

Kumarin ve izokumarin türevlerinin anti-enflamatuar aktivite profillerinin araştırılması

Zehra ARSLAN¹, Murat BİNGÜL^{1*}

¹Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Diyarbakır, Türkiye

ORCID: ^a0000-0001-9169-667X, ^b0000-0002-3909-0694

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
17.07.2021	20.09.2021	12.10.2021

Özet: Kumarinler (2H-1-benzopiran-2-on) ve izokumarinler (1H-2-benzopiran-1-on), çoğunlukla bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan doğal olarak oluşan biyolojik aktif bileşiklerdir. Çok sayıda kumarin ve izokumarin türevi, farklı mekanizmalar yoluyla hafif ila çok güçlü antienflamatuar aktiviteye sahip olacak şekilde tasarlanmış, sentezlenmiş ve değerlendirilmiştir. Çok sayıda araştırma raporu, kumarin ve izokumarin ana yapısını, antienflamatuar ilaçların geliştirilmesi için potansiyel adaylar olarak göstermiştir. Bu doğal ürünlerin yapısal çeşitliliği ve biyolojik aktivitesi ile ilgili mevcut literatür gözden geçirilmiştir. Bu derleme makalesinde; çeşitli çalışmalar sonucu elde edilen antienflamatuar aktiviteye sahip doğal ve sentetik kumarin ve izokumarin türevlerinin karşılaştırmalı analizi gerçekleştirilmiş ve etkili antienflamatuar ilaçların tasarımında yol gösterici olması amacıyla kumarin ve izokumarin ana yapısı etrafında genel bir yapı-aktivite ilişkisi oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kumarin, izokumarin, enflamasyon, antienflamatuar

Investigation of anti-Inflammatory activity profiles of coumarin and isocoumarine derivatives

Abstract: Coumarins (2H-1-benzopyran-2-one) and isocoumarins (1H-2-benzopyran-1-one) are naturally occurring biologically active compounds mostly found in plants as well as microorganisms. A large number of coumarin and isocoumarin derivatives have been designed, synthesized, and evaluated to have mild-to-very potent anti-inflammatory activity through different mechanisms. Numerous research reports have indicated the coumarin and isocoumarin nucleus as potential candidates for the development of anti-inflammatory drugs. The available literature on the structural diversity and biological activity of these natural products has been reviewed. In this review article; Comparative analysis of natural and synthetic coumarin and isocoumarin derivatives with anti-inflammatory activity obtained as a result of various studies was carried out and a general structure-activity relationship was established around the main structure of coumarin and isocoumarin to guide the design of effective anti-inflammatory drugs.

Keywords: Coumarin, isocoumarin, inflammation, anti-inflammatory

1. GİRİŞ

Kumarinler, izokumarinler ve bunların analogları, doğada bitkilerin ve basit mikroorganizmaların ikincil metabolitleri (canlı varlıklar tarafından dış uyaranlara yanıt olarak üretilen ürünler) olarak bulunur [1,2]. Kumarin, ilk olarak Vogel tarafından tonka fasulyesinde (*Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae) bulunmuş ve daha sonra farklı bitki ailelerinden çok sayıda bitkide tanımlanmıştır [3]. Kumarinler, bitkilerde bulunan doğal ve sentetik kökenli olabilen bir fenolik madde sınıfıdır ve benzen ile α -piron halkalarının kaynaşması ile meydana gelir [4]. Kumarin ve türevleri, antikoagülan, antibakteriyel, antioksidan, antitümör, antiviral ve enzim inhibisyonu gibi çeşitli biyolojik aktivite gösterir. Ayrıca kanser ve kardiyovasküler rahatsızlıkların riskini azaltarak faydalı etkiler sergiler [5]. Bu etkilerin çoğu, serbest radikal temizleme etkileri ile ilişkilendirilebilir. Kumarinler ayrıca prostaglandin biyosentezini inhibe ederek iltihabı azaltırlar [6]. İzokumarinler (1H-2-benzopiran-1-on), kumarinlerin (2H-1-benzopiran-2-on) izomerleridir. İzokumarinler, farklı bakteri türleri, küfler, likenler ve bitkilerden izole edilen doğal olarak oluşan laktonların önemli bir sınıfıdır [7]. Kumarinler gibi, bu aromatik lakton sınıfı da doğal oluşumları ve antifungal, antienflamatuar, antimikrobiyal, fitotoksik, sitotoksik ve diğer çeşitli farmakolojik aktiviteleri sebebiyle dikkat çekmiştir. [8] İzokumarinler ayrıca, izokarbostiriller, izokinolinler, izokromenler gibi çeşitli önemli hetero ve karbosiklik bileşiklerin sentezinde yer alan faydalı ara maddelerdir [8].

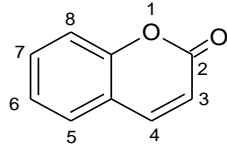
Enflamasyon, insan vücudunda kimyasal, fiziksel, immünolojik ve / veya biyolojik uyaranların bir sonucu olarak ortaya çıkan dinamik bir biyolojik süreçtir [9]. Tipik bir enflamatuar sürecin dört bileşeni; enflamatuar indükleyicileri (enfeksiyon, yara veya doku hasarı veya diğer hastalıklı durumlar gibi), sensörler (mast hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler vb.), enflamatuar araçları (çeşitli sitokinler, biyolojik aminler, vb.) ve hedef dokulardır. Orta dereceli bir iltihaplanma esas olarak insan vücudunun, antijenlere / indükleyicilere, fagositoz veya yaralanma bölgesinde lökosit göçü yoluyla karşı koyarak homeostasiyi eski haline getirmeye yönelik uyarıcı bir tepkidir [9]. Bu akut enflamatuar yanıt, normalde indükleyici ortadan kaldırıldıktan sonra sonlandırılır. Bununla birlikte indükleyici; Alzheimer hastalığı, astım, ateroskleroz, Crohn hastalığı, gut, multiple skleroz, osteoartrit, sedef hastalığı, romatoid artritis, diabetes mellitus, karsinom, bakteriyel veya viral enfeksiyonlar gibi herhangi bir hastalık durumu nedeniyle ortadan kaldırılmaz ve devam ederse, çözülme fazı kronik enflamasyona yol açarak indüklenmeyebilir bunun yerine genellikle indükleyicilerin yerinde lokalize olur ve lokal dokunun yeniden şekillenmesine neden olur. Enflamatuar yanıt; indükleyicileri ortadan kaldırarak, sensörleri bloke ederek, mediyatörleri inhibe ederek veya doğrudan hedef dokulara etki ederek kontrol edilebilir [10]. Enflamasyonu kontrol etmek için yaygın olarak

araştırılan hedefler; plazma proteazları, araşidonik asit metabolitleri (prostoglandin E2 (PGE2) ve lökotrienler gibi), histamin, serotonin, nitrik oksit, sitokinler (lipoksinler, interlökinler gibi iltihaplanma araçları ve tümör nekroz faktörü a), kemokinler ve koloni uyarıcı faktörlerdir. Bu araçlar, sensör hücrelerinin aktivasyonunun bir sonucu olarak siklooksijenazları, kaspazları ve kinazları içeren çeşitli süreçler yoluyla üretilir ve enflamatuar tepkiyi düzenlemek için spesifik reseptöre bağlanırlar [11]. Enflamasyonun üstesinden gelmek için mevcut yaklaşımlar, immün seçici antienflamatuar türevler, seçici glukokortikoid reseptör agonisti ve tümör nekrozis faktör (TNF) inhibitörlerinin kullanımını içerir [11]. Enflamatuar sitokinleri hedefleyebilen bir dizi aktif bileşik, bitkilerden izole edilmiş ve tanımlanmıştır [12]. Kumarin ve izokumarin türevi bileşikler de enflamasyon üzerinde etkili olabilen bileşikler arasında gösterilmiştir. Etkilerini, doku ödemi azaltarak, siklooksijenaz ve lipoksijenaz gibi enzimatik sistemlerin işlevlerini değiştirerek serbest radikallerin oluşumu ile gösterirler [7,14]. Bu nedenle çok sayıda kumarin ve izokumarin türevleri tasarlanmış, sentezlenmiş ve farklı mekanizmalar yoluyla hafif ila çok güçlü antienflamatuar aktiviteye sahip olacak şekilde değerlendirilmiştir.

2. KUMARİNLER

2.1. Kumarinlerin kimyasal yapıları

Kumarinler, bitkilerde bulunan doğal ve sentetik kökenli olabilen bir fenolik madde sınıfıdır ve benzen ile α -piron halkalarının kaynaşması ile meydana gelirler (Şekil 1). Kumarin yapısı, orto-hidroksilasyon, yan zincir çift bağının trans-cis izomerizasyonu ve laktonizasyon yoluyla sinnamik asitten türetilir. Kumarinlerin trans formu stabildir ve siklize edilemez, bu nedenle bir çeşit izomerizasyon söz konusudur. Cis formu çok kararsızdır, bu nedenle trans konfigürasyonunda bulunma eğiliminde olur [14]. Kumarin suda çözünmez; ancak 4-hidroksi substitüsyonu, moleküle zayıf asidik özellikler kazandırır ve bu sayede hafif alkali koşullar altında suda çözünür hale gelir [15]. Kumarin ve türevleri, kumarin içinde bulunan aromatik olmayan hidrokarbon kısmı nedeniyle oldukça reaktiftir, bu nedenle açıl merkezinde halka açıklığı oluşması muhtemeldir. Aromatik halka üzerindeki C-6, Friedel-Crafts açılması, sülfonasyon gibi C-6 pozisyonundan substitüe türevlerin oluşumuna yol açan elektrofilik saldırıya uğrayabilir. Kumarin çekirdeği üzerindeki bir metil substitüsyonu, bağlanma konumuna bağlı olarak farklı şekillerde reaksiyona girebilir. C-7 pozisyonunda bulunan fenol grubu, kolayca açılasyon, benzoilasyon ve Friedel-Crafts reaksiyonlarına maruz kalır [15].



Şekil 1. Kumarinlerin genel yapısı

Doğada yaygın olarak bulunan kumarinlerin biyosentez yolu incelendiğinde genel olarak C-7 pozisyonunda oksijenlendiği görülmüştür. Ayrıca, C-3, C-4 ve C-7 pozisyonlarında çeşitli farmakofor gruplara sahip birkaç sentetik kumarin, antimikrobiyal, antikanser, antioksidan faaliyetleri açısından yoğun bir şekilde incelemiştir [16]. C-4 substitüsyonlu ariloksimetil, arilaminometil ve dikloroasetamidometil kumarinlere, karşılık gelen 1-azakumarin ile birlikte potansiyel antimikrobiyal ve antienflamatuar maddeler olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, benzofuran, furan ve tiyazol halka sistemleri ile bi- ve tri-heterosiklik kumarinler ve 1-azakumarinler, vanilin gibi biyo-uyumlu parçalarla birlikte hayvan modellerinde antienflamatuar maddeler olarak dikkate değer bir etki göstermiştir [17]. Biyolojik işlevler için sentetik kumarinlerin yapısal çeşitliliği genişletilerek bunlara benzer çok sayıda girişimde bulunulmuştur.

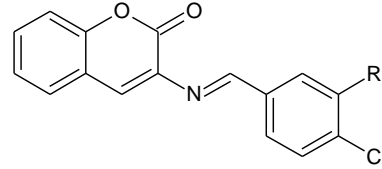
2.2. Kumarin türevlerinin antienflamatuar aktiviteleri

Heterosiklik çekirdek içeren bazı gruplardan türetilen bir çok kimyasal bileşiğin, bir veya birkaç aşamada enflamatuar süreci inhibe ettiği bildirilmiştir [11]. Kumarin analogları da içerdikleri benzo- α -piron iskeleti ile önemli bir antienflamatuar molekül sınıfını oluşturur [18]. Kumarinin kendisi ödem tedavisi için kullanılmıştır [19]. TNBS (trinitrobenzen-sülfonik asit) kaynaklı kolit üzerinde skopoletin, eskulin, dafnetin, fraksetin ve 4-metilumbeliferon gibi doğal kumarin türevleri ile yapılan genel bir çalışmada bu kumarinlerin iltihabı tedavi etmek için potansiyel ajanlar olduğu gösterilmiştir [20]. Etki, kumarinlerin antioksidan özellikleriyle doğrudan ilişkili görünmektedir. Bu doğal kumarin türevleri gibi doğal ürünler, sadece lipoksijenaz ve siklooksijenaz enzim sistemlerinin değil, aynı zamanda nötrofile bağımlı süperoksit anyon oluşumunun da inhibitörleri olarak kabul edilmektedir [21]. Doğal kaynaklardan izole edilen kumarin türevlerinin antienflamatuar özellik gösterdiğinin açığa çıkarılmasının ardından birçok araştırma grubu kumarin çekirdeği taşıyan sentetik türevler hazırlamış ve test etmiştir. Literatürde antienflamatuar, analjezik ve / veya antioksidan aktivite gösteren kumarin analoglarının sentezi ve keşfi hakkında birçok rapor mevcuttur. Bunlardan bazıları aşağıda kronolojik sırayla tartışılmıştır.

Sentetik kumarin türevleriyle ilgili en eski raporlardan biri 1992'de yayımlanmıştır, bu çalışmada bir dizi

süstitüe edilmiş 3- (benzilidenamino) kumarin, 100 mg / kg'lık oral dozda antienflamatuar aktivite için değerlendirilmiştir.

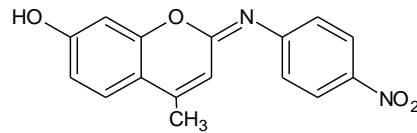
3-(3',4'-Diklorobenzilidenamino)kumarin ve 3-(3',4'-Klorobenzilidenamino)kumarin bileşikleri (Şekil 2), karragenanın neden olduğu pençe ödeminde sırasıyla %75 ve %60 inhibisyon sergilemiştir. Bunlar ayrıca farelerde asetik asitle indüklenen kıvrılma modelinde önemli analjezik aktivite göstermiştir [22].



(Bileşik 1 R= H; Bileşik 2 R=Cl)

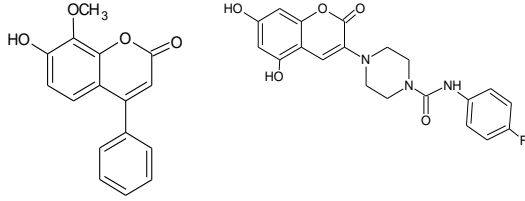
Şekil 2. 3- (Benzilidenamino) kumarin türevleri [22]

Bir diğer çalışmada farklı substitüsyonlara sahip kumarin Schiff bazları sentezlenmiş ve β -glukuronidaz inhibisyonu yoluyla in vitro antienflamatuar aktivite açısından değerlendirilmiştir. Yapı aktivite çalışmaları, bir nitro grubunun varlığının genel sterik etkisini, β -glukuronidaz inhibisyonuna katkıda bulunan faktörler arasında gösterilebileceğini ortaya çıkarmıştır. 4-metil-2-(4-nitrofenil)imino-2H-kromen-7-ol bileşiğinin (Şekil 3) %39 inhibisyonla çalışmada en güçlü antienflamatuar aktivite sergileyen bileşik olduğu bildirilmiştir [23].



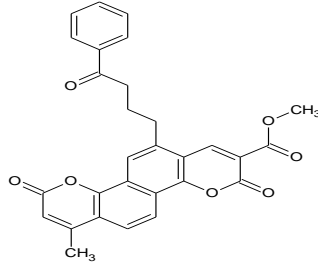
Şekil 3. 4-metil-2-(4-nitrofenil)imino-2H-kromen-7-ol [23]

7-hidroksi kumarin türevleri üzerinde yapılan bir çalışmada bu türevlerin, doza bağımlı bir şekilde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (İNOS) ekspresyonu, nitrik oksit (NO) ve interlökin-6 (IL-6) üretimi inhibisyonu aktivitesi sergilediği bulunmuştur. C-4 pozisyonundaki bir fenil halkası (4-(fenil)-6-hidroksi-7-metoksikumarin bileşiği) veya C-3'te bir lipofilik substitüsyonun (bileşik IMMLG5521) aktiviteyi daha da arttırdığı eklenmiştir (Şekil 4). Kumarin çekirdeği etrafındaki polar fonksiyonel grupların etkisinin keşfi, vasküler geçirgenliğin ve lökosit transmigrasyonunun inhibisyonu yoluyla önemli antienflamatuar aktiviteye sahip bileşik IMMLG5521 ile sonuçlanmıştır [24].



Şekil 4. 4-(fenil)-6-hidroksi-7-metoksikumarin ve bileşik IMMLG5521 [24]

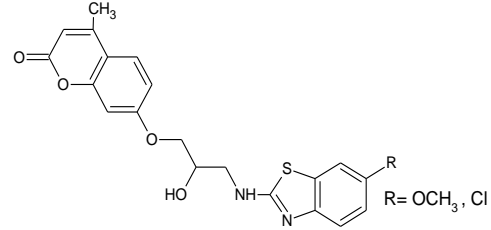
Bir başka çalışma grubu antioksidan/antiinflamatuvar moleküller elde etmek amacıyla kumarin ve kalkon yapılarının farmakofor gruplarını birleştirerek hibrid moleküller olarak bis-kumarinleri tasarlamıştır. Şekil 5'te verilen biskumarin-kalkon hibridi bileşik (4-okso-4fenilbütül türevi), ibuprofenden daha az olmakla birlikte en iyi antiinflamatuvar aktiviteyi sergilemiştir. Bununla birlikte bu bileşik, çift etkili ilaçların sentezinde öncül olabilecek güçlü antioksidan aktivite sergilemiştir [25].



Şekil 5. Biskumarin-kalkon hibridi (4-okso-4fenilbütül türevi) [25]

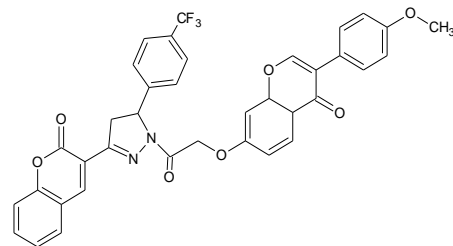
7-(3-(benzo[d]tiazol-2-ilamino)-2-hidroksipropoksi)-4-metil-2H-kromen-2-on türevlerinin (Şekil 6) çeşitli aromatik ve heterosiklik aminler kullanılarak sentezlendiği bir çalışmada, sentezlenen bileşikler antiinflamatuvar aktivite ve ülserojenik risk gözetilerek 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibisyonu açısından *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. Bağlanma afinitesini ve enzimin aktif bölgesindeki oryantasyonu tahmin etmek için docking çalışması yapılmıştır. *In vivo* antiinflamatuvar ve *in vitro* 5-LOX enzim inhibisyon çalışması, benzotiyol halkasında metoksi substitüenti taşıyan türevin tüm tarama yöntemlerinde en güçlü bileşik olduğunu ortaya koymuştur. Bu bileşik *in vitro* kinetik çalışması sonucu 5-LOX enzimi ile yarışmalı olmayan tipte inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. Aynı zamanda benzotiyazol halkasının C-6 pozisyonunda -OCH₃ grubu ve elektronegatif -Cl varlığı, güçlü aktivite için çok önemli substitüsyonlar olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca docking çalışması ve tüm farmakolojik taramalarda, bileşiklerde benzotiyazol halkasının varlığının kumarin halkasının C-7 pozisyonunda amino alkol bağlayıcı ile substitüe

edilmiş fenil halkasına kıyasla 5-LOX enzimi ile etkileşimde daha fazla kritik rol oynadığı sonucuna varılmıştır [26].

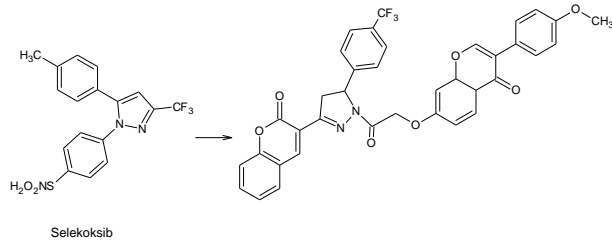


Şekil 6. 7-(3-(benzo[d]tiazol-2-ilamino)-2-hidroksipropoksi)-4-metil-2H-kromen-2-on türevleri [26]

Pirazolin ve pirazol gibi beş üyeli halkalar, antikanser ve antiinflamatuvar aktivitede kullanılan ayrıcalıklı yapılar olarak kabul edilmektedir. Merkezi pirazol halkası içeren diaril kısmından oluşan selekoksib, sık pazarlanan önemli seçici COX-2 (siklooksijenaz-1) inhibitörü ilaçlardan biridir [27]. Difeniloksadiazol/tiyadiazol hibritlerini içeren diaril beş üyeli heterosiklik iskelete dayanarak, yüksek antiinflamatuvar aktiviteye sahip birçok yeni bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bu çalışmaların birinde, gelişmiş farmasötik profillere sahip yeni antiinflamatuvar ajanlar geliştirmek için fenil-pirazolin-kumarin türevleri tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Tüm bileşikler, lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen IL-6 salımına karşı inhibisyonların değerlendirilmesi ile karakterize edilen antiinflamatuvar aktiviteleri bakımından taranmıştır. Bunlar arasında [3-(1-(2-(3-(4-metoksifenil)-4-okso-4H-kromen-7-iloksi)asetil)-5-(4-(triflorometil)fenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il)-2H-kromen-2-on] (Şekil 7); LPS ile uyarılan IL-6, TNF-a ve NO üretimini en yüksek antiinflamatuvar aktiviteyi göstererek inhibe etmiştir. Ayrıca çalışmada bu bileşik, iNOS, COX-2 ekspresyonlarını ve NF-kB / MAPK (nükleer faktör kappa B / mitojenle aktive olan protein kinaz) sinyal yoluyla IL-6, TNF-a, NO üretimlerini önemli ölçüde baskılayabildiği gösterilmiştir. Son olarak bu bileşiğin antiinflamatuvar aktivitesi, İrlanda yosunu kaynaklı pençe ödemi ile belirlenmiş ve *in vivo* değerlendirme sonuçları, bu bileşiğin araşidonik asit ile indüklenen sıçan ayak bileği eklemlerini de inhibe edebildiğini göstermiştir [28].

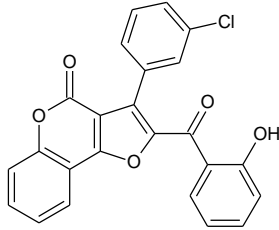


Şekil 7. [3-(1-(2-(3-(4-metoksifenil)-4-okso-4H-kromen-7-iloksi)asetil)-5-(4-(triflorometil)fenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il)-2H-kromen-2-on] [28]



Şekil 8. Çalışmanın genel tasarım şeması [28]

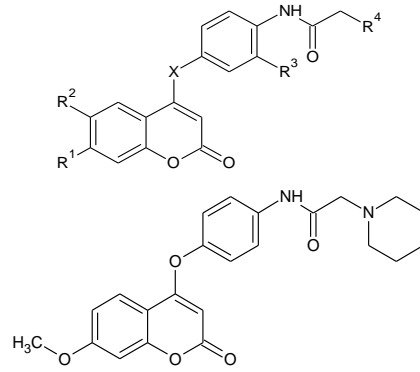
Bir dizi furo [3,2-c] kumarin türevlerinin sentezi, dimetil sülfoksit (DMSO) çözücüsü içinde 4-hidroksikumarinlerin substitüe benzaldehitlerle tek-kap üç bileşenli kondenzasyon yöntemi kullanarak yüksek verimde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenmiş hedef bileşiklerin in vitro antiinflamatuvar biyoanalizlerinde Murin RAW264.7 hücreleri kullanılmıştır. 3-(3-klorofenil)-2-(2-hidroksibenzoil)-4H-furo[3,2-c]kromen-4-on (Şekil 9) yüksek antiinflamatuvar aktivite sergilemiştir. Bunun yanında güvenlik profiliyle, test edilen tüm furokumarinlerin dikkate değer antiinflamatuvar aktiviteleri, Griess testi kullanılarak ölçüldüğünde indometasin etkinliğini kıyaslanamayacak derecede aşmıştır [29].



Şekil 9. 3-(3-klorofenil)-2-(2-hidroksibenzoil)-4H-furo[3,2-c]kromen-4-on [29]

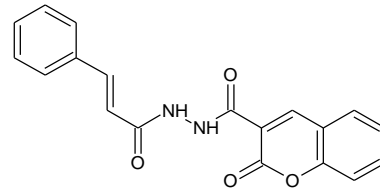
Kumarin iskeletinden hareketle yürütülen bir diğer çalışmada, yeni kumarin türevleri sentezlenmiş ve in vitro olarak anti-fibroz ve makrofajların anti-migrasyonu açısından değerlendirmiştir. Sentez esnasında hidrofobik grup terminalinin, inhibisyon aktivitesini bir dereceye kadar etkilediği görülmüştür. Bu çalışmada bileşiklerin toksisitesini azaltmak için ilaç tasarımında yaygın olarak kullanılan bir yöntem olan biyoizoster yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla bağlayıcı N atomu yerine O atomu substitüe edilerek toksisite önemli ölçüde azaltılmıştır. Sentezlenen bileşikler arasında N-(4-((2-okso-2H-kromen-4-il)oksi)fenil)-2-(piperidin-1-il)asetamid (Şekil 10), düşük toksisite ve makrofaj göçü ile NRK-49F (normal sıçan böbrek fibroblastı) hücrelerinde TGF-p (transforme büyüme faktörü-p) ile indüklenen toplam kolajen birikimi inhibisyonunda güçlü anti-fibroz etkinliği göstermiştir. Bu bileşiğin ayrıca, western blot analizi ile in vitro olarak COL1A1 (Kollagen tip I alfa 1 zinciri), a-SMA (alfa düz kas aktini) ve p-Smad3'ün TGF-21 ile indüklenen protein ekspresyonunu

baskıladığı gözlenmiştir. Bu, TGF-p / Smad3 sinyal yolunun hücre dışı matrisi azaltmak için inhibe edildiğinin göstergesidir. Ek olarak, aynı bileşik farelerde, hidrosiprolin içeriğini ve akciğer dokusunda enflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltarak bleomisin ile indüklenen pulmoner fibrozu hafifletmiştir. Kapsamlı yapısal özellikleri, iyi farmakokinetik özellikleri (F =% 39.88), anti-fibrotik aktivitesi ve in vivo düşük toksisitesi göz önüne alındığında, bu bileşik fibröz hastalıkların tedavisi için potansiyel bir aday olarak değerlendirilebilir [30].



Şekil 10. Sentezlenen bileşiklerin genel yapısı ve N-(4-((2-okso-2H-kromen-4-il)oksi)fenil)-2-(piperidin-1-il)asetamid [30]

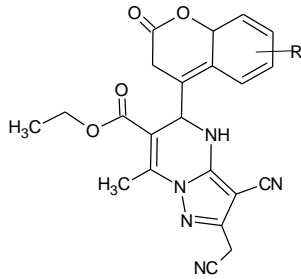
Kumarin türevlerinin, antiinflamatuvar ve antikonvülsan aktivitelerini araştırmak için 3-karbonil klorür kumarinler, substitüe aril asit hidrazidlerin reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Moleküllerin tasarımında antiinflamatuvar aktivite için iki yapının sinerjik etkilerini göz önünde bulundurarak, kumarin-diaçilhidrazid hibrit yapısındaki iki hidrojen bağı, iki elektron verici grup (-NHCO-) ve iki hidrofobik aril grubu (kumarin ve aril asit) anahtar farmakoforlar olarak değerlendirilmiştir. Antiinflamatuvar etkinlik karragenan ile indüklenmiş sıçan pençesi ödeminde inhibisyon yoluyla gözlemlenmiş ve en etkili kumarin türevi N'-(2-hidroksibenzoil)-2-okso-2H-kromen-3-karbohidrazid (Şekil 11) olarak bulunmuştur [31].



Şekil 11. N'-(2-hidroksibenzoil)-2-okso-2H-kromen-3-karbohidrazid [31]

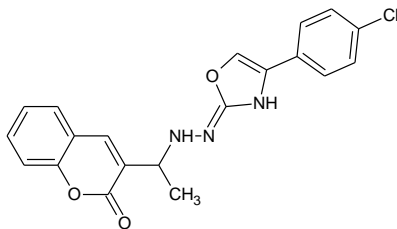
Enflamasyon oluşumu ile ilişkili kanserlerin tedavisinde umut verici bileşiklerin keşfi amacı ile aril/kumarin pirazolo[1,5-a]pirimidin türevi

bileşiklerin sentezi CAN (Serik amonyum nitrat) katalizörlüğünde tek aşamalı üç bileşenli yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen moleküller, yumurta albümini denatürasyon yöntemi ile antienflamatuar aktiviteleri açısından test edilmiş % 4.1-6.1 inhibisyon değerleri ile standart aseklofenaka göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Nicel yapı-aktivite ilişkisi sonuçları aromatik halka (fenil/kumarin) etrafındaki çeşitli substitüsyon modellerinde dikkate değer aktivite göstermiştir. Aynı zamanda docking çalışmasından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen bileşiklerin (Şekil 12), kanser hücreleri üzerindeki ön in vitro antiproliferatif aktivitesi, diğer bileşiklerle karşılaştırıldığında farmakolojik olarak belirgin bir şekilde daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanarak, fenil/kumarin pirazolo[1,5-a]pirimidinler gelecek nesil ilaç molekülleri için umut verici antienflamatuar ajanlar olarak öne çıkabilir[32].



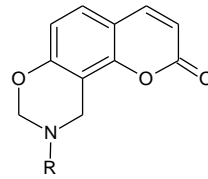
Şekil 12. Fenil/kumarin pirazolo[1,5-a]pirimidinler [32]

Enflamasyon tedavisinde ortaya çıkabilen yan etkileri en aza indirmek için etkili olan çözümlerden biri COX-2 inhibitörleridir. Bu çalışmada COX-2 inhibitörlerine yapısal olarak benzer tasarım esas alınarak hidrazon-etil köprüsü ile bağlanmış, kumarin yapısı ve substitüe oksazol halkasından oluşan üç farmakofor grup içeren moleküller sentezlenmiştir. Yumurta albümini, nihai bileşiklerin aktivitesini incelemek için bir akut enflamatuar model olarak sıçan pençe ödemi indüklemek için kullanılmıştır. DMSO'nun çözücü olarak kullanıldığı testlerde $3.98 \pm 0.04e$ değeri ile 3-(1-((4-(4-nitrofenil)oksazol-2(3H)-idin)hidraziledin)etil)-2H-kromen-2-on bileşiği (Şekil 13) diğer bileşiklere kıyasla pençe kalınlığında en iyi azalmayı göstermiş ve aynı zamanda selekoksib ile karşılaştırıldığında pençe kalınlığı ödemi azaltmada daha iyi antienflamatuar aktivite sergilediği bulunmuştur. [33]

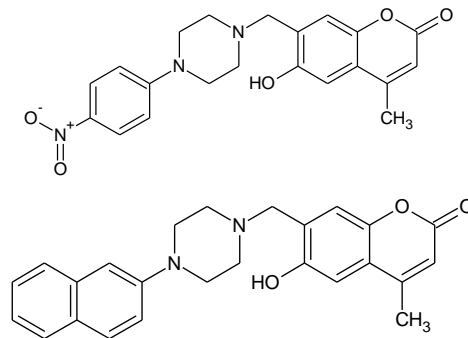


Şekil 13. 3-(1-((4-(4-nitrofenil)oksazol-2(3H)-idin)hidraziledin)etil)-2H-kromen-2-on [33]

Kumarin yapısında benzopiranon halkasının C-8'inden türetilen moleküllere odaklanan sınırlı sayıda çalışmanın varlığını göz önüne alan bir araştırma grubu, C-8 pozisyonunda aromatik ve alifatik piridin ve piperazinler ile substitüe yeni kumarin türevleri sentezlemiştir. Bu pozisyon daha önce antienflamatuar etki için sadece Kontogiorgis ve Hadjipavlou-Litina [34] tarafından 2005 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmada C-8 pozisyonundan türetilen bir dizi Mannich bazlı kumarin bileşiklerinin antienflamatuar aktivitesi ortaya çıkarılmıştır (Şekil 14). Aynı amaçla, doğal aktif metabolitler üzerinde de mevcut olan 7-OH parçası taşıyan kumarin ana yapısı seçilerek bir dizi amin ile çeşitlendirilip sentezlenen bileşikler, karagenan kaynaklı pençe ödemi karşı koruyucu aktivite sunduğu gösterilmiştir. Bunun yanında enflamatuar dokularda önemli ölçüde arttığı bilindiği için önemli bir enflamasyon göstergesi olan nitrit seviyeleri kullanılarak RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerinde yapılan NO inhibisyon testi sonuçları, piperazin türevlerinin piperidinlerden çok daha güçlü olduğunu göstermiştir. 7-Hidroksi-4-metil-8-(4-naftalen-2-ilmetil-piperazin-1-ilmetil)-kromen-2-on ve 7-Hidroksi-4-metil-4-(4-nitrofenil)-piperazin-1-ilmetil)-kromen-2-on bileşikleri en yüksek antienflamatuar aktiviteye sahip iki bileşik olarak tespit edilmiştir (Şekil 15). Yapı-aktivite çalışmaları, serbest bir 7-OH varlığının molekülün hidrofilik özelliğine ve C-8 konumundaki substitüsyonun sterik etkiye katkısını önemli faktörler olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak aril substitüsyonlu piperazin heterosiklik halkası, yeni kumarin bazlı antienflamatuar ilaçların geliştirilmesi için uygun hedefler olarak değerlendirilebilir. [35]

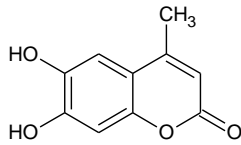


Şekil 14. Mannich bazlı kumarin türevlerinin genel yapısı [34]



Şekil 15. Aril substitüe piperazin-kumarin türevleri [35]

Doğal bir kumarin türevi olan eskuletinin (6,7-Dihidroksi-4-metilkumarin (6,7-DH-4MC)) (Şekil 16) antiinflamatuvar aktivitesi bilinmesine rağmen makrofajlardaki mekanizması daha önce çalışılmamıştır. Bu çalışmada; 6,7-DH-4MC'nin antiinflamatuvar aktivitesi, LPS ile uyarılan RAW 264.7 makrofajları üzerinde NO ve PGE2 gibi inflamatuvar faktörlerin ve IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu ölçülerek değerlendirilmiştir. Sonuçlar, 6,7-DH-4MC'nin sitotoksitesiyi indüklemeyen NO seviyelerini ve PGE2 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuş; NO ve PGE2 ekspresyonunun inhibisyonunun, 6,7-DH-4MC tedavisine yanıt olarak iNOS ve COX-2 aşağı-regülasyonu ile ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca 6,7-DH-4MC, IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini doza bağlı bir şekilde azaltmıştır. Mekanistik çalışmalar ile 6,7-DH-4MC tedavisi üzerine ERK (hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz) ve p38-MAPK'nın fosforilasyonunun azaldığı ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, LPS ile indüklenen hücrelerde I κ B-a'nın (B-hücreleri inhibitörü- alfa- kappa hafif polipeptit gen artırıcı nükleer faktör) bozunması ve NF-KB'nin fosforilasyonu, 6,7-DH-4MC tedavisi ile kesintiye uğradığı kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, 6,7-DH-4MC'nin dermatit, artrit, kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi inflamatuvar hastalıklar için potansiyel bir terapötik ajan olduğunu göstermektedir [36].



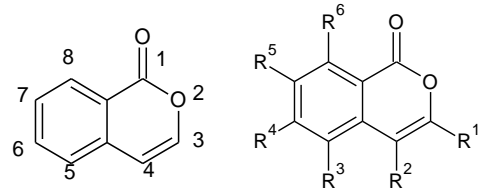
Şekil 16. 6,7-Dihidroksi-4-metilkumarin (6,7-DH-4MC) [36]

3. İZOKUMARİNLER

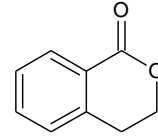
3.1. İzokumarinlerin kimyasal yapıları

İzokumarinler, doğada bol miktarda bulunan laktonik doğal ürünlerdir. (Şekil 17). Doğal izokumarinlerin çoğu tipik biyosentetik kökenleri nedeniyle, α -piranon halkasında bir 3-alkil veya bir substitüe edilmemiş 3-fenil halkasına ve benzen halkasında 8-oksijenasyona sahiptir [1]. Tüm doğal izokumarinler, ana yapılarındaki mevcut altı pozisyondan birinde veya daha fazlasında oksijen atomu taşırlar. Bu oksijen atomları, fenolik, eterli veya glikozidik gruplar şeklinde olabilir [37]. Diğer doğal ürün sınıflarında olduğu gibi, bu bileşiklerin sentezi sırasında yeni sentetik metodlar geliştirilmiştir [38]. İzokumarin iskeleti, 5,6 pozisyonunda benzen halkasına kaynaşmış bir laktonik α -piranon halkasından oluşur. İzokumarin terimi, bu bileşiklerin Coumarouna odorata olarak bilinen tonka ağacından izole edilmiş kumarin bileşiklerine izomer olduğunu belirtir [39].

İzokumarin, α -piranon halkası veya aromatik halka veya her ikisi üzerinden substitüe edilebilir. Bu nedenle R1-R6 genellikle alkil, aril, heterosiklik halkalar, halojen veya herhangi başka substitüsyonlar olabilir. Bununla birlikte, doğal izokumarinlerin çoğu, substitüe edilmiş bir C-3 karbonuna ve biyojenetik olarak asetattan türetilen tüm izokumarin C-8 oksijenasyonuna sahiptir ve bazıları C-6 oksijeni içerir [40]. İzokumarin, asiklik tautomerik keto asit formları ile dengede olabilir, aynı şekilde dihidroizokumarinlerin açık zincirli tautomer hidroksi asitleri ile dengede bulunabilirler. Bununla birlikte, her iki durumda da siklik tautomerler, keto- veya hidroksi-asid izokumarin ve 3,4-dihidroizokumarin iskeletine spontan siklizasyon gösterebileceği gibi termodinamik olarak daha karardır. 3,4-dihidroizokumarin yapısı Şekil 18'de verilmiştir [41].



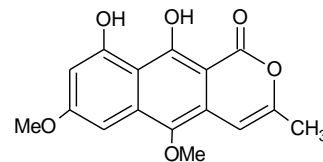
Şekil 17. İzokumarin genel yapısı ve substitüe izokumarin [37-40]



Şekil 18. 3,4-dihidroizokumarin yapısı [41]

3.2. İzokumarin türevlerinin antiinflamatuvar aktiviteleri

İzokumarinlerin antiinflamatuvar moleküller olarak etki gösterdikleri bilinmektedir, ayrıca radikal süpürme kabiliyetine de sahiptirler [42]. Paepalanthus bromelioides' den elde edilen bir izokumarin olan paepalantin (Şekil 19), sıçan modellerinde test edildiğinde kolite karşı antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [43].

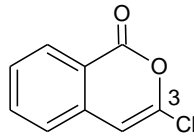


Şekil 19. Paepalantin kimyasal yapısı [43]

İzokumarinler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda izokumarinlerin; tümör oluşumu, beyin enfeksiyonu, amfizem, vasküler pıhtılaşma, artrit ve bronşiyal

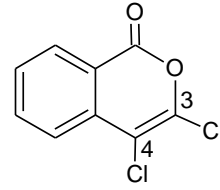
iltihaplanma gibi çeşitli hastalıkların etiyolojisinde rol oynayan çeşitli enzimleri inhibe ettikleri ortaya çıkarılmıştır [44]. Bunun sonucu olarak izokumarinler, enflamasyon oluşumunun eşlik ettiği hastalıkların tedavisinde geliştirilebilecek potansiyel antiinflamatuvar bileşikler olarak görülmüş ve üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları bu kısımda aktarılacaktır.

İzokumarinlerin enzim inhibisyonu aktivitesine dair yapılan kapsamlı çalışmalardan birinde, sentezlenen izokumarinlerde nükleofilik serin tarafından saldırıya uğrayabilecek bir lakton işlevi bulunmuştur. Bu bileşikler üç seriye ayrılabilir: 3-kloro, 3-alkoksi-4-kloro ve 3-alkoksi-7-amino-4-kloroizokumarinler. Sübstitüe edilmemiş izokumarin, bir substrat ya da bir serin proteazın inhibitörü olarak tanınmazken, pozisyon 3'e bir klor atomunun eklenmesi (Şekil 20), bu molekülün İnsan lökosit elastazı (HLE) ve domuz pankreatik elastaz (PPE) inhibitörü olmasını sağlamıştır. Bu sonuç, klorun laktonun elektrofilitesini artırabilen ve böylelikle serinin saldırısını kolaylaştıran elektron çekme davranışı ile açıklanabilir. Bu hipotez ile uyumlu bir şekilde ikinci seri bileşikler olarak, pozisyon 4'e ikinci bir klorun eklenmesi, inhibitör etki gücünü arttırmıştır [45].



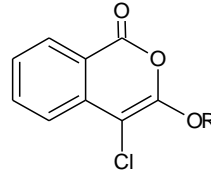
Şekil 20. 3-kloroizokumarin yapısı [45]

İkinci seri bileşikler, 3,4-dikloroizokumarin (DCI) (Şekil 21), çeşitli biyolojik süreçleri aydınlatmak için farmakolojik araç olarak yaygın şekilde kullanılan genel bir serin proteaz inhibitörüdür. DCI, metaloproteazları veya aspartik proteazları inhibe etmezken, kaspaz ve kalpain gibi sistein proteazlarını inhibe eder. Serin proteaz sınıfı içinde DCI, kimotripsin, HLE, katepsin G, insan proteinaz 3, trombin, tripsin, pıhtılaşma faktörü Xa, XIa, VIIa, XIIa, granzim gibi çok çeşitli enzimleri inhibe ettiği görülmüştür. 3-kloroizokumarin serisinde klor, lakton üzerindeki serin tarafından gerçekleştirilen nükleofilik saldırıyı maskelenmeyi önleyen gizli bir asit grubu gibi işlev görür [46]. Bu nedenle bu asit klorür, katalitik bölgenin histidin kalıntısını açılatabilir. PH-stat çalışmaları, diaçilat formunun oluşumunu ileri sürerken, inhibitörden gelen karboksilat fonksiyonu ile histidinden protonlanmış imidazolyum arasında elektrostatik bir bağ ile stabilize edilmiş mono-açillenmiş kompleks dahil edilmiştir. Bu son ara ürün, elektrosprey kütle spektrometresi ile tespit edilmiştir. Bu bileşiklerle karşılaşılan inhibisyonun geçici olduğu belirtilmiştir. Öte yandan enzim reaktivasyonunun hidroksilamin ile hızlandırılabilirliği eklenmiştir.



Şekil 21. 3,4-dikloroizokumarin yapısı [46]

İlerleyen çalışmalarda C-3'teki klor atomunun bir alkoksi grubu ile değiştirilmesi, 3-alkoksi-4-kloro izokumarin serisini vermiştir (Şekil 22). Bu alkoksi grubunun modülasyonu, serin proteaza karşı seçiciliğin gelişmesine katkı sağlamıştır. Yapı aktivite ilişkileri, R'teki küçük bir alkil grubunun elastaz inhibisyonunu desteklediğini göstermiştir (kobs / I = 43000, 9 500, 1 525 M-ls-1 ile R = etil, izobutil ve benzil). Öte yandan, benzil gibi daha büyük bir grupla (kobs / I = 16 000,750, 610 M-ls-1 ile R = benzil, izobutil ve etil) daha iyi bir kimotripsin inhibisyonu elde edilmiştir. Elastaz reaktivasyonunun yarı ömrü, R = etil olduğunda yaklaşık bir saat ve R = izobutil olduğunda yirmi saat olarak kaydedilmiştir [47].

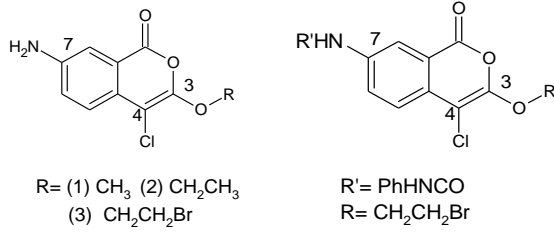


HLE : R = C₂H₅ > CH₂CH(CH₃)₂ > CH₂C₆H₅
a-CT : R = CH₂C₆H₅ > CH₂CH(CH₃)₂ > C₂H₅

Şekil 22. 3-alkoksi-4-kloro izokumarin bileşikler [47]

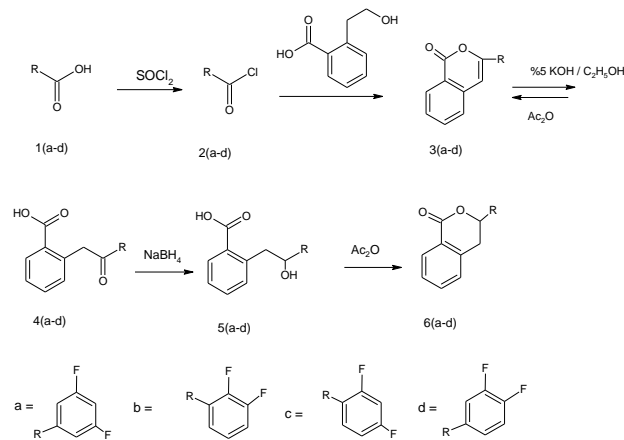
İnsan lökosit elastazı (HLE), iltihaplanma ve doku bozulmasında rol oynayan bir serin proteinaz enzimidir. Uygun HLE inhibitörlerinin, amfizem ve kistik fibroz gibi hastalıkların tedavisi için faydalı olacağına inanılmaktadır [48]. Farklı 3-alkoksi substitüsyonlarına sahip bir dizi 3-alkoksi-7-amino-4-kloroizokumarin bileşikleri hazırlanmış ve HLE inhibitörleri olarak değerlendirilmiştir (Şekil 23) [46]. Ek olarak, 7-amino-4-kloro-3-metoksiizokumarin, 7-amino-4-kloro-3-propoksiizokumarin ve 7-amino-4-kloro-3-(2-bromoetoksi)izokumarin bileşiklerinin açıl, üre ve karbamat türevleri serisi sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin çoğu, 104 ve 106 M-1 s-1 arasında kobs/[I] değerlere sahip çok güçlü HLE inhibitörleri olarak aktivite göstermişlerdir. İzokumarin halkasının 7-amino pozisyonundaki hidrofobik substitüsyonlar, HLE aktivitesi için en seçici ve iyi inhibe edici potansiyeli sağlamıştır. 2-bromoetoksi serisinde, PhNHCONH 7-substitüentine sahip bileşik 24, 1.2 x 10⁴ ve 106 M-1 s-1'lik bir kobs/[I] değeri ile HLE için test edilen bileşikler arasında en seçici ve güçlü inhibitör olarak öne çıkmıştır. Bu sonuçlar sentezlenen bileşiklerin, yüksek etki gücü ve

mekanizmaya dayalı seçicilik göstermeleri ile yeni izokumarin inhibitörlerine dahil edilebileceğini göstermektedir.



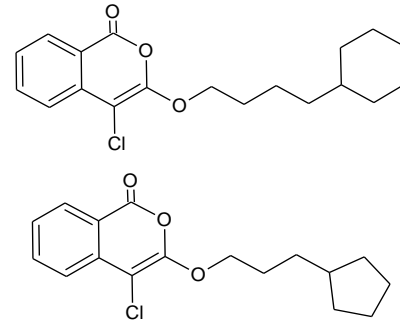
Şekil 23. 3-alkoksi-7-amino-4-kloroizokumarin bileşikleri [46]

İzokumarinlerin antienflamatuar aktivitelerinden hareketle yürütülen bir çalışmada, yeni 3-diflorofenilizokumarinler, asit klorürün homofitalik asit ile yoğunlaştırılması yoluyla sentezlenmiş ve bunlara karşılık gelen 3,4-dihidroizokumarine dönüştürülmüştür. Sentezlenen bileşikler (3 (a – d), 4 (a – d), 5 (a – d) ve 6 (a – d)) (Şekil 24), farelerde 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) ile indüklenen enflamasyona karşı antienflamatuar aktiviteleri ölçülerek değerlendirilmiş ve inhibitör aktiviteler, bir antienflamatuar ilaç olan indometasin ile karşılaştırılmıştır. 1,0 mg dozda, 3b, 4d ve 5a bileşikleri iyi aktivite gösterirken, geri kalan bileşikler indometasine kıyasla daha düşük veya neredeyse eşit aktivite göstermiştir (1,0 mg / kulak dozunda % 91,35). Bu bileşiklerin in vivo antienflamatuar aktivitesi, osteoartrit ve arteriyoskleroz gibi enflamatuar hastalıklarla bağlantılı semptomları tedavi etme amacıyla yeni ilaçların geliştirilmesi için olası bir aday olarak değerlendirilebilir. İlave olarak sentetik bileşiklerin stabil serbest radikal DPPH'ye (2,2-difenil-2-pikrilhidrazil hidrat) karşı radikal temizleme etkileri spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve bileşik 5b, 93,3'lük bir IC₅₀ değeri ile en etkili DPPH radikal temizleyici olarak bulunmuştur [49].



Şekil 24. Floro-izokumarinlerin sentezi ve sentezlenen bileşiklerin genel yapıları [49].

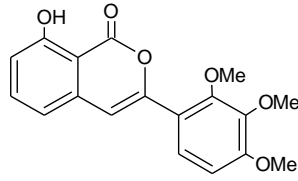
Pankreatik kolesterol esteraz (CEase), ekzokrin pankreastan salgılanan, diyet kolesterol esterlerinin safra tuzuna bağlı hidrolizine yardımcı olan, trigliserid ve fosfolipidlerin hidrolizine katkıda bulunan bir serin hidrolaz enzimidir [50]. CEase'nin dolaşımda aterosklerotik lezyonlarda biriktiği ve düz kas hücrelerinin proliferasyonunu tetiklediği için farklı patolojik roller üstlendiğini işaret eden çalışmalar mevcuttur [51]. Bu nedenle, potansiyel bir ilaç hedefi olarak CEase'lerin gelişimine ilgi gösterilmiştir. 4-Kloro-3-alkoksiizokumarinler (Şekil 25), serin hidrolazları ve serin proteazları inhibe eden bir haloenol laktone sınıfıdır. Güçlü CEase inhibitörleri olan 3-alkoksikloroizokumarinler geliştirildiği bir çalışmada inhibitörler, 3-alkoksi substitüentine dahil edilmiş doymuş bir sikloalkan halkasına sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Halkanın boyutunun yanı sıra halkaya bağlı karbon zincirinin uzunluğunun, CEase'ye bağlanmada önemli katkılar sağladığı bulunmuştur. 4-Kloro-3-(4-sikloheksilbütoksi) izokumarin ve 4-kloro-3-(3-siklopentilpropoksi) izokumarin bileşiğinin (Şekil 25), sırasıyla 11 nM ve 19 nM ayrılma sabitleri ile güçlü geri dönüşümlü CEase inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Yapılan kinetik sonuçlar, moleküler modellemelerden elde edilen tahminlerle tutarlılık göstermiştir. Yapı aktivite çalışmalarına göre 4-kloro-izokumarinlerin C-3 pozisyonunda büyük lipofilik gruplar ve daha uzun bağlar ile en iyi inhibitörler olacağı sonucu çıkarılmıştır. Kloroizokumarinler için, bir terminal siklopentil grubu veya sikloheksil grubu olan 3-alkoksi substitüentlerin iyi inhibitörler olacağı ve bağ uzunluğunun aktiviteye önemli katkı değişiklikler sağlayacağı tahmin edilmiştir [52].



Şekil 25. 4-Kloro-3-(4-sikloheksilbütoksi)izokumarin ve 4-kloro-3-(3-siklopentilpropoksi) izokumarin [52].

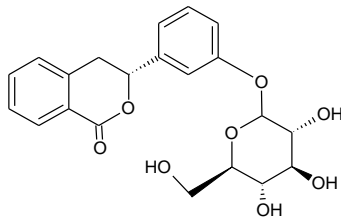
Bir diğer çalışmada, 3-arilizokumarin türevi yeni bileşikler sentezlenmiş ve bu bileşiklerin enflamasyon oluşumunda 5-lipoksijenaz ve mPGES1 enzimlerinin her ikisini de inhibe edici aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Bu durum etkili bir antienflamatuar tedavisi için birden fazla hedefli bileşik arayışı için umut vaat etmiştir. Çalışma sonunda aril halkasında trimetoksi taşıyan bileşik en etkili bileşik olarak bulunmuştur (Şekil 26). Bu bileşik kanser hücrelerinin bazal membranı geçmesine ve ekstrasellüler matrikse

ulaşmasına yardımcı olmuş ve epitelyal mezenkimal geçişte görev alan PGE2 üretimi inhibe etmiştir [53].



Şekil 26. 3-arilizokumarin türevi bileşik [53]

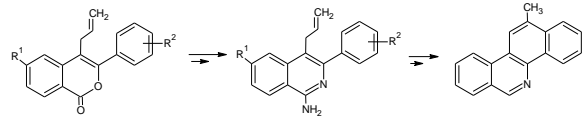
Homalium paniculiflorum'un köklerinden izole edilen doğal bir izokumarin olan GDC'nin (3-(4'-hidroksil-3'-O-β-D-glukopiranozil fenil dihidroizokumarin)) (Şekil 27), in vitro LPS kaynaklı iltihaplanmaya karşı koruyucu etkileri ve potansiyel mekanizmalarının incelendiği bir çalışmada sıçanların sinoviyal dokusundan elde edilen fibroblast benzeri sinoviyositler, LPS ile indüklenmiş ve ardından GDC ile tedavi edilmiştir. Sonuçlar, GDC'nin LPS'nin neden olduğu TNF-α, IL-6 üretimini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. GDC ayrıca iNOS ve IL-1β ifadesinin yanı sıra aktivin A, silyer nörotrofik faktör (CNTF), frakalkin, IFN-γ, IL-4 ve TIMP-1 (doku inhibitörü matris metalloproteinaz 1) gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu da azaltmıştır. Romatoid artrit oluşumunda fibroblast benzeri sinoviyositler ve bağışıklık hücreleri tarafından aşırı eksprese edilerek enflamatuar oluşumunu tetikleyen bu pro-enflamatuar sitokinlerin üretiminin GDC ile inhibe edilmesi romatoid artrit tedavisinde iltihabın üstesinden gelebilmek için umut verici olmuştur. Çalışmada elde edilen diğer sonuçlar GDC'nin in vitro olarak LPS kaynaklı enflamasyona karşı koruyucu etkilerinin NF-κB ve JNK (Jun N-terminal kinazlar) sinyal yolu ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür [54].



Şekil 27. 3-(4'-hidroksil-3'-O-β-D-glukopiranozil fenil)dihidroizokumarin [54].

Benzo[c]fenantridinlerin (Şekil 28) çeşitli farmakolojik özelliklerinin bilinmesine rağmen antienflamatuar potansiyelleri yeterince araştırılmamıştır. Bu nedenle 2020 yılında yapılan bir çalışma ile ilk kez, 11,12-dihidro benzo[c]fenantridin türevlerinin PDE4 inhibisyon potansiyeli in vitro olarak değerlendirilmiştir. Bu türevler, 4-alilizokumarin halkası ve FeCl3-aracılı intramoleküler yapının Pd katalizli eldesinin yanı sıra seçici aren-alil siklizasyonun anahtar adımlar olduğu çok aşamalı bir

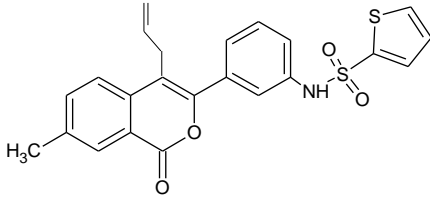
yöntem ile sentezlenmiştir. Çalışmadaki genel strateji, bir dizi 11,12-dihidro türevi elde etmek için Sonogashira bağlanmasının ardından izokumarin ve izokinolon sentezi daha sonra klorlamayı takiben siklizasyon adımlarının içerir. Elde edilen 11,12-dihidro türevlerin arasından doza bağlı PDE4B inhibisyonu (IC50 ~ 7 μM) gösteren bir bileşik, ilgili benzo[c]fenantridine dönüştürülmüş ve böylece bu sınıftan bir ilk isabet bileşiği elde edilmiştir. Bileşik ayrıca in vitro olarak kabul edilebilir mikrozomal stabilite ve önemli TNF-α sentez inhibisyonu göstermenin yanı sıra iki hücre bazlı toksisite analizinde önemli toksisite göstermemiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, 11,12-dihidro benzo[c]fenantridin türevleri iyi bir verimle sentezlenmiş ve böylece ilk kez benzo[c]fenantridin bazlı bir PDE4 inhibitörünün tanımlanmıştır [55].



Şekil 28. Benzo[c]fenantridinlerin sentez çalışmanın genel tasarımı [55].

Aynı ekip tarafından yürütülen bir diğer çalışmada ise, antienflamatuar mediatörlerin hücre içi etkinliklerinden sorumlu ana enzim sınıfı olan Fosfodiesteraz-4 (PDE4) inhibitörü olmayan izokumarinlerden yola çıkılarak izokumarin yapısında C-3 benzen halkasına bir aminosülfonil/aminokarboksamid parçasının eklenmesiyle umut verici yeni PDE4 inhibitörleri elde edilmiştir. Bu yeni izokumarin sınıfı, uygun 2-alkinil benzamid türevinden başlayarak PdCl2-katalizi ile 4-alil-3-aril izokumarin halkasından sentezlenmiştir. Birkaç bileşik iyi in vitro PDE4B inhibisyonu göstermiş ve yapı aktivite çalışmaları, PDE4B inhibisyonu açısından aminosülfonamid yapısının, aminokarboksamide göre üstünlüğünü ortaya çıkarmıştır. PDE4B IC50 ¼ 0.43 ± 0.11 ve 0.54 ± 0.19 mM değerleri ile PDE4D'ye göre 2 kat seçiciliğe sahip iki bileşik önemli isabetler olarak ortaya çıkmıştır. İn silico docking çalışmaları bu iki bileşikteki aminosülfonamid yapısının, PDE4B inhibisyonuna önemli katkı sağladığı ortaya çıkarılmıştır. Diğer PDE'lere göre daha fazla PDE4 seçiciliği gösteren N-[3-(7-metil-1-okso-1H-2-benzopiran-3-il)fenil]tiyofen-2-sülfonamid (iki bileşikten biri) bileşiği, adjuvan kaynaklı artritlik sıçanlarda ayrıca değerlendirilmiştir. 30 mg/kg intraperitoneal dozda bileşik doza bağlı bir şekilde; pençe şişmesinde, diz eklemlerinde iltihaplanma ile pannus oluşumu ve pro-enflamatuar gen ekspresyonu/mRNA seviyelerinde önemli bir azalma ve vücut ağırlığında artış göstermiştir. Ayrıca, TNF-α inhibisyonunun yanı sıra MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5 difenil

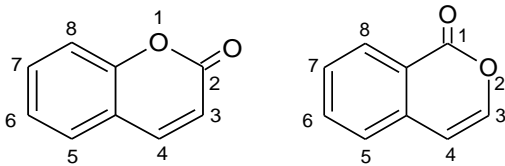
tetrazolyum bromür) deneyinde önemli bir toksisite göstermeyen bileşik zebra balıklarında yapılan kapsamlı toksisite çalışmasında teratojenite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite gibi testlerde herhangi bir toksik etki göstermemiştir. Böylece, yeni, güvenli ve orta derecede seçici bir PDE4B inhibitörü olarak ortaya çıkan N-[3-(7-metil-1-okso-1H-2-benzopiran-3-il)fenil]tiyofen-2-sülfonamid bileşiği (Şekil 29), enflamatuar hastalıklar için değerlendirilebilir [56].



Şekil 29. N-[3-(7-metil-1-okso-1H-2-benzopiran-3-yl)fenil]tiyofen-2-sulfonamid [56].

4. SONUÇ

Birçok araştırma grubu, kumarin ve izokumarin çekirdeğinin farklı pozisyonlarında (C-3'ten C-8'e) maksimum antienflamatuar aktiviteye uygun fonksiyonel grupları bulmak için bir dizi bileşik geliştirmiştir (Şekil 30). Bu çalışmalardan elde edilen verilerin karşılaştırmalı analizi ile kumarin ve izokumarin çekirdeği etrafında yeni antienflamatuar moleküller tasarlamasında yol gösterici olabilen yapı aktivite bilgilerine ulaşılabilir. Buna göre öne çıkan gruplar şu şekilde özetlenebilir:



Şekil 30. Kumarin ve izokumarinlerin ana yapıları [11-42,43,45-56].

Çalışmalarda sentezlenen bileşiklerin çoğu çekirdeğin C-3 ve C-4 konumlarından substitüsyonlar ile türevlendirilmiştir. C-3'te, pirimidin ve pirazol gibi nitrojen içeren heterosiklerden oluşan elektron açısından zengin bir hidrofobik grup, antienflamatuar aktiviteyi güçlendirir. C-4'te yine azot içeren yapıların yanında substitüsyon içermeyen fenil yapısının da aktiviteye olumlu katkılar sağladığı söylenebilir. Ayrıca C-3 ve C-4 grupları kondenzasyon ve hibrit yapılarının oluşumuna olanak sağlamış ve bunun sonucunda yüksek antienflamatuar aktivite sergileyen sentetik kumarin analogları elde edilmiştir. Bunun yanında, C-5 pozisyonu üzerinde yeteri sayıda denemeler yapılmadığı için bu pozisyon keşfedilmemiş olarak kalmıştır. Ayrıca, C-7 ve C-8'deki

substitüsyonların etkisi hem sentetik hem de bitkilerden türetilmiş kumarinlerde büyük ölçüde benzerlik gösterir. C-7'deki karbamatlar ve nitrojen içeren heterosiklerin, hidrojen bağı yoluyla reseptör ile etkileşime girerek aktiviteyi artırdığı sonucuna varılmıştır. Öte yandan kumarin yapısında benzopiranon halkasının C-8'inden türetilen türevlerin C-7 ile karşılaştırıldığında daha sınırlı sayıda olduğu sonucuna varılabilir. Bu pozisyonda 2005 ve 2020 yıllarında yapılan çalışmalar ile C-8 konumundaki substitüsyonun sterik etkiye katkısı antienflamatuar aktiviteye etki eden önemli faktörler olarak ortaya çıkarılmıştır.

İzokumarinlerin antienflamatuar aktiviteleri üzerine yapılan sentetik çalışmaların çoğu, kumarinlerde olduğu gibi C-3 ve C-4 karbonuna getirilen substitüsyonlar üzerinden yürütülmüştür. Substitüe edilen grupları incelediğimizde C-3 pozisyonunda substitüe fenil, sikloalkil ve daha büyük lipofilik gruplar aktivitenin oluşmasında iyi sonuçlar vermiştir. Bunun yanında Powers ve ark. yapmış olduğu üç serili çalışmalarda, C-3 ve C-4'te yapılan aktivite çalışmaları sonucunda klor ve özellikle C-3'teki alkoloksi gruplarının enflamatuar yollarla ilişkili olan elastaz enziminin güçlü inhibitörü olarak faydalı olabileceği bulunmuştur. Buna benzer bir başka çalışma Heynekamp ve ark. tarafından güçlü CEase inhibitörleri olan 3-alkoksikloroizokumarinler geliştirmek üzere yapılmıştır. 4 pozisyonundaki bir klor ve 3 pozisyonundaki bir terminal siklopentil veya sikloheksil grubu ile CEase'ın yağ asidi cebi ile optimum etkileşim enerjisine ulaşıldığı tespit edilmiştir. C-7'te ise hidroksil ve amino gruplarının öne çıktığını görüyoruz bu muhtemelen kumarinlerde olduğu gibi hidrojen bağları oluşumuna işaret eder.

Bu derleme makalesinde, literatürde yer alan kumarin ve izokumarinlerin antienflamatuar aktivitelerine dair yayınlar incelenip derlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda kumarin ve izokumarin türevi bileşiklerin beklenen derecede antienflamatuar aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Kumarin ve izokumarin ana yapısı etrafında yapılan karşılaştırmalı yapı aktivite analizi ile farklı konumlarında çeşitli fonksiyonel grupların veya kısımların uygunluğu ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Kumarinlerde C-5 ve C-6 pozisyonları nispeten keşfedilmemiş olarak kalmıştır. Bu nedenle, C-5'te uygun fonksiyonel grubun seçimi, faydalı yeni antienflamatuar moleküllerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. İzokumarinlerde ise özellikle C-3 ve C-4 dışındaki pozisyonlar üzerine çalışmalara yoğunlaşılabilir. Ayrıca kumarinlerde olduğu gibi izokumarinlerde de diğer sınıf bileşiklerle konjugasyon ile hibrit moleküller elde edilebilir. Bu noktada yapılacak çalışmalar birden fazla aktivite ile sonuçlanabileceğinden oldukça umut vaat etmektedir. Sonuç olarak kumarin ve izokumarinler, gösterdikleri çeşitli düzeylerdeki antienflamatuar aktivite profili ile üzerine daha fazla çalışılması gereken iki doğal olarak oluşan heterosiklik yapıdır.

5. ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar hiçbir rekabet eden finansal çıkar beyan etmemektedir.

Etik Onay

Bu çalışma için Etik Onay belgesi gerekli değildir.

KAYNAKLAR

- [1] Barry, R. D. "Isocoumarins. Developments Since 1950," *Chemical Reviews*, (2002), 64, 3, 229–260, doi: 10.1021/cr60229a002.
- [2] Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., and Uriarte, E. "Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity," *Current Medicinal Chemistry*, (2005), 12, 8, 887–916, doi: 10.2174/0929867053507315.
- [3] Matos, M. J., Santana, L., Uriarte, E., Abreu, O. A., Molina, E., and Yordi, E. G. "Coumarins — An Important Class of Phytochemicals," *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, (2015), 1-30, doi: 10.5772/59982.
- [4] Stefanachi, A., Leonetti, F., Pisani, L., Catto M., and Carotti, A. "Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds", *Molecules*, (2018), 23(2), 250, 1-34, DOI: 10.3390/molecules23020250
- [5] Kumar, K. A., Nagamallu, R., and Govindappa, V. K., "Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest," *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, (2015), 7, 9, 67–81,
- [6] Fylaktakidou, K., Hadjipavlou-Litina, D., Litinas, K., and Nicolaides, D. "Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory / Antioxidant Activities," *Current Pharmaceutical Design*, (2005), 10, 30, 3813–3833, doi: 10.2174/1381612043382710.
- [7] Shabir, G., Saeed, A., and El-Seedi, H. R. "Natural isocoumarins: Structural styles and biological activities, the revelations carry on ...," *Phytochemistry*, (2020), 181, 112568, doi: 10.1016/j.phytochem.112568.
- [8] Saeed, A. "Isocoumarins, miraculous natural products blessed with diverse pharmacological activities," *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2016), 116, 290–317, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.03.025.
- [9] Medzhitov, R. "Origin and physiological roles of inflammation," *Nature*, (2008), 454, 7203, 428–435, doi: 10.1038/nature07201.
- [10] Nathan, C. "Points of control in inflammation," *Nature*, (2002) 420, 6917, 846–852,
- [11] Dhingra, A., Chopra, B., Dass, R., Mittal, S. "An update on Anti-inflammatory Compounds: A Review," *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, (2015), 14, 2, 81–97, doi: 10.2174/1871523014666150514102027.
- [12] Perez, R. M. "Anti-Inflammatory Activity of Compounds Isolated from Plants," *The Scientific World Journal*, (2001), 1, 713–784, doi: 10.1100/tsw.2001.77.
- [13] Garg, S. S., Gupta, J., Sharma, S., and Sahu, D. "An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2020), 152, 105424, doi: 10.1016/j.ejps.2020.105424.
- [14] Sethna, N. M., Shah, S. M. "The Chemistry of Coumarins," *Chemical Reviews*, (1945), 36, 1, 1–62, doi.org/10.1021/cr60113a001
- [15] Jain P. K., and Joshi, H., "Coumarin: Chemical and pharmacological profile," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, (2012), 2, 6, 236–240, doi: 10.7324/JAPS.2012.2643.
- [16] Dighe, N., Pattan, S. R., Dengale, S. S., Musmade, S., Deepak, Madhuri, S., Tambe, V., and Hole, M. B. "Synthetic and pharmacological profiles of coumarins: A review," *Archives of Applied Science Research*, (2010), 2, 65–71, <http://scholarsresearchlibrary.com/aasr-vol2-iss2/AASR-2010-2-2-65-71.pdf>.
- [17] Kulkarni, C. M., Kulkarni, M. V., Lin, G. M., Sun, C. H. "Recent advances in coumarins and 1-azacoumarins as versatile biodynamic agents," *Current Medicinal Chemistry*, (2006), 13, 23, 2795–2818, doi:0.2174/092986706778521968.
- [18] Bansal, Y., Sethi, P., and Bansal, G. "Coumarin: A potential nucleus for anti-inflammatory molecules," *Medicinal Chemistry Research*, (2013), 22, 7, 3049–3060, doi: 10.1007/s00044-012-0321-6.
- [19] Piller, N. B. "A comparison of the effectiveness of some anti inflammatory drugs on thermal oedema," *British Journal of Experimental Pathology*, (1975), 56, 6, 554–560.
- [20] Witaicenis A., Seito, L. N., Chagas, A. da S., Luiz Jr, D. de Al., Luchini, A. C., Rodrigues-Orsi, P., Cestari, S. H., Stasi, L. C. Di. "Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives," *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology Specifications*, (2014), 21, 240–246.

- [21] Casley-Smith JR, C.-S. J. "Modern treatment of lymphoedema II. The benzopyrones," *Australasian Journal of Dermatology*, (1992), 33, 69–74.
- [22] Maddi, V., Raghu, K. S., and Rao, M. N. A. "Synthesis and anti-inflammatory activity of 3-(benzylideneamino)coumarins in rodents," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1992), 81, 9, 964–966, doi: 10.1002/jps.2600810926.
- [23] Gacche, R. N., Gond, D. S., Dhole, N. A., and Dawane, B. S., "Coumarin Schiff-bases: As antioxidant and possibly anti-inflammatory agents," *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, (2006), 21, 2, 157–161, doi: 10.1080/14756360500532671.
- [24] Timonen, J. M., et al., "Synthesis and anti-inflammatory effects of a series of novel 7-hydroxycoumarin derivatives," *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2011), 46, 9, 3845–3850, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.05.052.
- [25] Sashidhara, K. V., et al., "Synthesis and anti-inflammatory activity of novel biscoumarin-chalcone hybrids," *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, (2011), 21, 15, 4480–4484, doi: 10.1016/j.bmcl.2011.06.002.
- [26] Srivastava, P., Vyas, V. K., Variya, B., Patel, P., Qureshi, G., and Ghatge, M., "Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives," *Bioorganic Chemistry*, (2016), 67, 130–138, doi: 10.1016/j.bioorg.2016.06.004.
- [27] Abdellatif, A., Abdelall, A., Fadaly, W. A., and Kamel, G. M. "Synthesis, cyclooxygenase inhibition, anti-inflammatory evaluation and ulcerogenic liability of new 1,3,5-triarylpyrazoline and 1,5-diarylpyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors," *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, (2016), 26, 2, 406–412, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.11.105.
- [28] Chen L. Z., et al. "New arylpyrazoline-coumarins: Synthesis and anti-inflammatory activity," *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2017), 138, 170–181, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.06.044.
- [29] Fattah, T. A., et al. "Functionalized furo[3,2-c]coumarins as anti-proliferative, anti-lipolytic, and anti-inflammatory compounds: Synthesis and molecular docking studies," *Journal of Molecular Structure*, (2019), 1179, 390–400, doi: 10.1016/j.molstruc.2018.11.014.
- [30] Deng, D., et al. "Synthesis and discovery of new compounds bearing coumarin scaffold for the treatment of pulmonary fibrosis," *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2019), 111790, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111790.
- [31] Tapanyigit, O., Demirkol, O., Güler, E., Erşatır, M., Çam, M. E., and Giray, E. S., "Synthesis and investigation of anti-inflammatory and anticonvulsant activities of novel coumarin-diacylated hydrazide derivatives," *Arabian Journal of Chemistry*, (2020), 13, 12, 9105–9117, doi: 10.1016/j.arabjc.2020.10.034.
- [32] Naik, N. S., et al. "Synthesis of novel aryl and coumarin substituted pyrazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives as potent anti-inflammatory and anticancer agents," *Chemical Data Collections*, (2020), 30, 100550, doi: 10.1016/j.cdc.2020.100550.
- [33] Muthanna, M. H. A., Farhan, S. "Synthesis, Characterization and Anti-Inflammatory Study of New Heterocyclic Coumarin Derivatives," *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, (2021), 15, 1, 2363–2369.
- [34] Kontogiorgis, C. A., and Hadjipavlou-Litina, D. J. "Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives," *Journal of Medicinal Chemistry*, (2005), 48, 20, 6400–6408, doi: 10.1021/jm0580149.
- [35] Buran, B. K., Reis, R., Sipahi, H., "Piperazine and piperidine-substituted 7-hydroxy coumarins for the development of anti-inflammatory agents," *Archiv der Pharmazie (Weinheim)*, (2021), 1–11, doi: <https://doi.org/10.1002/ardp.202000354>.
- [36] Kang, Y. S., Chung, Y. C., Lee, J. N., Kim, B. S., Hyun, C.-G. "Anti-Inflammatory Effects of 6,7-Dihydroxy-4-Methylcoumarin on LPS-Stimulated Macrophage Phosphorylation in MAPK Signaling Pathways," *Natural product communications*, (2021), 16, 5.
- [37] Pal, S., Chatare, V., and Pal, M. "Isocoumarin and Its Derivatives: An Overview on their Synthesis and Applications," *Current Organic Chemistry*, (2011), 15, 5, 782–800, doi: 10.2174/138527211794518970.
- [38] Napolitano, E. "Synthesis of isocoumarins over the last decade: a review," *Organic Preparations and Procedures International*, (1997), 29, 631–664, doi: DOI: 10.1080/00304949709355245.
- [39] Braca, A., Bader, A., and Tommasi, N. D., "Plant and fungi 3,4-dihydroisocoumarins: Structures, biological activity, and taxonomic relationships" *Studies in Natural Products Chemistry*, (2012), 37, 191–215. doi:10.1016/B978-0-444-59514-0.00007-9.
- [40] Saikia P., and Gogoi, S. "Isocoumarins: General Aspects and Recent Advances in their Synthesis," *Advanced Synthesis and Catalysis*, (2018), 360, 11, 2063–2075, doi: 10.1002/adsc.201800019.
- [41] Saddiqa, A., Usman, M., and Çakmak, O. "Isocoumarins and 3,4-dihydroisocoumarins,

- amazing natural products: A review,” *Turkish Journal of Chemistry*, (2017), 41, 2, 153–178, doi: 10.3906/kim-1604-66.
- [42] Tianpanich, P. K. K., Prachya, S., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., “Radical scavenging and antioxidant activities of isocoumarins and a phthalide from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp.,” *Journal of Natural Products*, (2010), 74, 1, 79–81.
- [43] Di Stasi, J. G. L.C., Camuesco, D., Nieto, A., Vilegas, W., Zarzuelo, A. “Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis,” *Plantamedica*, (2004), 70, 4, 293–305.
- [44] Powers, J. C., and Kam, C. M. “Isocoumarin inhibitors of serine peptidases,” *Methods in Enzymology*, (1994), 244, 442–457, doi: 10.1016/0076-6879(94)44033-6.
- [45] Otake, J. C. P. S., Kam, C.M., Narasimhan, L., Poe, M., Blake, J.T., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., “Human and murine cytotoxic T lymphocyte serine proteases: subsite mapping with peptide thioester substrates and inhibition of enzyme activity and cytolysis by isocoumarins,” *Biochemistry*, (1991), 30, 2217–2225.
- [46] Kerrigan, J. E., Oleksyszyn, J., Kam, C.-M., Selzler, J. and Powers, J. C. “Mechanism-Based Isocoumarin Inhibitors for Human Leukocyte Elastase. Effect of the 7-Amino Substituent and 3-Alkoxy Group in 3-Alkoxy-7-amino-4-chloroisocoumarins on Inhibitory Potency,” *Journal of Medicinal Chemistry*, (2002), 38, 3, 544–552, doi: 10.1021/jm00003a017.
- [47] Wade Harper, J., and Powers, J. C., “Reaction of serine proteases with substituted 3-alkoxy-4-chloroisocoumarins and 3-alkoxy-7-amino-4-chloroisocoumarins: new reactive mechanism-based inhibitors,” *Biochemistry*, (2002), 24, 25, 7200–7213, doi: 10.1021/bi00346a028.
- [48] Zimmerman, M., Morman, H., Mulvey, D., Jones, H., Frankshun, R., and Ashe, B. M., “Inhibition of elastase and other serine proteases by heterocyclic acylating agents,” *Journal of Biological Chemistry*, (1980), 255, 20, 9848–9851, doi: 10.1016/s0021-9258(18)43470-9.
- [49] Qadeer, G., Rama, N. H., and Garduño-Ramírez, M. L. “Synthesis and anti-inflammatory activity of fluorinated isocoumarins and 3,4-dihydroisocoumarins,” *Journal of Fluorine Chemistry*, (2007), 128, 6, 641–646, doi: 10.1016/j.jfluchem.2007.02.021.
- [50] Hui, D. Y., “Molecular biology of enzymes involved with cholesterol ester hydrolysis in mammalian tissues,” *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, (1996), 1303, 1. Elsevier B.V., 1–14, doi: 10.1016/0005-2760(96)00085-9.
- [51] Howles, P. N., Carter, C. P., and Hui, D. Y., “Dietary free and esterified cholesterol absorption in cholesterol esterase (bile salt-stimulated lipase) gene-targeted mice,” *Journal of Biological Chemistry*, (1996), 271, 12, 7196–7202, doi: 10.1074/jbc.271.12.7196.
- [52] Heynekamp, J. J., Hunsaker, L. A., Vander Jagt, T. A., Royer, R. E., Deck, L. M., and Vander Jagt, D. L., “Isocoumarin-based inhibitors of pancreatic cholesterol esterase,” *Bioorganic Medicinal Chemistry*, (2008), 16, 9, 5285–5294, doi: 10.1016/j.bmc.2008.03.016.
- [53] Ramanan, M., Sinha, S., Sudarshan, K., Aiden, I. S., and Doble, M. “Inhibition of the enzymes in the leukotriene and prostaglandin pathways in inflammation by 3-aryl isocoumarins,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2016), 124, 428–434, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.08.066.
- [54] Zhang, Y., et al., “Compound GDC, an Isocoumarin Glycoside, Protects against LPS-Induced Inflammation and Potential Mechanisms In Vitro,” *Inflammation*, (2019), 42, 2, 506–515, doi: 10.1007/s10753-018-0908-2.
- [55] Thirupataiah, B., Reddy, G. S., Ghule, S. S., Kumar, J. S., Mounika, G., et al., “Synthesis of 11,12-dihydro benzo[c]phenanthridines via a Pd-catalyzed unusual construction of isocoumarin ring/FeCl₃-mediated intramolecular arene-allyl cyclization: First identification of a benzo[c]phenanthridine based PDE4 inhibitor,” *Bioorganic Chemistry*, (2020), 97, doi: 10.1016/j.bioorg.2020.103691.
- [56] Thirupataiaha, B., Mounika, G., Reddy, G. S., Kumar, J. S., Hossain. K. A., et al. “PdCl₂-catalyzed synthesis of a new class of isocoumarin derivatives containing aminosulfonyl / aminocarboxamide moiety: First identification of a isocoumarin based PDE4 inhibitor,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2021), 221, 0223–5234, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113514>