

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجهی دکتری عمومی داروسازی

عنوان

سنتز، ارزیابی خاصیت ضد لیشمانیایی و آنالیز کنفورماسیونی

مشتقات جدید ۲-آمینو تiazولی

اساتید راهنما

دکتر نیما رزاقی اصل

دکتر بهنام محمدی قلعه بین

استاد مشاور

دکتر جعفر عباسی شیران

نگارش

نسترن قلی زاده صفار

شماره پایان نامه: د- ۱۰۸

دی ۱۴۰۰

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه
زندگیست

تقدیم به خانواده ام که نه می توانم موهایشان را که در راه عزت
من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دستهای پینه بسته شان که ثمره
تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم. پس توفیقم ده که هر
لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست
بودنشان بگذرانم.

تقدیم به همسرم که سایه مهربانیش سایه سار زندگی می باشد،
او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل
نموده است.

اکنون که به یاری خداوند این دوره را به پایان رسانده ام بر خود واجب می دانم از اساتید راهنمای بزرگوایم جناب آقای دکتر نیما رزاقی اصل و آقای دکتر بهنام محمدی به پاس زحمات بی شائبه شان در طی انجام این تحقیق سپاسگزاری نمایم. از جناب آقای دکتر جعفر عباسی که استاد مشاور این پایان نامه بودند نیز قدردانی می نمایم.

چکیده فارسی

مقدمه و هدف:

بر اساس گزارش های داده شده لیشمانیوز یکی از بیماری های است که موجب نگرانی های بهداشتی در بیش از ۹۸ کشور دنیا شده است که شیوع آن به بالاتر از ۲ میلیون نفر در سال نیز می رسد. از آنجا که هیچ واکسن مورد تاییدی برای این بیماری تاکنون گزارش نشده است، و از طرف دیگر داروهای مطمئن با اثر بخشی بالا نیز بسیار محدود می باشد، یافتن داروهای موثر و در عین حال زیست سازگار بسیار حائز اهمیت می باشد. با توجه به شیوع نسبتا بالای این بیماری در کشور، هدف از مطالعه حاضر سنتز، ارزیابی خاصیت ضد لیشمانیایی و مدل سازی مولکولی مشتقات جدید ۲-آمینو تiazولی بوده است.

مواد و روش ها:

در این مطالعه مشتقات جدیدی از ترکیبات ۲-آمینو تiazولی سنتز شدند. سپس توسط تکنیک های طیف سنجی مادون قرمز (IR)، جرمی (MS) و رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (H-NMR) مشخصه یابی شدند. در مرحله بعد تاثیرات بیولوژیکی ترکیبات به صورت برون تنی در غلظت های مختلف بر روی فرم پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور بررسی شد و IC₅₀ هر کدام از ترکیبات محاسبه شد. در مرحله بعد رابطه ساختار- اثر ترکیبات مشخص شد. در نهایت با استفاده از روش محاسباتی داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار اتوداک، قدرت اتصالی ترکیبات به آنزیم N-myristoyltransferase مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که مبنای انتخاب این آنزیم برای مطالعات داکینگ مولکولی، نقش و اهمیت آن در مکانیسم های بیولوژیک انگل لیشمانیای ماژور می باشد که باعث انتقال اسید چرب اشباع میرستات از myristoyl-coA به انتهای آمینی گلايسین در جایگاه اتصال پروتین می شود که بر اساس گزارش مقالات معتبر علمی این آنزیم در چرخه زندگی لیشمانیای ماژور نقش حیاتی دارد.

یافته ها:

نتایج به دست آمده از تستهای شناسایی IR، NMR و MS نشان داد که تمامی ساختارهای مورد نظر به خوبی سنتز شده بودند و لذا مورد تایید قرار گرفتند. بررسی اثرات ضد لیشمانیایی بر روی فرم پروماستیگوت گونه های لیشمانیا ماژور انجام شد و نتایج نشان دادند که ترکیب N-(۴-متیل-۵-فنیل تiazول-۲-ایل) کارباموتیول (سیکلوپروپان کربوکسامید (4c) با $IC_{50} = 38.54 \pm 0.45$ میکروگرم در میلی لیتر دارای بهترین اثر ضد لیشمانیایی می باشد. همچنین نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که ترکیب 4b دارای بیشترین انرژی اتصال برابر با 8/45- کیلوکالری بر مول در اتصال به آنزیم N-myristoyltransferase بوده است. همچنین حضور اتم برم در ترکیب 4b امکان برهمکنش هیدروفوبی با Gly205 در باندینگ پاکت را فراهم می سازد.

بحث و نتیجه گیری:

بر اساس نتایج بدست آمده ترکیب 4c اثر ضد پروماستیگوت های انگل لیشمانیای ماژور قویتری نسبت به سایر ترکیبات از خود نشان داده است. در کل به نظر می رسد الگوی استخلافی ۵-متیل-۴-فنیل بر روی حلقه تiazول الگوی مناسب تر جهت توسعه ترکیبات قوی تر باشد. با توجه به داده های داکینگ مولکولی ترکیب 4b بالاترین انرژی برهمکنش را داشت که رفع مسئله حلالیت برای این ترکیب به جهت توسعه دارویی با اثر دهی بالاتر مطرح می باشد. همچنین با توجه به اثرات استخلاف برم بر روی حلقه فنیل در ترکیب 4b به نظر می رسد طراحی استخلاف های مختلف در حلقه فنیلی مذکور می تواند در توسعه ترکیبات قوی تر ضد لیشمانیا مهم باشد.

کلمات کلیدی: لیشمانیوز، سنتز، MTT، ۲-آمینو تiazول

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۱-۱-۱	لیشمانیا.....
۲
۲-۱	تاریخچه لیشمانیوز در جهان.....
۲
۳-۱	تاریخچه لیشمانیوز در ایران.....
۳
۴-۱	رده‌بندی و طبقه‌بندی انگل لیشمانیا.....
۵
۵-۱	سیر تکاملی و مورفولوژی لیشمانیا.....
۵
۶-۱	چرخه زندگی انگل لیشمانیا.....
۷
۷-۱	منابع لیشمانیوزها.....
۸
۱-۷-۱	منابع لیشمانیوزها در ایران.....
۹
۸-۱	ایمنولوژی عفونت‌های لیشمانیا.....
۹
۹-۱	روش‌های پیشگیری و درمان لیشمانیوز.....
۱۰
۱۰-۱	توسعه داروهای جدید.....
۱۲
۱-۱۰-۱	تiazول.....
۱۳
۲-۱۰-۱	آمینو تiazول.....
۱۴
۳-۱۰-۱	داروهای بر پایه تiazول.....
۱۶
۱۱-۱	استفاده از تiazول برای یافتن داروهای ضد لیشمانیا.....
۱۸
۱۲-۱	بررسی متون.....
۱۹
۱۳-۱	چگونگی استفاده از نتایج.....
۲۵

فصل دوم: مواد، دستگاه ها و روش ها

- ۲۸ ۱-۲ دستگاه های مورد استفاده
- ۲۸ ۲-۲ مواد مورد استفاده در سنتز ترکیبات کربونیل تیواوره
- ۲۹ ۳-۲ مواد و تجهیزات استفاده شده در بخش سنتز
- ۳۰ ۴-۲ لیست دستگاه های مورد استفاده
- ۳۰ ۵-۲ تجهیزات، حلال ها و مواد شیمیایی استفاده شده در ارزیابی های زیستی
- ۳۳ ۷-۲ سنتز مشتقات کربونیل تیواوره واجد ۲- آمینوتیازول
- ۳۳ ۱-۷-۲ ترکیب ۳-کلرو-N-((۵-متیل-۴-فنیل تیازول-۲-ایل) کارباموتیل) بنزامید (4a)
- ۳۴ ۲-۷-۲ ترکیب N-((۴-بروموفنیل) تیازول-۲-ایل) کارباموتیل-۳-کلروبنزامید (4b)
- ۳۵ ۳-۷-۲ ترکیب N-((۴-متیل-۵-فنیل تیازول-۲-ایل) کارباموتیول) سیکلوپروپان کربوکسامید (4c)
- ۳۶ ۴-۷-۲ ترکیب N-((۵-پی-تویل) تیازول-۲-ایل) کاراموتیول) سیکلوپروپان کربوکسامید (4d)
- ۳۷ ۵-۷-۲ ترکیب ۴-متوکسی-N-((۵-متیل-۴-فنیل تیازول-۲-ایل) کارباموتیول) بنزامید (4e)
- ۳۸ ۶-۷-۲ ترکیب ۴-فلورو-N-((۴-متیل-۵-فنیل تیازول-۲-ایل) کارباموتیول) بنزامید (4f)
- ۳۹ ۸-۲ سنتز ترکیبات کربونیل تیواوره واجد آمینومتیل فوران
- ۳۹ ۱-۸-۲ ترکیب N-(سکلوپروپیل کربونیل) N'-(۲-فیوریل متیل) تیواوره (7a)
- ۴۰ ۲-۸-۲ ترکیب N-((۲-فیوریل متیل) آمین) کربونوتیول-۴-متیل بنزامید (7b)
- ۴۰ ۳-۸-۲ ترکیب ۱-فیوران-۲-ایل متیل-۳-((۴-ئتوکسی-بنزیول)-تیواوره (7c)
- ۴۱ ۹-۲ شناسایی ترکیبات سنتز شده
- ۴۲ ۱۰-۲ بررسی اثرات بیولوژیک ترکیبات سنتز شده
- ۴۲ ۱-۱۰-۲ محیط کشت RPMI 1640

- ۴۲ ۲-۱۰-۲- سرم جنین گاوی یا FBS
- ۴۳ ۳-۱۰-۲- محلول MTT
- ۴۳ ۴-۱۰-۲- کشت انگل
- ۴۳ ۵-۱۰-۲- تهیه رقت های مختلف از مشتقات کربونیل تیواوره
- ۴۵ ۶-۱۰-۲- تیمار کردن پروماستیگوت های لیشمانیای ماژور با ترکیبات کربونیل تیواوره
- ۴۶ ۷-۱۰-۲- سنجش زنده مانی سلولی (MTT)
- ۴۷ ۱۱- مدلسازی مولکولی ساختارهای کربونیل تیو اوره در جایگاه فعال اهداف ماکرومولکولی
- ۴۹ ۱۲- ملاحظات اخلاقی

فصل سوم: نتایج و بحث

- ۵۱ ۱-۳- سنتز ترکیبات جدید
- ۵۱ ۱-۱-۳- روش سنتز ترکیبات کربونیل تیو اوره واجد ۲-آمینو تiazولی: N-((تiazول-آسیل) کارباموتیل) کربوکسامید
- ۵۱ ۲-۱-۳- روش سنتز ترکیبات کربونیل تیو اوره فوران دار: N-((۲-فیوریل متیل) آمین) کربونوتیول- کربوکسیماید
- ۵۲ ۲-۳- مکانیسم کلی واکنش
- ۵۴ ۳-۳- تایید ساختار ترکیبات سنتز شده
- ۵۵ ۱-۳-۳- آزمون TLC
- ۵۵ ۲-۳-۳- طیف سنجی مادون قرمز (IR)
- ۵۶ ۳-۳-۳- طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (H NMR)
- ۵۸ ۴-۳-۳- طیف سنجی جرمی (GC-MS)

۴-۳- مشخصات فیزیکوشیمیایی ترکیبات ۶۰

۵-۳- نتایج مربوط به ارزیابی های زیستی ترکیبات سنتز شده ۶۵

۶-۳- بررسی رابطه ساختار-اثر (SAR) ۷۱

۷-۳- همبستگی اثرات ضد لیشمانیایی و پارامترهای فیزیکوشیمیایی ۷۳

۸-۳- مدل سازی مولکولی ۷۶

فصل چهارم: نتیجه گیری و پیشنهادات

۱-۴- نتیجه گیری ۸۳

۲-۴- پیشنهادات ۸۵

منابع ۸۶

پیوست ها ۹۴

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- داده های بیولوژیک مطالعه ویانا و همکاران	۲۱
جدول ۲-۱- ترکیبات دارای بهترین رفتار بیولوژیکی	۲۲
جدول ۱-۲- دستگاه های استفاده شده در مطالعه حاضر جهت سنتز ترکیبات کربونیل تیو اوره	۲۸
جدول ۲-۲- حلال های مورد استفاده در این مطالعه جهت سنتز مشتقات کربونیل تیو اوره	۲۹
جدول ۳-۲- ترکیبات مورد استفاده در این مطالعه جهت سنتز مشتقات کربونیل تیو اوره	۲۹
جدول ۴-۲- تکنیک های استفاده شده جهت شناسایی ساختاری مشتقات کربونیل تیو اوره	۳۰
جدول ۵-۲- ترکیبات، وسایل و دستگاه های استفاده شده در قسمت بیولوژیک مطالعه	۳۰
جدول ۶-۲- نرم افزار های استفاده شده	۳۳
جدول ۷-۲- رقت های تهیه شده از مشتقات تiazولی جهت بررسی های بیولوژیک	۴۴
۱۲-۲- ملاحظات اخلاقی	۴۹
جدول ۱-۳- سنتز کربونیل تیو اوره تiazولی و فورانی طی فرآیند سه جزئی تک ظرفی	۵۳
جدول ۲-۳- خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات جدید	۶۱
جدول ۳-۳- سمیت سلولی (IC50) ترکیبات سنتز شده در فرم پروماستیگوت L. major	۶۵
جدول ۴-۳- انرژی های آزاد اتصال در برهمکنش های ترکیبات کربونیل تیو اوره تحت مطالعه با باندینگ	
سایت آنزیم NMT (کد PDB: 6qdf) در L. major	۷۷

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- طبقه بندی انواع لیشمانیا	۵
شکل ۲-۱- مورفولوژی های لیشمانیا. (بالا) فرم پروماستیگوت و (پایین) فرم آماستیگوت.....	۷
شکل ۳-۱- چرخه زندگی انگل لیشمانیا.....	۷
شکل ۴-۱- تعامل پیچیده بین پاسخهای Th1 و Th2 در سالک بر درک فعلی این پاسخها در CanL متمرکز شده است. پاسخهای ترکیبی Th1 و Th2 در سگهای آلوده رخ می دهد و فرض بر این است که تعادل بین این پاسخها در سگهایی که در معرض بیماریهای بالینی قرار می گیرند در جهت Th2 منحرف می شود، در حالی که یک فعالیت محافظتی قوی تر Th1 منجر به مقاومت می شود.....	۱۰
شکل ۵-۱- ساختار داروی پنتامیدین	۱۲
شکل ۶-۱- ساختار داروی آمفوتریسین بی.....	۱۲
شکل ۷-۱- ساختار شیمیایی تiazول	۱۳
شکل ۸-۱- ساختار شیمیایی اکسازول.....	۱۴
شکل ۹-۱- ساختار شیمیایی ۲-آمینوتiazول.....	۱۴
شکل ۱-۱۰- (a) همپوشانی ترکیبات شناسایی شده از ۳ ارزیابی غربالگری کینتوپلاستید شامل تعداد و درصد مربوط به ترکیبات: تریپانوزومیازیس آفریقای انسانی (HAT)، تریپانوزوما بروسی رودزینس (STIB 900). لیشمانیوز احشایی (VL)، لیشمانیا اینفانتوم (MHOM/MA(BE)/67)؛ و بیماری شاگاس (Tulahuen CL2، Trypanosoma cruzi). (b) ساختارهای شیمیایی منتخب(۶۵).....	۱۵
شکل ۱۱-۱- ساختار داروی نیتازوکسانید	۱۷
شکل ۱۲-۱- ساختار شیمیایی ۴-فنیل-۱،۳-تiazول-۲-آمین	۱۷
شکل ۱۳-۱- ساختار شیمیایی سیانینی فیوز شده به حلقه تiazولی	۱۸
شکل ۱۴-۱- ترکیبات بررسی شده بر علیه <i>L. infantum</i> در مطالعه سانتوس آلیانکا و همکاران	۲۰
شکل ۱۵-۱- مشتقات تیواوره بررسی شده در مطالعه ویانا و همکاران	۲۱

- شکل ۱-۱۶- ترکیبات ۴-فنیل-۱،۳-تيازول-۲-آمین بررسی شده در مطالعه رودریگز و همکاران ۲۲
- شکل ۱-۱۷- ترکیب استفاده شده در مطالعه دیاز و همکاران ۲۳
- شکل ۱-۱۸- ترکیبات بررسی شده در مطالعه کوپرز و همکاران ۲۴
- شکل ۱-۱۹- ترکیبات تيازولی بررسی شده توسط Oliveira و همکاران ۲۵
- شکل ۱-۲۰- فلوجارت مطالعه حاضر ۲۶
- شکل ۲-۱- تیمار کردن انگل های کشت شده با مشتقات ۲-آمینو تيازولی بر اساس رقت های مختلف از شماره ۱ تا شماره ۱۰، ستون C انگل بدون تیمار به عنوان کنترل و ستون B محیط کشت RPMI-1640 تنها به عنوان بلانک ۴۶
- شکل ۲-۲- تصویری از محیط نرم افزار اتوداک ۴/۲ ۴۹
- شکل ۳-۱- روش سنتز ترکیبات کربونیل تیواوره واجد ۲-آمینو تيازولی ۵۱
- شکل ۳-۲- روش سنتز ترکیبات کربونیل تیو اوره فوران دار ۵۲
- شکل ۳-۳- طرح شماتیک مکانیسم سنتز مشتقات مختلف کربونیل تیو اوره ۵۴
- شکل ۳-۴- طیف سنجی IR ترکیب 4c ۵۶
- شکل ۳-۵- طیف سنجی NMR ترکیب 4c ۵۷
- شکل ۳-۶- طیف سنجی جرمی ترکیب 4c ۵۹
- شکل ۳-۷- یون-رادیکالهای تشکیل شده در طیفسنجی جرمی ترکیب 4c ۶۰
- شکل ۳-۸- جرم مولکولی ترکیبات سنتز شده ۶۳
- شکل ۳-۹- تعداد گیرنده و دهنده های پیوند هیدروژنی در ترکیبات سنتز شده ۶۴
- شکل ۳-۱۰- مقدار CLogP مربوط به ترکیبات سنتز شده ۶۴
- شکل ۳-۱۱- نمودار دوز-زنده مانی ترکیب 4a ۶۶
- شکل ۳-۱۲- نمودار دوز-زنده مانی ترکیب 4b ۶۶
- شکل ۳-۱۳- نمودار دوز-زنده مانی ترکیب 4c ۶۷
- شکل ۳-۱۴- نمودار دوز-زنده مانی ترکیب 4d ۶۷
- شکل ۳-۱۵- نمودار دوز-زنده مانی ترکیب 4e ۶۸

- شکل ۳-۱۶ - نمودار دوز-زنده مانی ترکیب 4f ۶۸
- شکل ۳-۱۷ - نمودار دوز-زنده مانی ترکیب 7a ۶۹
- شکل ۳-۱۸ - نمودار دوز-زنده مانی ترکیب 7b ۶۹
- شکل ۳-۱۹ - نمودار دوز-زنده مانی ترکیب 7c ۷۰
- شکل ۳-۲۰ - نمودار دوز-زنده مانی داروی AmB ۷۰
- شکل ۳-۲۱ - الگوی SAR برای ترکیبات ساخته شده در این مطالعه ۷۳
- شکل ۳-۲۲ - رابطه خطی اثر ضد لیشمانیایی بر حسب IC50 و HBD در ترکیبات سنتز شده ۷۴
- شکل ۳-۲۳ - رابطه اثر ضد لیشمانیایی بر حسب IC50 و HBA در ترکیبات ساخته شده ۷۴
- شکل ۳-۲۴ - رابطه اثر ضد لیشمانیایی بر حسب IC50 و CLogP در ترکیبات ساخته شده ۷۵
- شکل ۳-۲۵ - الگوی برهمکنش مشتقات کربونیل تیو اوره سنتزی در باندینگ ۸۱