokusunda hasar oluşturmadığını ve hastalar tarafından GİS etkileri bakımından daha iyi tolere edildiğini göstermiştir.<sup>58</sup> COX-1'i COX-2'ye göre daha fazla inhibe eden ilaçlar başta indometazin olmak üzere naproksen, ibuprofen ve diğer NSAİİ'ler, gastrik dokuda daha fazla hasara yol açarlar.<sup>170</sup> Çalışmamızda da indometazin COX-1 enzimini en güçlü inhibe eden ilaç olarak bulundu. İndometazin inflamasyonlu bölgede COX-1 enzimini kontrol ve intakt sıçan gruplarına göre anlamlı olarak inhibe etti. İndometazin ile C1 (200 mg kg<sup>-1</sup> dozda) arasında COX-1 ve COX-2 inhibisyonu bakımından önemli bir fark yoktu. C1'in (50 ve 100 mg kg<sup>-1</sup> dozda) COX-1 inhibisyonu indometazine kıyasla anlamlı biçimde daha düşüktü.

NSAİİ'lerin antiinflamatuar etkilerinden COX-2, GİS yan tesirlerinden ise COX-1 enzim inhibisyonunun sorumlu olduğu ileri sürülmektedir.<sup>171</sup> COX-2'nin çeşitli büyüme faktörleri, proinflamatuar sitokinler, endotoksinler, mitojenik ajanlar,

proinflamatuvar ajanlar ve tümör ajanları tarafından indüklenmesi bu enzimin inflamasyon ve kanser gibi patolojik olayların oluşmasında rol aldığını göstermektedir.<sup>33,172,173</sup> Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar COX-2 nin gastrik doku, böbrek, uterus epiteli, insan miyometriyum ve fetal membranlarda, göz ve beyinde fizyolojik rollere sahip olduğunu ifade etmektedir.<sup>174</sup>

PGI<sub>2</sub> ve TxA<sub>2</sub> fizyolojik vasküler homeostazın regülasyonunda rol alan en önemli iki prostanoiddir.<sup>174</sup> Selektif COX-2 inhibitörleri vasküler PGI<sub>2</sub> sentezini azaltarak protrombotik ve antitrombotik eikosanoidler arasındaki dengeyi bozabilmektedirler. COX-1 inhibitörlerinin TxA<sub>2</sub>'yi inhibe edici etkisinin aksine selektif COX-2 inhibitörleri böyle bir antitrombotik özelliğe sahip değildirler. Bu yüzden protrombotik TxA<sub>2</sub>'nin inhibe edilmeyip, antitrombotik PGI<sub>2</sub>'nin inhibisyona maruz kalması trombotik kardiovasküler problemlere yol açabilir.<sup>37,134,175,176</sup> Bu nedenle COX-2 selektif inhibitörlerle tedavi edilen hastaların tedavilerine düşük doz aspirin (antitrombotik) ilave edilmesinin trombotik kardiovasküler problem riskini azaltacağı ifade edilmektedir.<sup>134,175</sup> Rofekoksibin uzun süreli kullanımı sonucunda gözlenen ciddi tromboembolik yan etkilerin artan insidansı nedeniyle bugün Rofekoksib (Vioxx) piyasadan çekilmiştir.<sup>177</sup>

Bugün artık kesin olarak bilinmektedir ki böbrekte hem COX-1 hem de COX-2 izoenzimleri yapısal formda mevcuttur. Bunun sonucunda selektif COX-2 inhibitörlerinin nonselektif NSAİİ'ler ile benzer yan etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Böbrekte en önemli role sahip PG'ler PGE<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub>'dir. PGE<sub>2</sub> Henle kıvrımının çıkan kolunda sodyum reabsorbsiyonunu azaltır. PGI<sub>2</sub>, renin salınımını stimüle eder ve aldosteron düzeyi artırır. Aldosteron distal nefronda sodyum reabsorbsiyonunu ve potasyum sekresyonunu artırır. PGI<sub>2</sub> ayrıca renal kan akımını ve glomerüler filtrasyon hızını (GFR) düzenleyen güçlü bir vazodilatördür.

Renal PG'lerin fonksiyonları ve fizyolojik etkileri incelendiğinde, bunların sentezlerinin inhibisyonunun doğuracağı sonuçlar tahmin edilebilir. PGE<sub>2</sub>'nin inhibisyonu sodyum tutulumuna neden olur ve bunun sonucunda kilo alma, periferal ödem ve nadiren kongestif kalp yetmezliği görülebilir. Sodyum tutulumundan dolayı kan basıncı artabilir. Bu durum özellikle antihipertansif tedavi gören hipertansiyonlu kişilerde sıklıkla gözlenir. PGI<sub>2</sub>'nin inhibisyonu hiperkalemiye yol açabilir veya NSAİİ'lerin renal yan etkileri bakımından risk altındaki hastalarda akut renal yetmezlikle sonuçlanabilir.<sup>36</sup> Selektif COX-2 inhibitörlerinin yan etkileri bakımından bu türde olumsuzluklarına rağmen, gastrointestinal güvenilirliklerine ilaveten bazı kanser türlerinde antitümör, antianjiogenezis, antiproliferatif ve apoptozisi indükleyici etkilere sahip oldukları bildirilmiştir.<sup>178-182</sup>

Deneyimizden edilen sonuçlara göre en selektif COX-2 inhibitörü ilaç rofekoksib olmuştur. Her iki izoenzimi (COX-1 ve COX-2) de eşit düzeyde inhibe eden ilaç indometazin olurken, nimesülid ve C1'in COX-2'ye olan selektivitesi rofekoksible kıyasla daha düşük, indometazine göre daha yüksek bulundu. C1'in COX-2'ye olan selektivitesinin nimesülide göre biraz daha fazla olduğu tesbit edildi.

Deneyimizde COX enzim aktivitelere ilaveten, karrageninle oluşturulan inflamasyonlu dokuda C1'in NO düzeyine etkisini araştırdık. Karrageninin oluşturduğu inflamasyonlu dokuda NO düzeyinin normal doku düzeyinden daha yüksek olduğu görüldü ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. C1 50 mg kg<sup>-1</sup> dozda NO düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaltırken bu farklılık 100 ve 200mg kg<sup>-1</sup> dozlarda istatistiki açıdan anlamlı değildi. C1'in NO düzeyine etkisi doza bağlı olarak değişiklik göstermedi. NO düzeyini en fazla azaltan ilaç indometazindi ve bu düşüş kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemliydi. Rofekoksib ve nimesülid de NO düzeyini kontrol grubuna kıyasla istatistiki açıdan anlamlı azalttı. Yukarıda

belirtildiği gibi karragenine bağlı ödemde artmış damar permeabilitesinin düzenlenmesinde NO'un da görev alabileceği düşünülmektedir.<sup>41,167</sup> İnflamasyonlu bölgede hasara yol açan NO ile ilgili esas madde NO'in  $O_2^-$  radikali ile birleşmesi sonucu oluşan peroksinitrittir. Araştırmalar romatoid artrit ve osteoartrit gibi inflamatuvar olaylarda NO seviyesinin arttığını göstermiştir.<sup>72</sup> NOS lar tarafından üretilen ve salınan NO'in doku hasarına, inflamasyona bağlı ödeme ve hiperaljeziye katkıda bulunduğu düşünülmektedir.<sup>183</sup> Yapılan çalışmalar nitrit, peroksinitrit, hipokloroz asit ve peroksidaz oluşumunu içeren reaksiyonların tirozin nitrasyonunu indükleyebileceğini ve doku hasarına katkı sağlayabileceğini belirtmektedirler. Artan NO'ya ilaveten peroksinitritin de karragenin akut inflamasyonunda üretildiği bildirilmiştir.<sup>184</sup> Bu veriler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz inflamasyona bağlı artmış NO sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Deneyimizde C1, nimesulid, indometazin ve rofekoksib sıçan gruplarında, NO düzeyinin kontrol grubuna göre değişik oranlarda düştüğü görülmüştür. İndometazinin mide mukozası üzerindeki hasar oluşturucu etkisinin NO sentezinin inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. cNOS katalizörlüğünde sentezlenen NO, GİS kanalında mukozal kan akımının, permeabilitenin, gastrik sekresyonun, motilite ve defans mekanizmalarının düzenlenmesi gibi fonksiyonlara sahiptir. iNOS katalizi ile sentezlenen NO ise yüksek konsantrasyonlarda GİS mukozasında zararlı etkiler oluşturmaktadır.<sup>185</sup>

Çalışmamızda, COX-1 ve COX-2 aktiviteleri ile NO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlenmedi. Daha önce de belirtildiği gibi, NOS gibi COX enzimlerinin de konstitütif ve indüklenebilir olmak üzere iki izoformu vardır. COX ve NOS enzimlerine spesifik inhibitörler kullanılarak NO ile PG sentezi arasındaki etkileşimler araştırılmıştır. COX inhibitörlerinin endojen NO sentezine

etkilerinin olmadığı ancak NOS enzimlerinin sentezini baskılayan inhibitörlerin NO sentezinin yanı sıra PG sentezlerini de inhibe ettikleri gözlenmiştir. COX enzimlerinin aktiviteleri için, aktif merkezdeki demirin ferrik ( $Fe^{+3}$ ) formda olması gerekir.  $O_2^-$  ve çeşitli indirgeyiciler  $Fe^{+3}$ 'ü ferröz ( $Fe^{+2}$ ) formuna indirirse, enzimin inaktivasyonuna neden olurlar. PG sentezinin NO tarafından aktivasyonu, COX enzimini inhibe eden  $O_2^-$ 'in NO tarafından ortamdaki çekilmesi ile açıklanmaktadır.

NO tarafından COX enzimlerinin aktivitesinin kontrolünün ortamdaki NO derişimine bağlı olduğu iddia edilmiştir. Fizyolojik derişimlerdeki NO, yukarıdaki mekanizma ile belirtildiği gibi, PG sentezini artırır. Oysa yüksek NO derişimi COX enzimlerini inhibe ederek PG sentezini azaltır. İnhibisyonun nedeni yüksek konsantrasyondaki NO'un enzimdeki  $Fe^{+3}$  ya da  $Fe^{+2}$ 'e bağlanarak nitrozilasyona neden olmasıdır. Yüksek konsantrasyondaki NO'dan kaynaklanan reaktif türler protein ile tepkimeye girerek; örneğin katalitik rolü olan tirozin aminoasidinin nitrasyonuna neden olarak enzimi inhibe edebilirler. Ayrıca NO, AA'den oluşan lipid radikal ürünle oksijenden önce tepkimeye girerek PG sentezini önleyebilir.<sup>16</sup> COX inhibitörlerinin endojen NO sentezine etkilerinin olmadığı ifade edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda COX inhibitörlerinin NO düzeylerini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Bu durum NSAİİ'lerin etki mekanizmasında COX enzim inhibisyonunun dışında transkripsiyonu aktive eden proteinlerin deaktivasyonunun da rol aldığını göstermektedir. Antiinflamatuvar etkiye sahip olan non-steroid ilaçlar I $\kappa$ B- $\alpha$  genini aktive ederek NF $\kappa$ B'nin çekirdeğe translokasyonunu önlerler ve bu yolla iNOS ekspresyonu inhibe edilmiş olur.<sup>16,73,74</sup>

## 6. SONUÇLAR

1. NSAİİ'lerin bugün dünya üzerinde en fazla kullanılan ilaçlar olduğu düşünülürse, bu ilaçların beraberinde getireceği yan etkilerin sonuçları da göz ardı edilmemelidir.
2. Selektif COX 2 inhibitörlerinin olumsuz yan etkileri bakımından nonselektif inhibitörler kadar tartışmalı ilaçlar olduğu artık bilinmektedir. Bu nedenle COX-1/COX 2 inhibisyon oranı optimal düzeyde olan ilaçların tercih edilmesi ve yeni NSAİİ'lerin geliştirilmesi yeni çözümler üretebilir.
3. Çalışmamızda, bir Mannik bazı türevi olan C1'in indometazinden ve nimesülidden daha güçlü rofekoksibden ise daha zayıf COX-2 selektivitesine sahip, antiinflamatuvar etkili bir madde olduğunu söyleyebiliriz.
4. C1'in geniş organ toksisitesi testlerinde güvenilir olduğu ispat edilirse, yüksek dozuna rağmen güvenli NSAİİ'ler arasında avantajlı bir yer alabileceği iddia edilebilir.
5. NSAİİ'lerin etki mekanizmalarında COX inhibisyonunun yanısıra NFκB gibi transkripsiyon faktörlerinin de rolü bilindiğine göre, C1'in antiinflamatuvar etki mekanizmasında COX inhibisyonuna ilaveten bu faktörlerin rolünün ne olduğu hakkında daha ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Sano H, HI T, Maier JAM, et al. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest* 1992;89:97-108.
2. Matyszak MK. Inflammation in the CNS: Balance between immunological privilege and immune responses. *Neurobiology* 1998;56:19-35
3. Pasinetti GM. Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: Experimental approaches and clinical interventions. *J Neurosci Res* 1998;54:1-6.
4. Sirsjo A, Karlsson M, Gidlof A, Rollman O, Torma H. Increased expression of nitric oxide synthase in psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes. *Br J Dermatol* 1996;134:643-648.
5. Bullock BL. (ed). Alterations in gastrointestinal function. In: *Pathophysiology*, New York: Lippincott 1996:781-802.
6. Calin A. Pain and inflammation. *Am J Med* 1984;10:9-16.
7. Suleyman H, Gepdiremen A, Banoglu NZ, Sonmez S. Yeni pirazol türevlerinin antiinflamatuvar etkileri. *Yeni Tıp Dergisi* 1996;13:294-297.
8. Lee J, Katayama S. Inflammation and non-steroidal antiinflammatory drugs. In Smith CM, Reynaud AM (eds). *Textbook of Pharmacology*. New York: Saunders, 1992:401-436.
9. Maling HM, Webster ME, Williams MA, Saul W, Anderson W. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: Antagonist and mechanism of action. *J Pharm Exp Ther* 1974;191:300-310.
10. Portanova PJ, Zhang Y, Anderson GD, et al. Selective neutralization of prostaglandin E<sub>2</sub> blocks inflammation, hyperalgesia and interleukin 6 production

- in vivo. *J Exp Med* 1996;184:883-891.
11. Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the edema of inflammation. *Nature* 1973;246:217-219.
  12. Samuelsson B. Leukotriens: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983;220:568-575.
  13. Rao ST, Currie JL, Shaffer AF, Isakson C. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J Pharm Exp Ther* 1994;269:917-925.
  14. Ferreira SH, Moncada S, Parsons M, Vane JR. The concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenin. *Br J Pharmacol* 1974; 52(1):108-109.
  15. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rew* 1980;32(1):1-46.
  16. Kilinc A, Kilinc K. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonlari ve Toksik Etkileri. *Palme Yayinlik. İstanbul, 2003;106-107.*
  17. Kumar V, Robbins SL. (eds). *Basic Pathology, Ceviri, Cevikbas U. İstanbul Yayınevi, 1995:25-47.*
  18. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60:1346-1352.
  19. McCord JM. Free Radicals and Inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974;185:529-531.
  20. Flower RJ. Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol Rew* 1974;26(1):33-67.
  21. Ogonowski AA, May SW, Moore AB, Barret LT, O'Bryant CL, Pollock SH. Antiinflammatory and analgesic activity of an inhibitor neuropeptide amidation. *J Pharm Exp Ther* 1997;280:846-853.



22. Sen T, Gnosh TK, Nag Chaudhuri AK. Studies on the mechanism of antiinflammatory and antiulcer activity of pluchea indica-probable involvement of 5-lipoxygenase pathway. *Life Sci* 1993;52:737-743.
23. Shylesh BS, Padikkala J. Antioxidant and antiinflammatory activity of emilia sonchifolia. *Fitoterapia* 1999;70:275-278.
24. Bombardier C. An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs. *Am J Cardiol* 2002; 89: 3D-9D.
25. Laine L. Gastrointestinal effects of NSAIDs and Coxibs. *J Pain Symptom Manage* 2003;25:S32-S40.
26. Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 1996;97:2672-2679.
27. Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 13313-13318.
28. Süleyman H, Demircan B, Göçer F, Halici Z, Hacimüftüoğlu A. Role of gland hormones in the mechanism of antiulcer action of nimesulide and ranitidine. *Pol J Pharmacol* 2004;56:799-804.
29. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Third edition, New York, 2000:784-787.
30. Ferraz JG, Sharkey KA, Reuter BK et al. Induction of cyclooxygenase-1 and 2 in rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. *Gastroenterology*, 1997;113:195-204.
31. Kayaalp O. *Rasyonel Tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Ankara: Feryal Basım, 2000:1026.

32. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM et al. Inhibitory effect of caffeic acid on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res* 1999;59:2347-2352.
33. Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P et al. Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells. *Br J Pharmacol* 1994;113:1008-1014.
34. Mitchell JA, Warner TD: Cyclooxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 1999;128:1121-1132.
35. Tegeder I, Neupert W, Guhring H, Geisslinger G. Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:1161-1168.
36. Brater DC. Renal effects of cyclooxygenase-2-selective inhibitors. *J Pain Symptom Manage* 2002;23:S15-S20.
37. Mukherjee D. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. *Biochem Pharmacol* 2002;63: 817-821.
38. Sofia RD, Diamantis W, Ludwig BJ. Pharmacological properties of 2,3-dihydro-9H-isoxazolo(2,3-b)quinazolin-9one (W-2429). *Arzneim Forsch* 1977;27(4):770-782.
39. Kulkarni SK, Mehta AK, Kunchandy J. Antiinflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw edema in rats. *Arch Int Pharmacodyn* 1986;279:324-334.
40. Süleyman H, Gepdiremen A, Göçer F, Sönmez S, Banoğlu ZN, Büyükkuroğlu ME. Antiinflammatory effects of a newly synthesized compound and phenylbutazone in intact and adrenalectomized rats. *New J Med* 1997;14:10-12.

41. Ialenti A, Ianora A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1992;211:177-182.
42. Burcak GC. Hormonlar. In Onat T, Emerk K, Ersoz B, İnsan Biyokimyası, Ankara: Palme Yayıncılık, 2002:439.
43. Katori M, Majima M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* 2000; 49:367-392.
44. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry, twentyfifth edition, McGraw-hill company, USA, 2000:254-258.
45. Kuehl FA, Egan RW. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science* 1980;210:978-984.
46. Fiorucci S, Meli R, Bucci M, Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1433-1438.
47. Garavito RM, Mulichak AM. The structure of mammalian cyclooxygenase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2003; 32: 183-206.
48. Garavito RM, DeWitt DL. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*, 1999; 1441: 278-287.
49. Laudanno OM, Cesolari JA, Esnarriaga J et al. Gastrointestinal damage induced by celecoxib and rofecoxib in rats. *Dig Dis Sci* 2001;46:779-784.
50. Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med* 1999;106:37S-42S.
51. Moran EM. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002; 21: 193-201.

52. Oshima M, Taketo MM. COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr Pharm Des* 2002;8:1021-1034.
53. Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol* 2002;3:166-174.
54. Stack E, DuBois RN. Role of cyclooxygenase inhibitors for the prevention of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2001; 30: 1001-1010.
55. Singh B, Lucci A. Role of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *J Surg Res* 2002; 108:173-179.
56. Makins R, Ballinger A. Gastrointestinal side effects of drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2003; 2: 421-429.
57. Kurumbail RG, Kiefer JR, Marnett LJ. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol*, 2001;11:752-760.
58. Buttgerit F, Burmester GR, Simon LS. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs of and cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med* 2001; 19: 13S-19S.
59. Deviere J. Do selective cyclo-oxygenase inhibitors eliminate the adverse events associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: S29-S33.
60. Stichtenoth DO, Frolich JC. The second generation of COX-2 inhibitors: What advantages do the newest offer? *Drugs* 2003; 63: 33-45.
61. Süleyman H, Akçay F, Altınkaynak K. The effect of nimesulide on the indomethacin-and ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacol Res* 2002; 45: 155-158.
62. Patrignani P: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, COX-2 and colorectal cancer. *Toxicol Let*, 2000;112-113, 493-498.

63. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 1994;90:11693-11697.
64. Mugford PK, Benn SJ, LaMarre J, Conlon P. In vitro effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on cyclooxygenase activity in dogs. *Am J Vet Res* 2000;61:802-810.
65. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR: Nonsteroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclooxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999;96:7563-7568.
66. Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470: M69-M78.
67. Kargman S, Wong E, Greig MG et al. Mechanism of selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in intact cells. *Biochem Pharmacol* 1996;52:1113-1125.
68. Fung HB, Kirschenbaum HL. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors for the treatment of arthritis. *Clin Ther* 1999;21:1131-1157.
69. Marnett LJ. Cyclooxygenase Mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 2000;4: 545-552.
70. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15: 831-845.
71. Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends Pharmacol Sci* 2003;24: 91-95.
72. Stichtenoth DO, Frölich JC. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* 1998;37:246-257.
73. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role

- for NF- $\kappa$ B in the resolution of inflammation. *Nat Med* 2001; 7: 1291-1297.
74. Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX et al. Angiotensin II is associated with activation of NF- $\kappa$ B-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics* 2002;11:21-30.
75. Dunne MW. Inflammation and repair In: Ed. Porth, CM. (ed). *Pathophysiology: Concepts of Altered Health States with Contributors*. Philadelphia: Lippincott, 1990:165-176.
76. Bullock BL. (ed). *Inflammation and repair*. In: *Pathophysiology*, New York: Lippincott, 1996: 276-311.
77. Doherty NS, Beaver TH, Chan KY, Coutant JE, Westrich GL. The role of prostaglandins in the nociceptive response induced by intraperitoneal injection of zymosan in mice. *Br J Pharmacol* 1987;91:39-47.
78. Greenwald RA, Moy WW. Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 455-463.
79. Higgs GA, Moncada S, Salmon JA, Seager K. The source of thromboxane and prostaglandins in experimental inflammation. *Br J Pharmacol* 1983;79:863-868.
80. Kayaalp SO. *Otakoidler: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ankara: Hacettepe-Taş, 2000:1469-1536.
81. Flower RJ, Harvey EA, Kingston WP. Inflammatory effects of prostaglandin D<sub>2</sub> in rat and human skin. *Br J Pharmacol* 1976;56:229-233.
82. Solomon LM, Juhlin L, Kirschenbaum MB. Prostaglandin on cutaneous vasculature. *J Invest Dermatol* 1968;51:280-282.
83. Vane J. Control of the circulation by endothelial mediators. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101:333-345.
84. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin

- endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rew* 1979;30:293-331.
85. Levine JD, Lau W, Kwait G. Leukotriene B<sub>4</sub> produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science* 1984; 225:743-745.
86. Christie MJ, Vaughan CW, Ingram SL. Opioids, NSAIDs and 5-lipoxygenase inhibitors act synergistically in brain via arachidonic acid metabolism. *Inflamm Res* 1999;48:1-4.
87. Wallace JL, McCafferty DM, Carter L, McKnight W, Argentieri D. Tissue selective inhibition of prostaglandin synthesis in rat by tepoxalin: Antiinflammatory without gastropathy. *Gastroenterology* 1993;105:1630-1636.
88. Chan CC, Boyce S, Brideau C et al. Pharmacology of selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: A novel nonsteroidal antiinflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and non human primate stomach. *J Pharm Exp Ther* 1995;274:1531-1537.
89. Chan CC, Boyce S, Brideau C et al. Rofecoxib (Rofecoxib Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharm Exp Ther* 1999;290:551-560.
90. Matsukawa A, Yoshinaga M. Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils. *Inflamm Res* 1998; S137-S144.
91. Dökmeçi İ. İmmun sistem modülatörleri. In: *Farmakoloji Temel Kavramlar*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2000: 559-569.
92. Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 660-664.

93. Babe KS, Serafin WE. Histamine, bradykinin and their antagonists. In Goodman Gilman, A. (ed). The pharmacological basis of therapeutics. New York: Mc-Graw Hill Press, 1996:581-600.
94. Haley JE, Dickenson AH, Schachter M. Electrophysiological evidence for a role of bradykinin in chemical nociception in the rat. *Neurosci Lett* 1989;97:198-202.
95. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: Kallikreins, Kininogens and kininases. *Pharmacol Rew* 1992; 44:1-80.
96. Campos MM, Mata LV, Calixto JB. Expression of B<sub>1</sub> kinin receptors mediating paw edema and formalin-induced nociception. Modulation by glycocorticoids. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:812-819.
97. Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *TINS* 1993;16:99-104.
98. Steranka LR, DeHaas CJ, Vavrek RJ, Stewart JM, Enna SJ, Snyder SH. Antinociceptive effects of bradykinin antagonists. *Eur J Pharmacol* 1987;136: 262-262.
99. Wirth K, Hock FJ, Albus U et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol* 1991;102:774-777.
100. Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1993;110:1227-1231.
101. Correa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol* 1993;110: 193-198.
102. Chapman V, Dickenson AH. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in rat. *Eur J Pharmacol* 1992;219:427-433.
103. Bennett AJ, West GB. Bradykinin and the dextran anaphylactoid reaction in rats.



- Int Archs Allergy Appl Immunol 1980;61:238-240.
104. Iwamoto I, Ueki IF, Borson DB, Nadel JA. Neutral endopeptidase modulates tachykinin-induced increase in vascular permeability in guinea pig skin. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1989;88:288-293.
  105. Lam HHD, Hanley DF, Trapp BD et al. Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase(NOS) after formalin injection in the rat hind paw. *Neurosci Lett* 1996;210:201-204.
  106. Whittle BJR, Belmonte JL, Ress DD. Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance p and endothelin in rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. *Br J Pharmacol* 1989;98:646-652.
  107. Hughes SR, Williams TJ, Brain SD. Evidence that endogenous nitric oxide modulates edema formation induced by substance P. *Eur J Pharmacol* 1990;191:481-484.
  108. Palmer RMJ, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss M. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 1993;193:398-405.
  109. Sirois MG, Plante GE, Braquet P, Sirois P. Role of eicosanoids in PAF-induced increases of the vascular permeability in rat airways. *Br J Pharmacol* 1990;101:896-900.
  110. Shinde UA, Phadke AS, Nair AM, Mungantivar AA, Dikshit VJ, Saraf MN. Membrane stabilizing activity-a-possible mechanism of action for the antiinflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia* 1999;70:251-257.
  111. Chan FKL, Sung JJY, Chung SCS et al. Randomised trial of eradication of helicobacter pylori before nonsteroidal antiinflammatory drug therapy to prevent

- peptic ulcers. *Lancet* 1997;350:975-979.
112. Simon LS, Mills JA. Nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Eng J Med* 1980;302:1237-1243.
113. Loux JJ, DePalma PD, Yankeel SL. Antipyretic testing of aspirin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972;22:672-675.
114. Laird JMA, Herrero JF, Garcia de la Rubia P, Cervero F. Analgesic activity of the novel COX-2 preferring NSAID, meloksikam in mono-arthritic rats: central and peripheral components. *Inflamm Res* 1997;46:203-210.
115. Kayaalp SO. Non steroidal antiinflammatuar ilaclar. In: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji*. Ankara: Hacettepe-Taş, 1998: 1026-1061.
116. Bednarek D, Ciesielska AS, Zdisinska B, Kondracki M, Paduch R, Szerszen MK. The effect of steroidal and non-steroidal antiinflammatory drugs on the cellular immunity of calves with experimentally induced local lung inflammation. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;71:1-15.
117. Brooks PM, Day RO. Nonsteroidal antiinflammatory drugs- differences and similarities. *N Eng J Med* 1991;324:1716-1725.
118. Celotti F, Laufer S. Antiinflammatory drugs:new multi-target compounds to face of an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol Res* 2001;43:419-436.
119. Higgs GA, Eakins KE, Mugridge KG, Moncada S, Vane JR. The effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenin-induced inflammation. *Eur J Pharmacol* 1980;66:81-86.
120. Jacobs JWJ, Bijlsma JWJ. NSAIDs: a critical appraisal. *Neth J Med* 1996;51:198-204.
121. Mahmud T, Rafi SS, Scott DL, Wrigglesworth JM, Bjarnason I. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative

- phosphorylation. *Arthritis Rheum* 1996;39:1998-2003.
122. Tegeder I, Niederberger E, Israr E et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen. *FASEB J* 2001;15:595-597.
  123. Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of I $\kappa$ B $\alpha$  expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activators. *J Biol Chem* 2000;275:36703-36707.
  124. Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:267-273.
  125. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:S41-S45.
  126. Jaradat MS, Wongsud B, Phornchirasilp S et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H<sub>2</sub> synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1587-1595.
  127. Trifilieff A, Bench A, Hanley M, Bayley D, Campbell E, Whittaker P. PPAR- $\alpha$  and  $\gamma$  but not  $\delta$  agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF- $\kappa$ B-independent effect. *Br J Pharmacol* 2003;139:163-171.
  128. Dougados M, Gueguen A, Nakache JP et al. Ankylosing spondylitis: what is the optimum duration of a clinical study? A one year versus a 6 weeks nonsteroidal antiinflammatory drug trial. *Rheumatology* 1999;38:235-244.
  129. Simon LS. COX-2 inhibitors. Are they nonsteroidal anti inflammatory drugs with

- a better safety profile? *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:1011-1025.
130. ten Wolde S, Breedveld FC, Hermans J et al. Randomised placebo-controlled study of stopping second-line drugs in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1996;347:347-352.
  131. Williams HJ, Ward JR, Egger MJ et al. Comparison of naproxen and acetaminophen in a two-year study of treatment of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1993;36:1196-1206.
  132. Vane JR. The mode of action of aspirin and similar compounds. *J Allergy Clin Immunol* 1976;58:691-712.
  133. Karaaslan Y. Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar. *İlaç ve Tedavi Dergisi*, 1993; 6:531-537.
  134. DeMaria AN, Weir MR. Coxibs-Beyond the GI Tract: Renal and Cardiovascular Issues. *J Pain Symptom Manage* 2003;25:S41-S49.
  135. Wallace J. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and gastroenteropathy: The second hundred years. *Gastroenterology* 1997;112:1000-1016.
  136. Collier DSJ, Pain JA. Non-steroidal antiinflammatory drugs and peptic ulcer perforation. *Gut* 1985;26:359-363.
  137. Bjorkman DJ. Current status of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAID) use in the United States: Risk factors and frequency of complications. *Am J Med* 1999;107:3S-8S.
  138. Langman MJS. Ulcer complications and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1988; 84 (Suppl 2A): 15-19.
  139. Ivey KJ. Mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drugs-induced gastric damage. *Am J Med* 1988;84:41-48.
  140. Bort R, Ponsoda X, Jover R, Lechon MJG, Castell JV. Diclofenac toxicity to

- hepatocytes: A role for drug metabolism in cell toxicity. *J Pharm Exp Ther* 1999; 288:65-72.
141. Pinsky PF, Hurwitz ES, Gtunn WJ. Reye's syndrome and aspirin. *JAMA* 1988;260:657-661.
142. Amadio P, Cummings DM, Amadio P. Non steroidal antiinflammatory drugs. *Postgrad M* 1993;93:73-97.
143. IAAAS. Risk of agranulocytosis and aplastic anemia . *JAMA* 1986;256:1749-1757.
144. Insel PA. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In Goodman Gilman A.(ed). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Mc-Graw Hill Press, 1996: 617-658.
145. Frolich JCA. Classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:30-34.
146. Kelly JP, Kaufman DW, Jurgelon JM, Sheehan J, Koff RS, Shapiro S. Risk of aspirin-associated major upper-gastrointestinal bleeding with enteric-coated or buffered product. *Lancet* 1996;348:1413-1416.
147. Golden W. Most antiarthritic agents injure GI mucosa. *JAMA* 1980;243:408.
148. Meade TW, Roderick PJ, Brennan PJ, Wilkes HC, Kelleher CC. Extra-cranial bleeding and other symptoms due to low dose aspirin and low intensity oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 1992;68:1-6.
149. Szczeklik A, Gryglewski RJ, Mysik GC. Participation of prostaglandins in pathogenesis of aspirin-sensitive asthma. *Nauyn-Schmeideberg's Arch of Pharmacol* 1977;297:S99-S101.
150. Ruiz JG, Lowenthal DT. NSAID and nephrotoxicity in the elderly. *Geriatr Nephrol Urol* 1997;7:51-57.

151. Furst DE, Anderson W. Differential effects of diclofenac and aspirin on serum glutamic axaloacetic transaminase elevations in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:804-810.
152. Payan DG, Shearn MA. Nonsteroidal antiinflammatory drugs; nonopioid analgesics; drugs used in gout. In Katzung BG (ed). *Basics and Clinical Pharmacology*. East Norwalk: Appleton-Lange, 1989;431-450.
153. Brandman S, Vandenburg MJ, Jenkins R, Currie WJC. The effect of nonsteroidal antiinflammatory therapy on plasma neuropeptide concentrations in patients with osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 1985;24:46-52.
154. Kataoka H, Horie Y, Koyama R, Nakatsugi S, Furukawa M. Interaction between NSAIDs and steroid in rat stomach: safety of nimesulide as a preferential COX-2 inhibitor in the stomach. *Dig Dis Sci* 2000;45:1366-1375.
155. Cullen L, Kelly L, Connor SO, Fitzgerald DJ. Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:578-582.
156. Halter F, Tarnawski AS, Schmassmann A, Peskar BM. Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing; controversial issues and perspectives. *Gut* 2001;49:443-453.
157. Kotsinas A, Gorgoulis V, Zacharatos P et al. Antioxidant agent nimesulide and beta blocker metoprolol do not exert protective effects against rat mitochondrial DNA alterations in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:651-656.
158. Süleyman H, Gül HI, Asoğlu M. Anti-inflammatory activity of 3-benzoyl-1-methyl-4-phenyl-4-piperidinol hydrochloride. *Pharmacol Res* 2003; 47: 471-475.
159. Süleyman H, Büyükokuroğlu ME. The effects of newly synthesized pyrazole derivatives on formaldehyde-, carrageenan- and dextran-induced acute paw

- edema in rats. *Biol Pharm Bull* 2001;24:1133-1136.
160. Moshage H, Kok B, Hulzenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892-896.
161. Houck JC, Chang CM. Permeability factor contaminating hyaluronidase preparations. *Inflammation* 1979;3:447-451.
162. Baytop T. *Farmakognozi, Baha matbaası*, İstanbul, 1971.
163. Gupta M, Mazumdar UK, Sivakumar T et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of chloroform extract of *Bryonia laciniosa* in experimental animal models. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1342-1344.
164. Marzocco S, Di Paola R, Serraino I et al. Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 484:341-50.
165. Gamache DA, Povlishock JT, Ellis EF. Carrageenan-induced brain inflammation. Characterization of the model. *J Neurosurg* 1986;65:675-685.
166. Nacife VP, Soeiro Mde N, Gomes RN, D'Avila H, Castro-Faria Neto HC, Meirelles Mde N. Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide in vivo. *Cell Struct Funct* 2004;29:27-34.
167. Hawkey CJ. Nonsteroidal antiinflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology*. 2000;119:521-535.
168. Takeuchi K, Kagawa S, Mimaki H, Aoi M, Kawauchi S. COX and NOS isoforms involved in acid-induced duodenal bicarbonate secretion in rats. *Dig Dis Sci* 2002;47:2116-2124.
169. Tani S, Suzuki T, Kano S et al. Mechanisms of gastric mucus secretion from cultured rat gastric epithelial cells induced by carbachol, cholecystokinin

- octapeptide, secretion, and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Biol Pharm Bull* 2002;25:14-18.
170. Laudanno OM, Cesolari JA, Esnarriaga J, San MP, Bedini OA. In vivo selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs and gastrointestinal ulcers in rats. *Dig Dis Sci* 2000;45:1359-1365.
171. Zhao SZ, Reynolds MW, Lejkowith J, Whelton A, Arellano FM. A comparison of renal-related adverse drug reactions between rofecoxib and celecoxib, based on the World Health Organization/Uppsala Monitoring Centre safety database. *Clin Ther* 2001;23:1478-1491.
172. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1994;91:2046-2050.
173. Siegle I, Klein T, Backmann JT, Saal JG, Nusing RM, Fritz P. Expression of cyclooxygenase-2 in human synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1998;41:122-129.
174. Krötz F, Schiele TM, Klauss V, Sohn H. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *J Vasc Res* 2005;42:312-324.
175. Borer JS, Simon LS. Cardiovascular and gastrointestinal effects of COX-2 inhibitors and NSAIDs: achieving a balance. *Arthritis Res Ther* 2005;7:S14-S22.
176. Gaddi A, Cicero AF, Pedro E. Clinical perspectives of antiinflammatory therapy in the elderly: the lipoxygenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Arch Gerontol Geriatr* 2004;38:201-212.
177. Patrignani P, Tacconelli S, Sciulli MG, Capone ML. New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Res Rev* 2005;48:352-359.
178. Shishodia S, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)- $\kappa$ B by suppressing activation of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase in human non-small cell lung



- carcinoma:correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. *Cancer Res* 2004;64:5004-5012.
179. Lianxu C, Hongti J, Changlong Y. NF- $\kappa$ Bp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1 $\beta$ - induced and TNF- $\alpha$ -induced chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:367-376.
180. Altınöz MA, Korkmaz R. NF- $\kappa$ B, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase-inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen- and NSAID-prevention of the ovarian cancer. *Neoplasma* 2004;51:239-247.
181. Callejas NA, Casado M, Bosca L, Martin Sanz P. Absence of nuclear factor  $\kappa$ B inhibition by NSAIDs in hepatocytes. *Hepatology* 2002;35:341-348.
182. Martey CA, Pollock SJ, Turner CK et al. Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287:981-991
183. Omote K, Hazama K, Kawamata T et al. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. *Brain Res* 2001;912:171-175.
184. Marzocco S, Di Paola R, Serraino I et al. Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;484:341-350.
185. Salvemini D, Masini E, Piselli A, Mannaioni PF, Vane JR. Nitric oxide. A regulatory mediator of mast cell reactivity. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17:258-264.