



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل  
دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری عمومی داروسازی

عنوان

سنتز و ارزیابی خاصیت سیتو توکسیک ترکیبات جدید N-هترو آریل این آمینو آمید  
و دی هیدرو پیریمیدین بر روی سلول های رده سرطانی AGS و MCF-7

اساتید راهنما

دکتر نیما رزاقی اصل

دکتر شهاب بهلوی

نگارنده

سجاد توانگرفلاح

۹۸

شماره پایان نامه: ۱۱۵-۷-۹۸

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نصبیم  
ساخته تا در سایه درخت پریار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها  
شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش  
تلash نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و  
نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار،  
مايه هستی ام بوده‌اند، دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی پر  
از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان  
بودن را معنا کردند.  
تقدیم به وجود با ارستان...

از اساتید گرامیم جناب آقای دکتر نیما رزاقی اصل و دکتر شهاب  
بهلوانی بسیار سپاسگزارم چرا که بدون راهنمایی‌های ایشان  
تکمیل این پایان نامه بسیار دشوار می‌بود.

## چکیده فارسی

### مقدمه و هدف:

سرطان بیماری بسیار مهمی است که در قرن اخیر میزان شیوع آن رو به افزایش نهاده است. میزان شیوع برخی از انواع آن مانند سرطان معده در استان اردبیل زیاد است و هر ساله افراد زیادی به این بیماری مبتلا می‌شوند که آثار روانی، اجتماعی و اقتصادی زیادی را در بردارد. لذا درمان و یا کنترل این بیماری در اولویت قرار دارد. امروزه از روش‌های مختلفی برای کنترل و درمان سرطان استفاده می‌شود که مهمترین آن شیمی‌درمانی است. در روش شیمی‌درمانی از مولکول‌های شیمیابی برای کنترل سرطان استفاده می‌شود. بررسی‌های جدید نشان داده‌است که ترکیبات إن‌آمینو‌آمیدی و دی-هیدروپیریمیدینی پتانسیل مناسبی برای توسعه به ترکیبات ضد سرطان دارند که در این پایان نامه ترکیبات جدیدی از این دو گروه سنتز و شناسایی گردیده و میزان سمیت آن‌ها بر روی رده‌های سلولی سرطان معده و سینه بررسی گردید.

### مواد و روش‌ها:

در این پژوهه به وسیله ۲،۲-تری‌متیل-۱،۳-دی‌اکسین-۴-اون و آمین آروماتیک ابتدا پیش‌سازهای بتاکتوآمیدی سنتز گردیده و در مرحله بعد از طریق حد واسطه‌های ایجاد شده، ۷ ترکیب إن‌آمینو‌آمیدی و ۲ ترکیب دی‌هیدروپیریمیدینی سنتز شده‌است. پس از خالص‌سازی به کمک روش‌های طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون، مادون قرمز و جرمی ساختار ترکیبات مورد شناسایی قرار گرفتند و در ادامه به روش ارزیابی سمیت سلولی با احیای نمک تیازول (MTT) بر روی رده‌های سلولی AGS و MCF-7 ارزیابی شدند.

### یافته‌ها:

با توجه به نتایج به دست آمده از تست‌های شناسایی  $^1\text{H}$  NMR و FT-IR و MS تمامی ساختارهای سنتز شده تایید و جهت ارزیابی مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، تست غربالگری سمیت سلولی انجام شد که در نهایت ترکیب B2 بهترین اثر را بر روی رده‌های سلولی AGS و MCF-7 نشان داده است.

### بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که ترکیبات دی‌هیدروپیریمیدین بسیار بهتر از إن‌آمینو‌آمیدها توانستند سلول‌های سرطانی را مهار کنند. حلقوی بودن ترکیبات بسیار مهم است و با خطی شدن قدرت ترکیبات به شدت کاهش می‌یابد، همچنین حلقه‌های غنی از الکترون مانند تیازول نیز اثر بخشی را تا ۲ برابر افزایش می‌دهند.

### کلمات کلیدی:

سرطان، شیمی‌درمانی، سنتز، إن‌آمینو‌آمید، دی‌هیدروپیریمیدین، MTT

## فهرست مطالب

فصل ۱: مقدمه .....	۱
۱-۱- بیماری سرطان .....	۲
۱-۲- شیوع سرطان در جهان .....	۵
۱-۳- شیوع سرطان در ایران .....	۹
۱-۴- سرطان معده .....	۹
۱-۵- سرطان سینه .....	۱۱
۱-۶- درمان سرطان معده .....	۱۲
۱-۷- درمان سرطان سینه .....	۱۳
۱-۸- مشکلات درمان سرطان .....	۱۴
۱-۹- ترکیبات هتروسیکل مهم زیستی .....	۱۶
۱-۱۰- شیمی این‌آمینوآمید و دی‌هیدروپیریمیدین .....	۲۰
۱-۱۱- اثرات فارماکولوژیکی ترکیبات این‌آمینوآمید و دی‌هیدروپیریمیدین .....	۲۲
۱-۱۲- سنتز و ارزیابی اثرات سیتوکسیک ترکیبات این‌آمینوآمید و دی‌هیدروپیریمیدین .....	۲۸
فصل ۲: مواد، دستگاهها و روش‌ها .....	۲۹
۱-۱- حللا و مواد شیمیایی استفاده شده در بخش سنتز و کشت سلولی .....	۳۰
۱-۲- وسائل آزمایشگاهی و دستگاهها .....	۳۱
۱-۳- مواد و لوازم مصرفی .....	۳۳
۱-۴- نرم افزارها .....	۳۳
۱-۵- سنتز ترکیبات هتروسیکل جدید این‌آمینوآمید .....	۳۵
۱-۵-۱- سنتز ۳-((۴-متیل بنزیل) آمینو)-N-(۵-متیل ایزوکسازول-۳-ئیل) بوت-۲-اًن‌آمید (A1) .....	۳۵
۱-۵-۲- سنتز ۳-((۴-متیل بنزیل) آمینو)-N-(تیازول-۲-ئیل) بوت-۲-اًن‌آمید (A2) .....	۳۶
۱-۵-۳- سنتز N-((۶-متوکسی بنزوتیازول-۲-ئیل)-۳-((۴-متیل بنزیل) آمینو) بوت-۲-اًن‌آمید (A3) .....	۳۷
۱-۵-۴- سنتز N-((۴-متیل بنزوتیازول-۲-ئیل)-۳-((۴-متیل بنزیل) آمینو) بوت-۲-اًن‌آمید (A4) .....	۳۸
۱-۵-۵- سنتز N-((۶-متیل بنزوتیازول-۲-ئیل)-۳-((۴-متیل بنزیل) آمینو) بوت-۲-اًن‌آمید (A5) .....	۳۹
۱-۵-۶- سنتز N-((۴-بروموفنیل) تیازول-۲-ئیل)-۳-((۴-متیل بنزیل) آمینو) بوت-۲-اًن‌آمید (A6) .....	۴۰
۱-۵-۷- سنتز ۳-((۴-متیل بنزیل) آمینو)-N-فنیل بوت-۲-اًن‌آمید (A7) .....	۴۱
۱-۶- سنتز ترکیبات هتروسیکل دی‌هیدروپیریمیدین .....	۴۲

۴۲	- سنتر ۶-متیل-۴-دیفنیل-۲-تیوکسو-۱،۳،۲-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسامید (B1)
۴۲	- سنتر ۶-متیل-۴-فنیل-۲-تیازول-۲-ئیل)-۲-تیوکسو-۱،۳،۲-تتراهیدروپیریمیدین-۵-
۴۳	کربوکسامید (B2)
۴۴	- کشت سلولی و تست‌های بیولوژیک
۴۵	- روش‌های استریلیزاسیون
۴۶	- استریلیزاسیون شیشه آلات
۴۶	- استریلیزاسیون وسایل پلاستیکی
۴۷	- استریلیزاسیون محلول‌ها
۴۷	- استریلیزاسیون آب
۴۸	- تهیه محلول‌ها و بافرهای لازم
۴۸	- محیط کشت
۴۹	- محلول شست و شو
۵۰	- محلول تریپسین
۵۱	- محلول تریپان بلو
۵۲	- محلول فریز
۵۲	- کشت سلول‌های سرطانی
۵۳	- خارج کردن سلول‌ها از فریز
۵۴	- ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌ها
۵۵	- رشد دادن سلول‌های سرطانی
۵۶	- پاساز دادن سلول‌های سرطانی
۵۷	- فریز کردن سلول‌ها
۵۸	- بررسی سمیت سلولی به روش MTT
۵۸	- کشت سلول‌های سرطانی درون پلیت
۵۸	- اضافه کردن ترکیبات سنتر شده برای ارزیابی سمیت سلولی
۵۹	- ریختن MTT و ارزیابی سمیت سلولی
۶۰	فصل ۳: نتایج و بحث
۶۱	- سنتر ترکیبات ان‌آمینو‌آمید خطی و حلقوی
۶۱	- سنتر ترکیبات حد واسط N-آریل-۳-اکسوبوتان‌آمید
۶۲	- مکانیسم سنتر ترکیبات حد واسط N-آریل-۳-اکسوبوتان‌آمید

۶۳.....	۳-۱-۲- سنتز ترکیبات این آمینوآمید خطی
۶۴.....	۳-۱-۲-۲- مکانیسم سنتز ترکیبات N-آریل-۳-(۴-متیل بنزیل) آمینو) بوت-۲- این آمید (این آمینوآمید خطی)
۶۵.....	۳-۱-۳- سنتز ترکیبات این آمینوآمید حلقوی (دیهیدروپیریمیدین)
۶۷.....	۳-۱-۳-۲- مکانیسم سنتز ترکیبات ۶-متیل-N-۴،۳،۲،۱-فنیل-۴-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسامید (ان آمینوآمید حلقوی)
۶۹.....	۳-۲- شناسایی و تایید ساختار ترکیبات سنتز شده توسط طیفهای اسپکتروسکوپی
۶۹.....	۳-۲-۱- طیفسنجی مادون قرمز (FT-IR)
۷۰.....	۳-۲-۲- طیفسنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون ( $^1\text{H}$ NMR)
۷۴.....	۳-۲-۳- طیفسنجی جرمی (MS)
۷۵.....	۳-۳- مشخصات فیزیکوشیمیایی ترکیبات دیهیدروپیریمیدین و این آمینوآمید سنتز شده
۸۰.....	۳-۴- نتایج ارزیابی‌های زیستی
۸۱.....	۳-۵- بررسی و مقایسه رابطه ساختار و اثربخشی زیستی
۸۳.....	۳-۶- همبستگی نتایج تست سمیت سلولی و پارامترهای فیزیکوشیمیایی
۸۹.....	فصل ۴: نتیجه‌گیری و پیشنهادات
۹۰.....	۴-۱- نتیجه‌گیری
۹۱.....	۴-۲- پیشنهادات
۹۱.....	منابع
۹۵.....	پیوست‌ها
۹۶.....	پیوست الف
۱۰۵.....	پیوست ب
۱۱۴.....	پیوست ج
۱۱۹.....	چکیده انگلیسی

## فهرست جداول‌ها

جدول ۱-۱ میزان ابتلا به سرطان و مرگ و میر ناشی از آن نسبت به جمعیت هر قاره.....	۶
جدول ۱-۲ رژیم‌های شیمی درمانی استفاده شده علیه سرطان معده.....	۱۳
جدول ۱-۳ دسته‌های دارویی مختلف که در شیمی درمانی سرطان سینه استفاده می‌شوند.....	۱۴
جدول ۱-۴ ویژگی‌های مولکولی و شیمیابی ترکیبات دی‌هیدروپیریمیدین .....	۲۱
جدول ۲-۱ مواد شیمیابی استفاده شده در بخش سنتز .....	۳۰
جدول ۲-۲ مواد شیمیابی استفاده شده در بخش ارزیابی سمیت سلولی .....	۳۱
جدول ۲-۳ وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌های استفاده شده .....	۳۲
جدول ۲-۴ مواد و لوازم مصرفی.....	۳۳
جدول ۲-۵ نرم افزارهای استفاده شده .....	۳۴
جدول ۲-۶ نحوه تهییه محلول PBS .....	۵۰
جدول ۲-۷ مواد مورد نیاز برای تهییه محلول تریپیسین-EDTA .....	۵۱
جدول ۲-۸ نحوه تهییه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول تریپیان بلو .....	۵۲
جدول ۳-۱ مقایسه فاکتورهای فیزیکوشیمیابی ترکیبات سنتز شده .....	۷۷
جدول ۳-۲ نتایج تست سمیت سلولی بر روی سلول‌های رده سرطانی AGS و MCF-7 .....	۸۰

## فهرست نمودارها و عکس‌ها

شکل ۱-۱ شیوع انواع سرطان در کشورهای مختلف جهان به تفکیک جنسیت.....	۸
شکل ۲-۱ ساختار بازهای پورینی و پیریمیدینی .....	۱۷
شکل ۳-۱ دو داروی آنتی‌متاپولیت با ساختار پیریمیدینی .....	۱۸
شکل ۴-۱ چند ترکیب پیریمیدینی با اثر ضد سرطان.....	۱۹
شکل ۵-۱ ساختار شیمیایی إن‌آمینو‌آمید و دی‌هیدروپیریمیدین .....	۲۰
شکل ۶-۱ مراحل سنتز ترکیبات إن‌آمینو‌آمید خطی به وسیله آمین آروماتیک و دی‌أکسین .....	۲۳
شکل ۷-۱ ساختار شیمیایی داروی داپوکستین.....	۲۴
شکل ۸-۱ ترکیبات شیمیایی به کار رفته علیه سرطان معده و کولون .....	۲۵
شکل ۹-۱ ترکیبات دارویی استفاده شده در بیماری‌های مختلف با ساختار دی‌هیدروپیریمیدینی.....	۲۷
شکل ۱۰-۱ مراحل انجام پایان نامه از شروع تا پایان .....	۲۸
شکل ۱۱-۱ نمونه‌ای از آلدگی میکروبی در کشت سلولی .....	۴۶
شکل ۱۲-۲ ست فیلتراسیون .....	۴۷
شکل ۱۳-۲ طیف تغییر رنگ فنول رد در PH های مختلف .....	۴۹
شکل ۱۴-۲ نمایش سلول‌های مرده و زنده توسط رنگ آمیزی تریپان بلو .....	۵۲
شکل ۱۵-۲ لام نئوبار (هموسیتومتر) و نواحی مشبك مخصوص شمارش سلول .....	۵۴
شکل ۱۶-۲ نمودار رشد سلول‌های سرطانی در طول زمان .....	۵۶
شکل ۱۷-۲ تست MTT در پلیت ۹۶ خانه .....	۵۹
شکل ۱۸-۳ مکانیسم سنتز ترکیبات حد وسط N-آریل-۳-اکسوبوتان‌آمید .....	۶۳
شکل ۱۹-۳ مراحل سنتز ترکیبات إن‌آمینو‌آمید خطی توسط آمین آروماتیک و دی‌أکسین .....	۶۴
شکل ۲۰-۳ مکانیسم سنتز ترکیبات إن‌آمینو‌آمید خطی .....	۶۵
شکل ۲۱-۳ هسته اصلی ترکیبات إن‌آمینو‌آمید حلقوی (دی‌هیدروپیریمیدین) .....	۶۶
شکل ۲۲-۳ مراحل سنتز ترکیبات دی‌هیدروپیریمیدین توسط ترکیبات N-آریل-۳-اکسوبوتان‌آمید و آلدهید .....	۶۷

..... شکل ۶-۳ مکانیسم سنتز ترکیبات این‌آمینوآمید حلقوی (دی‌هیدروپیریمیدین)	۶۸
..... شکل ۷-۳ طیف مادون قرمز ترکیب B1	۷۰
..... شکل ۸-۳ طیف $^1\text{H}$ NMR ترکیب B1	۷۳
..... شکل ۹-۳ طیف MS ترکیب B1	۷۴
..... شکل ۱۰-۳ یون-رادیکال‌های تشکیل شده در طیف‌سنجدی MS	۷۵
..... شکل ۱۱-۳ بازه جرم مولکولی ترکیبات سنتز شده	۷۸
..... شکل ۱۲-۳ بازه CLOGP ترکیبات سنتز شده	۷۹
..... شکل ۱۳-۳ تعداد پیوندهای هیدروژنی دهنده، گیرنده و قابل چرخش ترکیبات سنتز شده	۷۹
..... شکل ۱۴-۳ مقایسه اثر سمیت سلولی ترکیبات سنتز شده در رده‌های AGS و MCF-7	۸۱
..... شکل ۱۵-۳ رابطه ساختار-اثر ترکیبات سنتز شده	۸۳
..... شکل ۱۶-۳ همبستگی جرم مولکولی و غلظت موثر در رده سلولی AGS	۸۴
..... شکل ۱۷-۳ همبستگی CLOGP و غلظت موثر در رده سلولی AGS	۸۴
..... شکل ۱۸-۳ همبستگی تعداد پیوندهای هیدروژنی گیرنده و غلظت موثر در رده سلولی AGS	۸۵
..... شکل ۱۹-۳ همبستگی تعداد پیوندهای هیدروژنی دهنده و غلظت موثر در رده سلولی AGS	۸۵
..... شکل ۲۰-۳ همبستگی تعداد پیوندهای قابل چرخش و غلظت موثر در رده سلولی AGS	۸۶
..... شکل ۲۱-۳ همبستگی جرم مولکولی و غلظت موثر در رده سلولی MCF-7	۸۶
..... شکل ۲۲-۳ همبستگی CLOGP و غلظت موثر در رده سلولی MCF-7	۸۷
..... شکل ۲۳-۳ همبستگی تعداد پیوندهای هیدروژنی گیرنده و غلظت موثر در رده سلولی MCF-7	۸۷
..... شکل ۲۴-۳ همبستگی تعداد پیوندهای هیدروژنی دهنده و غلظت موثر در رده سلولی MCF-7	۸۸
..... شکل ۲۵-۳ همبستگی تعداد پیوندهای قابل چرخش و غلظت موثر در رده سلولی MCF-7	۸۸

## فهرست علائم، نشانه‌ها و اختصارات

**MTT:** 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

**EDTA:** Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid

**IC<sub>50</sub>:** Inhibitory Concentration 50%

**PBS:** Phosphate Bufferd Saline

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**DMSO:** Dimethyl Sulfoxide

**TLC:** Thin Layer Chromatography

**SAR:** Structure-Activity Relationship

**SERM:** Selective Estrogen Receptor Modulator

**SSRI:** Selective Serotonin Reuptake Inhibitor

**DDP-4:** Dipeptidyl Peptidase-4

**HNPPCC:** Heredity Nonpolyposis Colorectal Cancer

**HER2:** Human Epidermal growth factor Receptor 2

**BRCA1:** Brest Cancer 1 Gene

**BRCA2:** Brest Cancer 2 Gene

**CCR5:** CC Chemokine Receptor 5

**TP53:** Tumor Protein 53

**WHO:** World Health Organization

**ASIR:** Age Specific Incidence Rate

**HBA:** Hydrogen Bond Acceptor

**HBD:** Hydrogen Bond Donor

**RTB:** Rotatable Bonds