

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترا در داروسازی

عنوان

سنترز و ارزیابی خاصیت ضد لیشمانیایی مشتقات جدید N -هترو آریل - ۳ - (پارا-متوکسی

بنزیل) آمینو بوت- این آمید و دی هیدرو پیریمیدینون

اساتید راهنما

دکتر نیما رزاقی اصل

دکتر بهنام محمدی قلعه بین

نگارنده: سیما نجفی

بهمن ۱۳۹۸

شماره پایان نامه

۹۸/۱۱ - ۲۷۵

سپاس خدای عزوجل که عالم هستی از اوست.
سپاس خدا را به خاطر نعمت بی کرانش، نعمتی به خاطر خدا بودنش
و وجود پدر و مادری که دعای خیر پدر آسمانی و مادر عزیزم
همیشه و در همه حال پشتوانه بنده بوده و هست و بی دعای مادر
یعنی هیچ. سپاس خدا را به خاطر نعمت خانواده عزیزم و برادران
دلسوزم که در تمامی مراحل حمایت نمودند. این پایان نامه را
تقدیم می نمایم به پدر آسمانی خود و همراه با بوسه بردستان پر
مهر بهترین مادر دنیا و برادران دلسوزم و همه عزیزانم که در تمام
مراحل این راه پرفراز و نشیب و در تمام خوشی ها و سختی های
راه در کنارم بودند و قوت قلبی برای ادامه راهم.

تشکر و سپاس از تمامی استاتید گرانقدر بویژه آقای دکتر نیما رزاقی که از ابتدای طول تحصیل تا پایان این دوره از تحصیل همواره در تمامی مراحل بویژه در انجام پایان نامه راهنمای بنده بودند و تشکر از آقای دکتر بهنام محمدی قلعه بین که در طول این پایان نامه قبول زحمت فرمودند تا با حمایت های ایشان این پایان نامه به سرانجام رسد.

چکیده

مقدمه و هدف:

لیشمانیوز در مناطق وسیعی از دنیا دارای شیوع بالایی می باشد، به طوری که در بیش از ۹۸ کشور این بیماری شیوع دارد. طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی شیوع سالانه این بیماری ۲ میلیون نفر می باشد. هیچ گونه واکسنی برای این بیماری وجود ندارد و داروهای موثر کمی در ارتباط با درمان این بیماری وجود دارد. مقاومت دارویی به این بیماری در حال افزایش می باشد. براساس تظاهرات بالینی بیماری لیشمانیوز را به سه دسته کلی تقسیم بندی می کنند که عبارتند از: لیشمانیوز احشایی، لیشمانیوز جلدی و لیشمانیوز مخاطی. ایران جز مناطق اندمیک لیشمانیا می باشد. در طی دهه گذشته مطالعات برون تنی و درون تنی زیادی راجع به مشتقات دی هیدروپیریمیدینی و تعدادی از ترکیبات n - هتروآریل انجام شده است که اثرات آنتی لیشمانیوز برخی از مشتقات ساختاری این ترکیبات به اثبات رسیده است.

مواد و روش‌ها:

ترکیبات حد واسط خطی با استفاده از ترکیبات آمینی نوع اول آروماتیکی به همراه دی اکسین و زایلن تحت رفلکس تهیه شدند. بعد از ساخت ترکیبات حد واسط (بتا-کتو امیدها)، مشتقات نهایی با استفاده از ۴- متوکسی بنزیل آمین و ایزوپروپیل الکل سنتز گردیدند. مکانیسم سنتز عبارت است از واکنش دیلز-آلدر برگشتی در حلقه دی اکسین. جهت سنتز ترکیبات حلقوی نیز، ترکیبات حدواسط حاصل از روش قبلی به همراه اوره، ۴- فلوئورو بنزالدئید، HCl و اتانول یا ترکیبات فنیل استواستامید به همراه تیواوره، ۳-فلوئورو (یا کلرو) بنزالدئید، کبالت هیدروژن سولفات به عنوان کاتالیزور و اتانول وارد واکنش بیجینی شده و ترکیبات نهایی سنتز گردیدند. خالص سازی و شناسایی ساختاری ترکیبات سنتز شده با استفاده از روش های TLC، تعیین نقطه ذوب، طیف سنجی مادون قرمز (IR)، جرمی (MS) و رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (H-NMR) انجام گردید. در ادامه به روش ارزیابی سمیت سلولی با احیای نمک تiazول (MTT) بر روی انگل های پروماستیگوت لیشمانیا مازور ارزیابی شدند.

یافته‌ها:

با توجه به نتایج به دست آمده از تست های شناسایی NMR، IR و MS تمامی ساختارهای سنتز شده تایید شدند. بررسی اثرات ضد لیشمانیایی بر روی گونه های لیشمانیا مازور انجام شد و نتایج نشان دادند که ترکیب A10 (۴-۳- کلروفنیل)-۶-متیل-N-فنیل-۲-تیوکسو-۱ و ۲ و ۳ و ۴-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسامید با IC_{50} ۵۲/۶۷ میکروگرم در میلی لیتر دارای بهترین اثر ضد لیشمانیایی می باشد (بیش از داروی استاندارد گلوکانتیم با IC_{50} ۷۱/۰۱ میکروگرم در میلی لیتر).

بحث و نتیجه گیری:

براساس نتایج بدست آمده ترکیبات حلقوی با هسته ۶-متیل ۳،۴-دی هیدروپیریمیدین-۲-تیون حاوی استخلاف -N فنیل کربوکسامید نسبت به سایر ترکیبات حلقوی دی هیدروپیریمیدین-۲-اون حاوی استخلاف -N بنزیل کربوکسامید و همچنین مشتقات این آمینو آمیدی خطی مشابه اثر ضد لیشمانیایی بهتری از خود نشان دادند. نکات مهم در افزایش قابل توجه اثر ضد لیشمانیوز ترکیبات فوق را می توان (۱) به وجود اتم گوگرد لیپوفیل تر در مقایسه با اکسیژن در موقعیت ۲ حلقه اصلی و (۲) وجود گروه -N فنیل کربوکسامید به جای حلقه -N بنزیل کربوکسامید در موقعیت ۴ حلقه اصلی نسبت داد. همچنین، بررسی رابطه ساختار و اثر بیولوژیکی نشان داد که حلقه ایزوکسازول و بنزوتiazول متصل شده به آمین هسته اصلی ترکیبات خطی در مقایسه با تiazول خاصیت ضد لیشمانیایی بهتری از خود نشان می دهد.

کلمات کلیدی:

لیشمانیوز، این آمینو آمید، دی هیدروپیریمیدینون، MTT

فهرست مطالب

۱	فصل اول
۱-۱	بیماری های عفونی
۲-۱	بیماری های انگلی
۳-۱	لیشمانیوز
۱-۳-۱	اپیدمیولوژی بیماری لیشمانیوز در ایران
۲-۳-۱	چرخه زندگی انگل لیشمانیا
۳-۳-۱	حامل انگل (پشه خاکی)
۴-۱	لیشمانیوز جلدی
۱-۴-۱	تظاهرات بالینی لیشمانیوز جلدی
۲-۴-۱	تشخیص لیشمانیوز جلدی
۱-۲-۴-۱	روش های تشخیص
۲-۲-۴-۱	ابزار تشخیصی
۳-۲-۴-۱	سایر روش های تشخیصی
۳-۴-۱	درمان
۱-۳-۴-۱	درمان های موضعی
۲-۳-۴-۱	درمان سیستمیک خوراکی
۳-۳-۴-۱	درمان سیستمیک تزریقی
۴-۳-۴-۱	پیگیری درمان
۴-۴-۱	لیشمانیوز مخاطی
۱-۴-۴-۱	پیگیری درمان
۲-۴-۴-۱	کنترل بیماری
۵-۴-۱	لیشمانیوز احشایی
۱-۵-۴-۱	پاتوفیزیولوژی
۲-۵-۴-۱	علائم بالینی
۳-۵-۴-۱	یافته های آزمایشگاهی
۴-۵-۴-۱	تشخیص
۵-۵-۴-۱	درمان
۵-۱	مقاومت دارویی انگل لیشمانیا
۶-۱	سابقه انجام طرح و بررسی متون
۷-۱	اهمیت موضوع
۸-۱	اهداف پایان نامه
۹-۱	فرضیات یا سؤالات تحقیق
۴۵	فصل دوم: مواد، دستگاه ها و روش ها
۱-۲	دستگاه ها و تجهیزات بکار رفته در سنتز

- ۲-۲. حلال ها و ترکیبات مصرفی..... ۴۷
- ۲-۳. روش سنتز ترکیبات جدید با خاصیت ضد لیشمانیایی..... ۴۸
- ۲-۳-۱. روش سنتز ترکیبات خطی..... ۴۸
- ۲-۳-۱-۱. روش سنتز ترکیب N -(۶-متوکسی بنزوتیازول-۲-یل)-۳-اکسوبوتان آمید (حدواسط B1) ... ۴۹
- ۲-۳-۱-۲. روش سنتز ترکیب N -۳-(۴-متوکسی بنزیل آمینو)- N -(۶-متوکسی بنزوتیازول-۲-یل) بوت-۲-ان آمید (A1)..... ۵۰
- ۲-۳-۱-۳. روش سنتز N -(۶-متیل بنزوتیازول-۲-یل)-۳-اکسوبوتان آمید (حدواسط B2)..... ۵۱
- ۲-۳-۱-۴. روش سنتز ترکیب N -(۴-متوکسی بنزیل آمینو)- N -(۶-متیل بنزوتیازول-۲-یل) بوت-۲-ان آمید (A2)..... ۵۲
- ۲-۳-۱-۵. روش سنتز ترکیب N -(بنزوتیازول-۲-یل)-۳-اکسوبوتان آمید (حدواسط B3)..... ۵۳
- ۲-۳-۱-۶. روش سنتز ترکیب N -(۴-متوکسی بنزیل آمینو) N -(۲,۳-دی هیدروبنزو تیازول-۲-یل) بوت-۲-ان آمید (A3)..... ۵۴
- ۲-۳-۱-۷. روش سنتز ترکیب N -۳-اکسو- N -(تیازول-۲-یل) بوتان آمید (حدواسط B4)..... ۵۵
- ۲-۳-۱-۸. روش سنتز ترکیب N -(۴-متوکسی بنزیل آمین) N -(تیازول-۲-یل) بوت-۲-ان آمید (A4)..... ۵۶
- ۲-۳-۱-۹. روش سنتز ترکیب N -(۴-متیل بنزوتیازول-۲-یل)-۳-اکسوبوتان آمید (حدواسط B5)..... ۵۷
- ۲-۳-۱-۱۰. روش سنتز ترکیب N -(۴-متوکسی بنزیل آمینو) N -(۴-متیل بنزوتیازول-۲-یل) بوت-۲-ان آمید (A5)..... ۵۸
- ۲-۳-۱-۱۱. روش سنتز ترکیب N -(۵-متیل اکسازول-۳-یل)-۳-اکسو بوتان آمید (حدواسط B6)..... ۵۹
- ۲-۳-۱-۱۲. روش سنتز ترکیب N -(۴-متوکسی بنزیل آمینو) N -(۵-متیل اکسازول-۲-یل) بوت-۲-ان آمید (A6)..... ۶۰
- ۲-۳-۲. روش سنتز ترکیبات حلقوی..... ۶۱
- ۲-۳-۱-۱. روش سنتز ترکیب N -(۴-فلوئوروفنیل) N -(۶-متوکسی بنزوتیازول-۲-یل) -۶-متیل -۲-اکسو-۱ و ۲ و ۳ و ۴-تترا هیدرو پیریمیدین-۵-کربوکسامید (A7)..... ۶۱
- ۲-۳-۲. روش سنتز ترکیب N -(۴-فلوئوروفنیل)-۶-متیل N -(۶-متیل بنزوتیازول-۲-یل)-۲-اکسو-۱ و ۲ و ۳ و ۴-تترا هیدرو پیریمیدین-۵-کربوکسامید (A8)..... ۶۳
- ۲-۳-۳. روش سنتز ترکیب N -(بنزوتیازول-۲-یل)-۴-(۴-فلوئوروفنیل)-۶-متیل-۲-اکسو-۱ و ۲ و ۳ و ۴-تترا هیدرو پیریمیدین-۵-کربوکسامید (A9)..... ۶۵
- ۲-۳-۴. روش سنتز ترکیب N -(۳-کلروفنیل)-۶-متیل N -فنیل -۲-تیوکسو-۱ و ۲ و ۳ و ۴-تترا هیدرو پیریمیدین-۵-کربوکسامید (A10)..... ۶۷
- ۲-۳-۵. روش سنتز ترکیب N -(۳-فلوئوروفنیل)-۶-متیل N -فنیل -۲-تیوکسو-۱ و ۲ و ۳ و ۴-تترا هیدرو پیریمیدین-۵-کربوکسامید (A11)..... ۶۹
- ۲-۴. شناسایی ترکیبات سنتز شده..... ۷۱
- ۲-۵. بررسی اثرات بیولوژیک ترکیبات سنتز شده..... ۷۱
- ۲-۵-۱. روش تهیه محلول های مورد استفاده در بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیبات سنتز شده..... ۷۳
- ۲-۵-۲. روش کار..... ۷۳

۷۳کشت انگل. ۱-۲-۵-۲
۷۴آماده سازی محلول های ترکیبات سنتز شده. ۲-۲-۵-۲
۷۵کشت سلولی. ۳-۲-۵-۲
۷۶سنجش MTT. ۴-۲-۵-۲
۷۷نرم افزارها. ۶-۲
۷۷ملاحظات اخلاقی. ۷-۲
۷۸فصل سوم: نتایج و بحث.....
۷۹۱-۳. سنتز ترکیبات جدید خطی و حلقوی
۷۹۱-۱-۳. ترکیبات خطی.....
۸۰۲-۱-۳. ترکیبات حلقوی.....
۸۳۲-۳. شناسایی و تایید ساختار ترکیبات سنتز شده توسط روش های اسپکتروسکوپی.....
۸۳۱-۲-۳. تست TLC.....
۸۳۲-۲-۳. طیف سنجی مادون قرمز (IR).....
۸۴۳-۲-۳. طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (H-NMR).....
۸۵۴-۲-۳. طیف سنجی جرمی (GC-MS).....
۸۸۳-۳. مشخصات فیزیکوشیمیایی ترکیبات خطی و حلقوی سنتز شده.....
۹۲۴-۳. نتایج بررسی بیولوژیک ترکیبات سنتز شده.....
۱۰۱۵-۳. بررسی رابطه ساختار- اثر (SAR).....
۱۰۴۶-۳. همبستگی اثرات ضد لیشمانیایی و پارامترهای فیزیکوشیمیایی.....
۱۰۷فصل چهارم: نتیجه گیری و پیشنهادات.....
۱۰۸۱-۴. نتیجه گیری.....
۱۱۰۲-۴. پیشنهادات.....
۱۱۱منابع.....

فهرست جدول ها

جدول ۱-۱ ویژگی های سه گونه لیشمانیا.....	۴
جدول ۲-۱ ژن های دخیل در مقاومت دارویی	۳۶
جدول ۱-۲ دستگاه های مورد استفاده جهت سنتز ترکیبات جدید.....	۴۶
جدول ۲-۲ حلال های مورد استفاده جهت سنتز ترکیبات جدید.....	۴۷
جدول ۳-۲ ترکیبات مورد استفاده جهت سنتز ترکیبات جدید.....	۴۷
جدول ۴-۲ دستگاه های مورد استفاده در شناسایی ترکیبات جدید.....	۷۱
جدول ۵-۲ ترکیبات مورد استفاده در بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیبات جدید.....	۷۱
جدول ۶-۲ وسایل مورد استفاده در بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیبات جدید.....	۷۲
جدول ۷-۲ دستگاه های مورد استفاده در بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیبات جدید.....	۷۲
جدول ۸-۲ غلظت های مختلف محلول های ترکیبات سنتز شده بر حسب میکروگرم در میلی لیتر	۷۵
جدول ۹-۲ نرم افزارهای کاربردی در پایان نامه.....	۷۷
جدول ۱-۳ خصوصیات فیزیکی شیمیایی ترکیبات جدید.....	۸۸
جدول ۲-۳ نتایج اثرات ضد لیشمانیایی بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور برای ترکیبات سنتز شده بر حسب IC50.....	۹۳

فهرست شکل ها

- شکل ۱-۱ توزیع جغرافیایی لیثمانیوز جلدی در ایران..... ۵
- شکل ۲-۱ توزیع جغرافیایی لیثمانیوز احشایی در ایران..... ۶
- شکل ۳-۱ فرم پروماستیگوت و آماستیگوت انگل لیثمانیا..... ۷
- شکل ۴-۱ بیماری لیثمانیوز جلدی..... ۱۰
- شکل ۵-۱ ساختار داروی سدیم استیو گلوکونات..... ۲۰
- شکل ۶-۱ ساختار داروی پارامومایسین..... ۲۱
- شکل ۷-۱ ساختار داروی کتوکونازول..... ۲۲
- شکل ۸-۱ ساختار داروی میلترفوسین..... ۲۲
- شکل ۹-۱ ساختار داروی آمفوتریسین B..... ۲۵
- شکل ۱۰-۱ ساختار داروی پنتامیدین..... ۲۶
- شکل ۱۱-۱ مکانیسم فعال شدن $sb(v)$ و مقاومت دارویی..... ۳۵
- شکل ۱۲-۱ ساختار آنالوگ دی هیدروپیریمیدینی (DHPM)..... ۴۰
- شکل ۱۳-۱ ساختار ۱، ۲، ۳ و ۴ تتراهیدروپیریمیدین-۵- کربوکسامید و کربوهیدرازید..... ۴۱
- شکل ۱۴-۱ مشتقات دی هیدروپیریمیدینی سنتز شده از کربوکسامید و تتراهیدروپیریمیدین..... ۴۲
- شکل ۱-۳ نمای کلی سنتز ترکیبات خطی..... ۷۹
- شکل ۲-۳ مکانیسم سنتز ترکیبات خطی..... ۸۰
- شکل ۳-۳ واکنش بیجینیلی..... ۸۱
- شکل ۴-۳ نمای کلی سنتز ترکیبات حلقوی..... ۸۱
- شکل ۵-۳ مکانیسم سنتز ترکیبات حلقوی..... ۸۲
- شکل ۶-۳ طیف سنجی IR ترکیب A7..... ۸۴
- شکل ۷-۳ طیف سنجی NMR ترکیب A7..... ۸۵
- شکل ۸-۳ طیف سنجی جرمی ترکیب A7..... ۸۶
- شکل ۹-۳ یون های تشکیل شده در طیف سنجی جرمی A7..... ۸۷
- شکل ۱۰-۳ SAR ترکیبات خطی و حلقوی..... ۱۰۳

فهرست نمودارها

- نمودار ۳-۱ جرم مولکولی ترکیبات جدید..... ۹۰
- نمودار ۳-۲ ClogP ترکیبات جدید..... ۹۰
- نمودار ۳-۳ تعداد باند های هیدروژن دهنده ترکیبات جدید..... ۹۱
- نمودار ۳-۴ تعداد باند های هیدروژن پذیرنده ترکیبات جدید..... ۹۱
- نمودار ۳-۵ نقطه ذوب ترکیبات جدید..... ۹۲
- نمودار ۳-۶ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A1..... ۹۴
- نمودار ۳-۷ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A2..... ۹۴
- نمودار ۳-۸ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A3..... ۹۵
- نمودار ۳-۹ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A4..... ۹۵
- نمودار ۳-۱۰ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A5..... ۹۶
- نمودار ۳-۱۱ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A6..... ۹۶
- نمودار ۳-۱۲ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A7..... ۹۷
- نمودار ۳-۱۳ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A8..... ۹۷
- نمودار ۳-۱۴ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A9..... ۹۸
- نمودار ۳-۱۵ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A10..... ۹۸
- نمودار ۳-۱۶ نتیجه اثر ضد لیشمانیایی ترکیب A11..... ۹۹
- نمودار ۳-۱۷ IC₅₀ (مهارکنندگی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور) ترکیبات جدید سنتز شده..... ۹۹
- نمودار ۳-۱۸ رابطه اثر ضد لیشمانیایی بر حسب IC₅₀ و HBD در دی هیدروپیریمیدین های سنتز شده HBD..... ۱۰۴
- نمودار ۳-۱۹ رابطه اثر ضد لیشمانیایی بر حسب IC₅₀ و HBA در دی هیدروپیریمیدین های سنتز شده..... ۱۰۵
- نمودار ۳-۲۰ رابطه اثر ضد لیشمانیایی بر حسب IC₅₀ و جرم مولکولی در دی هیدروپیریمیدین های سنتز شده..... ۱۰۵
- نمودار ۳-۲۱ رابطه اثر ضد لیشمانیایی بر حسب IC₅₀ و لیوفیلیسیته در دی هیدروپیریمیدین های سنتز شده..... ۱۰۶

فهرست علائم، نشانه‌ها و اختصارات

WHO: World Health Organization

FDA: Food and drug administration

CL: Cutaneous Leishmaniasis

ML: mucosal Leishmaniasis

LR: Leishmaniasis recidivans

LCL: localized Cutaneous Leishmaniasis

DCL: diffuse Cutaneous Leishmaniasis

VL: Visceral leishmaniasis

NNN: Novy, MacNeal, Nicolle

MDR: Multi drug resistance

PTR: Pteridine reductase

DHFR: Dihydrofolat reductaz

IC₅₀: Inhibitory Concentration 50%

ED₅₀: Effective dose 50%

PBS: Phosphate Bufferd Saline

FBS: Fetal Bovine Serum

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

TLC: Thin Layer Chromatography

R_f: Retardation Factor

SAR: Structure-Activity Relationship

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

UV: ultraviolet

IR: Infrared spectroscopy

NMR: Nuclear magnetic resonance