بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای حرفه‌ای داروسازی

عنوان:

سنتز و بررسی اثر سایتوتوکسیک مشتقات جدید ۱و۲و۳و۴-تتراهیدروپیریمیدین ۶-کربوکسیلیک اسید علیه رده سلولی AGS و بررسی چرخه سلولی

اساتید راهنما

دکتر ساقی سپهری

دکتر یاسین پناهی

نگارش

مهسا جعفری

شماره پایان‌نامه:

د-۲۱۳

اردیبهشت ۱۴۰۳

تقدیم به

پدر، مادر و خواهر عزیزم به پاس‌گرمای امیدبخش وجودشان

و به تمامی آزاد اندیشان، دانشمندان، بزرگان و جوانمردانی که نیک می اندیشند و عقل و خرد را پیشه خود نموده و جز پیشرفت و سعادت جامعه، هدفی ندارند.

از استاد بزرگوارم سرکارخانم دکتر ساقی سپهری برای تمامی حمایت‌ها و زحمات بی دریغ‌شان سپاسگزاری می‌کنم. به راستی انجام این پایان‌نامه بدون راهنمایی‌های مدبرانه، پیگیری‌های دلسوزانه و تشویق های امیدبخش ایشان میسّر نبود.

از استاد محترم جناب آقای دکتر یاسین پناهی که زحمت زیادی برای تحقق این پایان نامه کشیدند، متشکرم.

همچنین از همکاری‌ها و راهنمایی‌های آقای دکتر واحد ادهمی بی نهایت سپاسگزارم.

و در پایان از تمامی عزیزانی که در طول انجام این پروژه مرا یاری کرده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایم.

چکیده فارسی

مقدمه

سرطان یک بیماری پیچیده است که در آن یک سری تغییرات ژنومی و مولکولی باعث رشد و تکثیر کنترل نشده سلول‌ها می شود. در میان انواع سرطان، سرطان معده یکی از علل اصلی مرگ و میر در دهه های اخیر است. به همین جهت کشف ترکیبات جدید ضد سرطان بزرگترین هدف پژوهشگران می باشد. با توجه به نتایج خوب مطالعات پیشین بر روی مشتقات تتراهیدروپیریمیدینی علیه رده های سلولی سرطانی مختلف و علی الخصوص AGS، در این پروژه مشتقاتی از این دسته ترکیبات طراحی و سنتز شد و سپس اثرات سمیت سلولی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پروژه تعدادی از مشتقات تتراهیدروپیریمیدینی با استفاده از روش بیجینلی سنتز شدند و پس از شناسایی و تایید ساختاری آن‌ها با روش‌های طیف سنجی ^{1}H-NMR، ^{13}C-NMR، FT-IR و MS انجام شد. سپس سمیت سلولی ترکیبات بر روی رده سلولی سرطانی معده (AGS) مورد ارزیابی قرار گرفت و آنالیز اثر ترکیبات سنتز شده بر روی آپوپتوز و چرخه سلولی انجام شد.

نتایج

با توجه به نتایج، ترکیب ۵-برومو- ۶-(۳و۴-دی متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M3**) و ۵-برومو- ۶-(۴-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M4**) بهترین اثر سمیت سلولی را نسبت به ترکیبات دیگر در رده سلولی AGS داشته اند (**M3**:IC_{50}=69.60±5.08µM)، (**M4**:IC_{50}=73.80±5.20µM). این ترکیبات حاوی گروه برم در موقعیت کربن شماره پنج حلقه تتراهیدروپیریمیدین خود هستند. همچنین نتایج نشان داد که **M3** بهترین ترکیب در القای آپوپتوز و ترکیب **M4** بهترین ترکیب در افزایش بیان ژن CDKN2A بود.

بحث‌و نتیجه گیری

بررسی رابطه ساختار و فعالیت ترکیبات نشان می دهد که حضور استخلاف برم در موقعیت کربن شماره پنج حلقه تتراهیدروپیریمیدین به علت خاصیت الکترون کشندگی و لیپوفیلیسیته بالا نسبت به متیل باعث افزایش اثر گشته و در مورد استخلاف‌های موجود بر روی حلقه فنیل احتمالاً می‌توان گفت وجود استخلاف الکترون‌کشنده و لیپوفیل در موقعیت پارای حلقه فنیل موجب افزایش اثر سمیت سلولی ترکیب می‌شود؛ اما وجود استخلاف به صورت همزمان در موقعیت پارا و متای حلقه فنیل احتمالاً به علت تغییر کانفورماسیون و تشکیل پیوند هیدروژنی درون مولکولی بین گروه دهنده و گیرنده هیدروژن و احتمالاً کاهش میزان درگیری با جایگاه فعال، باعث کاهش اثر می‌گردد.

کلیدواژه: سرطان، تتراهیدروپیریمیدین، سمیت سلولی، آپوپتوز، چرخه سلولی

فهرست

فصل اول: مقدمه..... ۱

۱-۱- تعریف سرطان ۲

۱-۲-تاریخچه سرطان ۲

۱-۳- پاتوژنز سرطان ۲

۱-۳-۱- بیولوژی تومور..... ۳

۱-۴- اپیدمیولوژی سرطان ۴

۱-۴-۱- اپیدمیولوژی سرطان در ایران..... ۵

۱-۵- تاثیر سرطان بر چرخه‌سلولی ۶

۱-۶- نقش آپوپتوز در پاتوژنز سرطان ۸

۱-۷- عوامل پرخطر برای سرطان ۱۰

۱-۸- درمان سرطان ۱۰

۱-۸-۱- جراحی..... ۱۱

۱-۸-۲- پرتودرمانی..... ۱۱

۱-۸-۳- شیمی درمانی..... ۱۲

۱-۸-۴- ایمنی درمانی..... ۱۲

۱-۸-۵- هورمون درمانی..... ۱۴

۱-۸-۶- درمان های پیشرفته و مدرن سرطان..... ۱۴

۱-۹- سرطان معده ۱۵

۱-۹-۱- اپیدمیولوژی سرطان معده ۱۶
۱-۹-۲- عوامل خطر سرطان معده ۱۷
۱-۹-۳- درمان سرطان معده ۱۸
۱-۱۰- واکنش‌های چند جزئی و روش بیجینلی ۱۹
۱-۱۱- تتراهیدروپیریمیدین ها (THPMs) ۲۰
۱-۱۲- مروری بر مطالعات انجام شده در خصوص اثر ضد سرطانی ترکیبات تتراهیدروپیریمیدینی ۲۲
فصل دوم : مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها ۲۷
۲-۱- نوع مطالعه ۲۸
۲-۲- مکان انجام مطالعه ۲۸
۲-۳- مواد و تجهیزات مصرفی ۲۸
۲-۳-۱- مواد و تجهیزات استفاده شده در بخش سنتز ۲۸
۲-۳-۲- مواد و تجهیزات استفاده شده در بخش ارزیابی‌های زیستی ۲۹
۲-۴- دستگاه‌ها ۳۰
۲-۵- رده سلولی استفاده شده در ارزیابی های زیستی ۳۲
۲-۶- نرم افزارها ۳۲
۲-۷- نحوه سنتز ترکیبات ۳۲
۲-۷-۱- روش سنتز کاتالیزورکبالت هیدروژن سولفات $Co(HSO_4)_2$ ۳۲
۲-۷-۲- روش کلی سنتز مشتقات ۶-آریل-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **(M1-M8)** ۳۳

۲-۷-۲-۱- روش سنتز ۶-(۳و۴-دی متوکسی فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **(M1)** ۳۳

۲-۷-۲-۲- روش سنتز ۶-(۴-هیدروکسی-۳- متوکسی فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **(M2)** ۳۴

۲-۷-۲-۳- روش سنتز ۵-برومو -۶-(۳و۴-دی متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **(M3)** ۳۴

۲-۷-۲-۴- روش سنتز ۵-برومو- ۶-(۴-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **(M4)** ۳۴

۲-۷-۲-۵- روش سنتز ۵-متیل- ۶-(۴-نیترو فنیل)- ۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **(M5)** ۳۵

۲-۷-۲-۶- روش سنتز ۶-(۴-برومو فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **(M6)** ۳۵

۲-۷-۲-۷- روش سنتز ۶-(۴-هیدروکسی فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **(M7)** ۳۵

۲-۷-۲-۸- روش سنتز ۶-(۳-اتوکسی-۴- هیدروکسی فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **(M8)** ۳۶

۲-۸- شناسایی و تایید ساختار ترکیبات سنتز شده با استفاده از روش‌های طیف سنجی ۳۶

۲-۸-۱- طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) ۳۷

۲-۸-۲- طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته (NMR) ۳۸

۲-۸-۳- طیف سنجی جرمی(MS) ۳۹

۲-۹- ارزیابی زیستی ۴۰

۲-۹-۱- روش بررسی سمیت سلولی ترکیبات سنتز شده بر روی رده سلولی سرطان معده (AGS)..... ۴۰

۲-۹-۱-۱- استرلیزاسیون ۴۰

۲-۹-۱-۲- ذوب کردن ویال حاوی سلول ۴۱

۲-۹-۱-۳- آزمایشMTT ۴۱

۲-۹-۲- آنالیز آپوپتوز سلولهای تحت تیمار با ترکیبات شیمیایی سنتز شده ۴۳

۲-۹-۳- آنالیز چرخه سلولی سلول‌های تحت تیمار با ترکیبات شیمیایی سنتز شده از طریق بیان ژن مرتبط با چرخه سلولی (CDKN2A)..... ۴۴

۲-۱۰- آنالیز آماری ۴۵

فصل سوم : نتایج..... ۴۶

۳-۱- شناسایی، تایید ساختار و مقادیر ترکیبات سنتز شده ۴۷

۳-۱-۱- ترکیب ۶-(۳و۴-دی متوکسی فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M1**)..... ۴۷

۳-۱-۲- ترکیب ۶-(۴-هیدروکسی-۳- متوکسی فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M2**)..... ۴۸

۳-۱-۳- ترکیب ۵-برومو- ۶-(۳و۴-دی متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M3**)..... ۴۹

۳-۱-۴- ترکیب ۵-برومو- ۶-(۴-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M4**)..... ۵۰

۳-۱-۵- ترکیب ۵-متیل- ۶-(۴-نیترو فنیل)- ۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M5**)..... ۵۱

۳-۱-۶- ترکیب ۶-(۴-برومو فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M6**) ۵۲

۳-۱-۷- ترکیب ۶-(۴-هیدروکسی فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M7**) ۵۳

۳-۱-۸- ترکیب ۶-(۳-اتوکسی-۴- هیدروکسی فنیل)-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M8**) ۵۴

۳-۲- بررسی اثرات بیولوژیک ترکیبات سنتز شده ۵۴

۳-۲-۱- ارزیابی نتایج سمیت سلولی ترکیبات سنتز شده بر روی رده سلولی سرطان معده (AGS) ۵۵

۳-۲-۲- نتایج آنالیز آپوپتوز ۵۶

۳-۲-۳- نتایج آنالیز مولکولی ۵۸

فصل چهارم : بحث و نتیجه‌گیری ۵۹

۴-۱- بحث و نتیجه‌گیری ۶۰

۴-۱-۱- روش کلی سنتز مشتقات ۶-آریل-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M1-M8**) ۶۰

۴-۱-۲- مکانیسم سنتز مشتقات ۶-آریل-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M1-M8**) ۶۰

۴-۲- بررسی طیف‌سنجی ترکیبات ۶۱

۴-۲-۱- طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) ۶۱

۴-۲-۲- طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته (^{1}H-NMR) ۶۴

۴-۲-۳- طیف سنجی جرمی (MS) ۶۵

۴-۳- ارزیابی زیستی ۶۸

۴-۳-۱- مقایسه و بررسی ساختار و اثرات بیولوژیک ترکیبات سنتز شده ۶۸

۴-۳-۲- آنالیز آپوپتوز ۷۵

۴-۳-۳-آنالیز مولکولی ۷۵

۴-۴- نتیجه‌گیری ۷۶

۴-۵-پیشنهادات ۷۸

منابع و مأخذ ۷۹

پیوست‌ها ۸۴

Abstract ۱۲۵

فهرست عکس‌ها و نمودارها

شکل۱-۱ توزیع انواع اصلی سرطان (هر دو جنس) در سطح جهانی و ارزیابی تنوع جغرافیایی..... ۴

شکل۱-۲ روند اپیدمیولوژیک تخمین زده شده توسط WHO برای پنج علت اصلی مرگ ، از سال ۲۰۱۶ تا ۲۰۶۰..... ۵

شکل۱-۳ شایع ترین سرطان ها در ایران (هر دو جنس)..... ۶

شکل ۱-۴ چرخه سلولی دارای چهار مرحله است:G1(Gap1) وS (سنتز) و G2 (Gap2) و M(میتوز). در پایان فاز G1، سلول‌ها از نقطه محدودیت عبور می‌کنند. مکانیسم‌های نظارتی پیچیده در چندین نقطه از چرخه سلولی عمل می‌کنند و هنگامی که یک ناهنجاری تشخیص داده می‌شود، متوقف می‌شود..... ۸

شکل۱-۵ نقش آپوپتوز در پاتوژنز سرطان..... ۹

شکل۱-۶ نمودار شماتیکی که اصول اولیه شیمی درمانی (A)، کلاس های مختلف داروهای شیمی درمانی (B) و مکانیسم های ایمنی درمانی و هدف قرار دادن سلول های سرطانی (C) را نشان می دهد..... ۱۳

شکل۱-۷ ساختار شیمیایی داروی فلوکسی مسترون، فلوتامید و تاموکسیفن..... ۱۴

شکل۱-۸ گسترش سلول‌های سرطانی معده..... ۱۵

شکل۱-۹ شیوع انواع سرطان در ایران..... ۱۷

شکل۱-۱۰ ساختار شیمیایی داروهای ۵-فلورو اوراسیل و لکوورین کلسیم..... ۱۸

شکل۱-۱۱ ساختار شیمیایی داروهای سیکلوفسفامید، پردنیزولون و دوکسوروبیسین..... ۱۹

شکل۱-۱۲ سنتز ترکیبات تتراهیدروپیریمیدین (واکنش بیجینلی)..... ۲۰

شکل۱-۱۳ ساختار شیمیایی داروی نیفدیپین..... ۲۱

شکل۱-۱۴ رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس. سلول‌های شاهد به مدت ۴ ساعت با ۰.۴٪ DMSO (a و b) یا ۶۸ میکرومولار مونسترول (c و d) تیمار شدند. تفاوتی در توزیع میکروتوبول ها و کروماتین در سلول های اینترفاز (b و d) مشاهده نشد. درمان سلول‌های میتوزی با مونسترول، دوک دوقطبی طبیعی (a) را با یک آرایه میکروتوبولی که توسط کروموزوم ها (c) احاطه شده است، جایگزین می کند..... ۲۲

شکل۱-۱۵ ساختار شیمیایی ترکیب مونسترول..... ۲۲

شکل۱-۱۶ساختار شیمیایی آنالوگ های مختلف مونسترول با اثر بخشی بهتر..... ۲۳
شکل۱-۱۷ ساختارشیمیایی ترکیب موثر بر رده های سلولی HeLa وMCF-7..... ۲۴
شکل۱-۱۸ ساختارشیمیایی ترکیب موثر بر رده های سلولی A549، HepG-2، MCF-7..... ۲۴
شکل۱-۱۹ساختارشیمیایی ترکیب موثر بر رده های سلولی AGS،HepG-2،MCF-7..... ۲۵
شکل۱-۲۰ ساختارشیمیایی وIC_{50} ترکیبات موثر بر رده ی سلولی HeLa ۲۶
شکل۱-۲۱ توزیع فاز های مختلف چرخه سلولی در سلول‌های شاهد (A) و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های IC_{50} و $2IC_{50}$ به مدت۲۴ساعت (B)..... ۲۶
شکل ۲-۱ انواع ارتعاشات مولکولی..... ۳۷
شکل ۳-۱ نمودارهای دوز-پاسخ ترکیبات سنتز شده بر اساس میزان بقای سلول‌ها در ۲۴ ساعت..... ۵۶
شکل ۳-۲ هیستوگرام فلوسیتومتری سلول های AGS تیمار شده با ترکیبات انتخابی(**M3** و **M4**) به مدت ۲۴ ساعت در مقابل کنترل مثبت و منفی..... ۵۷
شکل ۳-۳ سطوح بیان ژن‌های P53، CDKN2A و کاسپاز۸-۹ پس از تیمار سلول‌های AGS با ترکیبات انتخابی (**M3** و **M4**) به مدت ۲۴ ساعت..... ۵۸
شکل۴-۱ سنتز کلی مشتقات ۶-آریل-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید ۶۰
شکل۴-۲ مکانیسم سنتز مشتقات ۶-آریل-۵-متیل-۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید.... ۶۱
شکل۴-۳ طیف FT-IR ترکیب ۵-برومو -۶-(۳و۴-دی متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M3**)..... ۶۳
شکل۴-۴طیف ^{1}H-NMR ترکیب ۵-برومو- ۶-(۳و۴-دی متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M3**)..... ۶۵
شکل ۴-۵ قطعات شکسته شده ترکیب ۵-برومو- ۶-(۳و۴-دی متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M3**) درطیف سنجی جرمی..... ۶۷

شکل ۴-۶ طیف سنجی جرمی ترکیب ۵-برومو- ۶-(۳و۴-دی متوکسی فنیل) -۲-اکسو-۱و۲و۳و۶-تتراهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (**M3**)..... ۶۸

شکل ۴-۷ مقایسه ساختار شیمیایی ترکیب **M1** و **M2**..... ۶۹

شکل ۴-۸ مقایسه ساختار شیمیایی ترکیب **M1** و **M3**..... ۷۰

شکل ۴-۹ مقایسه ساختار شیمیایی ترکیب **M2** و **M7**..... ۷۰

شکل ۴-۱۰مقایسه ساختار شیمیایی ترکیب **M1** و **M5**..... ۷۱

شکل ۴-۱۱ مقایسه ساختار شیمیایی ترکیب **M2** و **M8**..... ۷۲

شکل ۴-۱۲ مقایسه ساختار شیمیایی ترکیبات **M5**، **M6** و **M7**..... ۷۳

شکل ۴-۱۳ مقایسه ساختار شیمیایی ترکیبات **M3** و **M4**..... ۷۴

شکل ۴-۱۴ بررسی رابطه‌ی ساختار و اثر ترکیب موثر بر رده سلولی سرطان معده (AGS) با بالاترین میزان اثربخشی ۷۴

فهرست جدول‌ها

جدول ۲-۱. لیست مواد و تجهیزات مورد استفاده در بخش سنتز..... ۲۸

جدول ۲-۲. لیست مواد و تجهیزات مورد استفاده در بخش ارزیابی زیستی..... ۲۹

جدول ۲-۳. لیست دستگاه های مورد استفاده..... ۳۰

جدول ۲-۴. لیست نرم افزار های مورد استفاده..... ۳۲

جدول ۳-۱. IC_{50} (µM) ترکیبات سنتزشده بر روی رده سلولی سرطان معده (AGS) ۵۵

فهرست علائم، نشانه‌ها و اختصارات

GC: cancer Gastric

EBV: Epstein Barr Virus

5-FU: 5-Fluorouracil

MCR: Multicomponent reaction

THPMs: Tetrahydropyrimidine

PBS: Phosphate buffer solution

FBS: Fetal Bovine Serum

FT-IR: Fourier Transform- Infrared Spectroscopy

^{1}H-NMR: ^{1}H-Nuclear Magnetic Resonance

^{13}C-NMR: ^{13}C-Nuclear Magnetic Resonance

GC-MS: Gas Chromatography–Mass Spectrometer

MTT: Measure cellular metabolism

RPMI1640: Rosewall Park Memorial Institute 1640

DMSO: Dymethil sulfoxide

IC_{50}: Inhibitory Concentration

CDKN2A: Cyclin dependent kinases

RT-qPCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

$2^{-\Delta\Delta CT}$: The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method is a convenient way to analyze the relative changes in gene expression from real time quantitative PCR experiments