بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه دکترای داروسازی

عنوان :

سنتز و بررسی اثر ترکیبات جدید N– (تیوفن–۲–کربونیل) تیواوره بر رده ی سلولی AGS از طریق سنجش مهاجرت سلولی

اساتید راهنما :

دکتر نیما رزاقی اصل

دکتر محسن سقا

استاد مشاور:

دکتر جعفر عباسی شیران

نگارنده:

غزاله ره‌گوی

خرداد ۱۴۰۳

شماره پایان نامه : د – ۲۲۰

حق چاپ، نشر و مالکیت معنوی پایان‌نامه

۱. هرگونه کپی برداری به صورت کل یا بخشی از پایان نامه تنها با موافقت استاد راهنما مجاز است.

۲. کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل است و بدون اجازه کتبی دانشگاه به شخص ثالث قابل واگذاری نیست.

۳. استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر منبع مجاز نیست.

بسمه تعالی

اظهارنامه دانشجو

اینجانب غزاله ره‌گوی دانشجوی دکترای داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، گواهی می‌نمایم که تحقیقات ارائه شده در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده و صحت و اصالت مطالب نگارش شده مورد تأیید بوده و در مورداستفاده از کار دیگر محققان به مرجع مورداستفاده اشاره شده است. بعلاوه گواهی می‌نمایم که مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی توسط اینجانب یا فرد دیگری در هیچ جا ارائه نشده است و در تدوین پایان‌نامه چارچوب مصوب دانشگاه را به طور کامل رعایت کرده‌ام.

امضا دانشجو:

تاریخ:

تقدیم به استوارترین تکیه‌گاهم در این دنیا، پدر عزیزم

تقدیم به روح آسمانی مادرم

و تقدیم به خواهر و برادرم همیشه حامی و پشتوانه من در زندگی هستند.

از اساتید گرامی جناب آقای دکتر نیما رزاقی اصل و آقای دکتر محسن سقا بسیار سپاس‌گزارم چرا که بدون راهنمایی‌های این بزرگواران تکمیل این پایان‌نامه بسیار دشوار می‌بود

و متشکرم از آقای دکتر جعفر عباسی و سرکار خانم آزاده اقوامی تهرانی به‌خاطر یاری‌ها و راهنمایی‌های ایشان که سختی‌ها را برایم آسان‌تر نمودند.

چکیده فارسی

مقدمه و هدف:

سرطان معده یکی از بدخیمی‌های دستگاه گوارش است که از سلول‌های اپیتلیال جدار معده منشأ می‌گیرد. با وجود روند کاهشی بروز سرطان معده در سال‌های اخیر، این سرطان همچنان از علل مهم مرگ‌ومیر در سراسر جهان محسوب می شود. اگرچه روش‌های درمانی سرطان معده در دهه‌های گذشته پیشرفت بسیاری داشته است، اما عمدتاً به دلیل متاستاز و مقاومت دارویی، پاسخ به درمان و میزان بقای کلی بیماران چندان رضایت‌بخش نیست. مهار تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی یک راهکار مهم برای درمان سرطان است و بررسی ترکیبات جدیدی که بر این فرایندها تأثیر می‌گذارند، می‌تواند به ما در یافتن راهکارهای جدید برای توسعهٔ درمان مراحل پیشرفته سرطان کمک کند. در مطالعه حاضر، چهار ترکیب جدید N- (تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره با هدف بررسی اثر سایتوتوکسیک این ترکیبات و تأثیر آن‌ها بر مهار مهاجرت ردهٔ سلولی AGS سنتز شد.

مواد و روش‌ها:

تعدادی از مشتقات جدید N- (تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره طراحی، به روش سنتز تک ظرفی سنتز و شناسایی ساختاری شدند و در مرحلهٔ بعد، میزان سایتوتوکسیسیتی ترکیبات سنتز شده از طریق تست MTT و اثر مهاری آن‌ها بر مهاجرت سلول‌های سرطانی AGS (سلول‌های سرطانی معده) با استفاده از تست ترمیم زخم بررسی شد.

یافته‌ها:

سلول‌های سرطانی AGS تیمار شده با ترکیب R4 در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب با درصد زنده‌مانی ۴۰/۵۷، ۹/۴۴ و ۳/۱۵، زنده‌مانی پایین تری نسبت به سلول‌های تیمار شده با سایر ترکیبات داشته‌اند و این نتیجه نشانگر آن است که ترکیب R4 سایتوتوکسیک‌تر از سایر ترکیبات می‌باشد. ترکیب R4 در مهار مهاجرت ردهٔ سلولی AGS نیز بهتر از سایر ترکیبات عمل کرده و نتایج نشان داده است که این ترکیب نسبت به گروه کنترل تا حدی اثر مهار کنندگی بر مهاجرت داشته است. در حالی که ترکیبات دیگر هیچ اثر بازدارندگی بر مهاجرت نداشته و نتایج تست ترمیم زخم ترکیبات R1، R2 و R3 مشابه گروه کنترل بود.

بحث و نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج حاصل، ترکیب R4 با داشتن استخلاف کلر در موقعیت پارای حلقهٔ فنیل بیشترین اثر سایتوتوکسیک و همچنین بیشترین اثر مهارکنندگی مهاجرت سلولی را نشان داد که می‌توان این اثر را احتمالا به افزایش لیپوفیلیسیتهٔ ترکیب مورد نظر مرتبط ساخت و ترکیب R4 را به عنوان یک الگوی مناسب برای توسعهٔ بیشتر ساختارهای N- (تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره مهارکنندهٔ مهاجرت سلولی در ردهٔ سلولی AGS معرفی کرد.

کلمات کلیدی:

سرطان معده، N- (تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره، سیتوتوکسیسیتی، مهاجرت سلولی

فهرست مطالب

فصل ۱: مقدمه ۱

۱-۱- سرطان ۲

۱-۲- سرطان معده ۴

۱-۲-۱- شیوع سرطان معده ۵

۱-۲-۲- ریسک فاکتورهای سرطان معده ۶

۱-۲-۳- علائم سرطان معده ۷

۱-۲-۴- درمان سرطان معده ۸

۱-۳- متاستاز ۹

۱-۳-۱- مهاجرت سلول‌های سرطانی ۱۰

۱-۳-۲- گذر از حالت اپیتلیالی به مزانشیمی ۱۲

۱-۴- طراحی ترکیبات مهارکنندهٔ مهاجرت سلولی ۱۳

۱-۴-۱- تیواوره و مشتقات آن ۱۴

۱-۴-۲- تیوفن و مشتقات آن ۱۶

۱-۴-۳- طراحی ترکیبات بر پایهٔ تیواوره و تیوفن ۱۶

۱-۴-۴- روش سنتز تک ظرفی ۱۸

۱-۵- خواص دارویی مشتقات آروئیل تیواوره ۱۹

۱-۵-۱- پژوهش های پیشین بر روی اثرات ضدمهاجرتی مشتقات تیواوره و تیوفن ۱۹

۱-۶- فلوچارت تحقیق ۲۲

فصل ۲: مواد، دستگاه ها و روش ها ۲۴

۲-۱- مواد و تجهیزات مصرفی ۲۴

۲-۱-۱- مواد و تجهیزات استفاده شده در بخش سنتز ۲۴

۲-۱-۲- مواد و تجهیزات استفاده شده در ارزیابی های زیستی ۲۵

۲-۲-دستگاه ها ۲۷

۲-۳- نرم افزار ها ۲۹

۲-۴- سنتز و شناسایی ساختاری مشتقات جدید N-(تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره ۳۰

۲-۴-۱- سنتز *N1*-فنیل-*N3*-(تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره *(R1)* ۳۰

۲-۴-۲- سنتز *N1*-(تیوفن-۲-ئیل متیل)-*N3*-(تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره *(R2)*.....۳۱
۲-۴-۳- سنتز *N1*-(۴-فلوئوروفنیل متیل)-*N3*-(تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره *(R3)* ۳۲
۲-۴-۴- سنتز*N1* -(۴-کلروفنیل متیل)-*N3*-(تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره *(R4)*.....۳۴
۲-۵- ارزیابی های زیستی ۳۵
۲-۵-۱- مواد و محلول‌های استفاده شده در ارزیابی های زیستی ۳۵
۲-۵-۱-۱- محیط کشتDMEM ۳۵
۲-۵-۱-۲- سرم جنین گاوی (FBS) ۳۶
۲-۵-۱-۳- بافر فسفات (PBS) ۳۶
۲-۵-۱-۴- Trypsin/EDTA.....۳۷
۲-۵-۱-۵- محلول MTT ۳۷
۲-۵-۲- کشت سلولی ۳۷
۲-۵-۲-۱- دفریز سلول های منجمد ۳۷
۲-۵-۲-۲- تعویض محیط کشت سلولی.....۳۸
۲-۵-۲-۳- پاساژ سلولی.....۳۸
۲-۵-۲-۴- انجماد سلولی.....۳۹
۲-۵-۲-۵- شمارش سلول ها ۳۹
۲-۵-۳- بررسی سمیت سلولی به روش *MTT* ۴۰
۲-۵-۳-۱- کشت سلول ها در در پلیت ۹۶ خانه.....۴۰
۲-۵-۳-۲- افزودن ترکیبات سنتزی برای ارزیابی سمیت سلولی ۴۱
۲-۵-۳-۳- شست و شوی دارو.....۴۱
۲-۵-۳-۴- افزودن MTT و ارزیابی سمیت سلولی ۴۱
۲-۵-۴- ارزیابی خاصیت مهارکنندگی مهاجرت سلولی به روش ترمیم زخم ۴۲
۲-۵-۴-۱- کشت سلول های سرطانی درون پلیت ۲۴ خانه.....۴۲
۲-۵-۴-۲- ایجاد زخم سلولی ۴۲
۲-۵-۴-۳- افزودن ترکیبات سنتزی برای ارزیابی اثر ضد مهاجرتی ۴۲
۲-۵-۵- بررسی داده های آماری ۴۳
فصل ۳: نتایج ۴۳
۳-۱- سنتز مشتقات جدید N-(تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره ۴۴
۳-۲- شناسایی و تایید ساختار ترکیبات سنتز شده توسط طیف های اسپکتروسکوپی ۴۵
۳-۲-۱- طیف سنجی فروسرخ *(IR)* ۴۵

۳-۲-۲- طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته *(NMR)* ۴۶
۳-۲-۳- طیف سنجی جرمی *(Mass)* ۴۷
۳-۳- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، فارماکوکینتیک و دارو-همانندی پیش‌بینی‌شده برای ترکیبات سنتزی ۴۸
۳-۳-۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پیش‌بینی شده برای ترکیبات سنتزی ۴۸
۳-۳-۳- ویژگی‌های فارماکوکینتیک پیش‌بینی شده برای ترکیبات سنتزی ۵۰
۳-۴- نتایج ارزیابی‌های زیستی ۵۱
۳-۴-۱- نتایج ارزیابی سمیت سلولی با روش *MTT* ۵۱
۳-۴-۲- نتایج اثر مهارکنندگی مهاجرت سلولی به روش ترمیم زخم ۵۲
فصل ۴: بحث و نتیجه‌گیری ۵۳
۴-۱- سنتز مشتقات جدید اِن-(تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره و مکانیسم واکنش ۵۴
۴-۲-شناسایی ساختاری و تفسیر طیف های اسپکتروسکوپی ترکیبات سنتز شده ۵۶
۴-۲-۱-طیف سنجی فروسرخ *(IR)* ۵۶
۴-۲-۲- طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته *(NMR)* ۵۷
۴-۲-۳- طیف سنجی جرمی *(Mass)* ۵۹
۴-۳- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، فارماکوکینتیک و دارو-همانندی پیش‌بینی‌شده برای ترکیبات سنتزی ۶۱
۴-۳-۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پیش‌بینی شده برای ترکیبات سنتزی ۶۱
۴-۳-۲- ویژگی‌های فارماکوکینتیک پیش‌بینی شده برای ترکیبات سنتزی ۶۲
۴-۴- ارزیابی‌های زیستی ۶۳
۴-۴-۱- بررسی اثر سمیت سلولی ترکیبات ۶۳
۴-۴-۱-۱- تحلیل آماری ۶۴
۴-۴-۱-۲- بررسی اثر حلال (DMSO) بر سمیت سلولی ۷۱
۴-۴-۲- بررسی اثر مهارکنندگی مهاجرت سلولی به روش ترمیم زخم ۷۲
۴-۵- بررسی اثر ساختار شیمیایی ترکیبات بر فعالیت بیولوژیک ۷۴
۴-۶- نتیجه گیری ۷۶
۴-۷- پیشنهاد ها ۷۷
منابع: ۷۸

فهرست جدول ها

جدول ۲-۱ لیست مواد و تجهیزات شیمیایی مورد استفاده در سنتز ۲۵

جدول ۲-۲ لیست مواد و تجهیزات مورد استفاده در ارزیابی های زیستی ۲۶

جدول ۲-۳ لیست دستگاه های مورد استفاده ۲۷

جدول ۲-۴ لیست نرم افزار های استفاده شده..... ۲۹

جدول ۳-۱ ویژگی های فیزیکوشیمیایی ترکیبات سنتز شده ۵۰

جدول ۳-۲ ویژگی های فارماکوکینتیک ترکیبات سنتز شده ۵۰

جدول ۳-۳ میزان زنده مانی ردۀ سلولی AGS تحت تاثیر غلظت های مختلف ترکیبات سنتز شده ۵۱

جدول ۴-۱ ویژگی های فیزیکوشیمیایی ترکیبات سنتز شده.....۶۱

جدول ۴-۲ ویژگی های فارماکوکینتیک ترکیبات سنتز شده ۶۲

جدول ۴-۳ درصد زنده مانی ردۀ سلولی AGS پس از ۲۴ ساعت تیمار با ترکیبات سنتز شده.....۶۴

جدول ۴-۴ مقایسۀ بین گروهی تاثیر غلظت های مختلف ترکیب R1 بر ردۀ سلولی AGS.....۶۶

جدول ۴-۵ مقایسۀ بین گروهی تاثیر غلظت های مختلف ترکیب R1 بر ردۀ سلولی AGS ۶۷

جدول ۴-۶ مقایسۀ بین گروهی تاثیر غلظت های مختلف ترکیب R1 بر ردۀ سلولی AGS.....۶۸

جدول۴-۷ مقایسۀ بین گروهی تاثیر غلظت های مختلف ترکیب R1 بر ردۀ سلولی AGS ۷۰

فهرست شکل ها و نمودارها

شکل ۱-۱ شیوع سرطان معده در کشورهای مختلف جهان ۴

شکل ۱-۲ آبشار متاستاتیک ۱۰

شکل ۱-۳ ساختار شیمیایی اوره و تیواوره ۱۴

شکل ۱-۴ ساختار شیمیایی تیوفن ۱۶

شکل ۱-۵ ساختار شیمیایی سورافنیب ۱۷

شکل ۱-۶ ساختار کلی مشتقات آروئیل تیواوره ۱۸

شکل ۱-۷ ساختار شیمیایی ترکیب ۱-(۴-متوکسی بنزیل)-۳-(۴-متوکسی بنزوئیل) تیوواوره ۲۰

شکل ۱-۸ ساختار شیمیایی -(۴-کلروفنیل)-۳-(۵-(P-تویلیل)-H۶-۱و۳و۴-تیادیازین-۲ئیل)تیواوره ۲۰

شکل ۱-۹ ساختار شیمیایی PIT-1 ..... ۲۱

شکل ۱-۱۰ ساختار شیمیایی HMQ-T-F5 ..... ۲۱

شکل ۱-۱۱ تعدادی از ترکیبات برپایهٔ تیوفن دارای اثرات مهاری بر روی مهاجرت سلول های سرطانی ۲۲

شکل ۱-۱۲ فلوچارت تحقیق..... ۲۳

شکل ۲-۱ روش سنتز ترکیبات N- (تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره..... ۳۵

شکل ۲-۲ لام نئوبار ۳۹

شکل ۳-۱ طیف IR ترکیب R1 ..... ۴۵

شکل۳-۲ طیف ^{1}H-NMR ترکیب R1 .....۴۶

شکل ۳-۳ طیف ^{13}C-NMR ترکیب R1 ..... ۴۷

شکل ۳-۴ طیف MASS ترکیب R1 ..... ۴۸

شکل ۳-۵ تاثیر ترکیبات سنتز شده در ترمیم زخم ایجاد شده در سلول های ردهٔ AGS..... ۵۲

شکل ۴-۱ مکانیسم تشکیل ترکیبات اِن-(تیوفن-۲-کربونیل) تیواوره ۵۵

شکل ۴-۲ طیف IR ترکیب R1.....۵۶

شکل ۴-۳ طیف H-NMR ترکیب R1 ..... ۵۸

شکل ۴-۴ طیف C-NMR ترکیب R1 ..... ۵۹

شکل ۴-۵ طیف MASS ترکیب R1 ..... ۶۰

شکل ۴-۶ یون-رادیکال های تشکیل شده در طیف سنجی جرمی ترکیب R1 ..... ۶۰

شکل ۴-۷ نمودار BOILED-EGG ترکیبات سنتز شده.....۶۳

شکل ۴-۸ نمودار زنده مانی/غلظت ترکیب R1 .....۶۵

شکل ۴-۹ نمودار زنده مانی/غلظت ترکیب R2 .....۶۷

شکل ۴-۱۰ نمودار زنده مانی/غلظت ترکیب R3 .....۶۸

شکل ۴-۱۱ نمودار زنده مانی/غلظت ترکیب R4.....۶۹

شکل ۴-۱۲ تاثیر DMSO 2% بر سمیت سلولی..... ۷۱

شکل ۴-۱۳ سلول های سرطانی معده در وضعیت مزانشیمی و مهاجرت..... ۷۲

شکل ۴-۱۴ تاثیر ترکیبات سنتز شده در ترمیم زخم ایجاد شده در سلول های ردهٔ AGS در شرایط IN-VITRO ۷۳

شکل ۴-۱۵ مشتقات کربونیل تیواوره مورد مطالعه این گروه پژوهشی..... ۷۵

فهرست علائم، نشانه ها و اختصارات

ECM: Extracellular matrix

AGS: Human gastric cancer cell line

EMT: Epithelial to mesenchymal transition

IR: Infrared

NMR: Nuclear magnetic resonance

DMEM: Dulbecco’s Modified Eagle Medium

FBS: Fetal bovine serum

PBS: Phosphate buffered saline

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid

IC_{50}: Inhibitory concentration 50%