بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه‌ی دکتری حرفه‌ای داروسازی

عنوان

سنتز و ارزیابی بیولوژیک مشتقات جدید تتراهیدروپیریمیدینی به عنوان مهار کننده اوره آز

اساتید راهنما

دکتر ساقی سپهری

دکتر حمید باخرد

نگارش

نازلی آهنگرزاده

مهر ۱۴۰۰

شماره پایان نامه: د-۹۶

تقدیم به

مقدس ترین واژه‌ها در لغت نامه دلم،

مادر مهربانم

که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت آن میدانم

پدر، مهربانی مشفق، بردبار و حامی

اسطوره زندگیم، پناه خستگیم و امید بودنم که نشانه لطف الهی در زندگی من است

خواهر مهربانم، پشتوانه همیشگیم

سپاسگزاری

تشکر قلبی و لسانی خود را از استاد عالی قدر سرکار خانم دکتر ساقی سپهری که زحمت راهنمایی این پایان نامه را عهده دار گردیدند و در تمامی مراحل انجام رساله از راهنمایی های مدبرانه ایشان استفاده نمودم ابراز دارم و توفیقات روز افزون ایشان را توأم با صحت و سعادت خواستارم.

از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر حمید باخرد به پاس زحمات بی شائبه شان در طی انجام این تحقیق سپاس گزاری می کنم.

با تشکر خالصانه خدمت سایر اساتید محترم و تمام کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

چکیده

با افزایش میزان ابتلا به سرطان معده در جهان و بررسی عوامل ایجاد کننده آن، توجه ویژه به هلیکوباکترپیلوری جلب شده است. هلیکوباکترپیلوری اولین باکتریای سرطانزای شناخته شده و یکی از موفق ترین عوامل بیماری زای انسانی است، زیرا این باکتری بیش از نیمی از جمعیت جهان را درگیر کرده است. در صورت عدم درمان، کلونیزاسیون این باکتری معمولاً مادام العمر ادامه می یابد. عفونت هلیکوباکتر پیلوری عامل اصلی در بیماری‌های مختلف گوارشی است، از گاستریت مزمن فعال بدون علائم بالینی گرفته تا زخم معده. همچنین نقش عمده‌ای در بروز سرطان معده یا مالت لنفوما دارد. به دلیل عدم اختصاصی بودن درمان و مقاومت آنتی بیوتیکی، مهار کننده های اوره آز هلیکو باکترپیلوری می‌توانند در پیشگیری و درمان از بیماری های دارای مرگ و میر زیاد مثل سرطان بسیار موثر باشد. بنابراین در این پروژه با تمرکز بر روی آنزیم اوره آز و تلاش برای مهار این آنزیم، مشتقات ۴،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین طراحی و سنتز شدند. سپس قدرت مهار کنندگی آنزیم اوره آز این ترکیبات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در پروژه حاضر پس از طراحی شش مشتق مختلف ۴،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدینی، مشتقات به وسیله واکنش بیجینلی یک مرحله‌ای سنتز شدند. سپس، شناسایی و تایید ساختاری آن ها با روش های طیف سنجی ^{1}H-NMR، FT-IR و جرمی انجام گردید. در نهایت، فعالیت مهاری آنزیم اوره از این ترکیبات بوسیله روش برتلوت (فنول- هایپوکلریت) ارزیابی شد.

نتایج

به طور کلی بیشترین اثر بخشی در بین مشتقات تتراهیدروپیریمیدینی سنتز شده، به ترتیب در ترکیب ۶-(۴-هیدروکسی فنیل) -۵- متیل-۲- اکسو- ۶،۳،۲،۱ – تتراهیدروپیریمیدین -۴-کربوکسیلیک اسید (N5) با IC_{50} = ۶/۸۱ ± ۵/۴۲۰۱ µM و ترکیب ۶- (۴- هیدروکسی- ۳- متوکسی فنیل) -۵ - متیل- ۲- اکسو- ۶،۳،۲،۱ – تتراهیدروپیریمیدین - ۴-کربوکسیلیک اسید (N6) با IC_{50} = ۸/۴۵ ± ۳/۶۴۱۷ µM و کمترین اثر بخشی در ترکیب بنزیل ۴-(۴-هیدروکسی فنیل)-۶-متیل-اکسو-۴،۳،۲،۱ -تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسیلات (N3) با IC_{50} = ۷۵/۰۲ ± ۲/۴۱۴۵ µM مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری

بررسی رابطه ساختار-فعالیت نشان می دهد که قرار گیری استخلاف کربوکسیلیک اسید در موقعیت ۴ حلقه تتراهیدروپیریمیدین، به دلیل توانایی بر قراری پیوند های هیدروژنی و یا یونی با جایگاه فعال آنزیم اوره آز و همچنین شلات کردن یون نیکل موجود در آنزیم اوره آز به طرز چشم گیری سبب افزایش قدرت مهار کنندگی این آنزیم گردید. براساس نتایج، قرار گیری گروه کربوکسیلیک اسید بر روی حلقه تتراهیدروپیریمیدین اثر مثبتی در فعالیت مهار کنندگی اوره آز دارد. حضور گروه تیواکسو در موقعیت ۲ حلقه تتراهیدروپیریمیدین، به دلیل امکان تشکیل پیوند دی سولفیدی با اسید آمینه های جایگاه فعال آنزیم فعالیت مهار کنندگی افزایش می یابد.

کلید واژه: هلیکوباکتر پیلوری، ۴،۳،۲،۱- تتراهیدروپیریمیدین، واکنش بیجینلی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- معرفی..... ۲

۱-۲- تاریخچه ۲

۱-۳- شیوع هلیکوباکترپیلوری در جهان ۳

۱-۴- شیوع هلیکوباکترپیلوری در ایران ۵

۱-۵- میکروبیولوژی ۶

۱-۵-۱- گونه‌های هلیکوباکتر گاستریک ۶

۱-۵-۱-۵- گونه‌های هلیکوباکتر انتروهپاتیک ۹

۱-۵-۲- میکروبیولوژی هلیکوباکترپیلوری ۹

۱-۵-۳- مورفولوژی ۱۰

۱-۶- تنظیم ژن..... ۱۰

۱-۷- بیماری زایی..... ۱۱

۱-۷-۱- گاستریت حاد و مزمن..... ۱۱

۱-۷-۲- بیماری زخم معده ۱۴

۱-۷-۳- سوء هاضمه بدون زخم..... ۱۵

۱-۷-۴- گاستریت آتروفیک، متاپلازی روده و سرطان معده ۱۶

۱-۷-۵- لنفوم مالت (MALT) معده ۱۸

۱-۷-۶- بیماری بازگشت اسید به مری (GERD) ۱۹

۱-۷-۷- اختلالات خارج دستگاه گوارش ۱۹

۱-۸- تشخیص ۲۰

۱-۹- درمان ۲۱

۱-۹-۱- خط اول درمان ۲۱

۱-۹-۲- خط دوم درمان..... ۲۲

۳-۹-۱- خط سوم درمان ۲۴
۱۰-۱- تنفس و دفاع از استرس اکسیداتیو ۲۵
۱-۱۰-۱- متابولیسم نیتروژن ۲۵
۱۱-۱- آنزیم اوره آز ۲۶
۱۲-۱- مهار کننده‌های آنزیم اوره‌آز ۲۸
۱۳-۱- واکنش‌های چند جزئی و روش بیجینلی ۳۰
۱۴-۱- مشتقات تتراهیدروپیریمیدینی ۳۰
۱۵-۱- مروری بر مطالعات انجام شده در خصوص مهار آنزیم اوره‌آز با ترکیبات تتراهیدروپیریمیدینی ۳۱

فصل دوم: روش کار

۱-۲-مواد مصرفی ۳۶
۱-۱-۲- مواد مورد استفاده در بخش سنتز ۳۶
۲-۱-۲- مواد مورد استفاده در بخش زیستی ۳۶
۲-۲- دستگاه های مورد استفاده ۳۷
۲-۳- بررسی اثرات مهار کنندگی آنزیم اوره آز ۳۸
۲-۴- نرم افزارها ۳۸
۲-۵- روش ها ۳۸
۲-۵-۱- روش سنتز کاتالیزور کبالت هیدروژن سولفات ۳۹
۲-۵-۲- روش کلی سنتز مشتقات ۶-متیل-۲-اکسو/تیواکسو-۴-آریل-۴،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسیلات استر (N1-N4) و مشتقات ۶-آریل-۵-متیل-۲-اکسو-۶،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (N5وN6) ۳۹
۲-۶- روش بررسی اثرات ضد اوره آزی ترکیبات سنتز شده بر روی آنزیم اوره آز ۴۵
۲-۶-۱- بررسی های آماری ۴۷

فصل سوم: نتایج

۳-۱- سنتز ترکیبات ۴۹
۳-۱-۱-سنتز مشتقات ۶-متیل-۲-اکسو/تیواکسو-۴-آریل-۴،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسیلات استر (N1-N4) ۴۹
۳-۱-۲-سنتز مشتقات ۶-آریل-۵-متیل-۲-اکسو-۶،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (N5وN6) ۴۹
۳-۱-۳- مکانیسم واکنش بیجینلی ۵۰

۳-۱-۴- مکانسیم سنتز مشتقات ۶-متیل-۲-اکسو/تیواکسو-۴-آریل-۴،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسیلات استر (N1-N4) و ۶-آریل-۵-متیل-۲-اکسو-۶،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (N5 و N6) ۵۲
۳-۲- تایید ساختار ترکیبات سنتز شده با استفاده از روش های طیف سنجی..... ۵۴
۳-۲-۲- بررسی طیف های H-NMR مشتقات سنتز شده..... ۵۷
۳-۲-۳- بررسی طیف‌های جرمی ترکیبات سنتز شده ۵۹
۳-۳ بررسی اثرات بیولوژیک ترکیبات سنتز شده ۶۲
۳-۳-۱ بررسی اثرات مهار کنندگی اوره آز ترکیبات سنتز شده..... ۶۲
۳-۳-۲ مقایسه و بررسی ساختار و اثرات بیولوژیک ترکیبات سنتز شده..... ۶۴
۳-۳-۳ مقایسه و بررسی ساختار ترکیبات تتراهیدروپیریمیدینی سنتز شده با سایر ترکیبات مهار کننده آنزیم اوره آز موجود در مطالعات پیشین ۶۸
۳-۳-۴ آنالیز آماری ۷۰

فصل چهارم: نتیجه گیری

۴-۱ نتیجه گیری ۷۲
۴-۲ پیشنهادات..... ۷۴
منابع ۷۵
پیوست ها..... ۸۱

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲- ۱ لیست تجهیزات و مواد شیمیایی مورد استفاده جهت سنتز مشتقات تتراهیدروپیرمیدینی ۳۶

جدول ۲- ۲ مواد مورد استفاده در بخش زیستی مطالعه.....۳۷

جدول ۲-۳ دستگاه های مورد استفاده در مطالعه حاضر.....۳۷

جدول ۲- ۴ نرم افزار های استفاده شده در مطالعه حاضر ۳۸

جدول ۳- ۱ نتایج فعالیت مهار کنندگی آنزیم اوره آز ترکیبات سنتز شده.....۶۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ آمار جهانی مربوط به شیوع هلیکوباکترپیلوری (۷) ۴

شکل ۱-۲ تصویر شماتیک از عوامل موثر در آسیب شناسی معده و نتیجه بیماری در عفونت هلیکوباکترپیلوری (۳).....۱۱

شکل ۱-۳ ایجاد زخم معده توسط باکتری هلیکوباکترپیلوری (۴۶) ۱۵

شکل ۱- ۴ سرطان معده و عفونتی هلیکوباکترپیلوری (۵۳) ۱۷

شکل ۱- ۵ روش های تهاجمی و غیر تهاجمی تشخیص هلیکوباکترپیلوری (۶۹).....۲۱

شکل ۱- ۶ ساختار شیمیایی کلاریترومایسین و آموکسی سیلین (۷۳).....۲۲

شکل۱- ۷ ساختار شیمیایی لووفلوکساسین و بیسموت (۷۳) ۲۳

شکل۱- ۸ ساختار شیمیایی وونوپرازان ۲۳

شکل ۱- ۹ ترکیب شیمیایی فورازولیدون (۷۳) ۲۴

شکل ۱- ۱۰ شکل شماتیک روابط بین مقاومت به اسید (فعالیت اوره و حمل و نقل اوره)، متابولیسم نیتروژن (تولید آمونیاک)، متابولیسم فلز (جذب آهن و جذب نیکل) و تنظیم ژن (FUR و NIKR) در هلیکوباکترپیلوری (۳) ۲۶

شکل ۱- ۱۱ نقش اوره آز در پاتوژنز هلیکوباکترپیلوری (۸۸) ۲۷

شکل ۱-۱۲ ساختار برخی از مهار کننده‌های اوره‌آز ۲۹

شکل ۱-۱۳ ساختارهای موثرترین بازدارنده های اوره آز آنالوگ ، آنالوگ ها با توجه به افزایش مهار JBU خالص در غلظت ۰/۱ میلی مولار مرتب شده اند (۹۵).....۲۹

شکل ۱-۱۴ واکنش بیجینلی (۹۸) ۳۰

شکل۱- ۱۵ ساختار شیمیایی ترکیبات با بهترین فعالیت اوره آزی.....۳۲

شکل ۱-۱۶ترکیبات دارای بیشترین فعالیت اوره آزی.....۳۳

شکل۱- ۱۷ ساختار شیمیایی ترکیب دارای بیشترین فعالیت اوره آزی نسبت به تیواوره استاندارد.....۳۴

شکل۱- ۱۸ ساختار شیمیایی ترکیب با بهترین فعالیت اوره آزی.....۳۴

شکل۳- ۱ سنتز کلی ترکیبات N1-N4.....۴۹

شکل۳- ۲ سنتز کلی ترکیبات N5,N6.....۵۰

شکل۳- ۳ مکانیسم های واکنش بیجینلی ۵۱

شکل۳- ۴ شکل شماتیک مکانیسم واکنش سنتز ترکیبات N1-N4 ..... ۵۲
شکل۳-۵ شکل شماتیک مکانیسم واکنش سنتز ترکیبات N5 وN6 ..... ۵۳
شکل۳- ۶ مشخصه طیف های مختلف FT-IR ۵۵
شکل۳- ۷ طیف مادون قرمز ترکیب متیل ۴-(۴-هیدروکسی فنیل)-۶-متیل-اکسو-۴،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسیلات (N1) ۵۷
شکل۳- ۸ طیف H-NMR ترکیب متیل ۴-(۴-هیدروکسی فنیل)-۶-متیل-اکسو-۴،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسیلات (N1) ۵۹
شکل۳- ۹ یون های حاصل از شکستن ترکیب متیل ۴-(۴-هیدروکسی فنیل)-۶-متیل-اکسو-۴،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسیلات (N1) در طیف سنجی جرمی ۶۱
شکل۳- ۱۰ طیف سنجی جرمی ترکیب متیل ۴-(۴-هیدروکسی فنیل)-۶-متیل-اکسو-۴،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریمیدین-۵-کربوکسیلات (N1) ۶۲
شکل۳- ۱۱ ساختار شیمیایی ترکیبات N1 ، N2 وN3 ..... ۶۵
شکل۳- ۱۲ ساختار شیمیایی ترکیبات N1 و N4 ..... ۶۵
شکل۳- ۱۳ ساختار شیمیایی ترکیبات N5 و N6 ..... ۶۶
شکل۳- ۱۴ ساختار شیمیایی کلی ترکیبات دارای کربوکسیلیک اسید(N5 وN6) و ترکیبات استری(N1-N4) ۶۷
شکل۳- ۱۵ ساختار شیمیایی ترکیبات N3 و N5 ..... ۶۸

فهرست علائم اختصاری

ردیف	علامت اختصاری	معادل انگلیسی
۱	MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
۲	FT-IR	Fourier transform - infrared spectroscopy
۳	^{1}H-NMR	1H – Nuclear Magnetic Resonance
۴	DMSO	Dimethyl sulfoxide
۵	SAR	Structure-activity relationship
۶	IC_{50}	Inhibitory concentration
۷	BSA	Bovine serum albumin
۸	THPM	Tetrahydropyrimidine
۹	LPS	Lipopolysaccharides
۱۰	IL-1	Interleukin-1
۱۱	NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
۱۲	WHO	World Health Organization
۱۳	PCR	Polymerase Chain Reaction
۱۴	GERD	Gastroesophageal reflux disease
۱۵	JBU	Jack Bean Urease