

Nezariyye Saif al-Dinleri Beyn al-İnanün Beyn al-Jasim
dosyası olarak gönderecek ve bu dosya resmi bir ünecektir.
Bu yaz çerçevesinde deki silinen ve şekle göre olarak
Baksek Beyn al-Dinleri Beyn al-İnanün Beyn al-Jasim
BEY-AL-İnanün Beyn al-Dinleri Beyn al-Jasim
sırasında sınırlı olarak "AYFAL-İnanün" ve "AYFAL-İnanün"
programı ile açıklanan bir sorunun çözümü için
BCEV-AL-İnanün Beyn al-Dinleri Beyn al-Jasim

YENİ PLATELET İNHİBİTÖRÜ TUZLARIN İLAÇ ETKİN MADDESİ OLARAK GELİŞTİRİLMESİ VE AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Harun USLU

**İnönü Üniversitesi ve Gazi Üniversitesi
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Ortak Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kadriye BENKLİ
Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erden BANOĞLU**

Doktora Tezi – 2018

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ PLATELET İNHİBİTÖRÜ TUZLARIN
İLAÇ ETKİN MADDESİ OLARAK GELİŞTİRİLMESİ
VE AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Harun USLU

İnönü Üniversitesi ve Gazi Üniversitesi
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Ortak Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Kadriye BENKLİ

Ortak Tez Danışmanı

Prof. Dr. Erden BANOĞLU

Bu araştırma T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Bilim ve Teknoloji Genel Müdürlüğü ile Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. tarafından SAN-TEZ kapsamında 0122.STZ.2013-1 Proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA

2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi ile Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüleri Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Harun USLU'nun "Yeni Platelet İnhibitörü Tuzların İlaç Etkin Maddesi Olarak Geliştirilmesi ve Aktivitelerinin Araştırılması"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/06/2018



Prof. Dr. Kadriye BENKLİ
Bezmialem Üniversitesi
Tez Danışmanı
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Erden BANOĞLU
Gazi Üniversitesi
Ortak Tez Danışmanı
Üye



Doç. Dr. Yusuf ÖZKAY
Anadolu Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Mehmet ALP
Ankara Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Arzu KARAKURT
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/.../2018 tarih ve 2018/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Tiyenopiridin ve Sentez Yöntemleri.....	8
2.1.1. Tiyeno[2,3- <i>b</i>]piridinler.....	12
2.1.1.1. Piridin Türevlerinde Tiyofen Halka Kapatma Yöntemleri.....	12
2.1.1.2. Tiyofen Türevlerinde Piridin Halka Kapanışı.....	14
2.1.2. Tiyeno[3,2- <i>b</i>]piridinler.....	15
2.1.3. Tiyeno[2,3- <i>c</i>]piridinler.....	17
2.1.4. Tiyeno[3,2- <i>c</i>]piridinler.....	20
2.2. Prasugrel'in Araştırılmış Bazı Tuzları ve Bunların Farklı Formları.....	23
2.3. Prasugrel HCl'e Ait Spektral Veriler.....	24
2.3.1. UV/VIS Spektroskopisi.....	24
2.3.2. FT-IR Spektroskopisi.....	25
2.3.3. Raman Spektroskopisi.....	26
2.3.4. ¹ H-NMR Spektroskopisi.....	27
2.3.5. ¹³ C-NMR Spektroskopisi.....	28
2.3.6. Mass Spektroskopisi.....	29
2.3.7. X-Işını Kristalografisi.....	31
2.3.8. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre.....	33
2.3.9. Titrimetrik Tanıma Reaksiyonları.....	33
2.4. Aktif Farmasötik Bileşikler İçin Yeni Katı Form Araştırmalarının Gerekliliği.....	34
2.4.1. Aktif Farmasötik Bileşikler İçin Tuz Seçiminde Trendler.....	35
2.5. Tez Kapsamında Prasugrel Tuzu Oluşturmada Kullanılan Karşit İyonlar.....	37
2.5.1. Trometamol (Trometamin, Trizma, TRIS).....	37
2.5.2. Oksalik Asit.....	38
2.5.3. Maleik Asit.....	39

2.5.4. Sitrik Asit.....	42
2.5.5. <i>trans</i> -1,2-Sikloheksan Dikarboksilik Asit.....	44
2.6. P2Y ₁₂ Reseptörleri ve Tiyenopiridin Türevi Bileşiklerin Antiplatelet Aktiviteleri... ..	45
2.6.1. P2Y ₁₂	46
2.6.2. P2Y ₁₂ Sinyali.....	46
2.6.3. P2Y ₁₂ 'nin Trombosit Fonksiyonundaki Rolü.....	47
2.6.4. P2Y ₁₂ Reseptör Antagonistlerinin Yan Etkilerinin Tolere Edilebilirliği ve Minimizasyonu.....	48
2.6.5. P2Y ₁₂ 'nin Doğuştan Eksikliği.....	49
2.6.6. P2Y ₁₂ 'yi Hedef Alan İlaçlar.....	50
2.6.7. Birinci ve İkinci Jenerasyon Tiyenopiridinler: Tiklopidin ve Klopidoğrel.....	51
2.6.8. P2Y ₁₂ İnhibisyonunun Farmakokinetiği.....	53
2.6.9. P2Y ₁₂ İnhibisyonunun Farmakodinamiği.....	54
2.6.10. P2Y ₁₂ İnhibitörlerinin Diğer Platelet İnhibitörleri İle Kombinasyonu.....	55
3. MATERYAL VE METOT.....	56
3.1. Materyal	56
3.2. Metot.....	57
3.2.1. Analitik Yöntemler.....	57
3.2.1.1. İTK Çalışmaları.....	57
3.2.1.2. Erime Noktalarının Tespiti.....	57
3.2.1.3. FT-IR Spektrumlarının Alınması.....	58
3.2.1.4. ¹ H-NMR Spektrumlarının Alınması.....	58
3.2.1.5. ¹³ C-NMR Spektrumlarının Alınması.....	58
3.2.1.6. Kütle Spektrumlarının Alınması.....	58
3.2.1.7. Elementel Analiz.....	58
3.2.2. Sentez Yöntemi.....	59
3.2.2.1. Prasugrel <i>trans</i> -1,2-Sikloheksan dikarboksilat (1a).....	59
3.2.2.2. Prasugrel Maleat (2a).....	59
3.2.2.3. Prasugrel Sitrata (3a).....	60
3.2.2.4. Prasugrel Trometamol tuzu (4a).....	60
3.2.2.5. Prasugrel Oksalat (5a).....	60
3.2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	62
3.2.3.1. <i>In Vivo-Ex vivo</i> Antiplatelet Aktivite Tayini.....	62

3.2.3.2. <i>In Vitro</i> Antiplatelet Aktivite Tayini.....	65
3.2.3.3. <i>In Vitro</i> Antikanser Aktivite Tayini.....	66
4. BULGULAR.....	69
4.1. Kimyasal Çalışmalar.....	69
4.1.1. Sentezlenen Tuzlar.....	69
4.1.1.1. Prasugrel <i>trans</i> -1,2-Sikloheksan dikarboksilat (1a).....	69
4.1.1.2. Prasugrel Maleat (2a).....	70
4.1.1.3. Prasugrel Sitrat (3a).....	71
4.1.1.4. Prasugrel Trometamol tuzu (4a).....	72
4.1.1.5. Prasugrel Oksalat (5a).....	73
4.2. Antiplatelet Aktivite.....	75
4.2.1. <i>In Vivo-Ex Vivo</i> Antiplatelet Aktivite.....	75
4.2.2. <i>In Vitro</i> Antiplatelet Aktivite.....	78
4.3. Antikanser Aktivite.....	78
4.3.1. <i>In Vitro</i> Antikanser Aktivite.....	78
5. TARTIŞMA.....	79
5.1. Kimyasal Çalışmalar.....	79
5.1.1. Prasugrel Tuzu Sentez Çalışmaları.....	79
5.1.2. Sentezlenen Prasugrel Tuzlarının Yapılarının Aydınlatılması.....	80
5.1.2.1. FT-IR Spektrumları.....	80
5.1.2.2. ¹ H-NMR Spektrumları.....	81
5.1.2.3. ¹³ C-NMR Spektrumları.....	82
5.2. Biyolojik Aktivite.....	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
KAYNAKLAR.....	101
EKLER.....	131
EK1. Etik Kurul Onayı.....	131

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince her türlü imkânı ve desteği esirgemeyen doktora annem, tez danışmanım, Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Kadriye BENKLİ'ye ve ortak tez danışmanım Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Erden BANOĞLU'na,

Tüm akademik hayatım boyunca yanımda yer alan ve katkıda bulunan İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Arzu KARAKURT'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Zeynep ÖZDEMİR'e,

In vivo-ex vivo aktivite çalışmalarını gerçekleştiren İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU'na ve tüm ekibine,

In vitro aktivite ve spektral analiz çalışmalarını gerçekleştiren Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı üyeleri Sayın Arş. Gör. Begüm Nurpelin SAĞLIK'a ve Uzman Sayın Serkan LEVENT'e,

Tezimin her aşamasında değerli katkılarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Yusuf ÖZKAY ve tüm ekibine,

İstatistik çalışmalarını gerçekleştiren İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Metin Fikret GENÇ'e

Doktora tezimle aynı ismi taşıyan 0122.STZ.2013-1 kodlu SAN-TEZ projemizi destekleyen T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Bilim ve Teknoloji Genel Müdürlüğü'ne ve Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.'ne,

İş ve doktora arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Müge ATEŞ'e, Sayın Öğr. Gör. Zeynep Ülkü GÜN'e, Sayın İrem BOZBEY'e ve Sayın Kemal DÜNDAR'a

Çalışmalarım sırasında evini paylaşan Sayın Seher BADAĞBAŞ'a

Hayatımın her anında bana destek olan, benimle beraber oldukları için her türlü fedakârlığı yapmak durumunda kalan, tüm dertlerime ortak olan ve beni asla yalnız bırakmayan canım aileme, tüm sevenlerime, tüm sevdiklerime ve sevgili hayat arkadaşım, eşim Kübra Ögmener USLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Harun USLU

ÖZET

Yeni Platelet İnhibitörü Tuzların İlaç Etkin Maddesi Olarak Geliştirilmesi ve Aktivitelerinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmada ülkemizde üretimi olmayan aktif farmasötik bileşen geliştirilmesi, Üniversite-Sanayi işbirliğinde ilaç adayı olabilecek yeni bir molekülün ortak araştırmalar sonucu ortaya konulması istenmiştir. Bu tez kapsamında Prasugrel'in, çeşitli karşıt iyonlarla reaksiyonu sonucunda 2'si yeni 5 farklı Prasugrel tuzu elde edilmiş, yapıları ve saflıkları spektroskopik yöntemler ve eleman analizi verileriyle kanıtlanmıştır.

Materyal ve Metot: Prasugrel tuzlarının *in vitro* antiplatelet ve antikanser aktiviteleri araştırılmış ve diyabette artan ateroskleroz etkisini anlayabilmek için diyabetik ve nondiyabetik hayvanlarda *in vivo-ex vivo* antiplatelet aktiviteleri karşılaştırılmıştır. *Ex vivo* ölçümlerde Chrono-Log agregometre cihazı ile sitratlı tam kanda antiagregan aktivite belirlenmiştir. Trombosit aktivasyon yolağında yer alan bileşenlerin, serumdan ve tam kandan izole edilen trombositlerde ELISA tekniği ile ölçümü yapılmıştır. *In vitro* antiplatelet ve antikanser çalışmalarında ELISA kitleri kullanılmıştır.

Bulgular: *In vivo-ex vivo* çalışmalarda ADP için **4a** Prasugrel'e göre daha zayıf etkili **2a** ve **3a** daha yüksek etkili, epinefrin için **2a** yüksek etkili bulunmuştur. **1a**, **2a**, **3a** ve **4a** tarafından TxB₂ ve GpIIb/IIIa düzeyleri diyabetik gruplarda anlamlı biçimde inhibe edilmiştir. pAKT ve pERK2 ölçümlerinde, nondiyabetik gruplarda **1a**, **2a**, **3a** ve **4a** tarafından yüksek inhibisyon gerçekleşmiştir. VASP düzeyi için nondiyabetiklerde **2a** anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. *In vitro* antiplatelet ve antikanser çalışmalarında aktivite gözlenememiştir.

Sonuçlar: *In vivo-ex vivo* çalışmalarda **2a** ve **3a** için baz Prasugrel'e yakın veya daha güçlü antiplatelet aktivite gözlenmiştir. *In vitro* antiplatelet ve antikanser çalışmalarında aktivite gözlenememiştir.

Anahtar Sözcükler: Prasugrel, Tuz, Antiplatelet, Diyabet, Antikanser

ABSTRACT

Development of Novel Antiplatelet Salts as Drug Active Ingredients and Investigation of Activities

Aim: The aims of this study were to develop an API substance which is not produced in our country and to put forward the result of joint researches with a new molecule which may be a drug candidate with the cooperation of University-Industry. In this thesis, with various counter ions, 2 new of 5 different Prasugrel salts have been obtained. Prasugrel salts structure and purity have been proved by spectroscopic methods and elemental analysis.

Material and Method: The *in vitro* antiplatelet and anticancer activities of these Prasugrel salts were investigated, and *in vivo-ex vivo* antiplatelet activities were compared in diabetic and nondiabetic animals in order to understand the increased atherothrombotic effect. Antiplatelet activity was determined by *ex vivo* measurements with total blood in citrate by using Chronolog aggregometer. The components of the platelet activation pathway were evaluated by ELISA technique in platelets isolated from serum and whole blood. *In vitro* antiplatelet and anticancer studies were performed using ELISA kits.

Results: According to *in vivo-ex vivo* studies, **4a** was weakly effective for ADP whereas **2a** and **3a** were found to be highly effective. For epinephrine, **2a** was found to be highly effective. TxB₂ and GpIIb/IIIa levels were significantly inhibited in diabetic groups by **1a**, **2a**, **3a** and **4a**. High inhibition by pAKT and pERK2 was observed in nondiabetic groups by **1a**, **2a**, **3a** and **4a**. In nondiabetics, **2a** resulted in a significant decrease in VASP levels. Prasugrel salts, according to *in vitro* studies for antiplatelet and anticancer activities found to be ineffective.

Conclusion: According to *in vivo-ex vivo* studies, antiplatelet activity closer to or greater than base Prasugrel was observed for **2a** and **3a**. Prasugrel salts, according to *in vitro* studies for antiplatelet and anticancer activities found to be ineffective.

Key Words: Prasugrel, Salt, Antiplatelet, Diabetes, Anticancer

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(a)	: Aksiyal
(e)	: Ekvatoryal
[³³P]2MeSADP	: [³³ P]2-metiltiyo-ADP
5-HT₃	: Serotonin Tip 3
ABCB1	: ATP Bağlayıcı Alt Aile B Üyesi 1
AC	: Adenilat Siklaz
ADP	: Adenozin Difosfat
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezlik Sendromu
AKS	: Akut Koroner Sendrom
AKŞ	: Açlık Kan Şekeri
AKT	: Serin/Treonin Kinaz
AMP	: Adenozin Monofosfat
API	: Aktif Farmasötik Bileşen
ASA	: Asetilsalisilik Asit
ATP	: Adenozin Trifosfat
ATR	: Zayıflatılmış Toplam Yansıma
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
CABG	: Koroner Arter Baypas Greftleme
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CH₃COONa	: Sodyum Asetat
CYP	: Sitokrom
Cys	: Sistein
DM	: Şeker Hastalığı
DMEM	: Besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMF	: Dimetilformamid
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
E.d.	: Erime Derecesi
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
eGFR	: Tahmini Glomerüler Filtrasyon Hızı
EP3	: Prostaglandin E reseptör 3

ERK	: Hücre Dışı Sinyal-Düzenlenmiş Kinaz
ESI	: Elektron Sprey İyonizasyon
Et₂NH	: Dietilamin
Et₃N, TEA	: Trietilamin
EtOH	: Etanol
EtONa	: Sodyum Etoksit
GnRH	: Gonadotropin Salınım Hormonu
GpIIb/IIIa	: Glikoprotein IIb/IIIa
G_q, G_i, G₁₂	: Heterotrimerik G Proteinleri
H₂SO₄	: Sülfürik Asit
HBr	: Hidrobromik Asit
hCE1	: İnsan Karboksilesteraz 1
hCE2	: İnsan Karboksilesteraz 2
HCl	: Hidroklorik Asit
HIV	: İnsan Bağışıklık Eksikliği Virüsü
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HRP	: Yabanturpu Peroksidaz
HSCH₂COOEt	: Etil 2-merkptoasetat
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC₅₀	: Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Yarısı
IR	: Kızılötesi
ip	: İntraperitoneal
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
<i>j</i>	: Jiromanyetik sabit
K₂CO₃	: Potasyum Karbonat
KBr	: Potasyum Bromür
KOH	: Potasyum Hidroksit
LC-MS	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
LR	: Lawesson reaktifi
m/z	: Kütle/Yük Oranı
MCF-7	: İnsan Meme Adenokarsinoma Hücre Dizisi
MeOH	: Metanol
MeONa	: Sodyum Metoksit

mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTT, XTT	: Tetrazolium Tuzları
N₂H₄	: Hidrazin
Na₂CO₃	: Sodyum Karbonat
NaBH₄	: Sodyum Borhidrür
NaH	: Sodyum Hidrür
NaNO₂	: Sodyum Nitrit
NCI-60	: Ulusal Kanser Enstitüsü İnsan Tümör Hücre Hattı
NH₄OH	: Amonyum Hidroksit
NIH3T3	: Fare Embriyo Fibroblast Hücre Dizisi
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Magnetik Rezonans
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PDE	: Fosfodiesteraz
PGE₁	: Prostaglandin E ₁
PI3K	: Fosfoinositid-3-kinaz
PKB	: Protein Kinaz B
PKG	: Perkütan Koroner Girişim
POCl₃	: Fosforil Klorür
ppm	: Milyonda Bir
PRP	: Trombositçe Zengin Plazma
PVC	: Polivinil Klorür
Rac1	: Ras-İlişkili C3 Botulinum Toksin Substratı 1
Rap1B	: RAS Onkogene Aile Üyesi
Rf	: Alıkoyma Faktörü
RPMI 1640	: Besiyeri (Roswell Park Memorial Institute Medium)
STZ	: Streptozotosin
TFA	: Trifluoroasetik Asit
THF	: Tetrahidrofur

TMB	: 3,3',5,5'-tetrametil benzidin
TMS	: Tetrametilsilan
Triton X-100	: Polietilen Glikol ters-oktilfenil Eter
Trizma	: Trometamol
TROCADERO	: Ticagrelor İle İlgili Dispneyi Hafifletmek İçin Kafein Denemesi
TxA₂	: Tromboksan A ₂
TxB₂	: Tromboksan B ₂
U.S. FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
UV/VIS	: Ultraviyole/Görünür Spektroskopi
VASP	: Vazodilator Uyarılmış Fosfoprotein
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ZnCl₂	: Çinko Klorür
μM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa No
Şekil 2.1.	Piridin ve tiyofenin 1,4- ve 1,2- katımı ile oluşan ürünler.....	8
Şekil 2.2.	İzomerik tiyenopiridin yapıları.....	9
Şekil 2.3.	Piyasada ilaç olarak bulunan tiyeno[3,2-c]piridin türevi antiplateletler..	20
Şekil 2.4.	Prasugrel genel sentezi.....	21
Şekil 2.5.	Prasugrel HCl (Form B)'nin FT-IR absorpsiyon spektrumu.....	25
Şekil 2.6.	Prasugrel HCl'nin Raman spektrumu.....	26
Şekil 2.7.	Prasugrel HCl'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	27
Şekil 2.8.	Prasugrel HCl'nin ¹³ C-NMR spektrumu.....	28
Şekil 2.9.	Prasugrel'in Kütle spektrumu.....	29
Şekil 2.10.	Prasugrel HCl'in farklı formları için toz X-ışını kırınım modeli.....	32
Şekil 2.11.	Prasugrel HCl Form B'nin DSC analizi.....	33
Şekil 2.12.	P2Y ₁₂ reseptörlerinin trombosit aktivasyonundaki rolü.....	48
Şekil 2.13.	Tiklopidin, Klopidoğrel ve Prasugrel'in biyotransformasyonları.....	53
Şekil 5.1.	Prasugrel tuzu genel sentez yöntemi.....	79
Şekil 5.2.	Prasugrel oksalat FT-IR spektrumu.....	81
Şekil 5.3.	Prasugrel oksalat ¹ H-NMR spektrumu.....	81
Şekil 5.4.	Prasugrel oksalat ¹³ C-NMR spektrumu.....	82
Şekil 5.5.	Tam kan viskozite ölçüm sonuçları (cP).....	84
Şekil 5.6.	PRP-Kollajen optik agregasyon ölçüm sonuçları.....	85
Şekil 5.7.	PRP-ADP optik agregasyon ölçüm sonuçları	86
Şekil 5.8.	PRP-Epinefrin optik agregasyon ölçüm sonuçları.....	87
Şekil 5.9.	Tam kan-Kollajen empedans agregasyon ölçüm sonuçları.....	88
Şekil 5.10.	Tam kan-ADP empedans agregasyon ölçüm sonuçları.....	89
Şekil 5.11.	Tam kan-Epinefrin empedans agregasyon ölçüm sonuçları.....	90
Şekil 5.12.	ELISA-cAMP ölçüm sonuçları.....	91

Şekil 5.13.	ELISA-AKT ölçüm sonuçları.....	92
Şekil 5.14.	ELISA-ERK ölçüm sonuçları.....	93
Şekil 5.15.	ELISA-TxB ₂ ölçüm sonuçları.....	94
Şekil 5.16.	ELISA-GpIIb/IIIa ölçüm sonuçları.....	95
Şekil 5.17.	ELISA-VASP ölçüm sonuçları.....	96



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1.1.	Sentezlenen Prasugrel tuzlarının genel yapıları..... 7
Tablo 2.1.	Tiyenopiridin halkası taşıyan bazı antiplatelet müstahzarlar ve dozları.. 11
Tablo 2.2.	Farklı solvanlarda Prasugrel HCl'in UV/VIS absorbands verileri..... 25
Tablo 2.3.	Prasugrel HCl'in FT-IR absorbands verileri..... 26
Tablo 2.4.	Prasugrel HCl'nin ¹ H-NMR rezonans bant atamaları..... 28
Tablo 2.5.	Prasugrel HCl'nin ¹³ C-NMR rezonans bant atamaları..... 29
Tablo 2.6.	Prasugrel'in kütle parçalanma modeli ve kütle parçaları..... 30
Tablo 2.7.	Kategori I API'larda kullanılan katyonların dağılımı..... 35
Tablo 2.8.	Kategori I API'larda kullanılan anyonların dağılımı..... 36
Tablo 2.9.	Ağır konjenital P2Y ₁₂ defektlerinin tanısı..... 50
Tablo 2.10.	Klopidogrel ve yeni oral P2Y ₁₂ reseptör inhibitörlerinin özellikleri.... 51
Tablo 3.1.	Sentezlenen Prasugrel tuzlarının genel yapıları, yüzde verimleri, erime dereceleri, moleküler kütle ve formülleri..... 61
Tablo 4.1.	Tam kan viskozite ölçüm sonuçları (cP)..... 75
Tablo 4.2.	PRP (%Agr) ve tam kan (Ohm) agregasyon ölçüm sonuçları..... 76
Tablo 4.3.	CAMP, AKT, ERK, TxB ₂ , GpIIb/IIIa ve VASP ELISA ölçüm sonuçları..... 77
Tablo 4.4.	<i>In Vitro</i> antiplatelet aktivite ELISA ölçüm sonuçları..... 78
Tablo 4.5.	<i>In Vitro</i> antikanser aktivite ELISA ölçüm sonuçları..... 78
Tablo 5.1.	Tam kan viskozite ölçüm sonuçları (cP)..... 84
Tablo 5.2.	PRP-Kollajen optik agregasyon ölçüm sonuçları..... 85
Tablo 5.3.	PRP-ADP optik agregasyon ölçüm sonuçları 86
Tablo 5.4.	PRP-Epinefrin optik agregasyon ölçüm sonuçları..... 87
Tablo 5.5.	Tam kan-Kollajen empedans agregasyon ölçüm sonuçları..... 88
Tablo 5.6.	Tam kan-ADP empedans agregasyon ölçüm sonuçları..... 89
Tablo 5.7.	Tam kan-Epinefrin empedans agregasyon ölçüm sonuçları..... 90

Tablo 5.8.	ELISA-cAMP ölçüm sonuçları.....	91
Tablo 5.9.	ELISA-AKT ölçüm sonuçları.....	92
Tablo 5.10.	ELISA-ERK ölçüm sonuçları.....	93
Tablo 5.11.	ELISA-TxB ₂ ölçüm sonuçları.....	94
Tablo 5.12.	ELISA-GpIIb/IIIa ölçüm sonuçları.....	95
Tablo 5.13.	ELISA-VASP ölçüm sonuçları.....	96



1. GİRİŞ

Morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri olan aterotrombotik vasküler hastalıklar, tüm batı ülkelerindeki ölümlerin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır (1). Trombotik rahatsızlıklar kan damarlarındaki kanın pıhtılaşması sebebiyle ortaya çıkarlar. Koroner arterde, akciğerlerde ve beyinde meydana gelen pıhtılaşmalar genelde ölümle sonuçlanır. Bu alandaki ilaç geliştirme süreçleri, antiplatelet ajanlar üzerine odaklı çalışmalar ve antikoagülanlar üzerine odaklı çalışmalar olarak iki kategoriye ayrılmaktadır (2).

Trombositler aterotrombozun patogeneğinde önemli bir rol oynadığından (3) ilaç araştırmaları antiplatelet ilaçların gelişimine odaklanmış durumdadır (4, 5). Trombosit aktivasyonu, akut koroner sendromlar (kararsız anjina, ST segment yükselmez miyokard enfarktüsü ve ST segment yükselmeli miyokard enfarktüsü dahil), iskemik inme, geçici iskemik atak ve semptomatik periferik arter hastalığı gibi vasküler aterotrombotik hastalıkların akut klinik belirtilerinden sorumlu önemli bir patofizyolojik olay olan trombozda kritik bir rol oynamaktadır (6-9). Trombositlerin aktivasyonu, yaralanmadan sonra kan kaybını önleyen koruyucu fizyolojik bir süreç olan hemostazda da önemlidir (6, 7, 9).

Antiplatelet ajanlar, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık ve periferik arter hastalığı da dahil olmak üzere, belgelenmiş aterosklerotik vasküler hastalığı olan hastalar için tedavinin temel taşıdır. En fazla kullanılan antitrombosit ajanlar Asetilsalisilik asit (ASA), Tiklopidin, Klopidoğrel ve Dipiridamol'dur. Gelişmekte olan ajanlar, yakın zamanda pazarlama için onaylanan Prasugrel ve Kanada Sağlık Sertifikası onayını bekleyen Tikagrelor'dur. Vasküler hastalığı olan hastalarda istenmeyen kardiyovasküler olayların önlenmesinde antiplatelet tedavinin faydasını gösteren açık kanıtlar olmasına rağmen, antiplatelet ajanlar klinik uygulamada az kullanılmaktadır (10).

Yaşlılar (75 yaş üstü), akut koroner sendromlu yatan hastaların yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır (11) ve kalp hastalığı, 75 yaş üstü Amerikalılar arasında önde gelen ölüm nedenlerindedir (12). Diabetes mellituslu (DM) hastalarda ölümlerin çoğunluğunu, üstüste trombüs oluşumu ile aterosklerotik lezyon bozulması olarak tanımlanan aterotromboz oluşturmaktadır. Son tahminler, 2000 ve 2050 yılları arasında diyabetin küresel prevalansının %165 artacağını öngörmektedir. Bu nedenle, 2000

yılında doğan nüfusun yaklaşık üçte birinde diyabetik hastalardaki ölümlerin %80'ini oluşturan, ömür süresinde %30'a varan bir azalma ile çoğunlukla da aterotrombozla ilişkili DM gelişecektir (13-15). Bu nedenle, diyabetik hastalarda artmış aterotrombotik hastalığın yükünü azaltmak için küresel çabalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaca yönelik olarak, sıkı glisemik kontrolden çok sayıda farmakolojik ajana kadar çeşitli terapötik seçenekler mevcuttur (16). Bununla birlikte, glisemik kontrolün kullanışlılığı son zamanlarda tartışmalıdır. Örneğin, Diyabette Kardiyovasküler Risk Kontrolü Eylemi, yoğun glisemik kontrol kolunda aşırı mortalite nedeniyle erken durdurulmuştur (17). Bu nedenle farmakolojik müdahalelerin, diyabetli hastalarda aterotrombotik kardiyovasküler olayların azaltılmasında önemli bir araç olarak kalacağı muhtemel görülmektedir. Diyabetik aterotrombozun patofizyolojisini daha iyi anlamak, etkinliği optimize ederek ve toksisiteyi azaltarak ilaç tedavisini iyileştirme vaad etmektedir. Bu bağlamda diyabetik hastalarda artan aterotromboz riski; endotel hasarı, plak neovaskülarizasyonu ve inflamasyonu, matris metaloproteinazların artmış ekspresyonu ve uyarılan trombositleri ve apoptotik hücrelerden doku faktörü taşıyan prokoagülan mikropartiküllerin atılmasını içeren çeşitli faktörlerle ilişkilendirilir (18, 19).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2011 yılı verilerine göre kanser, kardiyovasküler hastalıklarından sonra ikinci en büyük ölüm nedeni iken; IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı) 2014 yılı verileri incelendiğinde kanserin ölüm nedeni istatistiklerinde birinci sırada olduğu görülmektedir (20). Kanser vücudun çeşitli organlarını etkileyen, kontrolsüz yayılım gösteren ve her yıl çok sayıda insanın ölümüne sebep olan bir hastalıktır. Hücrelerin kontrolsüz büyümeleri kanserin değişik organlara ve sistemlere yayılmasına neden olmaktadır. Bu yönü ile kanser, bir grup rahatsızlıklar bütünü olarak düşünülebilir (21).

P2Y₁₂ reseptör inhibisyonunda etkili olan ilaçlar, çeşitli yollarla önemli ölçüde yararlı olabilir. P2Y₁₂ inhibisyonu, hem anjiyogenezde hem de metastaz oluşumunda önemli olan HIF1 α aktivitesini düzenler. HIF1 α , DNA hasarından kurtulma yeteneklerini arttırarak tümör hücrelerinin sitotoksik tedaviye direncini arttırmaktadır. Bu nedenle HIF1 α aktivitesinin P2Y₁₂ yolu ile inhibe edilmesi hem kemoterapide sitotoksik aktiviteyi arttırır hem de tümör yayılmasının önlenmesine yardımcı olur. Tümör büyümesini ve yayılmasını etkileyen diğer bir faktör de trombosit aktivitesidir. Son zamanlardaki araştırmalar, trombosit aktivitesinin tümör büyümesi, damar çoğalması ve metastatik potansiyel için de önemli olduğunu göstermektedir. P2Y₁₂'nin inhibe edilmesinin malign mikro ortamda trombosit aktivitesini azaltacağı ve böylece

yukarıda söz edilen durumların önleneyeği öngörülmektedir. P2Y₁₂ inhibisyonunun potansiyel etkinliğini destekleyen iki bulgu daha vardır. adenozin trifosfat (ATP), P2Y₁₂ reseptörü için bilinen bir antagonisttir. Bu nedenle, ATP'nin antikanser etkisini gösteren hayvan çalışmaları, bu yolda çalışılan ilaçların etkinliği için ümit vericidir. P2Y₁₂'yi etkileyen başka bir ilaç olan Prasugrel kullanımının tümör oluşum riskini azalttığı gösterilmektedir. Sonuç olarak, P2Y₁₂ üzerinde etkili bu ilaçlarla ilgili çalışmaların, bu reseptörü inhibe eden ilaçların potansiyel etkinliği için bir gösterge olduğu söylenebilir (22).

Trombositlerin hemostaz ve trombozdaki rollerinin ötesinde, tümörjenez ve metastaz yapabilecekleri ve bu etkilerin trombositlerin kanser ve stromal hücrelerle doğrudan etkileşimi ile ortaya çıkabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, Klopidoğrel, Tikagrelor ve Prasugrel gibi P2Y₁₂ reseptör antagonistlerinin, antitrombotik ilaç rollerine ek olarak potansiyel antikanser ajanlar olabileceği de düşünülmüş, kanser önleme ve ilerlemede P2Y₁₂ reseptör antagonistlerinin kullanılması alanında daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (23).

Akut koroner sendromun aterotrombotik bir süreç olarak görülmesinden bu yana trombositlerin kardiyovasküler tıpta baskın bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Bu gelişme iskemik kalp hastalığının önlenmesinde ASA, tiyenopiridinler ve GpIIb/IIIa reseptör bloke edicileri gibi antitrombosit ajanların yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır. Yine de yakın tarihli bulgular, tüm hastalara uygun antiplatelet tedavisi verilemediğini düşündürmektedir, çünkü kullanılan ilaca direnç gelişebilmekte veya değişken bir yanıt alınabilmekte, dahası kanama riski artabilmektedir. Klopidoğrel ve Aspirin kombinasyonunun bildirilen etkinlik eksikliği, daha fazla inhibisyonun daha fazla etkili olduğu genel konseptiyle ilgili endişeler ortaya çıkartmıştır. Günümüzde araştırmalar, etkinliği ve güvenilirliği artırmak için daha hızlı, daha güçlü ve daha dengeli platelet inhibisyonu sağlanabilmesi hedeflenerek mevcut antiplatelet tedavisini iyileştirmeye odaklanmaktadır, bu amaçla alternatif ADP-reseptör antagonistleri (Prasugrel, Kangrelor) ve trombin-reseptör antagonistleri geliştirilmektedir. Trombosit yapısı ve tromboz oluşumunun altında yatan mekanizmalara yönelik yeni bilgiler, yeni terapötik hedeflerin keşfedilmesine yol açabilecektir (24).

Trombosit P2Y₁₂ inhibitörleri, trombosit P2Y₁₂ reseptörlerinin arteriyel trombozdaki öneminden dolayı aterotrombozlu hastalar için tedavi stratejisinin merkezi bir bileşeni haline gelmiştir. P2Y₁₂ inhibitörleri, akut koroner sendromlar (AKS) ve perkütan koroner girişim (PKG) uygulanan hastalarda advers kardiyovasküler olay

riskini etkili bir şekilde azaltmaktadır. Buna rağmen, AKS'li hastalar tekrarlayan aterotromboz ve mortalite riski taşımaya devam etmektedir. Aynı zamanda, P2Y₁₂ inhibitörleri kanama riskini arttırmakta, bu da klinik yararlarını sınırlamaktadır. Dolayısıyla, P2Y₁₂ inhibitörlerinin farmakoloji ve tedavi stratejilerinde daha fazla optimizasyona ihtiyaç duyulduğu açıktır. Bu optimizasyonların amacı, hemostaz üzerindeki olumsuz etkileri en aza düşürürken kardiyovasküler faydayı en üst düzeye çıkarmaktır (25). Antiplatelet tedavide en yaygın kullanılan ilaçlar tromboksan sentezi inhibitörü Aspirin, P2Y₁₂ reseptör antagonisti tiyenopiridin türevleri, GpIIb/IIIa antagonistleri ve fosfodiesteraz (PDE) inhibitörleri Dipiridamol ve Silostazol'dur (26, 27).

Birinci nesil tiyenopiridin Tiklopidin, klinik uygulamada kullanılan ilk P2Y₁₂ inhibitörüdür, ancak nötropeniyi de içeren yan etkilerden dolayı kullanımı sınırlıdır (28). Klopidoğrel ve Prasugrel gibi tiyenopiridinler, trombosit reaksiyonunu azaltmak için *in vivo* hepatic sitokrom P450 (CYP) enzimleri ile aktif metabolitlerine dönüştürülmesi gereken ön ilaçlardır. İkinci nesil Klopidoğrel, CYP enzimleri, özellikle de CYP2C19 ile iki metabolik adımda aktif metabolitine dönüştürülür (29). Dolayısıyla, Klopidoğrel'in aktif metabolitinin üretilmesi, CYP2C19'u etkileyen ilaçlar (30) ve CYP2C19 geninin fonksiyon kaybı polimorfizmleri tarafından etkilenmektedir (31). Üçüncü nesil tiyenopiridin Prasugrel, CYP enzimlerine daha az bağımlıdır, bu nedenle trombosit reaktivitesinde daha güçlü ve tutarlı bir azalmaya neden olur (32). Prasugrel plazma esterazlarla ara formuna dönüştürülür ve aktif metabolitini oluşturmak için sadece bir CYP aracılı adım gerektirir ve CYP2C19'a bağımlılık azdır (33, 34) ancak klinik yararı kanıtlanmış olmasına ve CYP genetik polimorfizminden etkilenmemesine rağmen artmış kanama riski taşımaktadır (35).

Klopidoğrel'in aksine Prasugrel, hCE1 ve hCE2 tarafından aktive edilir. Prasugrel, hidroliz sonucunda hidroksitiyofen veren ve 2-okso klopidoğrelin yakın bir analogu olan tiolaktona dönüşen bir asetil ester fonksiyonel grubu taşır. Sülfoksidasyonun ardından hidrolitik halka açılması, aktif sülfenik asit metabolitini verir (36).

Tiyenopiridinlerin aksine, Tikagrelor direkt olarak etkindir ve bu nedenle trombosit reaktivitesini azaltmak için aktif bir metabolite dönüştürme gerektirmez ve böylece öngörülebilir bir farmakokinetik profil elde edilir (37). Bununla birlikte, Tikagrelor CYP3A ile en az 10 farklı aktif metabolite (bazıları Tikagrelor ile eş

değerlidir) dönüştürülür ve bu nedenle CYP3A inhibitörleri ile ilaç-ilaç etkileşimi gösterir (38).

Klopidogrel'in hastaların yaklaşık üçte birinin trombositlerini tatmin edici bir şekilde inhibe etmediği giderek daha açık bir hale gelmiştir (39). Bunun bir nedeni, aktif metabolitine dönüştürülmesi için birden fazla sitokrom P450 (CYP) enzimine gerek duymasıdır. Prasugrel, invaziv olarak yönetilen AKS hastalarında spontan ve ameliyatla ilgili kanamanın artmasına neden olsa da, Klopidogrel ile karşılaştırıldığında advers kardiyovasküler olay riskini azaltmaktadır (40). Tikagrelor, kısa süre önce piyasaya sürülen yeni bir P2Y₁₂ inhibitörüdür, ancak Heptinstall ve arkadaşları tarafından gözden geçirildiğinde AKS'de kullanılan non-tiyenopiridin P2Y₁₂ inhibitörünün yeni bir sınıfını temsil eden bir nükleosid analogu olan (41) Tikagrelor, AKS'li hastalarda istenmeyen kardiyovasküler olay riskini azaltmada Klopidogrel'den daha etkilidir; ancak spontan kanama riskini de arttırmaktadır (42).

2009'da Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (U.S. FDA) tarafından onaylanan yeni bir tiyenopiridin olan P2Y₁₂ reseptör inhibitörü Prasugrel, ADP aracı, güçlü, geri dönüşümsüz ve seçici bir trombosit agregasyonu inhibitörüdür. En çok satan tiyenopiridinler olarak bilinen Tiklopidin ve Klopidogrel ile ADP-reseptör antagonisti olarak bilinen Prasugrel karşılaştırıldığında, trombosit agregasyonunun daha güvenli, daha yüksek, daha hızlı ve tutarlı inhibisyon seviyesine ulaştığı görülmüştür (43, 44). Bu nedenle, Prasugrel'in üretimine ticari ilgi de oldukça fazladır (45).

Prasugrel için Daiichi Sankyo Limited Şirketinin 2012 yıllık raporunda, Effient/Efient'in 2009 yılında piyasaya sürülmesinin hemen ardından satışların beklenenden düşük gerçekleştiği belirtilmiştir. Daha sonra Amerikan ve Avrupa akademik çevrelerinin rehberlerine Effient/Efient kullanılması önerildiği ve 2010 yılında promosyon stratejisinin gözden geçirildiği, tüm bu çabaların sonucu olarak da sağlam bir büyüme yolunda oldukları belirtilmiştir. Özellikle 2011 yılında satışlar büyümüş ve küresel olarak üç ayda bir 100 milyon doları aştığı rapor edilmiştir. Ek endikasyonlar için onay alarak, daha büyük pazarlara girmek mümkün olacağından firma bu alanda da farklı çalışmalar yürütmüştür. Japonya'da, PKG uygulanan akut koroner sendromlu hastalara, elektif PKG hastalarına ve iskemik serebrovasküler hastalık çalışmalarına odaklanan üç farklı Faz III çalışması sürdürülmüş, bunun da ürünün bu pazardaki en önemli ürünlerden biri olmasını sağlayacağı düşünülmüştür (2).

Gelecekte kullanılacak P2Y₁₂ inhibitörleri doğrudan etki edici ve geri dönüşümlü olabilir fakat mevcut tedavilere göre anlamlı derecede daha güçlü olma olasılığı düşüktür (25).

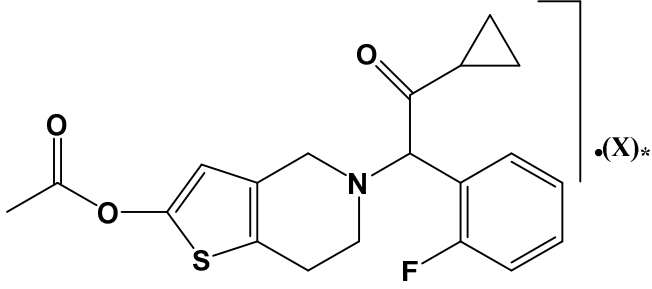
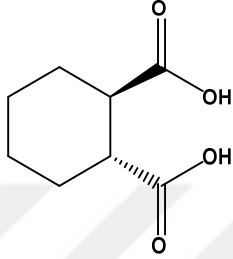
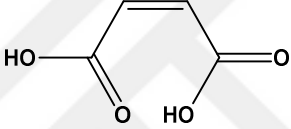
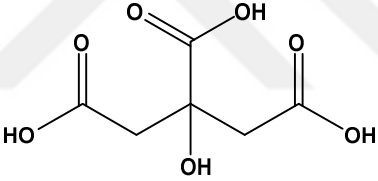
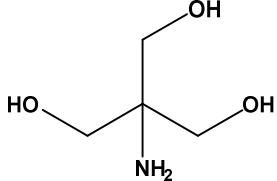
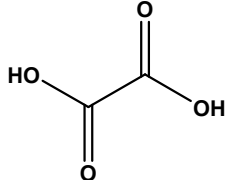
Güney Kore Kyungpook Ulusal Üniversite Hastanesi'nde yapılan bir araştırmada, Klopidoğrel besilat ve Klopidoğrel bisülfat tuzları farmakodinamik ve farmakokinetik açıdan değerlendirilmek üzere çalışılmış fakat her iki tuzun farmakokinetik ve farmakodinamik farklılıklarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve birbirine yakın sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (46).

Farmakofor yapısını değiştirmeden bir aktif farmasötik bileşenin (API) fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini önemli ölçüde geliştirmenin basit yollarından biri, tuzlar veya ko-kristaller gibi yeni katı formlar geliştirmektir. Tuz oluşumunun ilaç endüstrisinde en çok tercih edilen yöntem olduğu ve günümüzde API'ların %50'den fazlasının tuz olarak pazarlandığı rapor edilmiştir (47).

Mevcut katı biçimlerle karşılaştırıldığında, fizikokimyasal özellikleri daha elverişli olması koşuluyla, ilaçların yeni katı biçimleri değerlidir. Birçok ilaç için çözünürlük ve çözünme oranları, *in vivo* olarak ilaç biyoyararlanımını belirleyecek özelliklere sahiptir ve bu nedenle bu özelliklerin manipüle edilmesi büyük önem taşımaktadır (48).

Yukarıdaki literatür verilerinden hareketle bu doktora tezi kapsamında, klinikte kullanılmakta olan Prasugrel'in farklı tuzlarının (**Tablo 1.1.**) sentezlenmesi; bu bileşiklerin antiplatelet aktivitelerinin *in vitro* araştırılması ve diyabette artan ateroskleroza etkisini anlayabilmek için diyabetik ve nondiyabetik hayvanlarda *in vivo-ex vivo* antiplatelet aktivitelerinin karşılaştırılması ayrıca tiyepiridin türevleri için kanıtlanmış antikanser etkileri göz önüne alarak sentezlenen bu tuzlarda *in vitro* antikanser etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

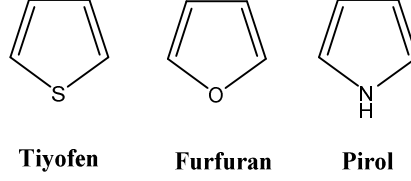
Tablo 1.1. Sentezlenen Prasugrel tuzlarının genel yapıları

Tuz	.X	*
		
(1a)	<p><i>Trans</i>-1,2-sikloheksan dikarboksilik asit</p> 	1
(2a)	<p>Maleik Asit</p> 	1
(3a)	<p>Sitrik Asit</p> 	1
(4a)	<p>Trizma (Trometamol)</p> 	2
(5a)	<p>Oksalik Asit</p> 	1

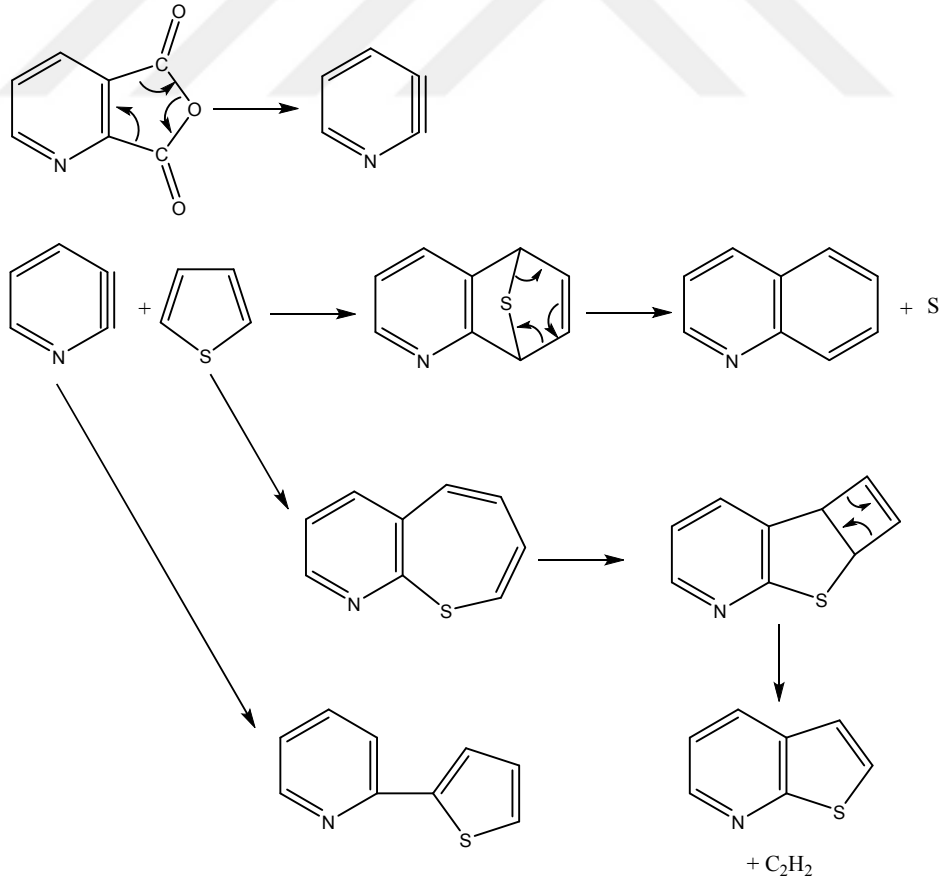
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tiyenopiridin ve Sentez Yöntemleri

Yapısında kükürt bulunan tiyofenin sentezi hakkında ilk bilgiler Victor Meyer tarafından 1885'de bildirilmiştir (49).



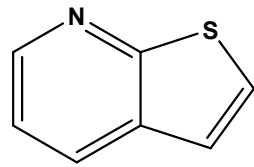
Tiyenopiridin sentezi ile ilgili ilk çalışma 1960'da Zhiryakov ve Abramenko tarafından bildirilmiştir (50). Tiyenopiridin yapısı için arenlerin reaksiyonları ve formasyon mekanizmalarını içeren bir çalışma Fields ve Meyerson tarafından 1968'de bildirilmiş, piridin ve tiyofenin 1,4- ve 1,2- katımı ile oluşan ürünleri kinolin, piridotiyofen ve piridiltiyofen olarak mekanizmalarıyla açıklanmıştır (51).



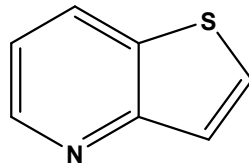
Şekil 2.1. Piridin ve tiyofenin 1,4- ve 1,2- katımı ile oluşan ürünler

Piridin türevleri, öncelikli olarak, çeşitli biyolojik faaliyetlerinden ve yüksek pratikliklerinden dolayı kayda değer ilgi çekmektedirler. Piridin türevleri arasında biyolojik olarak aktif kaynaştırılmış analoglar, monosiklik bileşiklere göre çok daha büyük ilgi görmektedir. Niteliksel olarak, farklı pozisyonlarda farklı farmakofor grupların olasılıkları üzerinden kaynaşmış moleküllerin yeni özellikleri ve daha geniş bir alıcı yelpazesiyile tepki verme yetenekleri burada belirleyici bir rol oynamaktadır. Buna ek olarak, bu faktörler, heterosiklik fragmanların farklı konumlarında anülasyona bağlı varyasyonlar ile takviye edilmiştir. Son yıllarda tiyenopiridin türevlerinin kimyasal ve farmakolojik etkilerinin farklı yönleri üzerine yayın sayısındaki büyük artışa tanık olunmuştur. Patent de dahil olmak üzere literatürde 1997-2007 yılları arasında 800'den fazla yayın ortaya çıkmıştır. Farklı anülasyon modları ile karakterize edilen altı izomerik tiyenopiridin yapısı bilinmektedir: (52).

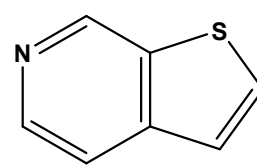
- a) Tiyeno[2,3-*b*]piridin,
- b) Tiyeno[3,2-*b*]piridin,
- c) Tiyeno[2,3-*c*]piridin,
- d) Tiyeno[3,2-*c*]piridin,
- e) Tiyeno[3,4-*b*]piridin,
- f) Tiyeno[3,4-*c*]piridin.



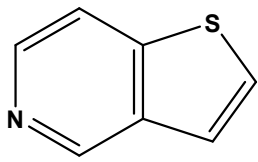
Tiyeno[2,3-*b*]piridin



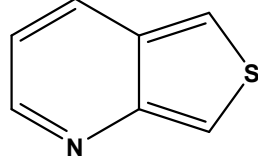
Tiyeno[3,2-*b*]piridin



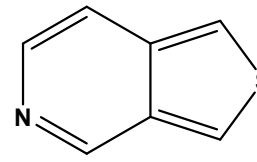
Tiyeno[2,3-*c*]piridin



Tiyeno[3,2-*c*]piridin



Tiyeno[3,4-*b*]piridin



Tiyeno[3,4-*c*]piridin

Şekil 2.2. İzomerik tiyenopiridin yapıları

1913'te ilk defa Steinkopf ve Lutzkendorf tarafından tiyeno[2,3-*b*]piridinlerden bahsedilmiştir (53, 54). Bu bileşik sınıfının biyolojik aktivite spektrumu geniştir ve antienflamatuar, antidepresan, antibakteriyel, antimikrobiyal, antiviral ve antitümör aktiviteleri içerir. Buna ek olarak, geniş spektrumlu 5-lipoksigenaz inhibitörleri, gonadotropin salınım hormonu antagonistleri (GnRH), vazodilatörler, asetilkolin esteraz inhibitörleri, aterosklerotik koroner arter anevrizmasının inhibitörleri, adenozin reseptörlerinin alosterik modülatörleri, telomeraz inhibitörleri, antikonvülsan ve mutajenler, dismnezi tedavisinde kullanılan ilaçlar, endotel aktivasyon modülatörleri, prolaktin sekresyon önleyicileri, romatizma ve otoimmün hastalıkların tedavisi için ajanlar, beyin hücrelerinden belirgin glutamat salınım inhibitörleri, antipsikotik ilaçlar, Alzheimer hastalığının tedavisi için ajanlar, geniş bir etki yelpazesine sahip protein tirozin fosfataz inhibitörleri ve γ -aminobütirik asit reseptörlerinin ligandlarını oluştururlar (52).

Pratik olarak faydalı özelliklere sahip çok fonksiyonlu karbo- ve heterosikliklerin sentezi için yeni kemo-, regio-, stereo- ve enantioselektif prosedürlerin geliştirilmesi, sentetik organik kimyanın temel bir problemidir. Piridin türevleri ve bunun kaynaşmış analogları özel ilgi alanındadır. Son on yılda yayınlanan izomerik tiyenopiridinlerin sentezi, kimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteleri hakkındaki verilerin analizi, bu heteroaromatik sistemlerin kimyasının büyük ilgi gördüğünü ikna edici bir şekilde göstermektedir. Biyolojik açıdan aktif bileşiklerin yeni gruplarının tasarımı ve tiyenopiridin türevlerinin yüksek farmakolojik potansiyeli, azot heterosikliklerinin kimyasının sentetik kapsamını genişleten yeni yaratıcı yöntemlerin, geleneksel olmayan yaklaşımların ve bölgesel ve stereoselektif prosedürlerin aşamalı olarak geliştirilmesini teşvik etmiştir (52). Tiyenopiridin halkası taşıyan bazı antiplatelet aktiviteli müstahzarlar, dozları ile birlikte **Tablo 2.1.**'de verilmiştir (55).

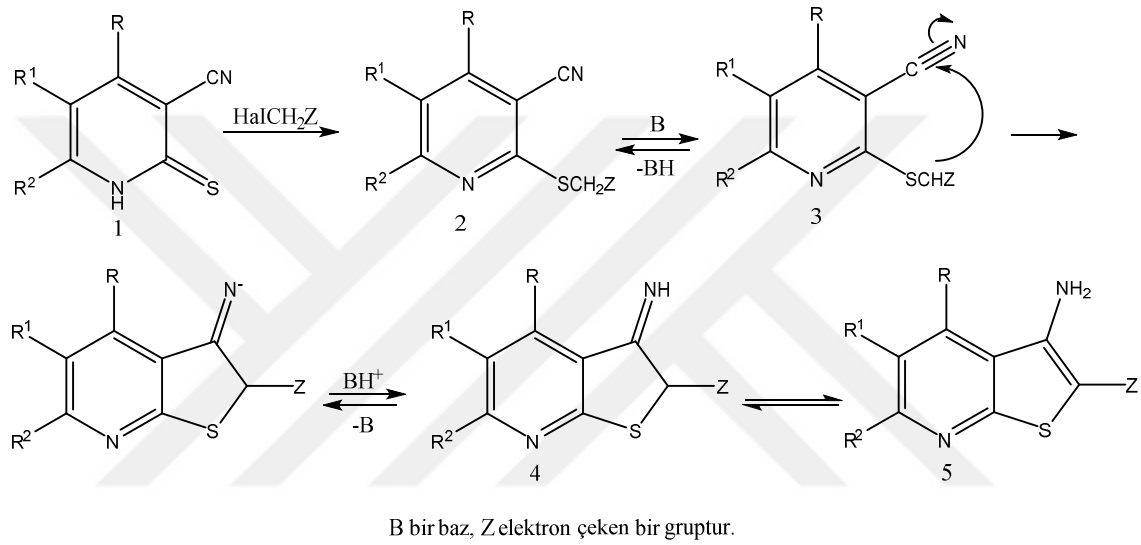
Tablo 2.1. Tiyenopiridin halkası taşıyan bazı antiplatelet müstahzarlar ve dozları

Tiklopidin HCl			
Aclotin 250mg	Ifapidin 250mg	Ticlo 250mg	Ticlopidin STADA
Anghostan 250mg	Klodin 250mg	Ticlodix 250mg	250mg Ticlopidin-CT
Antigreg 250mg	Neo-Fulvigal 250mg	Ticlodone 250mg	250mg
Aplaket 250mg	Opteron 250mg	Ticlopidin 250	Ticlopidin-neuraxpharm
Clox 250mg	Plaquetal 250mg	Heumann	250mg
Etfariol 250mg	Ruxicolan 250mg	Ticlopidin AL 250	Ticlopidin-ratiopharm
Fluilast 250mg	Tagren 250mg	Ticlopidin HEXAL	Tiklid
Flupid 250mg	Thrombodine 250mg	250mg	Tiklid 250mg
Fluxidin 250mg	Ticlid 250mg	Ticlopidin Sandoz	Tiklyd 250mg
Iclopid 250mg		250mg	
Klopidogrel	Klopidogrel HCl	Klopidogrel H₂SO₄	Klopidogrel bezilat
Aclop 75mg	Clopidogrel HCl	Clopidogrel Basics	ClogrelHEXAL 75mg
Clopidogrel AAA	HEXAL 75mg	75mg	Clopidogrel AbZ 75mg
75mg	Clopidogrel HCl-1A	Clopidogrel Amneal	Clopidogrel Acino 75mg
Clopidogrel Dr.	Pharma 75mg	75mg	Clopidogrel AL 75mg
Reddy's 75mg	Clopidogrel Sandoz	Clopidogrel Aurobindo	Clopidogrel Denk 75mg
Clopigamma 75mg	75mg	75mg	Clopidogrel Hennig
Pidogul 75mg	Clopidogrel TAD	Clopidogrel axcount	75mg
	75mg	75mg	Clopidogrel Heumann
	Clopidogrel Teva	Clopidogrel HEXAL	75mg
	Pharma 75mg	plus ASS	Clopidogrel Heumann
		Clopidogrel Teva 75mg	75mg Heunet
		Clopidrax 75mg	Clopidogrel STADA
		Clopivas 75mg	75mg
		ComPlavin	Clopidogrel-Actavis
		75mg/100mg	75mg
		DuoPlavin 75mg/100mg	Clopidogrel-biomo 75mg
		Iscover 300mg	Clopidogrel-CT 75mg
		Iscover 75mg	Clopidogrel-Hormosan
		Mistro 75mg	75mg
		Pidogul A	Clopidogrel-Q 75mg
		Pigrel 75mg	Clopidolut 75mg
		Plavix 25mg	Cloroden 75mg
		Plavix 300mg	Grepid 75mg
		Plavix 75mg	Synetra 75mg
		Zyllt 75mg	Vatoud 75mg
Prasugrel HCl			
		Effient 10mg	
		Effient 5mg	
		Efient 10mg	
		Efient 3.75mg	
		Efient 5mg	

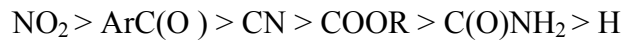
2.1.1. Tiyeno[2,3-*b*]piridinler

2.1.1.1. Piridin Türevlerinde Tiyofen Halka Kapatma Yöntemleri

Bu yöntemler arasında, süstitüe 2-alkiltiyyo-3-siyanopiridinlerin Thorpe izomerizasyonu büyük önem taşımaktadır. Bu yaklaşımın avantajları, başlangıçtaki 3-siyanopiridin-2(*1H*)-tiyonların kolayca erişilebilir olması, çeşitli 3-siyanopiridin-2(*1H*)-tiyonların kullanılabilmesi, tek basamaklı prosedürlerinin kullanılabilmesi ve ürünlerin yüksek verimle hazırlanmasıdır (52). Bu dönüşümün mekanizması aşağıdaki şema ile temsil edilebilir (56, 57):

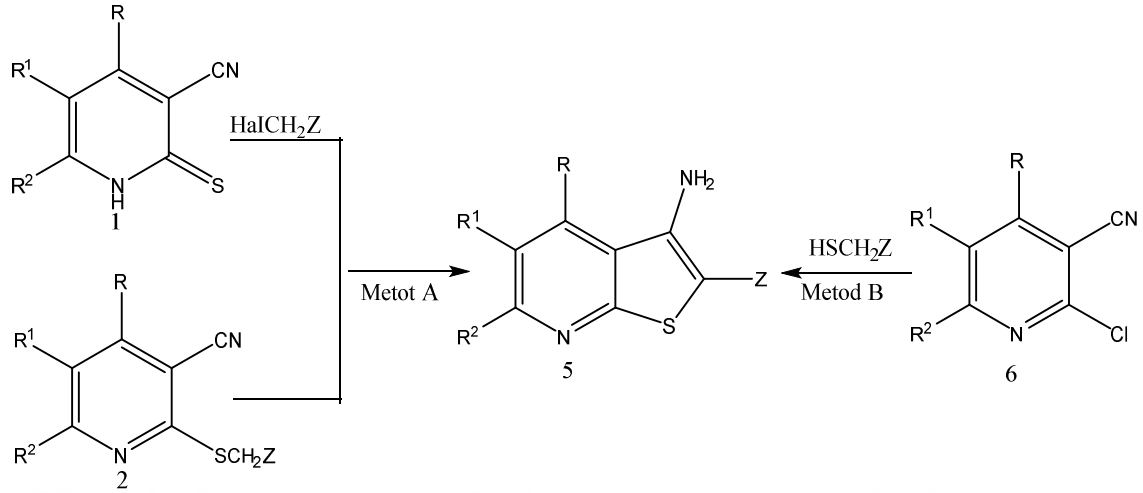


Kararlılık ve karbanyonun konsantrasyonundan sorumlu olan Z ikamesinin elektron çekici etkisi siklizasyon oranını belirleyen ana faktördür. Tautomerik denge $4 \rightleftharpoons 5$ tamamen amino formu ile değiştirilmiştir. Elektron geri çeken süstitüentlerin (Z) aktivitesinin aşağıdaki seride arttığı ampirik olarak tespit edilmiştir (56):



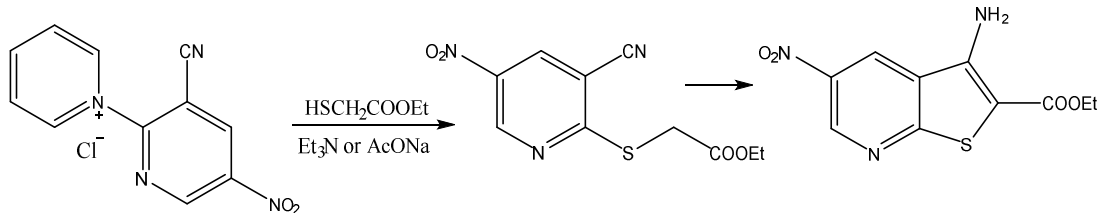
Reaksiyon koşulları çeşitlilik gösterebilir. Genel olarak siklizasyon için bir bazik ortam gereklidir, asit katalizi nadiren kullanılır. %10 sulu KOH/DMF çözeltisinin yanı sıra KOH/EtOH, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{EtOH}$, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{DMF}$ ve EtONa/EtOH seçilecek reaktiflerdir (52). $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{EtOH}$ (58), $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{Aseton}$ (59), %7 MeONa/EtOH (60), KOH/EtOH/ H_2O (61), AcONa/susuz EtOH (62), $\text{Et}_3\text{N}/\text{Dioksan}$ (63), $\text{Et}_3\text{N}/\text{EtOH}$ (63-65) ve $\text{Et}_3\text{N}/\text{DMSO}$ (66) sistemleri daha nadiren kullanılır. Tiyenopiridinler oda sıcaklığında kolaylıkla sentezlenebilir, ancak bazı reaksiyonlarda ısıtma gerekebilir. Başlangıç reaktiflerinin

yapılarına dayanarak, Thorpe reaksiyonu ile tiyofen halkasının oluşumunun birkaç ana yolu önerilebilir (52).

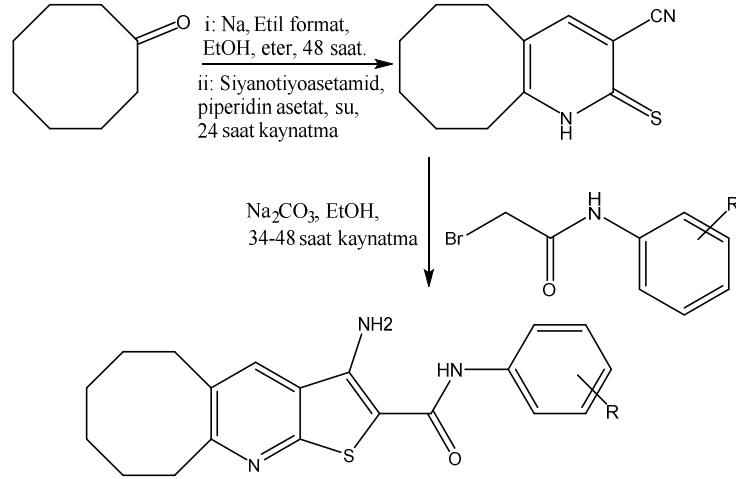


Bir kural olarak, tiyepiridinler, alkol içerisinde (EtOH-MeOH) bir klorür ve bir tioglikolik asit türevi (genellikle bir ester) karışımının, uzun bir süre bir bazın aşırısıyla geri çeviren soğutucu altında tutulması ile hazırlanır (52). Bu reaksiyonda MeONa (58), EtONa (67, 68), Na₂CO₃ (69, 70), veya K₂CO₃ (71) kullanılabilir. Isıtma süresinde bir azalma (71), oda sıcaklığında AcONa-EtOH (72) sisteminin kullanılması veya KOH (73) veya K₂CO₃ (74) varlığında DMF'de reaksiyon, EtONa'nın sıcak etanol içerisinde siklizasyona tabi tuttuğu ara ürünlerin izole edilmesine izin verir. Bununla birlikte, bazı durumlarda spontan siklizasyon, yumuşak koşullar (K₂CO₃, DMF, 60°C) altında bile gerçekleşir ve sülfid ara ürünü gözlenmez (75).

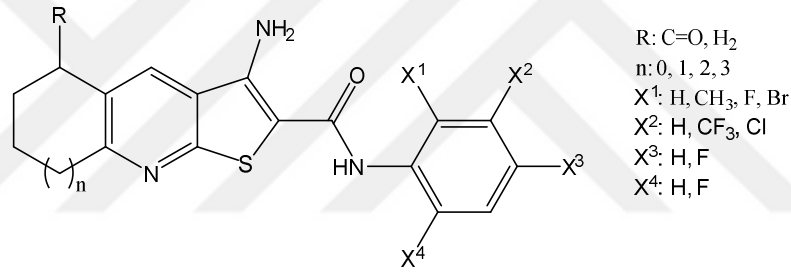
Bu reaksiyonlara, klor atomu haricindeki nükleofiller dahil olabilir. Örneğin, 1,2-bipiridinyum klorür, etil tioglikolat ile sülfid oluşturmak üzere piridinim elimine edilmesiyle reaksiyon verir ve bu tiyepiridin izomerizasyonu Thorpe reaksiyon koşulları altında gerçekleşir (76).



Binsaleh ve ark. yakın zamanda altı adet tiyeno[2,3-*b*]piridin ile *in vitro* antiplatelet aktivite değerlendirmesi yapmış, tüm türevler hem trombosit aktivasyonu hem de agregasyon üzerinde etki göstermiştir ve ASA ile sinerjik etki oluşturmuştur. Bazı bileşikler, Klopidoğrel ile karşılaştırıldığında daha fazla aktivite gösterdiği vurgulanmıştır (77).



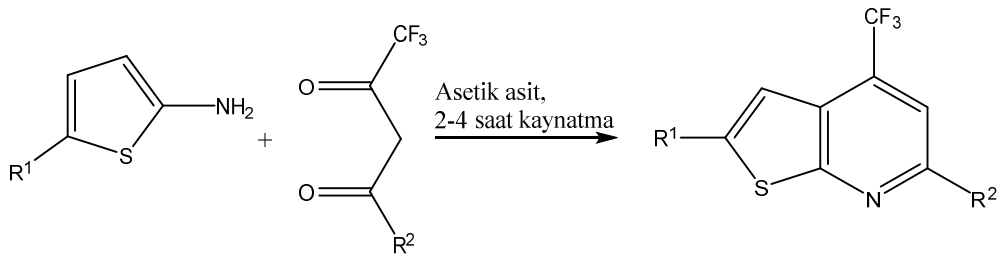
Zafar ve ark. tarafından yakın zamanda yapılan çalışmada tiyeno[2,3-*b*]piridin türevlerinin kanser ile ilişkili hedefler üzerinde aktiviteleri araştırılmış, tiyenopiridinlerin çeşitli hedeflerin proliferatif inhibitörleri/modülatörleri olduğu vurgulanmış ve buradaki asıl amacın tiyenopiridinlerin uygun ilaç adayları haline gelmesi için ilgili hedefe karşı spesifik olması gerekliliği belirtilmiştir (78).



2.1.1.2. Tiyofen Türevlerinde Piridin Halka Kapanışı

Piridin halkasının yapımı için yaygın olarak kullanılan yöntemler 2-aminotiyofen türevlerine dayandırılmaktadır (79).

Volochnyuk ve ark. sentez yöntemi 3 numaralı konumdan süstitüe edilmemiş 2-aminotiyofenlere veya bunların prekürsörlerine dayanmaktadır. Örneğin, 2-aminotiyofenlerin ve dikarbonil bileşiklerinin ısıtılması, bunların konum seçimli siklokondensasyonuna yol açarak 4-triflorometiltiyeno[2,3-*b*]piridinleri oluşturur (80).

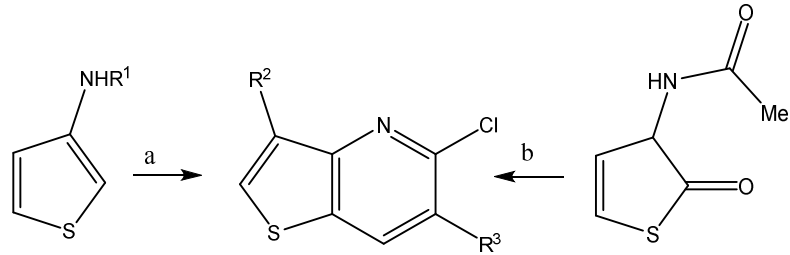


2.1.2. Tiyeno[3,2-*b*]piridinler

Tiyeno[3,2-*b*]piridin türevlerinin hazırlanma yöntemleri ve özellikleri, literatürde [2,3-*b*] izomeri ile karşılaştırıldığında daha az iyi tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda tiyeno[3,2-*b*]piridin sentezi ve kaynaşmış analoglarının kit verileri bulunmaktadır (57, 79, 81-84). [3,2-*b*] izomerinin transformasyonları derlemelerde daha ayrıntılı olarak tartışılmıştır (85).

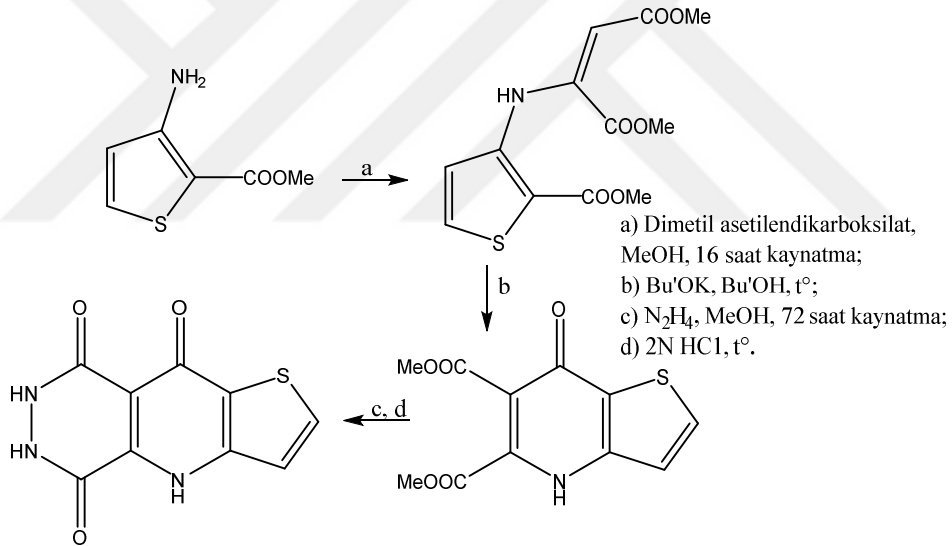
Tiyeno[3,2-*b*]piridin yapısı içeren bileşiklerin biyolojik etkileri iyi bilinmektedir. Bu sınıfın belirli temsilcileri, endotelin reseptörü antagonistleri, γ -aminobütirik asit reseptör ligandları, immünoregülatörler, kalsiyum kanal blokerleri, α 1-adrenerjik reseptör antagonistleri, sinaptik transmisyon üzerinde kimyasal kontrol maddeleri, topoizomeras ve 5-lipoksigenaz inhibitörleri, nöron büyüme faktörünün p75NGF reseptörlerine bağlanma inhibitörleri ve lökotrien antagonistleridir. Ek olarak, temsilcilerinin anti-inflamatuar, antialerjik, analjezik, antikanser, antitümör veya antiasmatik/bronkodilatör etkilere sahip oldukları, antikonvülsif veya antikolinesteraz aktivite sergiledikleri, gastrointestinal regülatörler, hafızayı iyileştiren asetilkolin esteraz inhibitörleri olduğu, sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar veya bakterisid özellik taşıdıkları bilinmektedir. Genel durumda, tiyeno[3,2-*b*]piridinlerin antibakteriyel aktivitesi, [2,3-*b*] izomer türevlerinin aktivitesinden daha yüksektir (79, 86). Kuşkusuz, biyolojik aktivitelerin çeşitliliği, tiyeno[3,2-*b*]piridin sisteminin yapımı için uygun sentetik yaklaşımların gelişmesine ivme kazandırmıştır (52).

Wright, siklizasyonun son aşamasında piridin halkasının C(4)-C(5) bağı oluşumunu varsayar. Tiyenopiridin, Vilsmeier-Haack reaksiyonu ile 3-(N-asetilamino)tiyofenden hazırlanmaktadır (87). Nihai ürün olarak 5-klorotiyeno[3,2-*b*]piridin-3-karbaldehid vermek üzere N-asetilhomosisteintiyolaktan, tiyofen halkasının formülasyonu ile birlikte siklo-kondenzasyona benzer bir transformasyon işlemine girer (88).

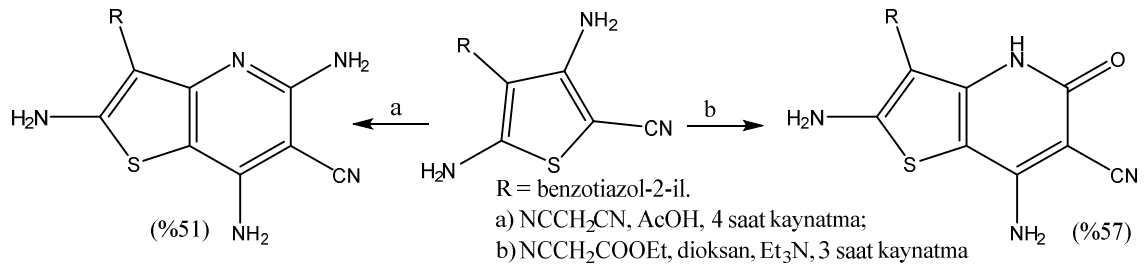


- a) $R^2 = H, R^3 = CN$; $POCl_3$, DMF, 1.5 saat kaynatma; $NH_2OH \cdot HCl$;
b) $R^2 = CHO, R^3 = H$; $POCl_3$, DMF, $90^\circ C$.

Luo ve ark. bir tiyeno[3,2-*b*]piridin sentezinin, piridin parçasının N(1)-C(2) ve C(3)-C(4) bağlarının art arda oluşturulmasını içerdiğini belirtmiştir. Birçok 3-aminotiyofen-2-karboksilik asit türevi, piridin halkasına C(2) ve C(3) karbon atomları sunan 2C-bileşenleri ile başlangıç reaktifleri olarak en çok kullanılırlar. Örneğin, amino esterin dimetil asetilenkarboksilat ile reaksiyonu, yeni heterosiklik sistem tiyeno[2',3':5,6]pirido[2,3-*d*]piridazinin türevlerini vermek üzere intramoleküler siklokondansasyon ve ardından hidrazinolizi içerir (89, 90).

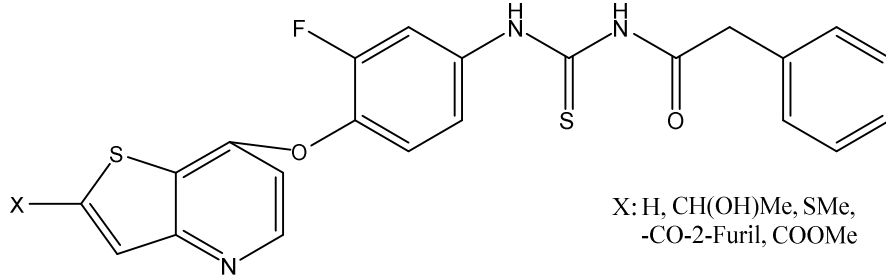


Sherif tarafından tiyeno[3,2-*b*]piridinler, *o*-aminonitril ve metilen-aktif bileşiklerden yola çıkılarak hazırlanmıştır (91).



Claridge ve ark. tarafından tiyeno[3,2-*b*]piridin türevi bir dizi c-Met (hepatosit büyüme/dağılım faktör reseptörü) ve VEGFR2 (vasküler endotelial büyüme faktör

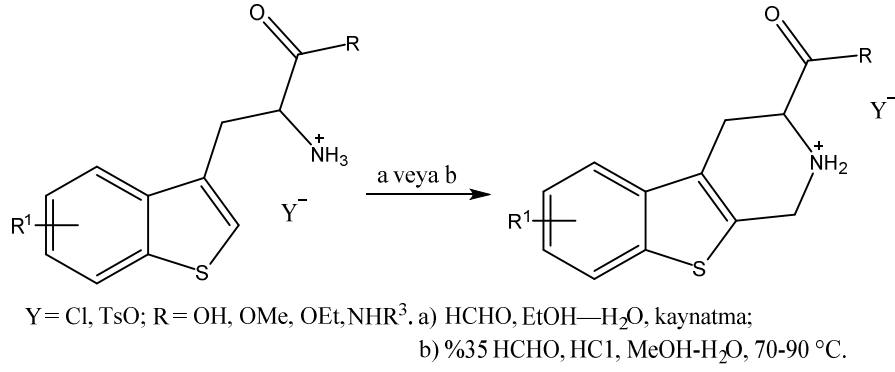
reseptörü) tirozin kinaz inhibitörü sentezlenmiş, iyi *in vitro* profillerinin yanısıra, *in vivo* olarakta önemli anti-tümör aktivite gösterdikleri vurgulanmıştır (92).



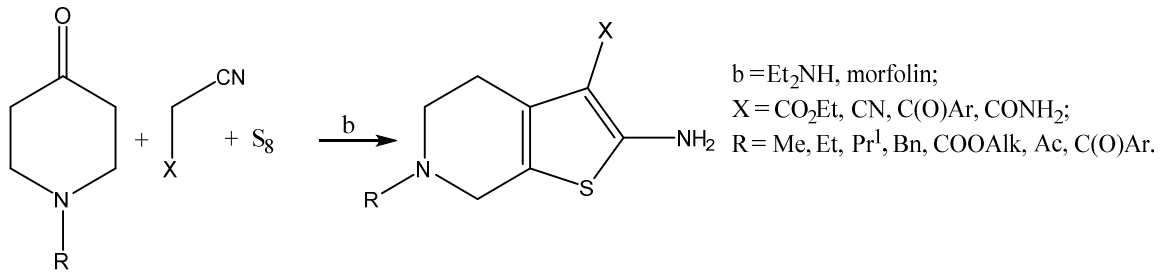
2.1.3. Tiyeno[2,3-*c*]piridinler

Tiyeno[2,3-*c*]piridinlerin sentezi ve dönüştürülmesine ayrılmış iki yüzü aşkın çalışma yayınlanmıştır. Birkaç çalışmada, kimyalarına büyük önem verilmiştir (79, 85, 93-96). Polisiklik yapıların hazırlanması ve biyolojik faaliyetleri için sintonlar olarak kullanılmasıyla aynı derecede ilgi çekmektedir. Pratik uygulamaların spektrumu geniştir. Bu nedenle, kardiyoprotektif, antiproliferatif, serebro ve nöroprotektif, vazodilatör, fungusidal, antialerjik, antikönvulsif, antitümör, antiviral, hipnotik, anksiyolitik, antiinflamatuvar, analjezik, antiülseröz, psikotropik ve nörotropik aktiviteye sahip bileşikler bulunmuştur. Buna ek olarak, tiyeno[2,3-*c*]piridin türevlerinin bazı temsilcileri, kappa-reseptör agonistleri, topoizomera II katalitik aktivitesi inhibitörleri, antidepresan aktiviteye sahip nörotransmitter fonksiyonlarının modülatörleri, 5-lipoksigenaz inhibitörleri, taşikinin antagonistleri, eritropoiesis geliştiren ilaçlar, cGMP-spesifik fosfodiesteraz 5 inhibitörleri, hücre adezyon molekül ekspresyonunun antagonistleri, β -amiloid peptid aktivitesinin düzenleyicileri, adenosin reseptörlerinin alosterik modülatörleri, nefrovasküler kanal dilatatörleri, trombosit aktivasyon faktörü antagonistleri, interlökin 2 üretiminin inhibitörleri ve iştah supresanları olarak görev yapmaktadırlar (52). Çoğalmış sitokin seviyesine bağlı olarak gelişen romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde de potansiyel etkili bileşikler oldukları vurgulanmıştır (97).

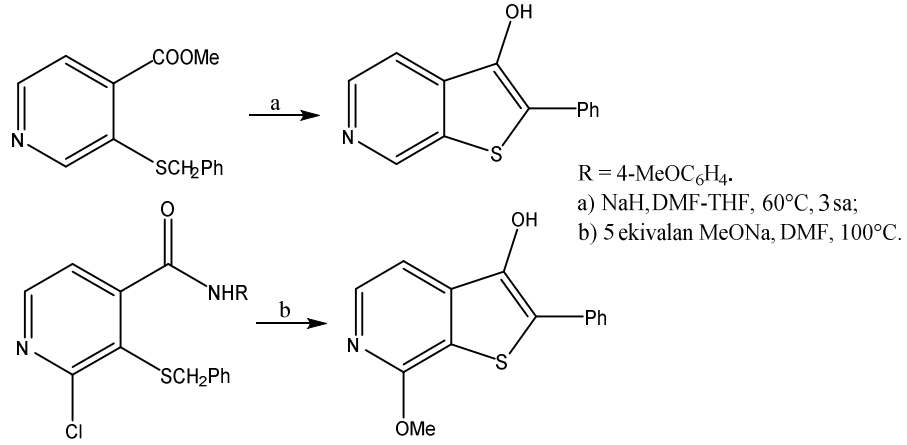
Tiyeno[2,3-*c*]piridin türevleri çoğunlukla Pictet-Spengler reaksiyonuna dayanan yöntemlere göre hazırlanır. Örneğin, tiyotriptofan esterleri ve amidleri, biyolojik açıdan aktif benzotiyenopyridinleri (tosilatlar veya hidroklorürler olarak) vermek üzere formaldehit ile siklokondensansasyona tabi tutulur (98-105).



Tiyyeno[2,3-*c*]piridinlerin yapımı için daha az sayıdaki yöntem tiyofen parçasının oluşumuna dayanır. Kuşkusuz, N-sübstitüe piperidin-4-on, elementel kükürt ve metilen-aktif nitrillerin ikincil aminler varlığında iyi çalışılmış çok bileşenli Gewald reaksiyonu en popüleridir. Bu yaklaşım, 30'un üzerinde patentte kullanılmıştır (106-110). Tiyyeno[2,3-*c*]piridinlerin Gewald reaksiyonu ile sentezlenmesi koşulları geniş bir aralıkta çeşitlenebilir. Çözücü olarak genellikle EtOH, DMF veya MeOH kullanılır; Et₂NH, morfolin veya Et₃N genellikle katalizör olarak kullanılır; reaksiyon genellikle orta derecede ısıtma ile 40-60°C'de veya nadiren 70-80°C'de yapılır. Hedef tetrahidrotiyyenopiridinlerin verimleri, genel olarak, %60-85'dir. Bu şekilde hazırlanan ürünler, çeşitli polietkileşimli sistemlerin sentezi için uygun prekürsörler olarak görev yapmaktadır (94).

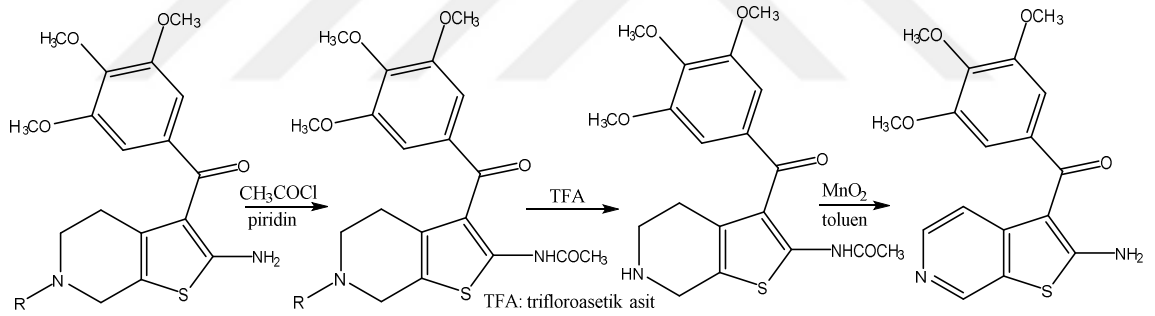


Güçlü bazlarla katalize edilen 3-(alkiltiyo)izonikotinic asit türevlerinin siklokondensasyonu, tiyofen halkasının kapatılması için uygun bir yöntem sağlar. Örneğin izonikotinatın NaOH ile muamele edilmesi tiyyenopiridin üretmiştir. İzonikotinamidin fazla miktarda MeONa varlığında siklizasyonu, sonuç olarak 3-hidroksi-7-metoksi-2-feniltiyyeno[2,3-*c*]piridin verecek şekilde klor atomunun nükleofilik sübstitüsyonuyla birlikte sağlanır (111).

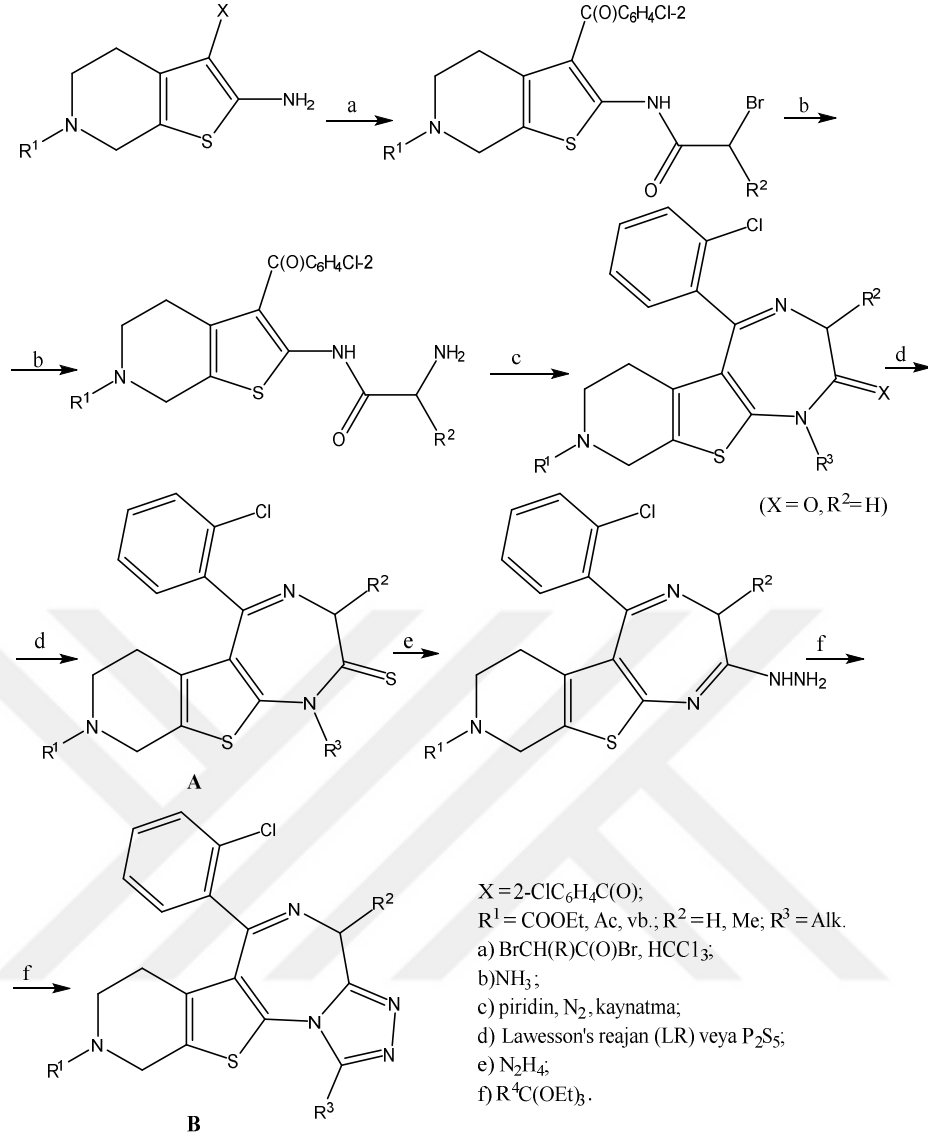


Tiyeno[2,3-*c*]piridinlerin ve özellikle de genel formülü taşıyan tetrahidrotiyenopiridinlerin yapı taşları olarak işlev gören annülasyon reaksiyonları, önemli bir ilgi alanıdır. Bu seçim öncelikle bu bileşiklerin Gewald reaksiyonu ile kolaylıkla hazırlanmasının yanı sıra ek halkaların oluşturulması için uygun olan iki komşu fonksiyonel grubun mevcudiyeti ile de ilgilidir (52).

Romagnoli ve ark. karsinomlu hücrelerin proliferasyonuna karşı tubulin sistemi üzerinden etki göstereceği düşünülen bir seri madde sentezlemiş ve bileşikleri potansiyel etkili bulmuştur (112).

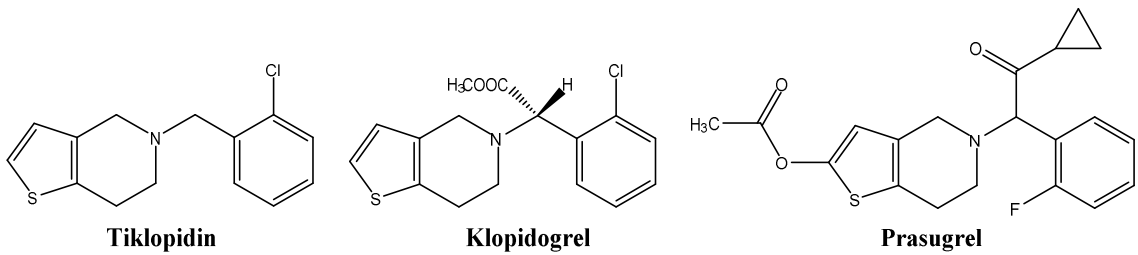


Bazı çalışmalar trombosit agregasyon faktörü üzerinden tetrasiklik antagonistlerin sentezine ayrılmıştır (106, 107, 113-124). En tipik yaklaşımlardan biri aşağıda sunulmuştur (52).

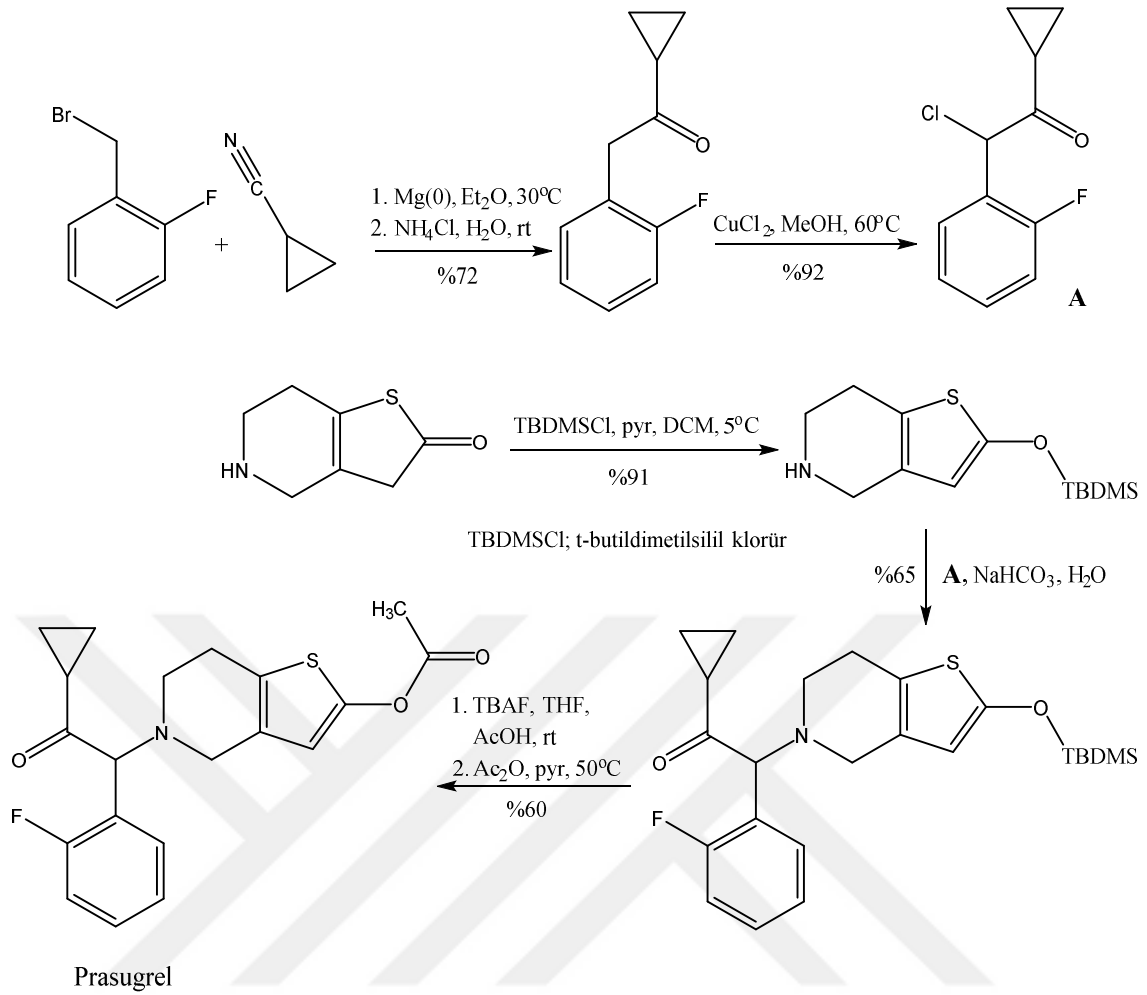


2.1.4. Tiyeno[3,2-*c*]piridinler

[3,2-*c*]tiyeno[3,2-*c*]piridin türevlerinin hazırlanma yöntemleri ve bu bileşiklerin özellikleri iyi bilinmektedir ve birçok çalışmaya konu olmuştur (79, 85, 96, 125). Bu sınıf bileşiklerin kimyası, öncelikli olarak birçok tiyeno[3,2-*c*]piridin türevinin yüksek biyolojik aktiviteleri nedeniyle ilgi çekmiştir. Tiklopidin, Klopidoğrel ve Prasugrel iyi bilinen antitrombotik aktiviteye sahip ilaçlardır.



Şekil 2.3. Piyasada ilaç olarak bulunan tiyeno[3,2-*c*]piridin türevi antiplateletler



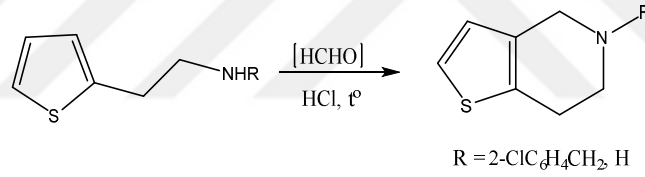
Şekil 2.4. Prasugrel genel sentezi (126)

Tiklopidin ilk kez 1978 yılında kullanılmıştır ve geniş bir uygulama yelpazesi bulmuştur (127). Bir başka sentetik molekül olan Klopidoğrel, miyokard enfarktüsü ve ateroskleroz ile ilişkili diğer hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için antiplatelet ilaç olarak 1998'de (128) kullanılmış, son zamanlarda ise bir dizi prelinik ve klinik çalışmada Klopidoğrel'den daha iyi platelet inhibisyon aktivitesi gösteren yeni bir tiyeno[3,2-*c*]piridin olan antiplatelet aktiviteli Prasugrel (Şekil 2.4.) geliştirilmiştir (129, 130).

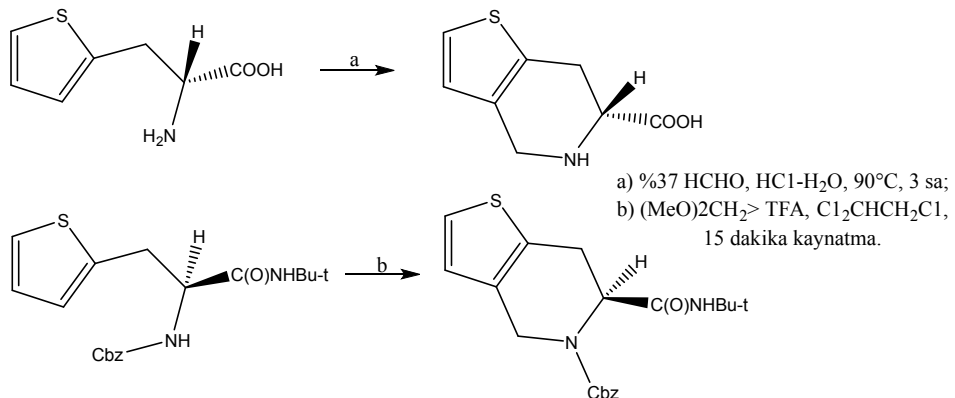
Tiklopidin ve tuzlarının antitümör etkinliği belgelenmiştir (131-133). Optik olarak saf Klopidoğrel'in, bunun rasematının ve başlangıç reaktiflerinin sentezi için yöntemler patentlenmiştir (134-138). ¹³C-ışaretili Klopidoğrel sentezi tarif edilmiştir (139). Bazı tiyeno[3,2-*c*]piridin türevleri, Tiklopidin ve Klopidoğrel'in üstüne ilaveten, yapısal olarak farklı tiyeno[3,2-*c*]piridinler, trombosit agregasyon inhibitörleri olarak, antibakteriyel, antimikrobiyal, psikotropik, analjezik, antitümör, antiinflamatuvar, vazodilatör veya hipotansif aktivitelere sahiptir ve 5-HT₃ reseptör antagonistleri, antikonvulsif ajanlar, epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçlar ve fibrinojen bağlayıcı

inhibitörleri, HIV-1 proteaz inhibitörleri gibi güçlü antiviral aktiviteye sahip olan bileşikler, selektif dopamin agonistleri, farnesil transferaz inhibitörleri, metaloproteaz (metalloproteinaz) inhibitörleri, serotonin antagonistleri, elastaz inhibitörleri, nefrovasküler dilatatörler, antidepresanlar ve hiperglisemi, iskemik ve otoimmün hastalıklar ve şeker hastalığının tedavisi için ilaçlar belgelenmiştir. Bazı tiyeno[3,2-*c*]piridinler kardiyo ve serebroprotektörler ve nörolojik ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar olarak önerilmiştir. Biyolojik etkinliklerle ilgili daha önceki veriler derlemelerde özetlenmiştir (52).

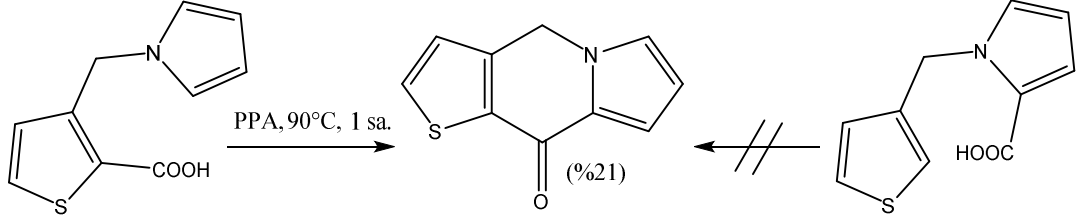
Direkt piridin halkasının kapatılmasında C(3a)-C(4) bağ oluşumuna dayanan bir yöntem tiyeno[3,2-*c*]piridin yapısının sentezinde kullanılır. Olası tüm yöntemlerden Pictet-Spengler sentezi en fazla kabulü görmüştür. Bu yöntem, Tiklopidin, Klopidoğrel gibi son derece aktif ilaçlara uygun ve basit bir yol sağlar. Tiklopidin veya bunun öncüsü olan 4,5,6,7-tetrahidrotiyeno[3,2-*c*]piridin, 2-(2-tienil)etilamin türevinin veya asit kloridinin, asit varlığında (genelde HCl) yüksek sıcaklıkta HCHO çözeltisi (140) ile sentezlenir, HCHO'nun yerine sentetik eşdeğerleri 1,3-ditiyan, 1,3-dioksan (132), dimetoksimetan (141) veya 1,3-dioksolan (132, 142) çözücü olarak kullanılabilir (52).



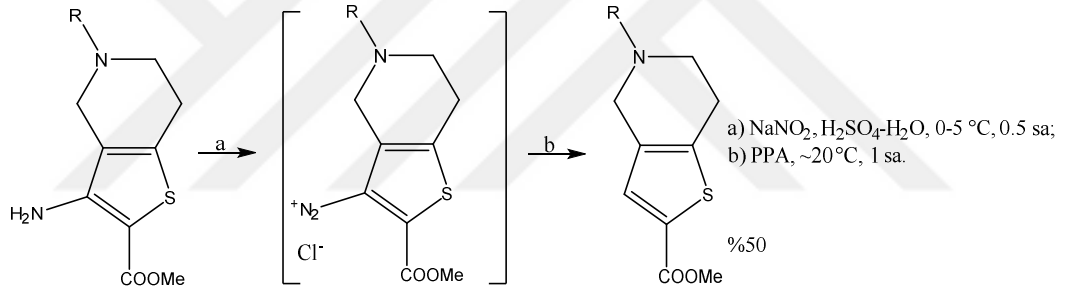
Antikanser ve antienflamatuar aktivitelere sahip olan tiyenopiridin metaloproteaz inhibitörlerinin sentezinde, formalin ile β-(2-tienil)-D-alanin'in asitli bir ortamda muamele edilmesiyle piridin halkası oluşturulmuştur (143, 144). Özellikle, bu yöntem, %91 verimle 6-(*R*)-aminoasit hazırlamak için kullanılmıştır. AT-Cbz-β-(2-Tienil)-L-alanin amid bir asit mevcudiyetinde dimetoksimetan ile 4,5,6,7-tetrahidrotiyenopiridin-(6*S*)-karboksamit haline dönüştürülmüştür. Bileşik anti-AIDS ilaçlarının sentezinde bir ara madde olarak görev yapmaktadır (145).



Tiyeno[3,2-*c*]piridin sisteminin yapımına alternatif bir yaklaşım, C(6)-C(7) bağ oluşumuna dayanmaktadır. Örneğin, PPA içinde karboksilik asitin ısıtılması, düşük verimde 9-okso-4*H*, 9*H*-pirolo[1,2- α]tiyeno[2,3-*d*]piridin verecek şekilde siklizasyona neden olmuştur. Bu bileşiğin bağımsız bir sentezle, yani benzer koşullar altında izomerik asitin siklizasyonu ile hazırlanmaya çalışılması başarısız olmuştur (146).



Birçok sentez tetrahidrotiyeno[3,2-*c*]piridin (131, 134, 135, 147-152) ve ilgili bileşiklerin (153, 154) N-alkilasyonuna dayanmaktadır. Tiklopidin de dahil olmak üzere birçok biyolojik açıdan aktif bileşik sentezlenmiştir. Bu ilacın birkaç öncü bileşiği, 3-aminotiyeno[3,2-*c*]piridin türevlerinin deaminasyonu ile hazırlanmıştır (155-157). Tiyenopiridin, ürün sentezi (R=2-ClC₆H₄CH₂) bir örnek sağlamaktadır (156).



Benkli, yakın zamanda yaptığı çalışmada tiyeno[3,2-*c*]piridin sistemine sahip Prasugrel gibi, biyoaktif moleküllerin metal merkezlerine koordinasyonun daha fazla terapötik etki ile sonuçlanabileceğini belirtmiştir. Özellikle, altın kompleksleri, farklı hastalıkların tedavisi için aday maddeler olarak tıbbi inorganik kimya alanında ilgi görmekte ve potansiyel antitümör ilaçlar olarak dikkat çekmektedir. Sisplatin dirençli kanser sinerjistik uygulamaları ve mitokondri ile DNA gibi spesifik biyolojik hedefler için afinitesi olan altın (III) kompleksleri hakkında zengin bir literatür bulunmaktadır. Tiyenopiridin altın kompleksleri, P2Y₁₂ reseptör inhibisyonu ve ayrıca DNA hasarı için önemli enzimlerin inhibisyonunda sinerjik etkiye sahip olabileceği vurgulanmıştır (22).

2.2. Prasugrel'in Araştırılmış Bazı Tuzları ve Bunların Farklı Formları

Prasugrel veya bunun asit ilaveli tuzları veya hidratları veya solvatları, reaksiyona ve kristalizasyon koşullarına bağlı olarak çok sayıda farklı iç yapıya ve

fizikokimyasal özelliklere sahip kristaller (kristal polimorfizm) oluşturabilir. Bir kristal, üç boyutlu olarak iç yapısı bileşen atomların (veya bunların bir grubunun) düzenli tekrarından oluşan ve düzenli bir iç yapıya sahip olmayan amorf dan ayrılabilen bir katkı belirtir. Kristaller ve bunların herhangi bir oranındaki karışımı mümkündür. Kristal ve amorf katılar olarak bir karışım halinde herhangi bir oranda mevcut olabilirler (158).

Prasugrel'in hazırlanması için bir metot ve bunun yanı sıra trombüs riskine maruz kalan hastalar için bir antiplatelet olarak kullanımı ilk kez EP 0542411 patentinde tarif edilmiştir. Sankyo'nun EP 1298132 patentinde, Prasugrel HCl ve Maleat açıklanmıştır. Bu şirketin bir başka patenti olan EP 2003136 fiziksel ve analitik yöntemlerle karakterize edilen Prasugrel HCl'in 2 kristalli formundan bahseder. Burada Prasugrel HCl'in B formu oldukça kararlı olarak kabul edilmiştir. Aynı patentte baz Prasugrel'in bir polimorf formundan bahsedilmiştir. Prasugrel HBr'nin C formu WO 2012/089180A1 patentinde açıklamıştır. Glenmark'ın WO 2010/070677 patent başvurusu, Prasugrel HCl Form G1 ve G2'nin yeni kristal formları ile ilgilidir ayrıca, amorf bir form olan Prasugrel HCl'i açıklar. Bir başka patent başvurusu, WO 2009/066326, Prasugrel Fumarat, Benzensülfonat, p-Tolüensülfonat ve Malat ile ilgilidir. Helm şirketi, geliştirilmiş kimyasal stabiliteye sahip alkilsülfonik ve arilsülfonik asitlerin tuzlarını tarif eden WO 2009/098142 patent başvurusunu yayınlamıştır. WO 2009/062044 patent başvurusu, Prasugrel HCl'in kristal formları C, B, E'nin yanı sıra amorf formunu da tarif etmektedir. Bir başka patent başvurusu olan WO 2009/129983, yine Prasugrel'in asit ilaveli tuzlarına ilişkindir ve esas olarak Benzensülfonat ve Naftalensülfonat'tan oluşur. Prasugrel Hidrojen Sülfat Sandoz'un WO 2009/130289 sayılı dokümanında tarif edilmiştir. CN 101633662 sayılı Çin patent başvurusu, çeşitli tuzları: 4-asetilaminobenzoat, Asetat, Adipat, Aljinat, 4-aminosalisilat, Askorbat, Aspartat, Glutamat, Piroglutamat, Benzoat, Bütirat, Kamforsülfonat'ı kapsar (159).

2.3. Prasugrel HCl'e Ait Spektral Veriler

2.3.1. UV/VIS Spektroskopisi

Prasugrel HCl'in halka yapısında var olan karbon-oksijen ve karbon-azot bağı ile heteroatomlardan dolayı başta $\pi \rightarrow \pi^*$ ve $n \rightarrow \pi^*$ geçişleri nedeniyle 200 ila 250 nm arasında absorpsiyon bantları vermektedir (**Tablo 2.2.**).

Tablo 2.2. Farklı solvanlarda Prasugrel HCl'in UV/VIS absorpsiyon verileri (160)

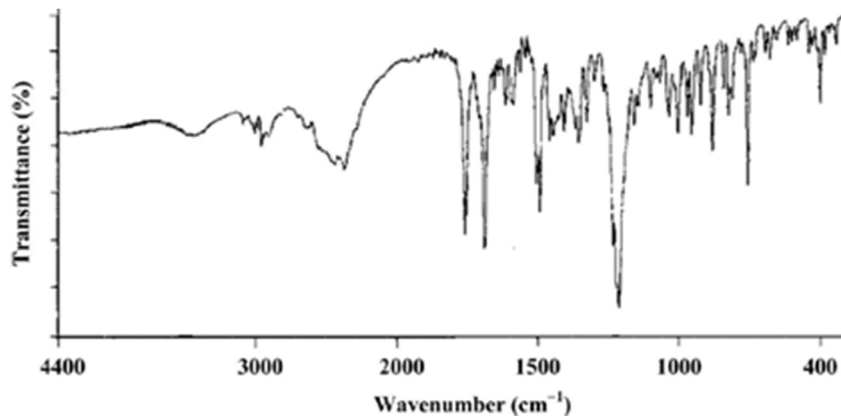
Prasugrel HCl	Çözücü	λ_{max} (nm)	A cm^{-1}
	Metanol	205 ~250	440 164
	Su	195 ~250	747 141
	0.1N NaOH	220 265	377 140
	0.1N HCl	205 ~250	474 146

205 nm'de kaydedilen maksimum miktar, aromatik halkadaki $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronik geçişlerinden kaynaklanmaktadır. 250 nm'de (Geniş bant) kaydedilen en uzun dalga boyu ise $n \rightarrow \pi^*$ elektronik geçişinden kaynaklanmaktadır, spektrumun alındığı çözücünün de absorpsiyonu etkilediği, çözücünün nötral, asidik veya bazik olması durumunda farklı dalga boylarında absorpsiyonun gerçekleştiği bildirilmektedir (160).

Maruszak ve Cybulski, Prasugrel HCl'de potansiyel olarak majör karşıyion klorür olmasına rağmen sentez sırasında asetilasyon basamağının Prasugrel asetat kirliliğine neden olduğunu düşünerek asetik asitin saptanması için dolaylı UV tespiti ile bir kapiler elektroforez (CE) yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırma, pH 8.1'de 0.5 mM miristiltrimetilamonyum bromür içeren 3,5 mM 1,2,4,5-benzenetetrakarboksilik asit 20 mM dietilaminden oluşan bir arka plan elektroliti (BGE) içinde gerçekleştirilmiştir. Yöntem, özgüllük, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik açısından doğrulanmıştır. Hidroklorür ve asetik asit için LOD'ler sırasıyla 1,6 ve 3,8 $\mu g/mL$ 'dir (161).

2.3.2. FT-IR Spektroskopisi

Prasugrel HCl (Form B)'nin FT-IR absorpsiyon spektrumu, Perkin Elmer Paragon 1000 (KBr) kullanılarak 4400-400 cm^{-1} aralığında kaydedilmiştir (Tablo 2.3).



Şekil 2.5. Prasugrel HCl (Form B)'nin FT-IR absorpsiyon spektrumu

Tablo 2.3. Prasugrel HCl'in FT-IR absorbans verileri

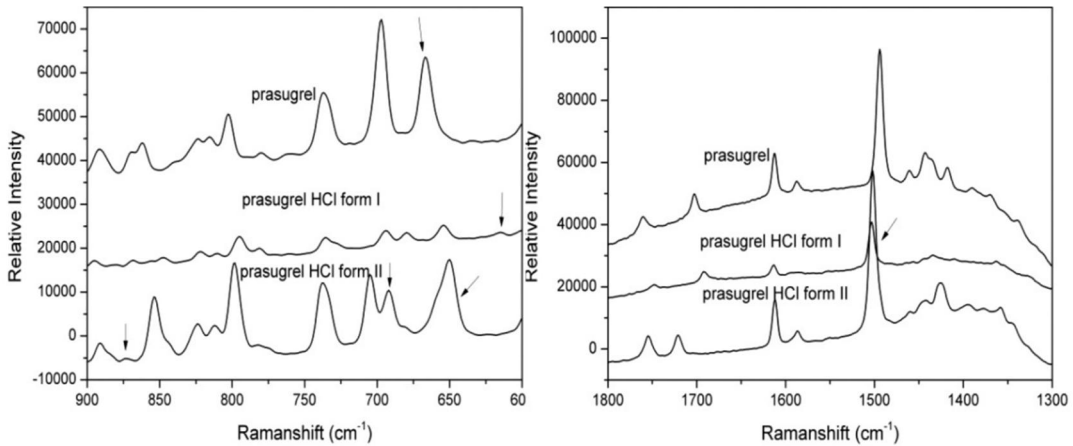
3425	$\nu(\text{H}_2\text{O})$
3100–3005	$\nu(\text{C-H})$; aromatik
2985–2890	$\nu(\text{C-H})$; alifatik
2440	$\nu(-\text{NH}^+)$
1758	$\nu(\text{C=O})$; karboksilat
1690	$\nu(\text{C=O})$; siklopropilkarbonil
1615-1590	$\nu(\text{C=C})$; aromatik
1505–1490	$\delta_b(\text{C-H})$
1405	$\nu(\text{C-F})$
1355, 1325	$\nu(\text{C-N})$
1215, 1235	$\nu(\text{C-O})$
1155, 1140	$\nu(\text{C-C})$
1100–1135	$\delta_b(\text{C-H})$, düzlem içi
955–880	$\delta_b(\text{C-H})$, düzlem dışı
825, 755	$\nu(\text{C-S})$
690–485	Halka deformasyonu

ν : esneme, δ_b : bükme

Farklı formlardaki Prasugrel HCl'nin ayırt edilmesi için FT-IR tekniği kullanılabilir. Örneğin, Prasugrel HCl'nin A Formu, 1762 ve 1720 cm^{-1} 'de karakteristik IR bantlarına, B Formu, 1758 ve 1690 cm^{-1} 'de karakteristik IR bantlarına sahiptir (160).

2.3.3. Raman Spektroskopisi

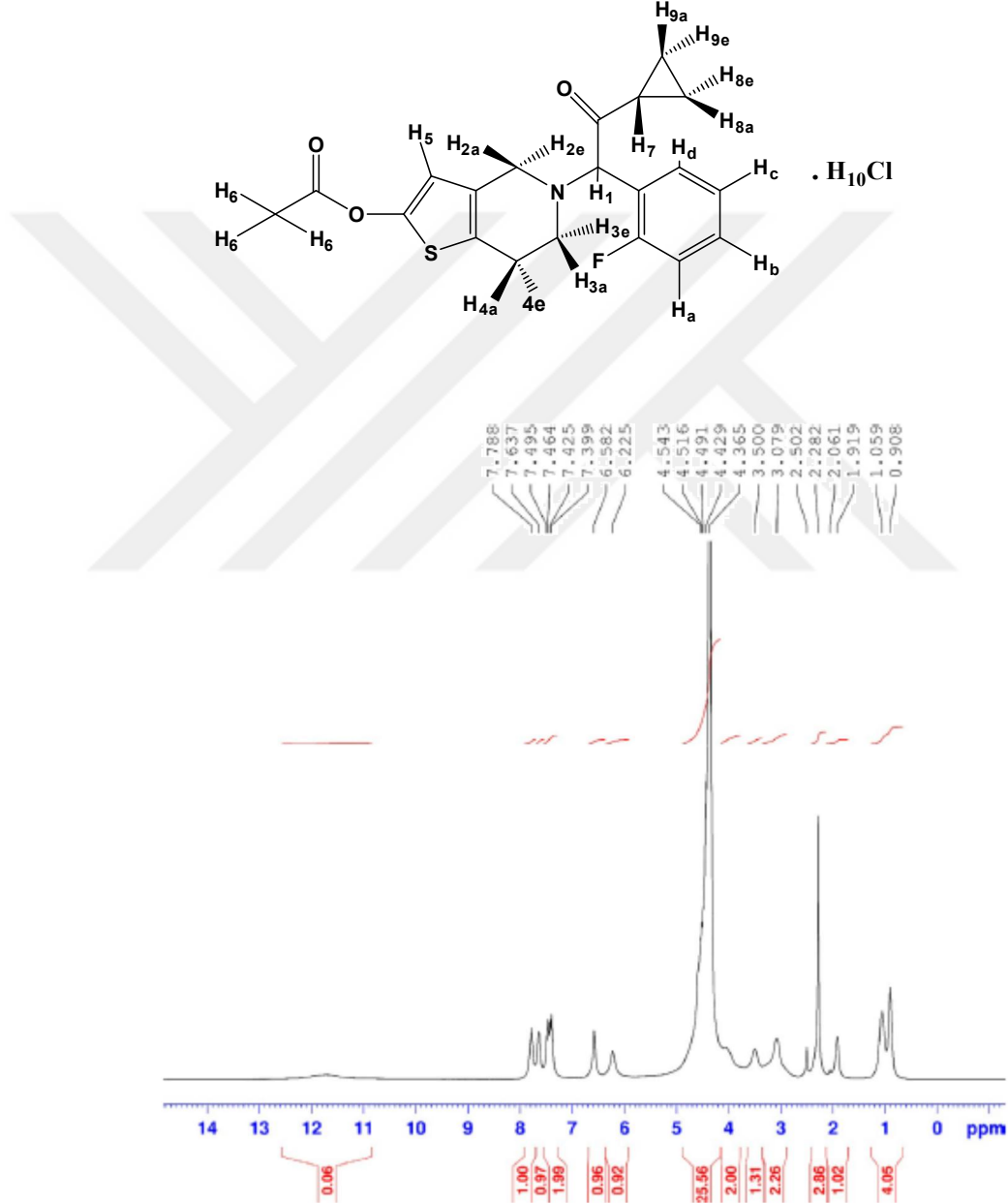
Prasugrel HCl'nin Raman spektrumu polimorfik formlarını belirlemek için RXN2, Kaiser optik sistemi kullanılmış, Prasugrel'in 667 cm^{-1} 'de karakteristik zirveye sahip olduğu ve form I ve II'nin de 1501 cm^{-1} 'de karakteristik zirvelere sahip oldukları belirlenmiştir. Prasugrel HCl'nin I ve II formundaki Raman spektrumlarının çok benzer olmasına rağmen II formunun spektrumunda 692 cm^{-1} 'de keskin bir karakteristik zirve yaptığı tespit edilmiştir (Şekil 2.6.) (162).



Şekil 2.6. Prasugrel HCl'nin Raman spektrumu

2.3.4. 1H -NMR Spektroskopisi

Prasugrel HCl'nin 1H -NMR spektrumu, Bruker Avance-300 spektrometresi kullanılarak, numune DMSO- d_6 içinde çözülerek ve tüm rezonans bantlarına tetrametilsilan (TMS) dahili standardı referans alınarak şekildeki spektrum elde edilmiş, 11.75 ppm'de geniş sinyal varlığının hidroklorür protonundan kaynaklandığı gösterilmiştir. Rezonans bantlarının atamaları **Tablo 2.4.**'de verilmektedir (160).



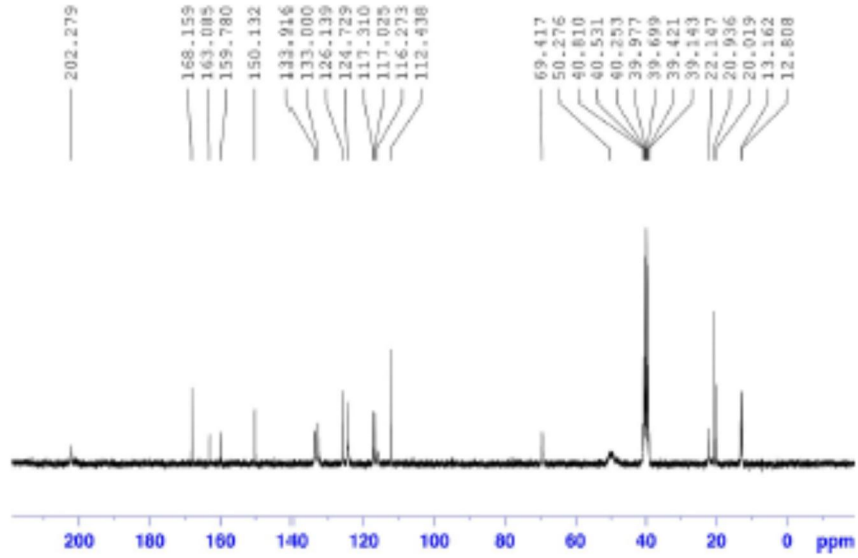
Şekil 2.7. Prasugrel HCl'nin 1H -NMR spektrumu

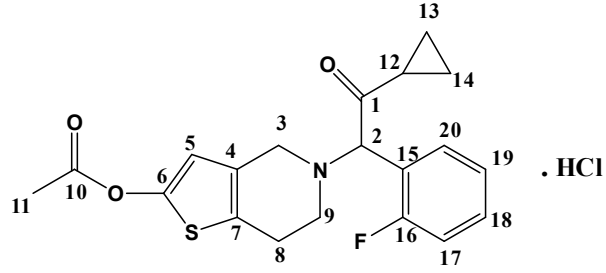
Tablo 2.4. Prasugrel HCl'nin 1H -NMR rezonans bant atamaları

Tanım	Proton Sayısı	Kimyasal Kayma (ppm)	Yarılma
H ₁₀	-	11.75	br
H _b , H _d	2	7.71	m
H _a , H _c	2	7.46	m
H ₅	1	6.58	s
H ₁	1	6.23	s
H _{2e}	1 HOD ile çakışma	4.50	m
H _{2a} , H _{3e}	2	4.10	m
H _{3a}	1	3.50	m
H _{4a} , H _{4e}	2	3.08	m
H ₆	3	2.28	s
H ₇	1	1.92	m
H _{8e} , H _{9e}	2	1.06	m
H _{8a} , H _{9a}	2	0.91	m

2.3.5. ^{13}C -NMR Spektroskopisi

Prasugrel HCl, DMSO- d_6 içinde çözülerek ^{13}C -NMR spektrumu, Bruker Avance-300 spektrometresi kullanılarak elde edilmiş ve tüm rezonans bantları, TMS baz alınarak değerlendirilmiştir. ^{13}C -NMR pik değerlendirmeleri, bağıl bollukları ile **Tablo 2.5.**'de verilmektedir (DMSO ~40 ppm'de görülmektedir) (160).

**Şekil 2.8.** Prasugrel HCl'nin ^{13}C -NMR spektrumu

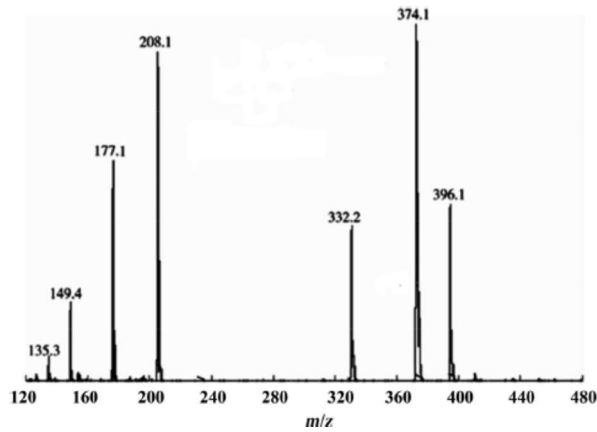


Tablo 2.5. Prasugrel HCl'nin ^{13}C -NMR rezonans bant atamaları

Tanıma	Kimyasal Kayma (ppm)	Bağıl Bollukları (%)
1	202.28	9.09
10	168.16	48.48
16	161.44	24.42
6	150.13	36.36
4	133.92	24.24
20	133.00	27.27
18	126.14	45.45
19	124.73	42.42
15	117.31	33.33
7	117.03	33.33
5, 17	112.44	75.75
2	69.42	21.21
3	50.28	9.09
DMSO	39.98	-
9	22.15	25.00
8, 12	20.94	100.00
11	20.02	54.17
13, 14	13.00	48.48

2.3.6. Mass Spektroskopisi

Prasugrel'in kütle spektrumu, bir elektrosprey iyonizasyon kaynağına sahip kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aşağıda tam kütle parçalanma modeli ve karşılık gelen kütle parçaları **Tablo 2.6.**'da gösterilmiştir (160).



Şekil 2.9. Prasugrel'in kütle spektrumu

Tablo 2.6. Prasugrel'in kütle parçalanma modeli ve kütle parçaları

m/z	Bağlı Bollük (%)	Fragman	
		Formül	Yapı
396.1	48.7	$[C_{20}H_{20}FNO_3S + Na]^+$	
374.1	100.0	$[C_{20}H_{21}FNO_3S]^+$	
332.2	43.6	$[C_{20}H_{21}FNO_3S + H]^+ - [COCH_3]$	
208.1	92.3	$[C_{12}H_{14}FNO + H]^+$	
177.1	61.5	$[C_{11}H_{10}FO]^+$	
149.4	23.1	$[C_7H_4NOS]^+$	
135.3	10.3	$[C_7H_5NS]^+$	

2.3.7. X-Işını Kristalografisi

Katı olsun yada olmasın kristalografik olarak bilinen bir yöntemle (toz X-ışını kristalografisi veya diferansiyel tarama kalorimetresi) kristal yapı incelenebilir. Bakır $K\alpha$ radyasyonu ile ışınlatma yoluyla elde edilen X-ışınları kullanılarak toz X-ışını kristalografisine tabi tutulur. Bir katı, X-ışını kırınım modelinde ayrı zirveler gözlemlendiğinde bir kristal olarak belirlenirken, farklı tepe noktaları gözlenmediğinde amorf olarak belirlenir. Zirveler okunabildiği halde farklı olmadığı (örneğin, geniş) görüldüğünde kristalliği düşük olan bir kristal olarak belirlenir.

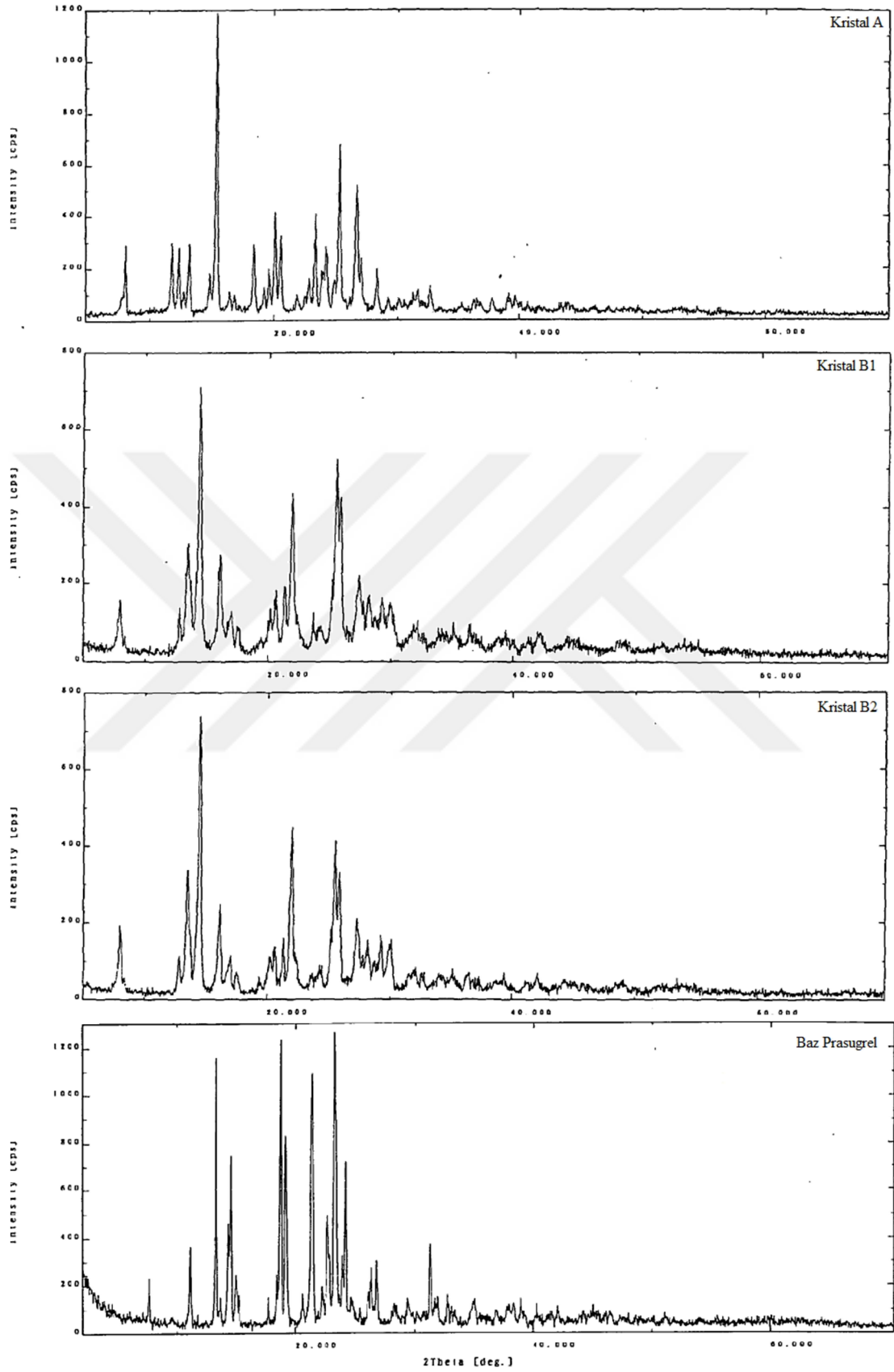
Bakır $K\alpha$ radyasyonu kullanılarak toz X-ışını kristalografisinde, bir numune tipik olarak bakır $K\alpha$ radyasyonu ile ışınlanır (içinde $K\alpha_1$ ve $K\alpha_2$ radyasyonları ayrılmaz). Bir X-ışını kırınım modeli, $K\alpha$ radyasyonundan türetilen kırınım analiz edilerek ve ayrıca sadece $K\alpha$ radyasyonundan türetilen difraksiyondan alınan $K\alpha_1$ radyasyonundan türetilen kırınım analiz edilerek elde edilebilir.

Prasugrel HCl Kristal A, bakır $K\alpha$ ($\lambda=1.54$ angstrom) radyasyonu ile ışınlayarak elde edilen bir toz X-ışını kırınım modelinde 5.7, 4.4, 3.8, 3.5 ve 3.3 angstrom aralıklarında (d) ana zirveleri gösteren bir kristal olabilir (**Şekil 2.10.**).

Prasugrel HCl Kristal B1, bakır $K\alpha$ ($\lambda=1.54$ angstrom) radyasyonu ile ışınlayarak elde edilen bir toz X-ışını kırınım modelinde 6.6, 6.1, 4.0, 3.5 ve 3.4 angstrom aralıklarında (d) ana zirveleri gösteren bir kristal olabilir (**Şekil 2.10.**).

Prasugrel HCl Kristal B2, bakır $K\alpha$ ($\lambda=1.54$ angstrom) radyasyonu ile ışınlayarak elde edilen bir toz X-ışını kırınım modelinde 6.6, 6.1, 4.0, 3.5 ve 3.4 angstrom aralıklarında (d) ana zirveleri gösteren bir kristal olabilir (**Şekil 2.10.**).

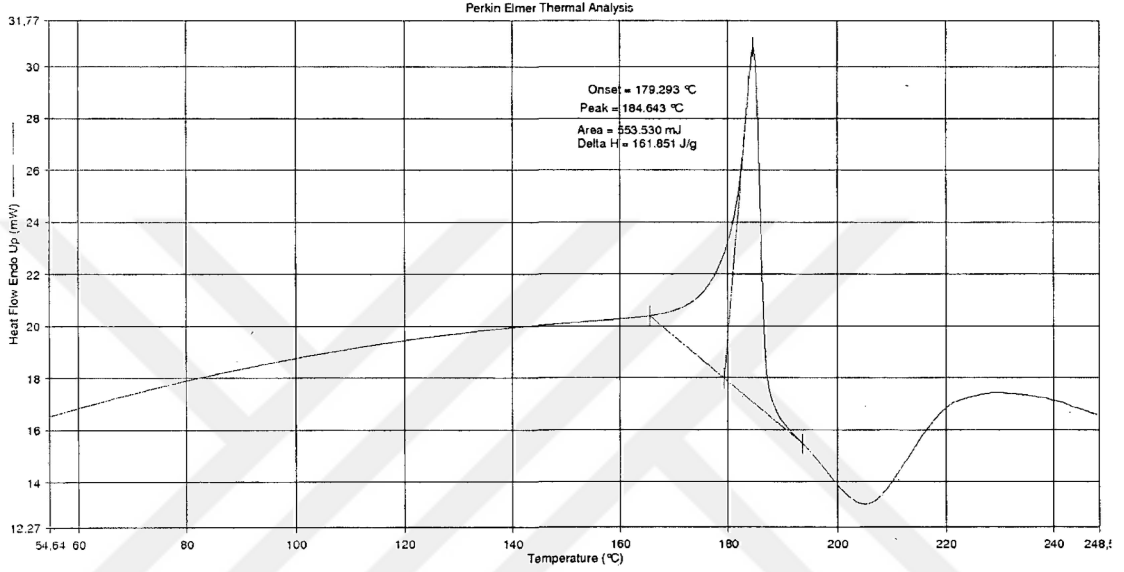
Baz Prasugrel, bakır $K\alpha$ ($\lambda=1.54$ angstrom) radyasyonu ile ışınlayarak elde edilen bir toz X-ışını kırınım modelinde 6.7, 4.7, 4.6, 4.2 ve 3.8 angstrom aralıklarında (d) ana zirveleri gösteren bir kristal olabilir (**Şekil 2.10.**) (158).



Şekil 2.10. Priligal HCl'in farklı formları için toz X-ışını kırınım modeli

2.3.8. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

Prasugrel HCl Form B'nin DSC analizi, 3-4 mg numune ve ısıtma hızı 10°C/dak. ayarlanarak gerçekleştirilmiştir. Pyris 1 cihazından alınan analiz sonucu aşağıda gösterilmiştir (163).



Şekil 2.11. Prasugrel HCl Form B'nin DSC analizi

2.3.9. Titrimetrik Tanıma Reaksiyonları

Sulu Titrasyon'da tam tartılan 410 mg Prasugrel HCl 50 ml suda çözülür. Numune, 0.1N NaOH vs. ile potansiyometrik olarak titre edilir. Her bir ml 0.1N NaOH, 40.99 mg C₂₀H₂₁ClFNO₃S'e eşdeğerdir .

Susuz Titrasyon'da tam tartılan 410 mg Prasugrel HCl, 50 ml susuz glasiyel asetik asit içinde çözülür. 10 ml %6'lık civalı asetat çözeltisi (asetik asit içinde) eklenir. Numune, 0.1N HClO₄ vs. ile potansiyometrik olarak titre edilir. Her bir ml 0.1N HCl 40.99 mg C₂₀H₂₁ClFNO₃S'e eşdeğerdir.

Arjantometrik Titrasyon'da tam tartılan 410 mg Prasugrel HCl 50 ml suda çözülür. Numune potansiyometrik olarak 0.1N AgNO₃ vs. ile titre edilir. Her bir ml 0.1N AgNO₃, 40.99 mg C₂₀H₂₁ClFNO₃S'e eşdeğerdir (160).

2.4. Aktif Farmasötik Bileşikler İçin Yeni Katı Form Araştırmalarının Gerekliliği

Mevcut katı biçimlerle karşılaştırıldığında, fizikokimyasal özellikleri daha elverişli olması koşuluyla, ilaçların yeni katı biçimleri değerlidir. Birçok ilacın çözünürlüğü *in vivo* olarak ilaç biyoyararlanımını belirleyecek özelliklere sahiptir bu nedenle bu özelliklerin manipüle edilmesi büyük önem taşımaktadır (48).

Farmasötik endüstride, yeni teknolojik gelişmelere yol açan önemli itici güç, aktif farmasötik bileşiğin (API) çözünürlük, biyoyararlanım, akış özellikleri ve termal stabilite gibi temel özelliklerinin güçlendirilmesidir, bununla birlikte kristal yapısı, higroskopik yapı, partikül boyutu, filtrelenebilirlik, yoğunluk ve lezzet de önemlidir. Dolayısıyla, bir ilaç ürününün iyileştirilmesi, daha iyi, daha etkili terapiler ve ekonomik tasarruflar açısından arzu edilen faydaları beraberinde getirmektedir (164).

Yeni ilaç moleküllerinin %60'ından fazlasının, boyut büyüklüğü ve lipofilisite nedeniyle suda zayıf çözünürlüğe sahip olduğu tahmin edilmektedir (165). Bu gibi zorluklar, araştırmacıların farmasötik ürün geliştirme ve iyileştirme için diğer yolları araştırmasına yol açmıştır, örneğin eski API'lerin yeni katı hal formlarını salifikasyon veya birlikte kristalleştirme işlemleri ile araştırarak farmakolojik doğasını değiştirmeden nihai özelliklerini modüle etmeye çalışmışlardır (166).

Önümüzdeki yıllarda bu alanın hızla büyümeye devam edeceğini ve farmasötik tuz veya kristal ilaç maddelerinin daha geniş ticarileşme için aday olacağını öngörebiliriz (167). Tuz alanında dikkate alınması gereken gelişim konusu, yeni katı bir formun istenen özelliklerini sağlayacak uygun bir karşıt iyonun seçilmesidir. Zayıf temel API'ler için inorganik asitlerle (HCl vb.) tuz oluşumu çoğu zaman bir ilacın biyoyararlanımı için en belirgin ve en uygun yol olmuştur. Bununla birlikte, örneğin, hidroklorür tuzlarının, parenteral formülasyonlardaki yüksek asiditesi, endüstriyel ekipmanın korozyon riski, ortak bir iyon etkisi sebebiyle midede çözünürlüğün azalması vb. bazı potansiyel dezavantajları vardır (168). Bu problemlerin bir kısmı, farmasötik olarak kabul edilebilir karboksilik asitler ve zayıf bazik API'ler ile stabil kristal/tuz formları oluşturabilen diğer nispeten güçlü organik asitler kullanılarak önlenebilir (169).

2.4.1. Aktif Farmasötik Bileşikler İçin Tuz Seçiminde Trendler

Paulekuhn ve arkadaşları yaptığı çalışmada FDA tarafından yayınlanan Orange Book veritabanını, farmasötik tuzların oluşumu için kullanılan farklı karşıt iyonların ortaya çıkma sıklığı açısından analiz etmiştir. Orange Book'un mevcut analizinden elde edilen verileri genel olarak göstermenin yanısıra karşıt iyon kullanımının dağılımını, karşıt iyon seçimindeki eğilimleri tanımlamak için 5 yıllık aralıklarla sınıflandırma yapmış ve aşağıda (Tablo 2.7. ve Tablo 2.8.) özetlemiştir (170).

Tablo 2.7. Kategori I API'larda Kullanılan Katyonların Dağılımı (170)

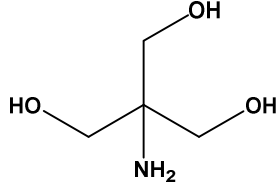
Katyonlar	Tamamı (%)	-1982 (%)	1982-1986 (%)	1987-1991 (%)	1992-1996 (%)	1997-2001 (%)	2002-2006 (%)
Benzatin	0.6	1.0					
Kalsiyum	6.9	7.3			9.5		18.8
Kolinat	0.6	1.0					
Dietanolamin	0.6	1.0					
Dietilamin	0.6	1.0					
Lizin	0.6						6.3
Magnezyum	1.2					6.3	6.3
Meglumin	2.9	5.2					
Piperazin	0.6	1.0					
Potasyum	6.3	6.3			14.3	6.3	6.3
Prokain	0.6	1.0					
Gümüş	0.6	1.0					
Sodyum	75.3	72.9	91.7	92.3	66.7	87.5	62.5
Trometamin	1.7			7.7	9.5		
Çinko	1.2	1.0	8.3				
Tuz sayısı	174	96	12	13	21	16	16

Tablo 2.8. Kategori I API'larda Kullanılan Anyonların Dağılımı (170)

Anyonlar	Tamamı (%)	1982 öncesi (%)	1982-1986 (%)	1987-1991 (%)	1992-1996 (%)	1997-2001 (%)	2002-2006 (%)
Asetat	3.3	1.5	8.0	12.7		3.5	2.8
Benzoat	0.2					1.7	
Besilat	0.8	0.4	2.0		3.3		
Bromit	4.6	5.2	4.0	2.1	1.7	5.2	8.3
Kamforsülfonat	0.2	0.4					
Klorid	53.4	52.9	52.0	63.8	63.3	46.6	38.9
Klorteofilinat	0.2	0.4					
Sitrat	2.7	2.6	2.0		3.3	5.2	2.8
Etandisülfonat	0.2	0.4					
Fumarat	1.7	0.4		2.1	3.3	8.6	
Glukseptat	0.2	0.4					
Glukonat	0.4	0.7					
Glukuronat	0.2				1.7		
Hipurât	0.2	0.4					
İyodür	1.0	1.5	2.0				
İzetionat	0.4	0.4	2.0				
Laktat	1.3	1.5	4.0	2.1			
Laktobiyonat	0.2	0.4					
Laurilsülfat	0.2	0.4					
Malat	0.4	0.4					2.8
Maleat	4.2	5.5	2.0		3.3	3.5	5.6
Mesilat	4.2	2.6	2.0	4.3	1.7	13.8	8.3
Metilsülfat	0.4	0.7					
Naftoat	0.2				1.7		
Napsilat	0.4	0.7					
Nitrat	1.7	0.7	8.0	2.1	1.7		2.8
Oktadekanoat	0.2	0.4					
Oleat	0.2			2.1			
Oksalat	0.2						2.8
Pamoat	0.8	1.1				1.7	
Fosfat	2.7	3.3		2.1	1.7	1.7	5.6
Poligalakturonat	0.2	0.4					
Süksinat	1.2	0.7			3.3	1.7	2.8
Sülfat	7.5	9.6	12.0	4.3	1.7	3.5	5.6
Sülfosalisilat	0.2	0.4					
Tartrat	3.8	3.7		2.1	6.7	3.5	8.3
Tosilat	0.4	0.4					2.8
Trifloroasetat	0.2				1.7		
Tuz sayısı	523	272	50	47	60	58	36

2.5. Tez Kapsamında Prasugrel Tuzu Oluşturmada Kullanılan Karşıt İyonlar

2.5.1. Trometamol (Trometamin, Trizma, TRIS)



Formül: C₄H₁₁NO₃,

Molar kütle: 121.14 g/mol,

Erime noktası: 167-172°C,

Yoğunluk: 1.353 g/cm³,

Kaynama noktası: 219-220°C.

Farmasötik geliştirmede katyonik tuz oluşturucu bir madde olarak kullanılan trometamin organik bir amin bazıdır (170, 171). Trometamol için, tekrarlanan doz toksisitesi emniyet verileri mevcut değildir. Akut toksisite için ratlarda oral LD₅₀=5.9 g/kg, intravenöz LD₅₀=1.8 g/kg olarak belirlenmiştir. Sınırlı güvenlik verileri mevcuttur (172-174).

Genel olarak trometamin tuzu için beş farmasötik tuz FDA tarafından onaylanmıştır.

Oral uygulama için iki trometamin tuzu listelenmiştir:

- Fosfomisin trometamin ve
- Ketorolak trometamin (üretilmiyor).

Bunların arasında, Fosfomisin trometamin, Fosfomisin serbest asiti için bildirilen 3 g günlük maksimum dozuna dayalı olarak 2650 mg ile en yüksek günlük trometamin dozu ile verilir.

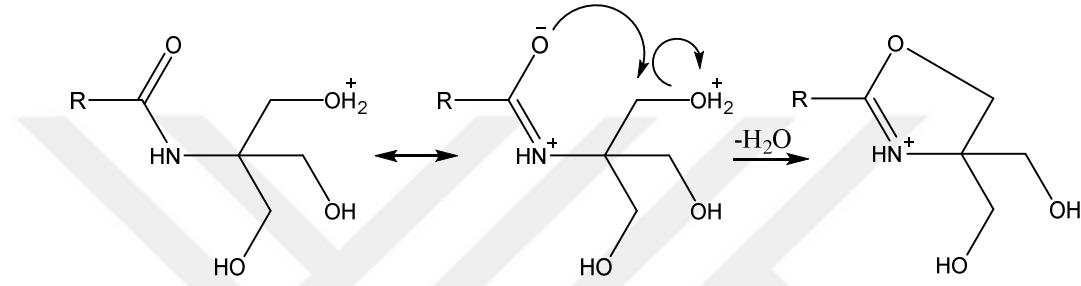
İntravenöz uygulama için üç trometamin tuzu listelenmiştir:

- Karboprost trometamin,
- Dinoprost trometamin (üretilmiyor) ve
- Ketorolak trometamin (üretilmiyor).

Dinoprost trometamin için, 120 mg'lık bir günlük doza karşılık gelen maksimum günlük trometaminin 39 mg'a karşılık geldiği bildirilmiştir (175).

Wu ve arkadaşları HPLC-MS'de, muhtemelen bir su molekülünün kaybıyla bir amid veya ester oluşturan, trometamin ile API arasındaki bir kondenzasyon reaksiyonu tarafından üretilen bir bozunma ürününü belgelemiştir (176).

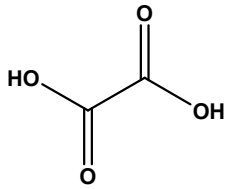
Loeser ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bir trometamin tuzunda aktif bir farmasötik bileşen ile karşıt iyonu arasındaki kimyasal etkileşimleri incelemiş kolay oluşan oksazolin yapısı için aşağıdaki mekanizmayı önermiştir. Amid veya ester oluşum ihtimali, primer bir amino grubunun varlığı ve trometamin yapısında üç adet hidroksil grubunun varlığına bağlıdır (177).



Dehidrasyona neden olan koşullar altında, bir karboksilik asit ile 1:1'lik bir trometamin karışımının iki ardışık dehidratasyona uğrayacağı bilinmektedir; ilk dehidratasyon bir amide yol açar ve ikinci dehidrasyon bir oksazoline yol açar (178).

Trometamin tuzunun, sodyum tuzuna göre önemli derecede daha düşük higroskopiklik göstermesi dikkat çekicidir; bu eğilim bazı diğer API'ler için rapor edilmiştir (176, 179) ve önemli pratik değere sahiptir (177).

2.5.2. Oksalik Asit



Oksalik Asit

Formül: C₂H₂O₄,

Molar kütle: 90.03 g/mol,

Erime noktası: 189°C (bozunma),

Yoğunluk: 1.9 g/cm³.

Oksalik Asit Dihidrat

Formül: C₂H₂O₄·2H₂O,

Molar kütle: 126.07 g/mol,

Erime noktası: 98-100°C,

Yoğunluk: 1.65 g/cm³.

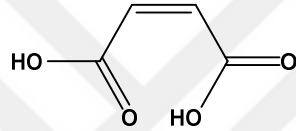
Essitalopram oksalat, oral yoldan uygulanan oksalat tuzunun tek örneğini temsil etmektedir. Sitokiyometri açısından oksalat tuzu 1:1 oranında temsil edilir. Serbest baza dayanılarak günlük maksimum 20 mg doz ile 5 mg oksalatın maksimum günlük oral

alımı hesaplanmıştır. Oral uygulamadan farklı diğer uygulama yollarına yönelik oksalat tuzları örnekleri Orange Book'da bulunmamaktadır (175).

Oksalik asit dihidrat için, tekrarlanan doz toksisitesi emniyet verileri mevcut değildir. Akut toksisite için doz ratlarda oral LD₅₀=375 mg/kg, insanlarda oral LD₅₀=71 mg/kg, tavşanlarda dermal LD₅₀=20 g/kg olarak belirlenmiştir (180).

Tunalı ve ark. tarafından yapılan çalışmada antimikrobiyal ajan olarak bilinen trimetopriminden, trimetoprim oksalat sentezlenmiş ve *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir (181).

2.5.3. Maleik Asit



Formül: C₄H₄O₄,
Molar kütle: 116.1 g/mol,
Erime noktası: 134-138°C,
Yoğunluk: 1.59 g/cm³,
Kaynama noktası: 355.5°C.

Maleik asit için, tekrarlanan doz toksisitesi emniyet verileri mevcut değildir. Renal proksimal tubül hücrelerinde bir Krebs siklüs inhibitörü olan Maleil-CoA'ya metabolize olur. Sıçanlar, tavşanlar ve fareler sırasıyla tek bir 75, 400 ve 600 mg/kg maleat dozundan sonra benzer etkiler sergilerler. Köpekler, 9 mg/kg maleattan oluşan tek bir oral dozdan sonra böbrek fonksiyonlarını etkileyen en hassas türler gibi gözükmektedir. Maleat dozları düşük tutulmalı ve renal parametreler gözlemlenmelidir. Akut toksisite için ratlarda oral LD₅₀=708 mg/kg olarak belirlenmiştir. Renal toksisite çoğu türün genelinde görülür. Göz tahriş edicidir (174, 182-185).

FDA onaylı Orange Book'da kayda değer sayıda maleat tuzu listelenmiştir. Çoğu, on yıllar önce onaylanmış ve daha sonra üretimi durdurulmuştur. Birden fazla asidik grup içeren diğer asitler için olduğu gibi, tuz oluşumu için çeşitli sitokiyometrilere mümkündür. 1:1 tuzların haricinde maleatlar için 1:2 (baz molekülüne başına iki molekül maleik asit) ve 2:1 (iki baz molekülüne başına bir molekül maleik asit) tuzlar bulunmaktadır. 2:1 esasen iki temel azot atomu olan bir piperazin parçasını içeren fenotiyazinler için gerçekleştirilir.

Oral uygulama için onaylanmış maleat tuzları ile ilgili olarak, aşağıdaki API'ler Orange Book'da listelenmiştir:

- Amlodipin maleat (ürettilmiyor),
- Asetofenazin maleat (ürettilmiyor),
- Azatadin maleat (ürettilmiyor),
- Bromfeniramin maleat (ürettilmiyor),
- Deksbromfeniramin maleat (ürettilmiyor),
- Deksklorfeniramin maleat (ürettilmiyor),
- Enalapril maleat,
- Fluvoksamin maleat,
- Karbinoksamin maleat,
- Kargenazin maleat (ürettilmiyor),
- Klorfeniramin maleat (ürettilmiyor),
- Metilergonovin maleat,
- Metisergid maleat (ürettilmiyor),
- Pirlamin maleat (ürettilmiyor),
- Proklorperazin maleat (ürettilmiyor),
- Rosigitazon maleat,
- Tegaserod maleat (ürettilmiyor),
- Tietilperazin maleat (ürettilmiyor),
- Timolol maleat,
- Trimipramin maleat.

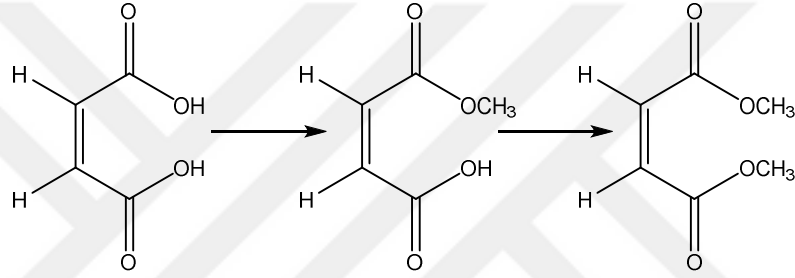
Maksimum günlük alım ile ilgili miktarlar 165 mg, 250 mg, 118 mg ve 80 mg olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca intravenöz formülasyonlar da mevcuttur:

- Bromfeniramin maleat,
- Klorfeniramin maleat,
- Metilergonovin maleat.

İntravenöz uygulamada Bromfeniramin maleat, Klorfeniramin maleat için günde yaklaşık 11 mg ve 12 mg maleat uygulanırken, Metilergonovin maleat için sadece 0.1 mg maleat enjekte edilir (175).

Maleik asit tuzu olarak amin fonksiyonel grubu içeren bir farmasötik bileşenin izolasyonu için proses geliştirilmesi sırasında, izole edilmiş tuzun analitik olarak sonlandırılması ile ilgili bir problem kaydedilmiştir. İstenen maleat tuzunun analitik incelemeleri sonucunda monometil maleat tuzu ile belirgin bir şekilde kontamine olduğu bulunmuştur. Bu durum yeniden kristalleştirme ile tatmin edici bir şekilde çözülsede sorunun nereden çıktığının anlaşılması için maleik asit ile metanol arasındaki reaksiyona ilişkin deneysel çalışmalar yapılmıştır (186).

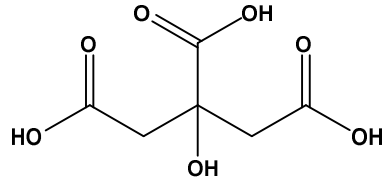


Diğer asitlerin yokluğunda metanol içinde maleik asitin esterifikasyonu kinetik olarak araştırılmış ve maleik asidin kendi esterifikasyonunu katalize ettiği bir mekanizma ile ilerlediği bulunmuştur. Maleik asitin kısmen nötrleştirilmesi bir tampon sistemi oluşturur ve ortamın asiditesini önemli ölçüde düşürür, bu da esterifikasyon oranını düşürür, bu tuz formu solüsyonunun stabilizasyonu esterifikasyonla ilgilidir (186).

Maleik anhidrit ile arilaminlerin açılasyonunun bir sonucu olarak oluşan maleik asitin süstitüe edilmiş amidlerinin geniş bir biyolojik etki spektrumu sergilediği bilinmektedir (187). Bunların arasında fungusid (188), antiarterosklerotik (189) ve bitkilerde büyüme düzenleyici (190) aktivite gözlemlenmiş ayrıca antimikrobiyal ilaçlar, insektisidler ve fungusidler sentezinde de (187) ara maddeler olarak da kullanılmıştır (191).

Tunalı ve ark. tarafından yapılan çalışmada antimikrobiyal ajan olarak bilinen trimetopriminden, trimetoprim maleat sentezlenmiş ve *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir (181).

2.5.4. Sitrik Asit



Formül: C₆H₈O₇,
Molar kütle: 192.124 g/mol,
Erime noktası: 153°C,
Yoğunluk: 1.66 g/cm³,
Kaynama noktası: 310°C.

Sitrik asit, tekrarlanan doz toksisitesi emniyet verisi olarak diyet için ratlarda 1.2 g/kg, 2 yıl süre için 1.3 g/kg olarak belirlenmiştir Oral olarak iyi tolere edilebilirdir. Gelişimsel ve üreme toksikolojisi çalışmalarında yan etki düzeyi gözlenmemiştir (>241 mg/kg). Göz tahriş edicidir (174, 192). Sitrat anyonu, kalsiyum için yüksek afiniteye sahiptir ve akut hipokalsemiye neden olabilir. Akut toksisite için ratlarda oral LD₅₀=6.7 g/kg, intravenöz LD₅₀=143 mg/kg olarak belirlenmiştir. İntravenöz olarak uygulandığında hipokalsemiye neden olabilir. Yüksek dozlarda göz tahriş edicidir (172, 193).

Oral ve intravenöz tedavi için FDA onaylı önemli miktarda sitrat mevcuttur. Sitrik asit, 3:2 tuzunu temsil eden Piperazin sitrat haricinde üç asidik fonksiyonel gruba sahip olmasına rağmen, Orange Book'da yalnızca 1:1 tuzları bildirilmiştir.

Oral uygulama için FDA onaylı API'lar:

- Kafein sitrat,
- Klomifen sitrat,
- Dietilkarbamazin sitrat (üretilmiyor),
- Difenhidramin sitrat,
- Orfenadrin sitrat,
- Piperazin sitrat (üretilmiyor),
- Sildenafil sitrat,
- Tamoksifen sitrat (üretilmiyor),
- Tofasitinib sitrat,
- Toremifen sitrat (üretilmiyor) ve
- Tripeleennamin sitrat (üretilmiyor).

Bunlardan en yüksek günlük doz, Piperazin sitrat, günlük maksimum 3:2 sitokiyometri ile oral 5250 mg uygulanır.

Dietilkarbamazin sitrat, Difenilhidramin sitrat, Orfenadrin sitrat ve Tripelenamin sitrat gibi diğer API'ler için maksimum günlük alım miktarı birkaç 100 mg aralığındadır.

İntravenöz uygulama için FDA onaylı API'lar:

- Kafein sitrat,
- Daunorubisin sitrat,
- Orfenadrin sitrat,
- Sildenafil sitrat ve
- Sufentanil sitrat.

Bunlardan en yüksek miktarda Sitrat, Kafein sitrat tarafından uygulanır. Bu durumda günlük maksimum 1400 mg sitrat enjekte edilir (175).

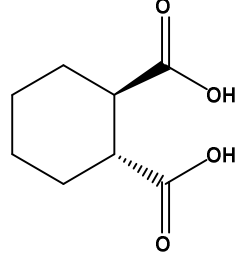
İlaçların tuzlarını hazırlamak için sitrik asitin kullanımı halen piyasada olan Sildenafil sitrat gibi örneklerle iyi bilinmektedir. Sildenafil sitrat, erektil disfonksiyon, pulmoner arteriyel hipertansiyon ve yüksek irtifa hastalığının tedavisinde yararlı olduğu kanıtlanmış bir farmakolojik ajandır (194).

Nanoyapılı yapılandırılmış Sildenafil bazı veya onun farmasötik açıdan kabul gören tuzları veya kokristal bileşimlerinin, bilinen geleneksel Sildenafil sitrat formülasyonlarına kıyasla artmış biyoyararlanım, daha hızlı etki başlangıcı, azaltılmış gıda etkisi sergilediği ve daha küçük dozlar gerektirdiği görülmüştür. Bu durum, nanoyapıda azalan parçacık boyutuna ve nanoyapılı parçacık oluşumuna bağlı olarak artan çözünürlük ve dağılma profiline sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Uygulanan bir aktif maddenin hızlı çözünmesi tercih edilir, çünkü daha hızlı çözünme genel olarak daha hızlı hareket başlangıcı ve daha fazla biyoyararlanıma yol açmaktadır (195).

Bazedoksifen seçici östrojen reseptör modülatörüdür. Literatüre ait bilgilere göre, bazedoksifen ve şimdiye kadar bilinen formları için saflaştırılması güç ve bozunmaya meyilli olan maddeler arasında sınıflandırma yapılabilir. Yapılan bir çalışmada, yüksek verim ve yüksek kararlılık gösteren API'ların üretimi için

kullanılabilen süksinik asit, propandioik asit, oksalik asit, maleik asit, hidroksibutanoik asit, tartarik asit ve sitrik asitin kristal tuzları üretilmiştir (196).

2.5.5. *trans*-1,2-Sikloheksan Dikarboksilik Asit

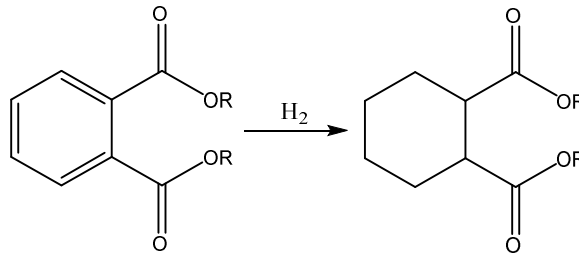


Formül: C₈H₁₂O₄,
Molar kütle: 172.18 g/mol,
Erime noktası: 220-221°C,
Yoğunluk: 1.314 g/cm³,
Kaynama noktası: 384.1°C.

Oral ve intravenöz tedavi için FDA onaylı *Trans*-1,2-sikloheksan dikarboksilat literatürde mevcut değildir ve bu bileşiğin toksikolojik özellikleri tam olarak araştırılmamıştır. Tekrarlanan doz toksisitesi ve akut toksisite emniyet verileri mevcut değildir.

Tunalı ve ark. tarafından yapılan çalışmada antimikrobiyal ajan olarak bilinen trimetopriminden, trimetoprim oksalat sentezlenmiş ve *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir (181).

1,2-benzendikarboksilik asit (ftalik asit) türevinin hidrojenlenmesi ile *cis*-ve/veya *trans*-sikloheksan-1,2-dikarboksilik asit diester ürünleri oluşur. Bu bağlamda *cis*-diester, ester gruplarından birinin aksiyal (a) diğeri ekvatoryal (e) hizalandığı izomerdir. *Trans* bileşiği ester grupları arasında hem aksiyal olarak (a,a) hem de ekvatoryal (e,e) hizalandığı izomer anlaşılmalıdır. Poliolefinlerin kullanımı için plastikleştiriciler olarak da kullanılırlar.



Polivinil klorürün plastikleştirilmesi için şu anda ağırlıklı olarak dibutil, dioktil, dinonil veya didesil esterler gibi ftalik asit esterleri kullanılmaktadır. Bu ftalatlar son

zamanlarda zararlı olarak nitelendirildiğinden, plastiklerin kullanımının sınırlandırılmasından korkulmaktadır (197).

Ftalatlar, çevredeki her yerde bulunmaları, insan biyolojik izlem araştırmalarında sık tespit edilmeleri ve kemirgenler ve insanlarda toksisite gösterdikleri için büyük ilgi görmektedirler (198-200).

Ftalatlar, hidroliz ve ardından oksidasyon reaksiyonları yoluyla hızla metabolize olup idrar ve dışkı ile atılırlar (201).

2.6. P2Y₁₂ Reseptörleri ve Tiyenopiridin Türevi Bileşiklerin Antiplatelet Aktiviteleri

Adenozin difosfat (ADP), trombosit işlevinde önemli bir rol oynamaktadır. Depolandığı yerden yoğun granüller salgılanırsa, diğer trombosit agonistleri (202, 203) tarafından indüklenen trombosit cevaplarını yükseltir ve trombosit agregatlarını stabilize eder (204-206). ADP'nin indüklediği sinyal P2Y reseptörleri tarafından yönlendirilir ve bunlar, ligandları pürin ve pirimidin nükleotidleri olan hemen hemen her tür hücrede bulunan G bağı 7 membranlı genetik proteinlerdir. Filogenetik ve yapısal bir bakış açısından, nispeten yüksek düzeyde yapısal farklılık gösteren 2 farklı P2Y reseptörü alt grubu tanımlanmıştır:

Birinci alt grup, G_q'ye bağı alt tipleri (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ ve P2Y₁₁)

İkinci alt grup, G_i'ye bağı alt tipleri (P2Y₁₂, P2Y₁₃ ve P2Y₁₄) içerir.

İnsan trombositleri, P2Y₁ ve P2Y₁₂ olmak üzere ADP için 2 farklı reseptörü ifade eder. G_q'ye bağı P2Y₁ reseptörü, sitoplazmik Ca⁺² trombosit şeklinin değışimi ve hızla geri döndürülebilir agregasyonda geçici bir yükselmeye aracılık ederken, G_i'ye bağı P2Y₁₂ reseptörü, adenilil siklazın inhibisyonuna aracılık eder ve trombosit agregasyon tepkisini artırır (203). ADP ile hem G_q hem de G_i yolaklarının eşzamanlı aktivasyonu, normal agregasyonu ortaya çıkarmak için gereklidir (203, 207).

P2Y₁₂ reseptörleri ağırlıklı olarak lipid yığınlarda bulunan homooligomerler olarak mevcuttur. Klopidoğrel'in P2Y₁₂ fonksiyonunu inhibe eden aktif metaboliti ile yapılan tedavide, homooligomerler, lipid yığınlının dışında tutulan fonksiyonel olmayan dimerlere ve monomerlere ayrılırlar (208).

2.6.1. P2Y₁₂

P2Y₁₂, kromozom 3q21-q25'e eşlenir; trombositlerde, endotel hücrelerinde, glial hücrelerde ve düz kas hücrelerinde bulunur (209). 17, 97, 175 ve 270 konumlarında 4 hücre dışı Cys kalıntısı da dahil olmak üzere 342 aminoasit kalıntısı içerir: Cys97 ve Cys175, bir disülfid köprüsü ile bağlanır ve reseptör ekspresyonu için önemlidir (208, 210, 211); Ekstraselüler amino terminalinde potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgeleri, aktivitesini modüle edebilir (212).

P2Y₁₂ reseptörleri ağırlıklı olarak lipid yığınlarında bulunan homooligomerlerdir. Klopidoğrel'in P2Y₁₂ fonksiyonunu inhibe eden aktif metaboliti ile yapılan tedavide homooligomerler, lipid yığınların dışında tutulan fonksiyonel olmayan dimerler ve monomerler haline dönüşür (208).

2.6.2. P2Y₁₂ Sinyali

ADP ve 2-metiltiyo-ADP ile (N)-metanokarba-2-metiltiyo-ADP gibi bazı ADP analogları, P2Y₁₂'yi stimüle ederken, ATP ve bunun trifosfat analogları antagonist gibi davranır (213). P2Y₁₂ reseptörü, çoğunlukla G α_{i2} 'nin aktivasyonu yoluyla adenil siklaz aktivasyon inhibisyonuna bağlıdır ve lipid yığınları için kritik bir gerekliliğe sahiptir (214). Bununla birlikte, adenil siklazın G α_{i2} yoluyla inhibisyonunun ADP tarafından trombosit aktivasyonunun anahtar bir özelliği olmasına rağmen trombosit agregasyonu ile hiçbir nedensel ilişki taşımadığı kaydedilmiştir (215, 216). Bu nedenle, G α_{i2} 'nin aşağı yönlü diğer sinyal olayları, integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 'ü ve bunun ardından trombosit agregasyonunu etkinleştirmek için gereklidir.

Çeşitli çalışmalar, trombosit aktivasyonunun ADP aracılı P2Y₁₂ reseptör amplifikasyonunda fosfoinositid 3-kinazın (PI3K) farklı izoformlarının önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (206, 217-221). Buna ek olarak, P2Y₁ knock-out farelerinde normal P2Y₁ antagonistlerinin varlığında trombosit çalışmaları, ADP'nin, trombositleri aktive etmek için yaygın olarak kullanılanlardan daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılması gerektiğini, platelet agregasyonunun yavaş ve sürekli PI3K'ye bağlı olduğunu, trombosit şekli değişmeden önce indüklediğini göstermiştir (222, 223).

2.6.3. P2Y₁₂'nin Trombosit Fonksiyonundaki Rolü

ADP tek başına trombosit (yoğun granüllerin), salgılanmasına neden olamasa da, P2Y₁₂ ile etkileşimi, tromboksan A₂ (224) ve trombin reseptörü-aktive edici peptid gibi agonistlerin neden olduğu trombosit sekresyonunu büyük ölçüde indükler (225). Muhtemelen PI3K'nın (218, 226) aracılık ettiği bu etki gösteriyor ki, Asetilsalisilik asit (ASA) varlığında hem fizyolojik hem de μ M konsantrasyonlarda ekstraselüler Ca⁺²'nin ve büyük platelet agregatlarının oluşumundan bağımsızdır ve P2Y₁₂ aracılı agregasyon amplifikasyonunda ikincil olmaktan ziyade direkt bir etkidir (224, 225, 227).

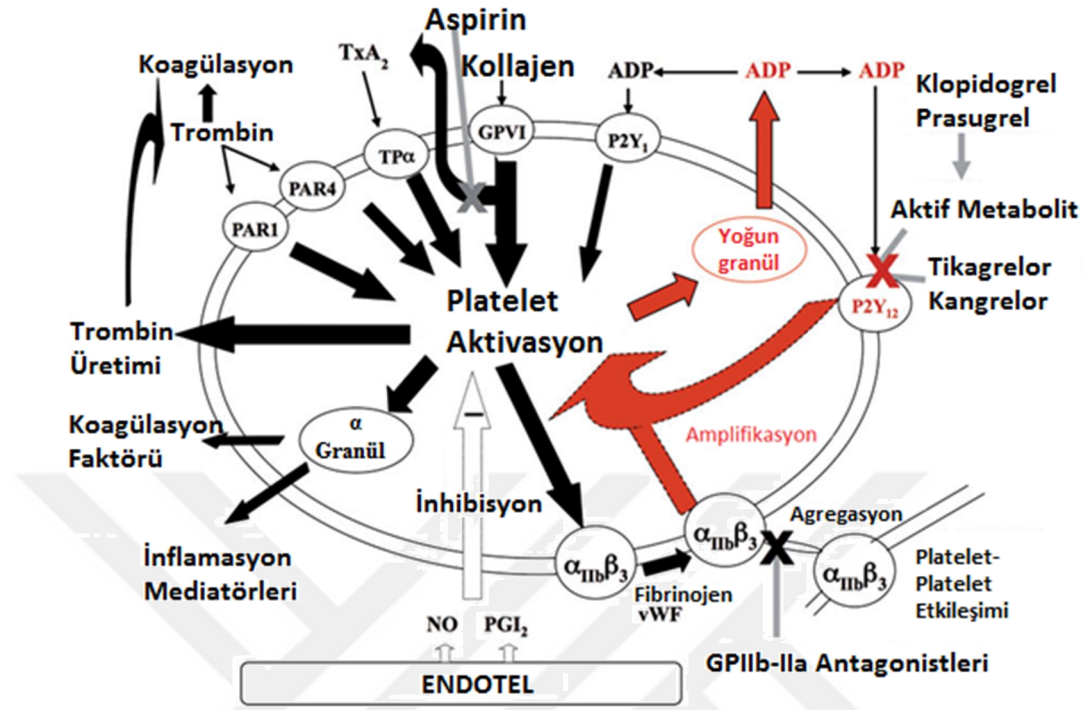
P2Y₁₂, PI3K aracılı trombin veya tromboksan A₂ tarafından indüklenen platelet agregatlarının stabilizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (214). Konjenital olarak P2Y₁₂ yoksunu insan trombositleri ve P2Y₁₂ knock-out farelerinin araştırmaları, bir dizi trombosit agonisti tarafından indüklenen platelet agregasyonu ve sekresyonunun bozulduğunu ortaya koymuştur (227-232). Serbest ADP aracılığıyla P2Y₁₂ reseptör stimülasyonu, adenilil siklazın inhibisyonuna, trombositlerde serin-treonin kinaz (Akt)'nin aktivasyonuna, tirozinin fosforilasyonuna, hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz 2 (ERK)'nin aktivasyonuna, Rap1B'nin aktivasyonuna, Rac'nin aktivasyonuna ve diğer agonistlerin neden olduğu Ca⁺²'nin mobilizasyonuna katkıda bulunur (208).

Önceki çalışmalar, P2Y₁₂'nin antitrombotik ilaç olan Tiklopidin ile tedavi edilen kişilerden veya konjenital P2Y₁₂ eksikliği olan bir hastadan alınan trombositleri kullanarak kesilme indüklü trombosit agregasyonunun önemli bir mediatörü olduğunu göstermiştir (233). Spesifik kullanımı daha sonra onaylanan P2Y₁₂'nin bu etkisi, doğrudan P2Y₁₂ antagonistleri, PI3K aktivasyonuna bağlıdır (234).

Daha önce de belirtildiği gibi, ADP'nin G α_{i2} yoluyla adenilat siklaz (AC) inhibisyonu, trombosit aktivasyonu ile nedensel bir ilişki taşımaz. Bununla birlikte, prostasiklinin veya adenilil siklazı uyaran diğer maddelerin antitrombosit etkisini önleyerek *in vivo* platelet tromboz oluşumuna büyük ölçüde katkıda bulunabilir (235).

P2Y₁₂ ile P2Y₁ tam kanda kollajen aracılı platelet mikropartikül oluşumuna ve lökosit yüzeyinde doku faktörüne maruz kalmaya neden olan platelet yüzey P-selektin maruziyetinin aracılık ettiği trombosit-lökosit agregatlarının oluşumuna katkıda bulunur. Bununla birlikte, trombin veya diğer trombosit agonistleri ve trombosit açısından zengin plazmada doku faktörüyle indüklenen trombin tarafından

fosfatidilserine maruz bırakılmasında sadece P2Y₁₂ reseptörünün ilişkisi olduğu bulunmuştur (209).



Şekil 2.12. P2Y₁₂ reseptörlerinin trombosit aktivasyonundaki rolü (25)

Trombosit aktivasyonu, kollajen, tromboksan A₂, trombin ve ADP ile diğer agonistler tarafından indüklenir. Bu da ADP içeren yoğun granüllerin salınımını başlatır. Serbest ADP daha sonra trombosit ADP reseptörleri üzerinde etkilir ve P2Y₁₂ reseptörü trombositin başlangıç agonistine tepkisinin çoğaltılmasında önemli bir role sahiptir (Şekil 2.12.'de kırmızı renkle vurgulanmıştır) (25).

2.6.4. P2Y₁₂ Reseptör Antagonistlerinin Yan Etkilerinin Tolere Edilebilirliği ve Minimasyonu

Temel olarak istenmeyen kanamanın antiplatelet stratejilerinin geliştirilmesinde endişe kaynağı olmasının yanında diğer olumsuz etkiler de önemli hususlardır. Klinik uygulamada kullanılan ilk tiyenopiridin P2Y₁₂ inhibitörü olan Tiklopidin, nötropeniye neden olmuş (28) ve Klopidoğrel ile yer değiştirmesine yol açmıştır. Tiyenopiridinler genel olarak iyi tolere edilirken, sonradan reversibl bağlayıcı ajanlar Tikagrelor, Kangrelor ve Elinogrel'in dispneye neden olduğu açıkça ortaya çıkmıştır (236). Tikagrelor'un adenozinin hücrel alımını inhibe ettiği (237) ve adenozin plazma düzeylerini arttırdığı (238) bu nedenle Tikagrelor kullanımının dispneye neden

olabileceği hipotezi ileri sürülmüştür (239). Alternatif olarak, reversibl P2Y₁₂ inhibitörlerinin duyu nöronlarındaki P2Y₁₂ reseptörlerini tiyepiridinlere göre daha fazla etkileyebileceği ve böylece dispneye neden olabileceği ileri sürülmüştür (236). Dispne P2Y₁₂ inhibitörünün nadiren durdurulmasına neden olabilir bu nedenle dispneden kaçınmak tercih edilir. Bununla birlikte, Tikagrelor kullanıldığında dispneye neden olan mekanizmanın ilacın klinik yararına katkısı olup olmadığı bilinmemektedir. Platelet P2Y₁₂ reseptör inhibisyonu yoluyla MI azalması alternatif bir açıklama olsa da, Tikagrelor ile Klopidoğrel'in PLATO konsantrasyonları karşılaştırıldığında ani kardiyak ölümlerde önemli azalma olduğu kaydedilmiştir, bu da ekstraselüler adenozin miktarının artmasıyla iskemik önkoşullamanın aritmik ölüm riskini azaltabileceği hipotezini güçlendirmektedir. Bir adenozin antagonisti olan kafeinin Tikagrelor'a (TROCADERO) bağlı dispneyi hafifletmek için denemesi, rahatlatıp rahatlatmayacağını araştırılması Tikagrelor ile ilişkili dispnenin nedenini netleştirecektir (25).

2.6.5. P2Y₁₂'nin Doğuştan Eksikliği

Konjenital P2Y₁₂ eksikliği otozomal resesif geçişli bir bozukluktur. Şiddetli P2Y₁₂ eksikliği olan ilk hasta 1992 yılında tanımlanmıştır (228). Yaşam boyu aşırı kanama öyküsü, uzun süren kanama zamanı (15-20 dakika), zayıf agonistlere tepki olarak tersinir agregasyon ve düşük konsantrasyonda kollajen veya trombin yanıtına bağlı agregasyon bozukluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, en tipik özelliği, ADP'nin, çok yüksek konsantrasyonlarda olmasına rağmen (>10µM), tam ve geri dönüşlü olmayan trombosit agregasyonuna neden olmaması olarak tespit edilmiştir. Trombosit fonksiyonunun diğer anormallikleri şunlardır (240):

- 1) trombosit adenilil siklaz ile inhibe edilen (PGE₁) prostaglandin E₁'in ADP aracılı inhibisyonu yoktur, ancak epinefrin aracılı inhibisyon normaldir;
- 2) ADP aracılı indüklenen sitoplazmik Ca⁺²'nin mobilizasyonu normal (sınırdan) ve şekil değişimi normaldir;
- 3) yeni üretilen plateletler üzerinde [³³P]2MeSADP (241) veya formalin bağlı plateletler üzerinde [³H]ADP için normal bağlanma alanlarının yaklaşık %30'unun varlığı söz konusudur (P2Y₁ ile ilişkili ADP reseptörü) (224).

Hastanın 4 oğlu çalışması ile heterozigot P2Y₁₂ eksikliğinin tanımlanmasını sağlanmıştır (227):

- ADP ile indüklenen trombosit agregasyonu, 10µM'den küçük veya eşit ADP konsantrasyonları için geri döndürülebilir, ancak ADP'nin 10µM'den daha yüksek veya eşit konsantrasyonları için geri döndürülemez;
- platelet cAMP'de PGE₁ ile indüklenen artışın inhibisyonu tamamen yok olmasa da bozulmuştur;
- [³³P]2MeSADP için trombosit bağlanma yerlerinin sayısı annenin ve normal deneklerin arasında orta düzeydedir; sonrasında trombosit salınımı bozulmuştur.

Bu hastanın trombositlerindeki salgı defekti, TxA₂ üretiminde bozulma veya düşük trombosit granülü içeriği ile ilişkili değildir, tanımlanmamış ve muhtemelen heterojen bir grup trombosit sekresyonu olan ve bazen "primer salgı defekti" genel terimi ile anılan hastalarda tarif edilenle çok benzerdir (225, 242).

2.6.6. P2Y₁₂'yi Hedef Alan İlaçlar

P2Y₁₂'yi hedef alan ilaçlar arteryal tromboz insidansını düşürür, bunun nedeni de birçok randomize klinik çalışmanın sonucunda belgelenmiştir (240).

Tablo 2.9. Ağır konjenital P2Y₁₂ defektlerinin tanısı

Klinik özellikler
Mukokutanöz kanamaların yaşam boyu öyküsü; ameliyat veya travma sonrası aşırı kanama
Laboratuvar özellikleri
Tarama testi: ADP'nin (>10µM) yüksek konsantrasyonlarının tam ve geri dönüşümlü trombosit agregasyonunu (ışık iletim agregometrisi) indükleyememesi
Doğrulamayı test: ADP'nin PGE ₁ ile uyarılmış adenil siklaz'ı inhibe edememesi (trombosit cAMP'sinin veya VASP fosforilasyonunun ölçülmesi)

Tablo 2.10. Klopidoğrel ve yeni oral P2Y₁₂ reseptör inhibitörlerinin özellikleri (243)

Özellikleri	Klopidoğrel (Tiyenopiridin)	Prasugrel (Tiyenopiridin)	Tikagrelor (Triazolopirimidin)
Ti başlaması	2 saat	30 dakika	30 dakika
Ti süresi	3-10 gün	5-10 gün	3-4 gün
Dozu	YD: 600 mg PKG'de veya öncesinde 300 mg FLT'de İD: 75 mg/gün Erken PKG'ye giden, kanama riski düşük, YD: 600 mg, İD: 7 gün 150 mg/gün	YD: 60 mg, koroner anatomi görülüp PKG'ye karar verilirse 1 saat içinde İD: 10 mg/gün, <60 kg olanlarda 5 mg/24 saat	YD: 180 mg, PKG'de veya öncesinde İD: 90 mg, günde iki kez
Tedavi uyarıları (244, 245)	Yan etkileri: Diyare ve abdominal şikâyetler Allerjik döküntüler, gerekirse antihistaminik, steroid, 2-3 günde kaybolur, KLOP'a devam edilir, kaybolmazsa ilaç değiştirilmelidir (Tikagrelor).	Yan etkileri: Ölümcül kanama riski yüksek Önceden P2Y ₁₂ reseptör inhibitörü alan; ≥75 yaş, aktif patolojik kanaması; GİA ve inme hikâyesi olanlarda kontrendikedir. KLOP ile çapraz- reaksiyon gösterir. KLOP direnci ve allerjisinde alternatif değildir. Diyabetik, geçirilmiş MI hikâyesi ve anteriyor MI'de faydası en fazladır.	Yan etkileri: Semptomsuz hiperürisemi, dispne, sık uzamış R-R aralığı SA hastalık, 2. veya 3. derece AV blok ve kalıcı kalp pili olanlarda dikkatli kullanılmalıdır. KLOP direncinde tek alternatiftir.

YD: Yükleme dozu; İD: idame dozu; Ti: Trombosit inhibisyonu; KLOP: Klopidoğrel; SA: Sinoatriyal hastalık; GİA: Geçici iskemik atak; FLT: Fibrinolitik tedavi

2.6.7. Birinci ve İkinci Jenerasyon Tiyenopiridinler: Tiklopidin ve Klopidoğrel

Tiklopidin ve Klopidoğrel hepatik sitokrom P450 (CYP) enzimatik yolağı ile *in vivo* aktif metabolitine dönüştürülmeye ihtiyaç duyan prodruglardır, sistein kalıntılarıyla

bir disülfid bağı oluşturarak P2Y₁₂'ye kovalent bağlanırlar ve reseptörü geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler (246).

Birkaç randomize klinik çalışmada, bu ilaçların önemli kardiyovasküler olayların önlenmesinde klinik etkinliği belgelenmiştir. Serebral veya koroner arter hastalığı stabil olan hastalarda, ASA'nın etkinliği esasen benzerdir. Akut koroner sendromlu hastalar için sadece medikal veya perkütan koroner girişim (PKG) ile tedavi görenlerde kombinasyon halinde ASA'ya tiylenopiridin eklenmesi son derece etkilidir. Buna karşılık, stabil hastalığı olan düşük-orta riskli hastalarda Klopidoğrel ve ASA kombinasyonu monoterapiden daha etkili değildir, ancak kanama insidansını arttırmaktadır (28, 247-253).

Toksikitesi nedeniyle, klinik uygulamada Tiklopidin neredeyse tamamen Klopidoğrel ile yer değiştirmiştir (246). Kanıtlanmış antitrombotik etkililiğine rağmen, Klopidoğrel'in bazı önemli dezavantajları vardır (254):

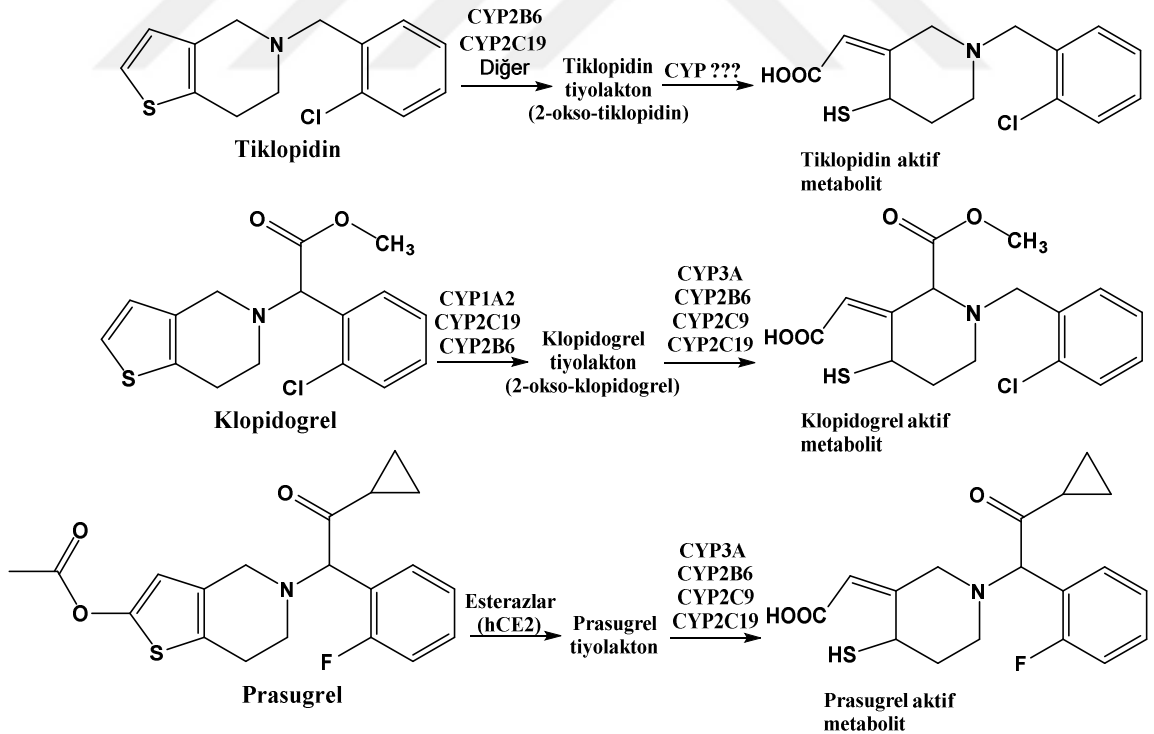
- 1) prodrugin metabolizmasına duyulan ihtiyaç yüzünden antiplatelet etki gecikir;
- 2) trombosit inhibisyonunda bireyler arası önemli değişiklikler vardır;
- 3) P2Y₁₂'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe etme kabiliyeti, postoperatif kanama komplikasyon insidansı, Klopidoğrel ile tedavi edilmemiş hastalardan daha yüksek olduğu için, koroner bypass (CABG) ameliyatı yapılması gereken hastalar için bir problem teşkil edebilir.

Klopidoğrel'in etki başlangıcı hastalara 300 ila 600 mg'lık bir yükleme dozu vererek hızlandırılabilse de, diğer iki problemin çözümü daha zor görünmektedir (254).

Klopidoğrel yanıtının bireyler arası değişkenliği klinik açıdan önemli bir konudur, öyle ki zayıf cevap verenlerin büyük kardiyovasküler olaydan yeterince korunmadığı gösterilmiştir (255). Tedavi edilen hastaların yaklaşık üçte birinde P2Y₁₂'ye bağlı platelet fonksiyonunun yeterli inhibisyonu görülmemektedir, bu durum CYP'nin fonksiyon eksikliği mutasyonlarıyla ilişkilidir (256-258), P-glikoproteinini kodlayan bir gen olan ABCB1'in homozigot 3435C→T mutasyonu ile (akış pompası P-glikoproteinini kodlayan bir gen) tiylenopiridin absorpsiyonunda yer alan anahtar bir proteindir (240, 259, 260), proton pompa inhibitörleri gibi ortak yardımcı ilaçlarla negatif etkileşim yoluyla daha da kötüleşebilir (258).

2.6.8. P2Y₁₂ İnhibisyonunun Farmakokinetiği

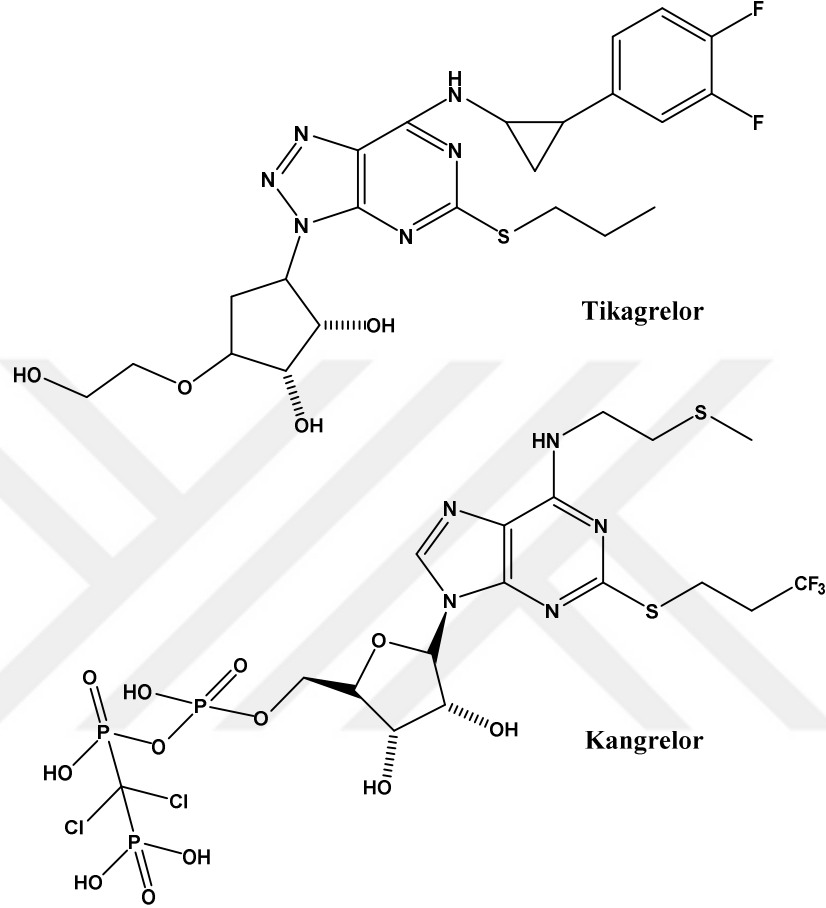
Klopidogrel ve Prasugrel gibi tiyenopiridinler, trombosit reaktivitesini azaltmak için *in vivo* hepatic sitokrom P450 (CYP) enzimleri ile aktif metabolitlerine dönüştürmeyi gerektiren ön ilaçlardır. Klopidogrel, CYP enzimleri, özellikle CYP2C19 ile iki metabolik adımda aktif metabolitine dönüştürülür (29). Dolayısıyla, Klopidogrel'in aktif metabolitinin üretilmesi, CYP2C19'u etkileyen ilaçlar (30) ve CYP2C19 geninin fonksiyon kaybı polimorfizmleri tarafından etkilenir (31). Bunun aksine, Prasugrel plazma esterazlarla ara formuna dönüştürülür ve aktif metabolitini oluşturmak için sadece bir CYP aracılı adım gerektirir ve CYP2C19'a bağımlılık azdır (33, 34). Klopidogrel ve Prasugrel'in aktif metabolitleri yapısal olarak çok benzer (fakat özdeş değildir) iken, Prasugrel'in Klopidogrel ile karşılaştırıldığında daha etkili ve kapsamlı metabolizması, Prasugrel'in aktif metabolitinin daha yüksek ve daha tutarlı bir şekilde üretilmesine neden olur (261). Sonuç olarak, Prasugrel'in farmakokinetik özellikleri, CYP2C19'u etkileyen ilaçlarla (30) veya CYP2C19'ın genetik polimorfizmlerinden önemli ölçüde etkilenmez (31).



Şekil 2.13. Tiklopidin, Klopidogrel ve Prasugrel'in biyotransformasyonları (240)

Tiyenopiridinlerin aksine, Tikagrelor direkt olarak etkindir ve bu nedenle trombosit reaktivitesini azaltmak için aktif bir metabolite dönüştürme gerektirmez ve

böylece öngörülebilir bir farmakokinetik profil elde edilmiş olur (37). Bununla birlikte, Tikagrelor CYP3A ile en az 10 farklı aktif metabolite (bazıları Tikagrelor ile eş değerlidir) dönüştürülür ve bu nedenle CYP3A inhibitörleri ile ilaç-ilaç etkileşimi görülür (38).



2.6.9. P2Y₁₂ İnhibisyonunun Farmakodinamiği

Klopidogrel ve Prasugrel'in aktif metabolitleri P2Y₁₂ reseptörlerine kovalent bağlanır ve trombosit ömrü boyunca, yaklaşık 10 gün süren geri dönüşümsüz inhibisyona neden olur. Yeni, engellenmiş trombositler sürekli olarak üretildiğinden trombosit fonksiyonu, Klopidogrel ve Prasugrel kesilmesinden yaklaşık 5-7 gün sonra düzelir (262). Buna karşılık, Tikagrelor, yaklaşık 72 saat içinde trombosit inhibisyonunun daha hızlı dengelenmesine neden olan geri dönüşlü P2Y₁₂ inhibitörüdür (263). Tikagrelor'un çabuk dengelenmesi potansiyel olarak P2Y₁₂ inhibisyonunun Klopidogrel'e göre daha kısa bir kesintiye izin vermesine rağmen, teorik olarak cerrahiden hemen öncesine kadar P2Y₁₂ inhibisyonunu sürdürmek cazip olur. BRIDGE çalışmasında, tiyenopiridin kesildikten sonra Kangrelor tedavisinin, kanamayı

arttırmadan ameliyat öncesi aralıktaki trombosit reaktivitesini azaltabildiği belirtilmiştir (264). Yakın zamanda Tikagrelor için bir antidot geliştirildi ve etkinliği şu anda test edilmektedir (265).

2.6.10. P2Y₁₂ İnhibitörlerinin Diğer Platelet İnhibitörleri İle Kombinasyonu

Platelet P2Y₁₂ inhibitörleri, rutin olarak düşük dozda Aspirin ile kombine olarak 75-100 mg optimal dozda kullanılır (266). Bununla birlikte, Prasugrel veya Tikagrelor gibi güçlü bir P2Y₁₂ inhibitörü kullanıldığında Aspirin'in her durumda hala gerekli olup olmadığı bilinmemektedir (25).

GLOBAL LEADERS (NCT01813435) çalışması ile rastgele PKG hastalarının Tikagrelor ile Aspirin'i kombine olarak 1 ay, ardından da sadece Tikagrelor ile 23 aylık normal tedavi stratejisiyle (12 aylık ikili antitrombosit tedavi sonrası, takiben tek başına Aspirin) araştırması yapılmıştır. Üçüncü bir antiplatelet ilacın Aspirin'e ve P2Y₁₂ inhibitörüne eklenip eklenememesine ilgi duyulmaktadır. Trombin reseptör inhibitörü Vorapaksar başlangıçta bu rolde bir potansiyel göstermiş fakat ne yazık ki AKS hastalarında acilen başlatıldığında istenmeyen kardiyovasküler olay riskini önemli ölçüde azaltamamış ve intrakraniyal hemoraji de dahil olmak üzere kanama riskini arttırmıştır (267). Bununla birlikte, Proteaz-aktive reseptör-1 (PAR-1) antagonisti antiagregan Vorapaksar, FDA tarafından ikincil önleme terapisi olmak üzere antiplatelet diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanımı için onaylanmıştır. Heptinstall ve ark. tarafından prostaglandin E reseptör 3 (EP3) antagonisti DG-041, Aspirin ve P2Y₁₂ inhibitörleri ile birlikte umut verici bir trombosit inhibitörü olarak tanımlanmıştır (268-270).

Gelecekte Aspirinin bu ilişkide daha az rol oynayabileceği halde, Aspirin ve etkili bir P2Y₁₂ inhibitörü ile birlikte ikili antiplatelet tedavinin kullanıldığı stratejiler halen büyük ivme kazanmaktadır (25).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

ADP	Sigma-Aldrich, Almanya
AKT/ERK Ölçüm Kiti	eBioscience, Amerika
Antiplatelet Ölçüm Kiti	CUSABIO, Amerika
Aseton	Sigma-Aldrich, Almanya
BrdU kiti	Roche, Almanya
Dekstroz	Sigma-Aldrich, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	Sigma-Aldrich, Almanya
DMEM	Sigma-Aldrich, Almanya
DMSO	Sigma-Aldrich, Almanya
EDTA	Sigma-Aldrich, Almanya
EGTA	Sigma-Aldrich, Almanya
Epinefrin	Sigma-Aldrich, Almanya
Etanol	Tekim, Türkiye
Eter	Sigma-Aldrich, Almanya
Etil Asetat	Sigma-Aldrich, Almanya
Fetal Bovine serum	Capricorn, Güney Amerika
GpIIb/IIIa Ölçüm ve VASP Ölçüm Kiti	Elabscience, Amerika
İndometasin	Cayman Chemical, Amerika
İTK plağı	Merck, Almanya
Kloroasetil klorür	Merck, Almanya
Kollajen	Sigma-Aldrich, Almanya
Maleik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
MCF-7 Hücre Hattı	ATCC, Amerika
MTT Boyası	Sigma-Aldrich, Almanya
NIH3T3 Hücre Hattı	ATCC, Amerika
Okzalik asit dihidrat	Sigma-Aldrich, Almanya
PBS	Gibco, İngiltere
Petrol Eteri	Merck, Almanya
PGE ₁	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum karbonat	Merck, Almanya

Potasyum klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Prasugrel (Sentez)	Abdi İbrahim İlaç, Türkiye
Prasugrel (Standart)	Sigma-Aldrich, Almanya
RPMI	Sigma-Aldrich, Almanya
Sitrik asit (Sentez)	Carlo Erba, Fransa
Sitrik asit (<i>In vivo</i>)	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum bikarbonat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Streptozotosin	Sigma-Aldrich, Almanya
Tetrahidrofur	Merck, Almanya
<i>trans</i> -1,2-Sikloheksandikarboksilik asit	Abcr, Almanya
Trietilamin	Merck, Almanya
Tripsin	Sigma-Aldrich, Almanya
Trometamol	Sigma-Aldrich, Almanya
TxB ₂ ve cAMP Ölçüm Kiti	Cayman Chemical, Amerika

3.2. Metot

3.2.1. Analitik Yöntemler

3.2.1.1. İTK Çalışmaları

Sentez çalışmalarında reaksiyonların kontrolü İTK ile gerçekleştirilmiştir. Belli zaman aralıkları ile reaksiyon ortamlarından alınan numuneler ve sentezlerde kullanılan başlangıç maddelerinin metanoldeki çözeltileri adsorban olarak seçilen slikajel 60 F254 kaplı, önceden uygun çözücü karışımları ile doyurulmuş alüminyum plaklara kılcal boru yardımıyla tatbik edilmiş ve hareketli fazlar içerisinde sürüklenmesi sağlanmıştır. Lekelerin saptanmasında, ultraviyole ışığı (UV/254-366nm) kullanılmıştır. İTK sonucuna göre reaksiyonlara yön verilmiş ve nihayetinde sonlandırılmıştır. Sentezlerin kontrolü için hareketli faz olarak Diklorometan:Metanol (99:1) veya Kloroform:Metanol (9:1) kullanılmıştır.

3.2.1.2. Erime Noktalarının Tespiti

Sentezlenen bileşiklerin erime noktaları MP90 digital melting point apparatus (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) kullanılarak tespit edilmiştir. Bir ucu kapalı

kılcal borulara 0.5cm kadar konulan sentez sonuç bileşikleri cihazın haznelere yerleştirilmiş ve erime dereceleri gözlenerek kaydedilmiştir.

3.2.1.3. FT-IR Spektrumlarının Alınması

Sentezlenen bileşiklerin IR spektrumları Shimadzu-IR Affinity-IS (Shimadzu, Tokyo, Japan) cihazı kullanılarak elde edilmiştir. IR spektrofotometresi ATR (The PIKE MIRacle™, PIKE Technologies, Madison, WI, USA) ataçmanına toz maddeler uygulanarak spektrumlar çekilmiştir.

3.2.1.4. ¹H-NMR Spektrumlarının Alınması

Sentezlenen bileşiklerin ¹H-NMR spektrumları DMSO-*d*₆ içindeki çözeltilerinin, tetrametilsilana (TMS) karşı Bruker (Bruker Bioscience, Billerica, MA, USA) 300 MHz'lik NMR spektrometresine uygulanması sonucu alınmıştır.

3.2.1.5. ¹³C-NMR Spektrumlarının Alınması

Sentezlenen bileşiklerin ¹³C-NMR spektrumları DMSO-*d*₆ içindeki çözeltilerinin, tetrametilsilana (TMS) karşı Bruker (Bruker Bioscience, Billerica, MA, USA) 75 MHz'lik NMR spektrometresine uygulanması sonucu alınmıştır.

3.2.1.6. Kütle Spektrumlarının Alınması

Sentezlenen bileşiklerin kütle spektrumları, numunelerin asetonitril:su içerisindeki çözeltilerinin Shimadzu 8040 LCMSMS (Shimadzu, Tokyo, Japan) cihazına enjekte edilmesi ve ESI (elektron spre y iyonizasyon) iyonlaştırma tekniği kullanılması ile negatif ve pozitif modda alınmıştır.

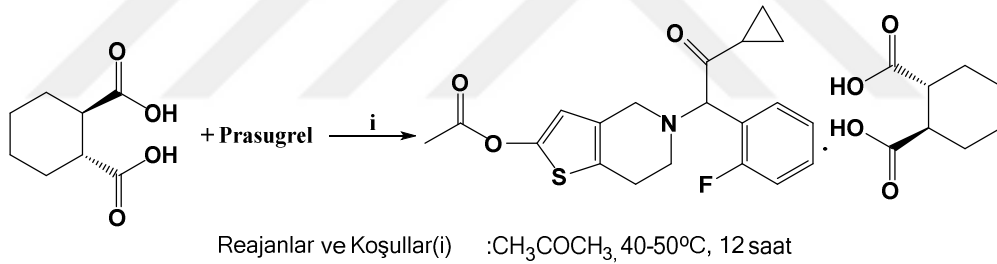
3.2.1.7.Elementel Analiz

Sentezlenen bileşiklerin elementel analiz sonuçları, Leco CHNS-932 (LECO Corporation, Saint Joseph, USA) cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.2. Sentez Yöntemi

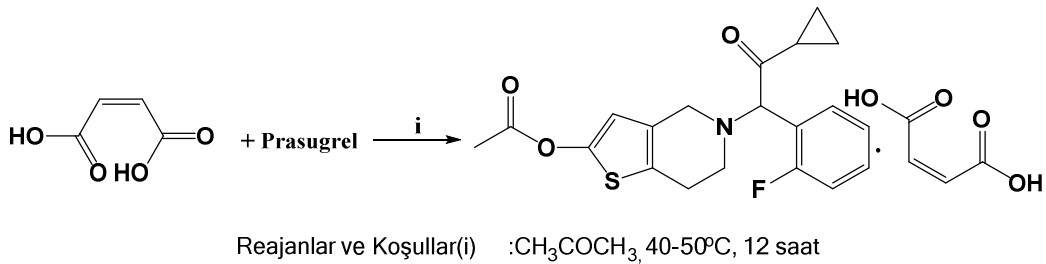
Yapılan çalışmalarda başlangıç maddesi olarak kullanılan karşıt iyon, tuz oluşturmak için anyonik asitlerde Prasugrel üzerindeki azotu kuarternize etmek üzere 1:1 oranda, katyonik bazda 1:2 oranında balona eklenmiş, aseton içerisinde çözülerek 12 saat süresince 50°C'de ısıtılarak, ışıktan korunmak suretiyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Her bir asit için 0.6 mmol (225 mg) Prasugrel alınmış, oluşan tuzlar için verim karşılaştırılması yapılmıştır. Deneyin sonlandığı İTK'dan anlaşılmış, çözücü oda ısısında uçurulduktan sonra maddeler eter içerisinde çöktürülmüş ve oluşan çökeltiler süzülerek ayrılmıştır. Çökeltiler 24 saat süre kurumaya bırakılmış, oluşan tuzlar FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-MS spektral verileri ve elementel analiz sonuçları kullanılarak yapıları aydınlatılmıştır. Sentezlenen Prasugrel tuzlarının genel yapıları, yüzde verimleri, erime dereceleri, moleküler kütleleri ve formülleri **Tablo 3.1**'de gösterilmiştir.

3.2.2.1. Prasugrel *trans*-1,2-Sikloheksan dikarboksilat (1a)



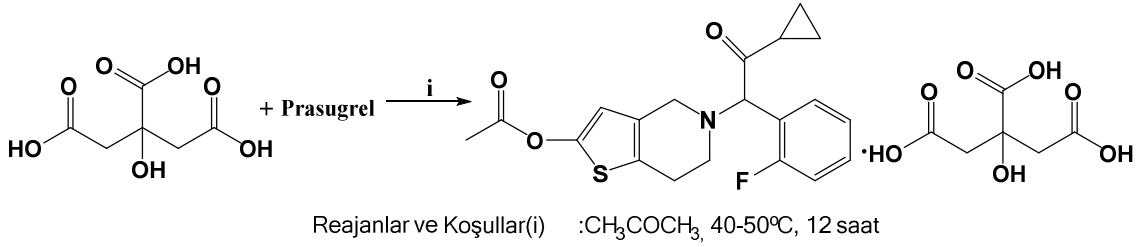
0,6 mmol Prasugrel ve 0,6 mmol *trans*-1,2-Sikloheksan dikarboksilik asit asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat süreyle ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Kirli beyaz renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 122.2°C, Verim: %88.

3.2.2.2. Prasugrel maleat (2a)



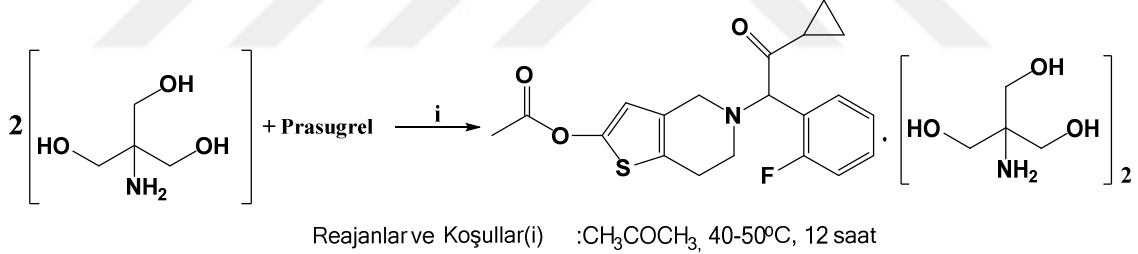
0,6 mmol Prasugrel ve 0,6 mmol maleik asit asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat süreyle ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Kirli beyaz renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 162.7°C, Verim: %85.

3.2.2.3. Prasugrel sitrat (3a)



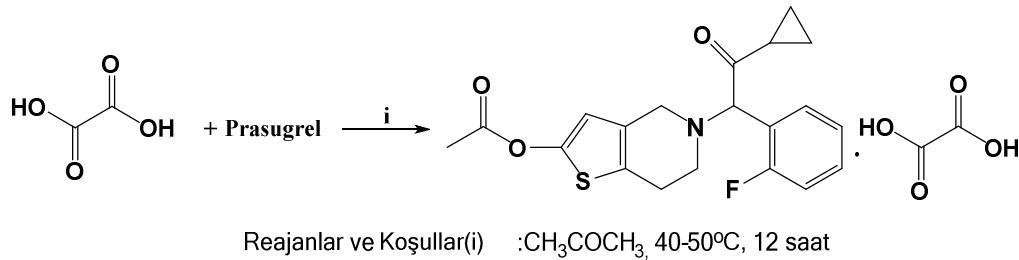
0,6 mmol Prasugrel ve 0,6 mmol sitrik asit asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat süreyle ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Kirli beyaz renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 104.8°C, Verim: %62

3.2.2.4. Prasugrel trometamol tuzu (4a)



0,6 mmol Prasugrel ve 1,2 mmol trometamol asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat süreyle ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Açık kahve renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 110-113°C, Verim: %56.

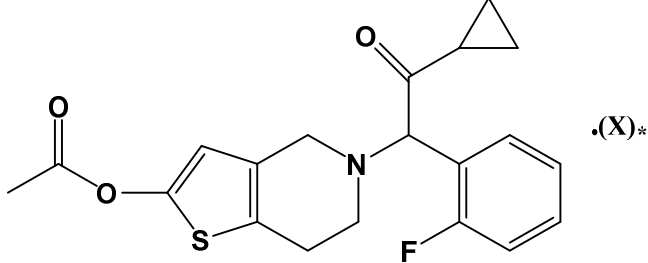
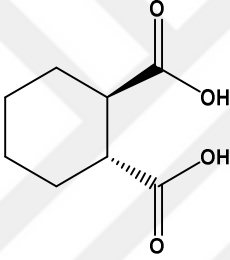
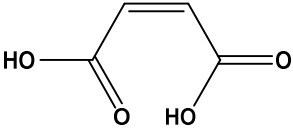
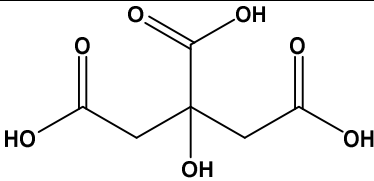
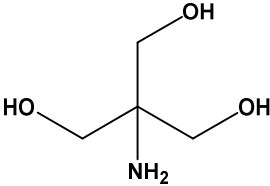
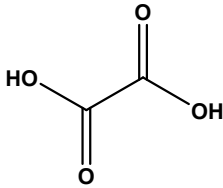
3.2.2.5. Prasugrel oksalat (5a)



0,6 mmol Prasugrel ve 0,6 mmol *trans*-1,2-sikloheksan dikarboksilik asit asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat

süreyle ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Kirli beyaz renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 118.3°C, Verim: %80.

Tablo 3.1. Sentezlenen Prasugrel tuzlarının genel yapıları, yüzde verimleri, erime dereceleri, moleküler kütleleri ve formülleri

Tuz	X	* Verim (%)	M. A.	E. D. (°C)	Moleküler Formül
					
1a		1 88	545.6224	122.2	C ₂₈ H ₃₂ FNO ₇ S
2a		1 85	489.5144	162.7	C ₂₄ H ₂₄ FNO ₇ S
3a		1 62	554.558	104.8	C ₂₆ H ₂₈ FNO ₁₀ S
4a		2 56	615.7144	112 dekom.	C ₂₈ H ₄₂ FN ₃ O ₉ S
5a		1 80	463.4764	118.3	C ₂₂ H ₂₂ FNO ₇ S

3.2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.2.3.1. *In Vivo-Ex vivo* Antiplatelet Aktivite Tayini

Bileşiklerin *in vivo-ex vivo* antiplatelet aktivite tayinleri İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Hayvan deneyleri için 2013/A-39 sayılı etik kurul onayı alınmıştır (EK.1.).

Materyal:

In vivo-ex vivo antiplatelet aktivite tayin çalışmalarında, trombosit indüksiyonu için referans endojen stimülatör ajanlar olarak bilinen ADP, kollajen ve epinefrin değişen konsantrasyonlarda uygulanmış ve ölçümlerde Chronolog antiagregan kitleri kullanılmıştır. ELISA ölçümlerinde BioTek Synergy H1 analiz sistemi kullanılmıştır. Süreçte rol oynadığı düşünülen biyomoleküllerden cAMP ve TxB₂ ölçümünde Cayman ELISA kitleri, AKT/ERK ölçümünde eBioscience Immunoassays kitleri, GpIIb/IIIa ve VASP ölçümlerinde Elabscience Bioassays kitleri kullanılmıştır.

Metot:

Önceden hazırlanmış olan metal kafeslere yerleştirilmek üzere 7-8 aylık *Wistar Albino* cinsi ağırlıkları 215±35 g olan ratlar seçilmiş ve her kafeste 10 rat bulunacak şekilde deney grupları oluşturulmuştur. Ratlara içme suyu olarak musluk suyu verilmiş ve *ad libitum* beslenmiştir. 12 saat karanlık 12 saat aydınlık olacak şekilde gün içi aydınlık/karanlık periyodu uygulanmıştır. Çalışma ana hatlarıyla iki temel hayvan grubu ve bu gruplar bünyesinde yer alan alt grupları kapsamaktadır. Temel gruplar nondiyabetik ve diyabetik gruplar olup bu grupların altında ayrı ayrı bileşik uygulanan alt gruplar yer almaktadır. Bu bağlamda nondiyabetik gruplar Kontrol, Prasugrel, 1a, 2a, 3a ve 4a gruplarından oluşurken diyabetik gruplar ise Diyabet, Diyabet+Prasugrel, Diyabet+1a, Diyabet+2a, Diyabet+3a ve Diyabet+4a gruplarından oluşmaktadır.

Streptozotosin (STZ), *Streptomyces achromogenes*'den türetilen ve memelilerdeki pankreasın insülin üreten β hücreleri için özellikle toksik olan doğal olarak oluşan bir kimyasaldır. Tıbbi alanda, Langerhans adacıkları kanserlerini tedavi etmek için kemoterapötik bir ilaç olarak kullanılır ve Tip 1 diyabet için bir hayvan modeli üretmek üzere tıbbi araştırmalarda kullanılır. Ayrıca Gram-negatif bakterilere karşı etkili bir antibiyotiktir. Streptozotosin, DNA sarmallarını alkileme, çapraz

bağlama ile ve aynı zamanda memeli hücre döngüsünün tüm aşamalarını etkileyerek mikroorganizmalarda ve memeli hücrelerinde DNA sentezini engeller. Streptozotosin insanda mutajenik, kanserojen ve muhtemelen teratojeniktir (271).

Diyabetik gruplarda diyabet oluşturulması amacıyla pankreas β hücreleri üzerine seçici sitotoksik etki gösteren streptozotosin pH:4.5 olan sitrat tamponu içerisinde çözülerek 75 mg/kg dozda intravenöz yolla juguler vene enjekte edilmiştir (272). Enjeksiyondan 1 gün sonra 8 saatlik açlık sonrası portabl glukometre cihazı ile ratların açlık kan şekeri düzeyleri ölçülerek 300 mg/dl ve üzerinde AKŞ değerine sahip olanlar diyabetik kabul edilmiştir. AKŞ ölçümlerine gün aşırı devam edilerek ve üç ölçüm sonrası diyabet oluşumu teyid edilmiştir. Diyabetli ratlar 1 ay süresince beslenerek bu süre zarfında diyabete bağlı komplikasyonlar nedeniyle rat kaybı yaşanmaması için STZ enjeksiyonundan sonraki 10. günden itibaren gün aşırı 3U/kg insülin, IP yolla enjekte edilmiştir. 30. günden itibaren sentezlenmiş ve spektral analizleri tamamlanmış olan dört farklı Prasugrel tuzu ve baz Prasugrel %5'lik arap zamkı (gum arabic) içerisinde 37°C'de çözülerek 2 mg/kg/gün dozda üç gün boyunca intragastrik gavaj yoluyla her biri daha önceden ayrılmış olan farklı gruplara uygulanmıştır (273-275). Üç gün boyunca Prasugrel tuzları uygulanmış daha sonra trombositleri aktive etmek amacıyla "kollajen+epinefrin" uygulanmıştır. Böylece, antitrombotik aktivite testlerini uygulamak ve ELISA ölçümlerini gerçekleştirebilmek için kan alınabilecek Kontrol, 1a, 2a, 3a, 4a, Diyabet, Diyabet+1a, Diyabet+2a, Diyabet+3a ve Diyabet+4a rat grupları oluşturulmuştur. Tüm gruplarda yer alan ratlardan, trombus oluşumunun uyarılmasından 6 saat sonra Ketamin/Ksilazin anestezisi altında abdominal aorttan sitratlı tüplere alınan kanlar *in vivo-ex vivo* ölçümlerde kullanılmıştır.

Tam kan örneklerinde viskozite ölçümü, Brookfield Rheometer DV3T sisteminde Cone-Plate aparatı ile gerçekleştirilmiştir. Tam kan örneklerinde antitrombotik aktivite Chrono-Log 560 CA sistemi empedans modunda çalıştırılarak ölçülmüştür (276). Trombositçe zengin plazma (PRP) sitratlı tam kan örneklerinin 200xg'de 10 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilmiş ve 1500xg'de 15 dakika santrifüj edilerek trombositçe fakir plazma (PPP) örnekleri elde edilmiştir. PRP örneklerinde antitrombotik aktivite ölçümleri yine Chrono-Log 560 CA sistemi optik ölçüm modunda çalıştırılarak gerçekleştirilmiştir.

cAMP Tayini: Birçok hücrede, uyarıcı ikinci haberci olarak fonksiyon gören cAMP trombositlerde inhibitör etkiye sahiptir ve adenilat siklaz enziminin aktivitesi ile oluşur. cAMP tayininde biyolojik materyal olarak, antikoagülan madde olan EDTA içeren tüplere konulan tam kan örnekleri kullanılmıştır. Hazırlanan plazmalardaki cAMP düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçülmüş, ölçümlerde 581001 kodlu Cayman ELISA kiti rehberine uygun olarak kullanılmıştır (277, 278).

pAkt ve pERK Tayini: Serin/treonin özgül kinaz olan Akt, protein kinaz B olarak bilinmektedir. Fosforile Akt ve Fosforile ERK tayini için, PRP örnekleri kullanıldı. ERK, mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağının anahtar komponentlerinden biridir. Abdominal aorttan alınan kan örnekleri, 1 mL antikoagülan (ACD, 85 mM trisodyum sitrat, 83mM dekstroz, ve 21mM sitrik asit) içeren test tüplerine aktararak 170xg'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar alınarak 120xg'de 7 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Bu PRP, yıkama tamponu ile 350xg'de 10 dakika iki defa santrifüj edilmiştir. Platelet presipitatları Tyrode tamponu ile (137mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 5.5mM glukoz, 2mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.3mM NaHPO₄, ve pH 7.4) 3x10⁸/mL'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan PRP kullanılarak pAkt/pERK ölçümü ELISA metodu ile gerçekleştirilmiş ve ölçümlerde 85-86014-11 kodlu Akt/Erk Activation InstantOne™ ELISA kiti rehberine uygun olarak kullanılmıştır (279).

TxB₂ Tayini: TxB₂, birçok hücrede araşidonik asitten üretilir, irreversibl platelet aktivasyonuna neden olur. TxB₂, indometazin içeren EDTA'lı tüplere konulan kan örneklerinin plazmalarında ölçüm ELISA yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve ölçümlerde 501020 kodlu Cayman ELISA kiti rehberine uygun olarak kullanılmıştır (280).

Platelet membran GpIIb/IIIa ve VASP Tayini: GpIIb/IIIa fibrinojen reseptörü olarak bilinmektedir. Trombositlerin ADP ile uyarılması fibrinojen reseptörünün ekspresyonuna yol açmaktadır. VASP, insan plateletlerinde cAMP bağımlı protein kinaz yolağı için major substrattır. GpIIb/IIIa ve VASP tayini için PRP kullanılmıştır. Abdominal aorttan alınan kan örnekleri, 1 mL antikoagülan (ACD, 85 mM trisodyum sitrat, 83mM dekstroz ve 21mM sitrik asit) içeren test tüplerine aktararak 170xg'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar alınarak 120xg'de 7 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Bu PRP, yıkama tamponu ile 350xg'de 10 dakika iki defa santrifüj edilmiştir. Platelet presipitatları Tyrode tamponu ile (137mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 5.5mM glukoz, 2mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.3mM NaHPO₄ ve pH 7.4) 3x10⁸/mL'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan PRP kullanılarak GpIIb/IIIa ölçümü ELISA metodu ile

gerçekleştirilmiş ve GpIIb/IIIa ölçümlerinde E-EL-R0760 kodlu ve VASP ölçümlerinde E-EL-R1207 kodlu Elabscience® Bioassays kitleri rehberlerine uygun olarak kullanılmıştır.

Ex vivo Analizler: Çalışma sonunda ratlardan sitratlı tüplere alınan tam kan örneklerinde kollajen, epinefrin ve ADP ile aktivasyon sonrası oluşan agregasyon ve sentezlenen tuzların antiplatelet etkisi Chrono-Log Agregometre sistemi ile literatüre uygun olarak değerlendirilmiştir (276, 281).

İstatistiksel Çalışmalar:

In vivo-ex vivo çalışmamızdan elde edilen ham veriler önce kullanılan kit rehberine uygun olarak işlenmiş veriler ve standart grafikler haline getirilerek, her bir grubun her bir parametresi için hesaplamalar sonrası elde edilen işlenmiş veriler, grup sayısı, denek sayısı ve normal dağılıma uygunluk gibi kriterler göz önünde bulundurularak belirlenen istatistiksel yöntemlerle analiz edilmiştir. Denek setlerimizden elde edilen verilerin önce normal dağılıma uygunluğu test edilmiş bu verilerin normal dağılıma uygunluk göstermediği tespit edildikten sonra, ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U Test'i, çoklu grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis Test'i kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2. In Vitro Antiplatelet Aktivite Tayini

Bileşiklerin *in vitro* antiplatelet aktivite tayinleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Materyal:

In vitro antiplatelet aktivite tayin çalışmalarında, E12816h kodlu CUSABIO ELISA kiti rehberine uygun olarak kullanılmıştır.

Metot

***In Vitro* Antiplatelet Aktivitenin Araştırılması:**

Bu kitte sağlanan mikrotitrasyon plakası trombosit antijeni ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler Horseradish Peroksidaz (HRP) ile

birleştirilmiş antiplatelet antikoru bulunan uygun mikrotiter plaka oyuklarına eklenip iyice karıştırılarak inkübe edilmiştir. (Numunelerde antiplatelet antikoru miktarı ne kadar fazla olursa, HRP ile birleştirilmiş antiplatelet antikoru önceden kaplanmış platelet antijenine bağlanır.) Daha sonra 3,3',5,5'-tetrametil benzidin (TMB) substrat solüsyonu her oyuğa eklenmiş ve renk, numunedeki antiplatelet antikorunun miktarının tersine gelişmiştir. Renk gelişimi durduktan sonra rengin yoğunluğu ölçülmüştür.

- Kuyucuk başına 50 µl numune, standart ve her kuyucuğa hemen 50 ul HRP-konjugatı eklenerek plaka hafifçe 60 saniye sallanmıştır.
- Daha sonra 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.
- Her kuyu aspire edildi ve 200 ul yıkama Tamponu ile doldurularak yıkanmış, yıkama işlemi beş kez tekrarlanmıştır. Son yıkamadan sonra, kalan tüm yıkama tamponu aspire edilerek veya süzülerek çıkarılmıştır.
- Her oyuğa 90 µl TMB substratı eklenmiş 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir.
- En düşük konsantrasyon standartları içeren son dört kuyucukta bariz mavi renk oluştuğunda, her oyuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir.
- 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropalak okuyucu kullanarak, her kuyunun optik yoğunluğu 15 dakika içinde belirlenmiştir.

3.2.3.3. *In Vitro* Antikanser Aktivite Tayini

Bileşiklerin antikanser aktivite tayinleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Materyal:

Bileşiklerin antikanser aktivitesinin araştırılmasında MCF-7 (İnsan meme adenokarsinoma hücre dizisi) ve antikanser aktivitenin selektivitesini değerlendirmek üzere NIH3T3 (fare embriyo fibroblast hücre dizisi) hücre dizileri kullanılmıştır. Besiyeri olarak fetal calf serum, 100 IU/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin ilave edildi. MCF-7 hücre dizisi için RPMI 1640, NIH3T3 hücre dizisi için DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılmıştır. Sentezlenen tuzların antikanser etkinliklerinin kıyaslanabilmesi amacı ile günümüzde kanser tedavisinde rutin olarak kullanılan Doksorubisin kullanılmıştır.

MTT Yöntemi ile Sitotoksik Aktivitenin Araştırılması:

Tetrazolium tuzları XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolum-5-karboksianilit tuzu) ve MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromür) canlı hücrelerde metabolik aktivitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Bu tuzlar metabolizma ve solunum zinciri intakt hücrelerinde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile formazana dönüşmektedir. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz sarı renkli tetrazolyum tuzunu turuncu renkli formazana dönüştürmektedir (282).

Metot

Hücrelerin Çoğaltılması:

Kullanılan MCF-7 ve NIH3T3 hücre dizilerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2-3 günde bir pasajlama yapılmıştır.

- İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesini sağlamak için çalkalanmış ve steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır.
- Hücrelerin yıkanması için kültür şişesine 5 ml fosfat tamponu ilave edilmiş daha sonra yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Kültür şişesine tripsin EDTA çözeltisi (1X) (75 cm²'lik kültür şişelerine 3-5 ml, 25 cm²'lik 1-3 ml) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk. bekletilmiştir (37°C, %95 nem ve %5 CO₂).
- İnkübatörden alınan kültür şişelerinin üzerine 20-25 ml besiyeri ilave edilerek hücreler süspanse edilmiş ve 1:2, 1:3 bölünerek yeni kültür şişelerine alınmıştır.
- Kültür şişeleri inkübasyona bırakılmıştır (37°C, %95 nem ve %5 CO₂).

MTT Sitotoksosite Testi Uygulaması:

24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bileşiklerin 0.000316 mM-1 mM 8 seri konsantrasyonu (DMSO) pozitif kontroller ile birlikte plakalara uygulanmış daha sonra 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (37°C, %95 nem ve %5 CO₂).

- Hücreler fosfat tamponu ile yıkanmış sonrasında yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır.

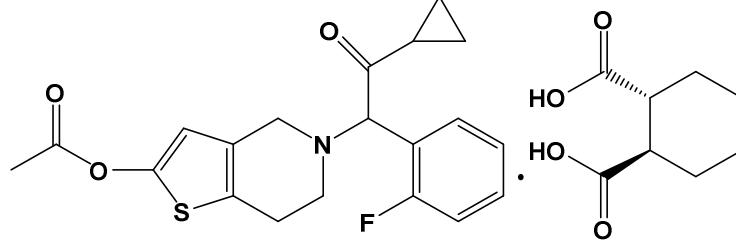
- MTT çözeltisi (5 mg/ml) ve besiyeri 1:10 oranında karıştırılmış, hücre kültür plakasına 100µL/kuyucuk olacak şekilde çözelti karışımından ilave edilerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır (37°C, %95 nem ve %5 CO₂).
- Hücre kültür plakasına DMSO çözeltisinden 100 µL/kuyucuk olacak şekilde ilave edilmiş ve kuyucukların ELISA'da 540 nm'de OD değerleri okunmuştur.
- Test maddelerinin her bir konsantrasyonu için yüzde (%) inhibisyon değerleri hesaplanmıştır (283, 284). Sitotoksik aktivitenin selektivitesinin değerlendirilmesi için bileşiklerin hücre dizisine karşı elde edilen IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bileşiklerin her biri için selektivite indeksi (NIH3T3 hücre dizisi IC₅₀ değeri/Kanser hücre dizisi IC₅₀ değeri) hesaplanamamıştır. Bu değer 1'den ne kadar büyük olduğu bileşiklerin antikanser aktivitelerinin değerini ortaya koymaktadır (285, 286).

4. BULGULAR

4.1. Kimyasal Çalışmalar

4.1.1. Sentezlenen Tuzlar

4.1.1.1. Prasugrel *trans*-1,2-Sikloheksan dikarboksilat (1a)



0,6 mmol Prasugrel ve 0,6 mmol *trans*-1,2-Sikloheksan dikarboksilik asit asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat süreyle ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Kirli beyaz renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 122.2°C, Verim: %88.

İnce tabaka kromatografisinde UV ışığı altında 254 nm'de floresan zeminde mor renk verir.

IR spektrumunda (ν cm⁻¹, ATR), 3327 (O-H gerilim, yayvan), 3053 (aromatik C-H gerilim), 2954-2920 (alifatik C-H gerilim, sikloheksan alifatik C-H gerilim), 2567 (iyonik NH gerilim, yayvan), 1757 (karboksilat C=O gerilim), 1689 (siklopropil karbonil C=O gerilim, karboksilik asit C=O gerilim), 1489 (C-H bükülme), 1415 (C-F gerilim), 1311 (C-N gerilim), 1209 (C-O gerilim), 1126-1089 (=C-H düzlem içi bükülme), 921 (=C-H düzlem dışı bükülme) ve 758 (C-S gerilim) pikleri görülür.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.80-0.90 (4H, m, Siklopropil CH₂), 1.69 (4H, yayvan s, Sikloheksan CH₂), 1.94 (4H, yayvan s, Sikloheksan CH₂), 2.26 (2H, Sikloheksan CH), 2.35-2,37 (4H, s, CH₃-CH), 2.72-2.81 (4H, m, Tiyenopiridin CH₂), 3.43 (2H, s, Tiyenopridin CH₂), 4.79 (1H, s, CH), 6.45 (1H, s, Tiyenopridin CH), 7.23-7.29 (2H, m, Florofenil CH), 7.38-7.43, (1H, m, Florofenil CH), 7.49-7.54, (1H, m, Florofenil CH), 12.11 (2H, s, HO-C=O, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.7 (Siklopropil CH₂), 12.1 (Siklopropil CH₂), 18.2 (CH₃), 20.9 (CH₂), 25.1 (Siklopropil CH), 25.4 (sikloheksan CH₂), 29.0 (sikloheksan CH₂), 44.8 (sikloheksan CH), 48.4 (CH₂), 50.3 (CH₂), 72.0 (CH), 112.8 (Tiyenopridin CH), 116.3 (d, *J*= 22.3 Hz, Florofenil CH), 122.5 (d, *J*= 14.2 Hz, Florofenil CH), 125.2 (d, *J*= 2.9 Hz, Florofenil CH), 125.9 (Tiyenopridin C), 129.8

(Tiyenopridin C), 130.6 (d, $J= 8.3$ Hz, Florofenil C), 131.2 (d, $J= 3.6$ Hz, Florofenil CH), 149.1 (Tiyenopridin C), 161.1 (d, $J= 244.1$ Hz, Florofenil C), 168.3 (O-C=O), 176.6 (sikloheksan C=O), 207.9 (C=O).

Mass (m/z): ESI-MS $[M + H]^+$: 374.2 (100%)

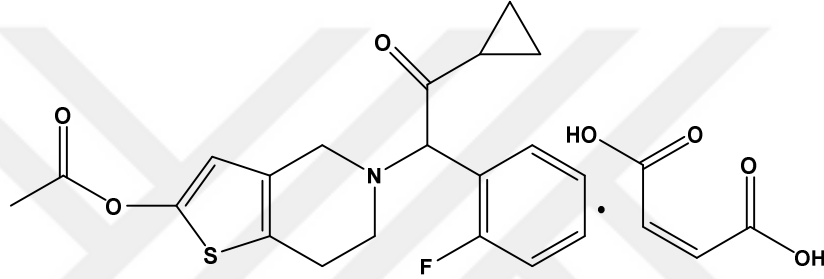
Analiz: C₂₈H₃₂FNO₇S için, M.A. 545.6224

%C %H %N %S

Hesaplanan: 61.64 5.91 2.57 5.88

Bulunan : 61.56 5.589 2.891 6.271

4.1.1.2. Prasugrel maleat (2a)



0,6 mmol Prasugrel ve 0,6 mmol maleik asit asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat süreyle ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Kirli beyaz renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 162.7°C, Verim: %85.

İnce tabaka kromatografisinde UV ışığı altında 254 nm'de floresan zeminde mor renk verir.

IR spektrumunda (ν cm⁻¹, ATR); 3097 (aromatik C-H gerilim), 2960 (alifatik C-H gerilim), 2453 (iyonik NH gerilim, yayvan), 1780 (karboksilat C=O gerilim), 1757 (karboksilik asit karbonil C=O gerilim), 1710 (siklopropil karbonil C=O gerilim), 1479 (C-H bükülme), 1456 (C-F gerilim), 1348 (C-N gerilim), 1233 (C-O gerilim), 1126 (=C-H düzlem içi bükülme), 875 (=C-H düzlem dışı bükülme) ve 783-773 (C-S gerilim) pikleri görülür.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.87-0.89 (4H, m, CH₂), 2.26 (4H, yayvan s, CH₃-CH), 2.79-2.92 (4H, m, CH₂), 3.57 (2H, s, CH₂), 5.06 (1H, s, CH), 6.22 (2H, s, Maleik Asit CH), 6.47 (1H, s, Tiyenopridin CH), 7.27-7.34 (2H, m, Florofenil CH), 7.45-7.54, (2H, m, Florofenil CH), 13.49 (1H, yayvan s, NH).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 12.0 (Siklopropil CH_2), 12.3 (Siklopropil CH_2), 18.6 (CH_3), 20.9 (CH_2), 24.5 (Siklopropil CH), 48.7 (CH_2), 50.2 (CH_2), 71.5 (CH), 112.8 (Tiyenopridin CH), 116.5 (d, $J= 22.1$ Hz, Florofenil CH), 121.3 (Florofenil CH), 125.4 (d, $J= 3.0$ Hz, Florofenil CH), 125.6 (Tiyenopridin C), 128.8 (Florofenil CH), 131.3 (Florofenil C), 131.5 (Tiyenopridin C), 131.8 (Maleik Asit CH), 149.4 (Tiyenopridin C), 161.2 (d, $J= 244.8$ Hz, Florofenil C), 167.3 (Maleik Asit $\text{C}=\text{O}$), 168.3 ($\text{O}-\text{C}=\text{O}$), 206.9 ($\text{C}=\text{O}$).

Mass (m/z): ESI-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 374.2 (100%)

Analiz: $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{FNO}_7\text{S}$ için, M.A. 489.5144

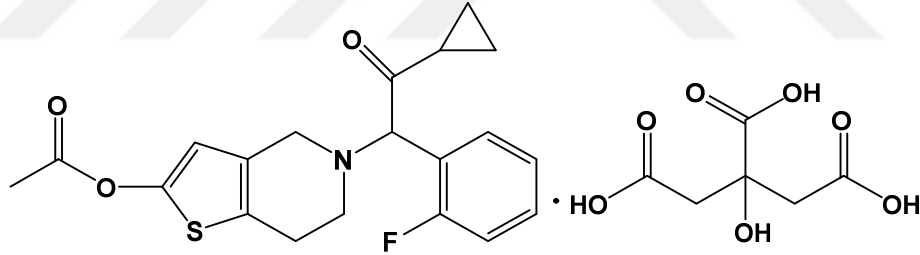
%C	%H	%N	%S
----	----	----	----

Hesaplanan:	58.89	4.94	2.86	6.55
-------------	-------	------	------	------

Bulunan :	58.98	4.941	2.902	6.259
-----------	-------	-------	-------	-------

Asai ve arkadaşlarının Prasugrel maleat için aldıkları patentde açıkladıkları spektral verilere uygundur (287).

4.1.1.3. Prasugrel sitrat (3a)



0,6 mmol Prasugrel ve 0,6 mmol sitrik asit asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat süreyle ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Kirli beyaz renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 104.8°C, Verim: %62

İnce tabaka kromatografisinde UV ışığı altında 254 nm'de floresan zeminde mor renk verir.

IR spektrumunda ($\nu \text{ cm}^{-1}$, ATR), 3509 (O-H gerilim, yayvan), 3014 (aromatik C-H gerilim), 2943 (alifatik C-H gerilim), 2520 (iyonik NH gerilim, yayvan), 1753 (karboksilat $\text{C}=\text{O}$ gerilim), 1738 (karboksilik asit karbonil $\text{C}=\text{O}$ gerilim), 1703 (siklopropil karbonil $\text{C}=\text{O}$ gerilim), 1585-1492 (C-H bükülme), 1493 (C-F gerilim),

1386 (C-N gerilim), 1190 (C-O gerilim), 1126 (=C-H düzlem içi bükülme), 887 (=C-H düzlem dışı bükülme), 758 (C-S gerilim) pikleri görülür.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ 0.86-0.90 (4H, m, CH₂), 2.26 (3H, s, CH₃), 2.67-2.78 (9H, m, Tiyenopridin CH₂, Siklopropil CH, Sitrik Asit CH₂), 3.44 (2H, s, CH₂), 4.80 (1H, s, CH), 6.45 (1H, s, Tiyenopridin CH), 7.24-7.29 (2H, m, Florofenil CH), 7.38-7.45, (1H, m, Florofenil CH), 7.49-7.54, (1H, m, Florofenil CH), 12.34 (1H, yayvan s, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ 11.7 (Siklopropil CH₂), 12.1 (Siklopropil CH₂), 18.2 (CH₃), 20.9 (CH₂), 25.1 (Siklopropil CH), 43.2 (Sitrik Asit CH₂), 48.4 (CH₂), 50.3 (CH₂), 72.0 (Sitrik Asit C), 72.8 (CH), 112.8 (Tiyenopridin CH), 116.3 (d, $J= 22.2$ Hz, Florofenil CH), 122.5 (d, $J= 13.7$ Hz, Florofenil CH), 125.2 (d, $J= 3.2$ Hz, Florofenil CH), 125.9 (Tiyenopridin C), 129.9 (Tiyenopridin C), 130.7 (d, $J= 8.0$ Hz, Florofenil C), 131.3 (d, $J= 3.5$ Hz, Florofenil CH), 149.5 (Tiyenopridin C), 161.1 (d, $J= 244.0$ Hz, Florofenil C), 168.3 (O-C=O), 171.8 (Sitrik Asit CH₂-C=O), 175.1 (Sitrik Asit C=O), 207.9 (C=O).

Mass (m/z): ESI-MS [M + H]⁺ : 374.2 (100%)

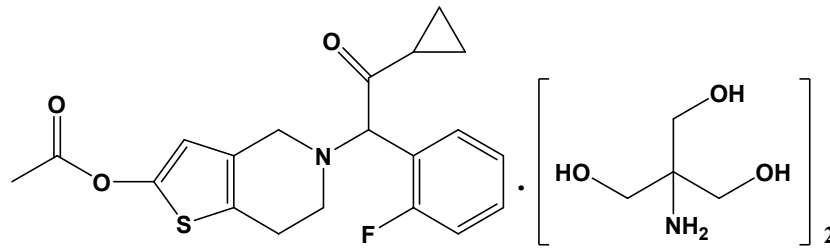
Analiz: C₂₆H₂₈FNO₁₀S için, M.A. 554.558

%C	%H	%N	%S
----	----	----	----

Hesaplanan:	55.22	4.99	2.48	5.67
-------------	-------	------	------	------

Bulunan	: 55.56	5.294	2.663	5.761
---------	---------	-------	-------	-------

4.1.1.4. Prasugrel trometaol tuzu (4a)



0,6 mmol Prasugrel ve 1,2 mmol trometamol asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat süreyle ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Açık kahve renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 110-113°C, Verim: %56.

İnce tabaka kromatografisinde UV ışığı altında 254 nm'de floresan zeminde mor renk verir.

IR spektrumunda (ν cm^{-1} , ATR), 3292 (O-H gerilim, yayvan), 3097 (aromatik C-H gerilim), 2945-2879 (alifatik C-H gerilim), 2505 (iyonik NH gerilim, yayvan), 1755 (karboksilat C=O gerilim), 1703 (siklopropil karbonil C=O gerilim), 1489 (C-H bükülme), 1418 (C-F gerilim), 1375-1369 (trometamol alkan eğilme), 1341-1317 (C-N gerilim), 1217 (C-O gerilim), 1047-1014 (=C-H düzlem içi bükülme), 921 (=C-H düzlem dışı bükülme) ve 758 (C-S gerilim) pikleri görülür.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ 0.85-0.90 (4H, m, CH_2), 2.26 (4H, s, CH_3 , Siklopropil CH), 2.72-2.74 (4H, m, Siklopropil CH_2), 3.24-3.31 (8H, m, Trometamol CH_2), 3.43 (2H, s, Tiyenopridin CH_2), 3.51 (4H, m, Trometamol CH_2), 4.79 (1H, s, CH), 6.44 (1H, s, Tiyenopridin CH), 7.23-7.29 (2H, m, Florofenil CH), 7.38-7.42 (1H, m, Florofenil CH), 7.48-7.51, (1H, m, Florofenil CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ 11.7 (Siklopropil CH_2), 12.1 (Siklopropil CH_2), 18.2 (CH_3), 20.9 (CH_2), 25.1 (Siklopropil CH), 48.4 (CH_2), 50.3 (CH_2), 61.0-63.8 (Trometamol C), 72.0 (CH), 112.8 (Tiyenopridin CH), 116.3 (d, $J= 22.4$ Hz, Florofenil CH), 122.5 (d, $J= 14.2$ Hz, Florofenil CH), 125.2 (d, $J= 3.1$ Hz, Florofenil CH), 125.9 (Tiyenopridin C), 129.9 (Tiyenopridin C), 130.7 (d, $J= 8.2$ Hz, Florofenil C), 131.3 (d, $J= 3.8$ Hz, Florofenil CH), 149.1 (Tiyenopridin C), 161.1 (d, $J= 244.0$ Hz, Florofenil C), 168.3 (O-C=O), 208.0 (C=O).

Mass (m/z): ESI-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$: 374.2 (100%)

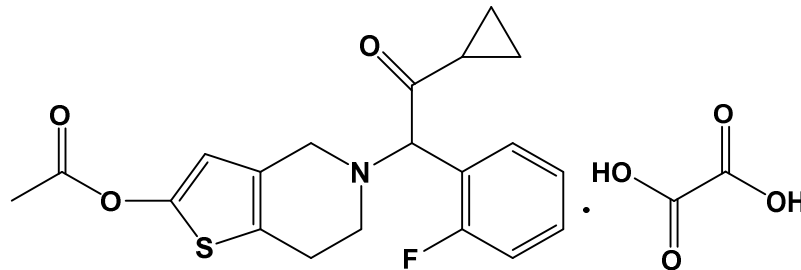
Analiz: $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{FN}_3\text{O}_9\text{S}$ için, M.A. 615.7144

%C %H %N %S

Hesaplanan: 54.62 6.88 6.82 5.21

Bulunan : 54.52 6.540 7.062 5.393

4.1.1.5. Prasugrel oksalat (5a)



0,6 mmol Prasugrel ve 0,6 mmol *trans*-1,2-sikloheksan dikarboksilik asit asetonda çözülür, ışıktan korunarak 40-50°C'de geri çeviren soğutucu altında 12 saat

süreyile ısıtılıp, karıştırılarak sentez edilir. Dietileter ile yıkanarak kurutulur. Kirli beyaz renkte, kristalize bir maddedir. E.d. 118.3°C, Verim: %80.

İnce tabaka kromatografisinde UV ışığı altında 254 nm'de floresan zeminde mor renk verir.

IR spektrumunda (ν cm⁻¹, ATR), 3010 (aromatik C-H gerilim), 2939 (alifatik C-H gerilim), 2517 (iyonik NH gerilim, yayvan), 1775 (karboksilat C=O gerilim), 1751 (karboksilik asit karbonil C=O gerilim), 1710 (siklopropil karbonil C=O gerilim), 1614 (karboksilik asit C=O gerilim), 1492 (C-H bükülme), 1454 (C-F gerilim), 1369 (C-N gerilim), 1192 (C-O gerilim), 1026 (=C-H düzlem içi bükülme), 930 (=C-H düzlem dışı bükülme) ve 765 (C-S gerilim) pikleri görülür.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.86-0.91 (4H, m, CH₂), 1.98 (H, m, CH), 2.27 (3H, s, CH₃), 2.75-2.77 (4H, m, Tiyenopridin CH₂), 3.44 (2H, s, Tiyenopridin CH₂), 4.87 (1H, s, CH), 6.46 (1H, s, Tiyenopridin CH), 7.25-7.31 (2H, m, Florofenil CH), 7.39-7.44, (1H, m, Florofenil CH), 7.49-7.55, (1H, m, Florofenil CH), 13.82 (1H, yayvan s, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.8 (Siklopropil CH₂), 12.1 (Siklopropil CH₂), 18.3 (CH₃), 20.9 (CH₂), 25.0 (Siklopropil CH), 48.5 (CH₂), 50.3 (CH₂), 72.8 (CH), 112.8 (Tiyenopridin CH), 116.3 (d, *J*= 22.2 Hz, Florofenil CH), 122.2 (d, *J*= 14.2 Hz, Florofenil CH), 125.3 (d, *J*= 3.1 Hz, Florofenil CH), 125.8 (Tiyenopridin C), 129.6 (Tiyenopridin C), 130.9 (d, *J*= 8.3 Hz, Florofenil C), 131.3 (d, *J*= 2.8 Hz, Florofenil CH), 149.2 (Tiyenopridin C), 161.1 (d, *J*= 244.3 Hz, Florofenil C), 161.7 (Oksalik Asit C=O), 168.3 (O-C=O), 207.7 (C=O).

Mass (m/z): ESI-MS [M + H]⁺ : 374.2 (100%)

Analiz: C₂₂H₂₂FNO₇S·¹/₃C₄H₁₀O için, M.A. 488.184

%C	%H	%N	%S
----	----	----	----

Hesaplanan:	57.41	5.23	2.87	6.57
-------------	-------	------	------	------

Bulunan :	57.64	5.367	3.106	6.957
-----------	-------	-------	-------	-------

4.2. Antiplatelet Aktivite

4.2.1. *In vivo-Ex vivo* Antiplatelet Aktivite

Prasugrel'in *trans*-1,2-Sikloheksandikarboksilik asit (**1a**) maleik asit (**2a**), Sitrik asit (**3a**) ve Trometamol tuzları (**4a**) ile baz Prasugrel'in deney hayvanlarına uygulanması sonucu elde edilen veriler istatistiksel sonuçlarla beraber tablolar halinde aşağıda verilmiştir.

Normal grup nondiyabetik hayvanlardan ve Kontrol, Prasugrel, 1a, 2a, 3a ve 4a alt gruplarından oluşmaktadır. Diyabetik grup ise diyabetik hayvanlardan ve Kontrol, Prasugrel, Diyabet+1a, Diyabet+2a, Diyabet+3a ve Diyabet+4a alt gruplarından oluşmaktadır.

Tablo 4.1. Tam Kan Viskozite Ölçüm Sonuçları (cP)

Bileşik	N	Normal		N	Diyabet	
		Ortalama	Değişim(%)		Ortalama	Değişim(%)
Kontrol	10	5.572 ± 0.1736 ^{m,h}		10	5.221 ± 0.3356	
Prasugrel	10	5.555 ± 0.1643 ^{m,h}	-0.3051	8	4.7275 ± 0.3137 ^{a,b,c,k}	-9.4522
1a	10	5.793 ± 0.1496 ^{e,h,m,n}	3.9663	10	5.193 ± 0.4398	-0.5363
2a	10	5.3 ± 0.181	-4.8816	10	5.917 ± 0.354 ^{e,h,n}	13.3308
3a	10	5.056 ± 0.1397 ^{c,k}	-9.2606	10	6.627 ± 0.26 ^{a,b,c,f}	26.9297
4a	10	5.483 ± 0.1707 ^m	-1.5973	10	4.948 ± 0.2832 ^{c,k}	-5.2289
Normal		^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05				
Diyabet		^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05				

Tablo 4.2. PRP (%Agr) ve Tam Kan (Ohm) Agregasyon Ölçüm Sonuçları

	Bileşik	N	Normal		Diyabet			
			Ortalama	Değişim(%)	N	Ortalama	Değişim(%)	
PRP Optik Agregasyon Ölçümleri (%Agr)	Kollajen	Kontrol	10	16.9 ± 5.012 ^{b,c,d,e,f,h,i,k,m}	10	33 ± 5.7135		
		Prasugrel	10	3.1 ± 0.3145 ^a	-81.6568	8	6.625 ± 2.7186 ^a	-79.9242
		1a	10	2.1 ± 0.1 ^a	-87.5740	10	5.8 ± 1.3888 ^a	-82.4242
		2a	10	4.6 ± 0.4269 ^a	-72.7811	10	4.9 ± 1.4333 ^a	-85.1515
		3a	10	3.7 ± 0.5385 ^a	-78.1065	10	4.5 ± 1.1475 ^a	-86.3636
	ADP	Kontrol	10	11.3 ± 2.0712 ^{b,c,d,e,f,h,i,k,m}	10	47 ± 6.6816		
		Prasugrel	10	2.9 ± 0.4069 ^a	-74.3363	8	2.75 ± 0.3134 ^a	-94.1489
		1a	10	2.7 ± 0.2603 ^a	-76.1062	10	4.1 ± 1.2689 ^a	-91.2766
		2a	10	2.6 ± 0.6 ^{a,n}	-76.9912	10	2.2 ± 0.1333 ^{a,n}	-95.3191
		3a	10	4 ± 0.5774 ^a	-64.6018	10	2.1 ± 0.1 ^{a,n}	-95.5319
	Epinefrin	Kontrol	10	6.9 ± 0.9939 ^{c,d,g}	10	13.1 ± 1.9462 ^{a,e,f,i,k,n}		
		Prasugrel	10	5.3 ± 0.5385 ^{c,m}	-23.1884	8	9.625 ± 1.375 ^d	-26.5267
		1a	10	12.4 ± 1.4079 ^{a,b,e,f,k,n}	79.7101	10	8.8 ± 1.4283 ^{d,g}	-32.8244
		2a	10	14.3 ± 1.6803 ^{a,f,h,i}	107.2464	10	5.9 ± 0.5667 ^{c,g,m}	-54.9618
		3a	10	6.5 ± 1.0028 ^{c,g}	-5.7971	10	10.5 ± 3.1029 ^{b,k,n}	-19.8473
Tam Kan Empedans Agregasyon Ölçümleri (Ohm)	Kollajen	Kontrol	9	9.8889±1.2522 ^{c,d,e}	10	2.7± 0.5588 ^{c,d,e}		
		Prasugrel	9	8.7778± 0.8784 ^{d,e,i,k}	-11.2358	10	3.4± 0.6 ^{c,d,e}	25.9259
		1a	9	6.7778± 0.894 ^{a,g,h}	-31.4605	10	4.9 ± 1.0269 ^{b,f,n}	81.4815
		2a	9	6 ± 0.6667 ^{a,b,h,m,n}	-39.3259	10	4.6± 0.4761 ^{b,f}	70.3704
		3a	9	6.1111± 0.9923 ^{a,b,g,h,m,n}	-38.2024	10	9± 0.8944 ^{d,e}	233.3333
	ADP	Kontrol	9	1.3333 ± 0.2357	10	1 ± 0 ^m		
		Prasugrel	9	1 ± 0 ^m	-24.9981	10	1 ± 0 ^m	0.0000
		1a	9	1 ± 0 ^m	-24.9981	10	1 ± 0 ^m	0.0000
		2a	9	1 ± 0 ^m	-24.9981	10	1 ± 0 ^m	0.0000
		3a	9	1 ± 0 ^m	-24.9981	10	2.1 ± 0.9 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,k,n}	110.0000
	Epinefrin	Kontrol	9	1 ± 0	10	1.3 ± 0.1528		
		Prasugrel	9	1.2222 ± 0.2222	22.2200	10	1 ± 0	-23.0769
		1a	9	1 ± 0	0.0000	10	1 ± 0	-23.0769
		2a	9	1 ± 0	0.0000	10	1.3 ± 0.3	0.0000
		3a	9	1 ± 0	0.0000	10	1.2 ± 0.1333	-7.6923
4a	9	1 ± 0	0.0000	10	1 ± 0	-23.0769		

Normal ^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05

Diyabet ^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05

Tablo 4.3. cAMP, AKT, ERK, TxB₂, GpIIb/IIIa ve VASP ELISA Ölçüm Sonuçları

	Bileşik	N	Normal		Diyabet		
			Ortalama	Değişim(%)	N	Ortalama	Değişim(%)
cAMP (pmol/ml)	Kontrol	10	1.8326 ± 0.1688 ^{a,c,i,k}		10	0.8455 ± 0.04224 ^{c,i,k}	
	Prasugrel	10	1.8502 ± 0.1453 ^{c,e,i,k}	0.9604	8	1.0353 ± 0.06253 ^{e,f}	22.4483
	1a	10	1.3513 ± 0.1082 ^{a,b,d,g,m,n}	-26.2632	10	1.2457 ± 0.1886 ^{a,b,f,g}	47.3329
	2a	10	1.9484 ± 0.1269 ^{c,e,k}	6.3189	10	1.3698 ± 0.1329 ^{a,b,d,g,m,n}	62.0106
	3a	10	1.4897 ± 0.1268 ^{b,d,h,m,n}	-18.7111	10	0.9586 ± 0.09355 ^{c,e,k}	13.3767
	4a	10	1.628 ± 0.06606 ^{h,i}	-11.1645	10	1.9114 ± 0.1426 ^{c,e,k}	126.0674
AKT (%RV)	Kontrol	10	21.55 ± 3.4081 ^{d,n}		10	18.055 ± 3.7114 ⁿ	
	Prasugrel	10	25.4 ± 4.8527 ^d	17.8654	8	16.6875 ± 2.8352 ⁿ	-7.5741
	1a	10	15.455 ± 2.3385 ^{i,n}	-28.2831	10	27.72 ± 6.7684 ^{c,d,e}	53.5309
	2a	10	8.91 ± 0.9208 ^{a,b,i,k,m}	-58.6543	10	21.78 ± 3.2632 ^{d,n}	20.6314
	3a	10	15.426 ± 3.4216 ^{i,n}	-28.4176	10	24.84 ± 3.7724 ^d	37.5796
	4a	10	16.94 ± 3.0321 ⁿ	-21.3921	10	34.5 ± 5.8299 ^{a,c,e,f,g,h,k}	91.0828
ERK (%RV)	Kontrol	10	45.959 ± 5.9481		10	40.701 ± 8.0509	
	Prasugrel	10	40.861 ± 9.1359	-11.0925	8	38.6825 ± 7.0023	-4.9593
	1a	10	35.29 ± 5.5722	-23.2142	10	55.133 ± 9.2658 ^{d,e}	35.4586
	2a	10	28.721 ± 4.7475 ^{i,n}	-37.5073	10	41.795 ± 5.3315	2.6879
	3a	10	31.239 ± 7.0155 ^{i,n}	-32.0285	10	38.039 ± 6.5335	-6.5404
	4a	10	38.207 ± 5.4473	-16.8672	10	53.653 ± 11.358 ^{d,e}	31.8223
TxB ₂ (pg/ml)	Kontrol	10	4.111 ± 0.209		10	23.133 ± 2.9338	
	Prasugrel	10	4.355 ± 0.2592	5.9353	8	2.3025 ± 0.254 ^f	-90.0467
	1a	10	4.441 ± 0.3542	8.0272	10	4.212 ± 0.2086	-81.7922
	2a	10	4.18 ± 0.3342	1.6784	10	4.683 ± 0.1757	-79.7562
	3a	10	4.845 ± 0.4393	17.8545	10	3.466 ± 0.3034	-85.0171
	4a	10	5.422 ± 0.780 ^h	31.8901	10	3.792 ± 0.3011	-83.6078
GpIIb/IIIa (ng/ml)	Kontrol	10	1.768 ± 0.232		10	3.629 ± 0.8267	
	Prasugrel	10	1.585 ± 0.1427	-10.3507	8	2.1125 ± 0.5757 ^g	-41.7884
	1a	10	1.59 ± 0.1034	-10.0679	10	1.71 ± 0.2094	-52.8796
	2a	10	1.852 ± 0.1546	4.7511	10	1.436 ± 0.1527	-60.4299
	3a	10	2.223 ± 0.4117 ^{g,m,n}	25.7353	10	1.162 ± 0.0908 ^e	-67.9802
	4a	10	1.878 ± 0.2419	6.2217	10	1.162 ± 0.1086 ^e	-67.9802
VASP (ng/ml)	Kontrol	10	0.2020 ± 0.0207 ^{d,m}		10	0.3030 ± 0.0375	
	Prasugrel	10	0.1780 ± 0.0227 ^{d,m}	-11.8812	8	0.2575 ± 0.0253 ^d	-15.0165
	1a	10	0.2450 ± 0.0280 ^{d,m}	21.2871	10	0.2700 ± 0.0193 ^d	-10.8911
	2a	10	0.4150 ± 0.1133 ^{a,b,c,e,h,i,k,n}	105.4455	10	0.1990 ± 0.0198 ^{d,m}	-34.3234
	3a	10	0.2114 ± 0.0291 ^{d,m}	4.6535	10	0.3590 ± 0.0750 ^{a,b,e,k,n}	18.4818
	4a	10	0.3100 ± 0.0610	53.4653	10	0.2190 ± 0.0346 ^{d,m}	-27.7228

Normal ^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05

Diyabet ^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05

4.2.2. *In Vitro* Antiplatelet Aktivite

Prasugrel tuzlarının (**1a**, **2a**, **3a**, **4a** ve **5a**) trombosit üzerindeki insan antiplatelet antikor konsantrasyonlarına etkisini anlamak üzere *in vitro* kantitatif tayin yapılmıştır. Sentezlenen tuzların antiplatelet etkinliklerinin kıyaslanabilmesi amacı ile günümüzde rutin olarak kullanılan Aspirin ve Prasugrel kullanılmıştır. İnsan antiplatelet antikor ELISA kiti (CSB-E12816h) uygulanması sonucu elde edilen yüzde inhibisyon verileri tablo olarak aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.4. *In Vitro* Antiplatelet Aktivite ELISA Ölçüm Sonuçları

Bileşik	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-5} M
Aspirin	98.85 ± 1.25	98.10 ± 1.17	97.25 ± 1.20
Prasugrel	40.15 ± 1.16	33.26 ± 1.07	30.18 ± 0.81
1a	32.77 ± 0.95	27.51 ± 0.82	20.51 ± 0.79
2a	40.55 ± 1.04	31.75 ± 0.92	27.53 ± 0.89
3a	38.51 ± 1.08	34.22 ± 0.99	28.11 ± 0.86
4a	36.84 ± 0.88	33.18 ± 0.83	28.66 ± 0.65
5a	42.87 ± 1.15	37.46 ± 1.10	31.06 ± 0.80

4.3. Antikanser Aktivite

4.3.1. *In Vitro* Antikanser Aktivite

Bileşiklerin antikanser aktivitesinin araştırılmasında MCF-7 (İnsan meme adenokarsinoma hücre dizisi) kullanılmış, antikanser aktivitenin selektivitesi NIH3T3 (fare embriyo fibroblast hücre dizisi) hücre dizilerinde değerlendirilmek istenmiştir. Sentezlenen tuzların antikanser etkinliklerinin kıyaslanabilmesi amacı ile günümüzde kanser tedavisinde rutin olarak kullanılan Doksorubisin kullanılmıştır.

Tablo 4.5. *In Vitro* Antikanser Aktivite ELISA Ölçüm Sonuçları

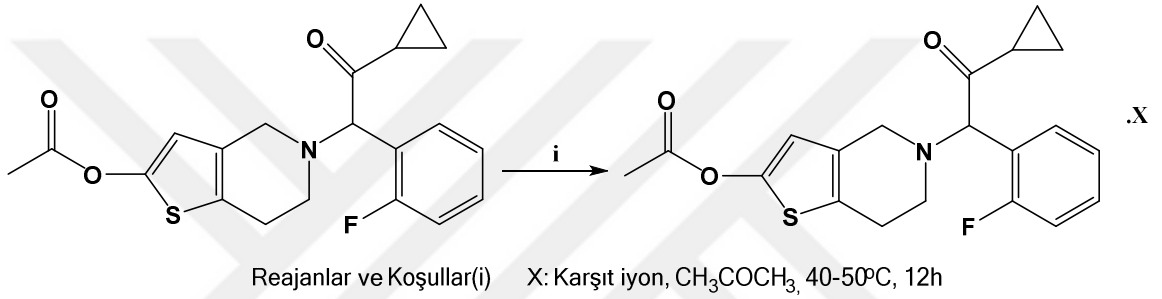
Bileşik	IC ₅₀ (µM)	
	MCF-7	NIH3T3
Prasugrel	> 1000	> 1000
1a	> 1000	> 1000
2a	> 1000	> 1000
3a	> 1000	> 1000
4a	> 1000	> 1000
5a	> 1000	> 1000
Doksurobisin	5.40 ± 0.12	1150.25 ± 2.25

5. TARTIŞMA

5.1. Kimyasal Çalışmalar

5.1.1. Prasugrel Tuzu Sentez Çalışmaları

Prasugrel tuzları genel sentez yönteminde belirtildiği gibi elde edilmiştir (Şekil 5.1.). Bu amaçla uygun karşıt iyonlar kuru aprotik solvan içerisinde, ışıktan korunarak Prasugrel ile literatüre uygun olarak reaksiyona sokulmuştur (287). Daha sonra reaksiyon ortamından solvan uçurulmuş ve kalan kısım kuru eterde katılaştırılmıştır.



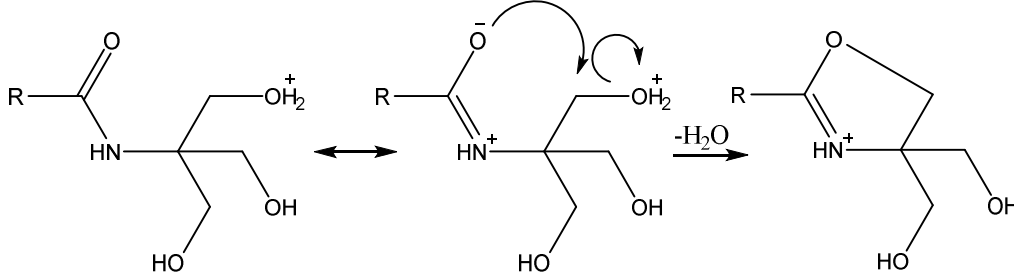
Şekil 5.1. Prasugrel tuzu genel sentez yöntemi

Yapılan çalışmalarda başlangıç maddesi olarak kullanılan karşıt iyon tuz oluşturmak için anyonik asitlerde Prasugrel ile 1:1 oranında, katyonik bazda 1:2 oranında reaksiyona sokulmuştur.

FDA onaylı Orange Book'da çok sayıda sitrat, maleat, oksalat, trometamol tuzu listelenmiştir. API'lar için tuz seçiminde trendler belirli yıllık periyotlar halinde anyon (Tablo 2.7.) ve katyonlar (Tablo 2.8.) için tablo olarak yukarıda verilmiştir (170). *Trans*-1,2-sikloheksan dikarboksilik asitten hareketle API tuzları için literatür verileri sınırlı olmakla beraber Trimetoprim *trans*-1,2-Sikloheksan dikarboksilik asit tuzu daha önce hazırlanmıştır (181).

Birden fazla asidik grup içeren diğer asitler için olduğu gibi, tuz oluşumu için çeşitli sitokiyometrilere mümkündür ancak sitrat, maleat, oksalat, trometamol tuzları için genel olarak 1:1 oranında tuz ürünü olduğu kaydedilmiştir. 1:1 tuzların haricinde maleatlar için 1:2 (baz molekülü başına iki molekül maleik asit) ve 2:1 (iki baz molekülü başına bir molekül maleik asit) tuzlar bulunmaktadır. 2:1 esasen iki temel azot atomu olan bir piperazin parçasını içeren fenotiyazinler için gerçekleştirilmiştir (175).

Trometamol (trometamin) tuzunda aktif bir farmasötik bileşen ile karışıt iyonu arasındaki kimyasal etkileşimleri incelenmiş, kolay oluşan oksazolin yapısı için bir mekanizma önerilmiştir. Amid veya ester oluşum ihtimali, primer bir amino grubunun varlığı ve trometamin yapısında üç adet hidroksil grubunun varlığına bağlı olduğu vurgulanmıştır (177).



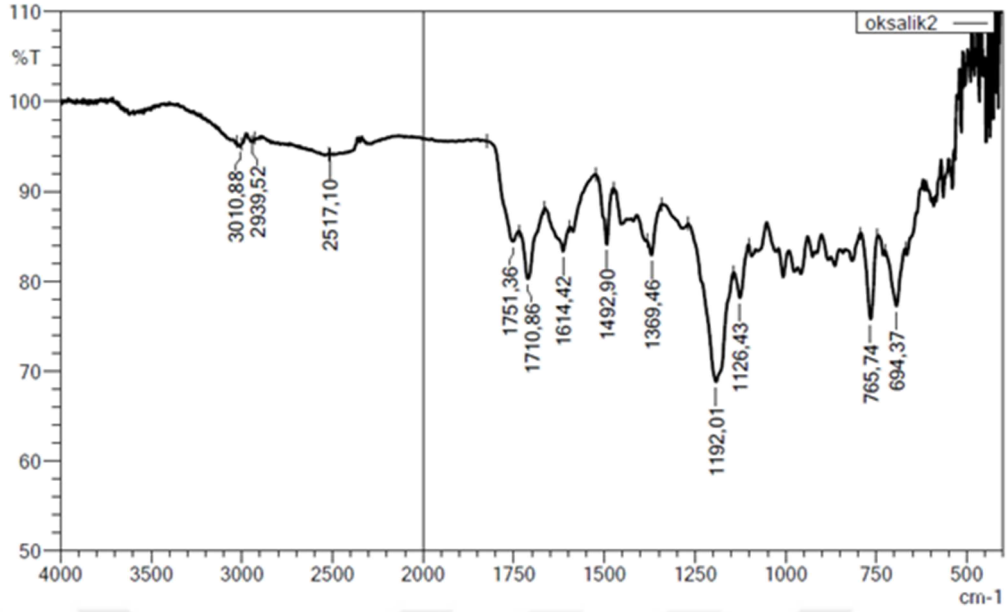
Prasugrel trometamol tuzunda sitokiyometrik oranının 1:2 (bir baz molekülüne başına iki molekül trometamol) olduğu spektral analiz sonuçları doğrultusunda görülmüştür.

5.1.2. Sentezlenen Prasugrel Tuzlarının Yapılarının Aydınlatılması

Sentezlenen Prasugrel tuzlarının yapısı FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve ESI-MS gibi spektral yöntemler ve eleman analizi verileri kullanılarak kanıtlanmıştır.

5.1.2.1. FT-IR Spektrumları

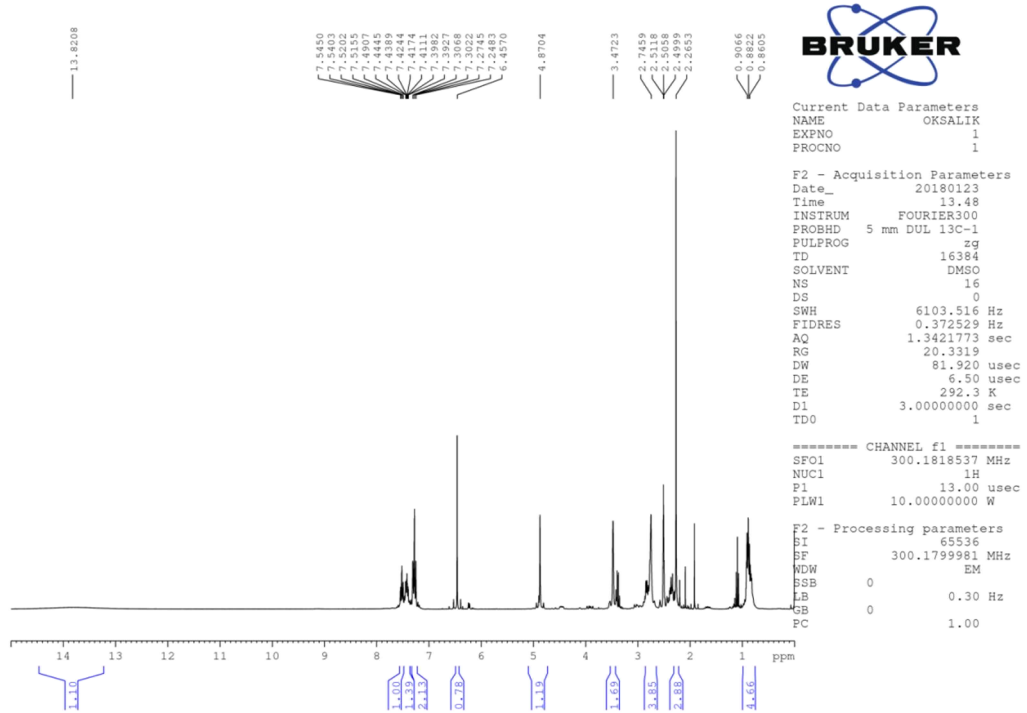
Prasugrel oksalat'ın FT-IR spektrumlarında, -OH karboksilik asit gerilim titreşimi 3506 cm⁻¹, tuz yapısında görülen -NH⁺ gerilim titreşimi 2517 cm⁻¹, C=O karboksilat gerilim titreşimi 1775 cm⁻¹, C=O karboksilik asit gerilim titreşimi 1751 cm⁻¹, C=O siklopropil karbonil gerilim titreşimi 1710 cm⁻¹, C-F gerilim titreşimi 1454 cm⁻¹, C-N gerilim titreşimi 1369 cm⁻¹, C-O gerilim titreşimi 1192 cm⁻¹, C-S gerilim titreşimi 765 cm⁻¹'de görülmüştür. Prasugrel oksalat için FT-IR spektral verileri (Şekil 5.2.) Prasugrel HCl literatürü ile uygunluk göstermektedir (160).



Şekil 5.2. Prasuğrel oksalat FT-IR spektrumu

5.1.2.2. 1H -NMR Spektrumları

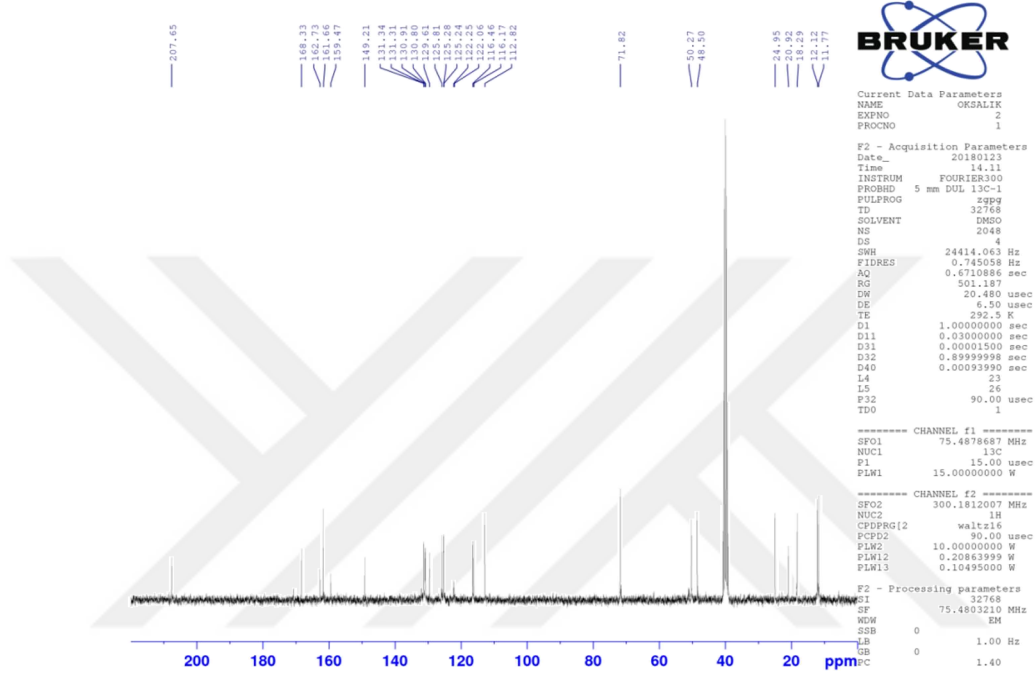
Prasuğrel oksalat 1H -NMR spektrumunda oksalik asitten gelen -CH protonu bulunmadığından herhangi bir farklı pik görülmemiştir. Tuz yapısında görülmesi beklenen $-NH^+$ protonuna ait pik 13.86 ppm'de gözlenmiştir. Prasuğrel oksalat'ın 1H -NMR spektral verileri (Şekil 5.3.) Prasuğrel HCl ile uygunluk göstermektedir (160).



Şekil 5.3. Prasuğrel oksalat 1H -NMR spektrumu

5.1.2.3. ¹³C-NMR Spektrumları

Prasugrel oksalat ¹³C-NMR spektrumunda oksalik asitten gelen karboksilli asit (HO-C=O) karbonili 161.7 ppm'de gözlenmiştir. Prasugrel oksalat için ¹³C-NMR spektral verileri (Şekil 5.4.) Prasugrel HCl literatürü ile uygunluk göstermektedir (160).



Şekil 5.4. Prasugrel oksalat ¹³C-NMR spektrumu

5.2. Biyolojik Aktivite

Sentezi yapılan tuzların *in vivo-ex vivo* antiplatelet aktiviteleri İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı araştırma grubu tarafından İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Yapılan deneyler için 2013/A-39 sayılı etik kurul onayı alınmıştır (EK.1.).

Bu çalışmada, seçilmiş karşıt iyonlarla 2'si yeni 5 farklı Prasugrel tuzu sentez edilerek *in vivo-ex vivo-in vitro* antiplatelet ve *in vitro* antikanser aktiviteleri test edilmiştir.

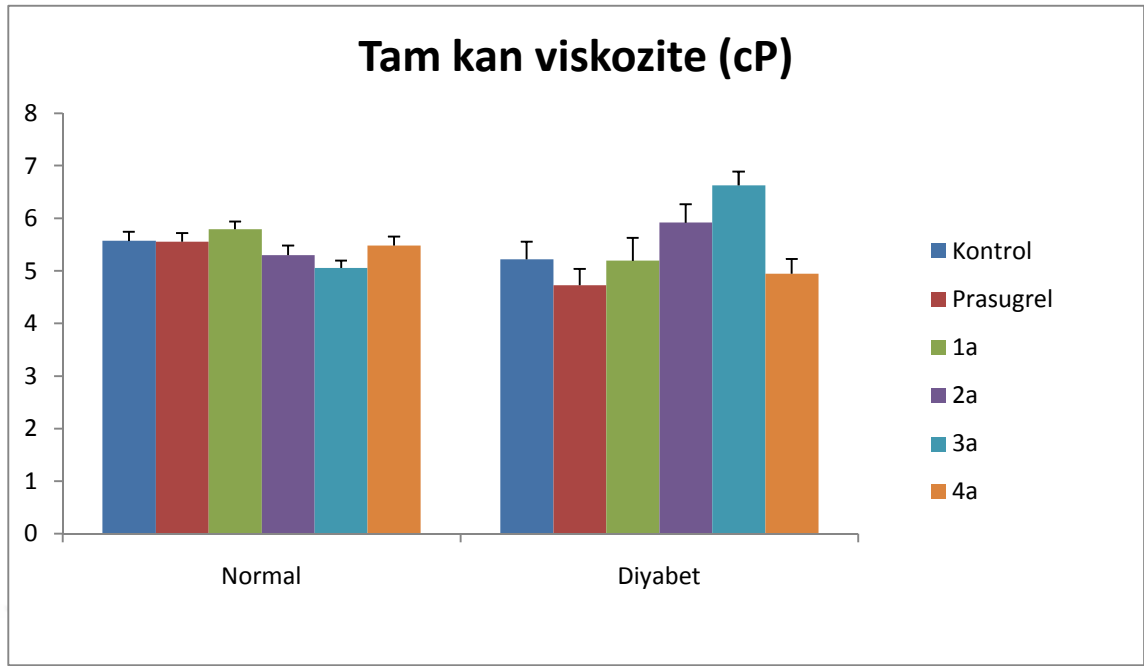
In vivo-ex vivo deneylerde diabetik ve nondiabetik ratlar kullanıldığından ve nondiabetik ratların yaşatılması zor olduğundan deneyler sırasında Prasugrel oksalat'ın (5a) sentezi, saflaştırılması ve analizlerinin yapılması işlemleri tamamlanamamış bu

nedenle *in vivo-ex vivo* çalışmalarına **5a** dahil edilememiştir ancak daha sonra elde edilen **5a**, *in vitro* çalışmalara dahil edilmiştir.

Prasugrel tuzlarının (**1a**, **2a**, **3a**, **4a** ve **5a**) trombosit üzerindeki insan antiplatelet antikör konsantrasyonlarına etkisini araştırmak üzere *in vitro* kantitatif tayini yapılmıştır. Sentezlenen tuzların antiplatelet etkinliklerinin kıyaslanabilmesi amacı ile günümüzde rutin olarak kullanılan Aspirin ve Prasugrel kullanılmıştır. Uygun insan antiplatelet antikör ELISA kiti uygulanması sonucu elde edilen veriler **Tablo 4.4.**'de verilmiştir.

Prasugrel tuzlarının (**1a**, **2a**, **3a**, **4a** ve **5a**) *in vitro* antikanser aktivitesinin araştırılmasında MCF-7 (İnsan meme adenokarsinoma hücre dizisi) kullanıldı. Tüm bileşiklerde $IC_{50} > 1000$ olduğundan antikanser aktivitenin selektivitesi NIH3T3 (fare embriyo fibroblast hücre dizisi) hücre dizilerinde değerlendirilemedi sonuçlar **Tablo 4.5.**'de verilmiştir.

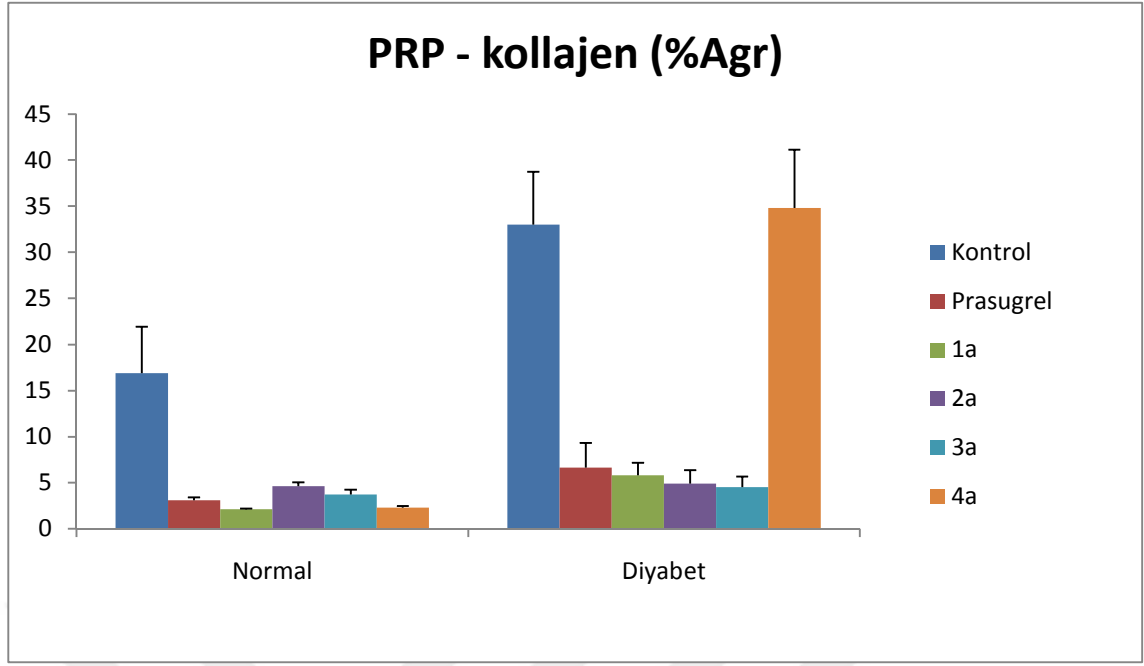
Prasugrel, **1a**, **2a**, **3a** ve **4a**'nın deney hayvanlarına uygulanması sonucu elde edilen veriler istatistiksel sonuçlarla beraber tablo olarak ve grafikler halinde aşağıda verilmiştir. Aşağıdaki grafiklerde her bar bir grubu göstermektedir. Normal grup nondiyabetik hayvanlardan ve Kontrol, Prasugrel, 1a, 2a, 3a ve 4a alt gruplarından oluşmaktadır. Diyabetik grup ise diyabetik hayvanlardan ve Kontrol, Prasugrel, Diyabet+1a, Diyabet+2a, Diyabet+3a ve Diyabet+4a alt gruplarından oluşmaktadır.



Şekil 5.5. Tam kan viskozite ölçüm sonuçları (cP)

Tablo 5.1. Tam kan viskozite ölçüm sonuçları (cP)

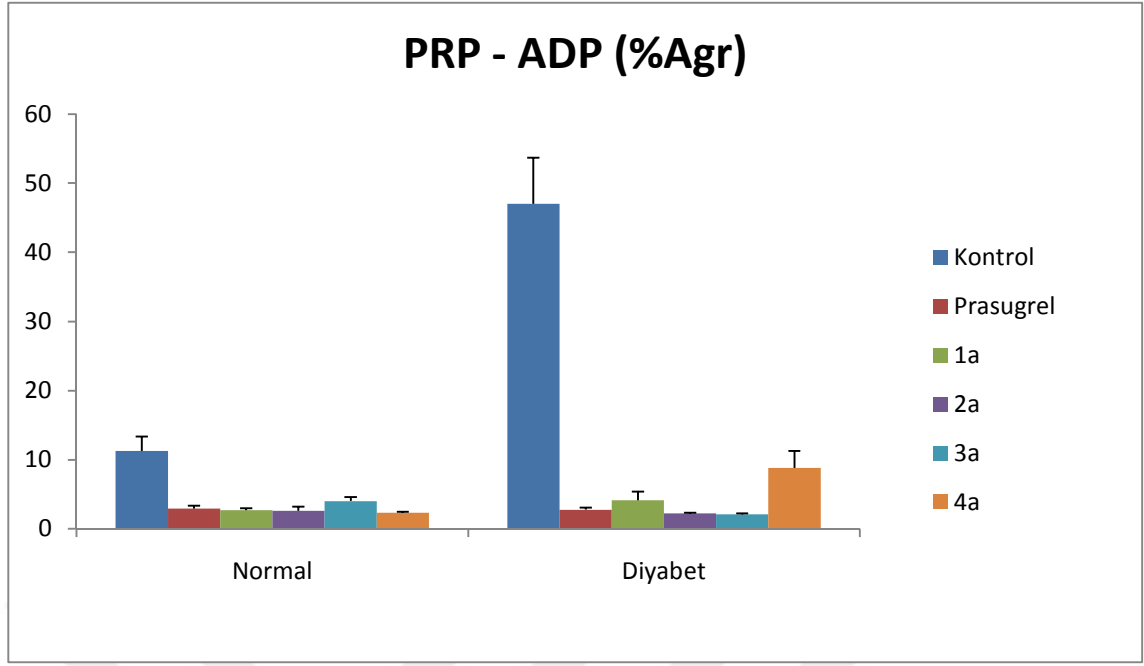
Bileşik	Normal			Diyabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	5.572 ± 0.1736 ^{m,h}		10	5.221 ± 0.3356	
Prasugrel	10	5.555 ± 0.1643 ^{m,h}	-0.3051	8	4.7275 ± 0.3137 ^{a,b,c,k}	-9.4522
1a	10	5.793 ± 0.1496 ^{e,h,m,n}	3.9663	10	5.193 ± 0.4398	-0.5363
2a	10	5.3 ± 0.181	-4.8816	10	5.917 ± 0.354 ^{e,h,n}	13.3308
3a	10	5.056 ± 0.1397 ^{c,k}	-9.2606	10	6.627 ± 0.26 ^{a,b,c,f}	26.9297
4a	10	5.483 ± 0.1707 ^m	-1.5973	10	4.948 ± 0.2832 ^{c,k}	-5.2289
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diyabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



Şekil 5.6. PRP-Kollajen optik agregasyon ölçüm sonuçları

Tablo 5.2. PRP-Kollajen optik agregasyon ölçüm sonuçları

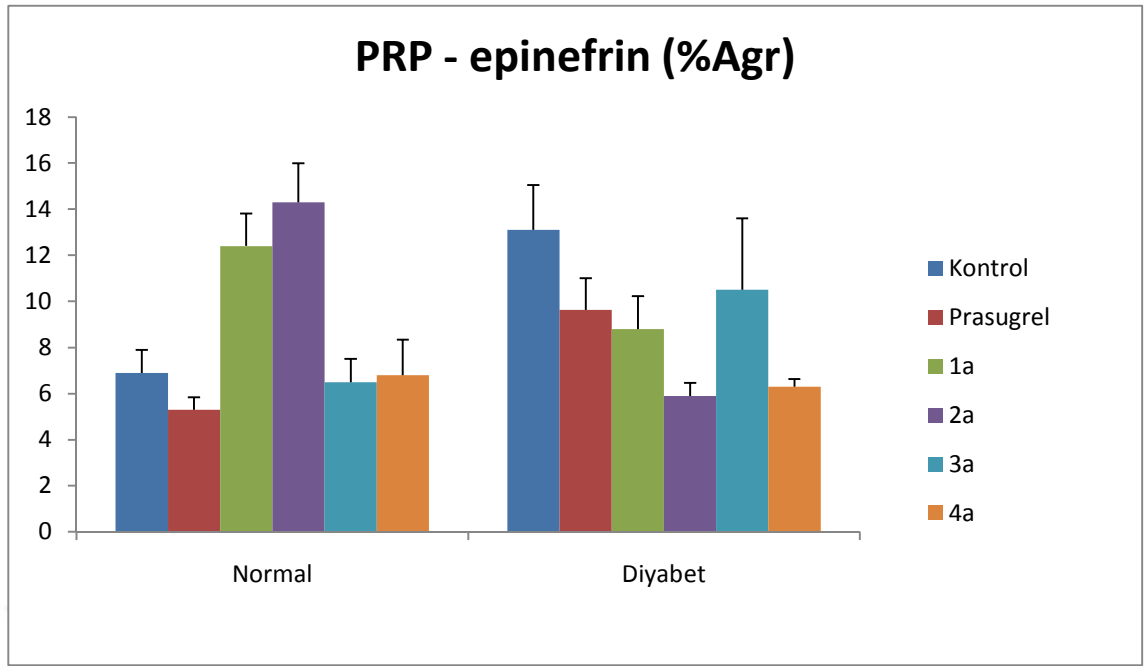
Bileşik	Normal			Diyabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	1.9 ± 5.0121 ^{b,c,d,e,f,h,i,k,m}		10	33 ± 5.7135	
Prasugrel	10	3.1 ± 0.3145 ^a	-81.6568	8	6.625 ± 2.7186 ^a	-79.9242
1a	10	2.1 ± 0.1 ^a	-87.5740	10	5.8 ± 1.3888 ^a	-82.4242
2a	10	4.6 ± 0.4269 ^a	-72.7811	10	4.9 ± 1.4333 ^a	-85.1515
3a	10	3.7 ± .0.5385 ^a	-78.1065	10	4.5 ± 1.1475 ^a	-86.3636
4a	10	2.3 ± 0.1528 ^a	-86.3905	10	34	5.4545
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diyabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



Şekil 5.7. PRP-ADP optik agregasyon ölçüm sonuçları

Tablo 5.3. PRP-ADP optik agregasyon ölçüm sonuçları

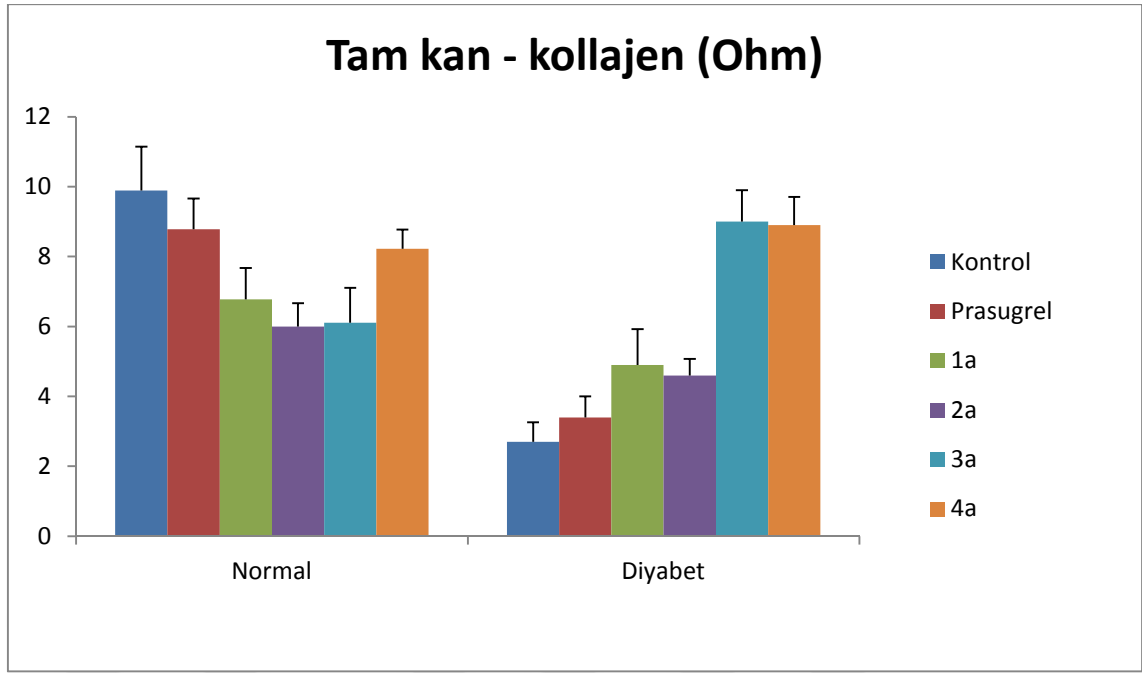
Bileşik	Normal			Diyabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	11.3 ± 2.0712 ^{b,c,d,e,f,h,i,k,m}		10	47 ± 6.6816	
Prasugrel	10	2.9 ± 0.4069 ^a	-74.3363	8	2.75 ± 0.3134 ^a	-94.1489
1a	10	2.7 ± 0.2603 ^a	-76.1062	10	4.1 ± 1.2689 ^a	-91.2766
2a	10	2.6 ± 0.6 ^{a,n}	-76.9912	10	2.2 ± 0.1333 ^{a,n}	-95.3191
3a	10	4 ± 0.5774 ^a	-64.6018	10	2.1 ± 0.1 ^{a,n}	-95.5319
4a	10	2.3 ± 0.1528 ^{a,n}	-79.6460	10	8.8 ± 2.4622 ^{d,f,k,m}	-81.2766
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diyabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



Şekil 5.8. PRP-Epinefrin optik agregasyon ölçüm sonuçları

Tablo 5.4. PRP-Epinefrin optik agregasyon ölçüm sonuçları

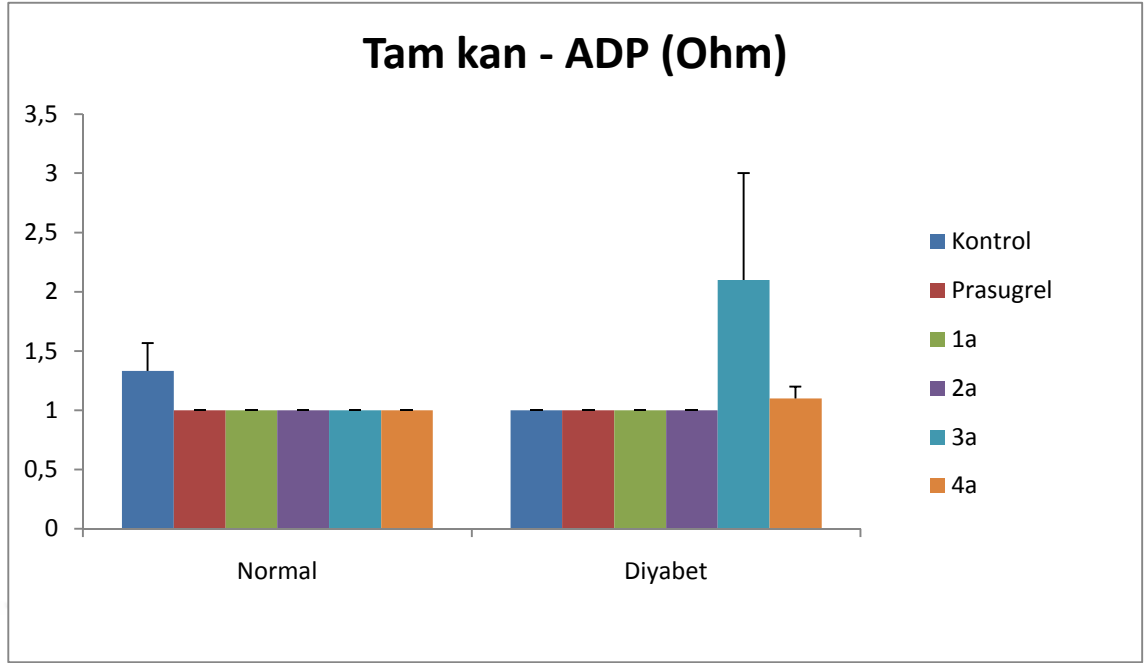
Bileşik	Normal			Diyabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	6.9 ± 0.9939 ^{c,d,g}		10	13.1 ± 1.9462 ^{a,e,f,i,k,n}	
Prasugrel	10	5.3 ± 0.5385 ^{c,m}	-23.1884	8	9.625 ± 1.375 ^d	-26.5267
1a	10	12.4 ± 1.4079 ^{a,b,e,f,k,n}	79.7101	10	8.8 ± 1.4283 ^{d,g}	-32.8244
2a	10	14.3 ± 1.6803 ^{a,f,h,i}	107.2464	10	5.9 ± 0.5667 ^{c,g,m}	-54.9618
3a	10	6.5 ± 1.0028 ^{c,g}	-5.7971	10	10.5 ± 3.1029 ^{b,k,n}	-19.8473
4a	10	6.8 ± 1.5333 ^{c,d,g}	-1.4493	10	6.3 ± 0.335 ^{c,g,m}	-51.9084
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diyabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



Şekil 5.9. Tam Kan-Kollajen empedans agregasyon ölçüm sonuçları

Tablo 5.5. Tam Kan-Kollajen empedans agregasyon ölçüm sonuçları

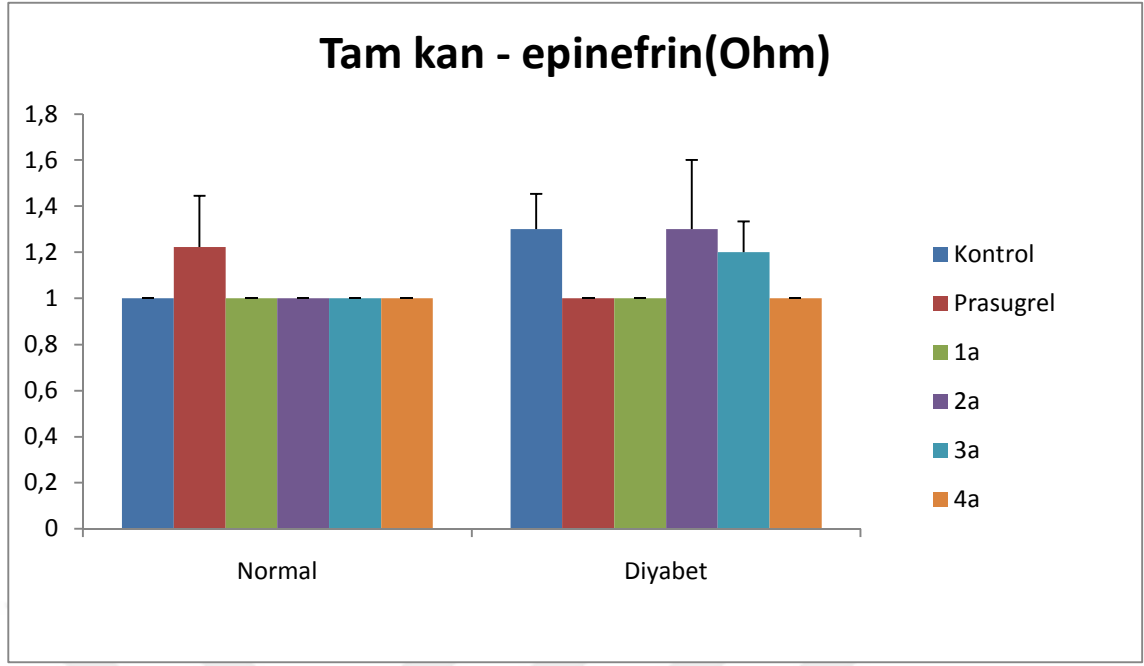
Bileşik	N	Normal		Diyabet		
		Ortalama	Değişim (%)	Ortalama	Değişim (%)	
Kontrol	9	9.8889 ± 1.2522 ^{c,d,e}		10	2.7 ± 0.5588 ^{c,d,e}	
Prasugrel	9	8.7778 ± 0.8784 ^{d,e,i,k}	-11.2358	10	3.4 ± 0.6 ^{c,d,e}	25.9259
1a	9	6.7778 ± 0.8941 ^{a,g,h}	-31.4605	10	4.9 ± 1.0269 ^{b,f,n}	81.4815
2a	9	6 ± 0.6667 ^{a,b,h,m,n}	-39.3259	10	4.6 ± 0.4761 ^{b,f}	70.3704
3a	9	6.1111 ± 0.9923 ^{a,b,g,h,m,n}	-38.2024	10	9 ± 0.8944 ^{d,e}	233.3333
4a	9	8.2222 ± 0.5472 ^{i,k}	-16.8543	10	8.9 ± 0.809 ^{d,e,i}	229.6296
Normal		^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05				
Diyabet		^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05				



Şekil 5.10. Tam Kan-ADP empedans agregasyon ölçüm sonuçları

Tablo 5.6. Tam Kan-ADP empedans agregasyon ölçüm sonuçları

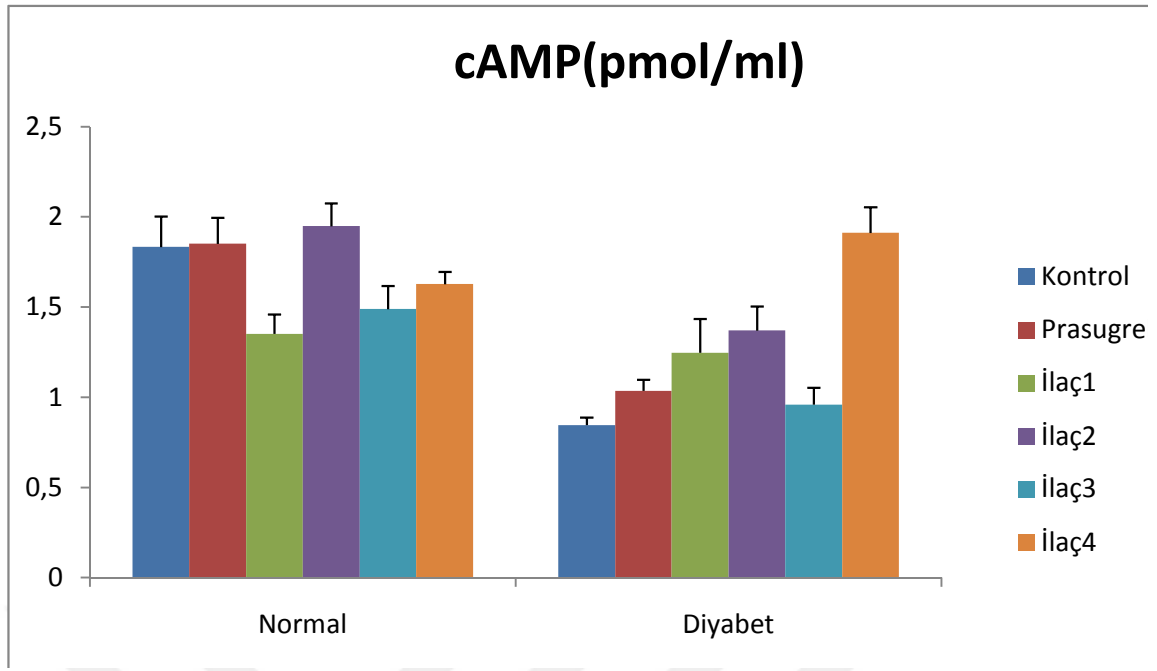
Bileşik	Normal			Diyabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	9	1.3333 ± 0.2357		10	1 ± 0 ^m	
Prasugrel	9	1 ± 0 ^m	-24.9981	10	1 ± 0 ^m	0.0000
1a	9	1 ± 0 ^m	-24.9981	10	1 ± 0 ^m	0.0000
2a	9	1 ± 0 ^m	-24.9981	10	1 ± 0 ^m	0.0000
3a	9	1 ± 0 ^m	-24.9981	10	2.1 ± 0.9 ^{b,c,d,e,f,g,h,i,k,n}	110.0000
4a	9	1 ± 0 ^m	-24.9981	10	1.1 ± 0.1 ^m	10.0000
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diyabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



Şekil 5.11. Tam Kan-Epinefrin empedans agregasyon ölçüm sonuçları

Tablo 5.7. Tam Kan-Epinefrin empedans agregasyon ölçüm sonuçları

Bileşik	Normal			Diyabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	9	1 ± 0		10	1.3 ± 0.1528	
Prasugrel	9	1.2222 ± 0.2222	22.2200	10	1 ± 0	-23.0769
1a	9	1 ± 0	0.0000	10	1 ± 0	-23.0769
2a	9	1 ± 0	0.0000	10	1.3 ± 0.3	0.0000
3a	9	1 ± 0	0.0000	10	1.2 ± 0.1333	-7.6923
4a	9	1 ± 0	0.0000	10	1 ± 0	-23.0769
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diyabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



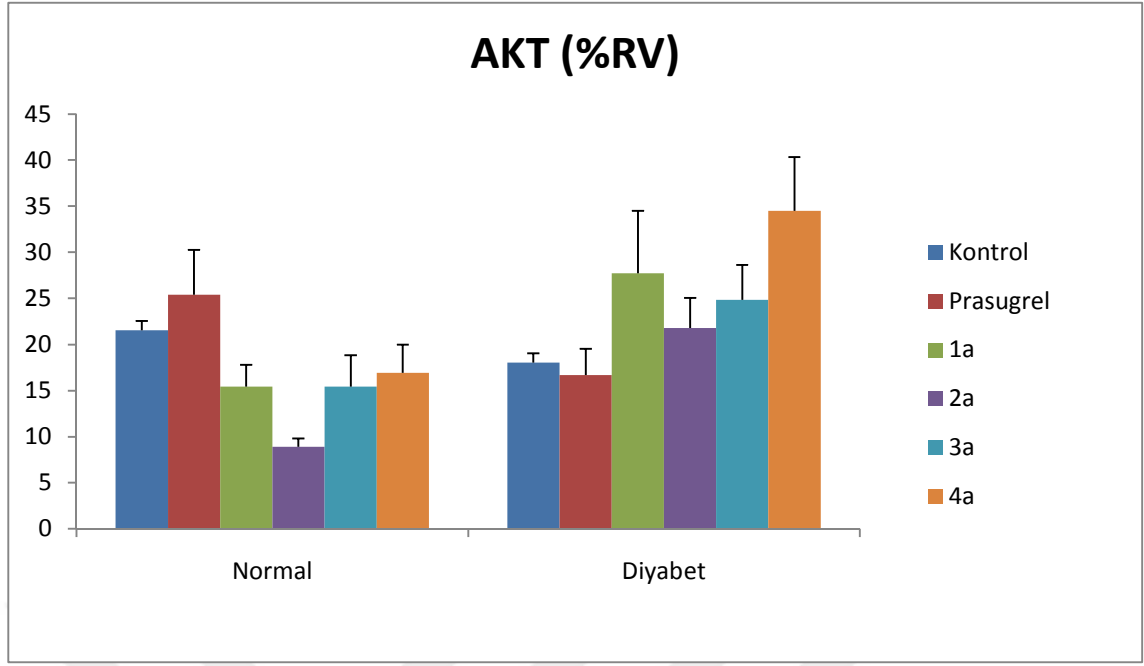
Şekil 5.12. ELISA- cAMP ölçüm sonuçları

Tablo 5.8. ELISA- cAMP ölçüm sonuçları

Bileşik	Normal			Diyabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	1.8326 ± 0.1688 ^{a,c,i,k}		10	0.8455 ± 0.04224 ^{c,i,k}	
Prasugrel	10	1.8502 ± 0.1453 ^{c,e,i,k}	0.9604	8	1.0353 ± 0.06253 ^{e,f}	22.4483
1a	10	1.3513 ± 0.1082 ^{a,b,d,g,m,n}	-26.2632	10	1.2457 ± 0.1886 ^{a,b,f,g}	47.3329
2a	10	1.9484 ± 0.1269 ^{c,e,k}	6.3189	10	1.3698 ± 0.1329 ^{a,b,d,g,m,n}	62.0106
3a	10	1.4897 ± 0.1268 ^{b,d,h,m,n}	-18.7111	10	0.9586 ± 0.09355 ^{c,e,k}	13.3767
4a	10	1.628 ± 0.06606 ^{h,i}	-11.1645	10	1.9114 ± 0.1426 ^{c,e,k}	126.0674

Normal ^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05

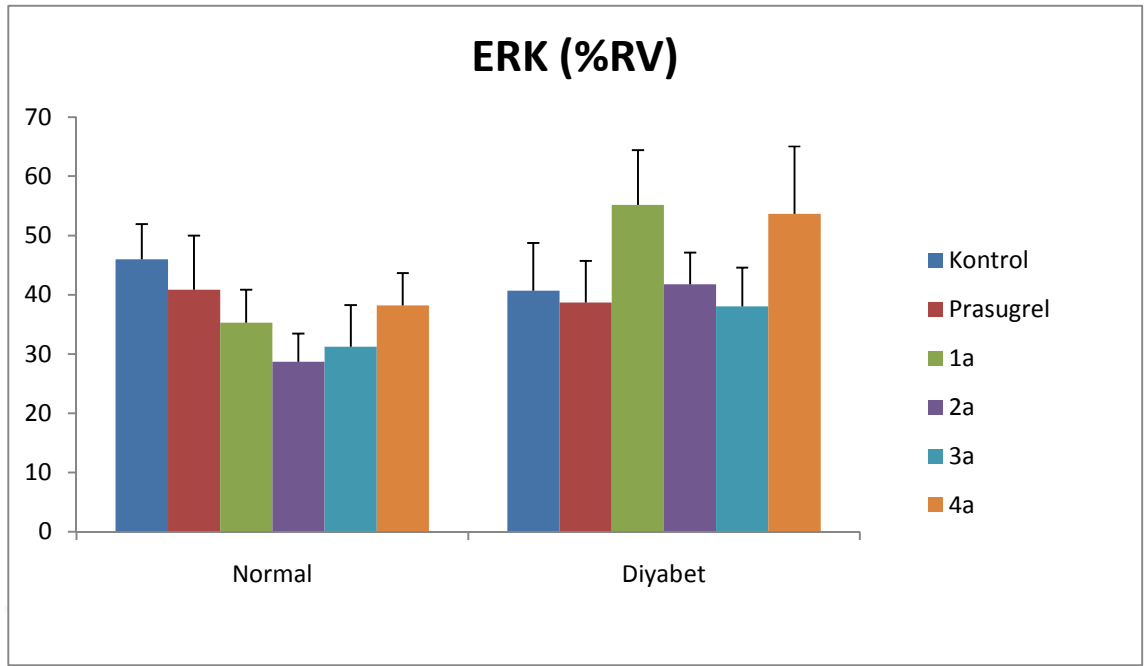
Diyabet ^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05



Şekil 5.13. ELISA-AKT ölçüm sonuçları

Tablo 5.9. ELISA-AKT ölçüm sonuçları

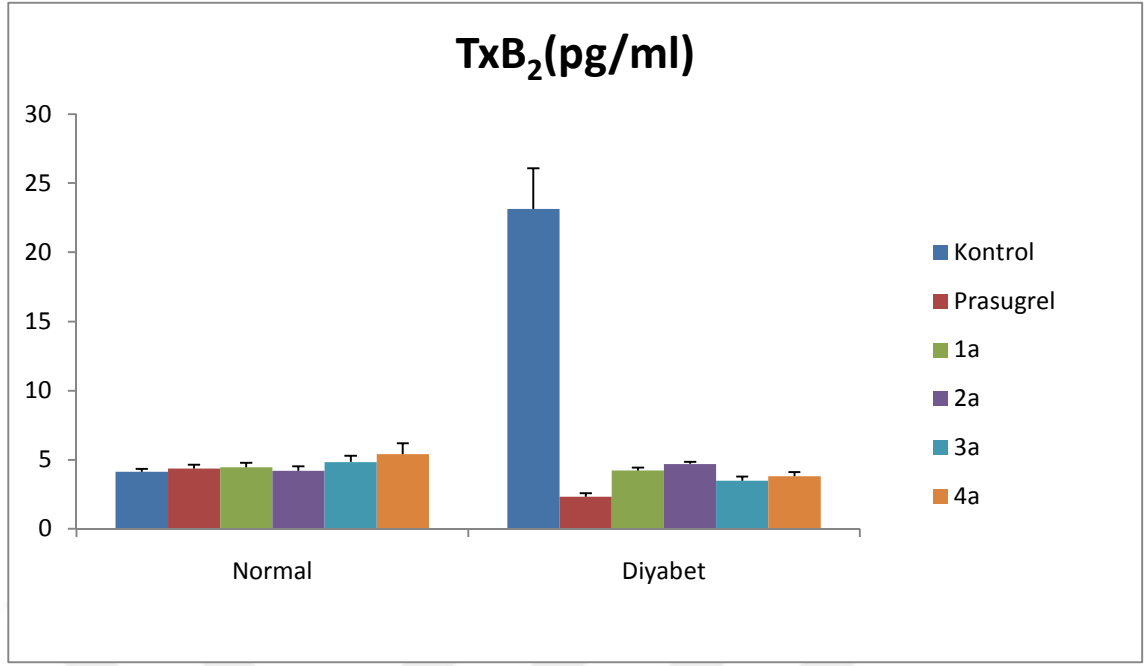
Bileşik	Normal			Diabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	21.55 ± 3.4081 ^{d,n}		10	18.055 ± 3.7114 ⁿ	
Prasugrel	10	25.4 ± 4.8527 ^d	17.8654	8	16.6875 ± 2.8352 ⁿ	-7.5741
1a	10	15.455 ± 2.3385 ^{1,n}	-28.2831	10	27.72 ± 6.7684 ^{c,d,e}	53.5309
2a	10	8.91 ± 0.9208 ^{a,b,1,k,m}	-58.6543	10	21.78 ± 3.2632 ^{d,n}	20.6314
3a	10	15.426 ± 3.4216 ^{1,n}	-28.4176	10	24.84 ± 3.7724 ^d	37.5796
4a	10	16.94 ± 3.0321 ⁿ	-21.3921	10	34.5 ± 5.8299 ^{a,c,e,f,g,h,k}	91.0828
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



Şekil 5.14. ELISA-ERK ölçüm sonuçları

Tablo 5.10. ELISA-ERK ölçüm sonuçları

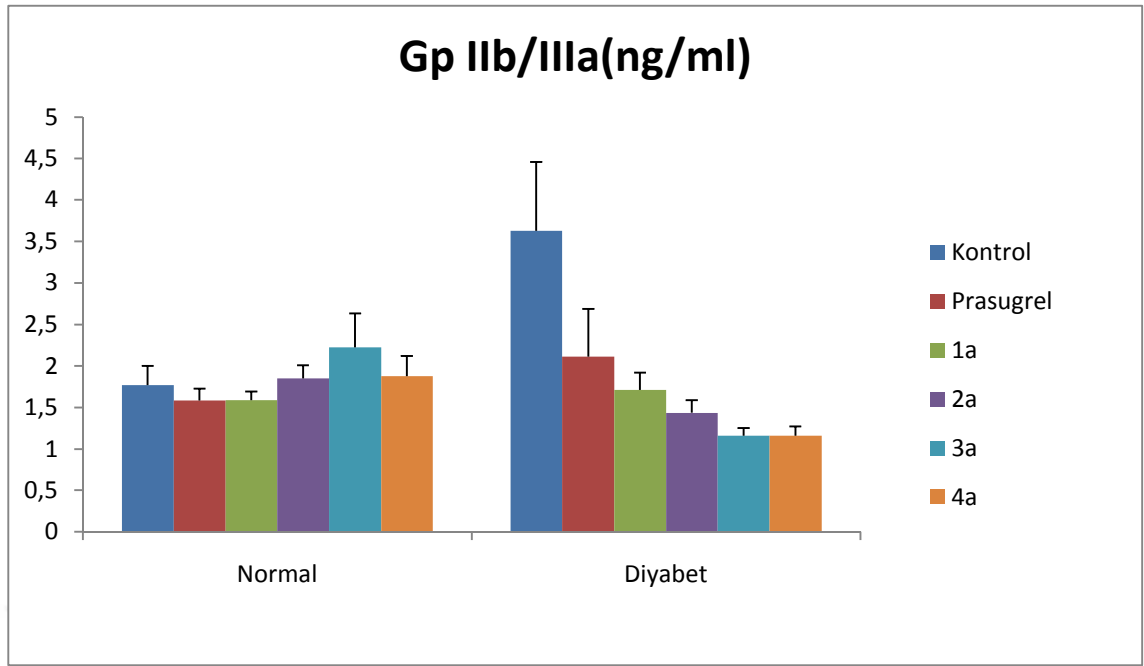
Bileşik	Normal			Diabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	45.959 ± 5.9481		10	40.701 ± 8.0509	
Prasugrel	10	40.861 ± 9.1359	-11.0925	8	38.6825 ± 7.0023	-4.9593
1a	10	35.29 ± 5.5722	-23.2142	10	55.133 ± 9.2658 ^{d,e}	35.4586
2a	10	28.721 ± 4.7475 ^{1,n}	-37.5073	10	41.795 ± 5.3315	2.6879
3a	10	31.239 ± 7.0155 ^{1,n}	-32.0285	10	38.039 ± 6.5335	-6.5404
4a	10	38.207 ± 5.4473	-16.8672	10	53.653 ± 11.358 ^{d,e}	31.8223
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



Şekil 5.15. ELISA-TxB₂ ölçüm sonuçları

Tablo 5.11. ELISA-TxB₂ ölçüm sonuçları

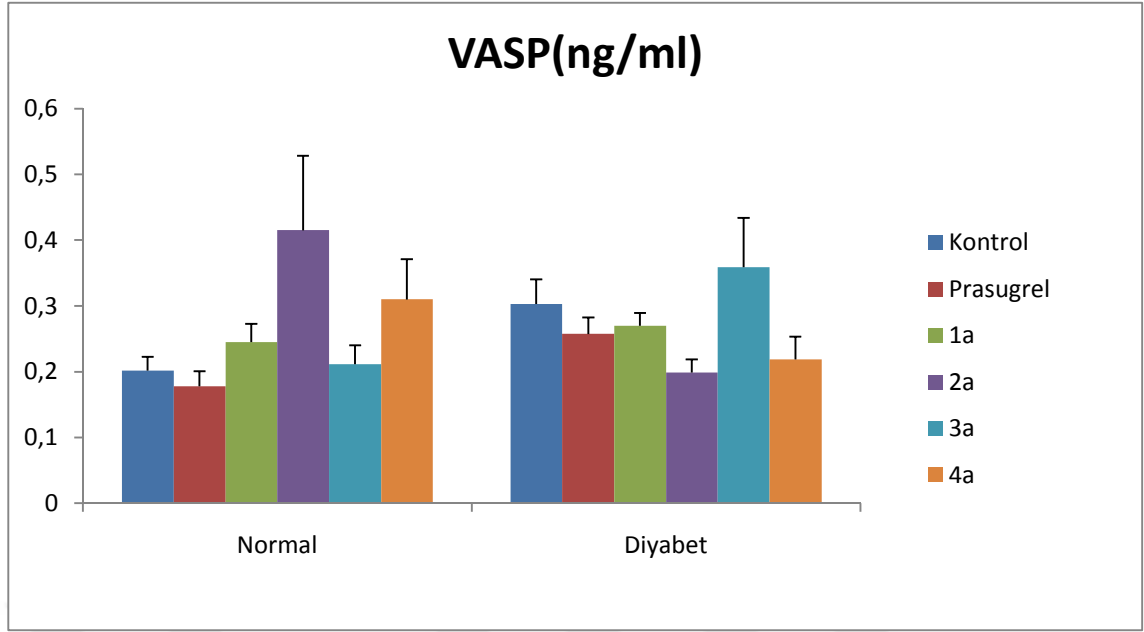
Bileşik	Normal			Diyabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	4.111 ± 0.209		10	23.133 ± 2.9338	
Prasugrel	10	4.355 ± 0.2592	5.9353	8	2.3025 ± 0.254 ^f	-90.0467
1a	10	4.441 ± 0.3542	8.0272	10	4.212 ± 0.2086	-81.7922
2a	10	4.18 ± 0.3342	1.6784	10	4.683 ± 0.1757	-79.7562
3a	10	4.845 ± 0.4393	17.8545	10	3.466 ± 0.3034	-85.0171
4a	10	5.422 ± 0.7801 ^h	31.8901	10	3.792 ± 0.3011	-83.6078
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diyabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



Şekil 5.16. ELISA-GpIIb/IIIa ölçüm sonuçları

Tablo 5.12. ELISA-GpIIb/IIIa ölçüm sonuçları

Bileşik	Normal			Diabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	1.768 ± 0.232		10	3.629 ± 0.8267	
Prasugrel	10	1.585 ± 0.1427	-10.3507	8	2.1125 ± 0.5757 ^g	-41.7884
1a	10	1.59 ± 0.1034	-10.0679	10	1.71 ± 0.2094	-52.8796
2a	10	1.852 ± 0.1546	4.7511	10	1.436 ± 0.1527	-60.4299
3a	10	2.223 ± 0.4117 ^{g,m,n}	25.7353	10	1.162 ± 0.0908 ^e	-67.9802
4a	10	1.878 ± 0.2419	6.2217	10	1.162 ± 0.1086 ^e	-67.9802
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					



Şekil 5.17. ELISA-VASP ölçüm sonuçları

Tablo 5.13. ELISA-VASP ölçüm sonuçları

Bileşik	Normal			Diabet		
	N	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kontrol	10	0.2020 ± 0.0207 ^{d,m}		10	0.3030 ± 0.0375	
Prasugrel	10	0.1780 ± 0.0227 ^{d,m}	-11.8812	8	0.2575 ± 0.0253 ^d	-15.0165
1a	10	0.2450 ± 0.0280 ^{d,m}	21.2871	10	0.2700 ± 0.0193 ^d	-10.8911
2a	10	0.4150 ± 0.1133 ^{a,b,c,e,h,i,k,n}	105.4455	10	0.1990 ± 0.0198 ^{d,m}	-34.3234
3a	10	0.2114 ± 0.0291 ^{d,m}	4.6535	10	0.3590 ± 0.0750 ^{a,b,e,k,n}	18.4818
4a	10	0.3100 ± 0.0610	53.4653	10	0.2190 ± 0.0346 ^{d,m}	-27.7228
Normal	^a Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ^c 1a ile karşılaştırıldığında, ^d 2a ile karşılaştırıldığında, ^e 3a ile karşılaştırıldığında, ^f 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					
Diabet	^g Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^h Prasugrel ile karşılaştırıldığında, ⁱ 1a ile karşılaştırıldığında, ^k 2a ile karşılaştırıldığında, ^m 3a ile karşılaştırıldığında, ⁿ 4a ile karşılaştırıldığında p<0,05					

Elde edilen *in vivo-ex vivo* antiplatelet verilerine göre **1a**, **2a**, **3a** ve **4a**'nın tam kan viskozitesi üzerinde herhangi bir değişiklik yaratmadığı Prasugrel'e benzer seviyede aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Tam kan kullanılarak empedans yöntemiyle gerçekleştirilen antiplatelet aktivite ölçümlerinde:

- Kollajen ile gerçekleştirilen uyarımlarda nondiyabetik gruplarda tüm bileşiklerin aktivite göstermesine rağmen **2a** en yüksek aktiviteyi göstermiş fakat diyabetik gruplarda hiçbir bileşik için beklenen antiplatelet etki gözlenmemiştir.
- ADP ve epinefrin ile gerçekleştirilen uyarımlarda hem diyabetik hem de nondiyabetik gruplarda hiçbir bileşik uygulamasında beklenen etki gözlenmemiştir.

Plateletçe zengin plazma (PRP) kullanılarak gerçekleştirilen antiplatelet aktivite ölçümlerinde:

- Kollajen ile gerçekleştirilen uyarımlarda, nondiyabetik grupta Prasugrel'e benzer şekilde **1a**, **3a** ve **4a**'nın son derece etkili olduğu tespit edilmiştir. Diyabetik grupta ise yine Prasugrel ile birlikte **1a**, **2a** ve **3a** etkili bulunmuş ancak **4a** hiçbir etki göstermemiştir. Diyabetik grupta **4a**'nın etkili olmamasının ayrıca bir çalışma konusu olarak irdelenmesi gerekmektedir düşünölmüştür. Öte yandan kollajen uyarımı sonucu izlenen trombosit agregasyonunun diyabetik ratlarda çok daha şiddetli olduğu gözlenmiştir. Zaten birçok literatür bulgusu diyabet ve kronik böbrek yetmezliğinin endotel disfonksiyon ve trombus riski ile birlikte seyrettiğine vurgu yapmaktadır (288).
- ADP ile gerçekleştirilen uyarımlarda, kollajen için olduğu gibi trombosit agregasyonu diyabetik grupta daha şiddetli gerçekleşmiştir. Nondiyabetik grupta Prasugrel ve diğer tüm tuzlar etkili bulunmuştur, diyabetik grupta da benzer şekilde etki gözlenmiş ancak **4a** Prasugrel'e göre daha zayıf etkili iken **2a** ve **3a** en güçlü etkiyi gösteren tuzlar olmuştur.
- Epinefrin ile uyarımlarda, nondiyabetik grupta elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı farklar içermemektedir. Diyabetik grupta ise **2a** en güçlü antiplatelet etki göstermiş olup diğer gruplarda olduğu gibi bu grupta da diyabet trombosit agregasyonunun daha şiddetli gerçekleşmesine neden olmuştur.

In vivo-ex vivo deney ELISA analiz sonuçları yukarıda grafikler halinde sunulmuştur. Bu sonuçlar içerisinde dikkat çekici olan sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- cAMP düzeyleri, diyabetik grupta kontrole göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur, nondiyabetik gruplarda cAMP düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, diyabetik gruplarda **1a**, **2a** ve **4a** cAMP düzeylerinde anlamlı artışlara neden olmuştur.
- TxB₂ düzeyleri, diyabetik grupta dramatik bir biçimde yüksektir, nondiyabetik gruplarda gruplar arası fark gözlenmezken, diyabetik gruplarda tespit edilen dramatik yükseklik Prasugrel, **1a**, **2a**, **3a** ve **4a** tarafından anlamlı biçimde inhibe edilmiştir.
- GpIIb/IIIa reseptör düzeyleri, diyabetik grupta anlamlı biçimde yüksek iken, bu yükseklik Prasugrel, **1a**, **2a**, **3a** ve **4a** tarafından anlamlı bir biçimde inhibe edilmiştir.
- VASP düzeyleri arasında diyabetik grupta anlamlı bir fark gözlenmemiş, nondiyabetik grupta **2a** anlamlı bir azalmaya neden olmuştur.
- pAKT ve pERK2 ölçümlerinde, diyabetik gruplarda anlamlı bir fark gözlenmemiş, nondiyabetik gruplarda **1a**, **2a**, **3a** ve **4a** tarafından yüksek inhibisyon gerçekleşmiştir.

Elde edilen *in vitro* antiplatelet verilere göre aktif metabolitine dönüşüm gerektirmeyen Aspirin için inhibisyonun çok yüksek sonuçlanmasına rağmen Prasugrel bir prodrug olduğundan elde edilen tuzları (**1a**, **2a**, **3a**, **4a** ve **5a**) için beklendiği üzere *in vitro* ortamda aktif metabolitine dönüşmemesi sebebi ile yüksek inhibisyon elde edilememiş dolayısıyla sentezlenen tuzlar ve baz Prasugrel'in benzer yüzde inhibisyon gerçekleştirdiği tespit edilmiştir.

Literatürde birçok tiyenopiridin türevi için antikanser aktivite görülse de (22, 78, 143) FDA tarafından gerçekleştirilen ve 3 Şubat 2009'da yayınlanan kanser olaylarının ayrıntılı bir analizi, Prasugrel kullanımı ile çoklu solid tümör türlerinde artış olduğunu ortaya koymuştur (289). Prasugrel ve elde edilen tuzları (**1a**, **2a**, **3a**, **4a** ve **5a**) için elde edilen *in vitro* antikanser verilerine göre antikanser hücre hattına karşı aktivite gözlenmemiş, buna karşılık sağlıklı hücre hattına karşı sitotoksik etkinin olmadığı tespit edilmiştir. Burada Prasugrel ve tuzları için kanser riski artışının sitotoksiteden ziyade trombositlerin esansiyel aktivitelerinin bozulması ve damar içerisinde tümör hücresi durmasının stabilizasyonuna bağlı olduğu düşünülmüştür (290).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde birçok tiyenopiridin türevi için antikanser aktivite görülmüştür fakat bunun tersine Prasugrel kullanımı ile çoklu solid tümör türlerinde artış olduğu da ortaya koyulmuştur. *In vitro* antikanser bulgular dikkate alındığında, Prasugrel, **1a**, **2a**, **3a**, **4a** ve **5a** için antikanser hücre hattına karşı aktivite gözlenememiş dahası sağlıklı hücre hattına karşı sitotoksik etkinin olmadığı da tespit edilmiştir. Burada Prasugrel ve tuzları için kanser riski artışının sitotoksiteden ziyade trombositlerin esansiyel aktivitelerinin bozulması ve damar içerisinde tümör hücresi durmasının stabilizasyonuna bağlı olduğu düşünülmüştür.

In vitro antiplatelet bulgular dikkate alındığında, Aspirin için inhibisyonun yüksek sonuçlanmasına rağmen Prasugrel bir prodrug olduğundan elde edilen tuzları **1a**, **2a**, **3a**, **4a** ve **5a**'nın *in vitro* ortamda aktif metabolitine dönüşmemesi sebebi ile yüksek inhibisyon elde edilemediği tespit edilmiştir.

In vivo-ex vivo antiplatelet bulgular dikkate alındığında, **1a**, **2a**, **3a** ve **4a**'nın tam kan viskozitesi üzerinde herhangi bir değişiklik yaratmadığı ve Prasugrel'e yakın seviyede aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Tam kan kullanılan ölçümlerde, kollajen uyarımları için nondiyabetiklerde **2a** en yüksek olmak üzere **1a**, **2a**, **3a** ve **4a** aktivite göstermiş, diyabetiklerde hiçbir bileşik etki göstermemiştir. ADP ve epinefrin uyarımları için hiçbir grupta hiçbir bileşik etki göstermemiştir.

PRP kullanılan ölçümlerde, kollajen uyarımları için, nondiyabetiklerde **1a**, **3a** ve **4a**, diyabetiklerde ise **1a**, **2a** ve **3a** etkili bulunmuştur. ADP uyarımları için, nondiyabetiklerde **1a**, **2a**, **3a** ve **4a** etkili bulunmuş ve diyabetiklerde de benzer etki gözlenirken **2a** ve **3a**, Prasugrel'e göre daha güçlü etki göstermiştir. Epinefrin uyarımları için, nondiyabetiklerde anlamlı bir fark görülmezken, diyabetiklerde **2a** en güçlü antiplatelet aktiviteyi göstermiştir.

ELISA analizlerinde, cAMP düzeyleri için nondiyabetiklerde anlamlı bir fark gözlenmezken, diyabetiklerde **1a**, **2a** ve **4a** tarafından artırılmıştır. TxB₂ ve GpIIb/IIIa düzeyleri için nondiyabetiklerde fark gözlenmezken, diyabetiklerdeki yükseklik **1a**, **2a**, **3a** ve **4a** tarafından anlamlı biçimde inhibe edilmiştir. VASP düzeyi için nondiyabetiklerde **2a** anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. pAKT ve pERK2

ölçümlerinde, diyabetik gruplarda anlamlı sonuçlar elde edilmezken, nondiyabetik gruplarda **1a**, **2a**, **3a** ve **4a** tarafından yüksek inhibisyon gerçekleşmiştir.

Genel anlamda *in vivo-ex vivo* çalışmalara bakıldığında **2a** ve **3a** etkili Prasugrel tuzları olarak görülmüştür. Prasugrel maleat (**2a**) ve Prasugrel sitrat'ın (**3a**) diğer tuzlardan olan Prasugrel *trans*-1,2-siklohesan dikarboksilat'a (**1a**) göre daha polar yapıda oluşu, muhtemelen Prasugrel'in suda çözünmeyen yapısını daha çözünür hale getirdiğinden, aktif metabolitine biyotransformasyonunu kolaylaştırarak daha yüksek antiplatelet aktivite görülmesine neden olmuştur. Günümüzde sitratlı hematoloji test tüpleri içinde antikoagülan olarak kullanılan sitrik asitten elde edilen Prasugrel sitrat'ın (**3a**) deney sonuçları beklendiği üzere gerçekleşmiş, Prasugrel sitrat'ın (**3a**) yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu tuzlar ile daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği ortaya çıkmıştır. Bundan sonraki aşamalarda biyoyararlanım ve doz-yanıt ilişkisini ortaya koyacak çalışmaların faydalı olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y, Stroke AHASC. Heart disease and stroke statistics - 2008 update - A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008, 117(4): E25-E146.
2. Daiichi Sankyo Co. L. Annual reports: Daiichi Sankyo İlaç Ticaret Ltd. Şti; 2018 [updated 14.06.2016]. Available from: <https://www.daiichi-sankyo.com/>.
3. Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost* 2008, 99(3): 480-6.
4. Angiolillo DJ, Bhatt DL, Gurbel PA, Jennings LK. Advances in Antiplatelet Therapy: Agents in Clinical Development. *Am J Cardiol* 2009, 103(3A): 40a-51a.
5. Xiang YZ, Kang LY, Gao XM, Shang HC, Zhang JH, Zhang BL. Strategies for antiplatelet targets and agents. *Thromb Res* 2008, 123(1): 35-49.
6. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007, 357(24): 2482-94.
7. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2009, 102(2): 248-57.
8. Meadows TA, Bhatt DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res* 2007, 100(9): 1261-75.
9. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006, 99(12): 1293-304.
10. Yan AT, Yan RT, Tan M, Fung A, Cohen EA, Fitchett DH, Langer A, Goodman SG, Canadian Acute Coronary S, Registry I. Management patterns in relation to risk stratification among patients with non-ST elevation acute coronary syndromes. *Arch Intern Med* 2007, 167(10): 1009-16.
11. Alexander KP, Newby LK, Cannon CP, Armstrong PW, Gibler WB, Rich MW, Van de Werf F, White HD, Weaver WD, Naylor MD, Gore JM, Krumholz HM, Ohman EM, American Heart Association Council on Clinical C, Society of

- Geriatric C. Acute coronary care in the elderly, part I: Non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology: in collaboration with the Society of Geriatric Cardiology. *Circulation* 2007, 115(19): 2549-69.
12. Kung HC, Hoyert DL, Xu J, Murphy SL. Deaths: final data for 2005. *Natl Vital Stat Rep* 2008, 56(10): 1-120.
 13. Peterson ED, Spertus JA, Cohen DJ, Hlatky MA, Go AS, Vickrey BG, Saver JL, Hinton PC. Vision and creation of the American Heart Association pharmaceutical roundtable outcomes research centers. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2009, 2(6): 663-70.
 14. Morel O, Kessler L, Ohlmann P, Bareiss P. Diabetes and the platelet: Toward new therapeutic paradigms for diabetic atherothrombosis. *Atherosclerosis* 2010, 212(2): 367-76.
 15. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *New Engl J Med* 1998, 339(4): 229-34.
 16. Writing Group M, Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Roger VL, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010, 121(7): e46-e215.
 17. Dabrowska B. [Recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram according to the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee and the Heart Rhythm Society 2007 and 2009 - new standards]. *Kardiol Pol* 2009, 67(10): 1128-32.
 18. Kushner FG, Hand M, Smith SC, Jr., King SB, 3rd, Anderson JL, Antman EM, Bailey SR, Bates ER, Blankenship JC, Casey DE, Jr., Green LA, Hochman JS, Jacobs AK, Krumholz HM, Morrison DA, Ornato JP, Pearle DL, Peterson ED,

- Sloan MA, Whitlow PL, Williams DO. 2009 focused updates: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused update) a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2009, 54(23): 2205-41.
19. Shaw RE. The 2009 American Heart Association Annual Scientific Sessions in Orlando, Florida. *J Invasive Cardiol* 2009, 21(11): A4, A14.
 20. McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr* 2016, 7(2): 418-9.
 21. Gupta SP. Quantitative Structure-Activity Relationship Studies on Anticancer Drugs. *Chem Rev* 1994, 94(6): 1507-51.
 22. Benkli K. PO-35 - Designing of the new antithrombotic and also anticancer gold complexes. *Thromb Res* 2016, 140: S189.
 23. Ballerini P, Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P. P2Y12 Receptors in Tumorigenesis and Metastasis. *Front Pharmacol* 2018, 9(66).
 24. Bairey Merz CN, Alberts MJ, Balady GJ, Ballantyne CM, Berra K, Black HR, Blumenthal RS, Davidson MH, Fazio SB, Ferdinand KC, Fine LJ, Fonseca V, Franklin BA, McBride PE, Mensah GA, Merli GJ, O'Gara PT, Thompson PD, Underberg JA, American Academy of N, American Association of C, Pulmonary R, American College of Preventive M, American College of Sports M, American Diabetes A, American Society of H, Association of Black C, Centers for Disease C, Prevention, National Heart L, Blood I, National Lipid A, Preventive Cardiovascular Nurses A. ACCF/AHA/ACP 2009 competence and training statement: a curriculum on prevention of cardiovascular disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association/American College of Physicians Task Force on Competence and Training (Writing Committee to Develop a Competence and Training Statement on Prevention of Cardiovascular Disease): developed in collaboration with the American Academy of Neurology; American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; American College of Preventive Medicine; American College of Sports Medicine; American Diabetes Association; American Society

- of Hypertension; Association of Black Cardiologists; Centers for Disease Control and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; National Lipid Association; and Preventive Cardiovascular Nurses Association. *Circulation* 2009, 120(13): e100-26.
25. Thomas MR, Storey RF. The future of P2Y₁₂ receptor antagonists. *Platelets* 2015, 26(5): 392-8.
 26. Kei AA, Florentin M, Mikhailidis DP, Elisaf MS, Liberopoulos EN. Review: Antiplatelet drugs: what comes next? *Clin Appl Thromb Hemost* 2011, 17(1): 9-26.
 27. Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9(2): 154-69.
 28. Gent M, Blakely JA, Easton JD, Ellis DJ, Hachinski VC, Harbison JW, Panak E, Roberts RS, Sicurella J, Turpie AG. The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet* 1989, 1(8649): 1215-20.
 29. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2010, 38(1): 92-9.
 30. Thomas MR, Storey RF. Optimal management of antiplatelet therapy and proton pump inhibition following percutaneous coronary intervention. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2012, 14(1): 24-38.
 31. Thomas MR, Storey RF. Genetics of response to antiplatelet therapy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014, 124: 123-53.
 32. Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Braunwald E, Downey WE, Angiolillo DJ, Xenopoulos NP, Jakubowski JA, Li Y, Murphy SA, Qin J, McCabe CH, Antman EM, Wiviott SD, Investigators T-T. Pharmacodynamic assessment of platelet inhibition by prasugrel vs. clopidogrel in the TRITON-TIMI 38 trial. *Eur Heart J* 2009, 30(14): 1753-63.
 33. Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA. Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. *J Clin Pharmacol* 2010, 50(2): 126-42.
 34. Rehm JL, Eckstein JA, Farid NA, Heim JB, Kasper SC, Kurihara A, Wrighton SA, Ring BJ. Interactions of two major metabolites of prasugrel, a

- thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 2006, 34(4): 600-7.
35. Fabre JE, Gurney ME. Limitations of current therapies to prevent thrombosis: a need for novel strategies. *Mol Biosyst* 2010, 6(2): 305-15.
 36. Testa B. Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. *Curr Opin Chem Biol* 2009, 13(3): 338-44.
 37. Husted SE, Storey RF, Bliden K, Tantry US, Hoimark L, Butler K, Wei C, Teng R, Gurbel PA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ticagrelor in patients with stable coronary artery disease: results from the ONSET-OFFSET and RESPOND studies. *Clin Pharmacokinet* 2012, 51(6): 397-409.
 38. Teng R, Butler K. Effect of the CYP3A inhibitors, diltiazem and ketoconazole, on ticagrelor pharmacokinetics in healthy volunteers. *Journal of drug assessment* 2013, 2(1): 30-9.
 39. Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, Kelder JC, Ruven HJT, Bal ET, Deneer VH, Harmsze AM, van der Heyden JAS, Rensing BJWM, Suttorp MJ, Hackeng CM, ten Berg JM. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation. *JAMA, J Am Med Assoc* 2010, 303(8): 754-62.
 40. Wiviott SD, Bruanwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann F-J, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM, Antmann EM. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007, 357(20): 2001-15.
 41. Wijeyeratne YD, Joshi R, Heptinstall S. Ticagrelor: a P2Y12 antagonist for use in acute coronary syndromes. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2012, 5(3): 257-69.
 42. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009, 361(11): 1045-57.
 43. Vlaar PJ, de Smet BJ, Zijlstra F. DES or BMS in acute myocardial infarction? *Eur Heart J* 2007, 28(22): 2693-4.
 44. Schafer JA, Kjesbo NK, Gleason PP. Critical Review of Prasugrel for Formulary Decision Makers. *J Manag Care Pharm* 2009, 15(4): 335-43.

45. Pan XH, Huang R, Zhang JS, Ding LP, Li WJ, Zhang QH, Liu F. Efficient synthesis of prasugrel, a novel P2Y₁₂ receptor inhibitor. *Tetrahedron Lett* 2012, 53(40): 5364-6.
46. Kim S-D, Kang W, Lee HW, Park DJ, Ahn JH, Kim MJ, Kim EY, Kim S, Nam HS, Na HJ, Yoon Y-R. Bioequivalence and tolerability of two clopidogrel salt preparations, besylate and bisulfate: a randomized, open-label, crossover study in healthy Korean male subjects. *Clin Ther* 2009, 31(4): 793-803.
47. Guillory JK. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use Edited by P. Heinrich Stahl and Camile G. Wermuth. VHCA, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Switzerland, and Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2002. vix + 374 pp. 17.5 × 24.5 cm. ISBN 3-906390-26-8. \$130.00. *J Med Chem* 2003, 46(7): 1277-.
48. Bannigan P, Durack E, Madden C, Lusi M, Hudson SP. Role of Biorelevant Dissolution Media in the Selection of Optimal Salt Forms of Oral Drugs: Maximizing the Gastrointestinal Solubility and in Vitro Activity of the Antimicrobial Molecule, Clofazimine. *ACS Omega* 2017, 2(12): 8969-81.
49. Meyer V. Synthesis of thiophen. *Ber Dtsch Chem Ges* 1885: 217.
50. Zhiryakov VG, Abramenko PI. Synthesis of 4-methyl-5,6-thiophenopyridines. *Zhurnal Vsesoyuznogo Khimicheskogo Obshchestva im D I Mendeleeva* 1960, 5: 707-8.
51. Fields EK, Meyerson S. Mechanisms of formation and reactions of arynes at high temperatures. *Advan Phys Org Chem* 1968, 6: 1-61.
52. Litvinov VP, Dotsenko VV, Krivokolysko SG. The chemistry of thienopyridines. *Advances in Heterocyclic Chemistry, Vol 93* 2007, 93: 117-78.
53. Steinkopf W, Lutzkendorf G, inventors Aminothiophene (thiophenine) patent, DE257462, 1912.
54. Steinkopf W, Lutzkendorf G, inventors Mononitrothiophene patent, DE255394, 1912.
55. RxMediaPharma®. GEMAŞ Genel Mühendislik Mekanik Sanayi ve Ticaret A.Ş.; 2018.
56. Shestopalov AM, Sharanin YA, Litvinov VP, Promonenkov VK. Recyclization of 1,3-Dithiacyclohexene Enaminonitriles as the New Method of Stereoselective Synthesis of Substituted 3,4-Trans-1,2,3,4-Tetrahydro-6-Pyridine Thiolates. *Zh Obshch Khim* 1989, 59(10): 2395-6.

57. Babichev FS, Sharanin YA, Litvinov VP, Promonenkov VK, Volovenko YM. Intramolecular Interaction of Nitrile and Methylidyne, Hydroxyl, and Sulfhydryl Groups: Naukova Dumka; 1985. 200 pp. p.
58. Rangnekar DW, Kamat PY. Synthesis of 3-amino-2-aryloxy-4,6-dimethylthieno[2,3-b]pyridines and their application on polyester fibers as disperse dyes. *Indian J Fibre Text Res* 1992, 17(2): 98-100.
59. Attaby FA, Ibrahim LI, Eldin SM, Ellouh AKK. Reactions with Cyanothioacetamide Derivatives - Synthesis and Reactions of Some Pyrazolo[3,4-B]Pyridine Derivatives. *Phosphorus Sulfur* 1992, 73(1-4): 127-35.
60. Ozols AI, Pelcher YE, Kalme ZA, Popelis YY, Turovsky IV, Duburs GY. Synthesis and chemical properties of 8-aryl-7-acyl-1,6-dimethyl-6-hydroxy-4-cyano-5,6,7,8-tetrahydro-3(2H)-isoquinolinones and isoquinolinethiones. *Khim Geterotsikl+* 1996, (1): 59-66.
61. Rangnekar DW, Kamat PY, Mavlankar SV. A Facile Synthesis of 2-Substituted-8-Dicyanovinylindeno(2,1-D)Thiazoles. *Synth Commun* 1990, 20(16): 2447-52.
62. Abdel-Rahman AF, Bakhite EA, Abdel-Moneam MI, Mohamed TA. Synthesis and Antibacterial Activities of Some New Thieno-[2,3-b]Quinolines. *Phosphorus Sulfur* 1993, 75(1-4): 219-27.
63. Elkholy YM. Studies with polyfunctionally substituted heterocycles: Syntheses of polyfunctionally substituted isoquinolines. *Khim Geterotsikl+* 2002, (11): 1525-30.
64. Kislyi VP, Nesterov VN, Semenov VV. Heterocycles with a beta-nitroenamine fragment 3. Synthesis of 3-amino-2-nitrothieno[2,3-b]pyridines. Crystal and molecular structure of 3-amino-4-methyl-2-nitro-6-trifluoromethylthieno[2,3-b]pyridine. *Russ Chem Bull* 1999, 48(6): 1139-42.
65. Rodinovskaya LA, Shestopalov AM, Gromova AV. 4-(3-Cyanopyridin-2-ylthio)acetoacetates in synthesis of heterocycles. *Russ Chem Bull* 2003, 52(10): 2185-96.
66. Riedl BD, Haebich DD, Stolle AD, Ruppelt MD, Bartel SD, Guarnieri WD, Endermann RD, Kroll HPD, inventors; Google Patents, assignee. Pyridoannellierte Thienyl- und Furanyl-Oxazolidinone patent1997.
67. Mekheimer RA, Ahmed EK, El-Fahham HA, Kamel LH. Fused quinoline heterocycles IV. First synthesis of four heterocyclic ring systems of 1H-5-thia-

- 1,2,3,6-tetra-azaacephenanthrylenes and 1H-5-thia-1,3,6-triazaacephenanthrylenes. *Phosphorus Sulfur* 2001, 175: 49-63.
68. Mekheimer RA, Ahmed EK, El-Fahham HA, Kamel LH. Fused quinoline heterocycles IV: First synthesis of four heterocyclic ring systems of 1H-5-thia-1,2,3,6-tetraazaacephenanthrylenes and 1H-5-thia-1,3,6-triazaacephenanthrylenes. *Synthesis-Stuttgart* 2001, (1): 97-102.
69. Nesterov VN, Krivokolysko SG, Dyachenko VD, Dotsenko VV, Litvinov VP. Synthesis, properties, and structures of ammonium 4-aryl-5-cyano-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyridine-6-thiolates. *Russ Chem Bull* 1997, 46(5): 990-6.
70. Krivokolysko SG, Dyachenko VD, Nesterov VN, Sharanin YA, Struchkov YT. Synthesis, structure and properties of 4-aryl-6-hydroxy-3-cyano-5-ethoxy-carbonyl-3,4-dihydropyridine-2-(1H)-thiones. *Zh Org Khim* 1999, 35(6): 966-72.
71. Peinador C, Veiga C, Vilar J, Quintela JM. A Synthesis of Heterocyclic Ring-Systems - Pyrido[3',2'-4,5]Thieno[2,3-B]Pyrrolizine and Pyrido[6',5'-4,5][3',2'-4,5]Dithieno[2,3-B'-2,3-B]Dipyrrolizine. *Heterocycles* 1994, 38(6): 1299-305.
72. Yakovlev MY, Kadushkin AV, Solov'eva NP, Granik VG. The investigation of pyrrolo-, thieno- and furo[2,3-b]pyridine synthesis based on Thorpe-Ziegler reaction. *Heterocycl Commun* 1998, 4(3): 245-52.
73. Dave CG, Shah PR, Shah AB. Synthesis and Reactions of 2-Carboethoxy-3-Aminothieno[2,3-B]Pyridines. *Indian J Chem B* 1992, 31(8): 492-4.
74. Aadil M, Kirsch G. Synthesis of New 3-Aminothieno[2,3-B]Pyridine and Seleno[2,3-B]Pyridine Derivatives. *Phosphorus Sulfur* 1993, 82(1-4): 91-7.
75. Murugova YY, Romanova OB, Sokolova AS, Nikolayeva IS, Pushkina TV, Fomina AN, Granik VG. Synthesis and Biological-Activity of Furo[3,2-a]Carbazole Derivatives. *Khim Farm Zh+* 1990, 24(11): 44-6.
76. Yakovlev MY, Kadushkin AV, Solov'eva NP, Anisimova OS, Granik VG. omega-substituted-2-(polyenamino)- or annelated nitropyridines from 1-(3-cyano-5-nitropyridyl-2)-pyridinium salts. *Tetrahedron* 1998, 54(21): 5775-80.
77. Binsaleh NK, Wigley CA, Whitehead KA, van Rensburg M, Reynisson J, Pilkington LI, Barker D, Jones S, Dempsey-Hibbert NC. Thieno[2,3-b]pyridine derivatives are potent anti-platelet drugs, inhibiting platelet activation, aggregation and showing synergy with aspirin. *Eur J Med Chem* 2018, 143: 1997-2004.

78. Zafar A, Sari S, Leung E, Pilkington LI, van Rensburg M, Barker D, Reynisson J. GPCR Modulation of Thieno[2,3-b]pyridine Anti-Proliferative Agents. *Molecules* 2017, 22(12).
79. Paronikyan EG, Noravyan AS, Vartanyan SA. Synthesis, Transformations and Pharmacological Properties of Thienopyridines (a Review). *Khim Farm Zh* 1987, 21(5): 536-45.
80. Volochnyuk DM, Pushechnikov AO, Krotko DG, Sibgatulin DA, Kovalyova SA, Tolmachev AA. Electron-rich amino heterocycles for regiospecific synthesis of trifluoro-methyl-containing fused pyridines. *Synthesis-Stuttgart* 2003, (10): 1531-40.
81. Babichev FS, Sharanin YA, Promonenkov VP, Litvinov VP, Volovenko YM. Intramolecular Interaction of Nitrile and Amino Groups: Naukova Dumka; 1987. 240 pp. p.
82. Ozols Y, Vigante B, Duburs G. Sulfur-Containing 1,4-Dihydropyridines. *Khim Geterotsikl* 1994, (11-12): 1603-18.
83. Artemov VA, Ivanov VL, Litvinov VP. Derivatives of gamma-halocrotonic acids - convenient reagents in the synthesis of heterocyclic compounds. *Khim Geterotsikl* 2000, (4): 435-70.
84. Litvinov VP, Yakunin YY, Dyachenko VD. Nucleophilic vinyl substitution in the synthesis of heterocycles (review). *Khim Geterotsikl* 2001, (1): 41-80.
85. Barker JM. The Thienopyridines. *Adv Heterocycl Chem* 1977, 21: 65-118.
86. Malicorne G, Bompart J, Giral L, Despaux E. Synthesis and Antibacterial Activity of 4,7-Dihydro-4-Ethyl-7-Oxothieno(3,2-B)Pyridine-6-Carboxylic Acids. *Eur J Med Chem* 1991, 26(1): 3-11.
87. Wright TL, inventor; Google Patents, assignee. (Tetrazolyl) thienopyridinones patent 1986.
88. Balasundaram B, Venugopal M, Perumal PT. Synthetic Studies on N-Acetyl Derivatives of Amino-Acids and Thiolactone Using Vilsmeier-Haack Reagent. *Tetrahedron Lett* 1993, 34(26): 4249-52.
89. Luo JK, Castle RN. The Synthesis of 2 Novel Fused Thienopyridopyridazines. *J Heterocycl Chem* 1991, 28(1): 205-8.
90. Luo JK, Castle RN. The Synthesis of Novel Polycyclic Heterocyclic Ring-Systems Via Photocyclization .2. Benzo[H][1]Benzothieno[2,3-C]Quinoline and

- Benzo[F][1]Benzothieno[2,3-C]Quinoline. *J Heterocycl Chem* 1990, 27(4): 1031-3.
91. Sherif SM. Syntheses with heterocyclic beta-enaminonitriles: A facile preparation of polyfunctionally substituted thiophene, thieno[3,2-b]pyridine and thieno[3,2-d]pyrimidine derivatives. *Monatsh Chem* 1996, 127(8-9): 955-62.
 92. Claridge S, Raepfel F, Granger M-C, Bernstein N, Saavedra O, Zhan L, Llewellyn D, Wahhab A, Deziel R, Rahil J, Beaulieu N, Nguyen H, Dupont I, Barsalou A, Beaulieu C, Chute I, Gravel S, Robert M-F, Lefebvre S, Dubay M, Pascal R, Gillespie J, Jin Z, Wang J, Besterman JM, MacLeod AR, Vaisburg A. Discovery of a novel and potent series of thieno[3,2-b]pyridine-based inhibitors of c-Met and VEGFR2 tyrosine kinases. *Bioorg Med Chem Lett* 2008, 18(9): 2793-8.
 93. Dabaeva VV, Noravyan AS, Madakyan VN, Enokyan BD. Synthesis of new condensed thieno[2,3-b]pyridines containing pyrimidine and imidazole rings. *Khim Geterotsikl+* 1997, (6): 847-50.
 94. Sabnis RW, Rangnekar DW, Sonawane ND. 2-aminothiophenes by the Gewald reaction. *J Heterocycl Chem* 1999, 36(2): 333-45.
 95. Yurovskaya MA, Mitkin OD. Functionalization of pyridines. 3. Reactions proceeding with formation of the carbon-heteroatom bond with elements of IV, V and VI groups (review). *Khim Geterotsikl+* 1999, (4): 437-94.
 96. Litvinov VP, Roman SV, Dyachenko VD. Naphthiridines. Structure, physicochemical properties and general methods of synthesis. *Usp Khim* 2000, 69(3): 218-38.
 97. George D, Friedman M, Allen H, Argiriadi M, Barberis C, Bischoff A, Clabbers A, Cusack K, Dixon R, Fix-Stenzel S, Gordon T, Janssen B, Jia Y, Moskey M, Quinn C, Salmeron J-A, Wishart N, Woller K, Yu Z. Discovery of thieno[2,3-c]pyridines as potent COT inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2008, 18(18): 4952-5.
 98. Suh JT, inventor; Google Patents, assignee. Substituted-1,2,3,4-tetrahydrobenzothieno 2,3-pyridine patent1970.
 99. Kawakubo H, Nagatani T, Ueki S, inventors; Google Patents, assignee. Tetrahydropyridine derivative having substituents on three rings patent1993.
 100. Kawakubo H, Takagi S, Yamaura Y, Katoh S, Ishimoto Y, Nagatani T, Mochizuki D, Kamata T, Sasaki Y. (R)-1,2,3,4-Tetrahydro[1]Benzothieno[2,3-

- C]Pyridines - Novel Optically-Active Compounds with Strong 5-Ht(1a) Receptor-Binding Ability Exhibiting Anticonflict Activity and Lessening of Memory Impairment. *J Med Chem* 1993, 36(23): 3526-32.
101. Kawakubo H, Nagatani T, Showa Ueki d, inventors; Google Patents, assignee. Tetrahydropyridine derivative having substituents on three rings patent 1997.
 102. Ueki S, Kawakubo H, Okazaki K, Nagatani T, inventors; Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Japan . assignee. Preparation of benzo[b]thieno[2,3-c]- and benzo[b]furo[2,3-c]pyridine-3-carboxylic acid derivatives as psychotropics patent, WO8802751A1, 1988.
 103. Kubo K, Ueno Y, inventors; Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Japan . assignee. Preparation of (R)-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[b]thieno[2,3-c]pyridine-3-carboxamide derivatives as central nervous system agents patent, JP04154785A, 1992.
 104. Kawakubo H, Hase T, Ueki A, inventors; Asahi Chemical Ind, Japan . assignee. Preparation of 1,2,3,4-tetrahydrobenzo[b]thieno[2,3-c]pyridine-3-carboxamide derivatives as central nervous system agents patent, JP05163278A, 1993.
 105. Kawakubo H, inventor; Asahi Chemical Ind, Japan . assignee. Method for preparation of optically active (R)-N-piperonyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[b]thieno[2,3-c]pyridine-3-carboxamide as anxiolytic agent patent, JP07109281A, 1995.
 106. Miyazawa S, Okano K, Shimomura N, Clark RSJ, Kawahara T, Asano O, Yoshimura H, Miyamoto M, Sakuma Y, Muramoto K, Obaishi H, Harada K, Kajima T, Yamada K, Tsunoda H, Katayama S, Abe S, Asakawa N, Souda S, Horie T, Sato T, Machida Y, Katayama K, Yamatsu I. Structure Activity Studies on Triazolothienodiazepine Derivatives as Platelet-Activating-Factor Antagonists. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1991, 39(12): 3215-20.
 107. Miyazawa S, Okano K, Kawahara T, Machida Y, Yamatsu I. Hapten Synthesis for (+)-6-(2-Chlorophenyl)-3-Cyclopropanecarbonyl-8,11-Dimethyl-2,3,4,5-Tetra-Hydro-8h-Pyrido[4',3'-4,5]Thieno[3,2-F]Triazolo[4,3-a][1,4]Diazepine (E6123). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992, 40(3): 762-5.
 108. El-Kashef HS, Geies AA, El-Dean AMK, Abdel-Hafez AA. Synthesis of thieno[2,3-c]pyridines and related heterocyclic systems. *J Chem Technol Biotechnol* 1993, 57(1): 15-9.

109. Sauter F, Jordis U, Frohlich J, Gewald K, Grohmann F, Ahmed EK. Syntheses of Fully Aromatic Pyrido[4',3'/4,5]Thieno[2,3-D]Pyrimidine Derivatives. *Ach-Models Chem* 1994, 131(3-4): 489-98.
110. Baba A, Mori A, Yasuma T, Unno S, Makino H, Sohda T. Studies on disease-modifying antirheumatic drugs. IV. Synthesis of novel thieno[2,3-b : 5,4-c']dipyridine derivatives and their anti-inflammatory effect. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1999, 47(7): 993-9.
111. Wright SW, Corbett RL. A Synthesis of 2-Aryl-3-Hydroxybenzothiophenes and Analogs by the Base Promoted Cyclization of N-Phenyl-2-(Benzylthio)Benzamides. *Tetrahedron Lett* 1993, 34(18): 2875-8.
112. Romagnoli R, Baraldi PG, Carrion MD, Cruz-Lopez O, Cara CL, Tolomeo M, Grimaudo S, Cristina AD, Pipitone MR, Balzarini J, Kandil S, Brancale A, Sarkar T, Hamel E. Synthesis and biological evaluation of 2-amino-3-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-6-substituted-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine derivatives as antimitotic agents and inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg Med Chem Lett* 2008, 18(18): 5041-5.
113. Okano K, Miyazawa S, Clark RSJ, Abe S, Kawahara T, Shimomura N, Asano O, Yoshimura H, Miyamoto M, Sakuma Y, inventors; Google Patents, assignee. Triazolo-1,4-diazepine derivatives and their use in pharmaceuticals patent1995.
114. Esanu A, Braquet P, Martin C, Laurent JP, inventors; Google Patents, assignee. Sulfonyl derivatives of thieno-triazolo-diazepines useful as anti-PAF and anti-ischemic agents patent1991.
115. Braquet P, Esanu A, Laurent JP, Rolland A, inventors; Societe de Conseils de Recherches et d'Applications Scientifiques, Fr. . assignee. Preparation of 6-(2-chlorophenyl)-9-carbamoyl-7,8,9,10-tetrahydro-1-methyl-4H-pyrido[4',3',4,5]thieno[3,2-f]-1,2,4-triazolo[4,3-a]-1,4-diazepines as PAF antagonists patent, GB2242427A, 1991.
116. Braquet P, Esanu A, Laurent JP, Rolland A, inventors; Societe de Conseils de Recherches et d'Applications Scientifiques, Fr. . assignee. Preparation of 7,8,9,10-tetrahydropyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-f]-1,2,4-triazolo[4,3-a]-1,4-diazepines as platelet activating factor (PAF) antagonists patent, DE4010316A1, 1990.
117. Esanu A, Braquet P, Martin C, Laurent JP, inventors; Societe de Conseils de Recherches et d'Applications Scientifiques, Fr. . assignee. Preparation of 9-

- sulfonyl-7,8,9,10-tetrahydro-4H-pyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-f]-1,2,4-triazolo[4,3-a]-1,2,1-diazepines as platelet activating factor (PAF) antagonists patent, DE4010361A1, 1990.
- 118.** Braquet P, Esanu A, Laurent JP, Pommier J, inventors; Societe de Conseils de Recherches et d'Applications Scientifiques, Fr. . assignee. Preparation of 9-alkylthiomethylcarbonyl-7,8,9,10-tetrahydro-1-methyl-4H-pyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-f]-1,2,4-triazolo[4,3-a]-1,4-diazepines as antiischemics and blood platelet aggregation inhibitors patent, DE4015137A1, 1990.
- 119.** Braquet P, Esanu A, Laurent JP, Pommier J, inventors; Societe de Conseils de Recherches et d'Applications Scientifiques, Fr. . assignee. Preparation of thienotriazolodiazepines as benzodiazepine receptor antagonists patent, GB2243829A, 1991.
- 120.** Okano K, Miyazawa S, Clark RSJ, Abe S, Kawahara T, Shimomura N, Asano O, Yoshimura H, Miyamoto M, et al, inventors; Eisai Co., Ltd., Japan . assignee. Preparation of 8H-pyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepines as platelet activating factor (PAF) inhibitors patent, EP367110A1, 1990.
- 121.** Miyazawa S, Okano K, Shimomura N, Kawahara T, Asano O, Yoshimura H, Kawai T, Souda S, Yoshida Y, Sato T, Machida Y, Yamatsu I. A Practical Synthesis of Optically-Active Platelet-Activating-Factor Antagonist, (+)-6-(2-Chlorophenyl)-3-Cyclopropanecarbonyl-8,11-Dimethyl-2,3,4,5-Tetrahydro-8h-Pyrido[4',3'-4,5]Thieno[3,2-F][1,2,4]Triazolo[4,3-a][1,4]Diazepine (E6123), and Its Absolute-Configuration. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992, 40(2): 521-3.
- 122.** Liberatore A-M, Bigg D, inventors; Societe de Conseils de Recherches et d'Applications Scientifiques S.C.R.A.S, Fr. . assignee. Pyridothienodiazepines useful as somatostatin receptor ligands, method for their production, and pharmaceutical compositions containing them patent, WO2000061587A1, 2000.
- 123.** Bigg D, Liberatore A-M, Pommier J, Taylor J, inventors; Societe De Conseils De Recherches Et D'Applications Scientifiques S.C.R.A.S, Fr. . assignee. Use of diazepines for preparing medicines for treating pathological conditions or diseases involving one of the growth hormone release inhibiting factor receptors patent, WO9965917A1, 1999.

124. Fujita M, Seki T, Inada H, Sano T, inventors; Nikken Chemicals Co., Ltd., Japan . assignee. Preparation of triazolo-1,4-diazepine compounds as blood platelet-activating factor (PAF) antagonists and thromboxane A2 (TxA2) synthesis inhibitors and medicinal composition containing the same patent, WO9858930A1, 1998.
125. Klemm LH. Recent interrelationships in the chemistries of thienopyridines, benzopyridines, and benzothiophenes. *Trends Heterocycl Chem* 1997, 5: 37-55.
126. Liu KKC, Sakya SM, O'Donnell CJ, Flick AC, Li J. Synthetic approaches to the 2009 new drugs. *Biorg Med Chem* 2011, 19(3): 1136-54.
127. Panak E, Maffrand JP, Picardfraire C, Vallee E, Blanchard J, Roncucci R. Ticlopidine - a Promise for the Prevention and Treatment of Thrombosis and Its Complications. *Haemostasis* 1983, 13: 1-54.
128. Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 1997, 54(5): 745-50.
129. Hashimoto M, Sugidachi A, Isobe T, Niitsu Y, Ogawa T, Jakubowski JA, Asai F. The influence of P2Y(12) receptor deficiency on the platelet inhibitory activities of prasugrel in a mouse model: Evidence for specific inhibition of P2Y(12) receptors by prasugrel. *Biochem Pharmacol* 2007, 74(7): 1003-9.
130. Sugidachi A, Asai F, Yoneda K, Iwamura R, Ogawa T, Otsuguro K, Koike H. Antiplatelet action of R-99224, an active metabolite of a novel thienopyridine-type G(i)-linked P2T antagonist, CS-747. *Br J Pharmacol* 2001, 132(1): 47-54.
131. Suguro T, inventor; Nisshin Flour Milling Co., Ltd., Japan; Nisshin Chemicals Co., Ltd. . assignee. 5-(O-chlorobenzyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridine patent, DE3534827A1, 1986.
132. Magni A, Signorelli G, inventors; Poli Industria Chimica S.P.A., Italy . assignee. Preparation thienopyridine derivatives patent, EP829482A2, 1998.
133. Castro B, Dormoy J-R, Previero A, inventors; Sanofi, Fr. . assignee. Improved method for preparing 2-thienylethylamine derivatives, including an intermediate for clopidogrel patent, WO9839322A1, 1998.
134. Heymes A, Castro B, Bakonyi M, Csatari Nagy M, Molnar LM, inventors; Sanofi, Fr. . assignee. New 2-[(2-thienyl)ethylamino](2-halophenyl)acetonitrile intermediates for clopidogrel and analogs, and process for their preparation patent, WO9851682A1, 1998.
135. Bousquet A, Musolino A, inventors; SANOFI, Fr. . assignee. Hydroxyacetic ester derivatives, namely (R)-methyl 2-(sulfonyloxy)-2-(chlorophenyl)acetates,

- preparation method, and use as synthesis intermediates for clopidogrel patent, WO9918110A1, 1999.
136. Bakonyi M, Bai T, Dombrady Z, Gaspar K, Supic A, inventors; Sanofi-Synthelabo, Fr. . assignee. Process for the racemization of [2-(2-thienyl)ethylamino](2-halophenyl)acetamides using organic or inorganic bases patent, WO2000027840A1, 2000.
 137. Joshi S, Bhuta S, Nair R, Salunke S, inventors; Sandoz AG, Switz. . assignee. Preparation of S-clopidogrel patent, WO2010046476A1, 2010.
 138. Descamps M, Radisson J, inventors; Sanofi SA, Fr. . assignee. Preparation of methyl α -[4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyrid-5-yl]-2'-chlorophenylacetate patent, EP466569A1, 1992.
 139. Burgos A, Herbert JM, Simpson I. ortho-metalation/chlorination of benzoic acid derivatives: Preparation of [benzene-U-C-13]-rac-Clopidogrel ([benzene-U-C-13]-rac-SR25990C). *J Labelled Compd Rad* 2000, 43(9): 891-8.
 140. Cen J. Synthesis of ticlopidine hydrochloride. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* 1997, 28(5): 197-9.
 141. Cooper GF, McCarthy KE, inventors; Elf Sanofi SA, Fr. . assignee. Preparation of N-(2-chlorobenzyl)-2,2-dioxo-1,2,3-oxathiazolidines as intermediates for thieno[3,2-c]pyridines (ticlopidine) patent, EP497695A1, 1992.
 142. Sumita K, Koumori M, Ohno S. A Modified Mannich Reaction Using 1,3-Dioxolane. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1994, 42(8): 1676-8.
 143. Thomson DS, Koch K, Hwang CK, Russo-Rodriguez SE, Hummel C, inventors; Amgen Inc., USA . assignee. Hydroxamic acid substituted fused heterocyclic metalloproteinase inhibitors patent, WO9906410A1, 1999.
 144. De Nanteuil G, Paladino J, Remond G, Atassi G, Pierre A, Tucker G, Bonnet J, Sabatini M, inventors; Adir Et Compagnie, Fr. . assignee. Fused pyridine N-hydroxy carboxamide derivatives and analogs as inhibitors of metalloproteases, process for their preparation, and pharmaceutical compositions containing them patent, EP803505A1, 1997.
 145. Hornback WJ, Munroe JE, Shepherd TA, inventors; Eli Lilly and Co., USA . assignee. Preparation of carbamoylheterocyclopyridines as HIV protease inhibitors patent, US5480887A, 1996.
 146. Decroix B, Morel J. Intramolecular Cyclization - Synthesis of 9-Oxo-4h,9h-Pyrrolo[1,2-a]Thieno[2,3-D]Pyridine and 4-Oxo-4h,9h-Pyrrolo[1,2-

- a]Thieno[2,3-D]Pyridine - Synthesis of Pyrrolo[1,2-a]Thieno[3,2-E][1,4]Diazepine and Pyrrolo[1,2-a]Thieno[2,3-E][1,4]Diazepine. *J Heterocycl Chem* 1991, 28(1): 81-7.
147. Yamanochi T, inventor; Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Japan . assignee. Thienopyridine derivative patent, JP61271291A, 1986.
148. Bousquet A, Calet S, Heymes A, inventors; Sanofi SA, Fr. . assignee. Isopropyl 2-thienylglycidate, process for its preparation, and its use as synthetic intermediate for ticlopidine and clopidogrel patent, EP465358A1, 1992.
149. Khatri HN, DeHoff BS, inventors; SANOFI, Fr. . assignee. Process for preparation of 2-thiopheneethanamine and its conversion to ticlopidine patent, EP439404A2, 1991.
150. Hartman GD, Halczenko W, Prugh JD, inventors; Merck and Co., Inc., USA . assignee. Thienopyridine derivatives and analogs useful as fibrinogen receptor antagonists patent, US5334596A, 1994.
151. Yamakawa K, Sato K, inventors; Fuji Photo Film Co Ltd, Japan . assignee. Preparation of 5-(2-chlorobenzyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridine and its salts patent, JP06298766A, 1994.
152. Halczenko W, Stump CA, inventors; Merck & Co., Inc., USA . assignee. Preparation of imidazolymethylthienopyridines, -azabenzimidazoles, and related compounds as inhibitors of farnesyl-protein transferase patent, WO9927929A1, 1999.
153. Yamakawa K, Sato K, Suginome T, inventors; Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan . assignee. Diazolization and reductive nitrogen-removing process for preparing 2-alkoxycarbonyl-5-(2-chlorophenylmethyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridines derivatives patent, EP573975A1, 1993.
154. Ohkubo M, Kuno A, Katsuta K, Ueda Y, Shirakawa K, Nakanishi H, Kinoshita T, Takasugi H. Studies on cerebral protective agents .10. Synthesis and evaluation of anticonvulsant activities for novel 4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridines and related compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1996, 44(4): 778-84.
155. Yamakawa K, Sato K, Suginome T, inventors; Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan . assignee. 5-Acyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridine-2-carboxylic acid-derivative ticlopidine intermediates patent, EP573954A1, 1993.

- 156.** Yamakawa K, Sato K, Suginome T, inventors; Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan . assignee. 3-amino-5-(2-chlorophenylmethyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridine-2-carboxylic acid derivatives and process for their preparation patent, EP573955A1, 1993.
- 157.** Yamakawa K, Sato K, Sugime T, inventors; Fuji Photo Film Co Ltd, Japan . assignee. Preparation of N-acyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridine derivative patent, JP06271582A, 1994.
- 158.** Inoue T, Nakamura K, Hagihara M, Miyata H, Wada Y, Yokota N, inventors; Daiichi Sankyo Company, Limited, Japan; Ube Industries, Ltd. . assignee. Process for producing high-purity prasugrel and acid addition salts thereof patent, WO2007114526A1, 2007.
- 159.** Kaminska K, Hajicek J, Stepankova H, inventors; Zentiva, K.S., Czech Rep. . assignee. Preparation of polymorphic form C of prasugrel hydrobromide patent, CZ305314B6, 2015.
- 160.** Al Omari MMH, Qinna NA, Rashid IS, Al-Sou'od KA, Badwan AA. Prasugrel Hydrochloride. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. 2015.
- 161.** Maruszak W, Cybulski M. Simultaneous determination of the counter ion and possible impurity from the synthetic route in the pharmaceutical substance prasugrel hydrochloride. *J Pharm Biomed Anal* 2015, 105: 32-8.
- 162.** Du W, Yin Q, Bao Y, Xie C, Hou B, Hao H, Chen W, Wang J, Gong J. Concomitant Polymorphism of Prasugrel Hydrochloride in Reactive Crystallization. *Ind Eng Chem Res* 2013, 52(46): 16182-9.
- 163.** Stepankova H, Kaminska K, Hajicek J, inventors; Zentiva, K.S., Czech Rep. . assignee. A method for the preparation of prasugrel hydrochloride in polymorphic form B patent, WO2011069473A1, 2011.
- 164.** Taylor D. The Pharmaceutical Industry and the Future of Drug Development. Pharmaceuticals in the Environment: The Royal Society of Chemistry; 2016. p. 1-33.
- 165.** Almeida e. Sousa L, Reutzel-Edens SM, Stephenson GA, Taylor LS. Supersaturation Potential of Salt, Co-Crystal, and Amorphous Forms of a Model Weak Base. *Cryst Growth Des* 2016, 16(2): 737-48.

166. Domingos S, Andre V, Quaresma S, Martins ICB, Minas da Piedade MF, Duarte MT. New forms of old drugs: improving without changing. *J Pharm Pharmacol* 2015, 67(6): 830-46.
167. Cerreia Vioglio P, Chierotti MR, Gobetto R. Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges. *Adv Drug Delivery Rev* 2017, 117: 86-110.
168. Li S, Wong S, Sethia S, Almoazen H, Joshi YM, Serajuddin AT. Investigation of solubility and dissolution of a free base and two different salt forms as a function of pH. *Pharm Res* 2005, 22(4): 628-35.
169. Biswas N. Chapter 7 Solid Forms and Pharmacokinetics. *Pharmaceutical Salts and Co-crystals: The Royal Society of Chemistry*; 2012. p. 128-53.
170. Paulekuhn GS, Dressman JB, Saal C. Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection based on analysis of the Orange Book database. *J Med Chem* 2007, 50(26): 6665-72.
171. O'Connor KM, Corrigan OI. Preparation and characterisation of a range of diclofenac salts. *Int J Pharm* 2001, 226(1-2): 163-79.
172. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 11th Edition By Richard J. Lewis, Sr. (Lewis Information Systems, Inc.). John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ. 2004. \$595.00 print set (other pricings available for CD-ROM and online versions). ISBN 0-471-47662-5 for print set. *J Am Chem Soc* 2005, 127(8): 2794-.
173. Economics M, Staff P. PDR Generics: PDR Network, LLC; 1998.
174. Thackaberry EA. Non-clinical toxicological considerations for pharmaceutical salt selection. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012, 8(11): 1419-33.
175. Saal C, Becker A. Pharmaceutical salts: a summary on doses of salt formers from the Orange Book. *Eur J Pharm Sci* 2013, 49(4): 614-23.
176. Wu Y, Hwang T-L, Algayer K, Xu W, Wang H, Procopio A, DeBusi L, Yang C-Y, Matuszewska B. Identification of oxidative degradates of the TRIS salt of a 5,6,7,8-tetrahydro-1,8-naphthyridine derivative by LC/MS/MS and NMR spectroscopy-interactions between the active pharmaceutical ingredient and its counterion. *J Pharm Biomed Anal* 2003, 33(5): 999-1015.
177. Loeser E, Sutton P, Skorodinsky A, Lin M, Yowell G. Chemical interactions between an active pharmaceutical ingredient and its counterion in a

- tromethamine salt under forced degradation conditions. *Drug Dev Ind Pharm* 2012, 38(3): 357-64.
- 178.** DeJarlais WJ, Gast LE, Cowan JC. Water-solubilizable oxazoline polyester coating resins. *J Am Oil Chem Soc* 1966, 43(1): 41-5.
- 179.** Gu L, Strickley RG. Preformulation salt selection. Physical property comparisons of the tris(hydroxymethyl)aminomethane (THAM) salts of four analgesic/antiinflammatory agents with the sodium salts and the free acids. *Pharm Res* 1987, 4(3): 255-7.
- 180.** Oxalic Acid, Dihydrate: SAMIRIAN CHEMICALS INC. 1999 S. BASCOM AVE., SUITE #515 CAMPBELL, CA 95008. Available from: <http://www.nsfarrington.com/nsfarrDocs/Oxalic%20Acid%20-%20Samirian.pdf>.
- 181.** Tunali Y, Karaca H, Iscan G, Demirci F, Benkli K. Antibacterial and antifungal activities of some trimethoprim salts. *Med Chem Res* 2012, 21(6): 932-5.
- 182.** Everett RM, Descotes G, Rollin M, Greener Y, Bradford JC, Benziger DP, Ward SJ. Nephrotoxicity of pravadoline maleate (WIN 48098-6) in dogs: evidence of maleic acid-induced acute tubular necrosis. *Fundam Appl Toxicol* 1993, 21(1): 59-65.
- 183.** Haviv YS, Wald H, Levi M, Dranitzki-Elhalel M, Popovtzer MM. Late-onset downregulation of NaPi-2 in experimental Fanconi syndrome. *Pediatr Nephrol* 2001, 16(5): 412-6.
- 184.** Zager RA, Johnson AC, Naito M, Bomsztyk K. Maleate nephrotoxicity: mechanisms of injury and correlates with ischemic/hypoxic tubular cell death. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, 294(1): F187-97.
- 185.** Suokas A, Kupari M, Heikkila J, Lindros K, Ylikahri R. Acute cardiovascular and metabolic effects of acetate in men. *Alcohol Clin Exp Res* 1988, 12(1): 52-8.
- 186.** Ashworth IW, Bush E, Chan LC, Cherryman J, Cox BG, Muir J, Korupaju SR, Keshwan J. Where Has My Acid Gone? Understanding the Self-Catalyzed Esterification of Maleic Acid in Methanol During Salt Formation. *Org Process Res Dev* 2012, 16(10): 1646-51.
- 187.** Gherasim GM, Zugravescu I. Maleinimide Compounds .1. N-Substituted Maleinimides - Synthesis and Properties. *Rev Chim* 1981, 32(11): 1047-54.
- 188.** Ligett WB, Wolf CN, Closson RD, inventors; Ethyl Corp. . assignee. Maleamic esters patent, US2779704, 1957.

- 189.** Liu K-C, Chen T-B, Jan H-J, Shih C-Y. Synthesis of N-substituted maleamic acids as potential hypocholesteremics. *J Chin Chem Soc (Taipei)* 1973, 20(3): 163-9.
- 190.** Toyosato T, Ochiai M, Hagimoto H, Tamura H, Kamikado T, inventors; Takeda Chemical Industries, Ltd. . assignee. Method of regulating growth of plants patent, US3326662, 1967.
- 191.** Kozminykh VO, Andreichikov YS, Chernobrovin NI, Kolla VE, Drovosekova LP, Shelenkova SA, Semyonova ZN. Maleic acid substituted amides and hydrazides. I. Synthesis and biological activity of maleic acid o-hydroxy-, o-aminobenzoylhydrazides and of 1H-2,10-dihydropyridazino[3,2-b]quinazolin-2,10-dione. *Khim-Farm Zh* 1992, 26(11-12): 32-5.
- 192.** Citric Acid: Unep Publications; 2001 [updated 10 November 2000]. OECD SIDS Initial Assessment Report]. Available from: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/77929.pdf>.
- 193.** Kaiser C. New Drugs 2001. Including All Drugs Approved in 2000 and 2001 Edited by G. W. A. Milne. Ashgate Publishing Company, Burlington, VT. 2002. xxiii + 154 pp. 12.5 × 25 cm. ISBN 0-566-08516-X. \$90.00. *J Med Chem* 2003, 46(4): 650-.
- 194.** Deshmukh B, Narkhede K, Chaudhari P. Formulation and In Vitro Evaluation of Fast Dissolving Tablet Containing Sildenafil Citrate Nanocrystals. *IJPRR* 2014, 3(6): 10-8.
- 195.** Filipcsei G, Oetvoes Z, Pongracz K, Darvas F, inventors; NanoForm Hungary Ltd., Hung. . assignee. Nanostructured sildenafil base, its pharmaceutically acceptable salts and co-crystals, compositions of them, process for the preparation thereof and pharmaceutical compositions containing them patent, WO2010146407A1, 2010.
- 196.** Jirman J, Richter J, inventors; Zentiva A.S., Czech Rep. . assignee. New crystalline salts of bazedoxifene with di-, tri-, or polycarboxylic acids patent, WO2009012734A2, 2009.
- 197.** Bueschken W, Grass M, Kaizik A, Maschmeyer D, Nierlich F, Tuchlenski A, inventors; OXENO Olefinchemie GmbH, Germany . assignee. Stereoselective hydrogenation process and catalysts for the manufacture of mixture of alicyclic polycarboxylic acid esters with a high cis-isomer content for use as plasticizers patent, DE10146848A1, 2003.

- 198.** Alves A, Kucharska A, Erratico C, Xu F, Den Hond E, Koppen G, Vanermen G, Covaci A, Voorspoels S. Human biomonitoring of emerging pollutants through non-invasive matrices: state of the art and future potential. *Anal Bioanal Chem* 2014, 406(17): 4063-88.
- 199.** Hannon PR, Flaws JA. The Effects of Phthalates on the Ovary. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015, 6: 8.
- 200.** Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007, 51(7): 899-911.
- 201.** Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Kato K, Malek NA, Hodge CC, Hurtz D, 3rd, Calafat AM, Needham LL, Brock JW. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch Toxicol* 2003, 77(10): 561-7.
- 202.** Packham MA, Mustard JF. Platelet aggregation and adenosine diphosphate/adenosine triphosphate receptors: A historical perspective. *Semin Thromb Hemost* 2005, 31(2): 129-38.
- 203.** Cattaneo M, Gachet C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscl Throm Vas* 1999, 19(10): 2281-5.
- 204.** Cattaneo M, Canciani MT, Lecchi A, Kinloughrathbone RL, Packham MA, Mannucci PM, Mustard JF. Released Adenosine-Diphosphate Stabilizes Thrombin-Induced Human Platelet Aggregates. *Blood* 1990, 75(5): 1081-6.
- 205.** Cattaneo M, Akkawat B, Kinloughrathbone RL, Packham MA, Cimminiello C, Mannucci PM. Ticlopidine Facilitates the Deaggregation of Human Platelets Aggregated by Thrombin. *Thromb Haemost* 1994, 71(1): 91-4.
- 206.** Trumel C, Payrastre B, Plantavid M, Hechler B, Viala C, Presek P, Martinson EA, Cazenave JP, Chap H, Gachet C. A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 1999, 94(12): 4156-65.
- 207.** Jin JG, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(14): 8070-4.
- 208.** Savi P, Zacharyus JL, Delesque-Touchard N, Labouret C, Herve C, Uzabiaga MF, Pereillo JM, Culouscou JM, Bono F, Ferrara P, Herbert JM. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(29): 11069-74.

209. Cattaneo M, editor *The platelet P2 receptors* 2013: Elsevier Ltd.
210. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2000, 84(5): 891-6.
211. Ding ZR, Kim S, Dorsam RT, Jin JG, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 2003, 101(10): 3908-14.
212. Zhong XT, Kriz R, Seehra J, Kumar R. N-linked glycosylation of platelet P2Y₁₂ ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression. *FEBS Lett* 2004, 562(1-3): 111-7.
213. Kauffenstein G, Hechler B, Cazenave JP, Gachet C. Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y₁₂ receptor. *J Thromb Haemost* 2004, 2(11): 1980-8.
214. Quinton TM, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Lipid rafts are required in G_α(i) signaling downstream of the P2Y₁₂ receptor during ADP-mediated platelet activation. *J Thromb Haemost* 2005, 3(5): 1036-41.
215. Savi P, Pflieger AM, Herbert JM. cAMP is not an important messenger for ADP-induced platelet aggregation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996, 7(2): 249-52.
216. Haslam RJ. Interactions of the pharmacological receptors of blood platelets with adenylate cyclase. *Ser Haematol* 1973, 6(3): 333-50.
217. Gratacap MP, Herault JP, Viala C, Ragab A, Savi P, Herbert JM, Chap H, Plantavid M, Payrastre B. Fc gamma RIIA requires a Gi-dependent pathway for an efficient stimulation of phosphoinositide 3-kinase, calcium mobilization, and platelet aggregation. *Blood* 2000, 96(10): 3439-46.
218. Dangelmaier C, Jin JG, Smith JB, Kunapuli SP. Potentiation of thromboxane A₂-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb Haemost* 2001, 85(2): 341-8.
219. Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann MP, Montrucchio G. Resistance to thromboembolism in PI3K gamma-deficient mice. *FASEB J* 2001, 15(9): 2019-+.
220. Jackson SP, Yap CL, Anderson KE. Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function. *Biochem Soc Trans* 2004, 32: 387-92.

221. Garcia A, Kim S, Bhavaraju K, Schoenwaelder SM, Kunapuli SP. Role of phosphoinositide 3-kinase beta in platelet aggregation and thromboxane A(2) generation mediated by G(i) signalling pathways. *Biochem J* 2010, 429: 369-77.
222. Jarvis GE, Humphries RG, Robertson MJ, Leff P. ADP can induce aggregation of human platelets via both P2Y(1) and P-2T receptors. *Br J Pharmacol* 2000, 129(2): 275-82.
223. Kauffenstein G, Bergmeier W, Eckly A, Ohlmann P, Leon C, Cazenave JP, Nieswandt B, Gachet C. The P2Y(12) receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha(IIb)beta(3) integrin - a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett* 2001, 505(2): 281-90.
224. Cattaneo M. The P2 receptors and congenital platelet function defects. *Semin Thromb Hemost* 2005, 31(2): 168-73.
225. Cattaneo M, Lombardi R, Zighetti ML, Gachet C, Ohlmann P, Cazenave JP, Mannucci PM. Deficiency of (P-33)2MeS-ADP binding sites on platelets with secretion defect, normal granule stores and normal thromboxane A(2) production - Evidence that ADP potentiates platelet secretion independently of the formation of large platelet aggregates and thromboxane A(2) production. *Thromb Haemost* 1997, 77(5): 986-90.
226. Li ZY, Zhang GY, Le Breton GC, Gao XP, Malik AB, Du XP. Two waves of platelet secretion induced by thromboxane A(2) receptor and a critical role for phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem* 2003, 278(33): 30725-31.
227. Cattaneo M, Lecchi A, Lombardi R, Gachet C, Zighetti ML. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2(CYC) receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A(2) production and normal granule stores - Further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2(CYC) receptors. *Arterioscl Thromb Vas* 2000, 20(11): E101-E6.
228. Cattaneo M, Lecchi A, Randi AM, Mcgregor JL, Mannucci PM. Identification of a New Congenital Defect of Platelet-Function Characterized by Severe Impairment of Platelet Responses to Adenosine-Diphosphate. *Blood* 1992, 80(11): 2787-96.
229. Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, Zhang FL, Gustafson E, Monsma FJ, Wiekowski MT, Abbondanzo SJ, Cook DN, Bayne ML, Lira SA, Chintala MS. Molecular identification and characterization

- of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest* 2001, 107(12): 1591-8.
- 230.** Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Martinez C, Lecchi A, Conley PB, Ware J, Ruggeri ZM. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(4): 1978-83.
- 231.** Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, Koller B, Phillips DR, Conley PB. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003, 112(3): 398-406.
- 232.** Nurden P, Savi P, Heilmann E, Bihour C, Herbert JM, Maffrand JP, Nurden A. An Inherited Bleeding Disorder Linked to a Defective Interaction between Adp and Its Receptor on Platelets - Its Influence on Glycoprotein Iib-Iiia Complex Function. *J Clin Invest* 1995, 95(4): 1612-22.
- 233.** Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Mannucci PM. Role of Adp in Platelet-Aggregation at High-Shear - Studies in a Patient with Congenital Defect of Platelet Responses to Adp. *Br J Haematol* 1994, 88(4): 826-9.
- 234.** Resendiz JC, Feng SJ, Ji GL, Francis KA, Berndt MC, Kroll MH. Purinergic P2Y₁₂ receptor blockade inhibits shear-induced platelet phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Mol Pharmacol* 2003, 63(3): 639-45.
- 235.** Cattaneo M, Lecchi A. Inhibition of the platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate potentiates the antiplatelet effect of prostacyclin. *J Thromb Haemost* 2007, 5(3): 577-82.
- 236.** Cattaneo M, Faioni EM. Why does ticagrelor induce dyspnea? *Thromb Haemost* 2012, 108(6): 1031-6.
- 237.** Armstrong D, Summers C, Ewart L, Nylander S, Sidaway JE, van Giezen JJJ. Characterization of the adenosine pharmacology of ticagrelor reveals therapeutically relevant inhibition of equilibrative nucleoside transporter I. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014, 19(2): 209-19.
- 238.** Bonello L, Laine M, Kipson N, Mancini J, Helal O, Fromonot J, Gariboldi V, Condo J, Thuny F, Frere C, Camoin-Jau L, Paganelli F, Dignat-George F, Guieu R. Ticagrelor Increases Adenosine Plasma Concentration in Patients With an Acute Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2014, 63(9): 872-7.

239. Wittfeldt A, Emanuelsson H, Brandrup-Wognsen G, van Giezen JJJ, Jonasson J, Nylander S, Gan LM. Ticagrelor Enhances Adenosine-Induced Coronary Vasodilatory Responses in Humans. *J Am Coll Cardiol* 2013, 61(7): 723-7.
240. Cattaneo M. The platelet P2Y(12) receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood* 2011, 117(7): 2102-12.
241. Gachet C, Cattaneo M, Ohlmann P, Hechler B, Lecchi A, Chevalier J, Cassel D, Mannucci PM, Cazenave JP. Purinoceptors on Blood-Platelets - Further Pharmacological and Clinical-Evidence to Suggest the Presence of 2 Adp Receptors. *Br J Haematol* 1995, 91(2): 434-44.
242. Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2003, 1(7): 1628-36.
243. Enar R. Prominent features of management strategies in acute coronary syndromes with the new oral antiplatelet agents. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2013, 41(2): 166-71.
244. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, Ohman M, Petrie MC, Sonntag F, Uva MS, Storey RF, Wijns W, Zahger D, Esc. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2011, 32(23): 2999-3054.
245. Jneid H, Anderson JL, Wright RS, Adams CD, Bridges CR, Casey DE, Ettinger SM, Fesmire FM, Ganiats TG, Lincoff AM, Peterson ED, Philippides GJ, Theroux P, Wenger NK, Zidar JP. 2012 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (Updating the 2007 Guideline and Replacing the 2011 Focused Update) A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2012, 60(7): 645-81.
246. Cattaneo M. ADP receptor antagonists. *Platelets* 2013: 1117-38.
247. Hass WK, Easton JD, Adams HP, Prysephillips W, Molony BA, Anderson S, Kamm B. A Randomized Trial Comparing Ticlopidine Hydrochloride with Aspirin for the Prevention of Stroke in High-Risk Patients. *New Engl J Med* 1989, 321(8): 501-7.
248. Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, ZitzmannRoth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K. A

- randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *New Engl J Med* 1996, 334(17): 1084-9.
- 249.** Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KKL, Giambartolome A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE, Study SAR. A clinical trial comparing three antithrombotic drug regimens after coronary-artery stenting. *New Engl J Med* 1998, 339(23): 1665-71.
- 250.** Gent M, Beaumont D, Blanchard J, Bousser MG, Coffman J, Easton JD, Hampton JR, Harker LA, Janzon L, Kusmieriek JJE, Panak E, Roberts RS, Shannon JS, Sicurella J, Tognoni G, Topol EJ, Verstraete M, Warlow C. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996, 348(9038): 1329-39.
- 251.** Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiv J, Rupprecht HJ, investigators M. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004, 364(9431): 331-7.
- 252.** Mehta SR, Yusuf S, Peters RJG, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Maimberg K, Rupprecht HJ, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KAA, Preven CUA. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001, 358(9281): 527-33.
- 253.** Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R, Liu LS, Chen ZM, Liu LS, Collins R, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Cai NS, Chen YZ, Cui JJ, Dai GZ, Feng JZ, Fu SY, Gent M, Gong LS, Hu DY, Huang DJ, Huang J, Huang TG, Huang ZW, Hui RT, Jiang BQ, Li DY, Li SM, Li TD, Li YQ, Li ZQ, Liu YH, Meng QY, Qian TJ, San J, Tao SQ, Wang DW, Wang LH, Wang W, Wu HA, Xi WH, Xu CB, Yang DC, Yang XF, Yin JQ, Zeng DY, Zhang F, Zhou JC, Zhu DQ, Zhu J, Sleight P, MacMahon S, Lam TH, Sandercock P, Grp CC. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005, 366(9497): 1607-21.
- 254.** Cattaneo M. New P2Y(12) Inhibitors. *Circulation* 2010, 121(1): 171-9.
- 255.** Snoep JD, Hovens MMC, Eikenboom JCJ, van dBJG, Jukema JW, Huisman MV. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous

- coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2007, 154(2): 221-31.
- 256.** Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P. Cytochrome P450C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006, 108(7): 2244-7.
- 257.** Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS, Lachno DR, Salazar D, Winters KJ. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 2007, 5(12): 2429-36.
- 258.** Hulot JS, Collet JP, Silvain J, Pena A, Bellemain-Appaix A, Barthelemy O, Cayla G, Beygui F, Montalescot G. Cardiovascular Risk in Clopidogrel-Treated Patients According to Cytochrome P450 2C19*2 Loss-of-Function Allele or Proton Pump Inhibitor Coadministration A Systematic Meta-Analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 2010, 56(2): 134-43.
- 259.** Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N, Steg PG, Ferrieres J, Danchin N, Becquemont L, ST-Elevation FRA. Genetic Determinants of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events. *New Engl J Med* 2009, 360(4): 363-75.
- 260.** Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, Antman EM, Braunwald E, Sabatine MS. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet* 2010, 376(9749): 1312-9.
- 261.** Payne CD, Li YG, Small DS, Ernest CS, Farid NA, Jakubowski JA, Brandt JT, Salazar DE, Winters KJ. Increased active metabolite formation explains the greater platelet inhibition with prasugrel compared to high-dose clopidogrel. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007, 50(5): 555-62.
- 262.** Price MJ, Walder JS, Baker BA, Heiselman DE, Jakubowski JA, Logan DK, Winters KJ, Li W, Angiolillo DJ. Recovery of Platelet Function After Discontinuation of Prasugrel or Clopidogrel Maintenance Dosing in Aspirin-Treated Patients With Stable Coronary Disease The Recovery Trial. *J Am Coll Cardiol* 2012, 59(25): 2338-43.

263. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Tantry US, Gesheff T, Wei C, Teng RL, Antonino MJ, Patil SB, Karunakaran A, Kereiakes DJ, Parris C, Purdy D, Wilson V, Ledley GS, Storey RF. Randomized Double-Blind Assessment of the ONSET and OFFSET of the Antiplatelet Effects of Ticagrelor Versus Clopidogrel in Patients With Stable Coronary Artery Disease The ONSET/OFFSET Study. *Circulation* 2009, 120(25): 2577-U103.
264. Angiolillo DJ, Firstenberg MS, Price MJ, Tummala PE, Hutyra M, Welsby IJ, Voeltz MD, Chandna H, Ramaiah C, Brtko M, Cannon L, Dyke C, Liu T, Montalescot G, Manoukian SV, Prats J, Topol EJ, Investigators B. Bridging Antiplatelet Therapy With Cangrelor in Patients Undergoing Cardiac Surgery A Randomized Controlled Trial. *Jama-J Am Med Assoc* 2012, 307(3): 265-74.
265. Nylander S, Pehrsson S, Inghardt T, Antonsson T, Svensson P, Sjogren T, Oster L, Janefeldt A, Sandinge AS, Newton P, Keyes F, Austin M, Buchanan A. A Specific Antidote for Ticagrelor. *J Am Coll Cardiol* 2015, 65(10): A253-A.
266. Thomas MR, Storey RF. Impact of Aspirin Dosing on the Effects of P2Y(12) Inhibition in Patients with Acute Coronary Syndromes. *J Cardiovasc Transl Res* 2014, 7(1): 19-28.
267. Tricoci P, Huang Z, Held C, Moliterno DJ, Armstrong PW, Van de Werf F, White HD, Aylward PE, Wallentin L, Chen E, Lokhnygina Y, Pei JL, Leonardi S, Rorick TL, Kilian AM, Jennings LHK, Ambrosio G, Bode C, Cequier A, Cornel JH, Diaz R, Erkan A, Huber K, Hudson MP, Jiang LX, Jukema JW, Lewis BS, Lincoff AM, Montalescot G, Nicolau JC, Ogawa H, Pfisterer M, Prieto JC, Ruzyllo W, Sinnaeve PR, Storey RF, Valgimigli M, Whellan DJ, Widimsky P, Strony J, Harrington RA, Mahaffey KW, Investigators T. Thrombin-Receptor Antagonist Vorapaxar in Acute Coronary Syndromes. *New Engl J Med* 2012, 366(1): 20-33.
268. Heptinstall S, Espinosa DI, Manolopoulos P, Glenn JR, White AE, Johnson A, Dovlatova N, Fox SC, May JA, Hermann D, Magnusson O, Stefansson K, Hartman D, Gurney M. DG-041 inhibits the EP3 prostanoid receptor A new target for inhibition of platelet function in atherothrombotic disease. *Platelets* 2008, 19(8): 605-13.
269. Iyu D, Glenn JR, White AE, Fox SC, Dovlatova N, Heptinstall S. P2Y(12) and EP3 antagonists promote the inhibitory effects of natural modulators of platelet aggregation that act via cAMP. *Platelets* 2011, 22(7): 504-15.

270. Iyu D, Glenn JR, White AE, Johnson A, Heptinstall S, Fox SC. The role of prostanoid receptors in mediating the effects of PGE(3) on human platelet function. *Thromb Haemost* 2012, 107(4): 797-9.
271. Abdollahi M, Hosseini A. Streptozotocin A2 - Wexler, Philip. Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). Oxford: Academic Press; 2014. p. 402-4.
272. Brooks DP, Nutting DF, Crofton JT, Share L. Vasopressin in Rats With Genetic and Streptozocin-Induced Diabetes. *Diabetes* 1989, 38(1): 54-7.
273. Sugidachi A, Asai F, Ogawa T, Inoue T, Koike H. The in vivo pharmacological profile of CS-747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties. *Br J Pharmacol* 2000, 129(7): 1439-46.
274. Garcia AE, Rico MC, Liverani E, DeLa Cadena RA, Bray PF, Kunapuli SP. Erosive Arthritis and Hepatic Granuloma Formation Induced by Peptidoglycan Polysaccharide in Rats Is Aggravated by Prasugrel Treatment. *PLoS One* 2013, 8(7).
275. Sugidachi A, Ohno K, Ogawa T, Jakubowski JA, Hashimoto M, Tomizawa A. A comparison of the pharmacological profiles of prasugrel and ticagrelor assessed by platelet aggregation, thrombus formation and haemostasis in rats. *Br J Pharmacol* 2013, 169(1): 82-9.
276. Yun-Choi HS, Park KM, Pyo MK. Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. *Thromb Res* 2000, 100(6): 511-8.
277. Pradelles P, Grassi J, Chabardes D, Guiso N. Enzyme Immunoassays of Adenosine Cyclic 3',5'-Monophosphate and Guanosine Cyclic 3',5'-Monophosphate Using Acetylcholinesterase. *Anal Chem* 1989, 61(5): 447-53.
278. Maxey KM, Maddipati KR, Birkmeier J. Interference in Enzyme Immunoassays. *J Clin Immunoassay* 1992, 15(2): 116-20.
279. Nehra S, Bhardwaj V, Singh M, Singh K, Saraswat D. Cardioprotective Role of Amlodipine under Acute Hypobaric Hypoxia: Role of Akt-1 in Redox Balance. *Int J Pharm Sci Res* 2015, 6(1): 190-9.
280. Brainard BM, Epstein KL, LoBato D, Kwon S, Papich MG, Moore JN. Effects of Clopidogrel and Aspirin on Platelet Aggregation, Thromboxane Production, and Serotonin Secretion in Horses. *J Vet Intern Med* 2011, 25(1): 116-22.
281. Demirbas MY, Gulsever M, Bozkurt AK. Comparison of ADP-and collagen-induced platelet aggregation responses between patients with Buerger's disease and healthy individuals. *Turk Gogus Kalp Dama* 2009, 17(2): 106-9.

- 282.** Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 11: Elsevier; 2005. p. 127-52.
- 283.** Altintop MD, Ozdemir A, Turan-Zitouni G, Ilgin S, Atli O, Demirci F, Kaplancikli ZA. Synthesis and in vitro evaluation of new nitro-substituted thiazolyl hydrazone derivatives as anticandidal and anticancer agents. *Molecules* 2014, 19(9): 14809-20.
- 284.** Altintop MD, Ozdemir A, Turan-Zitouni G, Ilgin S, Atli O, Demirel R, Kaplancikli ZA. A novel series of thiazolyl-pyrazoline derivatives: synthesis and evaluation of antifungal activity, cytotoxicity and genotoxicity. *Eur J Med Chem* 2015, 92: 342-52.
- 285.** Musa MA, Badisa VL, Latinwo LM, Waryoba C, Ugochukwu N. In vitro cytotoxicity of benzopyranone derivatives with basic side chain against human lung cell lines. *Anticancer Res* 2010, 30(11): 4613-7.
- 286.** Souza AO, Silva CL, Durán N, Andrade-Santana MH. Antimycobacterial and cytotoxicity activities of free and liposome-encapsulated 3-(4'-bromo[1,1'-biphenyl-4-yl)-3-(4-bromo-phenyl)-N,N-dimethyl-2-propen-1-amine. *Quim Nova* 2010, 33: 871-4.
- 287.** Asai F, Ogawa T, Naganuma H, Yamamura N, Inoue T, Nakamura K, inventors; Sankyo Company, Ltd., Japan; Ube Industries, Ltd. . assignee. Tetrahydrothienopyridine derivative acid addition salts patent, WO2002004461A1, 2002.
- 288.** Stratmann B, Tschoepe D. Atherogenesis and atherothrombosis – focus on diabetes mellitus. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009, 23(3): 291-303.
- 289.** Floyd JS, Serebruany VL. Prasugrel as a potential cancer promoter: Review of the unpublished data. *Arch Intern Med* 2010, 170(12): 1078-80.
- 290.** Serebruany VL. Platelet Inhibition with Prasugrel and Increased Cancer Risks: Potential Causes and Implications. *The American Journal of Medicine* 2009, 122(5): 407-8.

EKLER

EK .1. Etik Kurul Onay Sayfası



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 09-04-2013
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2013/A-39
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : Wistar Albino
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 140 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 3-6 ay/180-250 g.

Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Kadir Batçioğlu'nun yürütücüsü olduğu "Yeni Platelet İnhibitörü Tuzların İlaç Etkin Maddesi Olarak Geliştirilmesi ve Aktivitelerinin Araştırılması" isimli 2013/A-39 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Doç.Dr.M.Ahif ALADAĞ Başkan	 Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye	 Doç. Dr. Abdurrahman KARAMAN Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
 Salih AVCI Sivil Üye	 Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	 Doç. Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye

ASLI GİBİDİR