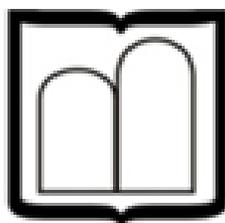


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه رساله ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

سنتز مشتقات جدید ۲-آمینوتیازولی ۳ و ۴-دی هیدروپیریمیدینون و بررسی
اثر آن ها بر مهاجرت سلول های AGS

اساتید راهنما:

دکتر نیما رزاقی اصل

دکتر محسن سقا

نگارش:

مهتاب صلاحی

شماره پایان نامه:

۱۴۰۰/۰۱/۲۶ ۷۴-د

فروردین ۱۴۰۰

تقدیم به

هر آن که در این راه سخت سنگی برداشت و دستم گرفت و با وجود آن ها هنوز به فردا امیدی هست پدر عزیز تر از جانم، مادر فداکارم، همسر مهربانم، و استاد خوبم که هر چه داشتند از من دریغ نکردند.

از زحمات اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر رزاقی اصل و جناب آقای دکتر سقا هزاران سپاس تقدیم شما زبان قاصر از توصیف
لطفتان و توصیف بزرگواری تان ممنون از صبر بی پایان تان در برابر ضعف های من و تلاش از صمیم دلتان برای پرواز من.

چکیده فارسی

مقدمه و هدف: سرطان، بیماری است که در آن سلول های غیر طبیعی به صورت کنترل نشده تکثیر یافته و می توانند بافت های مجاور را درگیر کنند. بیش از ۲۰۰ نوع متفاوت از بیماری های سرطان وجود دارد که هرکدام به شیوه های خاص خود ایجاد می شوند. سرطان معده پنجمین سرطان شایع در جهان است و از نظر تعداد مرگ و میر رتبه سوم را داراست. در ایران نیز بیشترین شیوع سرطان معده در شمال و شمال غرب ایران گزارش شده است. متاستاز سرطان های با منشأ بافت اپیتلیال که سرطان معده هم جز این دسته محسوب می گردد، رایج ترین دلیل مرگ بیماران سرطانی است. جلوگیری از روند مهاجرت سلولی که می تواند مانعی برای ایجاد متاستاز باشد، در تسریع و بهبود روند درمان این گونه سرطان ها می تواند بسیار موثر باشد.

مواد و روش ها: در این پروژه، تعدادی از مشتقات جدید ۲- آمینوتیازولی ۳ و ۴-دی هیدروپیریمیدینون سنتز گردید و پس از خلص سازی، شناسایی و تأیید ساختاری با استفاده از روش های IR، H-NMR، MS، از نظر خاصیت سایتوتوکسیک بر روی رده ی سلولی AGS مطالعه صورت گرفت. در مرحله بعد با روش Wound-healing خاصیت مهارکنندگی مهاجرت سلولی ترکیبات سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات داکینگ مولکولی بر روی آنزیم کینزین ۵ (Eg5) با استفاده از نرم افزار اتوداک ۴.۲ و آنالیز کیفی و کمی برهمکنش های لیگاند-گیرنده نیز توسط سرور محاسباتی PLIP انجام گرفت.

یافته ها: ترکیب M₂ از کم ترین IC₅₀ بر روی سلول های سرطانی AGS نسبت به ترکیبات دیگر برخوردار است و در دوز پایین تری باعث ایجاد سمیت سلولی می شود. با بررسی اثر ترکیبات سنتزی M₁، M₂ و M₃ بر مهاجرت سلولی مشاهده شد که این ترکیبات به ویژه ترکیب M₂ باعث القای مهاجرت سلولی شدند و مهاجرت در آن ها بیشتر از سلول های AGS تیمار نشده طبیعی بود. مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که اینانٹیومر S ترکیبات دی هیدروپیریمیدینونی قدرت اتصال نسبتاً بالاتری به آنزیم Eg5 از خود نشان دهند که این مسئله در انطباق با نحوه اتصال موناسترول (مهارکننده استاندارد Eg5) با توجه به برخی منابع موجود، می باشد. در اتصال ترکیبات به Eg5 برهمکنش های هیدروفوبی و پیوندهای هیدروژنی اهمیت دارند و اسید آمینه Glu116 با گروه NH آمیدی متصل به تیازول در ترکیبات R-1 و S-3 پیوند هیدروژنی برقرار نموده است. اسید آمینه مورد نظر یکی از اجزای کلیدی سایت اتصال آنزیم Eg5 در اتصال به ترکیبات مختلفی می باشد که به نوعی این آنزیم را تارگت می نمایند. مطالعات ساختار باندینگ نشان دهنده اهمیت وجود حلقه دی هیدروپیریمیدینون در ساختار ترکیبات هستند به نحوی که اتم های اکسیژن کربونیل حلقه در ترکیب S-3 و اتم هیدروژن در گروه N3H ترکیب R-1 به ترتیب در برقراری پیوند هیدروژنی با Glu117 و Trp127 مشارکت دارند.

بحث و نتیجه گیری: ترکیب M₁ با داشتن استخلاف فلئور در موقعیت ۴ حلقه فنیل بیشترین سمیت سلولی و از طرفی دارای بیشترین اثر القای مهاجرت سلولی را دارا می باشد که این اثر به نظر می رسد حاصل برهمکنش کوچک بودن اندازه استخلاف و قدرت الکترون کشندگی نسبتاً بالای فلئور می تواند باشد. بر اساس آنالیز نقشه های اتصال لیگاند-پروتئین، حلقه تیازول در ترکیبات M₁ تا M₃ نقش خاص و قابل مشاهده ای در برهمکنش با اسیدهای آمینه سایت اتصال Eg5 از خود نشان نداد و شاید این مسئله قابل بیان باشد که تبدیل حلقه تیازول به حلقه بنزوتیازول واجد استخلاف های هیدروفوبی، بر قدرت اتصال از طریق برقراری برهمکنش های مؤثر با اسیدهای آمینه های تشکیل دهنده پاکت هیدروفوبی مجاور افزوده شده و بدین ترتیب ترکیبات مورد نظر بتوانند اثر احتمالی مهار مهاجرت سلولی را از خود نشان دهند.

کلیدواژه ها: سرطان، متاستاز، دی هیدروپیریمیدینون، Wound-healing، AGS

فهرست مطالب

فصل ۱: مقدمه.....	۱
۱-۱- بیماری سرطان	۲
۱-۲- تاریخچه سرطان	۲
۱-۳- سرطان معده	۳
۱-۳-۱- اپیدمیولوژی سرطان معده	۳
۱-۳-۲- ریسک فاکتور های سرطان معده	۴
۱-۳-۳- پاتوژنز سرطان معده	۵
۱-۳-۴- پیشگیری از سرطان معده	۶
۱-۳-۵- درمان سرطان معده	۷
۱-۴- متاستاز	۱۱
۱-۴-۱- تهاجم	۱۱
۱-۴-۲- ورود به رگ های خونی	۱۲
۱-۴-۳- بقای سلول های توموری در جریان خون	۱۳
۱-۴-۴- توقف در محل بافت یا اندام ثانویه	۱۳
۱-۴-۵- خروج از خون به بافت پارانشیمی اندام هدف	۱۴
۱-۴-۶- تشکیل ریزمتاستاز	۱۵
۱-۴-۷- تشکیل کلونی متاستازی	۱۵
۱-۵- واکنشهای شیمیایی سنتزی چندجزئی	۱۶
۱-۶- دی هیدرو پیریمیدینونها	۱۷
۱-۶-۱- بررسی مشتقات دی هیدرو پیریمیدینونی با اثرات ضد سرطان	۱۸
فصل ۲: مواد، دستگاه ها و روش ها.....	۲۲
۲-۱- مواد و تجهیزات مصرفی	۲۳
۲-۱-۱- مواد و تجهیزات استفاده شده در بخش سنتز	۲۳
۲-۱-۲- تجهیزات، حلال ها و مواد شیمیایی استفاده شده در ارزیابی های زیستی	۲۴
۲-۲- دستگاه ها	۲۵
۲-۳- نرم افزارها	۲۶
۲-۴- سنتز مشتقات جدید ۲- آمینوتیازولی ۳ و ۴- دی هیدروپیریمیدینون	۲۷
۲-۴-۱- سنتز ۳- اکسو-ان- (تیازول-۲- ایل) بوتان آمید (حدواسط)	۲۷
۲-۴-۲- سنتز ۶- متیل- ۴- (۴- نیتروفنیل)- ۲- اکسو-ان- (تیازول-۲- ایل) ۱،۲،۳،۴- تتراهیدرو پیریمیدین-۵- کربوکسامید	۲۷
..... (M1)	۲۷

۲-۴-۳- سنترز ۴- (۴-فلوئورو فنیل)-۶-متیل ۱۲-اکسو-ان- (تیازول-۲- ایل) ۱,۲,۳,۴-تتراهیدرو پیریمیدین-۵-کربوکسامید	۲۹.....
(M2)	
۲-۴-۳- سنترز ۴- (۴-کلرو فنیل)-۶-متیل ۲-اکسو-ان- (تیازول-۲- ایل) ۱,۲,۳,۴-تتراهیدرو پیریمیدین-۵-کربوکسامید	۳۰.....
(M3)	
۲-۵- ارزیابی های زیستی	۳۱
۲-۵-۱- روش های استریلیزاسیون	۳۱.....
۲-۵-۲- محلول های استفاده شده در ارزیابی زیستی	۳۲.....
۲-۵-۳- کشت سلولی	۳۳.....
۲-۵-۴- بررسی سمیت سلولی به روش MTT	۳۶.....
۲-۵-۵- ارزیابی اثر مهارکنندگی مهاجرت سلولی به روش ترمیم زخم	۳۷.....
۲-۵-۶- بررسی های آماری	۳۷.....
۲-۶- داکینگ (مدل سازی مولکولی)	۳۸
۲-۶-۱- نرم افزار اتوداک	۳۸.....
فصل ۳: نتایج و بحث	۴۱
۳-۱- سنترز مشتقات ۳ و ۴- دی هیدرو پیریمیدینون و مکانیسم واکنش	۴۲
۳-۱-۱- سنترز حدواسط ۳-اکسو-ان- (تیازول-۲- ایل)- بوتان آمید	۴۲.....
۳-۱-۲- سنترز ۳ و ۴- دی هیدرو پیریمیدینون ها	۴۲
۳-۲- شناسایی و تایید ساختار ترکیبات سنترز شده توسط طیف های اسپکتروسکوپی	۴۴
۳-۲-۱- طیف سنجی مادون قرمز (IR)	۴۴.....
۳-۲-۲- طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته (^1H-NMR)	۴۵.....
۳-۲-۳- طیف سنجی جرمی (Mass)	۴۸.....
۳-۳- فیزیکوشیمیایی، فارماکوکینتیک و داروهماندی پیش بینی شده برای ترکیبات سنتزی	۴۹
۳-۳-۱- ویژگی های فیزیکوشیمیایی پیش بینی شده برای ترکیبات سنترز شده	۴۹.....
۳-۳-۲- ویژگی های فارماکوکینتیک پیش بینی شده برای ترکیبات سنتزی	۵۱.....
۳-۴- نتایج ارزیابی های زیستی	۵۲
۳-۴-۱- نتایج ارزیابی سمیت سلولی به روش MTT	۵۲.....
۳-۴-۲- نتایج اثر مهارکنندگی مهاجرت سلولی به روش ترمیم زخم	۵۹.....
۳-۴-۳- بررسی اثر حلال (DMSO) بر روی ترمیم زخم	۶۰.....
بررسی اثر ساختار شیمیایی ترکیبات بر فعالیت بیولوژیک	۶۰.....
۳-۵-۱- مقایسه اثر ساختار شیمیایی ترکیبات بر اثر سمیت سلولی	۶۱.....
۳-۵-۲- مقایسه اثر ساختار شیمیایی ترکیبات بر اثر مهارکنندگی مهاجرت سلولی	۶۱.....
۳-۶- مدل سازی مولکولی	۶۱.....

۶۷.....	فصل ۴: نتیجه گیری و پیشنهادات
۶۸.....	۴-۱- نتیجه گیری
۶۸.....	۴-۲- پیشنهادات
۶۸.....	۴-۳- محدودیت های مطالعه
۶۹.....	منابع
۷۲.....	پیوست ها

TLC: Thin layer chromatography

NMR: Nuclear magnetic resonance

IR: Infrared

AGS: Human gastric cancer cell line

FBS: Fetal bovine serum

RPMI: Roswell park memorial institute

PBS: Phosphate-buffered saline

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid

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

IC50: Inhibitory Concentration 50%

VEGFR1: Vascular endothelial growth factor receptor 1

SDF1: Stromal Cell-Derived factor 1

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition

فهرست جدول ها

جدول ۱-۲- مواد شیمیایی و تجهیزات استفاده شده در بخش سنتز.....	۲۲
جدول ۲-۲- لیست مواد و تجهیزات مورد استفاده در بخش ارزیابی زیستی.....	۲۳
جدول ۳-۲- دستگاه های مورد استفاده.....	۲۴
جدول ۴-۲- لیست نرم افزارهای مورد استفاده.....	۲۵
جدول ۱-۳- ویژگی های فیزیکوشیمیایی ترکیبات سنتز شده.....	۵۲
جدول ۲-۳- ویژگی های فارماکوکینتیکی ترکیبات سنتز شده.....	۵۳
جدول ۳-۳- سمیت سلولی (IC ₅₀) ترکیبات سنتزی بر حسب میکرومولار در رده سلولی AGS.....	۵۴
جدول ۳-۴- مقایسه بین گروهی تاثیر غلظت های مختلف ترکیب M1 بر رده سلولی AGS.....	۵۵
جدول ۳-۵- مقایسه بین گروهی تاثیر غلظت های مختلف ترکیب M2 بر رده سلولی AGS.....	۵۶
جدول ۳-۶- مقایسه بین گروهی تاثیر غلظت های مختلف ترکیب M3 بر رده سلولی AGS.....	۶۰
جدول ۷-۳- برهمکنش های هیدروفوبی ایزومر S ترکیب F2 در اتصال به سایت باندینگ آنزیم Eg5 (2x7e).....	۶۵
جدول ۸-۳- انرژی های آزاد اتصال در برهمکنش های هیدروفوبی ایزومرهای نوری مختلف ترکیبات دی هیدروپیریمیدینونی تحت مطالعه با سایت باندینگ آنزیم Eg5 (کدهای PDB: 2x7e و ieh۲).....	۶۶

فهرست عکس‌ها

شکل ۱-۱	ساختر ۵ فلورو اوراسیل	۷
شکل ۱-۲	ساختر لکوورین کلسیم	۷
شکل ۱-۳	ساختر کپسیتابین	۷
شکل ۱-۴	ساختر سیکلوفسفامید	۸
شکل ۱-۵	ساختر دوکسوروبیسین	۸
شکل ۱-۶	ساختر وین کریستین	۹
شکل ۱-۷	ساختر پردنیزولون	۹
شکل ۱-۸	مراحل متاستاز	۹
شکل ۱-۹	شیمیایی ترکیب موناسترول	۱۷
شکل ۱-۱۰	ساختر شیمیایی ترکیب الگو گرفته شده از موناسترول	۱۸
شکل ۱-۱۱	ساختر شیمیایی ترکیب دی متیلن آسترون	۱۹
شکل ۱-۱۲	فلوچارت تحقیق	۲۰
شکل ۲-۱	سلول های رده AGS در شرایط آزمایشگاهی	۳۲
شکل ۲-۲	لام هموسایتومتر	۳۵
شکل ۳-۱	مکانیسم تشکیل	۴۲
شکل ۳-۲	کلئ ترکیبات سنتزی ۳ و ۴-دی هیدرو پیری میدینون	۴۲
شکل ۳-۳	مکانیسم تشکیل ۳ و ۴-دی هیدرو پیری میدینون ها (واکنش بیجینلی)	۴۳
شکل ۳-۴	مادون قرمز ترکیب M1	۴۵
شکل ۳-۵	H1-NMR ترکیب M1	۴۷
شکل ۳-۶	جرم سنجی ترکیب M1	۴۸
شکل ۳-۷	رادیکال های تشکیل شده در طیف سنجی جرمی ترکیب M1	۴۹
شکل ۳-۸	تاثیر ترکیبات سنتزی (M1، M2 و M3) در ترمیم زخم ایجاد شده در سلول های رده AGS در شرایط آزمایشگاهی... ۶۰	
شکل ۳-۹	تاثیر حلال DMSO در ترمیم زخم ...	

.....۶۱

شکل ۱۰-۳ الگوی سه بعدی برهمکنش ایزومر R مولکول ۱ در اتصال به سایت باندینگ آنزیم Eg5 (2x7e).....۶۳

شکل ۱۱-۳ الگوی سه بعدی برهمکنش ایزومر S مولکول ۳ در اتصال به سایت باندینگ آنزیم Eg5 (2x7e).....۶۴

شکل ۱۲-۳ همبستگی داده های انرژی آزاد اتصال ترکیبات دی هیدروپیریمیدینی تحت مطالعه در سایت اتصال فرم های القایی آنزیم Eg5 با کدهای 2X7E (محور افقی) و 2IEH (محور عمودی).....۶۵

فهرست نمودارها

نمودار ۱-۳-۱- منحنی غلظت در برابر سمیت ترکیب M1 در رده سلولی AGS.....۵۴

نمودار ۲-۳-۲- نمودار زنده مانی/دوز ترکیب M1.....۵۴

نمودار ۳-۳-۳- نمودار زنده مانی/دوز ترکیب M2.....۵۵

نمودار ۴-۳-۴- منحنی غلظت در برابر زنده مانی ترکیب M2 در رده سلولی AGS.....۵۶

نمودار ۵-۳-۵- منحنی غلظت در برابر زنده مانی ترکیب M3 در رده سلولی AGS.....۵۸

نمودار ۶-۳-۶- نمودار زنده مانی/دوز ترکیب M3.....۵۸