



دانشگاه علوم پزشکی شیراز
دانشکده داروسازی
بخش شیمی دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی
Pharm.D

عنوان:

سنتز مشتقات جدید ناقربنه او ۴- دی هیدروپیریدین حاوی
گروه های استری پیریدیل و آلکیل در موقعیت های C_3 و C_5
حلقه دی هیدروپیریدین و ارزیابی اثرات بیولوژیک آن ها

توسط:

الهام منصورآبادی

به راهنمایی:

دکتر رامین میری

دکتر کتایون جاوید نیا

دکتر امید رضا فیروزی

اردیبهشت ۱۳۸۹



تقدیم بہ ہر امان زندگی ام:

از محظہ ای کہ شکل گرفت

تا این کہ ہستم

و تا جایی کہ خواہم بود...

با احترام بہ پیشگاہ خانوادہ عزیزم کہ تغزل آسمانی چشمانشان در بی تکیہ گاہی، امیدوارم کرد.

باسپاس و تشکر فراوان از اساتید ارجمند، جناب آقای دکتر میری، سرکار خانم دکتر جاویدنیا و جناب آقای دکتر

فیروزی که همواره در طول تحصیل مرا از راهنمایی های خالصانه خود بهره مند نمودند.

با کمال تشکر از اساتید بزرگوار، سرکار خانم دکتر خواب نادیده و سرکار خانم دکتر رسول ایمنی که مراد تصحیح نهایی این پایان

نامه یاری فرمودند.

باتقدیر فراوان از استاد کرامتقدر، جناب آقای دکتر صادقی، سرکار خانم دکتر ادراکی و جناب آقای دکتر مهدی پور که در

پیشبرد این پایان نامه مرا صمیمانه یاری کردند.

باتشکر از سرکار خانم دکتر رضایی، معاونت محترم پژوهشی دانشکده به پاس همکاری صمیمانه اشان.

و باتشکر از تمامی دوستان عزیزم و پرسنل محترم مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی.

چکیده

سنتز مشتقات جدید ناقربینه ۴ا- دی هیدروپیریدین حاوی گروه های استری پیریدیل و آلکیل در موقعیت های C₃ و C₅ حلقه دی هیدروپیریدین و ارزیابی اثرات بیولوژیک آن ها

دکتر رامین میری، دکتر کتایون جاویدنیا، دکتر امید رضا فیروزی، الهام منصورآبادی
دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی

سرطان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در دنیا است که شیوع و مرگ و میر ناشی از آن در نژادهای مختلف، متفاوت است. در حال حاضر، برای درمان سرطان از روش هایی مثل جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی استفاده می شود که شیمی درمانی یکی از معمولترین و پر مصرف ترین این روش ها است. مقاومت به داروهای شیمی درمانی، یکی از موانع موفقیت شیمی درمانی در انواع سرطان های مختلف است. ترکیبات ۴ا- دی هیدروپیریدین، یکی از دسته های اصلی مسددهای کانال کلسیم محسوب می شوند که اخیراً به عنوان یک کلاس جدید ترکیبات مهار کننده مقاومت دارویی در درمان سرطان، مطرح شده اند. امروزه محققان در تلاشند تا داروهای جدیدی کشف کنند که دارای بیشترین اثر بر روی سلول های سرطانی و کمترین اثر بر روی سلول های نرمال داشته باشند.

در این مطالعه، مشتقات جدید ناقربینه ۴ا- دی هیدروپیریدین (۱۴ ترکیب)، طراحی و با روش اصلاح شده هانش سنتز شده اند که دارای استرهای مختلف پیریدیل و آلکیل در موقعیت های C₃ و C₅ و استخلاف های نیتروفنیل و نیتروایمیدازولیل در موقعیت C₄ حلقه دی هیدروپیریدین هستند. این ترکیبات با روش کروماتوگرافی لایه نازک، جداسازی و خالص شدند و با روش های اسپکتروسکوپی IR، Mass و ¹H-NMR مورد تأیید قرار گرفتند. در ادامه، اثرات سمیت سلولی ترکیبات سنتز شده، بر روی ۴ رده سلول سرطانی (Hela, Raji, MCF-7, LS-180) ارزیابی شد و نتایج حاصل با داروی دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت، مقایسه گردید.

محدوده IC₅₀ های این ترکیبات، بین ۶/۴ تا ۸۸/۹ میکرو مولار ارزیابی شد که از بین آن ها، بیشترین فعالیت سمیت سلولی، مربوط به ترکیبات 7g و 7h بود. سپس فعالیت فارماکولوژیک مسدودی کانال کلسیم آن ها با استفاده از غلظت بالای K⁺ بر روی عضله صاف ایلیوم کوچک هندی، به عنوان عارضه جانبی این ترکیبات بررسی شد که در این مرحله، ترکیب 7d به عنوان ضعیفترین ترکیب مسدود کننده کانال کلسیم، معرفی شد. با توجه به نتایج به دست آمده، در مطالعات آتی می توان اثرات مهار کنندگی مقاومت دارویی این ترکیبات را بر روی رده های مختلف سلولی و نیز رابطه ساختمان و اثر آن ها را بررسی کرد.

لغات کلیدی: دی هیدروپیریدین ها، فعالیت سایتوتوکسیک، مسدود کننده های کانال کلسیم

فهرست مندرجات

| صفحه | عنوان |
|-----------|----------------|
| I..... | فهرست مندرجات |
| VIII..... | فهرست اشکال |
| IX..... | فهرست جداول |
| X..... | فهرست نمودارها |
| XI..... | فهرست طیف ها |
| XVI..... | اختصارات |

فصل اول: مقدمه

| | |
|--------|---------------------------------|
| ۱..... | ۱- مقدمه |
| ۱..... | ۱-۱- سرطان |
| ۱..... | ۱-۱-۱- درمان سرطان |
| ۲..... | ۱-۱-۱-۱- جراحی |
| ۲..... | ۱-۱-۱-۲- اشعه درمانی |
| ۳..... | ۱-۱-۱-۳- درمان ایمونولوژیک |
| ۳..... | ۱-۱-۱-۴- شیمی درمانی |
| ۴..... | ۱-۲- طبقه بندی داروهای ضد سرطان |
| ۴..... | ۱-۲-۱- داروهای آلکیله کننده |
| ۵..... | ۱-۲-۲- آنتی متابولیت ها |
| ۵..... | ۱-۲-۳- آنتی بیوتیک های ضد تومور |
| ۶..... | ۱-۲-۴- عوامل ضد میتوزی |

| | |
|----|--|
| ۶ | عوامل هورمونی. ۵-۲-۱-۱ |
| ۶ | مقاومت چند دارویی (MDR). ۲-۱ |
| ۷ | مکانیسم های کلی مقاومت چند دارویی. ۱-۲-۱ |
| ۸ | وابسته به P-گلیکوپروتئین (MDR کلاسیک). ۱-۱-۲-۱ |
| ۹ | وابسته به پروتئین (MRP). ۲-۱-۲-۱ |
| ۱۰ | مکانیسم های دیگر. ۲-۱-۱-۲ |
| ۱۰ | راه های غلبه بر MDR. ۲-۲-۱ |
| ۱۰ | مهار کننده های MDR. ۳-۲-۱ |
| ۱۰ | نسل اول. ۱-۳-۲-۱ |
| ۱۱ | نسل دوم. ۲-۳-۲-۱ |
| ۱۱ | نسل سوم. ۳-۳-۲-۱ |
| ۱۱ | ارزیابی سمیت سلولی. ۴-۲-۱ |
| ۱۲ | روش رنگ سنجی. ۱-۴-۲-۱ |
| ۱۳ | اساس تست MTT. ۲-۴-۲-۱ |
| ۱۵ | ارزیابی قابلیت مهار کنندگی MDR. ۳-۴-۲-۱ |
| ۱۶ | ترکیبات دی هیدروپیریدین. ۳-۱ |
| ۱۶ | ساختار شیمیایی دی هیدروپیریدین ها. ۱-۳-۱ |
| ۲۸ | نقش دی هیدروپیریدین ها در مهار کانال کلسیم. ۴-۱ |
| ۲۸ | رابطه ساختمان و اثر (SAR) ترکیبات ۱ و ۴-دی هیدروپیریدینی. ۱-۴-۱ |
| ۳۱ | اثر مهار کنندگی MDR دی هیدروپیریدین ها. ۵-۱ |
| | رابطه ساختمان و اثر (SAR) ترکیبات دی هیدروپیریدین به عنوان عوامل مهار کننده. ۱-۵-۱ |
| ۳۲ | MDR |

- ۳۳ ۱-۶- کاربرد های دیگر دی هیدروپیریدین ها
- ۳۳ ۱-۶-۱- داروهای ۱ و ۴- دی هیدروپیریدین در درمان صرع
- ۳۴ ۱-۶-۲- مشتقات ۱ و ۴- دی هیدروپیریدینی به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده آدنوزین A_3
- ۳۵ ۱-۶-۳- مشتقات ۱ و ۴- دی هیدروپیریدین به عنوان مهارکننده جذب هورمون تیروئید توسط سلول ها
- ۳۶ ۱-۶-۴- مشتقات ۱ و ۴- دی هیدروپیریدین به عنوان کاهنده قند خون
- ۳۷ ۱-۶-۵- مشتقات ۱ و ۴- دی هیدروپیریدینی به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده آدرنژیک α_{1a} برای درمان هایپرپلازی خوش خیم پروستات
- ۳۸ ۱-۶-۶- اثرات ضدقارچی مشتقات ۱ و ۴- دی هیدروپیریدینی
- ۴۰ ۱-۷- هدف از این مطالعه

فصل دوم: مواد، وسایل و روش کار

- ۴۱ ۲- مواد، وسایل و روش کار
- ۴۱ ۲-۱- مواد
- ۴۳ ۲-۲- دستگاه ها و وسایل
- ۴۵ ۲-۳- حیوانات آزمایشگاهی و رده های سلولی
- ۴۶ ۲-۴- نرم افزار های مورد استفاده
- ۴۷ ۲-۵- روش کار
- ۴۷ ۲-۵-۱- روش کلی سنتز ترکیبات ۱ و ۴- دی هیدرو پیریدینی با استخلاف نا قرینه به روش Dagnino
- ۴۹ ۲-۵-۲- سنتز ۱- متیل-۵- نیتروایمیدازول-۲- کربوکسالدئید
- ۵۰ ۲-۵-۳- روش کلی سنتز آریل استواتات ها

- ۵۰ (3a) ۲-۵-۳-۱- سنتز ۳- (پیریدین-۲- ایل) پروپیل-۳- اکسو بوتانوات
- ۵۱ (3b) ۲-۵-۳-۲- سنتز ۳- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل-۳- اکسو بوتانوات
- ۵۱ (3c) ۲-۵-۳-۳- سنتز ۳- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل-۳- اکسو بوتانوات
- ۵۲ ۲-۵-۴-۴- روش کلی سنتز آلکیل-۳- آمینوکروتونات
- ۵۲ (5a) ۲-۵-۴-۱- سنتز متیل-۳- آمینوکروتونات
- ۵۳ (5b) ۲-۵-۴-۲- سنتز اتیل-۳- آمینوکروتونات
- ۵۳ (5c) ۲-۵-۴-۳- سنتز ایزوپروپیل-۳- آمینوکروتونات
- ۵۴ ۲-۵-۵-۵- روش کلی سنتز ۱و۴- دی هیدرو پیریدین با استخلاف نا قرینه
- ۲-۵-۵-۱- سنتز ۳- متیل-۵- (۳- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۶و۲- دی متیل-۴- (۴-)
- ۵۵ (7a) ۲-۵-۵-۱- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
- ۲-۵-۵-۲- سنتز ۳- متیل-۵- (۳- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۶و۲- دی متیل-۴- (۳-)
- ۵۶ (7b) ۲-۵-۵-۱- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
- ۲-۵-۵-۳- سنتز ۳- اتیل-۵- (۳- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۶و۲- دی متیل-۴- (۴-)
- ۵۷ (7c) ۲-۵-۵-۱- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
- ۲-۵-۵-۴- سنتز ۳- متیل-۵- (۳- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۶و۲- دی متیل-۴- (۲-)
- ۵۸ (7d) ۲-۵-۵-۱- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
- ۲-۵-۵-۵- سنتز ۳- اتیل-۵- (۳- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۶و۲- دی متیل-۴- (۳-)
- ۵۹ (7e) ۲-۵-۵-۱- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
- ۲-۵-۵-۶- سنتز ۳- ایزوپروپیل-۵- (۳- (پیریدین-۲- ایل) پروپیل)-۶و۲- دی متیل-۴- (۳-)
- ۶۰ (7f) ۲-۵-۵-۱- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
- ۲-۵-۵-۷- سنتز ۳- ایزوپروپیل-۵- (۳- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۶و۲- دی متیل-۴- (۳-)
- ۶۱ (7g) ۲-۵-۵-۱- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات

- ۲-۵-۸- سنتز ۳-ایزو پروپیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۲و۶- دی متیل-۴-(۳-۴)-
 ۶۲ نیترو فنیل-۱و۴- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7h).....
- ۲-۵-۹- سنتز ۳-اتیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲و۶- دی متیل-۴-(۳-۴)-
 ۶۳ نیترو فنیل-۱و۴- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7i).....
- ۲-۵-۱۰- سنتز ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲و۶- دی متیل-۴-(۱-۱)- متیل-
 ۶۴ ۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل-۱و۴- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7j) ...
- ۲-۵-۱۱- سنتز ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۲و۶- دی متیل-۴-(۱-۱)- متیل-
 ۶۵ ۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل-۱و۴- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7k) ..
- ۲-۵-۱۲- سنتز ۳-اتیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲و۶- دی متیل-۴-(۱-۱)- متیل-
 ۶۶ ۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل-۱و۴- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7l) ...
- ۲-۵-۱۳- سنتز ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۲و۶- دی متیل-۴-(۱-۱)- متیل-
 ۶۷ ۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل-۱و۴- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7m) .
- ۲-۵-۱۴- سنتز ۳-ایزو پروپیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۲و۶- دی متیل-۴-(۱-۱)-
 متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل-۱و۴- دی هیدرو پیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
 ۶۸ (7n)
- ۶۹ ۲-۶- کشت سلولی.....
- ۶۹ ۲-۶-۱- واکشت.....
- ۷۰ ۲-۶-۱- واکشت سلول های چسبنده.....
- ۷۰ ۲-۶-۱- واکشت سلول های سوسپانسیونی.....
- ۷۱ ۲-۶-۲- معرفی رده های سلولی مورد مطالعه.....
- ۷۱ ۲-۶-۱-۲-۱- MCF-7.....
- ۷۱ ۲-۶-۲-۲-۱- LS-180.....

| | |
|------|---|
| ۷۱ |Hela -۳-۲-۶-۲ |
| ۷۱ |Raji -۴-۲-۶-۲ |
| ۷۱ |مراحل کشت سلول -۳-۶-۲ |
| ۷۲ |آماده سازی ترکیبات -۴-۶-۲ |
| ۷۴ |نحوه ارزیابی سمیت سلولی ترکیبات -۵-۶-۲ |
| ۷۲-۷ |ارزیابی اثر فارماکولوژیک (مسدود کانال کلسیمی) آنالوگ های دی هیدروپیریدینی سنتز شده |
| ۷۶ | |
| ۷۶ |تهیه محلول های مورد نیاز -۱-۷-۲ |
| ۷۶ |طرز تهیه محلول تیروید جهت ایلئوم -۱-۱-۷-۲ |
| ۷۷ |روش تهیه محلول های مورد نظر از مشتقات دی هیدروپیریدینی سنتز شده -۲-۱-۷-۲ |
| ۷۸ |تهیه ایلئوم مجزای خوکچه هندی و مراحل کار بر روی آن -۲-۷-۲ |
| ۸۱ |روش های آماری مورد استفاده -۱-۷-۲ |
| ۸۲ |بررسی کانفورماسیون ترکیبات سنتز شده -۸-۲ |

فصل سوم: نتایج

| | |
|-----|--|
| ۸۳ |نتایج -۳ |
| ۸۳ |نتایج حاصل از سنتز آنالوگ های ناقصه جدید ۱و۴- دی هیدروپیریدینی -۱-۳ |
| ۱۳۴ |نتایج حاصل از آزمون سمیت سلولی -۲-۳ |
| |نتایج حاصل از ارزیابی اثر فارماکولوژیک آنالوگ های ۱و۴- دی هیدروپیریدینی سنتز شده -۳-۳ |
| ۱۵۲ | |
| ۱۵۴ |نتایج حاصل از آنالیز کانفورماسیون ترکیبات مورد مطالعه -۴-۳ |

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

| | |
|-----|--------------------------|
| ۱۵۹ |بحث و نتیجه گیری -۴ |
|-----|--------------------------|

۱۷۲ ۴-۱- پیشنهاد ها برای مطالعات آتی

۱۷۳ منابع و مأخذ

۱۸۱ چکیده انگلیسی

فهرست اشکال

| عنوان | صفحه |
|--|------|
| شکل ۱-۱: عمل پمپ P-gp..... | ۹ |
| شکل ۱-۲: روش کلی سنتز ترکیبات ۱ و ۴- دی هیدرو پیریدینی مورد نظر با استخلاف نا قرینه به روش Dagnino..... | ۴۷ |
| شکل ۲-۲: روش کلی سنتز آریل استو استات ها..... | ۴۸ |
| شکل ۳-۲: روش کلی سنتز آلکیل-۳- آمینوکروتونات..... | ۴۸ |
| شکل ۴-۲: روش سنتز ۱- متیل-۵- نیتروایمیدازول-۲- کربوکسالدهید..... | ۴۹ |
| شکل ۵-۲: انقباض فازیک و تونیک حاصل از KCl بر روی عضله صاف ایلئوم کوچکه هندی..... | ۸۰ |
| شکل ۱-۳: نمایش کانفورمر پایدار ترکیبات مورد مطالعه..... | ۱۵۴ |
| شکل ۱-۴: مکانیزم تشکیل آمینوکروتونات..... | ۱۶۰ |
| شکل ۲-۴: مکانیزم تشکیل ترکیبات ۱ و ۴- دی هیدروپیریدینی..... | ۱۶۴ |
| شکل ۳-۴: تعدادی از شکست های مطلوب مربوط به ترکیب ۳- متیل-۵- (۳- پیریدین-۳- ایل) پروپیل-۲- و ۶- دی متیل-۴- (۲- نیتروفنیل)-۱ و ۴- دی هیدروپیریدین-۳- و ۵- دی کربوکسیلات..... | ۱۶۶ |

(7d)

فهرست جداول

| عنوان | صفحه |
|---|------|
| جدول ۱-۱: مکانیسم های اصلی مقاومت دارویی سلول های تومور..... | ۸ |
| جدول ۱-۳: نتایج حاصل از سنتز آنالوگ های جدید ۱و ۴- دی هیدروپیریدین..... | ۸۵ |
| جدول ۲-۳: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی Hela..... | ۱۳۵ |
| جدول ۳-۳: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی MCF-7..... | ۱۳۷ |
| جدول ۴-۳: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n و در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی LS-180..... | ۱۳۹ |
| جدول ۵-۳: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی Raji..... | ۱۴۱ |
| جدول ۳-۶: IC_{50} ترکیبات ۱و ۴- دی هیدروپیریدین و دوکسوروبیسین در ۴ رده سلول در غلظت $100 \mu M$ | ۱۴۳ |
| جدول ۳-۷: مقدار $IC_{50} \pm$ خطای استاندارد جهت شل کردن انقباض ناشی از KCl (40 mM) در ایلنوم خوکچه هندی..... | ۱۵۳ |
| جدول ۳-۸: زوایای دی هیدرال ترکیبات دی هیدروپیریدینی سنتز شده و نیفدیپین..... | ۱۵۸ |
| جدول ۴-۱: ترتیب سمیت سلولی آنالوگ های دی هیدروپیریدینی سنتز شده بر اساس میزان IC_{50} آن ها بر ۴ رده سلول سرطانی..... | ۱۶۷ |

فهرست نمودارها

| عنوان | صفحه |
|--|------|
| نمودار ۱-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های Hela بر اثر ترکیبات دی هیدروپیریدینی سنتز شده و دوکسوروبیسین..... | ۱۴۴ |
| نمودار ۲-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های MCF-7 بر اثر ترکیبات دی هیدروپیریدینی سنتز شده و دوکسوروبیسین..... | ۱۴۶ |
| نمودار ۳-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های LS-180 بر اثر ترکیبات دی هیدروپیریدینی سنتز شده و دوکسوروبیسین..... | ۱۴۸ |
| نمودار ۴-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های Raji بر اثر ترکیبات دی هیدروپیریدینی سنتز شده و دوکسوروبیسین..... | ۱۵۰ |

فهرست طیف ها

| عنوان | صفحه |
|--|------|
| طیف ۱-۳: طیف IR مربوط به ۱- متیل-۵- نیتروایمیدازول-۲- کربوکسالدهید..... | ۸۵ |
| طیف ۲-۳: طیف IR مربوط به ۳-(پیریدین-۲- ایل) پروپیل-۳- اکسو بوتانوات (3a)..... | ۸۶ |
| طیف ۳-۳: طیف IR مربوط به ۳-(پیریدین-۳- ایل) پروپیل-۳- اکسو بوتانوات (3b)..... | ۸۷ |
| طیف ۴-۳: طیف IR مربوط به ۳-(پیریدین-۴- ایل) پروپیل-۳- اکسو بوتانوات (3c)..... | ۸۸ |
| طیف ۵-۳: طیف IR مربوط به متیل-۳- آمینوکروتونات (5a)..... | ۸۹ |
| طیف ۶-۳: طیف IR مربوط به اتیل-۳- آمینوکروتونات (5b)..... | ۹۰ |
| طیف ۷-۳: طیف IR مربوط به ایزوپروپیل-۳- آمینوکروتونات (5c)..... | ۹۱ |
| طیف ۸-۳: طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵-(۳- پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲و۶- دی متیل-۴-۴- نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7a)..... | ۹۲ |
| طیف ۹-۳: طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵-(۳- پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۲و۶- دی متیل-۴-۴- نیترو فنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7b)..... | ۹۳ |
| طیف ۱۰-۳: طیف IR مربوط به ۳- اتیل-۵-(۳- پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲و۶- دی متیل-۴-۴- نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7c)..... | ۹۴ |
| طیف ۱۱-۳: طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵-(۳- پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۲و۶- دی متیل-۴-۴- نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7d)..... | ۹۵ |
| طیف ۱۲-۳: طیف IR مربوط به ۳- اتیل-۵-(۳- پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲و۶- دی متیل-۴-۴- نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7e)..... | ۹۶ |
| طیف ۱۳-۳: طیف IR مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵-(۳- پیریدین-۲- ایل) پروپیل)-۲و۶- دی متیل-۴-۴- نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7f)..... | ۹۷ |

- طیف ۳-۱۴: طیف IR مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-
 ۴-(۳- نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7g)..... ۹۸
- طیف ۳-۱۵: طیف IR مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-
 ۴-(۴- نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7h)..... ۹۹
- طیف ۳-۱۶: طیف IR مربوط به ۳- اتیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۳-
 نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7i)..... ۱۰۰
- طیف ۳-۱۷: طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۱-
 متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7j)..... ۱۰۱
- طیف ۳-۱۸: طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-
 (۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
 (7k)..... ۱۰۲
- طیف ۳-۱۹: طیف IR مربوط به ۳- اتیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۱-
 متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
 (7l)..... ۱۰۳
- طیف ۳-۲۰: طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۱-
 متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
 (7m)..... ۱۰۴
- طیف ۳-۲۱: طیف IR مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-
 ۴-(۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی
 کربوکسیلات (7n)..... ۱۰۵
- طیف ۳-۲۲: طیف جرمی مربوط به ۳- متیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-
 (۴- نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7a)..... ۱۰۶

- طیف ۳-۲۳: طیف جرمی مربوط به ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲-۶-دی متیل-۴-
 (۳-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات (7b)..... ۱۰۷
- طیف ۳-۲۴: طیف جرمی مربوط به ۳-اتیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۲-۶-دی متیل-۴-
 (۴-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات (7c)..... ۱۰۸
- طیف ۳-۲۵: طیف جرمی مربوط به ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲-۶-دی متیل-۴-
 (۲-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات (7d)..... ۱۰۹
- طیف ۳-۲۶: طیف جرمی مربوط به ۳-اتیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۲-۶-دی متیل-۴-
 (۳-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات (7e)..... ۱۱۰
- طیف ۳-۲۷: طیف جرمی مربوط به ۳-ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۲-۶-دی
 متیل-۴-۴-(۳-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات (7f)..... ۱۱۱
- طیف ۳-۲۸: طیف جرمی مربوط به ۳-ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲-۶-دی
 متیل-۴-۴-(۳-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات (7g)..... ۱۱۲
- طیف ۳-۲۹: طیف جرمی مربوط به ۳-ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۲-۶-دی
 متیل-۴-۴-(۴-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات (7h)..... ۱۱۳
- طیف ۳-۳۰: طیف جرمی مربوط به ۳-اتیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲-۶-دی متیل-۴-
 (۳-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات (7i)..... ۱۱۴
- طیف ۳-۳۱: طیف جرمی مربوط به ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲-۶-دی متیل-۴-
 (۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات
 (7j)..... ۱۱۵
- طیف ۳-۳۲: طیف جرمی مربوط به ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۲-۶-دی متیل-۴-
 (۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۳و۵-دی کربوکسیلات
 (7k)..... ۱۱۶

- طیف ۳-۳۳: طیف جرمی مربوط به ۳-اتیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲-دی متیل-۴-
 (۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۵و۳-دی کربوکسیلات
 ۱۱۷.....(7l)
- طیف ۳-۳۴: طیف جرمی مربوط به ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۶و۲-دی متیل-۴-
 (۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۵و۳-دی کربوکسیلات
 ۱۱۸.....(7m)
- طیف ۳-۳۵: طیف جرمی مربوط به ۳-ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۶و۲-دی
 متیل-۴-(۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۵و۳-دی
 کربوکسیلات (7n)..... ۱۱۹
- طیف ۳-۳۶: $^1\text{H-NMR}$ طیف مربوط به ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۶و۲-دی
 متیل-۴-(۴-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۵و۳-دی کربوکسیلات (7a)..... ۱۲۰
- طیف ۳-۳۷: $^1\text{H-NMR}$ طیف مربوط به ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲-دی
 متیل-۴-(۳-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۵و۳-دی کربوکسیلات (7b)..... ۱۲۱
- طیف ۳-۳۸: $^1\text{H-NMR}$ طیف مربوط به ۳-اتیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۶و۲-دی
 متیل-۴-(۴-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۵و۳-دی کربوکسیلات (7c)..... ۱۲۲
- طیف ۳-۳۹: $^1\text{H-NMR}$ طیف مربوط به ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲-دی
 متیل-۴-(۲-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۵و۳-دی کربوکسیلات (7d)..... ۱۲۳
- طیف ۳-۴۰: $^1\text{H-NMR}$ طیف مربوط به ۳-اتیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۶و۲-دی
 متیل-۴-(۳-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۵و۳-دی کربوکسیلات (7e)..... ۱۲۴
- طیف ۳-۴۱: $^1\text{H-NMR}$ طیف مربوط به ۳-ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۶و۲-دی
 متیل-۴-(۳-نیتروفنیل)-۴و۱-دی هیدروپیریدین-۵و۳-دی کربوکسیلات (7f)..... ۱۲۵
- طیف ۳-۴۲: $^1\text{H-NMR}$ طیف مربوط به ۳-ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲-دی

- متیل-۴-(۳-نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7g)..... ۱۲۶
- طیف ۳-۴۳: طیف $^1\text{H-NMR}$ مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۴-نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7h)..... ۱۲۷
- طیف ۳-۴۴: طیف $^1\text{H-NMR}$ مربوط به ۳- اتیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۳-نیتروفنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7i)..... ۱۲۸
- طیف ۳-۴۵: طیف $^1\text{H-NMR}$ مربوط به ۳- متیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7j)..... ۱۲۹
- طیف ۳-۴۶: طیف $^1\text{H-NMR}$ مربوط به ۳- متیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7k)..... ۱۳۰
- طیف ۳-۴۷: طیف $^1\text{H-NMR}$ مربوط به ۳- اتیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7l)..... ۱۳۱
- طیف ۳-۴۸: طیف $^1\text{H-NMR}$ مربوط به ۳- متیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7m)..... ۱۳۲
- طیف ۳-۴۹: طیف $^1\text{H-NMR}$ مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۶و۲- دی متیل-۴-(۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات (7n)..... ۱۳۳

اختصارات

DHP: Dihydropyridine

ABC: ATP Binding Cassette

ANOVA: One-Way Analysis of Variance

DMSO: Dimethyl sulfoxide

FT-IR: Fourier Transformation Infra Red

IR: Infra Red

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

MDR: Multiple Drug Resistance

MRP: Multiple Drug Resistance-associated Protein

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

P-gp: P-glycoprotein

ppm: Part Per Milion

SAR: Structure-Activity Relationship

SD: Standard Deviation

TB: Trypan Blue

TLC: Thin Layer Chromatography

UV: Ultra Violet

QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship

۱- مقدمه

۱-۱- سرطان

سرطان اصولاً یک روند رشد غیر قابل کنترل در تولید مثل سلول‌ها است و همراه با رفتارهای خطرناک و هجومی این توده سلولی می‌باشد که در پزشکی، آن را بیشتر با نام نئوپلاسم می‌شناسند. اصطلاح نئوپلاسم به عنوان نوعی جدید از رشد بیمارگونه بافت‌ها مطرح می‌باشد. نئوپلاسم‌های خوش خیم به عنوان بافت سرطانی قلمداد نمی‌شوند، در صورتی که انواع بدخیم آن‌ها سرطان محسوب می‌شوند^[۱،۵]. احتمال بروز سرطان در سنین مختلف وجود دارد ولی احتمال بروز سرطان با افزایش سن زیاد می‌شود^[۲].

سرطان ممکن است بنا به دلایل ژنتیکی و یا محیطی رخ دهد. ۱۳٪ از کل مرگ‌ها به علت سرطان می‌باشد^[۳]. بر طبق گزارش انجمن بهداشت آمریکا، ۷/۶ میلیون نفر بر اثر سرطان در سال ۲۰۰۷ جان خود را از دست داده‌اند^[۴].

سرطان ممکن است بنا به دلایل ژنتیکی و یا محیطی رخ دهد. درمان رایج سرطان، فقط در ۵۰٪ بیماران که بیماری آن‌ها تشخیص داده شده است، مفید می‌باشد^[۵].

۱-۱-۱- درمان سرطان

روش اختصاصی برای درمان سرطان به نوع خاص، محل و مرحله سرطان بستگی دارد. بدون توجه به جزئیات خاص، چندین روش اساسی برای درمان سرطان وجود دارد که عبارتند از: جراحی، اشعه درمانی، درمان ایمونولوژیک و شیمی درمانی. هر کدام از این روش‌ها قابلیت‌های خاص خود را دارد و عموماً ترکیبی از این روش‌ها استفاده می‌شود؛ مثلاً جراحی همراه با شیمی درمانی یا اشعه درمانی همراه با شیمی درمانی. در بیشتر روش‌های درمان سرطان، به هر حال، یک دارو یا ماده شیمیایی

وجود دارد^[۵۰]. این دارو ها اکثراً بر سلول هایی مؤثرند که سرعت تکثیر بالایی داشته باشند. برای کاهش اثرات سوء این داروها، اغلب از چند دارو با سیستم های گوناگون به طور همزمان استفاده می شود تا میزان مصرف هر یک به تنهایی تا حد امکان کاهش یابد^[۶].

۱-۱-۱-۱- جراحی

جراحی یکی از قدیمی ترین روش های درمان سرطان می باشد. برای این که این روش از کارایی خوبی برخوردار باشد، سرطان باید در مراحل اولیه خود شناسایی و درجه بالایی از اطمینان در برداشتن کامل تومور وجود داشته باشد. جراحی می تواند برای اهداف تشخیصی نیز به تنهایی یا همراه با سایر روش ها به کار رود^[۵۰].

۱-۱-۲- اشعه درمانی

اشعه درمانی برای کوچک کردن یا تخریب کامل تومور کاربرد دارد. این عمل به وسیله تخریب DNA ی تومور توسط اشعه صورت می گیرد تا سلول ها بمیرند. معمولاً اشعه ایکس و به صورت متمرکز بر روی خود تومور مورد استفاده قرار می گیرد. این روش معمولاً دردناک نبوده و بیهوشی نیز برای آن نیاز نیست، ضمناً اثرات جانبی استفاده از این روش بسیار نادر است مگر این که تومور در مجاور احشاء دستگاه گوارش باشد که در این صورت ممکن است بیماران با حالت تهوع و استفراغ مواجه شوند. مشابه جراحی در این روش نیز تومور باید محدود به یک ناحیه بوده تا درمان مؤثر واقع شود^[۵۰].

۱-۱-۱-۳- درمان ایمنولوژیک

این نوع درمان، یک روش جدید در درمان سرطان است در این روش از سیستم ایمنی مریض جهت مقابله با سرطان استفاده می شود و تلاش بر این است تا سطح لنفوسیت ها خصوصاً لنفوسیت های B و T افزایش یابد. نقش اصلی سلول های T، تخریب سلول های خارجی از جمله سلول های بدخیم و پیش بدخیم است. سلول های B، در مغز استخوان و غدد لنفاوی تولید شده و در برابر پروتئین های سلول های خارجی، آنتی بادی ترشح می کنند. در حال حاضر درمان ایمنولوژیک شامل اینترفرون های بسیار خالص از جمله اینترفرون ۲ می باشد [۵۰].

۱-۱-۱-۴- شیمی درمانی

عوامل شیمی درمانی برای اهداف وسیعی در سرطان کاربرد دارند. منظور اصلی استفاده از این ترکیبات ممکن است درمان نوع خاصی از سرطان یا کاهش اندازه یک تومور قبل از عمل جراحی یا حساس کردن تومور به اشعه درمانی یا تخریب متاستازهای ریز میکروسکوپی که بعد از برداشتن تومور اصلی دیده می شود باشد.

مزیت شیمی درمانی به جراحی و اشعه درمانی این است که در این روش می توان به جنگ تومورهای متاستاز یافته یا باقی مانده تومورها بعد از عمل جراحی و اشعه درمانی نیز رفت. به عبارت دیگر، این روش درمان برای از بین بردن تومورهای کوچک، بسیار مفید است. علت این که شیمی درمانی در تومورهای بزرگ، کمتر کاربرد دارد این است که تومورهای بزرگ معمولاً خون رسانی خوبی ندارند و بنابراین قسمت های داخلی تومورها در معرض عوامل شیمی درمانی قرار نمی گیرند (در داخل تومورها عروق خونی وجود ندارد). دومین فاکتور منفی در خصوص روش شیمی درمانی این است که این داروها نمی توانند اختصاصی عمل کنند و همان گونه که بر علیه سلول های سرطانی

مؤثرند، بر روی سلول های سالم نیز تأثیر می گذارند؛ به عبارت دیگر این عوامل، سیتوتوکسیک بوده و سلول های سرطانی و طبیعی را یکسان خواهند کشت.

تنها نکته مفید این روش این است که چون سلول های سرطانی با سرعت بیشتری رشد و تکثیر می یابند مقدار بیشتری از داروی سیتوتوکسیک را جذب کرده و لذا بیشتر تحت تأثیر دارو قرار می گیرند. تعداد کمی از سلول های بدن از جمله سلول های مو، مغز استخوان و مخاط دستگاه گوارش نیز از رشد و تکثیر بالایی برخوردار بوده و به همین علت عوارض جانبی داروهای ضد سرطان در این سلول ها بیشتر مشهود است که به صورت ریزش مو، سرکوب سیستم ایمنی و تهوع یا اسهال بعد از شیمی درمانی خودنمایی می کند و زمانی که شیمی درمانی قطع گردید، این عوارض نیز از بین می روند [۵۰].

۱-۱-۲- طبقه بندی داروهای ضد سرطان

دارو های موثر در شیمی درمانی، به ۵ دسته مختلف، طبقه بندی می شوند:

داروهای آلکیله کننده، آنتی متابولیت ها، آنتی بیوتیک های ضد تومور، عوامل ضد میتوزی و عوامل هورمونی [۵۰].

۱-۱-۲-۱- داروهای آلکیله کننده

داروهای آلکیله کننده، برای جلوگیری از تکثیر سلول های سرطانی، مستقیماً به DNA ی سلول آسیب می رسانند. این داروها با آلکیلاسیون (تعویض اتم هیدروژن با یک گروه آلکیل) اسیدهای نوکلئیک یا پروتئین ها و متعاقباً با کاهش تعداد میتوز، می توانند سمیت سلولی خود را اعمال کنند اما اهمیت سلولی آن ها معمولاً روی بافت های با سرعت ازدیاد بالا است که سلول های زیادی در چرخه تقسیم سلولی آن ها وجود دارد. مهمترین مواد آلکیله کننده که اهمیت بالینی دارند، ترکیباتی

با دو گروه عاملی هستند که قادرند در DNA، پیوندهای عرضی (داخل یا بین رشته DNA) ایجاد کنند^[۷].

۱-۲-۲- آنتی متابولیت ها

آنتی متابولیت ها ترکیباتی هستند که از بیوسنتز متابولیت های سلول و یا استفاده طبیعی سلول از این متابولیت ها جلوگیری می کنند. تقریباً تمام موادی که در این رابطه کاربرد بالینی دارند، با متابولیت ها یا کوفاکتورهایی مرتبط هستند که در بیوسنتز اسیدهای نوکلئیک دخالت می کنند. این عوامل معمولاً ساختاری مشابه با همان متابولیتی دارند که آن را آنتاگونیست می کنند^[۸].

۱-۲-۳- آنتی بیوتیک های ضد تومور

ضمن ارزیابی فعالیت آنتی بیوتیکی چندین ترکیب، نشان داده شد که بعضی از این ترکیبات دارای خواص ضد توموری یا ضد سرطانی نیز هستند. بسیاری از این ترکیبات مدت هاست که شناخته شده اند ولی به دلیل داشتن سمیت بالا از دسته آنتی بیوتیک ها کنار گذاشته شدند ولی خاصیت سمیت سلولی آن ها باعث شد تا این ترکیبات از لحاظ داشتن خواص ضد توموری در درمان سرطان، مجدداً مورد توجه قرار گیرند. منبع تهیه بسیاری از آنتی بیوتیک های ضد تومور، از تخمیر میکروبی می باشد و هنوز هم راه تخمیر میکروبی در اولویت قرار دارد؛ زیرا بسیاری از این ترکیبات دارای ساختمان های پیچیده ای هستند و تهیه آن ها از مسیر سنتزی، بسیار مشکل و هزینه بر می باشد^[۹].

۱-۱-۲-۴- عوامل ضد میتوزی

همان گونه که از نام آن ها مشخص است، این ترکیبات از میتوز سلولی جلوگیری می کنند و اختصاصاً اینکه از تشکیل دوک های میتوزی جلوگیری می نمایند. در ضمن میتوز، پروتئین توبولین پلیمریزه شده و نهایتاً ایجاد دوک های میتوزی می نماید. عوامل ضد میتوزی با پدیده پلیمریزه شدن یا از طریق دپلیمریزه شدن میکروتوبول ها و یا به وسیله ایجاد ساختمان های غیردوکی (شبهه توپ یا ستاره) مقابله می نمایند. وقتی ساختمان دوکی شکل اختصاصی تشکیل نشود، کروموزوم ها نمی توانند به خوبی جدا شده و این در نهایت مرگ سلولی را سبب می شود^[۱۰].

۱-۱-۲-۵- عوامل هورمونی

هورمون های استروئیدی شامل استروژن ها، آندروژن ها، پروژستین ها و گلوکوکورتیکوئیدها، روی بافت های هدف خود در سطح رونویسی DNA تأثیر می گذارند که باعث سرکوب عملیات الگوبرداری ژنتیکی و تحریک فعالیت های سلول می شود. برخی سلول های سرطانی نیز دارای تعدادی از گیرنده های هورمونی هستند و برای تحریک شدن به هورمون نیاز دارند. اتصال این هورمون ها به گیرنده، ساختار گیرنده را تغییر می دهد، کمپلکس تشکیل یافته به درون هسته وارد می شود و رونویسی DNA تحت تأثیر میان کنش کمپلکس با جایگاه های پذیرنده اش قرار می گیرد^[۱۱].

۱-۲- مقاومت چند دارویی (MDR)

پاسخ تومورها به رژیم شیمی درمانی متفاوت است و شکست در دارو درمانی سرطان، به مقاومت تومورها نسبت به داروهای شیمی درمانی بستگی دارد^[۱۲]. مقاومت چند دارویی، مقاومت سلول های تومور به فعالیت سمیت سلولی داروهایی است که در شیمی درمانی استفاده می شوند و از نظر

ساختمان و فعالیت، متفاوتند^[۱۳]. مقاومت به داروهای شیمی درمانی، معمولاً برای تعداد خاصی از سلول ها به وجود می آید. توده سلولی مقاوم به دارو، ممکن است در اثر پیشرفت توده یا جهش سلول ها به وجود آید. بعضی از تأثیرات درون سلولی نیز می تواند به طور ثانویه، باعث مقاومت به دارو شوند که عبارتند از: سازش سلول به دارو، تغییر سطوح آنزیم ها یا تغییر خصوصیات آنزیم ها. سلول هایی که به یک دارو مقاومند، ممکن است به دیگر داروها نیز مقاومت تقاطع نشان دهند؛ حتی اگر ساختمان شیمیایی آن ها متفاوت باشد^[۱۴].

به طور کلی، MDR به دو دسته تقسیم می شود: ذاتی و اکتسابی. اگر بیماری از ابتدا به شیمی درمانی مقاوم باشد، مقاومت ذاتی و اگر بعد از برگشت بیماری به درمان جواب ندهد، مقاومت اکتسابی ایجاد شده است^[۱۵].

پدیده مقاومت دارویی، در مطالعات مختلف بررسی شده و مکانیسم های مختلفی برای شکست دارو درمانی سرطان، در مدل های *in vitro* و *in vivo* شناخته شده است.

۱-۲-۱- مکانیسم های کلی مقاومت چند دارویی

مقاومت ذاتی و اکتسابی به چند دارو، به چندین عامل بستگی دارد. مکانیسم های اصلی مقاومت چند دارویی در جدول ۱-۱ نشان داده شده است.

جدول ۱-۱- مکانیسم های اصلی مقاومت دارویی سلول های تومور^[۱۶]

| مکانیسم های مقاومت دارویی (مثال) | تغییرات ناشی از مقاومت دارویی | مراحل فعالیت سیتواستاتیک داروها |
|--|---|---|
| فعال سازی ناقل های پروتئین ها (P-) گلیکوپروتئین، MRP و ... | کاهش تجمع دارو به وسیله سلول | ۱ ورود دارو به سلول ↓ |
| فعال سازی آنزیم های سیستم گلوکوتانیون، تجزیه دارو در وزیکول های بین سلولی | سم زدایی دارو یا مهار سیستم های فعال سازی دارو | ۲ تحریک یا مهار فعالیت دارو در سلول ↓ |
| جهش در ژن های رمز کننده آنزیم توپوایزومراز، افزایش ترمیم DNA | تغییر در محل هدف دارو، افزایش ترمیم محل هدف آسیب دیده | ۳ آسیب به محل هدف دارو ↓ |
| جهش در ژن p53، فعال کردن ژن BCL-2 | از بین بردن آپوپتوز یا توقف سیکل سلولی: تغییر در ژن های کنترل کننده آپوپتوز | ۴ توقف سیکل سلولی و یا مرگ سلول ⊥ |

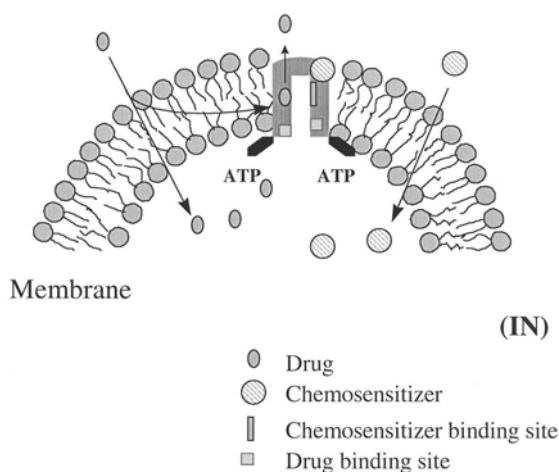
۱-۱-۲-۱- MDR وابسته به P-گلیکوپروتئین (MDR کلاسیک)

P-گلیکوپروتئین (P-gp)، یکی از اعضای با اهمیت خانواده بزرگ ناقل های کاست متصل به ATP، (ABC)^۱، است که توسط ژن MDR₁ در انسان و MDR_{1a} و MDR_{1b} در جوندگان رمز می شود^[۱۷،۱۵]. شواهد نشان می دهد که نقش اصلی فیزیولوژیکی P-gp، سم زدایی از سلول ها از طریق بیرون راندن سموم است^[۱۷]. P-gp در ۲ منطقه بدن بیشتر یافت می شود: ۱- P-gp یکی از

ترکیبات مهم سد خونی- مغزی^۱ است که ورود عوامل مختلف به مغز را محدود می کند، P-gp-۲ در مجرای گوارشی رودی- معدی^۲، فراهمی زیستی دسته گسترده ای از مواد شیمیایی را محدود می کند.

امروزه، P-gp به عنوان یکی از دلایل اصلی MDR در سرطان های مختلف می باشد.

(OUT)



شکل ۱-۱- عمل پمپ P-gp: مدل بالا، پروتئینی را نشان می دهد که با صرف انرژی ATP، مولکول دارویی را از غشای پلاسمایی به طور فعال، خارج می کند. تعدیل کننده^۳ MDR - (Chemosensitizer) - ممکن است به عنوان یک مهار کننده رقابتی، با اشغال محل های اتصال دارو یا به عنوان مهار کننده غیر رقابتی، در محل های اتصال Chemosensitizer عمل کند^[۲۱].

۱-۲-۲-۱ MDR وابسته به پروتئین (MRP)

MRP یک پروتئین غشایی ۱۹۰-KDa است که ساختمان آن مشابه P-gp و ناقل های غشایی ABC است^[۱۸]. افزایش بیان ژن MRP، وابسته به ایجاد MDR است. از طرف دیگر، کاهش در بیان ژن MRP، به علت برگشت حساسیت به شیمی درمانی است.

1- Blood Brain Barrier (BBB)
2- Gastrointestinal (GI)
3- modulator
4- Multiple drug resistance-associated protein

۲-۱-۱-۲- مکانیسم های دیگر

حضور آنزیم های توپوایزومراز در مراحل مختلف متابولیسم DNA شامل نسخه برداری، همانند سازی و ...، بسیار با اهمیت و حیاتی است. بیان کم یا تغییر در توپوایزومراز II، به مقاومت در برابر سموم این آنزیم ارتباط دارد. مطالعات دیگر نشان داده اند که افزایش سطح گلوتاتیون (GSH) و فعالیت آنزیم های وابسته به آن (آنزیم هایی که GSH را با کنژوگه کردن، به فرم فعال آن تبدیل می کنند)، باعث مقاومت سلول ها به عوامل آلكيله كننده می شوند. همچنین مشخص شده است که افزایش ترمیم DNA باعث مقاومت به دوکسوروبیسین و سیس پلاتین شده است. میتومایسین C (MMC) هم مانند سیکلوفسفامید، نیاز به فعال سازی برای اعمال اثر خود دارد؛ لذا کاهش سطح سیتوکروم P₄₅₀ ردوکتاز، ممکن است در مقاومت به MMC دخیل باشد [۲۸-۳۰].

۲-۲-۱- راه های غلبه بر MDR

راه های غلبه بر شکست شیمی درمانی، شامل تلاش برای جلوگیری از ایجاد مقاومت دارویی است. به طور کلی، MDR می تواند با ۱- مهار اتصال دارو به پروتئین های وابسته به MDR، ۲- دخالت در هیدرولیز آنزیم ATPase و ۳- تغییر در تمامیت لیپیدهای غشای سلولی؛ محدود شود.

۳-۲-۱- مهار کننده های MDR

۱-۳-۲-۱- نسل اول

نسل اول مهار کننده های MDR، مشخصاً برای مهار MDR به کار نمی روند. آن ها اغلب، فعالیت فارماکولوژیکی دیگری دارند. به همین دلیل، استفاده از آن ها محدود شده است. همچنین، استفاده کلینیکی از دارو های این نسل، به علت عوارض جانبی ناشی از واکنش های مضرشان، رد

شده است^[۱۹]. این گروه شامل بلاک کننده های کانال کلسیم مثل وراپامیل، سرکوب کننده های سیستم ایمنی مثل سیکلوسپورین آ و داروهای ضد فشار خون مثل رزپرین، هستند^[۲۰].

۱-۲-۳-۲- نسل دوم

نسل دوم بر مبنای نسل اول هستند ولی مخصوصاً جهت کاهش عوارض جانبی و حذف اثر فارماکولوژیکی غیر از مهار کنندگی MDR، انتخاب و طراحی شده اند^[۱۵]. برای مثال، انانتیومر R وراپامیل (R-verapamil)، بلاک کننده ضعیف تری برای کانال کلسیم است، در صورتی که P-gp را بهتر مهار می کند.

۱-۳-۳-۲- نسل سوم

نسل سوم مهار کننده های MDR، در غلظت های کم در حد نانومولار در مدل های *in vitro* ی MDR، اثر مهار کنندگی بالایی برای پمپ P-gp دارند. این ها مشخصاً تمایل زیادی برای مهار P-gp و یا دیگر ناقل های MDR دارند^[۱۵]؛ مثل LY335979، OC144093 و XR9576 که ۱۰ برابر قوی تر از نسل اول و دوم هستند و مهار کننده های اختصاصی MDR می باشند.

۱-۴-۲-۱- ارزیابی سمیت سلولی

یکی از روش های ارزیابی سمیت سلولی استفاده از روش رنگ سنجی است. در این روش یک ماده غیر رنگی به یک ترکیب رنگی تبدیل می شود. واسطه این تبدیلات، سلول های زنده می باشند و سلول های مرده و سایر مواد موجود در محیط کشت قادر به انجام این امر نمی باشند^[۲۲-۲۴].

یکی از مهمترین روش های رنگ سنجی، استفاده از فعالیت های آنزیمی می باشد. در این روش آنزیمی از سوبسترای یکی از آنزیم های داخل سلولی، به منظور ارزیابی فعالیت استفاده می شود. سوبسترای مورد نظر، توسط آنزیم اختصاصی خود به یک ماده رنگی تبدیل می شود. میزان تشکیل رنگ، شاخصی جهت تعیین فعالیت آنزیم و در نتیجه سمیت سلولی می باشد. از جمله روش های ارزیابی فعالیت آنزیمی، احیای رنگ MTT (تترازولیوم) می باشد [۲۲-۲۴].

۱-۴-۲-۱- روش رنگ سنجی

اندازه گیری حیات، رشد و تکثیر سلول ها کاربرد های مختلفی در تحقیقات دارد. یکی از قدیمی ترین روش ها، رنگ آمیزی سلول ها با تریپان بلو است که حساسیت کافی نداشته و نیاز به بررسی میکروسکوپی دارد. روش های دیگری نظیر اندازه گیری میزان کل اسید های هسته ای و میزان پروتئین در لیزات سلولی نیز از دقت کافی برخوردار نمی باشند [۲۲ و ۲۵].

اندازه گیری جذب مواد رادیواکتیو توسط سلول های در حال رشد، روش دقیقی است. ترکیباتی نظیر تیمیدین نشاندار شده با تریتیوم و ۵- برومودئوکسی اوریدین هنگام پرولیفراسیون سلول، وارد ساختمان هسته سلول شده و باعث نشاندار شدن سلول ها می شوند. اما این روش نیز وقت گیر بوده و به علاوه نیازمند هاروست کردن سلول ها پس از تحریک سلولی است. همچنین مشکلات مربوط به کار با مواد رادیواکتیو نظیر دفع مواد باقی مانده و حفاظت از اشعه را نیز به دنبال دارد.

در سال ۱۹۸۳ آزمایش MTT به عنوان جایگزینی برای روش رادیواکتیو پیشنهاد شد. در این روش آنزیماتیک، بعنوان سوبسترای واکنش از نمک های محلول تترازولیوم که مهمترین آن ها MTT است، استفاده می شود. به وسیله این آزمایش ساده و دقیق می توان پاسخ سلول های مختلف را به فاکتورهای خارجی از جمله فاکتورهای رشد، داروهای سایتوتوکسیک و سایر عوامل شیمیائی ارزیابی کرد. به طوریکه میزان فعالیت و سرعت تکثیر سلول ها ممکن است تحت تاثیر هورمون ها،

فاکتورهای رشد، سایتوکین ها و میتوزن ها افزایش یافته یا تغییری نکند. همچنین تحت تاثیر بعضی از داروها و عوامل سایتوتوکسیک نظیر داروهای ضد سرطان ممکن است سلول ها دچار نکروز یا آپوپتوز شده و سرعت تکثیر یا رشدشان کاهش یابد.

این روش نسبت به سایر روش های بررسی پرولیفراسیون سلولی، ساده تر بوده و با امکانات موجود در اغلب آزمایشگاه ها قابل اجرا است. به علاوه کلیه مراحل آزمایش، در پلیت های ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه الیزا ریدر قرائت می شود؛ لذا تعداد زیادی نمونه را می توان همزمان آزمایش کرد [۲۲ و ۲۶ و ۲۷].

۱-۲-۴-۲- اساس تست MTT

آزمایش MTT، یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیائی-3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)، بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال های آبی رنگ نامحلول انجام می شود.

در این روش برخلاف سایر روش ها، مراحل شستشو و هاروست کردن سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول ها می شوند، حذف شده است و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با فوتومتر، در یک میکروپلیت انجام می شوند؛ لذا تکرار پذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است.

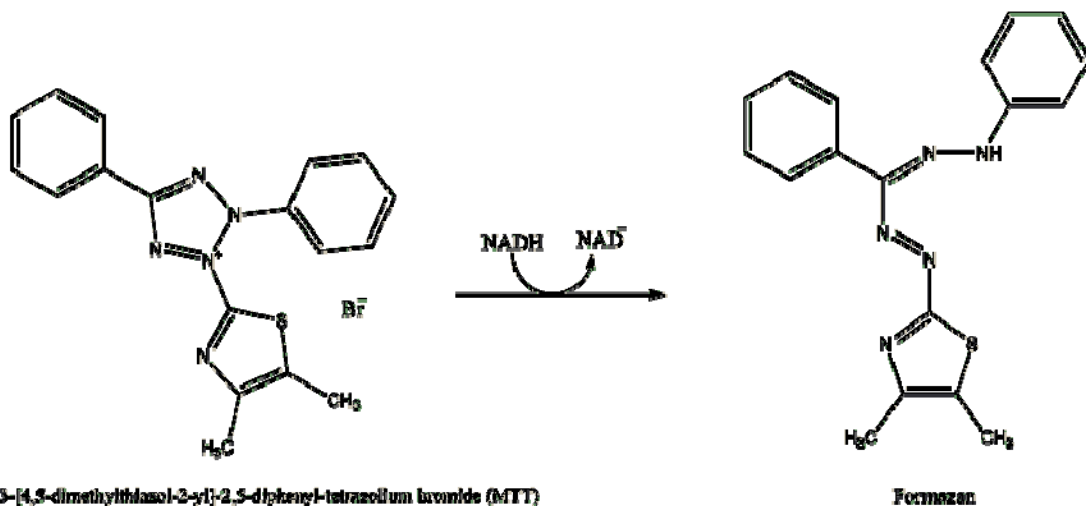
بطور کلی سلول ها در محیط کشت به دو صورت چسبیده به پلیت (attached) و سوسپانسیونی (suspended) دیده می شوند. در صورتی که آزمایش روی سلول های چسبیده به پلیت نظیر سلول ای توموری و فیبروبلاست ها انجام شود، ابتدا بایستی تعداد مناسبی سلول را در هر یک از چاهک ها کشت داده، اجازه داد تا سلول ها به کف پلیت چسبیده و به حالت پایدار خود درآیند. سپس چاهک

های کنترل و آزمایش، انتخاب شده و مقدار مناسبی از ماده میتوزن یا داروی مورد نظر را به چاهک های تست اضافه می کنیم و پلیت را تا زمان مورد نیاز جهت تاثیر ماده مورد نظر، انکوبه می کنیم. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت روئی را دور ریخته به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر RPMI ی بدون فنل قرمز حاوی نیم میلی گرم در میلی لیتر محلول MTT اضافه نموده و به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور CO₂ در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

در طی زمان انکوباسیون، MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم های چرخه تنفسی میتوکندری ها می باشد، احیا می شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال های آبی رنگ فورمازان می شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، رابطه مستقیم دارد.

کریستال های فورمازان، در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO به حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول بدست آمده را می توان در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت کرده و به کمک منحنی استاندارد، تعداد سلول ها را محاسبه نمود. برای هر رده سلولی ارتباط خطی بین تعداد سلول ها و جذب نوری محلول نهائی وجود دارد؛ لذا جهت بررسی هر نوع سلول بایستی منحنی استاندارد مربوط به همان رده را رسم نموده و استفاده کرد.

انجام آزمایش روی سلول های معلق، یک اختلاف جزئی با سلول های چسبیده دارد. در مورد سلول های معلق باید پس از اتمام مراحل کار، کشت سلولی پلیت را در سانتریفیوژ مخصوص قرار داده و در دور ۱۰۰۰-۲۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ نمود تا سلول های معلق در کف پلیت رسوب کنند. در صورت لزوم می توان سلول ها را با DMSO در کف پلیت فیکس نمود. عمل فیکساسیون بایستی در زمان کوتاهی انجام شود تا خصوصیات آنزیمی سلول ها حفظ گردد. سپس سلول ها را با PBS سرد شستشو داده و بر روی آنها محیط کشت حاوی MTT می افزائیم. بقیه مراحل شبیه سلولهای چسبیده می باشد.



۱-۲-۴-۳- ارزیابی قابلیت مهار کنندگی MDR

در روش ارزیابی سمیت سلولی، بارها از تکنیک سنجش میزان قدرت غلبه بر مقاومت دارویی استفاده شده است که به طور کلی آن را با عنوان نسبت MDR^[۳۱] بیان می کنند:

$$\text{MDR Ratio (RF)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ (cytotoxic drug alone)}}{\text{IC}_{50} \text{ (cytotoxic drug + inhibiting agent)}}$$

در این روش، اطلاعات بر اساس غلظت عامل مهار کننده و داروی سیتوتوکسیک، بیان می شود. تا وقتی که ارزیابی سمیت سلولی بر پایه یک روش کلی انجام شود، بیش از یک مکانیسم برای مقاومت دارویی وجود دارد؛ در حقیقت، مطالعات بیشتری برای تعیین مکانیسم دقیق غلبه بر مقاومت دارویی نیاز است^[۳۱].

۱-۳-۳- ترکیبات دی هیدروپیریدین

بررسی شیمی ترکیبات دی هیدروپیریدین، نخستین بار در سال ۱۸۸۲ با سنتز این مولکول ها توسط هانش آغاز شد. پس از آن طی ۵۰ سال، روش اولیه هانش توسط سایر محققین، بررسی و اصلاح گردید.

دی هیدروپیریدین ها به عنوان واسطه در واکنش های پیریدین، نقش های مهمی چون جاننشینی نوکلئوفیلی، احیاء و نیز آسیلاسیون در حضور پیریدین ایفا می نماید. این عوامل در سیستم های زیستی، اثرات مهمی به ویژه شرکت در واکنش های اکسیداسیون- احیای NADH اعمال می کنند. نقش های اولیه و فیزیولوژیک مولکول های حاوی دی هیدروپیریدین شامل فعالیت ضد توموری، القا کننده پورفیریا و ... می باشد. همچنین ثابت شده است که دی هیدروپیریدین ها در اتصال متقاطع الاستین و بیوسنتز آلكالوئید های ایندول نیز مؤثر می باشند [۳۲].

۱-۳-۱- ساختار شیمیایی دی هیدروپیریدین ها

از نگاه نظری، دی هیدروپیریدین ها دارای ۵ ایزومر می باشند. اما در واقع اغلب دی هیدروپیریدین های شناخته شده، ساختار ۲ا- دی هیدرو یا ۴ا- دی هیدرو را دارند، زیرا جفت الکترون های غیر پیوندی اتم نیتروژن حلقه دی هیدروپیریدین در سایر ایزومرها تشکیل پیوند π می دهد. اما در ایزومر های ۲ا و نیز ۴ا- دی هیدروپیریدین دارای بالاترین مراکز پیوند هیبرید SP^2 بوده، از این رو از پایداری بیشتری برخوردار هستند. استخلاف های آمیدین سبب پایداری ترکیبات ۴ا-۳- دی هیدروپیریدین می گردد [۳۲].

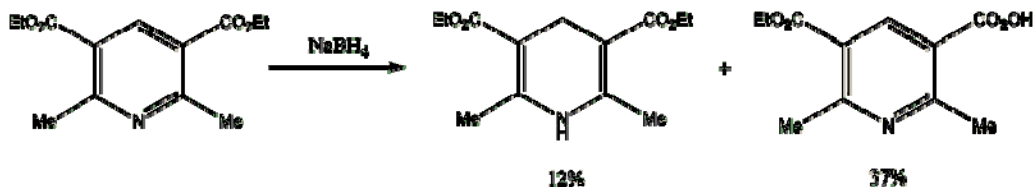
۱-۳-۲- روش های کلی سنتز ترکیبات ۴ا- دی هیدروپیریدینی

روش های متعددی جهت سنتز مشتقات دی هیدروپیریدینی وجود دارد. در زیر به تعدادی از روش های کلی سنتز این ترکیبات، اشاره شده است:

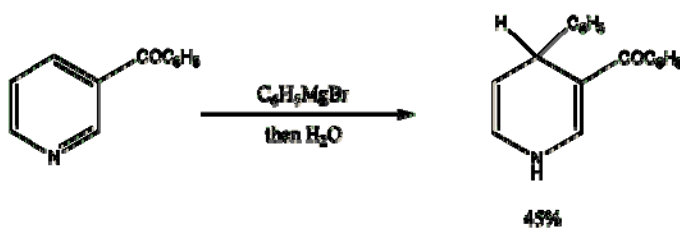
۱-۲-۳-۱- استفاده از مشتقات پیریدینی [۳۲]

الف) واکنش با نوکلئوفیل ها

۱- احیاء به وسیله هیدریدهای فلزی کمپلکس



۲- افزودن واکنشگرهای ارگانومتالیک

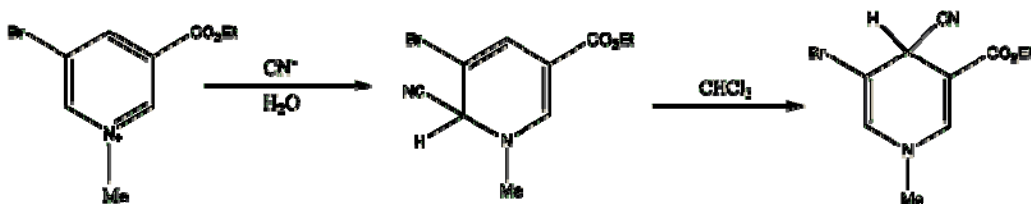


۳- احیاء به وسیله نمک های دی تیونیت مانند سدیم دی تیونیت ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

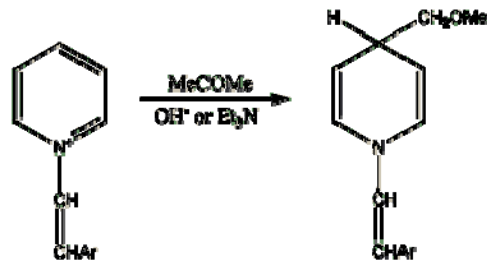
واکنش احیاء نمک های پیریدینی حاوی استخلاف در موقعیت ۳ یا ۳ و ۵ بوسیله سدیم دی

تیونیت در یک محلول باز ملایم منجر به تولید ۱ و ۴- دی هیدرو پیریدین مربوطه خواهد شد.

۴- افزودن یون سیانید



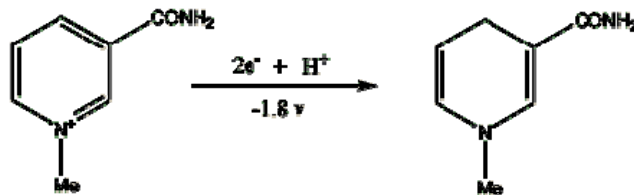
۵- واکنش با سایر نوکلئوفیل ها



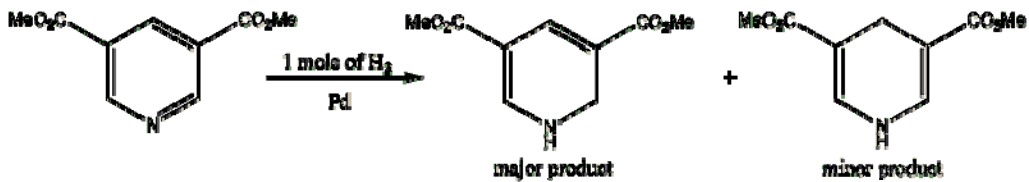
ب) احیای تک الکترونی

۱- به وسیله فلزات، بطور مثال سدیم آمالگام

۲- احیای الکترولیتیک

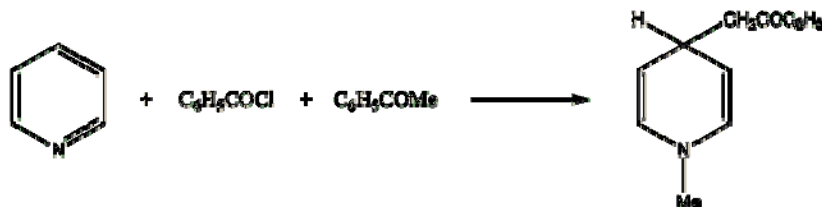


۳- هیدروژناسیون کاتالیتیک



۴- استفاده تری متیل سیلان

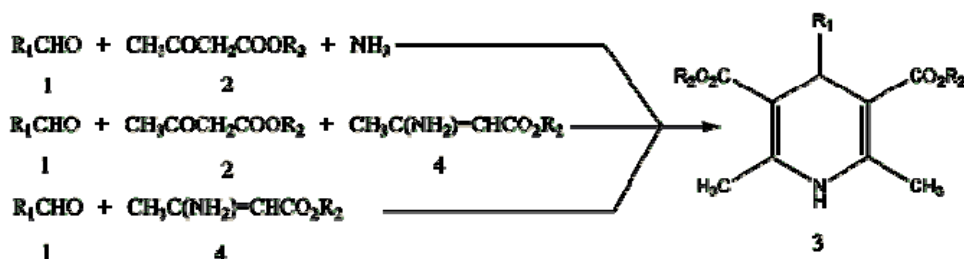
۵- متفرقه



۱-۳-۲-۲- روش سنتزی هانش و واکنش های وابسته

الف) روش هانش

اولین بار هانش در حدود یک قرن پیش، او^{۴۱}- دی هیدروپیریدین ها را از واکنش آلدهید ۱ و بتا کتواستر ۲ به نسبت ۱ به ۲ در حضور آمونیاک سنتز نمود^[۳۳]. این واکنش ها معمولاً در حلال الکلی سبک و حرارتی در حد رفلاکس در شرایط استاندارد و زمانی بین ۶ الی ۲۰ ساعت منجر به سنتز حلقه او^{۴۱}- دی هیدروپیریدین ۳-۵ و دی کربوکسیلات می گردد^[۳۲].



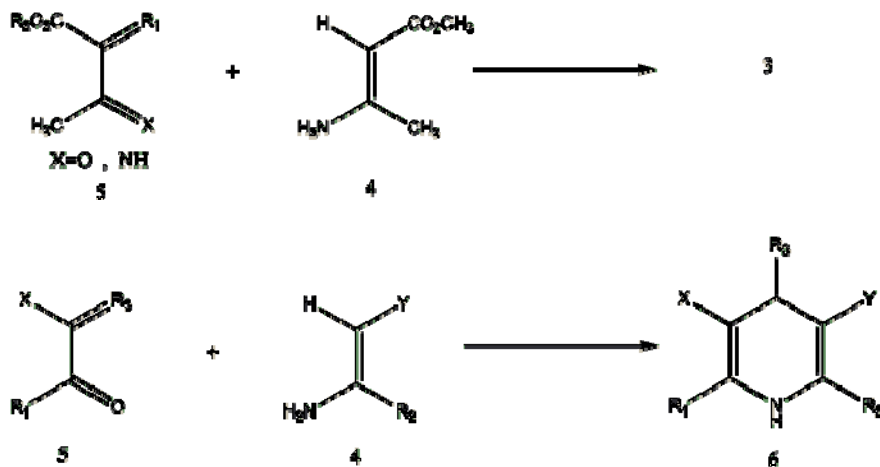
جهت سنتز مشتقات او^{۴۱}- دی هیدروپیریدینی با استرهای ناقربنه، تغییراتی در روش هانش ایجاد گردید:

Colie این ترکیبات را از طریق واکنش استر آمینوکروتونات ۴ با آلدهید در محیط اسیدی تهیه نمود^[۳۴]. Mayer طی دو مرحله واکنش، ابتدا آرالکیلیدین استواستیک استر ۵ را از واکنش آریل آلدهید و الکیل استواستات تهیه نمود و سپس آن را با آمینوکروتونات استر ۴ واکنش داده و مشتق ناقربنه او^{۴۱}- دی هیدروپیریدین را سنتز نمود^[۳۵].

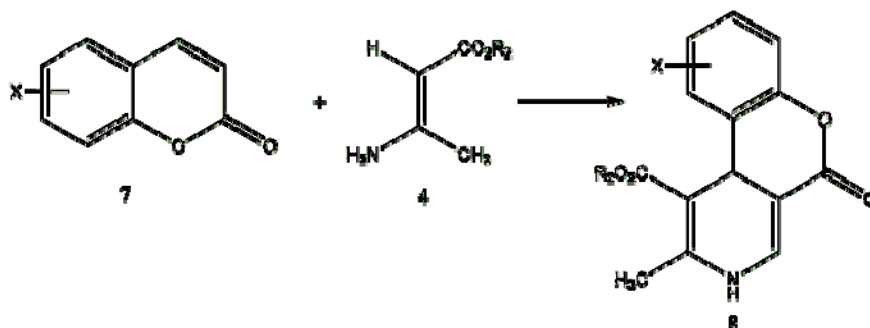
Dagnino این ترکیبات را از تراکم آلکیل استواستات، آلکیل آمینوکروتونات و آریل آلدهید تهیه نمود که این روش به لحاظ راندمان نسبت به سایر روش ها مناسب تر است. در واقع در هر سه روش اخیر، اضافه شدن مایکل آمینوایزوکروتونات به محصول حاصل از تراکم Knoevnager ۵ مرحله اصلی واکنش می باشد^[۳۶].

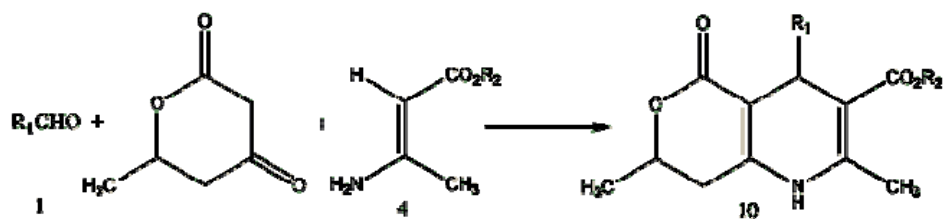
جهت سنتز او^{۴۱}- دی هیدروپیریدین هایی با استخلاف های مختلف در ناحیه ۲ و ۶ یا ۳ و ۵ (ترکیب ۶) از روش های زیر استفاده می شود. به غیر از استر گروه های دیگر الکترون کشنده مانند

اکسو، سیانو، نیترو و سولفونیل نیز می توانند موجب پایداری بهتر سیستم ۱و۴- دی هیدروپیریدین گردند [۳۷].

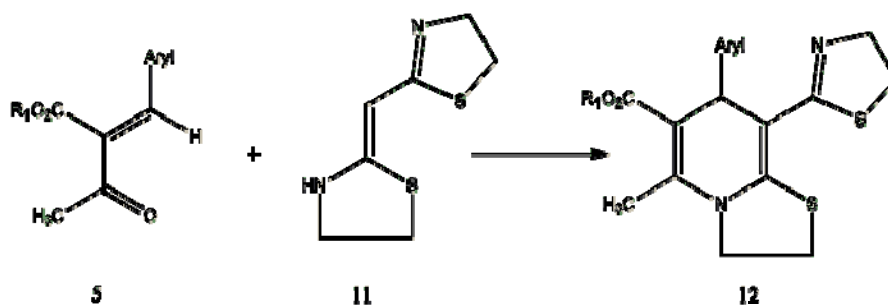


در صورت قرارگیری استخلاف های متفاوت روی حلقه ۱و۴- دی هیدروپیریدین و مرکز ناقربندی در کربن ۴ خواهد بود. نظر به اثرات متفاوت انانتیومرها از روش های گوناگونی برای جداسازی آنها استفاده می شود. شناخته شده ترین روش تهیه مشتق ۱و۴- دی هیدروپیریدین با بخش استری کایرال است که پس از جداسازی دو انانتیومر، بخش استری کایرال را به یک بخش ناقربنه توسط سلولیز تبدیل می کنیم. بطور مثال در مورد نیکاردیپین این جداسازی صورت گرفته و نشان داده است که اثر مسدد ایزومر S آن به مراتب بیش از ایزومر R است [۳۸]. روشهای متفاوت دیگری نیز جهت سنتز مشتقات متفاوت ۱و۴- دی هیدروپیریدین گزارش شده است.

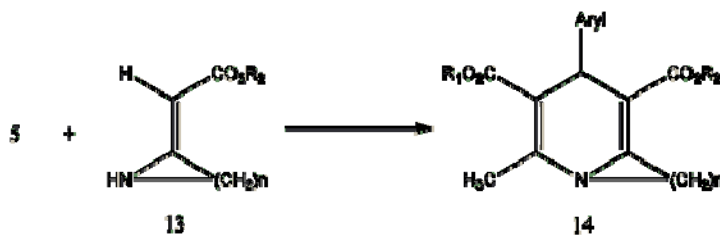




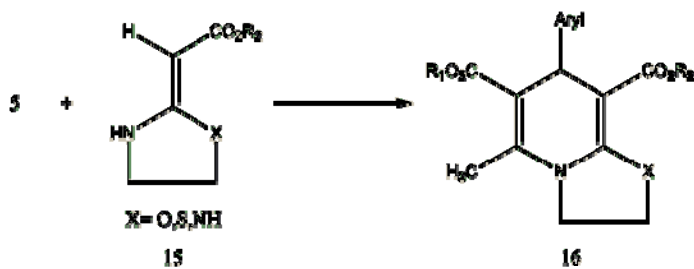
مشتقاتی که دارای حلقه هتروسیکل در ناحیه ۳ حلقه می باشند^[۳۷]:



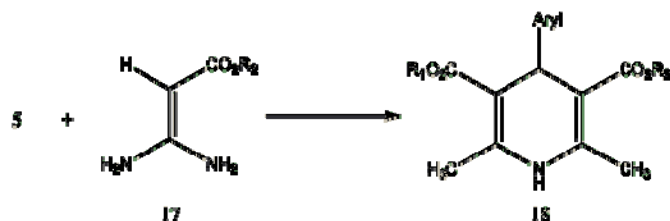
تهیه مشتقاتی که از اتم نیتروژن به حلقه دیگر متصلند، به روش زیر با راندمان بالا تهیه می شوند^[۳۷]:



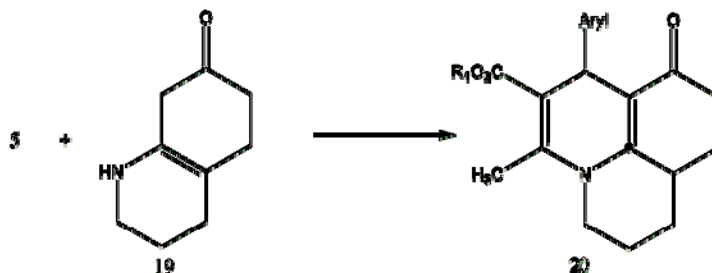
ترکیباتی که دارای هترواتم در ناحیه ۲ حلقه DHP هستند^[۳۷]:



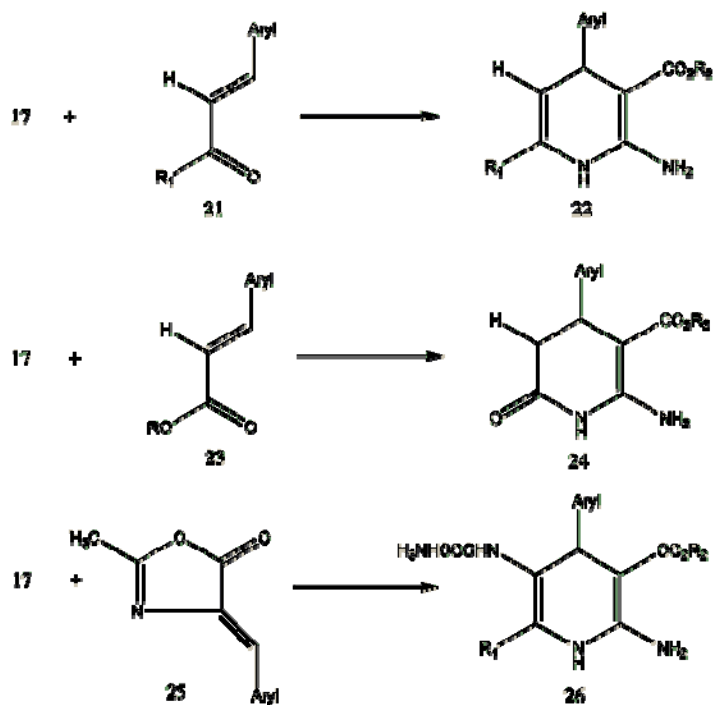
با استفاده از آمیدینو استیک استرها به عنوان اضافه شونده مایکل، سنتز ۱ و ۴- دی هیدروپیریدین های متنوع گسترش بیشتری یافته است. دی آمینو کربونیل ۱۷ مانند ۳- آمینو کربونوات ها عمل می کند با این تفاوت که در اضافه شدن مایکل فعال تر است [۳۷]:



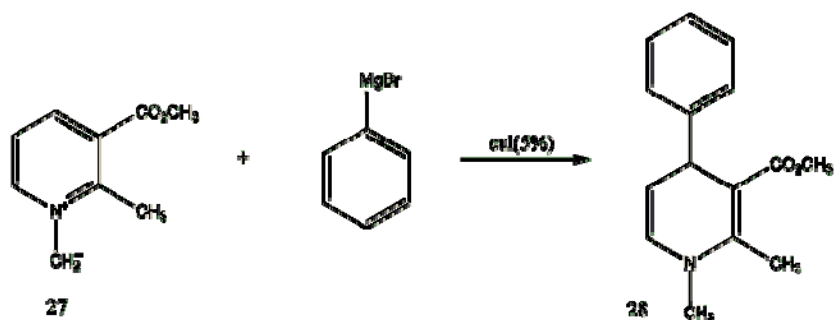
ترکیب ۵ با ستن های دو حلقه ای ۱۹ در اسید استیک گلاسیال در حالت رفلکس تولید ۱ و ۴- دی هیدروپیریدین های سه حلقه ای ۲۰ می کند [۳۷].



ترکیباتی وجود دارند که با ساختمان معمول DHP از نظر شیمیایی تفاوت هایی دارند، اما یک قسمت مولکول می تواند با گیرنده های مربوط به ۱ و ۴- دی هیدروپیریدین تداخل نماید. این ترکیبات از واکنش ۱۸ به عنوان ماده اولیه به روش آسیلاسیون با انیدریدها تهیه می شوند. همچنین ترکیب ۱۷ در تراکم شدن با ستن های α و β اشباع نشده ۲۱ تولید ۱ و ۴- دی هیدروپیریدین های مونو کربوکسیلیک ۲۲ را می کند ولی افزوده شدن آن به آریل آلکیل ایدن مالونات ها ۲۳ و ۴- آراکلیلیدن-۲- متیل اکسازول-۵- (H۴)- اون ها ۲۵ محصولاتی جدید تولید می کند [۳۷].



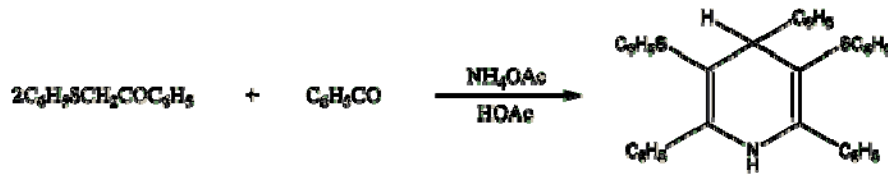
افزایش گروه های نوکلوپیلی خوب همچون واکنشگر گرینیارد به نمک پیریدینیوم ۲۷ یکی دیگر از روش های سنتز مشتقات ۱۴-دی هیدروپیریدین و ۱۱-۲-دی هیدروپیریدین به صورت توأم وجود دارد اما حضور 5% CuI واکنش را به سمت تولید ۱۴-دی هیدروپیریدین ۲۸ به عنوان محصول عمده با راندمان بالا کاتالیز می کند.^[۳۹]



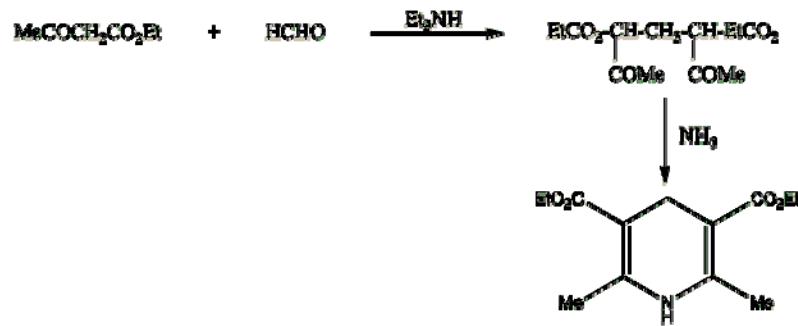
ب: استفاده از enamine ها^[۳۲]

مشخص شده است که استفاده از اتیل ۳-آمینو کروتونات بجای اتیل استوات باعث افزایش راندمان واکنش سنتز دی هیدرو پیریدین ها می شود.

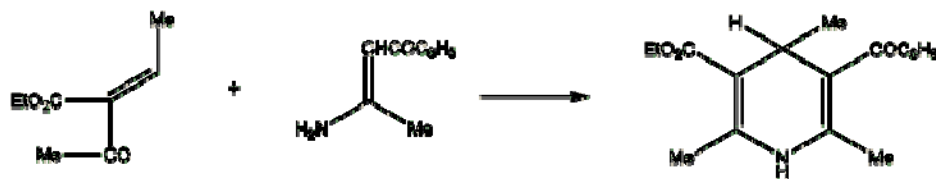
ج) استفاده از آمونیوم استات-استیک اسید^[۳۲]



د) استفاده از ۱،۵-دی کتون ها^[۳۲]

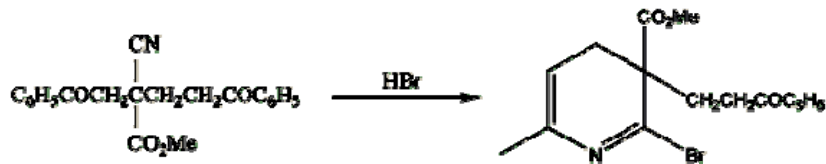


ه: استفاده از کتون های α و β اشباع نشده^[۳۲]

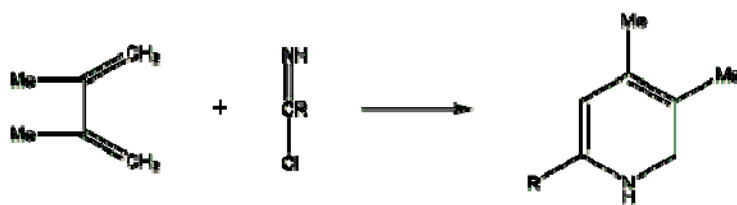


۱-۳-۲-۳- متفرقه:

الف) حلقوی شدن نیتریل ها و آمیدها^[۳۲]

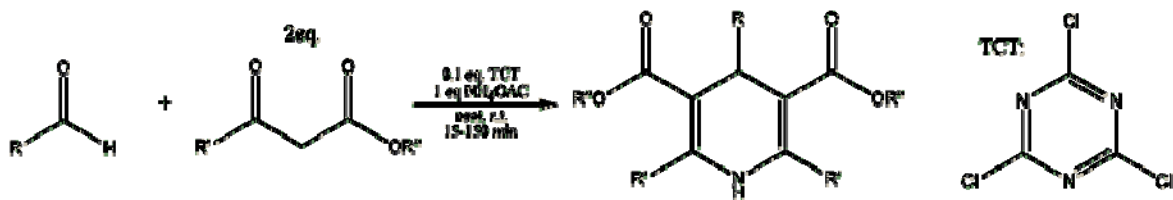


ب) واکنش های cycloaddition^[۳۲]



ج) واکنش در دمای اتاق با استفاده از کاتالیست^[۴۰]

کاتالیست: 2,4,6-trichloro[1,3,5]triazine (TCT, cyanuric chloride)



۱-۳-۲-۴- استفاده از میکروویو جهت سنتز او۴- دی هیدروپیریدین ها

اولین گزارش استفاده از میکروویو در سنتز او۴- دی هیدروپیریدین های هانش، به وسیله Alajarin^[۴۱] ارائه شده است. این گروه یک سری از مشتقات او۴- آریل را در آون معمولی (خانگی) به واسطه روش کلاسیک (۱۵ mmol آلدئید و ۴۳ mmol آلکیل استواسات و ۳۰ mmol آمونیاک در ۳ ml اتانول) سنتز نمودند. راندمان این واکنش ها طی زمان ۴ دقیقه بین ۵۲-۱۵٪ بوده است. در

حالیکه زمان لازم برای سنتز این ترکیبات به روش رفلکس با راندمان ۵۰-۳۶٪ حدود ۱۲ ساعت بوده است. در ۱۹۹۵ این گروه^[۴۲] جهت سنتز مشتقات ناقربنه 1,4-DHP در آون معمولی از آریل متیل استواسات ۸ mmol و ۳-آمینوکروتونات ۴ mmol در اتانول ۴/۵ ml استفاده نمودند. اما همانند روش معمول سنتز مشتقات ناقربنه زمان لازم برای واکنش بیشتر می باشد.

در همان سال Zhang^[۴۳] تهیه مشتق ۴-آریل ۱ و ۴-دی هیدروپیریدین را از ۳-آمینوکروتونات ۲۰ mmol و متیل استواسات ۲۰ mmol و آریل الدهید ۲۰ mmol در غیاب حلال در آون معمولی گزارش نمود. راندمان این واکنش ها ۷۷-۵۹٪ طی زمان کمتر از ۱۰ دقیقه بود. روشی مشابه توسط Khadilker^[۴۴] استفاده شد اما او واکنش را در حضور اتانول انجام داد. (۳-آمینوکروتونات mmol ۱۰ و متیل استواسات mmol ۱۴ و آریل الدهید mmol ۱۰) این واکنش در آون معمولی به مدت ۳-۵ دقیقه صورت گرفت.

Khadilker^[۴۵] همچنین سنتز 1,4-DHP را در محلول هیدروتروپ آبی (monoglycol sulphate , 5 ml 50% butyl از ۳-آمینوکروتونات mmol ۱۰ و متیل استواسات mmol ۱۴ و آلدئید های آروماتیک و آلیفاتیک mmol ۱۰ توصیف نمود.

در نهایت همراهی انرژی میکروویو و استفاده از پایه های جامد معدنی (مثلاً آلومینا ۲g) توسط M.Suarez و همکارانش^[۴۶]، برای سنتز مشتقات ناقربنه 1,4-DHP از متیل ۳-آمینوکروتونات mmol ۳ و اتیل استواسات mmol ۳ و بنزآلدئید mmol ۳ به کار گرفته شد. مقادیر کاتالیتیک DMF (۰/۵ ml) به عنوان محیط انتقال انرژی جهت رسیدن به دماهای بالاتر به مخلوط واکنش افزوده شد.

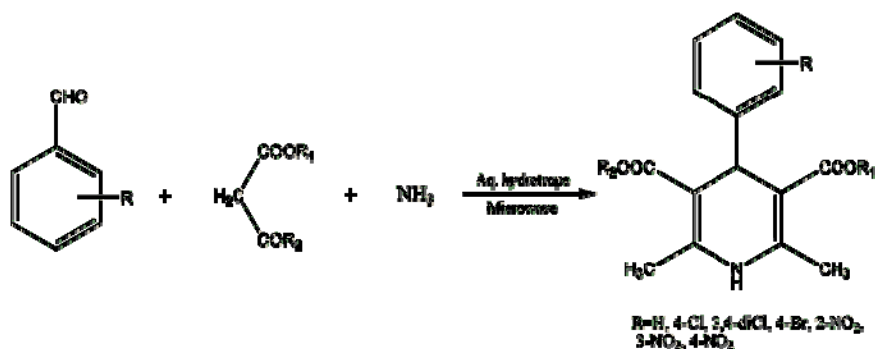
اخیراً J.J.Vanden Eynde^[۴۷]، 1,4-DHP لنگر شده به پلیمر محلول را ارائه نمودند که می تواند تحت شرایط بدون حلال همانند سایر 1,4-DHP ها سنتز گردد.

استفاده از محلول های هیدروتروپ آروماتیک مانند: محلول آبی سدیم P- تولوئن سولفونات ۵۰٪

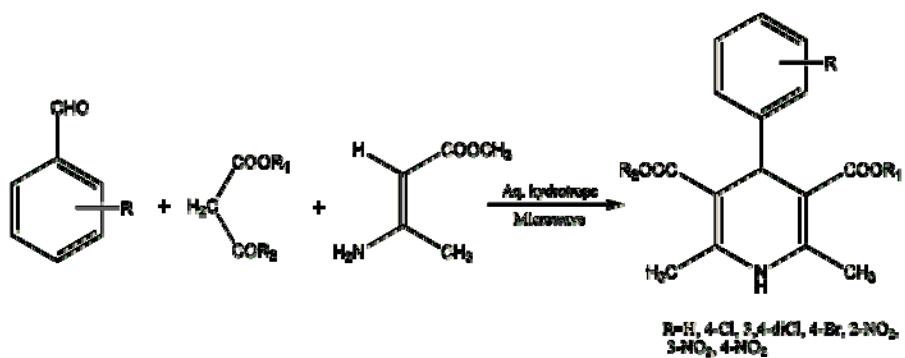
(NaPTSA) محلول آبی سدیم کومن سولفونات ۴۰٪ (NaCuS) و محلول آبی سدیم P-گزیلن

سولفونات ۲۰٪ (aXSN) [۴۸].

روش A:



روش B:

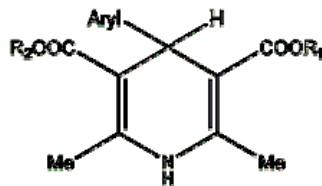


۱-۴- نقش دی هیدروپیریدین ها در مهار کانال کلسیم

اولین بار این ترکیبات توسط هانش در سال ۱۸۸۲ ساخته شدند. در سال ۱۹۴۳ مشتق ۴- کینولین آن ها شناخته شد که از نظر خصوصیات ضد دردی و ضد اسپاسم، مورد توجه قرار گرفت. پس از ۲۰ سال، دستیابی به ترکیباتی مؤثر بر سیستم قلبی- عروقی میسر گشت. متعاقب این کشف، به اثرات مهاری این ترکیبات بر کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ در سلول های قلبی و عضلات صاف جدار عروق، پی بردند. برای اولین بار در سال ۱۹۷۵ در آلمان، نیفدیپین از این دسته ترکیبات برای درمان بیماری های عروق کرونر به بازار دارویی عرضه شد و تا به امروز این داروها مؤثرترین گروه مسددهای کانال کلسیم بوده اند.^[۴۹] این ترکیبات به صورت برگشت پذیر بر کانال های نوع L مؤثرند. مسددهای دی هیدروپیریدین، وضعیت غیر فعال کانال را ترجیح می دهند. در اثر تغییرات ساختمانی، آنتاگونیست ها، باز شدن های طولانی مدت کانال ها و آنتاگونیست ها، باز شدن کوتاه مدت را پایدار می نمایند.

۱-۴-۱- رابطه ساختمان واثر (SAR) ترکیبات ۴- دی هیدروپیریدینی

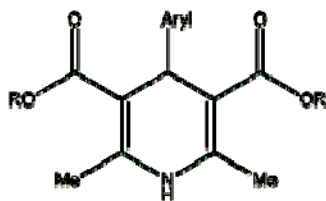
Loev و همکارانش^[۵۱] اولین گزارشات سیستماتیک در مورد ویژگی های فارماکولوژیک ترکیبات DHP گروه هانش را به عنوان عوامل کاهنده فشارخون منتشر نمودند. پس از آن Rodendrichen و همکارانش^[۵۲] رابطه ساختمان و اثر آنالوگ های نیفدیپین را در عضله مجزا شده قلب مشخص نمودند. هر دوی این مطالعات به جزئیات اثر اتصال گروه های عاملی مختلف به حلقه DHP بر فعالیت فارماکولوژیک آن ها پرداخته شده است.



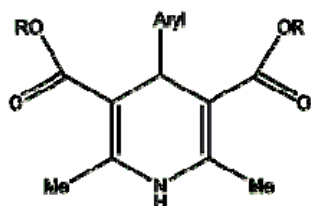
در مورد مسددهای کانال کلسیم حلقه DHP به صورت قایق نسبتاً مسطح (flat-boat) قرار می گیرد. در ناحیه ۳ و ۵ حلقه دی هیدروپیریدینی، گروه های استری قرار دارند. در مقایسه به کربن ۴ حلقه DHP گروه های استری در وضعیت شبه استوایی (equatorial-like) قرار می گیرند. در ناحیه ۴ حلقه DHP یک استخلاف آروماتیک در وضعیت محوری کاذب (pseudo axial) نسبت به حلقه می باشد. صفحه حلقه آروماتیک به شکلی آرایش یافته است که از نیتروژن ۱ و کربن ۴ می گذرد. هنگامی که حلقه DHP به صورت قایق نسبتاً مسطح در نظر گرفته شود و نیتروژن موقعیت (stern) و C₄ موقعیت (bow) و استخلاف آروماتیک ناحیه ۴ وسط حلقه DHP (Bowsprit) قرار می گیرد در صورتی که استخلاف های دیگر مانند گروه های استری طرف چپ (port) و یا راست (starboard) را اشغال می کند. استخلاف های ناحیه اورتو و یا متای حلقه آروماتیک ناحیه ۴ حلقه DHP موقعیت syn-periplanar نسبت به هیدروژن ناحیه ۴ حلقه DHP دارند^[۵۳].

در مسددهای کانال کلسیم صفحه ای که این گروه های استری در آن قرار می گیرند با صفحه DHP زاویه ای در حدود ۶۰°-۳۰° می سازد^[۵۴-۵۶]. استخلاف های استری معمولاً نسبت به باند دوگانه حلقه DHP می تواند به سه فرم هم آرائی داشته باشند:

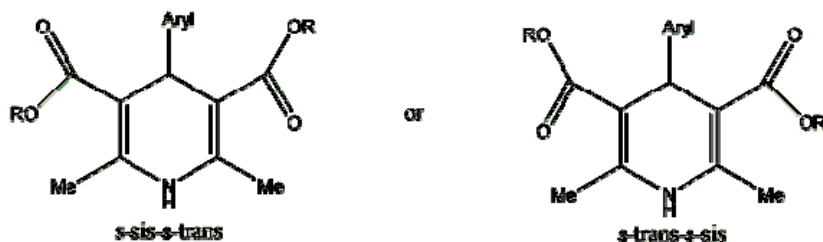
- هم آرائی S-S/ترانس-ترانس که در آن دو گروه استری نسبت به پیوندهای دوگانه DHP حالت ترانس دارند.



- هم آرائی S-S/سیس-سیس که دو گروه استری نسبت به پیوندهای دوگانه حلقه حالت سیس دارند.



- هم آرائی S- ترانس/S- سیس و هم آرائی S- سیس/S- ترانس که در آن یکی از دو گروه های استری نسبت به پیوندهای دوگانه حلقه حالت سیس و دیگری حالت ترانس دارد.



مطالعات ساختمانی انجام شده بیانگر برتری آرایش S- ترانس/S- سیس و S- سیس/S- سیس می باشد [۵۳].

سایر مطالعات مرتبط با رابطه ساختمان و اثر ترکیبات ۱و۴- دی هیدروپیریدینی نشان داده است که:

- در حلقه ۱و۴- دی هیدروپیریدینی، نیتروژن موقعیت ۱ حلقه، آمین نوع دوم می باشد و برای ایجاد پیوند هیدروژنی با گیرنده ضروری است. اکسید شدن حلقه دی هیدروپیریدینی به حلقه مسطح پیریدین، موجب کاهش فعالیت مسدودی آن می شود [۵۵-۵۷].
- استخلاف معمول برای اثر مسدودی در ناحیه ۳ و ۵ حلقه DHP، استر می باشد. عدم وجود استخلاف و یا استخلاف های الکترون کشنده همچون سیانو و یا کربونیل کتونی باعث کاهش اثر مسدودی می شود. در گروه های استری اکسیژن کربونیل دارای یک بار نسبی منفی می باشد که در پیوند هیدروژنی با گیرنده شرکت می کند.

- در صورتی که استرهای ناحیه ۳ و ۵ حلقه DHP یکسان نباشد، C₄ مرکز ناقربینگی خواهد بود. در چنین حالتی معمولاً اثر مسدودی کانال کلسیم افزایش می یابد و این اثر بین انانیتومرها متفاوت خواهد بود و انتخاب فضایی وجود دارد.
- افزایش اندازه گروه های آلکیلی استخلاف استری در C₃ و C₅ سبب افزایش فعالیت مسدودی می گردد به این صورت که این اثر با قرار گرفتن متیل، اتیل، ایزوپروپیل و ایزوبوتیل به ترتیب افزایش می یابد [۵۳و۵۷].
- در دی هیدروپیریدین های نامتقارن، افزایش فعالیت می تواند به دلیل بزرگ شدن گروه استری در ناحیه چپ و کوچکتر شدن آن در ناحیه راست مولکول باشد که به واسطه آن گروه لیپوفیل سمت چپ راحت تر به بخش لیپوفیل گیرنده متصل شده و گروه سمت راست با تشکیل پیوند هیدروژنی با نقطه اتصال خود بر گیرنده بهتر عمل می کند.
- آگونست های کانال کلسیم عموماً دارای مرکز ناقربینگی در C₄ می باشند یعنی استخلاف موقعیت ۳ و ۵ یا حلقه DHP با یک گروه الکترون کشنده مانند نیترو لاکتون، تیولاکتون و یا هیدروژن جایگزین شده است و نیز مشاهده شده که این گروه الکترون کشنده باید در طرف چپ (port) حلقه DHP باشد. در صورت وجود این گروه در طرف راست (Starboard) اثر مسدودی ضعیف مشاهده می شود [۵۶و۹۱].

۱-۵- اثر مهار کنندگی MDR دی هیدروپیریدین ها

مقاومت دارویی، مانع اصلی موفقیت شیمی درمانی است؛ لذا ایجاد ترکیباتی که بتوانند بر مقاومت دارویی داروهای ضد سرطان غلبه کنند، در درمان سرطان بسیار مفید خواهد بود [۶۳]. طیف وسیعی از عوامل مهار کننده MDR وجود دارند از جمله: مهار کننده های کانال کلسیم، مهار کننده های پروتئین کیناز C، مهار کننده های کالمودولین، استروئیدها، سرکوب کننده های سیستم ایمنی و بسیاری از عوامل دیگر. ترکیبات دی هیدروپیریدین نیز دسته گسترده ای از عوامل فعال مهار کننده

مقاومت دارویی هستند^[۶۴] که این خصوصیتشان اولین بار توسط Tsuruo و همکارانش روی سلول های لوکمیا مشخص شد^[۶۵]. بعد از آن، در بسیاری از آزمایشات کلینیکی از وراپامیل برای این منظور استفاده شد؛ ولی استفاده از دی هیدروپیریدین ها به دلیل عوارض قلبی-عروقی آن ها محدود شد^[۶۸].^[۶۶] اما به دلیل اینکه انانتیومر R وراپامیل، اثر ضعیفتر مهار کنندگی کانال کلسیم و در عین حال، به همان میزان اثر مهار کنندگی P- گلیکوپروتئین را دارد، فعالیت مهار کنندگی MDR به اثر بلاک کنندگی کانال کلسیم بستگی ندارد^[۶۹،۶۴]. بنابراین بر اساس یافته های موجود، ترکیبات دی هیدروپیریدین با اثرات بالای مهار کنندگی MDR و نیز فعالیت کم در بلاک کنندگی کانال های کلسیم، با اعمال تغییرات ساختمانی طراحی شده اند.

۱-۵-۱- رابطه ساختمان و اثر (SAR) ترکیبات دی هیدروپیریدین به عنوان عوامل مهار

کننده MDR

به طور کلی، عوامل فعال مهار کننده MDR، ترکیباتی با لیپوفیلیسسته بالا و دارای سیستم های حلقوی آروماتیک^[۷۰] و زنجیره جانبی cationic یا dicationic هستند^[۷۱]. ترکیبات بسیاری نیز دارای اتم نیتروژن نوع سوم با بار مثبت در pH فیزیولوژیک هستند^[۷۲]. همچنین، مطالعات بسیاری نشان داده اند که مشتقات ۱ و ۴- دی هیدروپیریدین که در موقعیت C₄، دارای حلقه آروماتیک می باشند، می توانند اثر سیتوتوکسیسیتی داروهای ضد سرطان را تقویت کنند^[۷۳-۷۵]. مطالعات دیگری به این اثرات مشتقات نیترو ایمیدازول، بدون ایجاد عوارض جانبی ترکیبات ۱ و ۴- دی هیدروپیریدین، اشاره کرده اند^[۶۷].

۱-۶- کاربرد های دیگر دی هیدروپیریدین ها

۱-۶-۱- داروهای او۴- دی هیدروپیریدین در درمان صرع

هم اکنون ۳۰-۲۰٪ موارد صرع به دارو درمانی پاسخ نمی دهند و در سال های اخیر با وجود عرضه داروهای جدید ضد صرع به بازار جهانی دارو، هنوز درمان صرع چندان رضایت بخش نیست^[۴۱]. بسیاری از داروهای ضد صرع که مصرف بالینی دارند نظیر دی فنیل هیدانتوئین، کاربامازپین، باربیتورات ها و بنزودیازپین ها جریان ورود کلسیم را به پایانه های سیناپسی کم می کنند، هر چند در پاره ای از موارد غلظت های مورد نیاز بیش از سطح درمانی می باشد^[۴۲].

با توجه به این موارد، منطقی به نظر می رسد که داروهایی که جریان ورود کلسیم را به داخل سلول ها از طریق کانال های کلسیم مهار می نمایند، یعنی مسددهای کانال کلسیم، دارای خصوصیات ضد صرع باشند^[۴۳]. مشتقات دی هیدروپیریدینی بر ضد حملات صرع القاء شده توسط شوک الکتریکی حداکثر^[۴۱-۴۲] یا حملات صرع amygdale-kindled^[۴۱] مؤثر بوده اند. همچنین در بسیاری از حملات صرعی القاء شده توسط مواد شیمیایی نظیر پنتیلن تترازول (PTZ) پیکروتوکسین، N-متیل-D-آسپاراتات و پیلوکارپین مؤثر بوده اند^[۴۱]. گزارشاتی وجود دارد که نشان می دهد ترکیبات دی هیدروپیریدینی بر علیه حملات القاء شده توسط استریکنین و آمینوفیلین بی اثرند^[۴۰].

در گزارش هایی آمده است که ترکیب Bayk 8644 که یک آگونیست کانال های کلسیمی می باشد، می تواند سبب القای تشنج های Clonic و tonic گردد^[۴۱].

پاره ای از مطالعات نشان داده اند که آنتاگونیست های کانال کلسیم، اثرات ضد تشنجی بعضی داروهای ضد صرع را در مدل های آزمایشی مختلف از صرع القاء شده توسط PTZ و یا شوک الکتریکی حداکثر افزایش می دهند^[۴۱-۴۳]. مثلاً DHP ها فعالیت ضد تشنجی کاربامازپین و یا دی فنیل هیدانتوئین را افزایش داده، اما بر فعالیت والپروات منیزوم بر ضد حملات القاء شده توسط شوک الکتریکی حداکثر بی اثرند. افزایش فعالیت ضد تشنجی داروهای ضد صرع توسط مسددهای

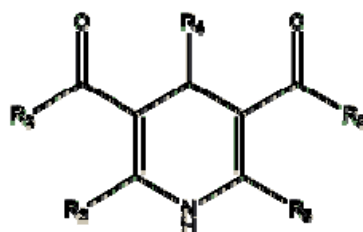
کانال کلسیم در همه DHP ها دیده نمی شود، مثلاً در مورد Niguldipine اثرات متضادی مشاهده شده است^[۴۱].

آملودیپین که در درمان اختلالات قلبی-عروقی جایگاه ویژه ای دارد، از سد خونی-مغزی عبور می کند و گزارشاتی مبنی بر اثرات ضد تشنج این ترکیب وجود دارد. تزریق داخل بطن مغزی از آن جلو Spiking ناشی از PTZ، در نوار مغزی موش صحرایی می گیرد و در این مورد نسبت به نیفدیپین و نیکاردیپین قوی تر است^[۴۱].

۱-۶-۲- مشتقات ۱و۴- دی هیدروپیریدینی به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده

آدنوزین A₃

آنتاگونیست های گیرنده آدنوزین A₃، به طور بالقوه اثرات درمانی مختلف مانند اثرات ضد التهابی، ضد آسم و یا اثرات ضد ایسکمیک دارند. گروهی از مشتقات ۱و۴- دی هیدروپیریدینی با ساختار زیر سنتز شده اند که به طور اختصاصی آنتاگونیست گیرنده آدنوزین A₃ می باشند.



R₂: Me, Et R₃: OEt, SEt
R₄: Me, Ph-ortho-, Et, CHO
R₅: Et, CH₂Ph
R₆: Ph, Cyclohexyl

نشان داده شده است که MRS1097 یک آنتاگونیست اختصاصی گیرنده آدنوزین A₃ بود و با

مهار گیرنده های آدنوزین A₃ در عضله قلب و هیپوکامپوس، دارای اثرات ضد ایسکمیک می

باشند^[۵۸].

مطالعات SAR این ترکیبات بیان می کند که:

تداخلات هیدروفوبیک در خاصیت آنتاگونیستی گیرنده آدنوزین A₃ این ترکیبات بسیار مهم می

باشد [۵۸].

۱-۶-۳- مشتقات ۱و۴- دی هیدروپیریدین به عنوان مهارکننده جذب هورمون تیروئید

توسط سلول ها

ورود هورمون تیروئید از خون به درون سلول یک مرحله ضروری از عملکرد هورمون تیروئید می

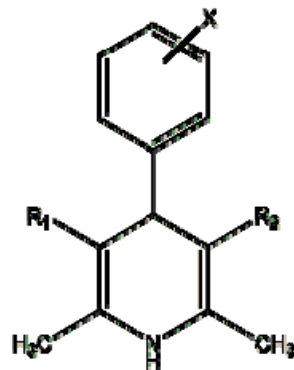
باشد. جزئیات مکانیسم مولکولی ورود هورمون به داخل سلول هنوز به خوبی مشخص نیست. اما با این

وجود چند مطالعه نشان داده است که اختصاصیت فضایی، اشباع پذیری، انرژی و دما نقش مهمی در

ورود هورمون به درون سلول های سوماتیک ایفا می نمایند. اخیراً نشان داده شده است که گروهی از

مشتقات ۱و۴- دی هیدروپیریدینی با ساختمان زیر مهارکننده ورود هورمون تیروئید به داخل سلول

می باشند.

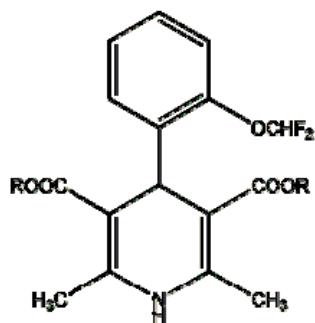


R₁: COOC₂H₅, COOCH₃, CN
R₂: COOC₂H₅, COOCH₃, CN
X: 3-I, OH, OCH₃, NO₂, 4-I, NO₂

زاویه بین حلقه فنیل در موقعیت ۴ در حلقه دی هیدروپیریدین و میزان چرخش آن در فعالیت
 مهاری این ترکیبات نقش مهمی را ایفا می کنند و همچنین، تداخلات هیدروفوب نیز از اهمیت ویژه
 ای برخوردار است [۵۹].

۱-۶-۴- مشتقات ۴-دی هیدروپیریدین به عنوان کاهنده قند خون

مشخص شده است که درمان طولانی مدت با آنتاگونیست های کانال کلسیم مانند نیفدیپین در
 رت های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین و یا حیوانات دیابتی غیروابسته به انسولین سبب کاهش
 معنی دار قند خون، بهبود متابولیسم گلوکز و افزایش حساسیت بافتی به انسولین می گردد. اثرات
 مشابه در بیماران مبتلا به فشارخون و دیابتی غیر وابسته به انسولین که به صورت طولانی مدت تحت
 درمان با نیفدیپین قرار می گیرند، نیز مشاهده گردید. در مطالعه ای نشان داده شده است که مشتقات
 ۴-دی هیدروپیریدینی با ساختارهای زیر بطور معنی داری قند خون را در رت های دیابتی شده با
 استرپتوزوتوسین کاهش می دهند.



R: CH₂CH₂OCH₂CH₂CH₂ (Cerebrocas)
 R: CH₂CH₂OCH₂CH₂ (Elafloron)
 R: CH₂CH₂OCH(CH₃)₂ (OSI-3802)

بررسی رابطه ساختار و اثر این ترکیبات مشخص نموده است که وجود گروه $OCHF_2$ در ناحیه ۲ حلقه هتروسیکل نقش مهمی در فعالیت کاهندگی قندخون این ترکیبات را دارد. افزایش لیپوفیلیسته این ترکیبات و افزایش خاصیت *Memberanotropic* اثرات مثبتی بر فعالیت این ترکیبات دارد [۶۰].

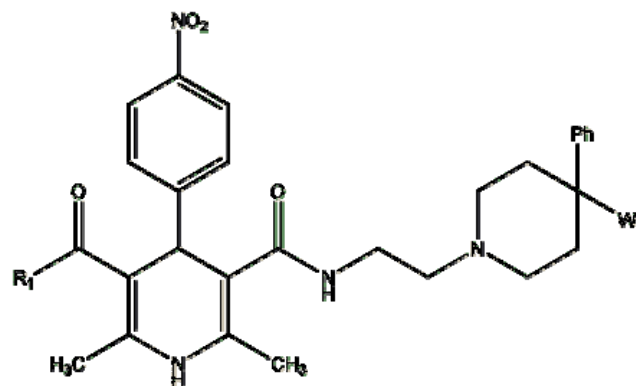
۱-۶-۵- مشتقات ۱و۴- دی هیدروپیریدینی به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده

آدرنژیک α_{1a} برای درمان هایپرپلازی خوش خیم پروستات

بیماری هایپرپلازی خوش خیم پروستات یک اختلال اورولوژیک است که میزان بروز آن با افزایش سن افزایش می یابد. بطوری که ۵۰٪ مردان بالای ۶۰ سال علائم مختلفی و با درجات متفاوت این بیماری را نشان می دهند. از علائم این بیماری می توان به کاهش جریان ادرار، تکرار ادرار، افزایش حجم باقی مانده ادرار و سوزش ادرار اشاره کرد.

آنتاگونیست های آدرنژیک α_1 مانند ترازوسین و Doxazosin و پرازوسین جهت کاهش علائم این بیماری بکار می رود. این ترکیبات با آنتاگونیزه کردن گیرنده α_1 سبب کاهش و تعدیل علائم این بیماری می شود. اما چون این داروها غیراختصاصی عمل نموده و بر روی انواع مختلف گیرنده های α_1 مؤثر هستند، بنابراین اثرات جانبی نامطلوبی مانند کاهش فشارخون وضعیتی، سرگیجه، کاهش میل جنسی، گرفتگی بینی و ... را ایجاد می کنند.

گروهی از مشتقات ۱و۴- دی هیدروپیریدینی با ساختار زیر سنتز شده اند که اختصاصیت آنها بر روی گیرنده α_{1a} به طور قابل ملاحظه ای نسبت به دیگر انواع گیرنده α_1 افزایش یافته است.

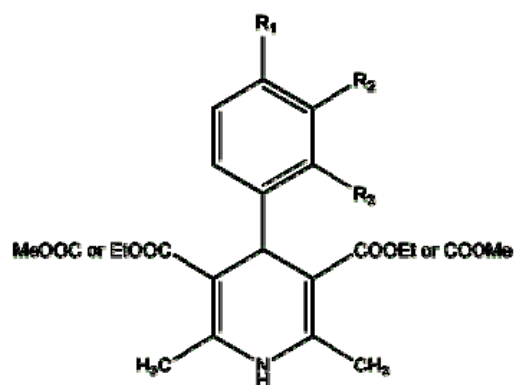


R₁: NH₂, MeNH₂
W: Ph, Me, OH, COMe, CO₂Et, CO₂Ph

این ترکیبات در حدود ۵۰۰ برابر برگیرنده α_{1a} نسبت به α_{1d} اختصاصی تر عمل می کنند و در بعضی از مشتقات این اختصاصیت به میزان بیش از ۷۰۰ برابر می رسند [۶۱].

۱-۶-۶- اثرات ضدقارچی مشتقات (۴-دی هیدروپیریدینی

گروهی از مشتقات (۴-دی هیدروپیریدینی با ساختمان زیر اثرات ضد قارچی بخصوص بر روی آسپرژیلوس نشان داده است.



R₁, R₂, R₃: OMe, OH, Cl, Br, H

این ترکیبات بطور *in vitro* بر روی آسپرژیلوس مؤثر هستند و اثرات ضد قارچی خوبی نشان داده

اند [۹۰،۶۲].

۷-۱- هدف از این مطالعه

همانگونه که قبلاً اشاره شد ترکیبات ۱و۴- دی هیدروپیریدینی دارای اثرات مختلفی چون مهارکنندگی کانال کلسیم و ضد سرطان می باشند.

در این مطالعه، مشتقات جدید ۱و۴- هیدروپیریدینی حاوی استخلاف نیترو فنیل و نیتروایمیدازولیل در موقعیت C_4 و گروه های پیریدیل و آلکیل استرهای مختلف به ترتیب در موقعیت C_3 و C_5 حلقه دی هیدروپیریدین، طراحی و سنتز گردید.

ترکیبات طراحی شده فاکتورهای لازم جهت اعمال اثر مسدودی کانال کلسیم را دارند، زیرا:

الف) ساختار کلی ترکیبات ۱و۴- هیدروپیریدین مهارکننده کانال کلسیم را دارا هستند.

ب) گروه نیتروایمیدازولیل در موقعیت ۴ حلقه دی هیدروپیریدین، بیوایزواستر گروه نیتروفنیل در آنالوگ های نیفدیپین است.

لذا در این مطالعه، پس از سنتز ترکیبات ذکر شده، ارزیابی اثرات مسدودی کانال کلسیم بر روی

ایلئوم خوکچه هندی بعنوان مدل عضله صاف، مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

همچنین ترکیبات مذکور به صورت بالقوه می توانند بعنوان عوامل ضد سرطان عمل نمایند؛ زیرا:

الف) این ترکیبات دارای ساختار کلی عوامل ۱و۴- دی هیدروپیریدینی ضد سرطان هستند.

ب) حاوی گروه های استری در ناحیه ۳ و ۵ حلقه دی هیدروپیریدین می باشند.

ج) گروه نیتروایمیدازولیل ناحیه ۴، دارای خاصیت ضد سرطان می باشد.

۲- مواد، وسایل و روش کار

۲-۱- مواد

| کشور | شرکت | فرمول شیمیایی | ماده شیمیایی |
|-------|---------------------------------------|--|---|
| آلمان | Merck | CHCl_3 | کلروفرم |
| آلمان | Merck | CH_3OH | متانول |
| آلمان | Merck | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ | اتانول مطلق |
| آلمان | Merck | HCl | اسید هیدروکلریک |
| آلمان | Merck | $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ | دی متیل سولفو کساید |
| ایران | آزمایشگاه شیمی دانشکده داروسازی تهران | $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_3\text{N}_3$ | ۲-هیدروکسی متیل-۱-متیل-۵-نیتروایمیدازول |
| آلمان | Merck | MnO_2 | دی اکسید منگنز |
| آلمان | Merck | $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$ | ۲-پیریدیل پروپانول |
| آلمان | Merck | $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$ | ۳-پیریدیل پروپانول |
| آلمان | Merck | $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$ | ۴-پیریدیل پروپانول |
| آلمان | Aldrich | $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_3$ | ۲و۲و۶-تری متیل-۴-هیدروژن-۳و۱-دی اکسین-۴-اون |
| آلمان | Merck | $\text{C}_2\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ | آمونیم استات |
| آلمان | Merck | $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ | ۲-پروپانول |
| آلمان | Merck | C_8H_{10} | گزیلین |
| آلمان | Merck | $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$ | متیل استو استات |
| آلمان | Merck | $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$ | اتیل استو استات |

| | | | |
|----------|---|---------------------------------|-----------------------------------|
| ایران | آزمایشگاه شیمی مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی شیراز | $C_7H_{12}O_3$ | ایزوپروپیل استو استات |
| آلمان | Merck | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | کلرید کلسیم-۲ مولکول آب |
| آلمان | Merck | $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ | گلوکز-۱ مولکول آب |
| آلمان | Merck | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | کلرید منیزیم-۶ مولکول آب |
| آلمان | Merck | $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | سدیم دی هیدروژن فسفات-۱ مولکول آب |
| آلمان | Merck | NaCl | کلرید سدیم |
| آلمان | Merck | $NaHCO_3$ | بی کربنات سدیم |
| انگلستان | Sigma | $C_{17}H_{18}O_6N_2$ | نیفدپین |
| ایران | آزمایشگاه شیمی مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی شیراز | H_2O | آب دوبار تقطیر و آب دیونیزه |
| آلمان | Merck | $C_4H_{10}O$ | دی اتیل اتر |
| آلمان | Merck | C_6H_{14} | هگزان نرمال |
| آلمان | Merck | $C_7H_5O_3N$ | ۲- نیترو بنزآلدهید |
| آلمان | Merck | $C_7H_5O_3N$ | ۳- نیترو بنزآلدهید |
| آلمان | Merck | $C_7H_5O_3N$ | ۴- نیترو بنزآلدهید |
| آلمان | Merck | $CDCl_3$ | کلروفرم دوتره |
| آلمان | Merck | Silica gel 60 GF ₂₅₄ | سیلیکا ژل جهت تهیه پلیت |

| | | | |
|----------|-------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| آلمان | Merck | Silica gel (0.063-0.200 mm) | سیلیکا ژل ستون |
| ایران | PARS Chemie | | پترولیوم اتر |
| انگلستان | Biosera | | RPMI 1640 |
| انگلستان | Sigma | | MTT |
| انگلستان | Sigma | | آلبومین سرم جنینی گاو (FBS) |
| آلمان | Merck | | تریپان بلو |
| انگلستان | Biosera | | پنی سیلین و استرپتومایسین |
| آمریکا | Gibco | | تریپسین |
| ایتالیا | Pharmacia | | دوکسوروبیسین ۵۰ |

۲-۲- دستگاه ها و وسایل

| کشور | شرکت | دستگاه |
|--------|--|--------------------|
| ژاپن | Nikon | Inverse Microscope |
| ایران | Jal Tajhiz JTLVC2X | Laminar Flow hood |
| آلمان | Leitz | Light Microscope |
| ایران | Shimifann E.O. 155 | آون |
| کره | SPL Life Science | پلیت ۹۶ خانه |
| آمریکا | Talor-harton | تانک نیتروژن |
| آلمان | Sartotius cp 2245 (Max 220g,d=0.1) Sartotius cp 2202 (Max 2200g,d=0.01) | ترازوی دیجیتالی |

| | | |
|----------|---|------------------------------|
| اسپانیا | Pan Lab (Letica) TRI 202P | ترانسدیوسر |
| اسپانیا | Pan Lab s.1 EL 13206 | ترموستات |
| اسپانیا | Letica | حمام بافت |
| آلمان | Burker-AvanceDPX-500 | دستگاه $^1\text{H-NMR}$ |
| ژاپن | BIO RAD | دستگاه Eliza Reader |
| آمریکا | Perkin Elmer | دستگاه FT-IR |
| آلمان | Heidolph MR 3001 k | دستگاه Heater stirrer |
| آمریکا | Agilent technologies 5975C inert MSD | دستگاه Mass-spectroscopy |
| سوئیس | Metrohm AG 9101 Herisau | دستگاه pH-meter |
| استرالیا | AD Instrument Quad Bridge Amp Power Lab 4/30 ML 112,866 | دستگاه Power Lab |
| ایران | Kavoosh Med Instrument | دستگاه اتوکلاو |
| انگلستان | Electro thermal 9200 | دستگاه تعیین نقطه ذوب |
| آلمان | Heidolph400 | دستگاه تقطیر دورانی |
| فرانسه | Direct-Q5 (MILLIPORE) | دستگاه تهیه آب دیونیزه |
| ایران | Fater 6204(Fater Rizpardaz) | دستگاه تهیه آب مقطر |
| ژاپن | Eyela A-35 | دستگاه خلأ |
| ایران | Electro Steel | فریزر $^{\circ}\text{C} -20$ |
| سوئد | Snijders | فریزر $^{\circ}\text{C} -70$ |
| آلمان | Philips | لامپ UV |
| آلمان | Hat 250-611-90 | لامپ سدیم |

| | | |
|-------|----------|----------------------------------|
| آلمان | Brand | میکروپیپت $10-0.5 \mu\text{l}$ |
| آلمان | Brand | میکروپیپت $10-100 \mu\text{l}$ |
| آلمان | Brand | میکروپیپت $100-1000 \mu\text{l}$ |
| آلمان | Heidolph | ورتکس |

وسایل آزمایشگاهی

پیپت- بشر- استوانه مدرج- بالن ته گرد- لوله آزمایش- ارلن مایر- بالن حجمی- لوله موئینه- مبرد- دسیکاتور- کپسول گاز ازت (شرکت پارس بالن)- پلیت شیشه ای (20×20 سانتیمتر)- کاغذ TLC (TLC -plastic or aluminum sheet Silica gel 60F₂₅₄) از شرکت Merck آلمان- فیچی - پنس- سرنگ ۱ میلی لیتری- سرنگ هامیلتون (آمریکا)- کپسول کربوژن (۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ دی اکسید کربن از شرکت پارس بالن)- نخ بخیه ۰۴- سوزن

۲-۳- حیوانات آزمایشگاهی و رده های سلولی

خوکچه هندی نر آلبینو با وزن ۳۰۰-۴۰۰ گرم از لانه حیوانات دانشکده پزشکی

National Cell Bank (Pasteur Institute) از HeLa cell line

National Cell Bank (Pasteur Institute) از Raji cell line

National Cell Bank (Pasteur Institute) از MCF-7 cell line

National Cell Bank (Pasteur Institute) از LS-180 cell line

۲-۴- نرم افزار های مورد استفاده

نرم افزار Chem. Window

نرم افزار Hyper Chem. 7.0

نرم افزار Curve Expert 1.3

نرم افزار Sigma Plot I

نرم افزار SPSS 13.0

نرم افزار Dragon 2.1 2002

نرم افزار Excel 2003

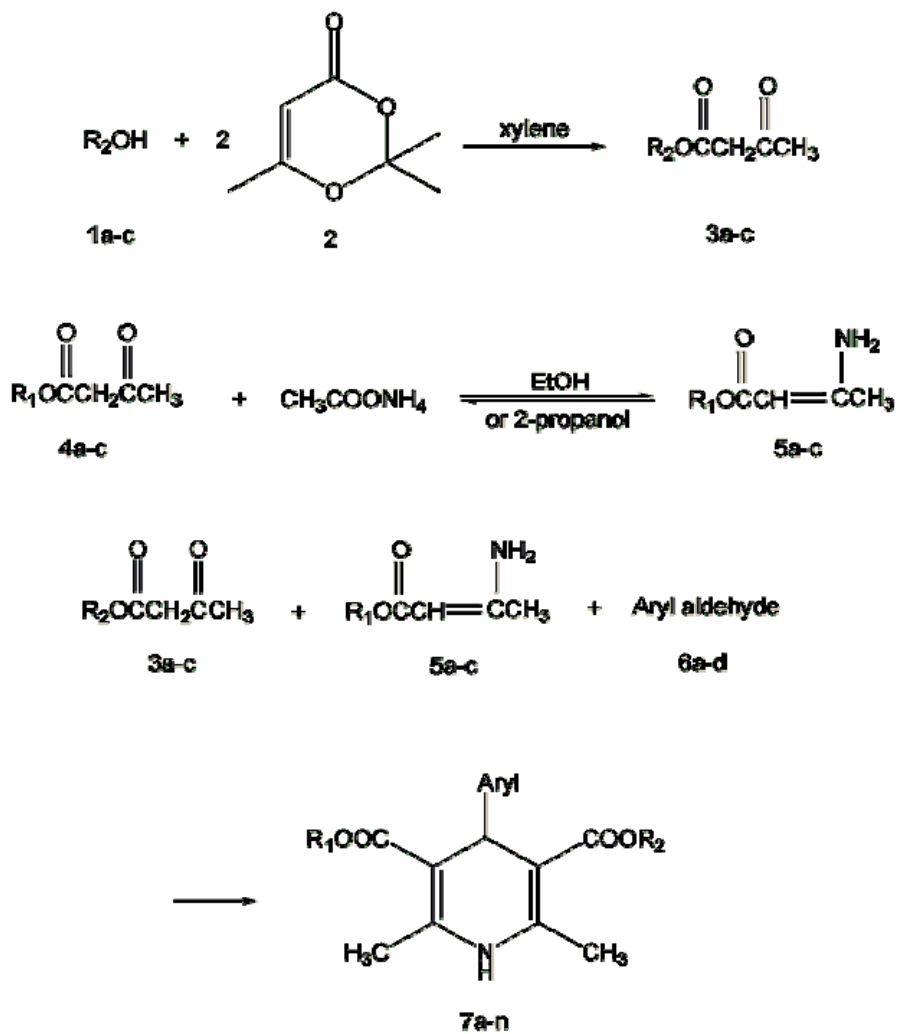
نرم افزار MATLAB 7.0.4

نرم افزار ISIS Draw 2.4

۲-۵- روش کار

۲-۵-۱- روش کلی سنتز ترکیبات (۴-دی هیدرو پیریدینی با استخلاف نا قرینه به روش

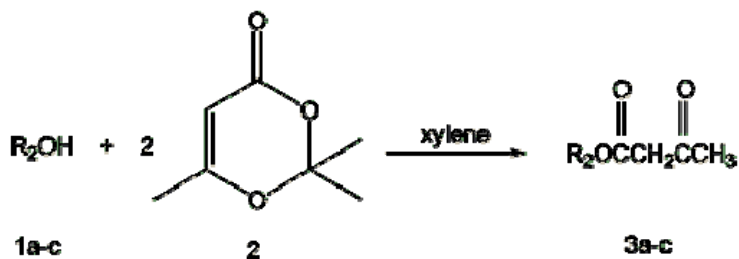
Dagnino



شکل ۲-۱: روش کلی سنتز ترکیبات (۴-دی هیدرو پیریدینی مورد نظر با استخلاف نا قرینه به روش Dagnino

- استو استات های مورد نیاز (3a-3c) از واکنش الکل های مربوطه (1a-1c) با ۲و۲-تری متیل

-۳و۱-دی اکسین-۴-اون (2) تهیه شدند:

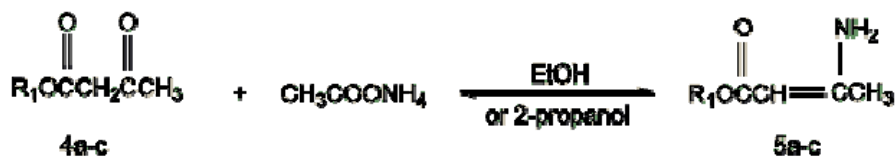


R_2 : 3-(pyridine-2-yl)propyl (a)
 3-(pyridine-3-yl)propyl (b)
 or 3-(pyridine-4-yl)propyl (c)

شکل ۲-۲: روش کلی سنتز آریل استو استات ها

- از آلکیل استو استات مربوطه (4a-4c) در حضور آمونیوم استات و حلال مناسب، آلکیل

آمینوکروتونات (5a-5c) ایجاد شد:

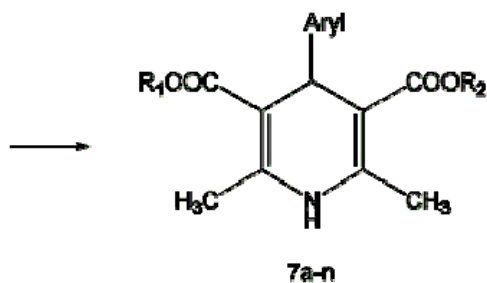
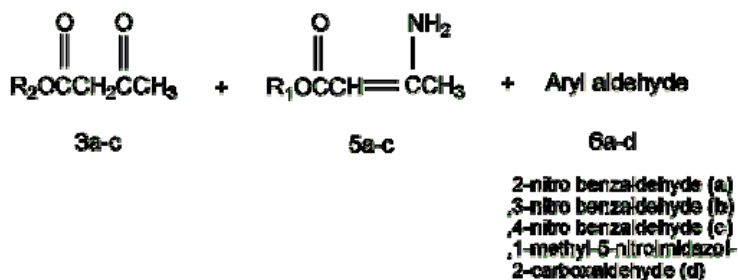


R_1 : methyl(a), ethyl(b) or isopropyl(c)

شکل ۲-۳: روش کلی سنتز آلکیل-۳-آمینوکروتونات

- از واکنش بین استو استات (3a-3c)، آلکیل آمینوکروتونات (5a-5c) و آلدهید (6a-d) مربوطه،

در حلال مناسب و به دور از نور، ترکیب دی هیدرو پیریدینی مورد نظر (7a-n) سنتز شد:



۲-۵-۲- سنتز ۱-متیل-۵-نیتروایمیدازول-۲-کربوکسالدهید

۶/۳ میلی مول (۱ گرم) ۲- هیدروکسی متیل-۱-متیل-۵-نیتروایمیدازول و ۶/۳ گرم دی اکسید منگنز در ۶۰ میلی لیتر کلروفرم به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه به شدت به هم زده شد. تشکیل محصول توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم-متانول (۸۰٪) - (۲۰٪) به تأیید رسید. پس از صاف کردن، حلال در خلأ تبخیر شد و ماده جامد زرد کم رنگ به دست آمده با کریستال کردن در استون، خالص گردید. (۸۰٪، ۸۰۰ mg) و (mp=۹۷-۹۸°C)

IR (KBr): ν 2875, 2800(CH, -CHO), 1702(CO), 1532, 1351 cm^{-1} (NO₂)



شکل ۲-۴: روش سنتز ۱-متیل-۵-نیتروایمیدازول-۲-کربوکسالدهید

۲-۵-۳- روش کلی سنتز آریل استو استات ها

۱۶/۶۷ میلی مول (۲/۲۸ گرم) الکل های مربوطه و ۱۶/۶۷ میلی مول (۲/۳۷ گرم) ۲و۲و۶-تری متیل-۳و۱-دی اکسین-۴-اون در ۱۰ میلی لیتر گزین و دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه، حین بهم خوردن رفلاکس گردید (شکل ۲-۳). تشکیل محصول توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم-اتانول (۳-۹۳٪-۷٪) به تأیید رسید. سپس گزین در شرایط خلأ تبخیر گردید. باقیمانده توسط کروماتوگرافی ستونی با فاز متحرک اتیل استات-پترولیوم اتر (۲۰٪-۸۰٪) خالص گردید. محصول تخلیص شده، مایعی غلیظ به رنگ زرد کم رنگ بود (شکل ۲-۲).

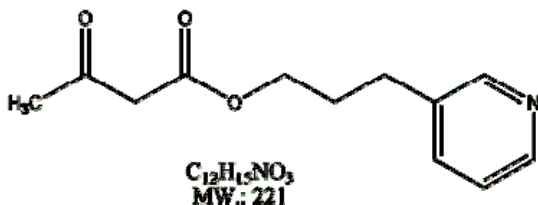
۲-۵-۳-۱- سنتز ۳- (پیریدین-۲-ایل) پروپیل-۳- اکسو بوتانوات (3a)



این ترکیب مطابق روش ذکر شده در بخش ۲-۵-۳، سنتز گردید. ۱۶/۶۷ میلی مول (۲/۲۸ گرم) ۲- پیریدیل پروپانول و ۱۶/۶۷ میلی مول (۲/۳۷ گرم) ۲و۲و۶-تری متیل-۳و۱-دی اکسین-۴-اون در ۱۰ میلی لیتر گزین و دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه، حین بهم خوردن رفلاکس گردید. تشکیل محصول توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم-اتانول (۳-۹۳٪-۷٪) به تأیید رسید. سپس گزین در شرایط خلأ تبخیر گردید. باقیمانده توسط کروماتوگرافی ستونی با فاز متحرک اتیل استات-پترولیوم اتر (۲۰٪-۸۰٪) خالص گردید. محصول تخلیص شده، مایعی غلیظ به رنگ زرد کم رنگ بود (>۹۰٪).

IR: ν 1743 (CO, ester), 1716 (CO, keton), 2958 cm^{-1} (C-H aromatics)

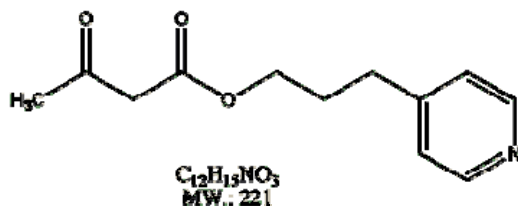
۲-۵-۳-۲- سنتز ۳-(پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۳-اکسو بوتانوات (3b)



این ترکیب مطابق روش ذکر شده در بخش ۲-۵-۳، سنتز گردید. ۱۶/۶۷ میلی مول (۲/۲۸ گرم) ۳- پیریدیل پروپانول و ۱۶/۶۷ میلی مول (۲/۳۷ گرم) ۲و۲و۶- تری متیل-۱و۳- دی اکسین-۴- اون در ۱۰ میلی لیتر گزین و دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه، حین بهم خوردن رفلکس گردید. تشکیل محصول توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم- اتانول (۷٪-۹۳٪) به تأیید رسید. سپس گزین در شرایط خلأ تبخیر گردید. باقیمانده توسط کروماتوگرافی ستونی با فاز متحرک اتیل استات-پترولیوم اتر (۲۰٪-۸۰٪) خالص گردید. محصول تخلیص شده، مایعی غلیظ به رنگ زرد کمرنگ بود (>۹۰٪).

IR: ν 1748(CO, ester), 1717 (CO, keton), 2958 cm^{-1} (C-H aromatics)

۲-۵-۳-۳- سنتز ۳-(پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۳-اکسو بوتانوات (3c)



این ترکیب مطابق روش ذکر شده در بخش ۲-۵-۳، سنتز گردید. ۱۶/۶۷ میلی مول (۲/۲۸ گرم) از ۴- پیریدیل پروپانول و ۱۶/۶۷ میلی مول (۲/۳۷ گرم) ۲و۲و۶- تری متیل-۱و۳- دی اکسین-۴- اون در ۱۰ میلی لیتر گزین و دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه، حین بهم خوردن رفلکس گردید. تشکیل محصول توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم-

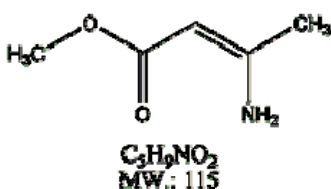
اتانول (۰.۷٪-۰.۹۳٪) به تأیید رسید. سپس گزین در شرایط خلأ تبخیر گردید. باقیمانده توسط کروماتوگرافی ستونی با فاز متحرک اتیل استات-پترولیوم اتر (۰.۲۰٪-۰.۸۰٪) خالص گردید. محصول تخلیص شده، مایعی غلیظ به رنگ زرد کم رنگ بود (>۰.۹۰٪).

IR: ν 1742 (CO, ester), 1716 (CO, keton), 2963 cm^{-1} (C-H aromatics)

۲-۵-۴- روش کلی سنتز آلکیل-۳- آمینوکروتونات

جهت سنتز ۲ میلی مول آلکیل آمینوکروتونات، ۲ میلی مول آلکیل استو استات مربوطه و ۳ میلی مول آمونیوم استات (۰/۲۳۰ گرم) در ۱۰ میلی لیتر اتانول یا ۲- پروپانول و دمای ۸۰-۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط رفلاکس قرار داده شد. تشکیل محصول توسط طیف IR به تأیید رسید (شکل ۲-۳).

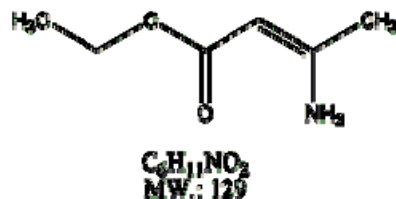
۲-۵-۴-۱- سنتز متیل -۳- آمینوکروتونات (5a)



۲ میلی مول متیل استو استات (۰/۲۳۲ گرم) و ۳ میلی مول آمونیوم استات (۰/۲۳۰ گرم) در ۱۰ میلی لیتر اتانول و دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط رفلاکس قرار داده شد. تشکیل محصول توسط طیف IR به تأیید رسید.

IR (CCl₄): ν 1716(C=O, ester), 3511,3333 cm^{-1} (NH₂)

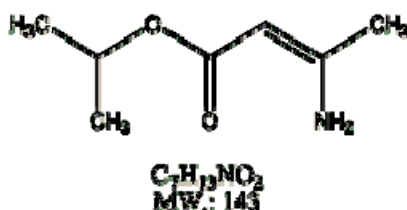
۲-۵-۴-۲- سنتز اتیل-۳- آمینوکروتونات (5b)



۲ میلی مول اتیل استو استات (۰/۲۶۰ گرم) و ۳ میلی مول آمونیوم استات (۰/۲۳۰ گرم) در ۱۰ میلی لیتر اتانول و دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط رفلکس قرار داده شد. تشکیل محصول توسط طیف IR به تأیید رسید.

IR (CCl₄): ν 1716(C=O, ester), 3511,3332 cm⁻¹ (NH₂)

۲-۵-۴-۳- سنتز ایزوپروپیل-۳- آمینوکروتونات (5c)



۲ میلی مول ایزوپروپیل استو استات (۰/۲۸۸ گرم) و ۳ میلی مول آمونیوم استات (۰/۲۳۰ گرم) در ۱۰ میلی لیتر ۲-پروپانول و دمای ۸۵-۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط رفلکس قرار داده شد. تشکیل محصول توسط طیف IR به تأیید رسید.

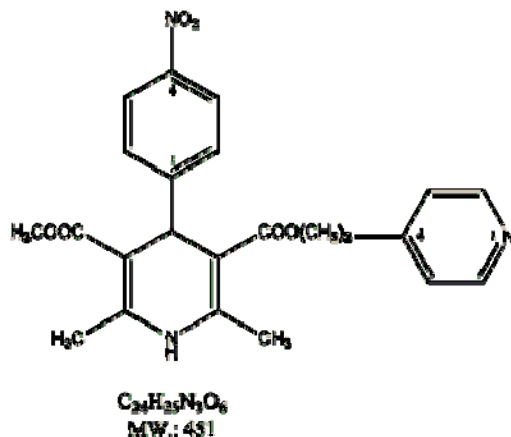
IR (CCl₄): ν 1716(C=O, ester), 3509,3332 cm⁻¹ (NH₂)

۲-۵-۵- روش کلی سنتز ۴- دی هیدرو پیریدین با استخلاف نا قرینه

به محلول آلکیل آمینو کروتونات (**5a-c**) به دست آمده در بخش ۲-۵-۴، ۲ میلی مول استو استات (**3a-c**)، ۲ میلی مول آلدهید مربوطه (**6a-d**) و ۱۰ میلی لیتر اتانول یا ۲-پروپانول به عنوان حلال افزوده گردید و محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰-۹۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلاکس و دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم- اتانول (۹۵٪-۵٪) خالص گردید. سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر، دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، ¹H-NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد (شکل ۲-۱).

۲-۵-۵-۱- سنتز ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۲-۶-دی متیل-۴-۴-

نیتروفنیل-۴-۱-دی هیدروپیریدین-۳-۵-دی کربوکسیلات (7a)



به محلول متیل آمینوکروتونات (5a) به دست آمده از مرحله ۲-۵-۴-۱، ۲ میلی مول ۳- (پیریدین-۴-ایل- پروپیل) ۳- اکسو بوتانات (3c) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۴- نیترو بنزالدهید (6c) (۰/۳۰۲ گرم) و ۱۰ میلی لیتر اتانول به عنوان حلال افزوده گردید، محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم- اتانول (۵-۹٪) خالص گردید ($R_f=0/۲۷$). سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر، دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، ^1H-NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۱۳۰ mg، ۱۴/۴٪) و ($mp=152-154^{\circ}C$)

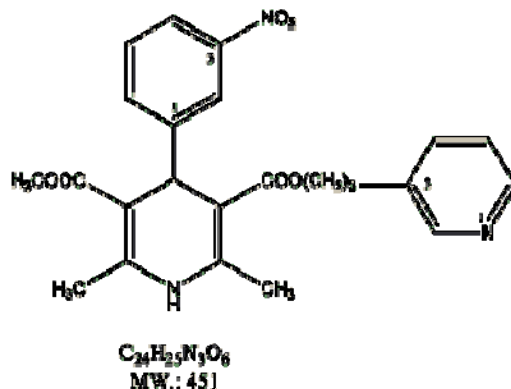
IR (KBr): ν 3278(NH), 3077(CH-aromatic), 2947(CH-aliphatic), 1699(CO), 1342,1508 cm^{-1} (NO_2)

^1H-NMR ($CDCl_3$, 500Hz): δ 1.90-1.94(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 2.34-2.37(2s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃), 2.55(t,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j= 15.50), 3.65(s,3H,COOCH₃), 4.03-4.09(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 5.10(s,1H,C₄-H), 5.91(brs,1H,NH-DHP), 7.02(d,2H,C_{3,5}H-pyridyl, j= 5.85), 7.44(d,2H,C_{2,6}H-phenyl, j= 8.75), 8.07(d,2H,C_{3,5}H-phenyl, j= 8.70), 8.47(d,2H,C_{2,6}H-pyridyl, j= 6.00)

MS: (m/z) 451(1), 434(5), 420(4), 343(11), 329(100), 297(6), 196(3), 136(8), 120(22), 106(13), 92(14), 77(4), 51(2)

۲-۵-۵-۲- سنتز ۳- متیل-۵- (۳- پیریدین-۳- ایل) پروپیل- ۲-۶- دی متیل- ۴- (۳)-

نیتروفنیل- ۴-۱- دی هیدروپیریدین- ۳-۵- دی کربوکسیلات (7b)



به محلول متیل آمینوکروتونات (5a) به دست آمده از مرحله ۲-۵-۴-۱، ۲ میلی مول ۳- (پیریدین-۳- ایل- پروپیل) ۳- اکسو بوتانات (3b) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۳- نیترو بنزآلدهید (6b) (۰/۳۰۲ گرم) و ۱۰ میلی لیتر اتانول به عنوان حلال افزوده گردید و محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم- اتانول (۵-۹٪) خالص گردید ($R_f=0/۲۷$). سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره بلوری گردید، در نهایت ساختمان شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، ^1H-NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۴۷/۵ mg، ۰/۵/۲۶) و (mp=۱۳۸-۱۴۰°C)

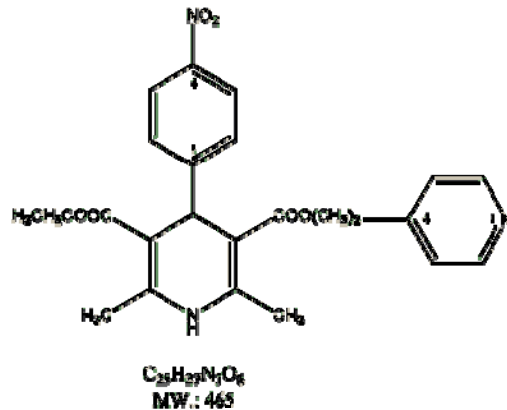
IR (KBr): ν 3188(NH), 3057(CH-aromatic), 2925(CH-aliphatic), 1682(CO), 1344,1526 cm^{-1} (NO_2)

^1H-NMR ($CDCl_3$, 500Hz): δ 1.89-1.95(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 2.36-2.38(2s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃), 2.57(t,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j= 15.45), 3.65(s,3H,COOCH₃), 4.01-4.12(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 5.10(s,1H,C₄-H), 5.87(brs,1H,NH-DHP), 7.18-7.20(dd,1H,C₅H-pyridyl), 7.37(t,1H,C₅H-phenyl, j= 15.80), 7.41(d,1H,C₆H-phenyl,j= 7.8), 7.64(d,1H,C₄H-pyridyl, j= 7.65), 7.99(d,1H,C₄H-phenyl, j= 8.20), 8.11(s,1H,C₂H-phenyl), 8.37(s,1H,C₂H-pyridyl), 8.43(d,1H,C₆H-pyridyl, j= 3.50)

MS: (m/z) 452(7), 434(4), 420(6), 329(33), 297(72), 120(22), 106(13), 92(50), 78(7), 51(5)

۲-۵-۵-۳- سنتز ۳- اتیل-۵- (۳- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲ و ۶- دی متیل-۴- (۴)-

نیتروفنیل)-۱ و ۴- دی هیدروپیریدین-۳ و ۵- دی کربوکسیلات (7c)



به محلول اتیل آمینوکروتونات (**5b**) به دست آمده از مرحله ۲-۵-۴-۲، ۲ میلی مول ۳- (پیریدین-۴- ایل- پروپیل)-۳- اکسو بوتانات (**3c**) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۴- نیترو بنزآلدهید (**6c**) (۰/۳۰۲ گرم) و ۱۰ میلی لیتر اتانول به عنوان حلال افزوده گردید و محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم- اتانول (۵-۹۵٪) خالص گردید ($R_f=0/24$). سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، 1H -NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۲۷۳/۲ mg، ۲۹/۳۸٪) و ($mp=114-118^\circ C$)

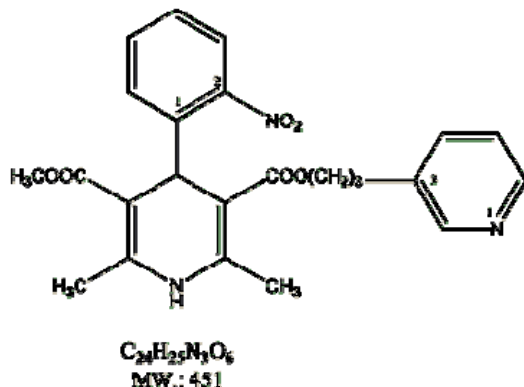
IR (KBr): ν 3194(NH), 3075(CH-aromatic), 2951(CH-aliphatic), 1688,1703(CO), 1343,1513 cm^{-1} (NO_2)

1H -NMR ($CDCl_3$, 500Hz): δ 1.23(t,3H,COOCH₂CH₃, j= 14.25), 1.90-1.93(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 2.36(2s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃), 2.56(t,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j= 15.55), 4.04-4.12(m,4H,COOCH₂CH₂CH₂ and COOCH₂CH₃), 5.11(s,1H,C₄-H), 5.87(brs,1H,NH-DHP), 7.02(d,2H,C_{3,5}H-pyridyl, j= 5.95), 7.45(d,2H,C_{2,6}H-phenyl, j= 8.75), 8.08(d,2H,C_{3,5}H-phenyl, j= 8.75), 8.47(d,2H,C_{2,6}H-pyridyl, j= 6.00)

MS: (m/z) 466(1), 448(40), 343(100), 329(4), 297(44), 271(4), 196(21), 136(11), 120(58), 106(13), 93(20), 77(6)

۲-۵-۴- سنتز ۳- متیل-۵- (۳- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۲-۶- دی متیل-۴- (۲)-

نیتروفیل)-۴۱- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7d)



به محلول متیل آمینوکروتونات (5a) به دست آمده از مرحله ۲-۴-۵-۱، ۲ میلی مول ۳- (پیریدین-۳- ایل- پروپیل)-۳- اکسو بوتانات (3b) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۲- نیترو بنزآلدهید (6a) (۰/۳۰۲ گرم) و ۱۰ میلی لیتر اتانول به عنوان حلال افزوده گردید و محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم-اتانول (۵٪-۹۵٪) خالص گردید و سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، ¹H-NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۲۲۱/۳ mg، ۲۴/۵۳٪) و (mp=۱۷۸-۱۸۰°C)

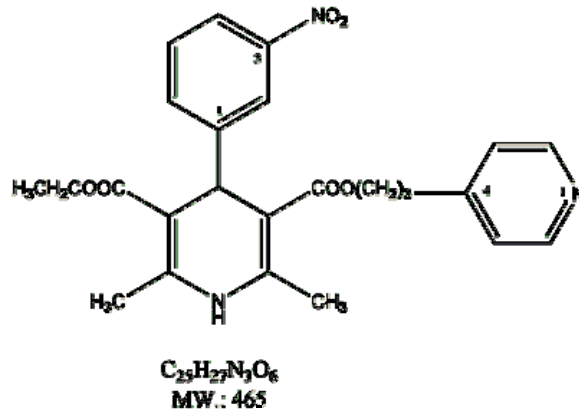
IR (KBr): ν 3188(NH), 3067(CH-aromatic), 2944(CH-aliphatic), 1699,1688(CO), 1342,1508 cm^{-1} (NO₂)

¹H-NMR (CDCl₃, 500Hz): δ 1.86-1.92(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 2.34(2s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃), 2.47(t,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j= 15.65), 3.58(s,3H,COOCH₃), 3.99-4.12(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 5.78(s,1H,C₄-H), 5.89(brs,1H,NH-DHP), 7.16-7.19 (dd,1H,C₅H-pyridyl), 7.23(t,1H,C₄H-phenyl, j= 8.60), 7.43(d,1H,C₆H-phenyl, j= 7.85), 7.47(t,1H, C₃H-phenyl, j= 15.15), 7.53(d,1H,C₄H-pyridyl, j= 1.30), 7.68(d,1H,C₃H-phenyl, j= 7.00), 8.30(s,1H,C₂H-pyridyl), 8.40(d,1H,C₆H-pyridyl, j= 4.80)

MS: (m/z) 452(1), 434(36), 420(2), 343(1), 329(16), 297(31), 270(55), 196(13), 136(8), 120(87), 106(23), 92(100), 77(13), 51(8)

۲-۵-۵-۵- سنتز ۳-اتیل-۵-۳- (پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۲-۶- دی متیل-۴-۳-

نیتروفنیل-۴۱- دی هیدروپیریدین-۵۳- دی کربوکسیلات (7e)



به محلول اتیل آمینو کروتونات (**5b**) به دست آمده از مرحله ۲-۴-۵-۲، ۲ میلی مول ۳- (پیریدین-۴-ایل- پروپیل) ۳- اکسو بوتانات (**3c**) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۳- نیترو بنزآلدهید (**6b**) (۰/۳۰۲ گرم) و ۱۰ میلی لیتر اتانول به عنوان حلال افزوده گردید و محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم- اتانول (۵-۹۵٪) خالص گردید و $R_f=0/30$. سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، ^1H-NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۲۲۹/۴ mg، ۲۴/۶۷٪) و (mp=۱۶۷-۱۷۰°C)

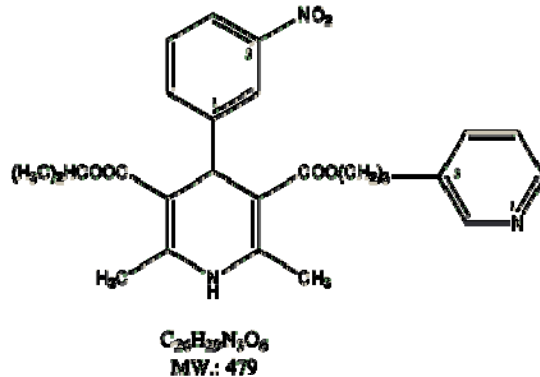
IR (KBr): ν 3272(NH), 3068(CH-aromatic), 2957(CH-aliphatic), 1697(CO), 1348, 1524 cm^{-1} (NO_2)

^1H-NMR ($CDCl_3$, 500Hz): δ 1.23(t, 3H, $COOCH_2CH_3$, $j=14.20$), 1.90-1.95(m, 2H, $COOCH_2CH_2CH_2$), 2.37(2s, 6H, C_2-CH_3 and C_6-CH_3), 2.56(t, 2H, $COOCH_2CH_2CH_2$, $j=15.55$), 4.06-4.16(m, 4H, $COOCH_2CH_2CH_2$ and $COOCH_2CH_3$), 5.11(s, 1H, C_4-H), 5.94(brs, 1H, NH-DHP), 7.03(d, 2H, $C_{3,5}H$ -pyridyl, $j=5.95$), 7.37(t, 1H, C_5H -phenyl, $j=15.85$), 7.64(d, 1H, C_6H -phenyl, $j=7.70$), 7.99(d, 1H, C_4H -phenyl, $j=1.30$), 8.14(s, 1H, C_2H -phenyl), 8.47(d, 2H, $C_{2,6}H$ -pyridyl, $j=5.95$)

MS: (m/z) 466(1), 448(35), 343(100), 329(4), 297(50), 196(16), 136(9), 120(18), 106(13), 92(12), 77(2), 51(1)

۲-۵-۷- سنتز ۳-ایزوپروپیل-۵-۳- (پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲-۶- دی متیل-۴-

(۳- نیترو فنیل)-۴-۱- دی هیدرو پیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7g)



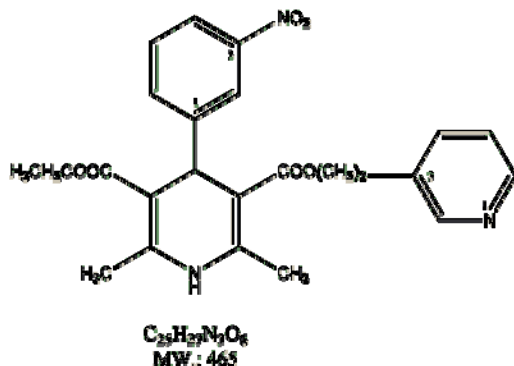
به محلول ایزوپروپیل آمینو کروتونات (5c) به دست آمده از مرحله ۲-۵-۴-۳، ۲ میلی مول ۳- (پیریدین-۳-ایل-پروپیل)-۳- اکسو بوتانات (3b) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۳-نیترو بنزآلدهید (6b) (۰/۳۰۲ گرم) و ۱۰ میلی لیتر ۲- پروپانول به عنوان حلال افزوده گردید و محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۹۰-۸۵ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم- اتانول (۵/۹۵٪) حاصل ۵٪ خالص گردید ($R_f=0/30$). سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، NMR-¹H و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۶۳/۲ mg، ۱۳/۱۹٪) و (mp=۱۱۴-۱۱۶°C)

IR (KBr): ν 3208(NH), 3087(CH-aromatic), 2979(CH-aliphatic), 1695(CO), 1347,1522 cm^{-1} (NO_2)

¹H-NMR (CDCl₃, 500Hz): δ 1.11-1.26(2d,6H,COOCH(CH₃)₂, j= 6.25 , 6.25), 1.88-1.94(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 2.35-2.38(2s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃), 2.58(t,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j= 15.45), 4.01-4.11(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 4.94-4.99(m,1H,COOCH(CH₃)₂), 5.10(s,1H,C₄-H), 5.80(brs,1H,NH-DHP), 7.18-7.21(dd,1H,C₅H-pyridyl), 7.37(t,1H,C₅H-phenyl, j= 15.80), 7.41(d,1H,C₆H-phenyl, j= 7.75), 7.64(d,1H,C₄H-pyridyl, j= 7.70), 7.99 (d,1H,C₄H-phenyl, j= 9.30), 8.14(s,1H,C₂H-phenyl), 8.37(s,1H,C₂H-pyridyl), 8.43(d,1H,C₆H-pyridyl, j= 4.70)
MS: (m/z) 480(2),461(46), 447(3), 343(10), 329(1), 297(100), 196(25), 136(15), 120(40), 106(26), 92(77), 77(10), 51(6)

۲-۵-۹- سنتز ۳-اتیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل)-پروپیل-۲-۶- دی متیل-۴-۳-

نیتروفنیل-۴۱- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7i)



به محلول اتیل آمینوکروتونات (**5b**) به دست آمده از مرحله ۲-۴-۵-۲، ۲ میلی مول ۳- (پیریدین-۳-ایل- پروپیل)-۳- اکسو بوتانات (**3b**) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۳- نیترو بنزالدهید (**6b**) (۰/۳۰۲ گرم) و ۱۰ میلی لیتر اتانول به عنوان حلال افزوده گردید و محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم- اتانول (۵-۹٪) خالص گردید ($R_f=0/31$). سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، ^1H-NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۱۲۴/۷ mg، ۲۶/۵٪) و ($mp=116-118^{\circ}C$)

IR (KBr): ν 3206(NH), 3081(CH-aromatic), 2979(CH-aliphatic), 1692(CO), 1342,1522 cm^{-1} (NO_2)

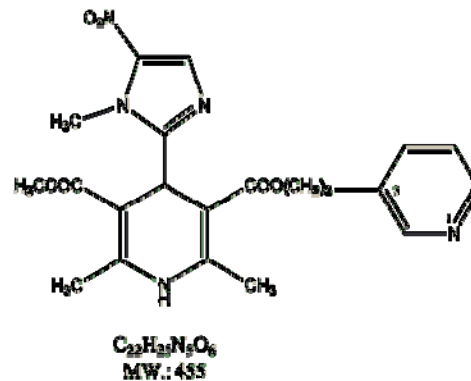
^1H-NMR ($CDCl_3$, 500Hz): δ 1.23(t,3H,COOCH₂CH₃, j= 14.15), 1.90-1.93(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 2.34-2.38(2s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃), 2.57(t,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j= 15.40), 4.04-4.11(m,4H,COOCH₂CH₂CH₂ and COOCH₂CH₃), 5.11(s,1H,C₄-H), 5.91(brs,1H,NH-DHP), 7.20(t,1H,C₅H-pyridyl), 7.37(t,1H,C₅H-phenyl, j= 15.80), 7.41(d,1H,C₆H-phenyl, j= 7.70), 7.64(d,1H,C₄H-pyridyl, j= 7.55), 7.99(d,1H,C₄H-phenyl, j= 7.85), 8.13(s,1H,C₂H-phenyl), 8.37(s,1H,C₂H-pyridyl), 8.44(d,1H,C₆H-pyridyl)

MS: (m/z) 466(2), 447(45), 420(3), 343(44), 329(6), 297(91), 196(29), 136(13), 120(25), 106(21), 92(56), 78(8), 51(5)

۲-۵-۱۰-۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲-۶-دی متیل-۴-۱-

متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل-۴-۱-دی هیدروپیریدین-۳-۵-دی کربوکسیلات

(7j)



به محلول متیل آمینوکروتونات (**5a**) به دست آمده از مرحله ۲-۵-۴-۱، ۲ میلی مول ۳-

(پیریدین-۳-ایل-پروپیل) ۳-اکسو بوتانات (**3b**) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۱-متیل-۵-نیترو-۱-

ایمیدازول-۲-کربالدهید (**6d**) (۰/۳۱۰ گرم) و ۱۰ میلی لیتر اتانول به عنوان حلال افزوده گردید و

محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار

داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید.

محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم-اتانول

(۵-۹٪) خالص گردید ($R_f=0/23$). سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم

اتر دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی

Mass، ^1H-NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۱۳۶/۶ mg، ۱۵/۰۱٪) و ($162^\circ C$ -

(mp=۱۵۸

IR (KBr): ν 3423(NH), 3081(CH-aromatic), 2979(CH-aliphatic), 1700(CO), 1375,1501 cm^{-1} (NO_2)

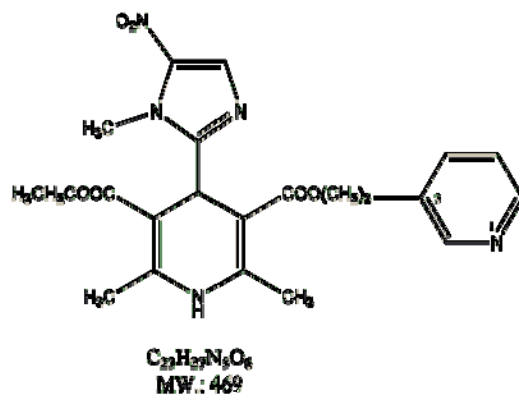
^1H-NMR ($CDCl_3$, 500Hz): δ 1.92-1.98(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 2.25-2.26(2s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃), 2.63(t,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j=15.40), 3.68(s,3H,N-CH₃), 4.08-4.16(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 4.21(s,3H,COOCH₃), 5.14(s,1H,C₄-H), 7.19-7.21(dd,1H,C₅H-pyridyl), 7.45(d,1H,C₄H-pyridyl, j= 7.75), 7.95(s,1H,H-Imidazole), 8.41(s,1H,C₂H-pyridyl), 8.45(d,1H,C₆H-pyridyl, j= 3.30), 8.45(brs,1H,NH-DHP)

MS: (m/z) 438(33), 329(21), 297(41), 272(7), 120(29), 106(25), 92(50), 51(4)

۲-۵-۱۲- سنتز ۳-اتیل-۵-۳- (پیریدین-۳-ایل) پروپیل-۲-۶- دی متیل-۴-۱-

متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل-۴-۱- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات

(71)



به محلول اتیل آمینوکروتونات (**5b**) به دست آمده ۲-۴-۵-۲، ۲ میلی مول ۳- (پیریدین-۳-ایل-

پروپیل)-۳-اکسو بوتانات (**3b**) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-

کربالدهید (**6d**) (۰/۳۱۰ گرم) و ۱۰ میلی لیتر اتانول به عنوان حلال افزوده گردید و محلول واکنش

به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار داده شد. سپس

حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با

استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم-اتانول (۵-۹۵٪)

خالص گردید ($R_f=0/22$). سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره

بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، ^1H-NMR و

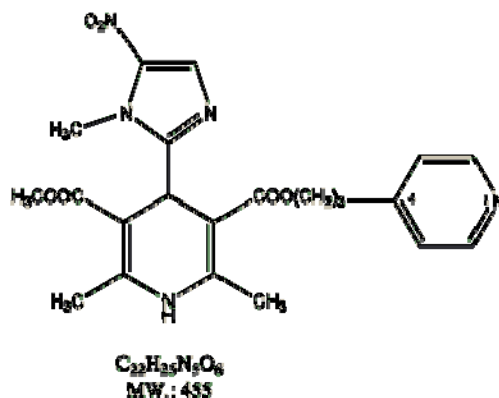
IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۷۳/۴ mg، ۷/۸۲٪) و ($mp=166-168^\circ C$)

IR (KBr): ν 3438(NH), 3081(CH-aromatic), 2933(CH-aliphatic), 1698,1674(CO), 1373,1500 cm^{-1} (NO_2)

^1H-NMR ($CDCl_3$, 500Hz): δ 1.24(t,3H,COOCH₂CH₃, j= 14.25), 1.93-1.98(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 2.27(s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃), 2.63(t,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j= 15.45), 4.10-4.16 (m,4H,COOCH₂CH₂CH₂ and COOCH₂CH₃), 4.22(s,3H,N-CH₃), 5.14(s,1H,C₄-H), 7.19-7.21(dd,1H,C₅H-pyridyl), 7.44(d,1H,C₄H-pyridyl, j= 7.85), 7.95(s,1H,H-Imidazole), 8.41(s,1H,C₂H-pyridyl), 8.44(d,1H,C₆H-pyridyl, j= 3.40)

MS: (m/z) 452 (46), 329(6), 297(33), 273(2), 196(11), 120(15), 106(13), 92(22), 51(2)

۲-۵-۵-۱۳- سنتز ۳-متیل-۵-(۳-پیریدین-۴-ایل) پروپیل-۲-و۶- دی متیل-۴-۱-
 متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل-۴-و۱- دی هیدروپیریدین-۳-و۵- دی کربوکسیلات
 (7m)



به محلول متیل آمینوکروتونات (**5a**) به دست آمده ۲-۵-۴-۱، ۲ میلی مول ۳-(پیریدین-۴-ایل- پروپیل)-۳-اکسو بوتانات (**3c**) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲- کربالدهید (**6d**) (۰/۳۱۰ گرم) و ۱۰ میلی لیتر اتانول به عنوان حلال افزوده گردید و محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفرم-اتانول (۵-۹۵٪) خالص گردید ($R_f=0/25$). سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف سنجی Mass، ^1H-NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (mp=۱۷۴-۱۷۸°C) و (۱۸/۷٪، ۱۷۰/۲ mg)

IR (KBr): ν 3423(NH), 3081(CH-aromatic), 2924(CH-aliphatic), 1701(CO), 1376,1501 cm^{-1} (NO_2)

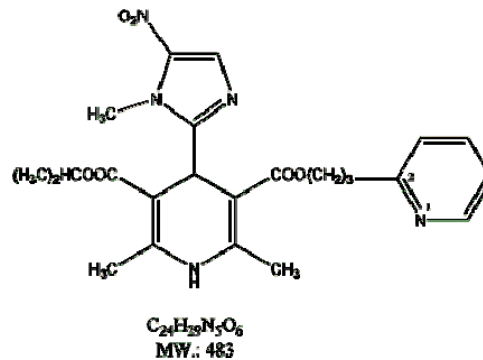
^1H-NMR ($CDCl_3$, 500Hz): δ 1.93-1.99(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 2.26(s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃), 2.61 (t,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j= 15.50), 3.68(s,3H,N-CH₃), 4.07-4.17 (m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 4.21(s,3H,COOCH₃), 5.14(s,1H,C₄-H), 7.06(d,2H,C_{3,5}H-pyridyl, j= 6.00), 7.95(s,1H,H-Imidazole),8.25(brs,1H,NH-DHP), 8.49(d,2H,C_{2,6}H-pyridyl, j= 6.00)

MS: (m/z) 455(2), 438(100), 329(37), 297(28), 120(26), 106(11), 93(11), 51(2)

۲-۵-۱۴- سنتز ۳-ایزوپروپیل-۵- (۳- (پیریدین-۲- ایل) پروپیل) -۲-۶- دی متیل-۴-

(۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲-ایل)-۴- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی

کربوکسیلات (7n)



به محلول ایزوپروپیل آمینو کروتونات (5c) به دست آمده از مرحله ۲-۵-۴-۳، ۲ میلی مول ۳-

(پیریدین-۲-ایل-پروپیل) ۳-اکسو بوتانات (3a) (۰/۴۴۲ گرم)، ۲ میلی مول ۱-متیل-۵-نیترو-۱-

ایمیدازول-۲-کربالدهید (6d) (۰/۳۱۰ گرم) و ۱۰ میلی لیتر ۲-پروپانول به عنوان حلال افزوده

گردید و محلول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۹۰-۸۵ درجه سانتیگراد در شرایط رفلکس و

دور از نور قرار داده شد. سپس حلال واکنش در شرایط خلأ تبخیر شد و باقیمانده در حلال کلروفرم

حل گردید. محلول حاصله با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک

کلروفرم-اتانول (۵-۹٪) خالص گردید ($R_f=0/30$). سپس ترکیب به دست آمده، در حلال دی

اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره بلوری گردید و در نهایت ساختار شیمیایی آن توسط روش های طیف

سنجی Mass، ^1H-NMR و IR تأیید و نقطه ذوب آن اندازه گیری شد. (۹۴ mg، ۹/۷۳٪) و

(mp=۱۳۸-۱۴۰°C)

IR (KBr): ν 3428(NH), 3081(CH-aromatic), 2978(CH-aliphatic), 1700,1671(CO),
1373,1508 cm^{-1} (NO_2)

^1H-NMR ($CDCl_3$, 500Hz): δ 1.17-1.24(2d,6H,COOCH(CH_3)₂, j= 6.20, 6.30), 2.07-2.10
(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂, j= 14.85), 2.27-2.28(2s,6H,C₂-CH₃ and C₆-CH₃),
2.78(t,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 4.14-4.17(m,2H,COOCH₂CH₂CH₂), 4.22(s,3H,N-CH₃), 5.01-
5.03(m,1H,COOCH(CH_3)₂), 5.10(s,1H,C₄-H), 7.08(d,1H,C₅H-pyridyl, j= 8.25),
7.10(d,1H,C₃H-pyridyl, j= 4.70), 7.57(t,1H,C₄H-pyridyl, j= 13.55), 7.95(s,1H,H-Imidazole),
8.50(d,1H,C₆H-pyridyl, j= 4.10)

MS: (m/z) 466(12), 196(2), 136(3), 120(100), 106(4), 92(6), 78(2)

۲-۶- کشت سلولی

بعد از اینکه رده های سلولی در تانک نیتروژن فریز شدند، اولین مرحله، ذوب کردن آن ها است.

پروسه ذوب کردن سلول ها به این صورت انجام شد:

۱. تیوب حاوی سلول های فریز شده از تانک نیتروژن خارج شده و در حمام آب با دمای 37°C قرار داده شد.

۲. سوسپانسیون سلولی به تیوب سانتریفیوژ منتقل شد. سپس ۳-۵ میلی لیتر RPMI 1640 به آرامی به سلول ها اضافه گردید. بعد از آن، سلول ها سانتریفیوژ (300G ، 10min) شدند تا به ته تیوب بچسبند.

۳. مایع رویی سلول ها به آهستگی خارج گردید. سپس سلول ها دوباره در محیط کشت CM_{10} یا CM_{20} (حاوی ۸۰ یا ۹۰٪ RPMI و ۱۰ یا ۲۰٪ FBS) سوسپانسیون شدند.

۴. سلول های سوسپانسیون شده به فلاسکی منتقل گردید و در دمای 37°C ، ۵٪ دی اکسید کربن و رطوبت ۹۵٪ انکوبه شدند.

۲-۶-۱- واکشت^۱

رشد سلول ها از یک الگوی خاص تبعیت می کند. بعد از کشت سلول ها، مدتی طول می کشد تا رشد سلول ها آغاز شود. به این مدت، مدت زمان تأخیری یا lag phase می گویند. سپس سلول ها وارد فاز لگاریتمی می شوند. در این فاز، رشد و تکثیر سلول ها سریع است. هنگامی که غلظت سلول ها به حدی رسید که تمام فلاسک اشغال گردید، رشد متوقف شده یا شدیداً کاهش می یابد. در این حالت باید بخشی از سلول ها به محیط کشت جدید منتقل شوند تا سلول ها مجدداً بتوانند وارد فاز لگاریتمی شوند.

1- Sub culturing

۲-۶-۱-۱- واکشت سلول های چسبنده

۱. محلول تریپسین از یخچال خارج گردید تا به دمای اتاق برسد.
۲. محیط کشت با پیپت از سطح سلول ها جدا شد.
۳. اگر از فلاسک 75cm^3 استفاده می شد، 15ml ، و در صورتی که از فلاسک 25cm^3 استفاده می شد، 5ml PBS^۱ جهت شستشو اضافه گردید و بعد کل PBS با پیپت خارج شد.
۴. در صورتی که از فلاسک 75cm^3 استفاده می شد، 2ml ، و در صورتی که از فلاسک 25cm^3 استفاده می شد، 1ml محلول تریپسین (جهت جداسازی کامل سلول های چسبنده از کف پلیت)، اضافه گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه سلول ها انکوبه شدند.
۵. با بررسی سلول ها در زیر میکروسکوپ، در رابطه با از هم جدا شدن آن ها اطمینان حاصل شد.
۶. پس از ۵ دقیقه که سلول ها کاملاً از کف پلیت جدا شدند، جهت خنثی سازی تریپسین، 10ml محیط کشت (RPMI + 10% FBS)، اضافه شد. سپس کل محلول فوق توسط پیپت به لوله های سانتریفیوژ منتقل و سانتریفیوژ (300G ، 10min) گردید. سپس کل محلول روی سلول ها خارج شد و به پلیت مورد نظر، 10ml محیط کشت افزوده گردید.
۷. سلول ها با پیپت جمع و مقدار مشخصی از سوسپانسیون سلولی به فلاسک جدیدی منتقل گردید.
۸. فلاسک های قدیمی و جدید در انکوباتور قرار گرفت.

۲-۶-۱-۲- واکشت سلول های سوسپانسیونی

۱. محیط کشت، با چشم و نیز به وسیله میکروسکوپ، به منظور بررسی میزان رشد سلول ها، به دقت مورد ارزیابی قرار گرفت.

1- Phosphate Buffer Saline (PBS)

۲. مقدار مشخصی از سلول ها با پیپت از داخل فلاسک برداشته و به فلاسک جدیدی منتقل گردید.

۳. مقدار مناسبی از محیط کشت تازه به هر دو فلاسک، اضافه شد.

۴. هر دو فلاسک داخل انکوباتور قرار گرفت.

۲-۶-۲- معرفی رده های سلولی مورد مطالعه

۲-۶-۲-۱- **MCF-7**: این رده سلولی در سال ۱۹۷۰ از یک زن سفید پوست مبتلا به سرطان سینه به دست آمده است. این سلول ها بصورت تک سلولی و چسبنده رشد می کنند [۷۹].

۲-۶-۲-۲- **LS-180**: این رده سلولی از یک زن ۵۸ ساله سفید پوست مبتلا به آدنوکارسینومای کولون به دست آمده است. این سلول ها بصورت تک سلولی و چسبنده رشد می کنند [۸۰ و ۸۱].

۲-۶-۲-۳- **Hela**: این رده سلولی برای اولین بار در سال ۱۹۵۱ از اپیتلیوم رحم یک زن سیاه پوست به دست آمده است. این سلول ها بصورت تک سلولی و چسبنده رشد می کنند [۷۷ و ۷۸].

۲-۶-۲-۴- **Raji**: این رده سلولی لنفوما برای اولین بار از یک فرد ۱۱ ساله سیاه پوست از سلولهای B جدا شده است که در سطح خود مارکر اختصاصی CD20 را بیان می کند. این رده بصورت سوسپانسیونی رشد می کند [۷۷ و ۷۸].

۲-۶-۳- مراحل کشت سلول

۱. ۵۰ μ l سوسپانسیون سلولی با ۵۰ μ l محلول تریپان بلو (۰/۴ w/v) در سرم فیزیولوژی مخلوط گردید.

۲. ۵۰ μ l سوسپانسیون مخلوط توسط میکروپیپت برداشته و روی لام نئوبار قرار گرفت.

۳. تعداد کل سلول ها در 2×10^4 ضرب شد (۲ ضریب رقت و 10^4 ضریب تبدیل $mm^3 / 1$ به ml می باشد).

۴. تعداد کل سلول های زنده با ضرب تعداد سلول های زنده در 2×10^4 محاسبه گردید.

۵. درصد زنده بودن سلول ها از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد زنده بودن سلول ها} = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} \times 100$$

۲-۶-۴- آماده سازی ترکیبات

جهت انجام این آزمون مراحل زیر انجام شده است [۲۲]:

۱. تهیه استوک از ۱۴ ترکیب مورد نظر: برای این کار با توجه به وزن مولکولی ترکیبات، مقادیر مشخصی از هر ترکیب در مقداری DMSO (مطابق فرمول زیر) حل گردید. این استوک همواره در فریزر $-80^{\circ}C$ نگهداری می شد. استوک تهیه شده دارای غلظت ۲۰ میلی مولار بود. ($C_M = 0.02$)

$$\text{DMSO } (\mu\text{l}) = \frac{\text{وزن اندازه گیری شده}}{\text{وزن مولکولی دارو}} \times C_M$$

۲. جهت تهیه غلظت های اولیه مختلف از استوک ترکیبات، $10 \mu\text{l}$ از استوک با $990 \mu\text{l}$ محیط کشت مخلوط شد. بدین صورت غلظت اولیه $200 \mu\text{M}$ تهیه گردید (به دلیل اینکه در مراحل بعدی کار، با اضافه کردن ۵۰ میکرو لیتر دارو به ۵۰ میکرو لیتر محیط کشت و سلول، غلظت دارو در هر چاهک نصف می شد، فاکتور رقت ۲ در نظر گرفته شد). بنابراین، از ابتدا غلظت های ۲۰۰، ۵۰، ۱۰ و ۲ میکرو مولار تهیه گردید.

| | | initial concentration | | final concentration in well |
|-------------------------------|--------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| 10 (Stock)+990 Media | —————> | 200 μM | ————— $\div 2$ —————> | 100 μM |
| 125 (200 μM)+375 Media | —————> | 50μM | ————— $\div 2$ —————> | 25 μM |
| 25 (200μM)+475 Media | —————> | 10μM | ————— $\div 2$ —————> | 5 μM |
| 10 (200μM)+990 Media | —————> | 2μM | ————— $\div 2$ —————> | 1 μM |

۳. مرحله بعد ساخت غلظت های مختلف دوکسوروبیسین^۱ (کنترل مثبت) بود. دوکسوروبیسین خریداری شده بصورت محلول و دارای غلظت ۱۰ میلی مولار است. از این استوک غلظت های ۱۰، ۵۰ و ۲۵۰ نانو مولار تهیه شد (واحد اعداد میکرولیتر می باشد). در این مرحله نیز فاکتور رقت ۲ در نظر گرفته شد. بنابراین، از ابتدا غلظت های اولیه، ۲ برابر غلظت های نهایی درون هر چاهک بود (مقدارهای ذکر شده جهت تهیه دو برابر غلظت های نهایی می باشد).

| | | initial concentration | | final concentration in well |
|------------------------------|--------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| 20 (Stock)+980 Media | —————> | 200 μM | ————— $\div 2$ —————> | 100 μM |
| 10 (200 μM)+990 Media | —————> | 2 μM | ————— $\div 2$ —————> | 1 μM |
| 125 (2μM)+375 Media | —————> | 500 nM | ————— $\div 2$ —————> | 250 nM |
| 25 (2μM)+475 Media | —————> | 100 nM | ————— $\div 2$ —————> | 50 nM |
| 10 (2μM)+990 Media | —————> | 20 nM | ————— $\div 2$ —————> | 10 nM |

۲-۶-۵- نحوه ارزیابی سمیت سلولی ترکیبات^[۲۲]

۱. پس از تهیه سوسپانسیون سلولی با غلظت مورد نظر، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن وارد هریک از چاهک ها گردید. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد.
۲. پس از گذشت ۲۴ ساعت برای سلول های سوسپانسیونی، پلیت ها را با سانترفیوژ مخصوص، سانترفیوژ (۱۸۵۵ rpm) (۳۰۰ G) و به مدت ۱۰ دقیقه) و سپس ۴۰ میکرولیتر از محیط رویی چاهک ها توسط میکروپیپت چند کاناله خالی شد. در ادامه، ۵۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت های اولیه ترکیبات و دوکسوروبیسین بصورت سه تایی^۱ در چاهک ها وارد شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، برای سلول های چسبنده پلیت در زاویه ۴۵ درجه قرار گرفت و سپس ۴۰ میکرولیتر از محیط رویی چاهک ها توسط میکروپیپت چند کاناله، تخلیه شد. در ادامه، ۵۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت های اولیه ترکیبات و دوکسوروبیسین بصورت سه تایی وارد چاهک ها شد. در هر پلیت تعداد ۶ چاهک (۲ تا ۳ تایی) به عنوان کنترل سلول در نظر گرفته شد. این چاهک ها حاوی همه مواد به جز ترکیبات مورد سنجش بودند. همچنین در هر پلیت، ۳ چاهک به عنوان شاهد منفی (Empty RPMI) در نظر گرفته شدند. این چاهک ها تنها حاوی محیط کشت بودند و در انتها MTT به آن ها اضافه شد. جذب کنترل سلول و ترکیبات و کنترل مثبت از جذب این چاهک ها تفریق شد. در این ۳ چاهک سلول و ترکیبات مورد سنجش وجود نداشت.
۳. با توجه به رده سلولی مورد نظر ۷۲ و یا ۹۶ ساعت نیاز دارد تا ماده MTT به آن اضافه شود. همه رده های سلولی به جز HeLa، ۷۲ ساعت نیاز دارند. با احتساب ۲۴ ساعت اولیه، مدت زمان کل آزمون برای همه رده ها به جز HeLa، ۹۶ ساعت و برای HeLa ۱۲۰ ساعت می باشد.

۴. پس از گذشت زمان لازم برای سلول های سوسپانسیونی، پلیت با سانترفیوژ مخصوص، سانترفیوژ (۱۸۵۵ rpm) (۳۰۰ G) و به مدت ۱۰ دقیقه) و سپس ۷۰ میکرولیتر از محیط رویی چاهک ها با میکروپیپت چند کاناله تخلیه شد. در ادامه، ۸۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۶ میلی گرم در لیتر به آن اضافه شده، پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. برای سلول های چسبنده، پلیت در زاویه ۴۵ درجه قرار داده شد و سپس ۷۰ میکرولیتر از محیط رویی چاهک ها توسط میکروپیپت چند کاناله تخلیه گردید و ۸۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۶ میلی گرم در لیتر به آن اضافه شد و پلیت ها را به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. برای ساخت محلول MTT ابتدا غلظت ۵ mg/ml از پودر MTT در بافر نمکی فسفات^۱ تهیه و ۹/۶ میکرولیتر از این محلول را با ۷۰/۴ میکرولیتر RPMI بدون فنل رد مخلوط شد. در مجموع ۸۰ میکرولیتر MTT برای یک چاهک استفاده شد. با توجه به تعداد چاهک ها مقدار مورد نیاز از MTT و RPMI بدون فنل رد مخلوط شد.
۵. پس از گذشت ۴ ساعت از اضافه کردن MTT، پلیت از انکوباتور بیرون آورده شد. در این مرحله، سلول های سوسپانسونی دوباره سانترفیوژ شده، ۹۰ میکرولیتر از مایع رویی خارج شد و در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید. برای سلول های چسبنده پلیت در زاویه ۴۵ درجه قرار داده شد و ۷۰ میکرولیتر مایع رویی خارج شد. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به آن اضافه گردید. DMSO کریستال های فورمازان تشکیل شده توسط سلول های زنده را حل می کند.
۶. به مدت ۱ ساعت، پلیت ها در انکوباتور قرار گرفتند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. بدین ترتیب، کریستال های تشکیل شده به خوبی حل شدند. در انتها جذب نوری هر یک از پلیت ها با کمک قرائت کننده جذب میکروپلیت در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد.

1- Phosphate Buffer Saline (PBS)

۲-۷- ارزیابی اثر فارماکولوژیک (مسدد کانال کلسیمی) آنالوگ های دی هیدروپیرییدینی

سنتز شده

۲-۷-۱- تهیه محلول های مورد نیاز

۲-۷-۱-۱- طرز تهیه محلول تیروید جهت ایلئوم

محلول تیروید (Tyrode) حاوی گلوکز و نمک های مختلف می باشد و نقش مغذی، نگهدارنده و شستشو دهنده برای بافت مجزا را دارد. محلول تیرویدی که برای انجام آزمایش به کار می رود، حاوی مواد زیر می باشد^[۸۱]:

| نوع ماده | میلی مول در لیتر | گرم در لیتر |
|---|------------------|-------------|
| NaCl | ۱۱۹ | ۶/۹۶۰ |
| KCl | ۲/۷ | ۰/۲۰۱ |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | ۰/۸۸ | ۰/۱۷۸ |
| NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O | ۰/۳۶ | ۰/۰۵۶ |
| NaHCO ₃ | ۱۲ | ۱/۰۰۰ |
| C ₆ H ₁₂ O ₆ | ۵/۵ | ۱/۰۸ |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | ۲ | ۰/۲۹۴ |

این محلول به صورت غلیظ تهیه و در یخچال نگهداری شد و در هنگام مصرف به مقدار مورد نیاز، رقیق و آماده شد.

به این منظور، ۱ لیتر محلول تیروید ۱۰ برابر غلیظ، با حل نمودن ۶/۹۶ گرم NaCl، ۲ گرم KCl، ۱/۷۸ گرم MgCl₂.6H₂O، ۲/۹۴ گرم CaCl₂.2H₂O و ۰/۵۶ گرم NaH₂PO₄.H₂O در مقدار کمی آب دیونیزه و به حجم رساندن محلول توسط آب دیونیزه به حجم ۱ لیتر تهیه گردید و در یخچال نگهداری شد. محلول غلیظ به مدت ۱ ماه در یخچال قابل نگهداری است. محلول غلیظ می

بایست فاقد گلوکز و بی کربنات باشد زیرا افزودن گلوکز سبب رشد میکروارگانیزم می شود. بنابراین، گلوکز و بی کربنات، هنگام مصرف به این محلول اضافه می گردد.

در هنگام شروع هر آزمایش، ۱۰۰ میلی لیتر از محلول غلیظ را برداشته و به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رساندیم. پیش از آن لازم است که ۱/۰۸ گرم گلوکز و ۱ گرم بی کربنات سدیم را در کمی آب دیونیزه حل نمود و آن ها را آرام آرام به محلول فوق الذکر که توسط همزن مغناطیسی به هم زده می شود، اضافه کرد. علت افزودن آهسته و جداگانه محلول گلوکز و بی کربنات سدیم به محلول ۵ نمک ذکر شده، جلوگیری از تشکیل رسوب و تغییر ناگهانی pH محلول می باشد.

سپس توسط pH متر، pH محلول اندازه گیری شد. pH بهینه محلول می بایست ۷/۴۰-۷/۴۴ باشد. چنانچه pH اسیدی تر از ۷/۴۰ باشد، با استفاده از چند قطره سود ۲ نرمال (NaOH 2N)، در حد بهینه (۷/۴۰-۷/۴۴) تنظیم می شود و اگر pH، قلیایی تر از ۷/۴۴ باشد، توسط چند قطره اسید کلریدریک ۶ مولار (HCl 6M) تنظیم می گردد.

۲-۷-۱-۲- روش تهیه محلول های مورد نظر از مشتقات دی هیدروپیریدینی سنتز شده

به منظور بررسی اثرات مسدود کنندگی کانال کلسیم، مقادیر لازم از مواد مورد آزمایش جهت تهیه ۱ میلی لیتر محلول 10^{-3} مولار، توزین و در DMSO حل گردید^[۸۲-۸۵]. علاوه بر تهیه چنین غلظتی از آنالوگ های دی هیدروپیریدینی سنتز شده، از نیفدیپین نیز به عنوان ترکیب مرجع، غلظت مورد نظر تهیه گردید. تهیه محلول های رقیق تر به وسیله روند رقیق سازی پیوسته^۱ با استفاده از حلال DMSO و آب دیونیزه صورت گرفت (حجم مورد نیاز از محلول 10^{-3} رابرداشته و اندکی آب دیونیزه به آن اضافه نمودیم. چنانچه کدورتی مشاهده گردد، برای رقیق سازی از DMSO استفاده می کنیم و چنانچه در آب حل شود، ترجیحاً از آب دیونیزه استفاده می شود). بنابراین، محلول هایی با غلظت

10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} از ماده مورد نظر، تهیه شد. کار کردن با محلول های تهیه شده در کلیه مراحل زیر لامپ سدیم و یا به صورت محافظت شده از نور با فویل آلومینیومی انجام گرفت.

۲-۷-۲- تهیه ایلئوم مجزای خوکچه هندی و مراحل کار بر روی آن

قبل از شروع آزمایش، محلول تیروید با $\text{pH}=7/4$ درون حمام بافت ریخته شد و توسط کپسول کربوژن (۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ دی اکسید کربن) اکسیژن دار شد. در این مطالعه، خوکچه هندی نر آلبینو با وزن تقریبی ۳۰۰-۴۰۰ گرم از لانه حیوانات دانشکده پزشکی شیراز تهیه شد. حیوان می بایست از ۲۴ ساعت قبل از آزمایش به منظور کاهش حرکات دودی ایلئوم، گرسنه نگه داشته شود و تنها به آب دسترسی داشته باشد.

برای جداسازی ایلئوم، ابتدا حیوان با زدن ضربه ای به پشت سر، کشته شد. پس از آن حیوان به پشت قرار داده شد و ناحیه شکم به شکل صلیب، برش داده شد. با کنار زدن نواحی بریده شده، سکوم همراه با قطور ترین بخش روده که به صورت افقی در قسمت پایین و سمت چپ شکم حیوان قرار دارد، نمایان می شود.

ایلئوم در پشت سکوم قرار دارد. روده کوچک به سه قسمت (دئودنوم، ژوژنوم و ایلئوم) تقسیم می شود که ایلئوم آخرین بخش روده کوچک، به سکوم یا اولین بخش روده بزرگ، توسط دریچه ای به نام ایلئوسکال متصل می گردد.

پس از شناسایی سکوم و با توجه به اتصال ایلئوم به آن، توسط پنس به یکباره کشیده شد تا از بافت های اطراف جدا گردد. به علت کشش وارد شده، حدود ۱۰ سانتیمتر اول مورد استفاده قرار نمی گیرد.

از بقیه ایلئوم قطعات ۱/۵-۱ سانتیمتری تهیه شد. این قطعات درون تشتک پتری حاوی محلول تیروید اکسیژن دار شده که از نظر اسمولاریته و pH با شرایط فیزیولوژیک حیوان مشابه است، قرار

داده شد. مجرای داخلی قطعات ایلئوم توسط یک سرنگ باریک حاوی محلول تیروید شسته شد تا بافت از مواد زائد و موکوس به منظور کاهش حرکات پریستالتیک و نهایتاً کاهش خطا در آزمایش، پاک شود. همچنین بافت پیوندی و چربی اطراف آن جدا شود. کار تمیز کردن بافت ها باید به صورتی انجام پذیرد که کمترین میزان کشش و فشار به آن ها وارد گردد.

قطعات تمیز شده ایلئوم را در یک بشر حاوی تیروید اکسیژن دار شده قرار داده و درون یخچال نگه داری شدند. این عمل به منظور به حداقل رساندن انقباضات خودکار ایلئوم صورت می گیرد. قطعات موجود در یخچال برای مدت ۲۴ ساعت قابل استفاده هستند.

قطعات مجزای ایلئوم بعد از خارج شدن از یخچال و هم دما شدن با محیط، در حمام بافت پر شده از محلول تیروید، قرار گرفتند. بدین صورت که از یک سو به حمام بافت اتصال یافته و از سوی دیگر به قلاب ترانسدیوسر وصل شدند.

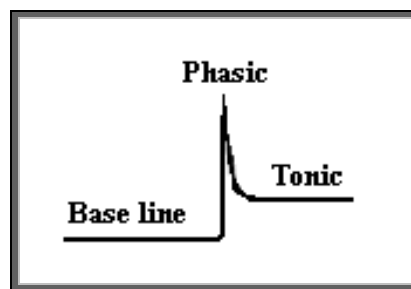
بعد از اتصال ایلئوم به دستگاه، کششی معادل ۰/۵ گرم به عضله اعمال شده و با بر قرار نمودن جریان اکسیژن در درون حمام بافت دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، محیط مناسبی جهت حیاط بافت و انجام آزمایش فراهم گردید. بعد از آن به بافت اجازه داده شد تا به وضعیت پایداری برسد و حرکات و انقباضات خود به خودی بافت کاهش یابد.

به منظور جلوگیری از تجمع متابولیت های سمی، محلول تیروید داخل حمام بافت هر ۱۰ دقیقه تعویض می شد. پس از گذشت حدود ۱ ساعت یا بیشتر از اتصال بافت در حمام و اطمینان از پایداری بافت که بوسیله کاهش انقباضات خود به خود و اسپایک ها مشخص می شود، مقدار ۰/۴ میلی لیتر از محلول ۲ مولار KCl به حمام بافت ۲۰ میلی لیتری اضافه شد.

بنابراین غلظتی حدود ۴۰ میلی مولار در حمام ایجاد گردید. افزودن محلول KCl باید به آرامی و توسط سرنگ صورت پذیرد.

افزودن KCl به بافت سبب باز شدن کانال کلسیمی حساس به ولتاژ و متعاقب آن ورود یون کلسیم به سلول و نهایتاً انقباض بافت خواهد شد. انقباض حاصله به ترانسدیوسر منتقل شده و توسط کامپیوتر ثبت گردید.

انقباض حاصل از KCl شامل ۲ مرحله فازیک و تونیک است که در شکل نشان داده شده است (فاز phasic انقباض، به عنوان حداکثر انقباض در نظر گرفته می شود).



شکل ۲-۵: انقباض فازیک و تونیک حاصل از KCl بر روی عضله صاف ایلئوم کوچک هندی

روش به کار رفته در این مطالعه، مهار انقباضات می باشد. بر اساس این روش، ابتدا توسط یک ماده منقبض کننده (مانند KCl) انقباضاتی ایجاد کرده و میانگین آنها به عنوان کنترل (انقباض صددرصد) در نظر گرفته می شود. سپس بافت در مدت زمان معین تحت تأثیر دوز معینی از ماده مهار کننده قرار می گیرد. در انتهای محدوده زمانی معین، ماده منقبض کننده با همان دوز قبل افزوده شده و با مقایسه انقباض حاصل از آن با میزان انقباض کنترل، مقدار اثر مهاری ماده مهار کننده معین می گردد.

با توجه به این مطالب، پروتکل آزمایش به صورت زیر می باشد:

الف) توسط KCl، ۳ انقباض تقریباً مشابه ثبت می شود. به گونه ای که اختلاف آنها بیش از ۲۰٪ نباشد و میانگین آنها به عنوان کنترل (صددرصد انقباض) ثبت می گردد (پس از هر بار افزودن

KCl، بافت شسته می شود تا از KCl عاری گردد و محفظه توسط محلول تازه تیروید، پر می شود.

پس از گذشت ۱۰ دقیقه استراحت، تزریق بعدی KCl انجام می گیرد).

(ب) مجاورت بافت با غلظت مشخص از مشتقات ۱ و ۴-دی هیدروپیرییدینی سنتز شده در بخش ۲ - ۵

- ۱، در محدوده زمان معین (۱۰ دقیقه) و در عدم حضور KCl.

(ج) افزودن KCl پس از زمان ۱۰ دقیقه و مقایسه انقباض حاصل از آن با کنترل بدست آمده از مرحله

الف؛ (سپس بافت دوباره شستشو می گردد).

(د) تکرار مراحل ب و ج با غلظت های بالاتر از مشتقات دی هیدروپیرییدینی مورد نظر.

لازم به ذکر است که با توجه به عدم پاسخ های یکسان از مرحله تونیک انقباض KCl، در این روش

تنها از فاز فازیک انقباض استفاده می شود.

نیفدیپین، آنتاگونیست کانال های کلسیمی بوده و به عنوان ترکیب معیار انتخاب می گردد. به منظور

مقایسه قدرت اثر مواد مختلف مورد آزمایش با یکدیگر و نیفدیپین، برای هر کدام IC_{50} محاسبه می

گردد.

IC_{50} عبارتست از غلظتی از ماده مورد نظر که در آن غلظت، عضله صاف ۵۰٪ شل می شود. بنابراین

هر چه IC_{50} کمتر باشد، ماده قوی تر خواهد بود.

اعداد به دست آمده برای رسم نمودار غلظت- پاسخ استفاده شدند و با توجه به نمودار های حاصله،

پارامتر IC_{50} با استفاده از نرم افزار کامپیوتری curve expert محاسبه شدند. نتایج حاصله از

میانگین IC_{50} های به دست آمده از هر ترکیب همراه با خطای معیار (SEM) ارائه شدند.

۲-۷-۱- روش های آماری مورد استفاده

میانگین IC_{50} های به دست آمده از هر ترکیب، مثبت و منفی خطای استاندارد بیان می شود

(Mean \pm SEM). به منظور بررسی معنی دار بودن تفاوت میان نتایج آزمایش های مختلف از تست

آماري ANOVA-One way استفاده شد. براي مقايسه تركيبات مورد آزمايش با تركيب استاندارد از پس آزمون Dunnet و به منظور مقايسه دو به دو تركيبات با هم از پس آزمون Tukey HSD استفاده شد. در صورتي كه مقدار ارزش P کمتر از ۰/۰۵ باشد، اختلاف بين مقادير معني دار در نظر گرفته مي شود.

۲-۸- بررسی کانفورماسیون ترکیبات سنتز شده

ساختمان ترکیبات دی هیدروپیریدینی سنتز شده (7a-7n)، با استفاده از نرم افزار Hyperchem 7.01 رسم گردید و با تغییر انواع کانفورماسیون های ممکن با استفاده از نرم افزار Gaussian 98W توسط روش RHF/STO-3G، ساختمانی که حداقل انرژی را داشته باشد، بازسازی شد. در ادامه جهت مقایسه کانفورماسیون پایدار ترکیبات طراحی شده و نیفدیپین، ساختار پایدار نیفدیپین نیز با روش ذکر شده بازسازی شد و زوایای دی هیدرال مشابه در ترکیبات ۱-۴ دی هیدروپیریدینی سنتز شده در بخش ۲-۵-۱ و نیفدیپین، در جدول ۳-۸ آمده است.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از سنتز آنالوگ های ناقربنه جدید ۴-۱- دی هیدروپیریدینی

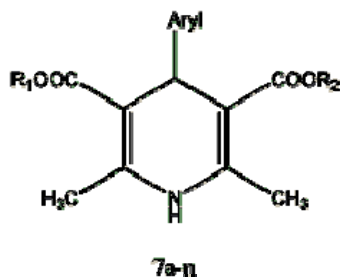
در این مطالعه، ابتدا بتا کتو استرهای مورد نیاز (**3a-c**) از واکنش الکل های مربوطه (**1a-c**) با ۲و۲-تری متیل-۴-هیدروژن-۱و۳-دی اکسین-۴-اون (2)، تهیه گردید. ترکیبات سنتز شده توسط طیف IR، مورد شناسایی قرار گرفتند که طیف های مربوطه در ادامه آمده است.

سپس الکیل استو استات ها (**4a-c**) در حضور استات آمونیوم در حلال اتانول یا ۲-پروپانول، طی مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰-۹۰ درجه سانتیگراد، الکیل-۳-آمینوکروتونات (**5a-c**) را ایجاد کردند. تشکیل الکیل-۳-آمینوکروتونات های مورد نظر به کمک روش طیف سنجی مادون قرمز (IR)، به تأیید رسید. ترکیبات ایجاد شده، مستقیماً در مرحله بعد واکنش به کار گرفته شدند، زیرا این ترکیبات تحت شرایط تخلیص، ناپایدار بوده و به سرعت دچار شکست می گردند.

در نهایت از واکنش بین بتا کتو استر (**3a-c**) و الکیل-۳-آمینوکروتونات (**5a-c**) و آریل آلدئید (**6a-d**) در حلال اتانول یا ۲-پروپانول، به دور از نور و با استفاده از روش اصلاح شده هانش در شرایط رفلکس، ترکیبات دی هیدروپیریدینی مورد نظر (**7a-n**) سنتز گردید.

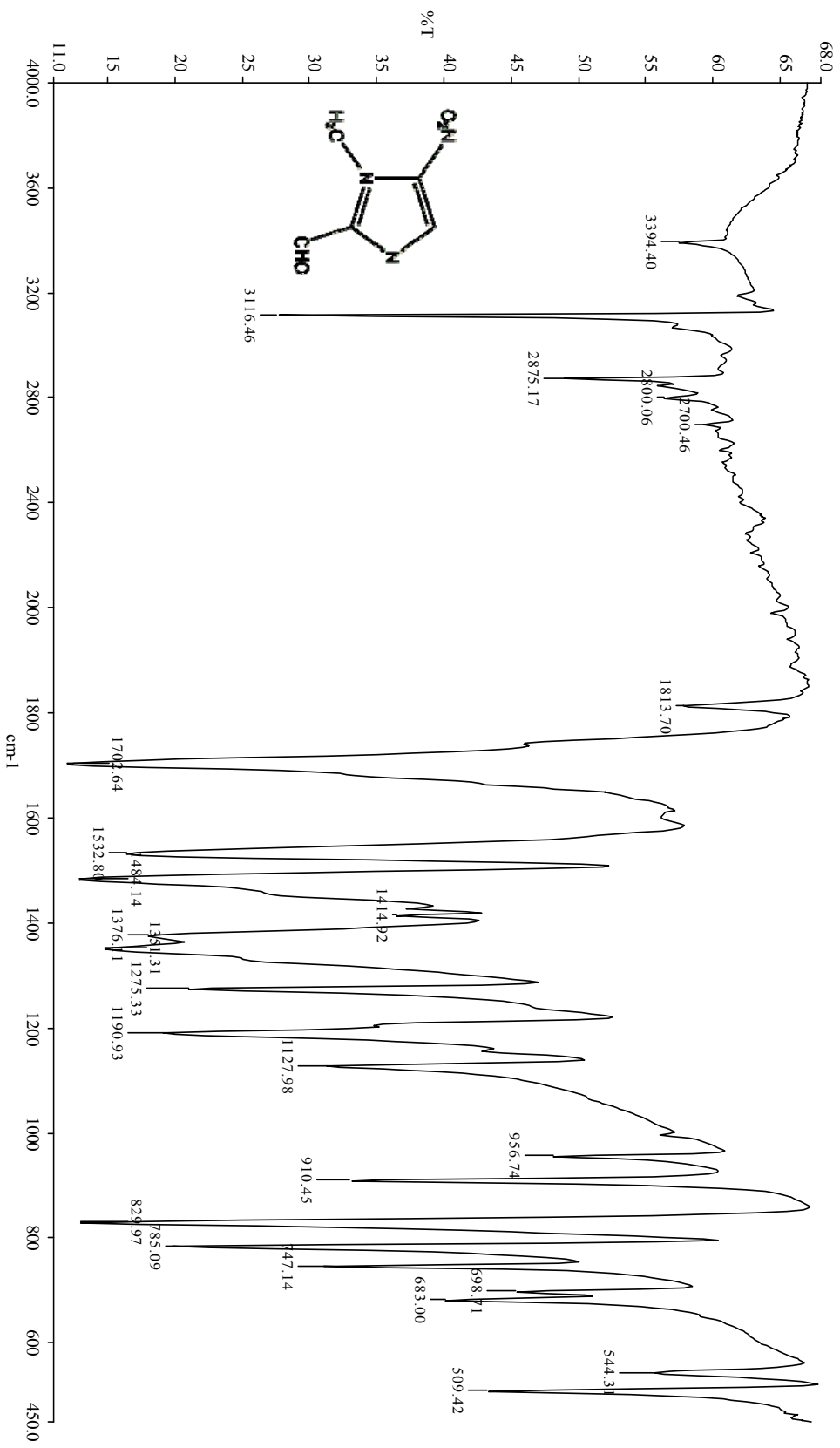
خالص سازی این ترکیبات با کمک کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و سیستم حلال کلروفورم-اتانول (۹۵٪-۵٪) صورت گرفت. پس از آن ترکیبات به دست آمده در حلال دی اتیل اتر-پترولیوم اتر دوباره بلوری گردید. تشکیل ترکیبات مورد نظر با کمک روش های طیف سنجی IR، Mass و ¹H-NMR به تأیید رسید. نتایج حاصل از سنتز این ترکیبات در جدول ۱-۳ نشان داده شده است.

جدول ۳-۱: نتایج حاصل از سنتز آنالوگ های جدید ۱-۴ دی هیدروپیریدین

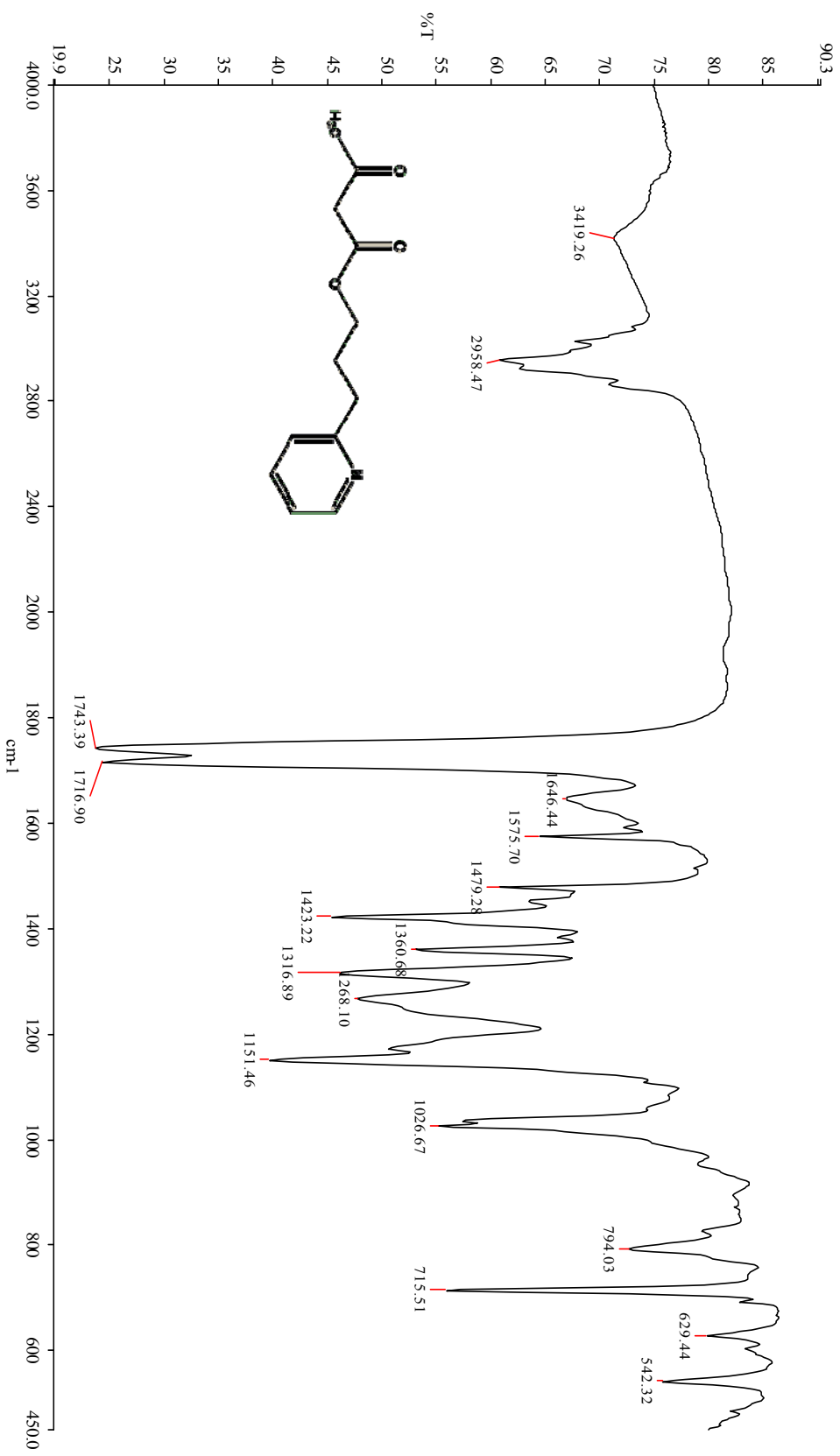


| *R _f | راندمان (%) | نقطه ذوب (°C) | Aryl | R ₂ | R ₁ | ترکیب |
|-----------------|-------------|---------------|----------------------------------|-------------------------|----------------|----------|
| ۰/۲۷ | ۱۴/۴ | ۱۵۲-۱۵۴ | 4-nitro phenyl | 3-(pyridine-4-yl)propyl | Methyl | 7a |
| ۰/۲۷ | ۵/۲۶ | ۱۳۸-۱۴۰ | 3-nitro phenyl | 3-(pyridine-3-yl)propyl | Methyl | 7b |
| ۰/۲۴ | ۲۹/۳۸ | ۱۱۴-۱۱۸ | 4-nitro phenyl | 3-(pyridine-4-yl)propyl | Ethyl | 7c |
| ۰/۲۲ | ۲۴/۵۳ | ۱۷۸-۱۸۰ | 2-nitro phenyl | 3-(pyridine-3-yl)propyl | Methyl | 7d |
| ۰/۳۰ | ۲۴/۶۷ | ۱۶۷-۱۷۰ | 3-nitro phenyl | 3-(pyridine-4-yl)propyl | Ethyl | 7e |
| ۰/۳۱ | ۱۹/۷۳ | ۱۲۰-۱۲۲ | 3-nitro phenyl | 3-(pyridine-2-yl)propyl | Isopropyl | 7f |
| ۰/۳۰ | ۱۳/۱۹ | ۱۱۴-۱۱۶ | 3-nitro phenyl | 3-(pyridine-3-yl)propyl | Isopropyl | 7g |
| ۰/۳۰ | ۲۹/۲۵ | ۱۸۰-۱۸۲ | 4-nitro phenyl | 3-(pyridine-4-yl)propyl | Isopropyl | 7h |
| ۰/۳۱ | ۲۶/۵۰ | ۱۱۶-۱۱۸ | 3-nitro phenyl | 3-(pyridine-3-yl)propyl | Ethyl | 7i |
| ۰/۲۳ | ۱۵/۰۱ | ۱۵۸-۱۶۲ | 1-methyl-5-nitro-1-imidazol-2-yl | 3-(pyridine-3-yl)propyl | Methyl | 7j |
| ۰/۲۴ | ۹/۶۹ | ۱۵۰-۱۵۲ | 1-methyl-5-nitro-1-imidazol-2-yl | 3-(pyridine-2-yl)propyl | Methyl | 7k |
| ۰/۲۲ | ۷/۸۲ | ۱۶۶-۱۶۸ | 1-methyl-5-nitro-1-imidazol-2-yl | 3-(pyridine-3-yl)propyl | Ethyl | 7l |
| ۰/۲۵ | ۱۸/۷ | ۱۷۴-۱۷۸ | 1-methyl-5-nitro-1-imidazol-2-yl | 3-(pyridine-4-yl)propyl | Methyl | 7m |
| ۰/۳۰ | ۹/۷۳ | ۱۳۸-۱۴۰ | 1-methyl-5-nitro-1-imidazol-2-yl | 3-(pyridine-2-yl)propyl | Isopropyl | 7n |
| ---- | ----- | ----- | 2-nitro phenyl | Methyl | Methyl | نیفدیپین |

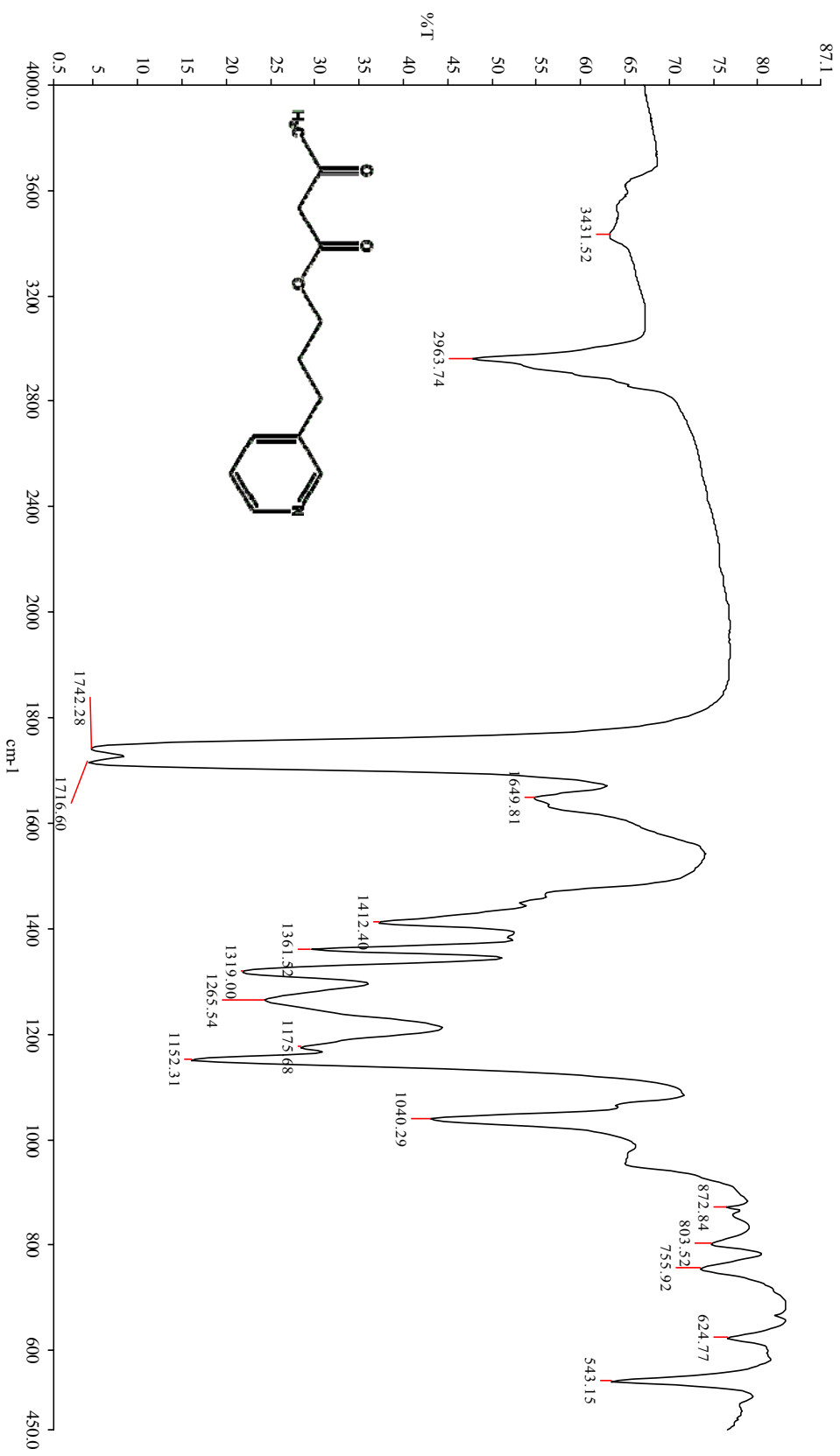
* R_f محصولات در سیستم کلروفرم-اتانول (۵-۹۵٪) و بر روی فاز ساکن سیلیکا ژل اندازه گیری شده است.



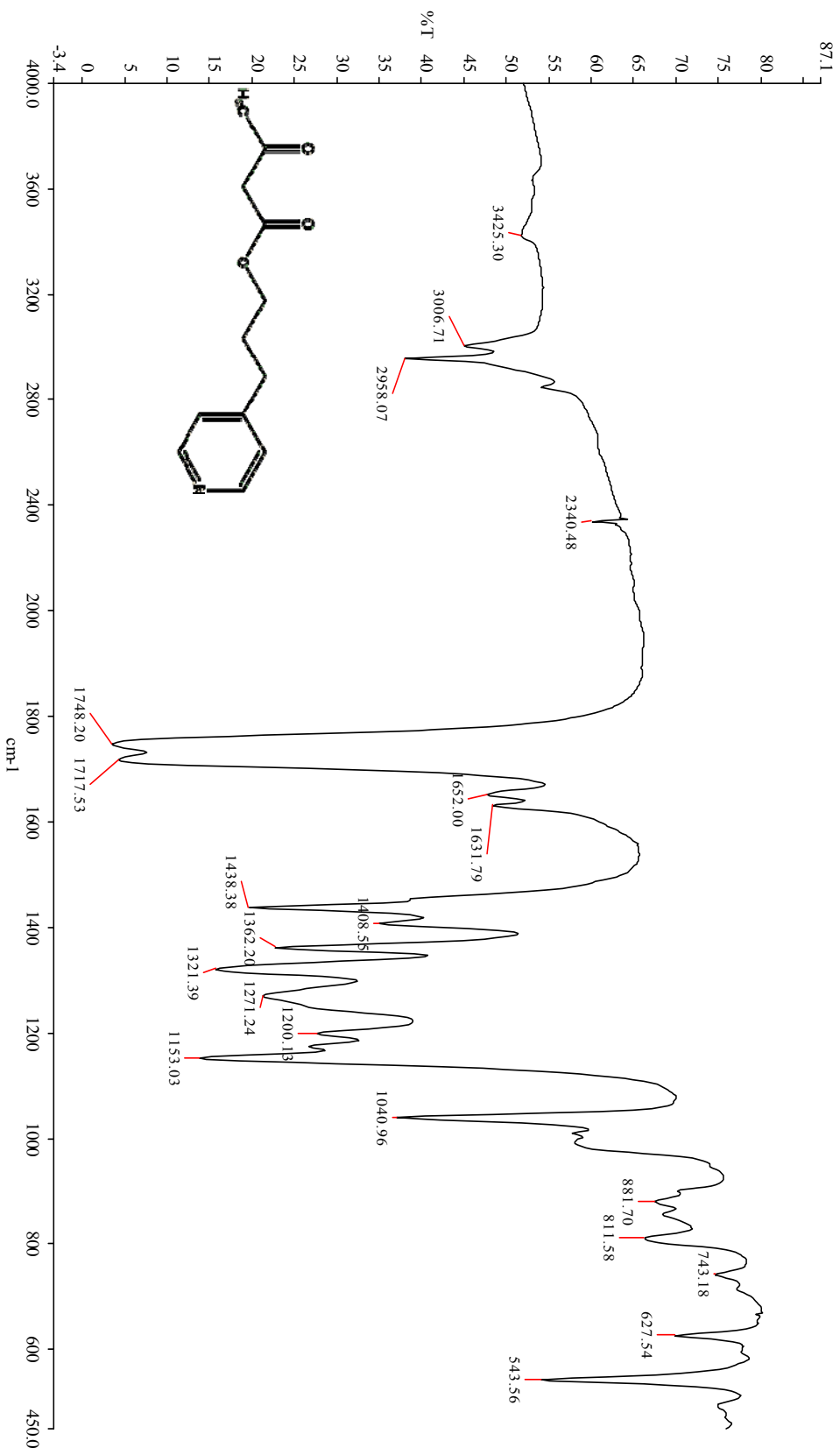
طیف ۱-۳ - طیف IR مربوط به ۱- متیل - ۵- نیترو ایمیدازول - ۲- کربوکسالدهید



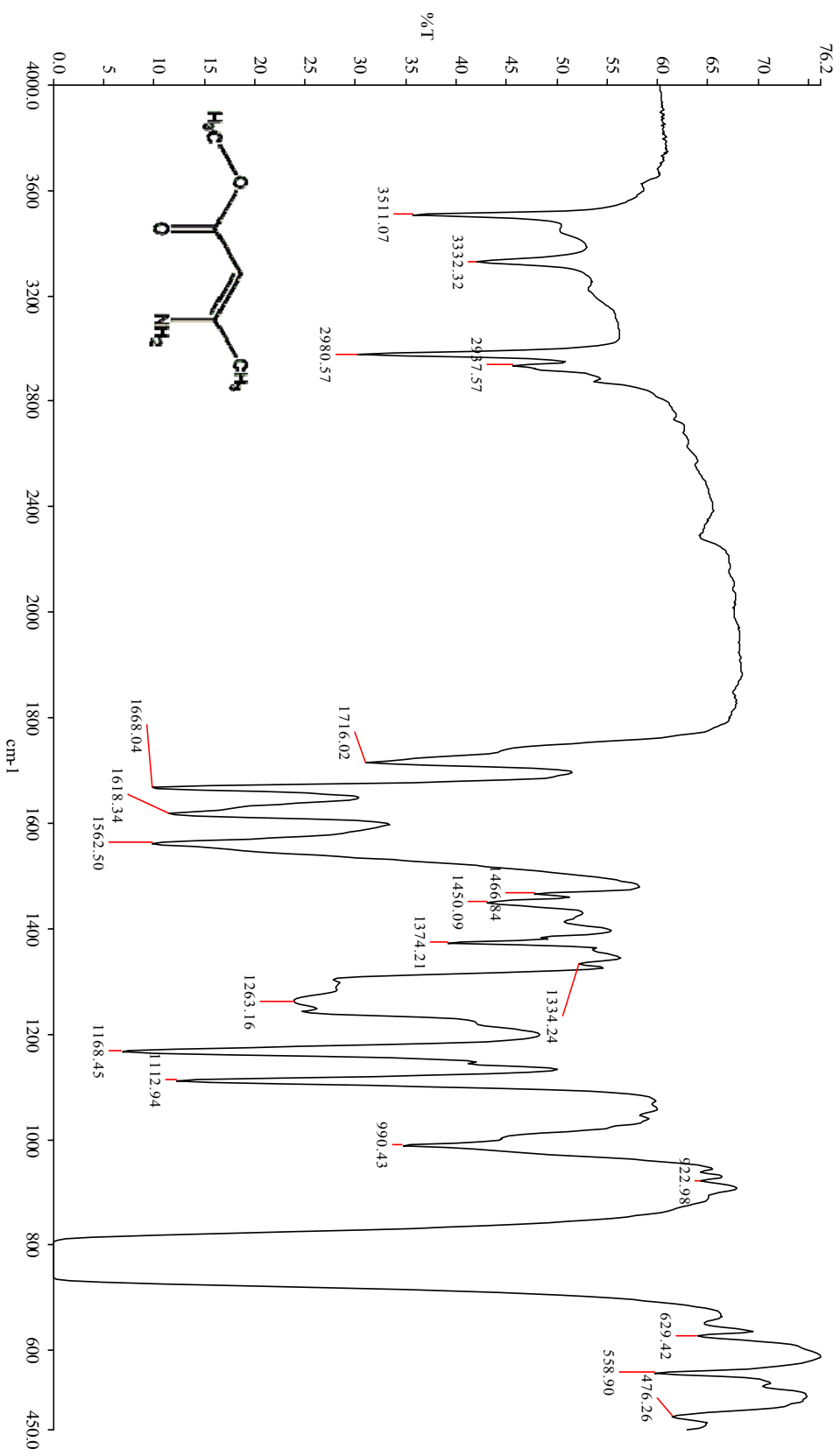
طیف ۲-۳ - طیف IR مربوط به ۳- (پیریدین-۲- ایل) پروپیل-۳- آکسو بوتانات (3a)



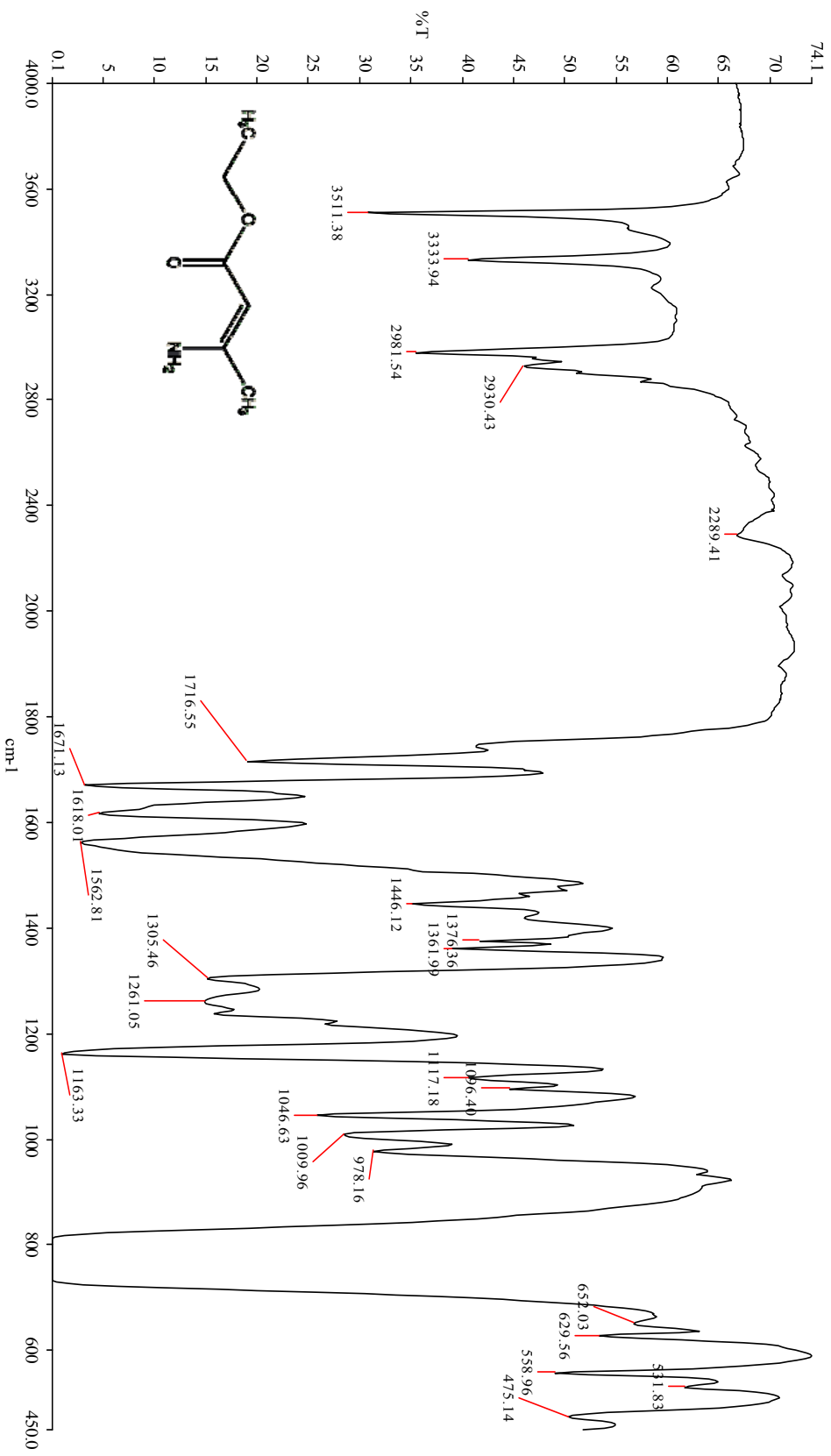
طیف ۳- طیف IR مربوط به ۳- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل-۳- اکسو بوتانوات (3b)



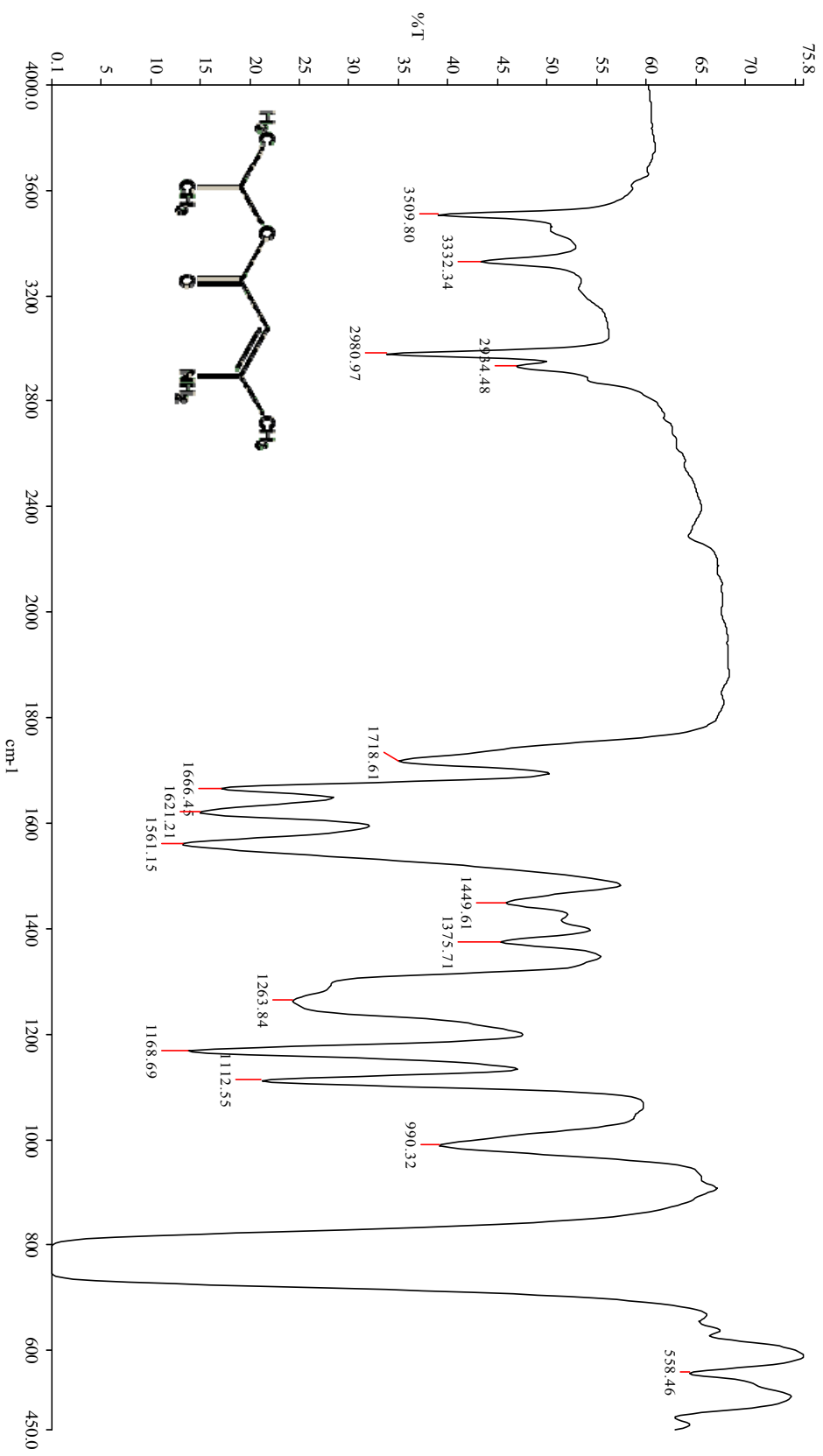
طیف ۳-۴- طیف IR مربوط به ۳- (پیرویدین - ۴- ایل) پروپیل - ۳- اکسو بوتانوات (3c)



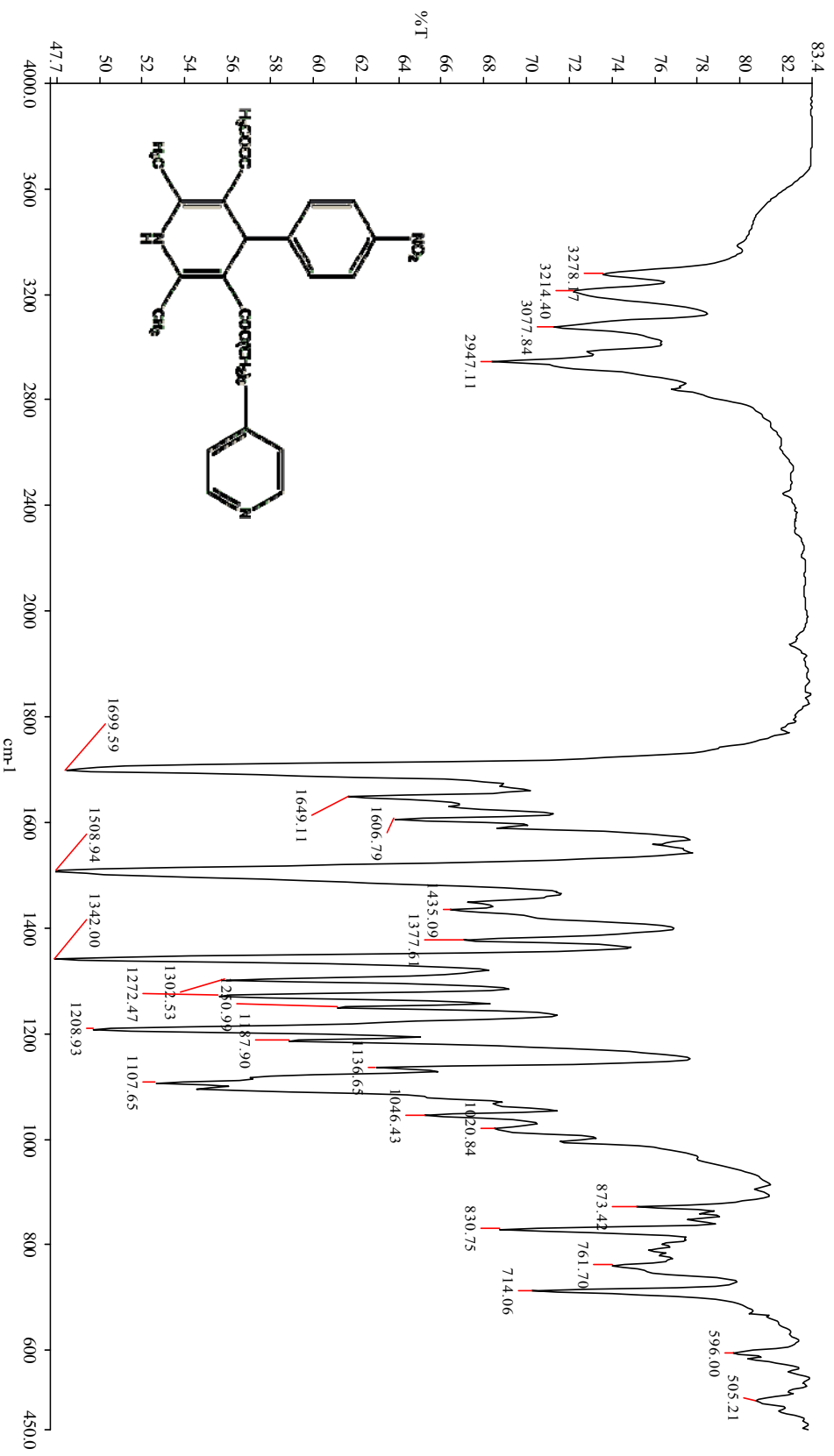
طیف IR مربوط به متیل-3-آمینوبوتونات (5a)



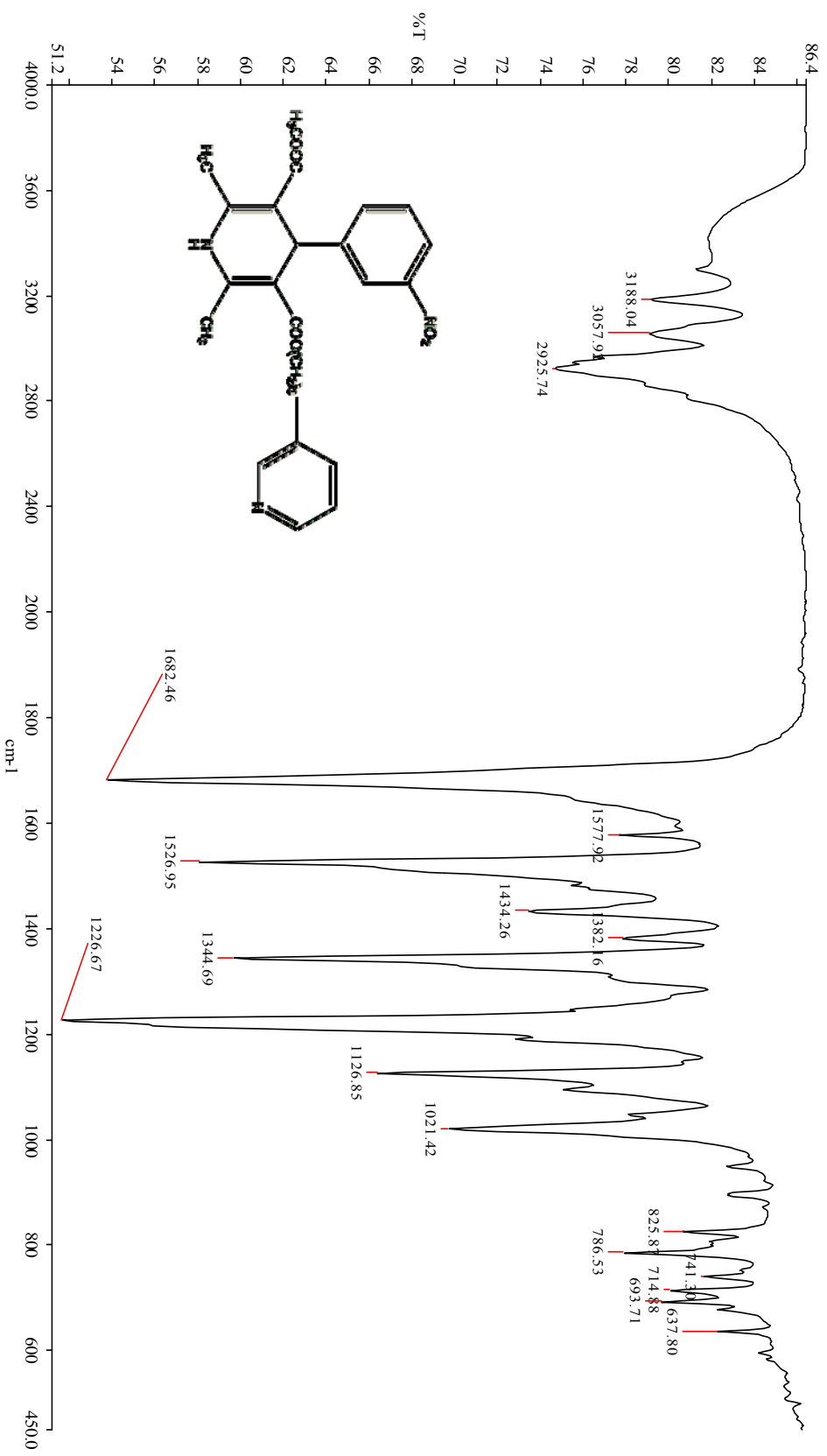
طیف ۳-۶- طیف IR مربوط به ایل-۳- آمینو کروتونات (5b)



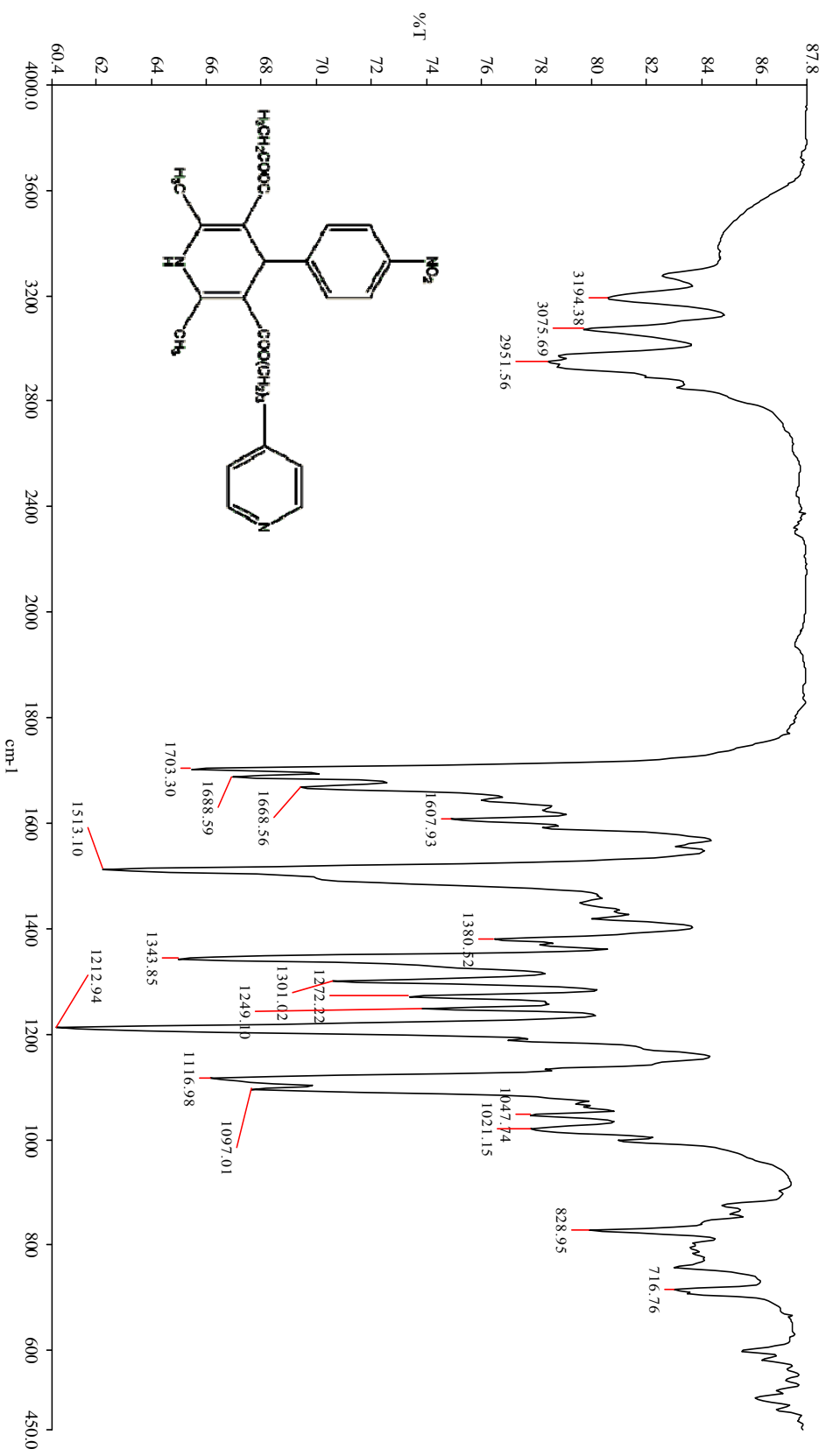
طیف ۷-۳- IR مربوط به ایزوپروپیل-۳-آمینو کروتونات (5c)



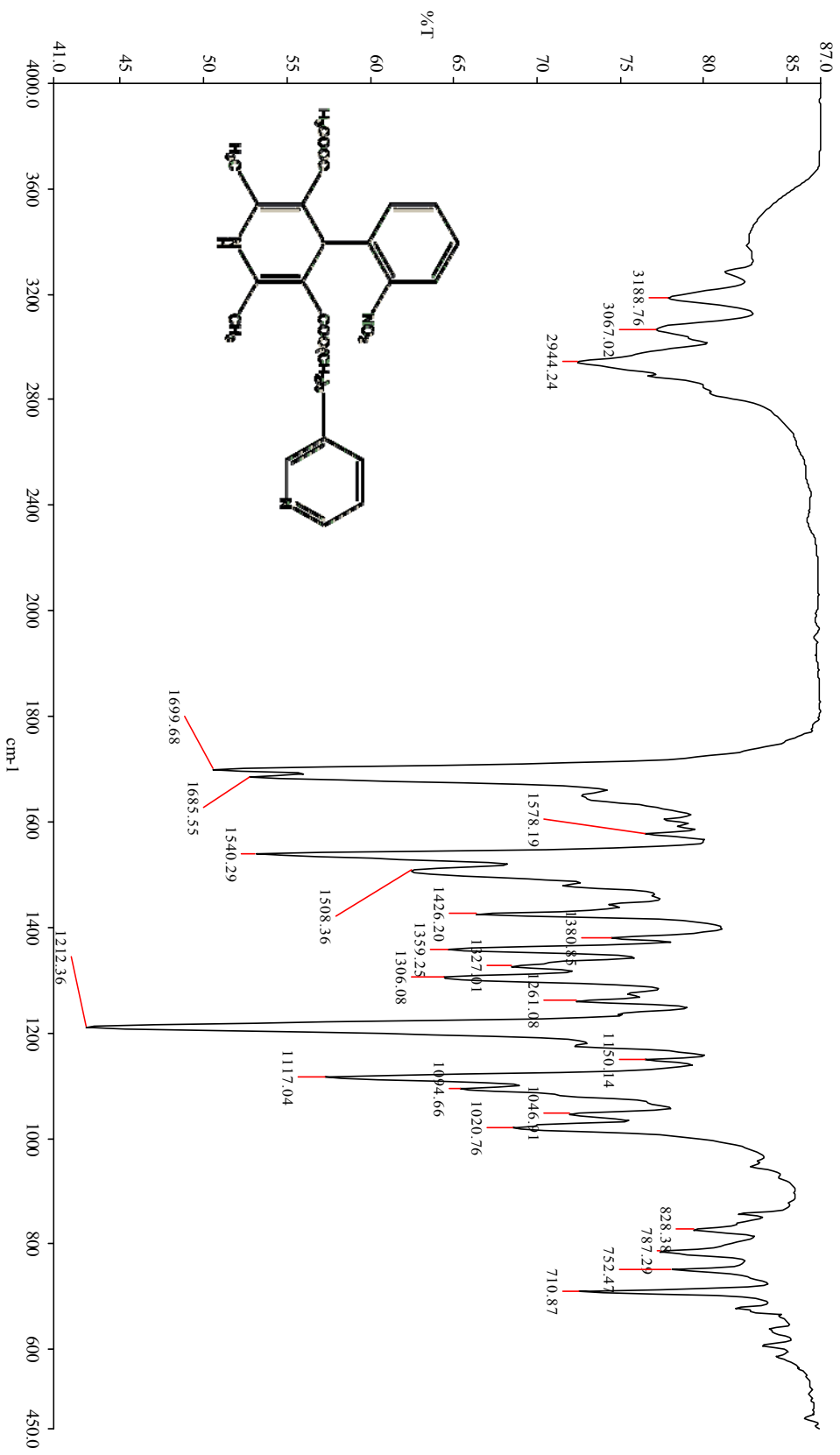
طیف ۸-۳- طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵- (۳- (بیریدین-۴- (ایل) پروپیل)-۲-و ۶- دی متیل-۴- نیترو فنیل)- (۱-و ۴- دی هیدرو پیریدین-۳-و ۵- دی کربوکسیلات (7a)



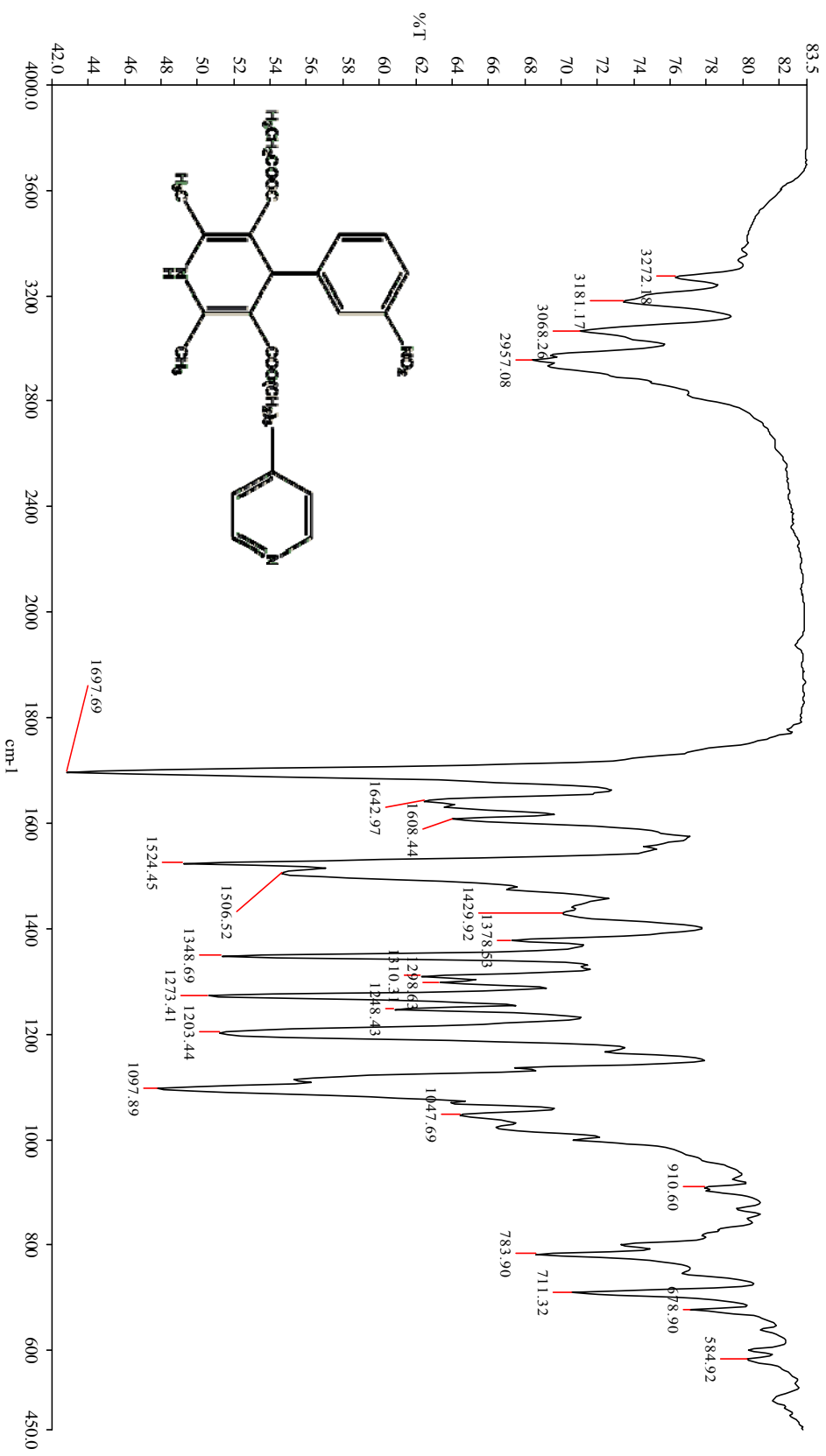
طیف ۹-۳ مربوط به ۳-میتیل-۵- (پیریدین-۳-یل) پروپیل)-۲-او۶-دی میتیل-۴-(۳-نیترو فنیل)-۱-او۴-دی هیدروپیریدین-۳-او۵-دی کربوکسیلات (7b)



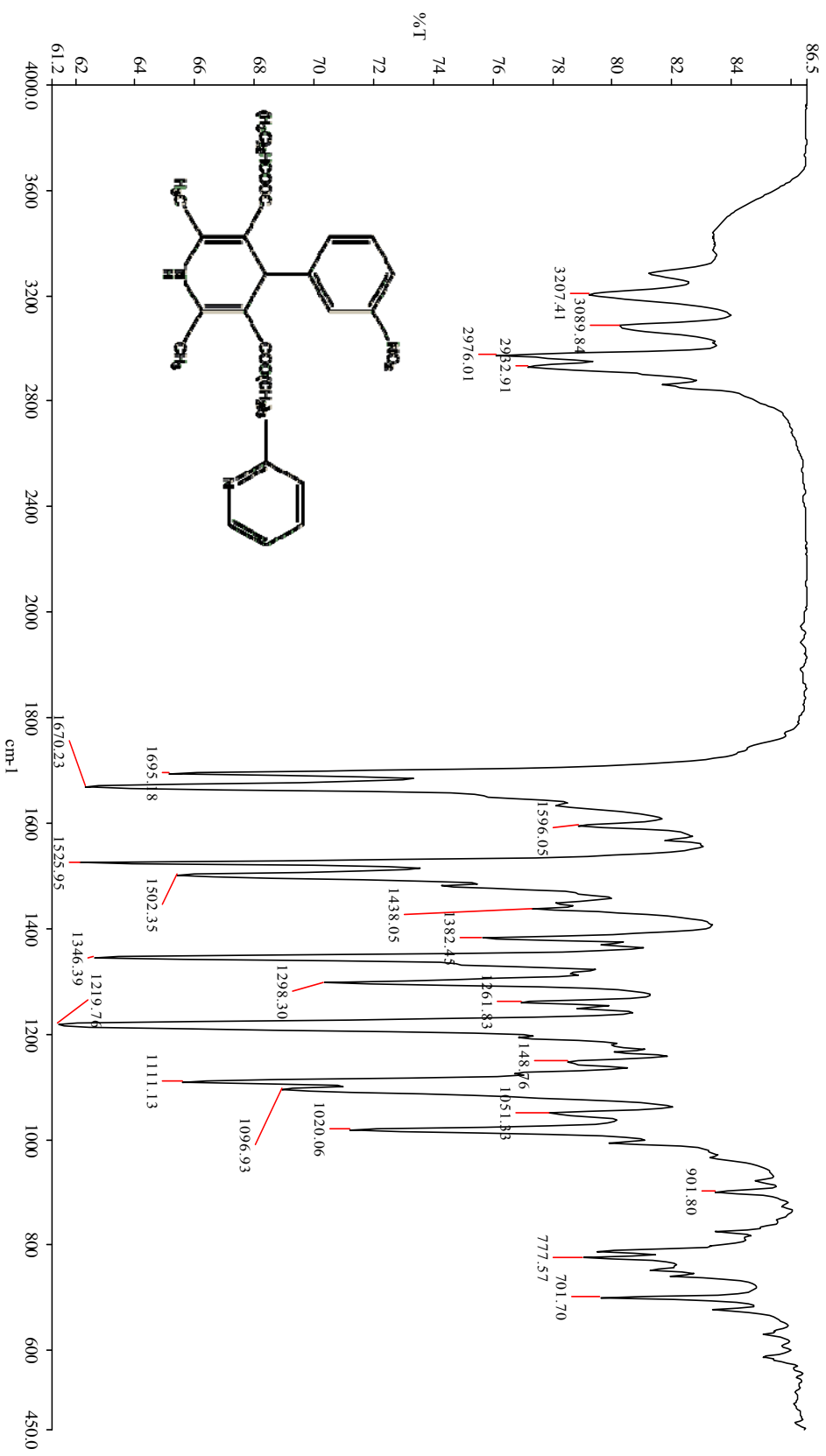
طیف ۱-۳ مربوط به ۳- اتیل-۵- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل-۶- دی میتیل-۴- نیترو فنیل- (۴- دی هیدرو پیریدین-۳- او۵- دی کربوکسیلات (7c)



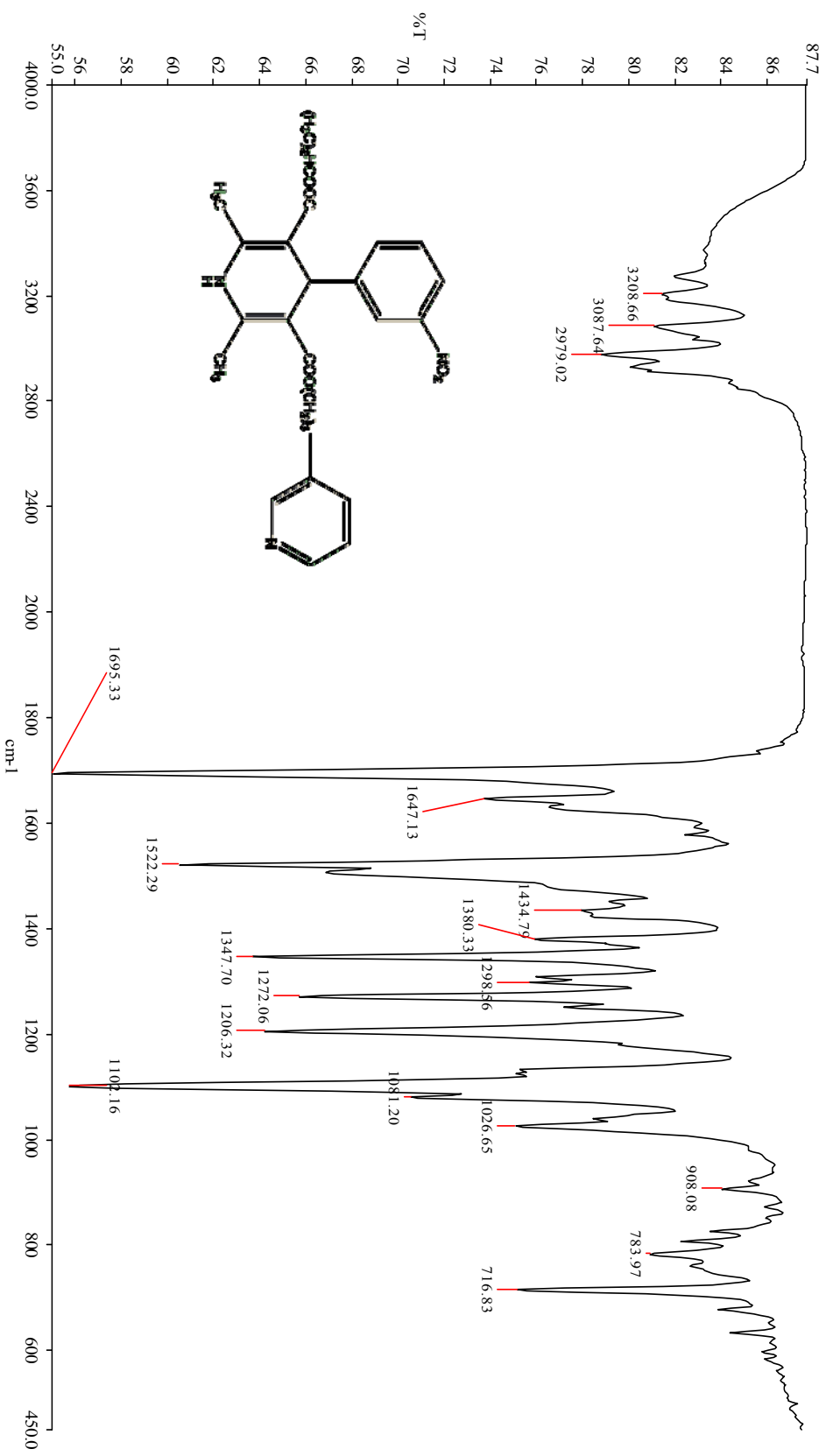
طیف ۳-۱۱- IR طیف مربوط به ۳- متیل-۵- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل-۲- ایل-۴- نیترو فنیل-۱-۳- دی هیدرو پیریدین-۳- دی کروکسیلات (7d)



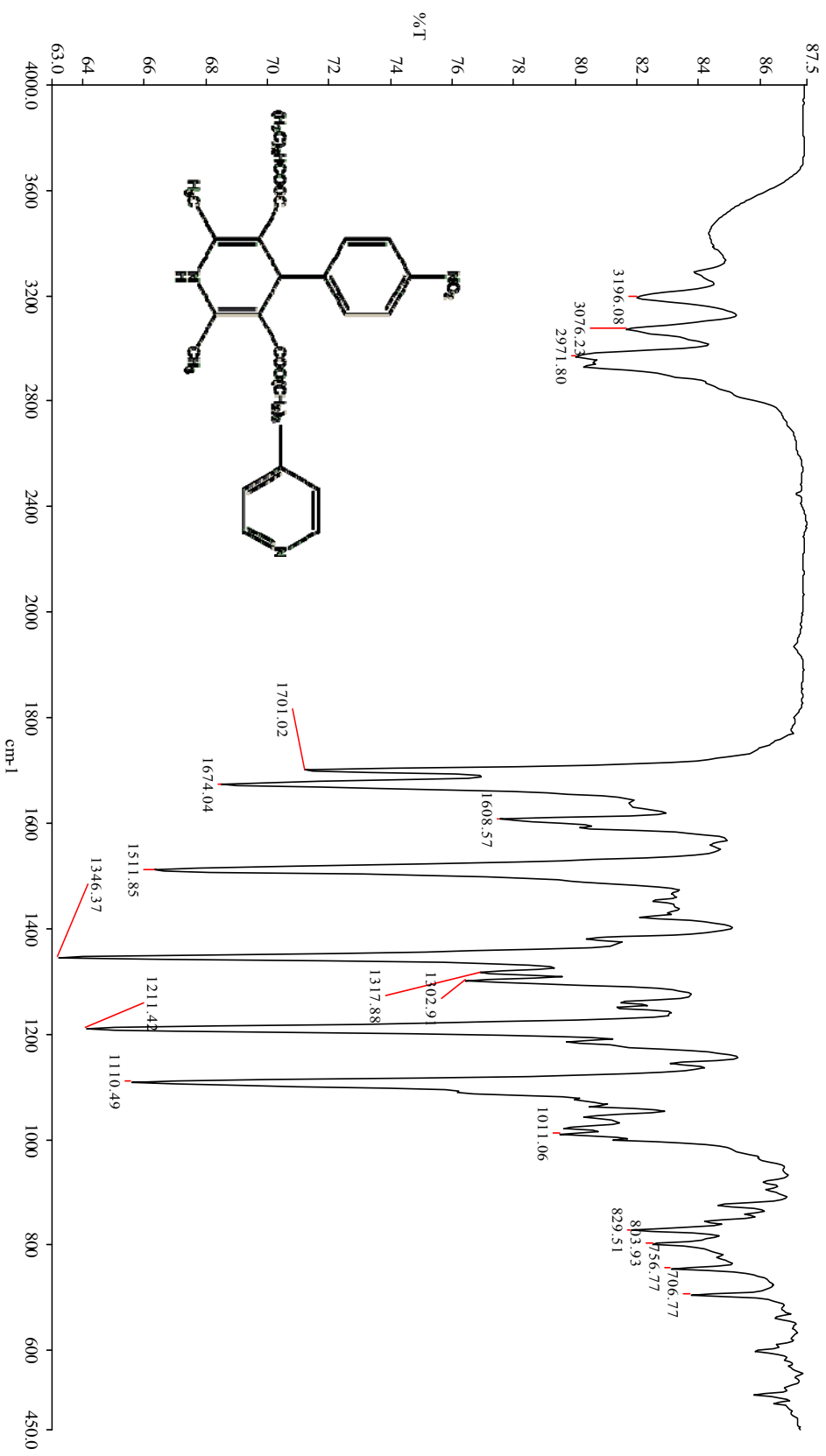
طیف ۱۲-۳- مربوط به ۳- اتیل-۵- (۳- پیریدین-۴-یل) پروپیل) ۲- دی متیل-۴- (۳- نیترو فیل) -۴- دی هیدرو پیریدین-۳- دی کربوکسیلات (7e)



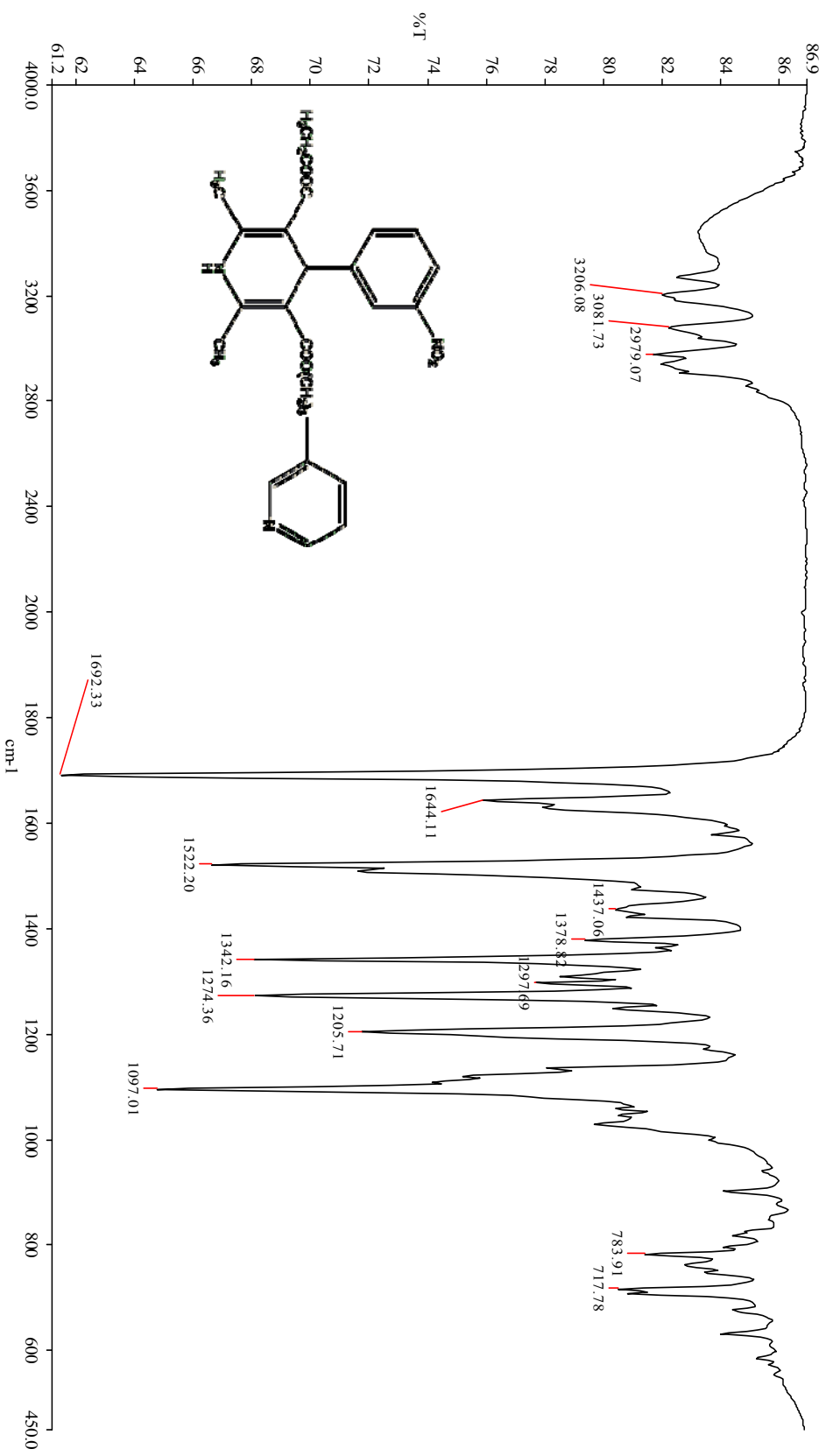
طیف ۳-۱۲- طیف IR مربوط به ۳- اینزوپروپیل-۵- (پیریدین-۲- ایل) پروپیل-۲-و-۶- دی متیل-۴- (۳- نیترو فنیل)-۱-ا-۴- دی هیدروپیریدین-۳-۵-
دی کربوکسیلات (7f)



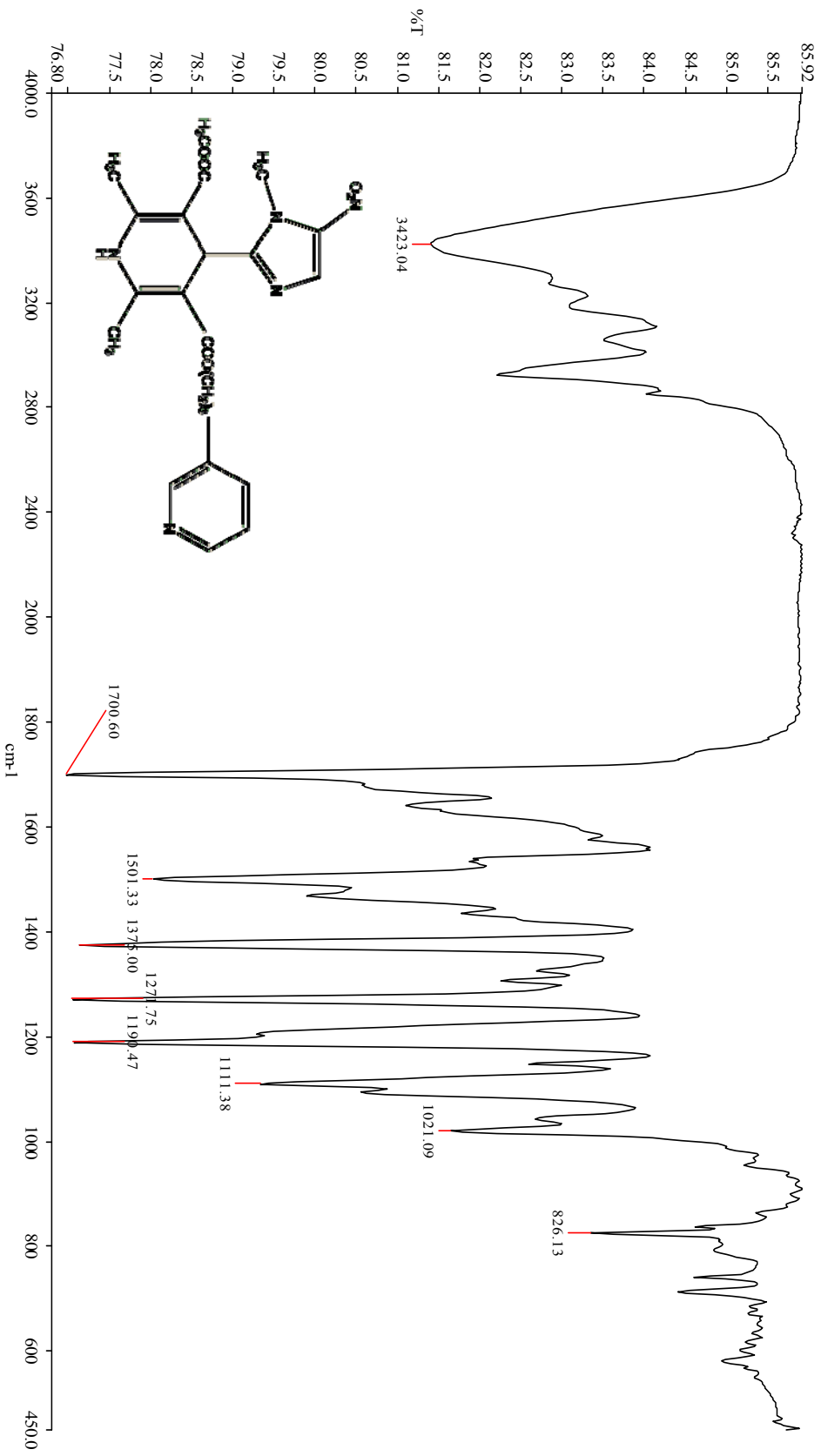
طیف ۳-۱۴- طیف IR مربوط به ۳- انیزوپروپیل-۵- (۳- پیپیدین-۳- ایل) پروپیل-۲- او-۶- دی متیل-۴- (۳- نیترو فیل)- (او-۴- دی هیدرو پیپیدین-۵- دی کربوکسیلات (7g))



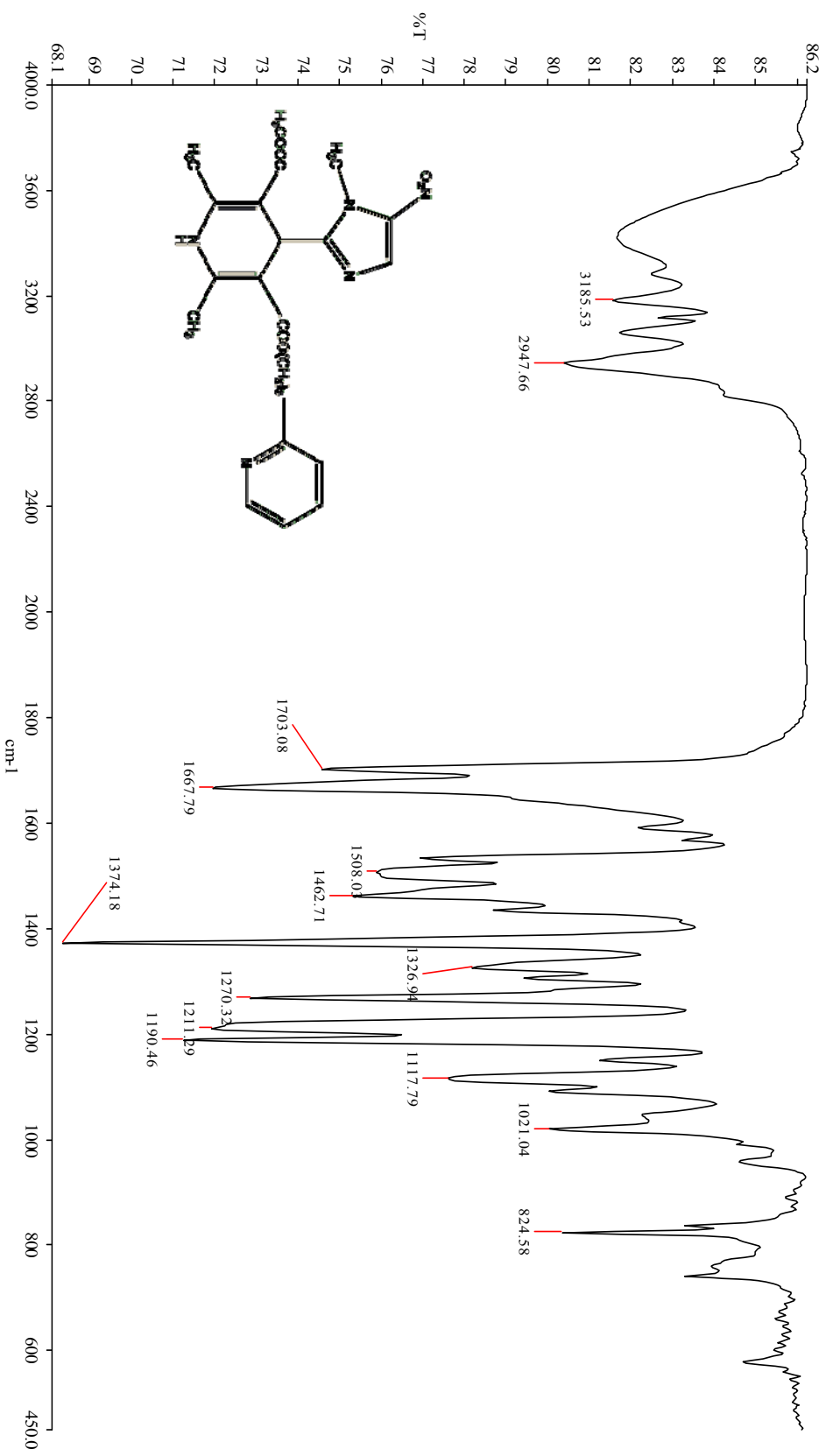
طیف ۳-۱۵- طیف IR مربوط به ۳- اینزوپروپیل-۵- (۳- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲-و-۶- دی متیل-۴- (۴- نیترو فیل)- (۱-ا۴- دی هیدرو پیریدین-۳- دی کربوکسیلات (7h)



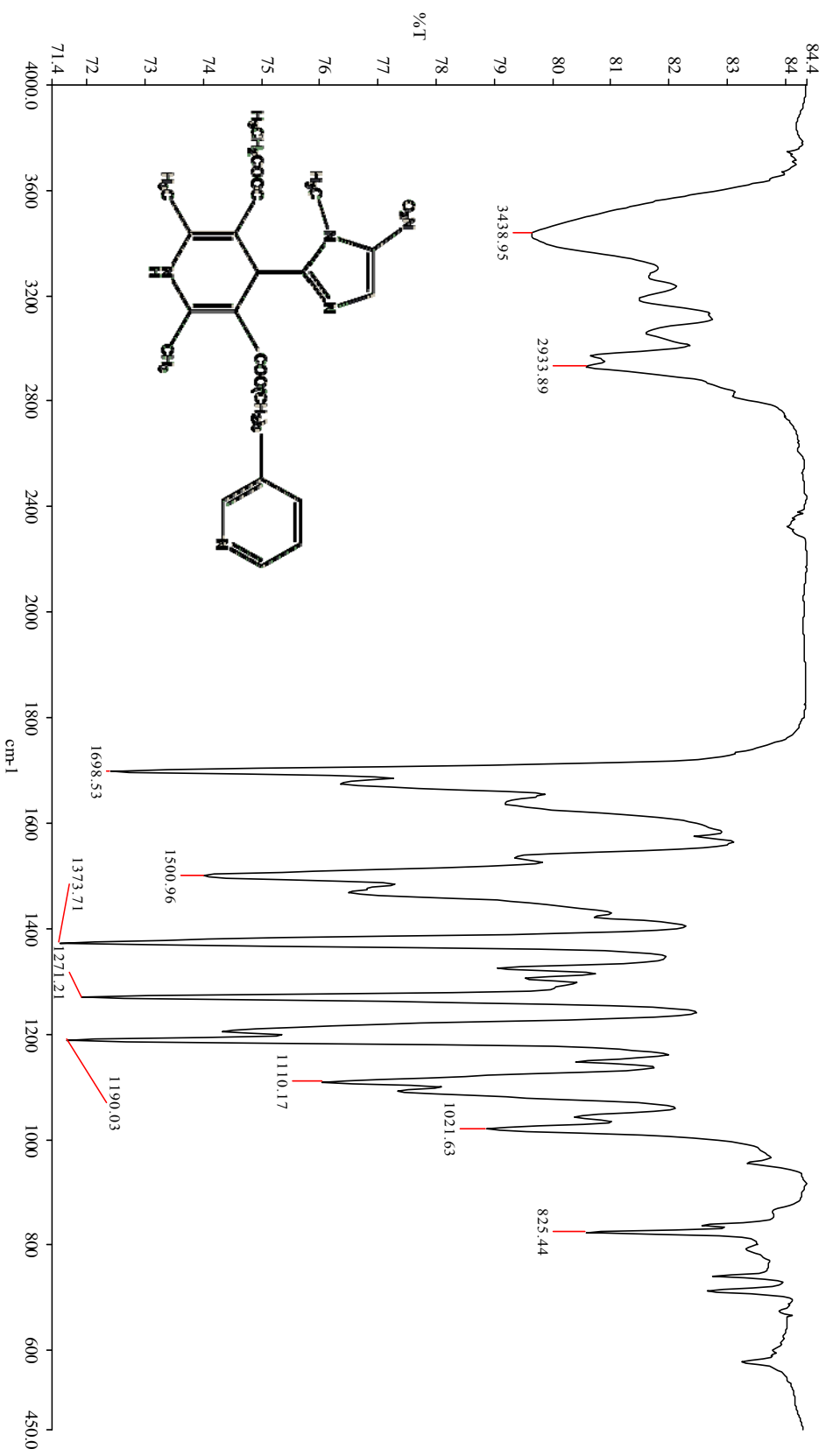
طیف ۱۶-۳ مربوط به ۳- ایل-۵- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۲-او-۶- دی متیل-۴- (۳- نیترو فنیل)-۱-او-۴- دی هیدرو پیریدین-۳-او-۵- دی کربوکسیلات (7i)



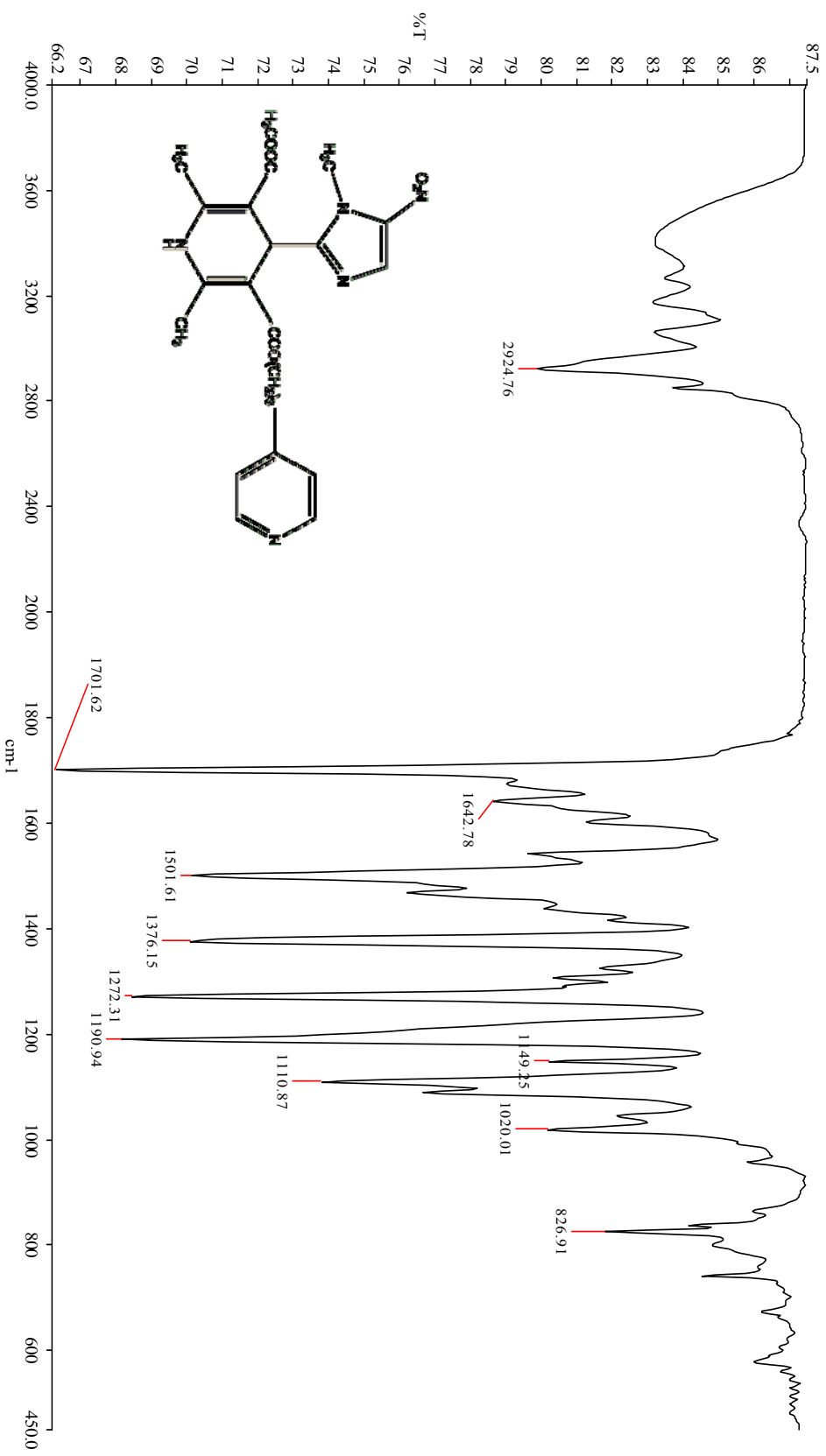
طیف ۱۷-۳ - طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل-۲- کوک- دی متیل-۴- (۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲- ایل)-۱- او-۴- دی هیدرو پیریدین-۳- او-۵- دی کربوکسیلات (7)



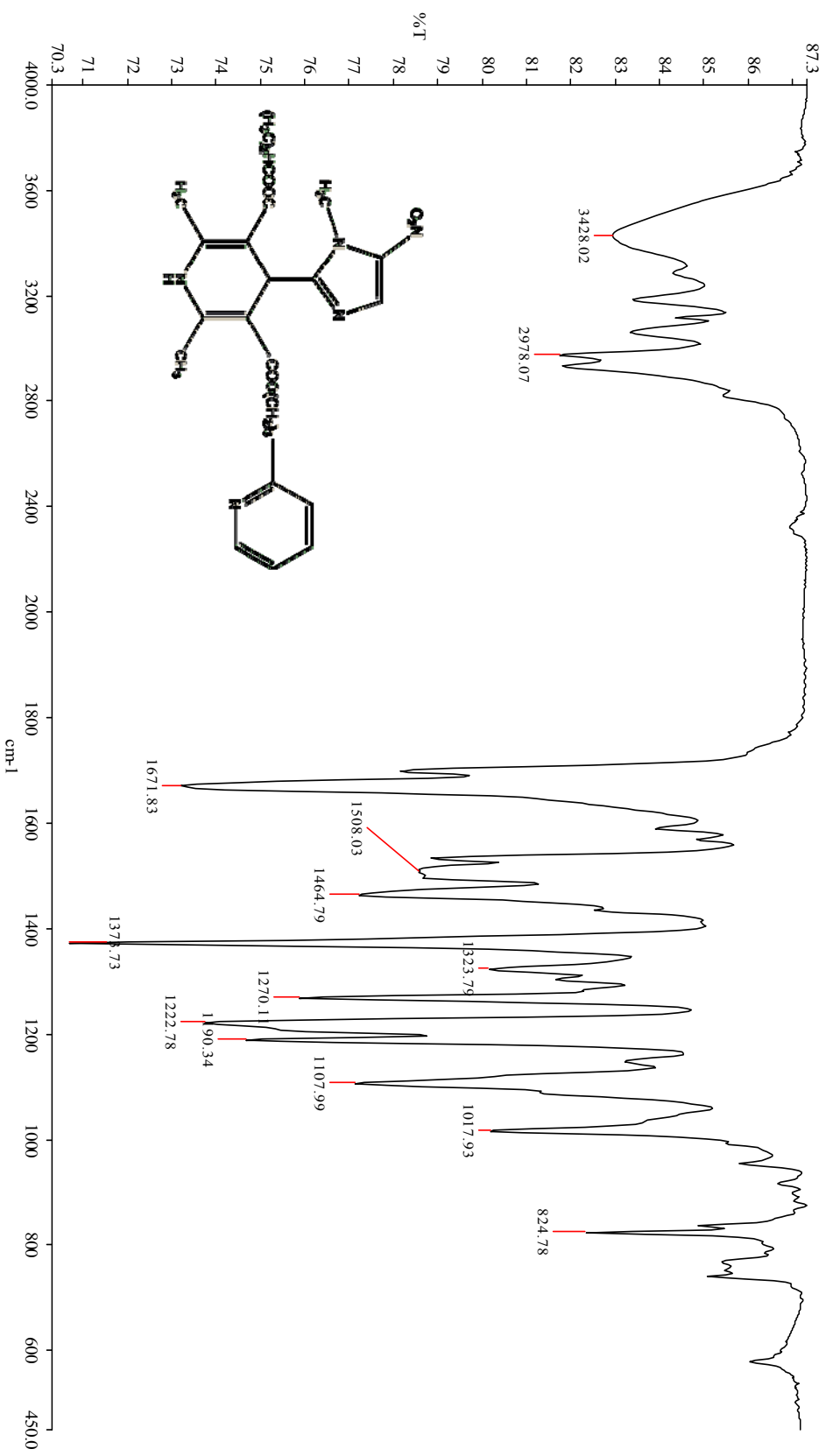
طیف ۱۸-۳ - طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵- (بیریدین-۲- ایل) پروپیل)-۲- دی متیل-۴- (۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲- ایل)-۱-و۴- دی هیدروپیریدین-۳-و۵- دی کربوکسیلات (7k)



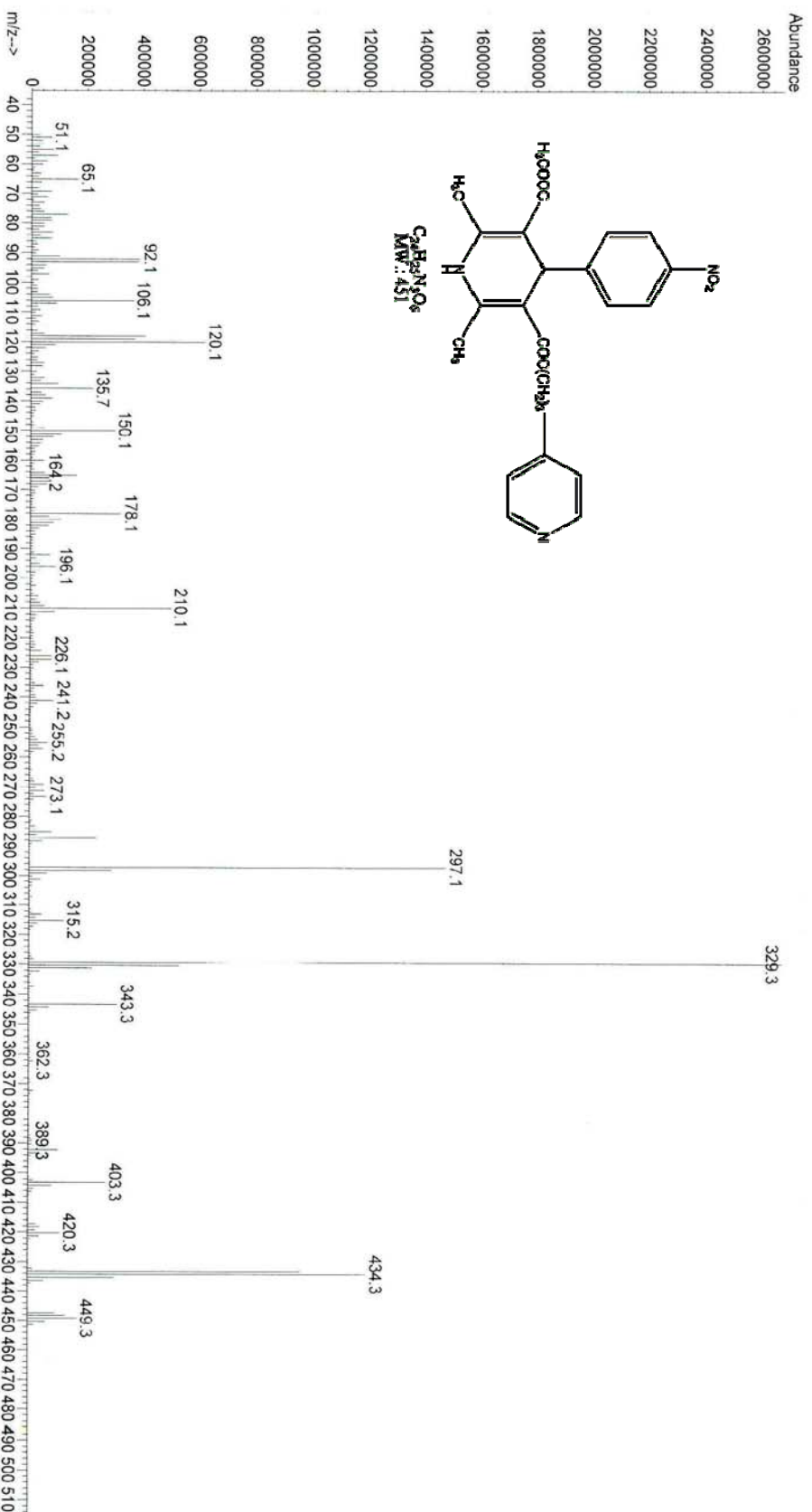
طیف ۱۹-۳- طیف IR مربوط به ۳- اتیل-۵- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل (۲-او۶-دی متیل-۴- (۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲- ایل)-۴-و۱)- دی هیدروپیریدین-۳-وه-۵- دی کربوکسیلات (71)



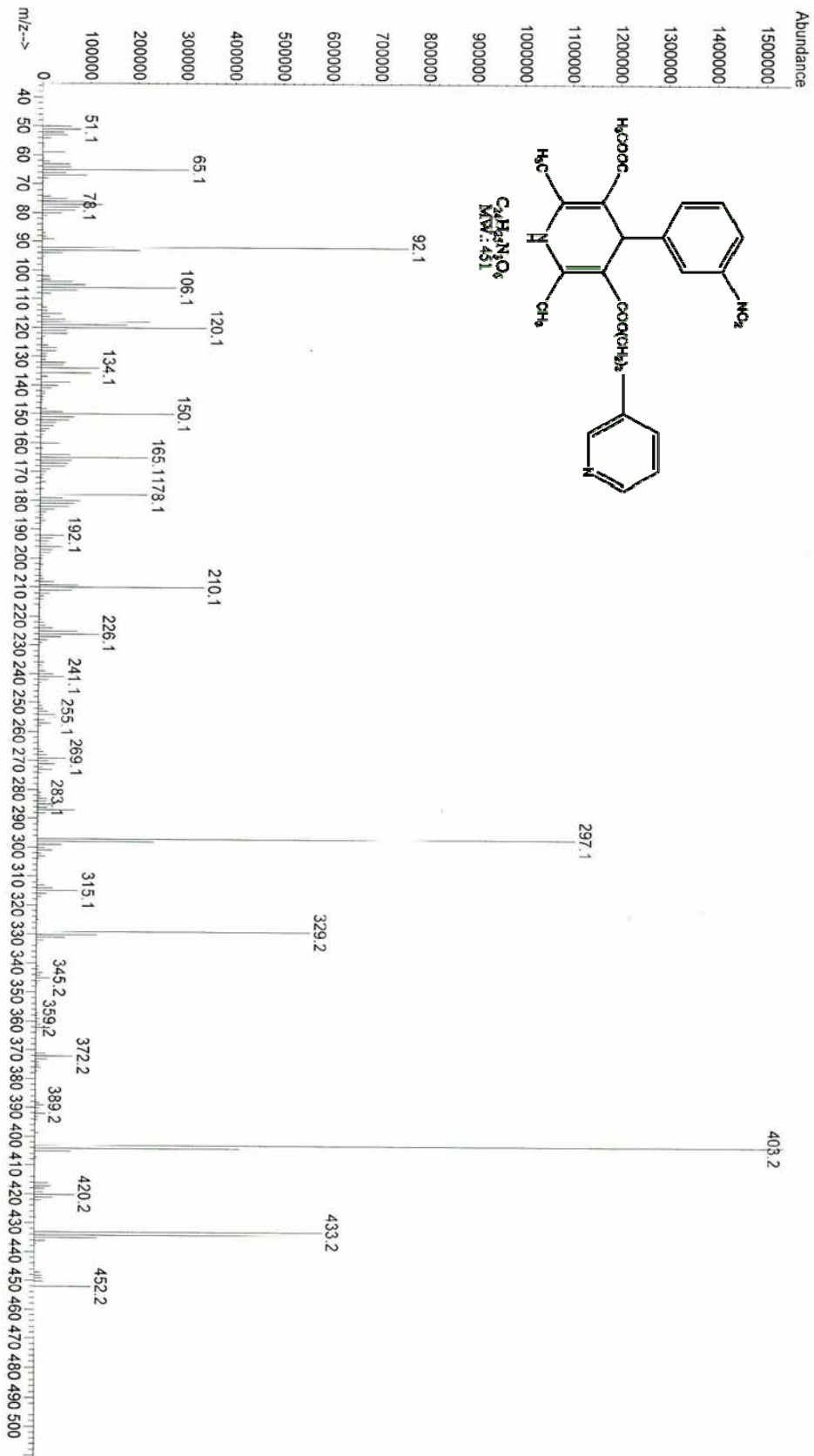
طیف ۲-۳- طیف IR مربوط به ۳- متیل-۵- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲-و ۶- دی متیل-۴- (۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲- ایل)-۱-و ۴- دی هیدروپیریدین-۳-و ۵- دی کربوکسیلات (7m)



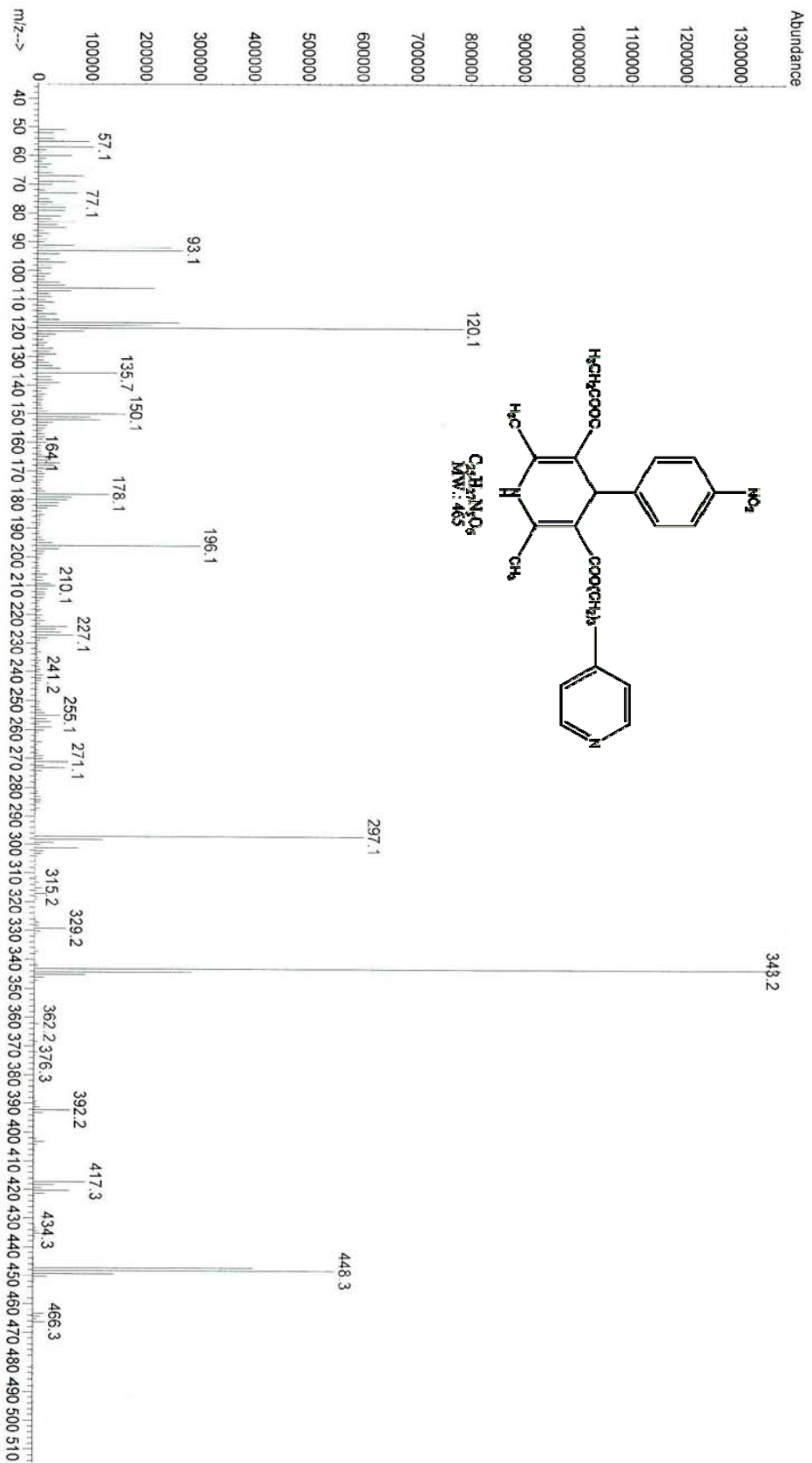
طیف ۲۱-۳- طیف IR مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵- (۳- (پیریدین-۲- ایل) پروپیل) اتو ۲- دی متیل-۴- (۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲- ایل)-
 او ۴- دی هیدروپیریدین-۳- او ۵- دی کربوکسیلات (7n)



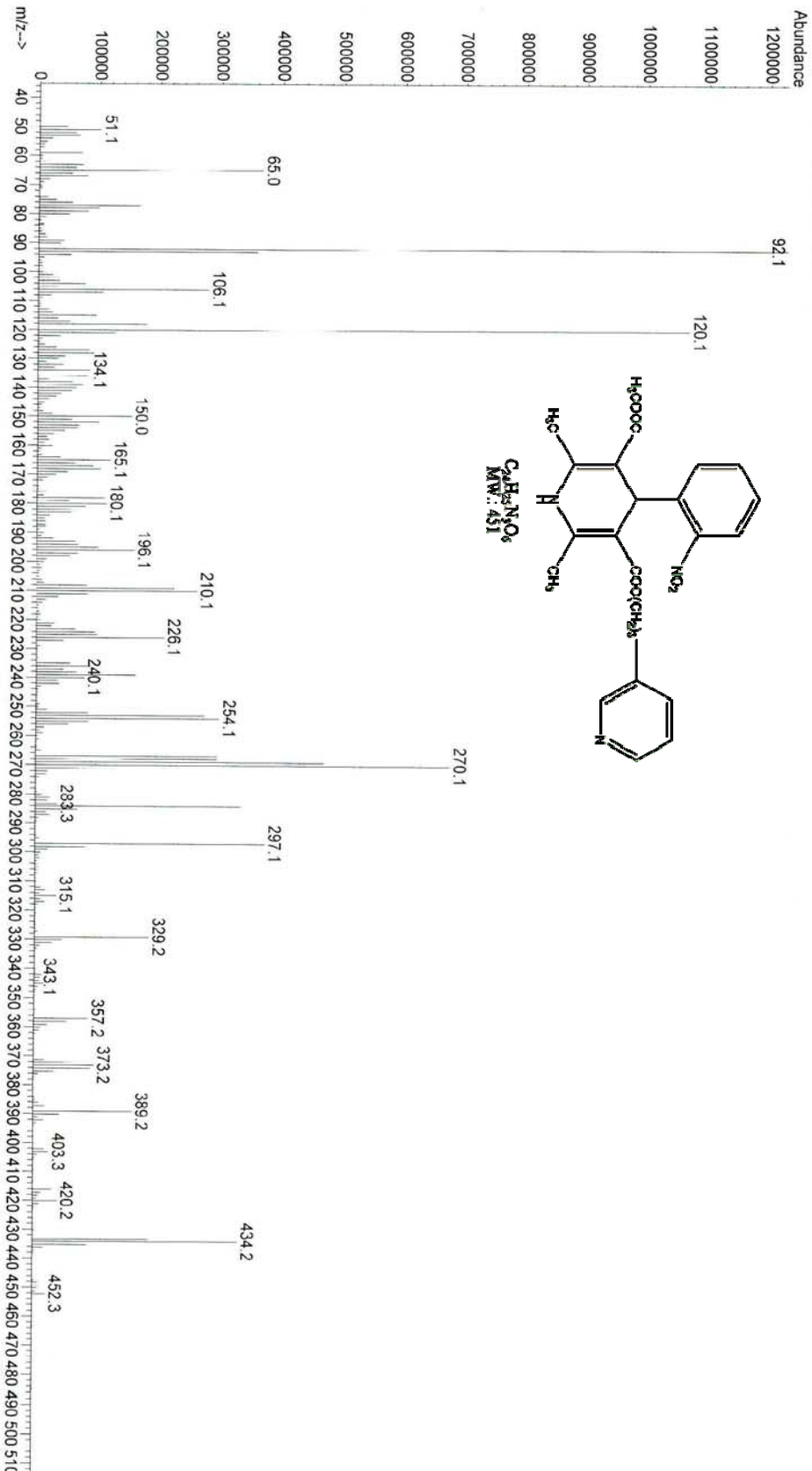
طیف ۲-۳- طیف جرمی مربوط به ۳- متیل-۵- (۳- (بیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲-و۶-دی-متیل-۴- نیترو فیل)- (۱-و۴)- دی هیدروپیریدین-۳-۵-دی کربوکسیلات (7a)



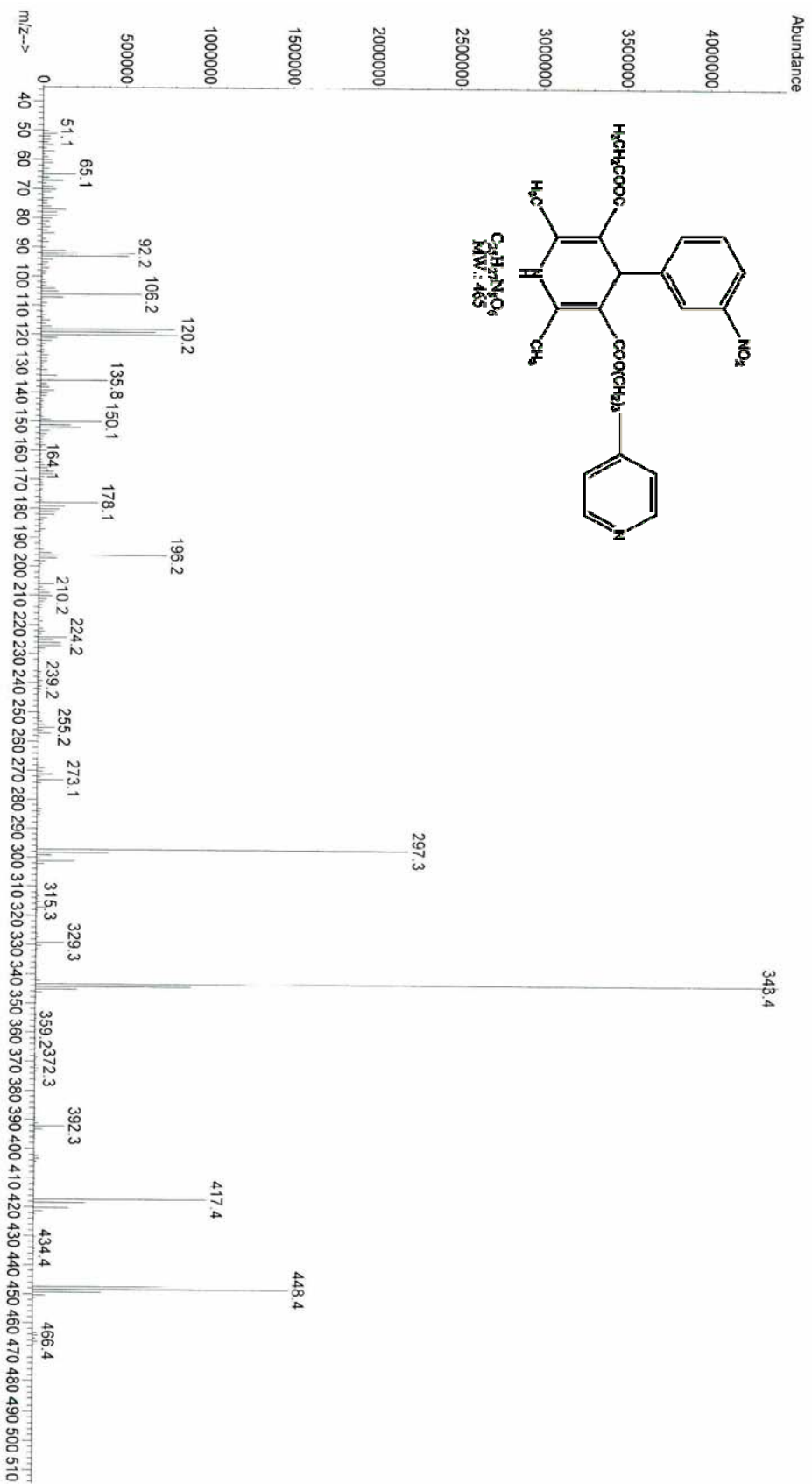
طیف ۳-۲- طیف جرمی مربوط به ۳- متیل-۵- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل-۲- دی متیل-۴- (۳- نیترو فنیل)-۱- او-۴- دی هیدرو پیریدین-۳- ۵-
 دی کربوکسیلات (7b)



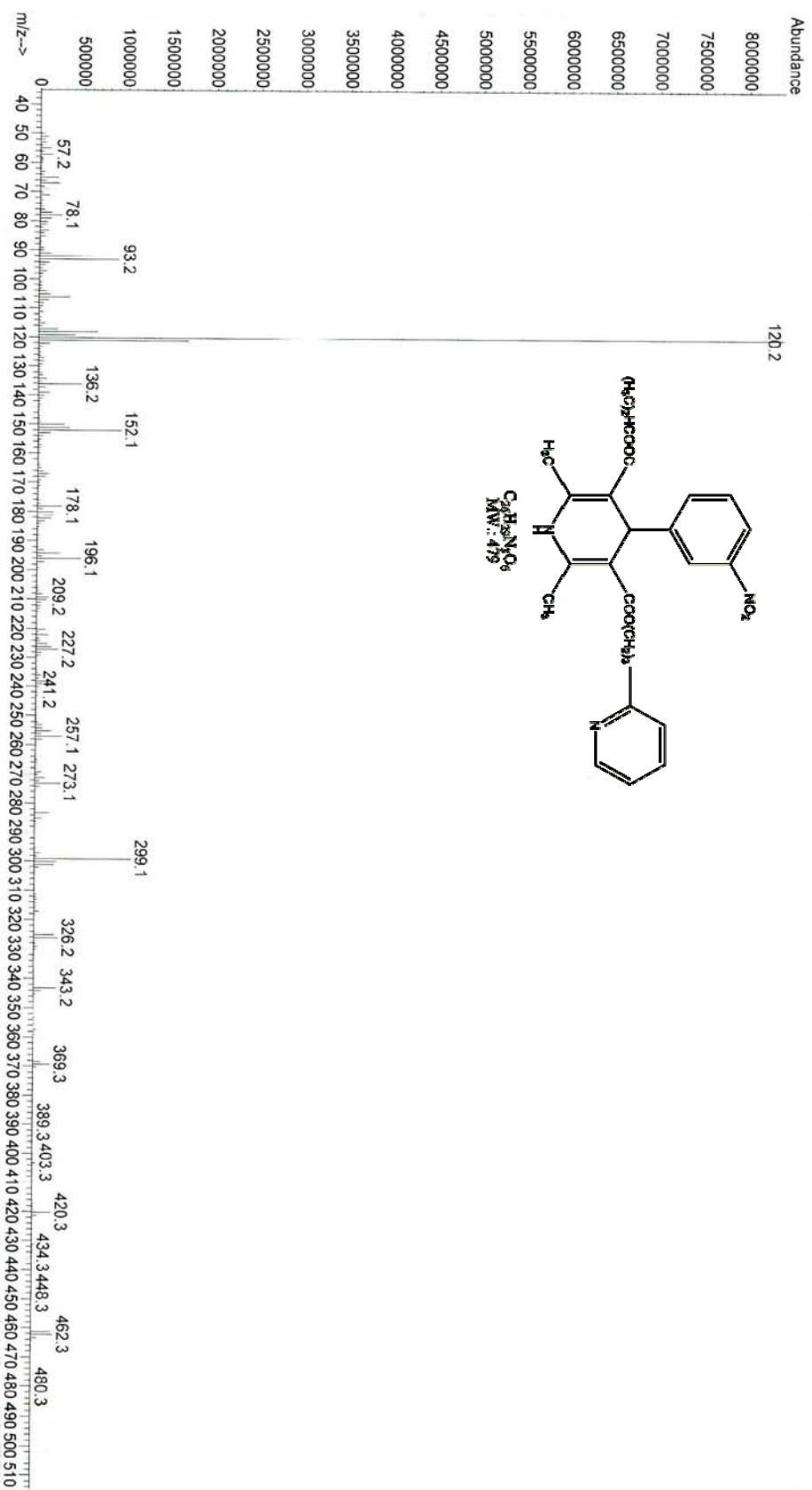
طیف ۳-۲- ایل-۵- (پیریدین-۴-۳) (۳-۲- ایل) پروپیل-۴- متیل-۴- نیترو فیل- (۴-۱) دی هیدرو پیریدین-۵-۳-
 دی کربوکسیلات (7c)



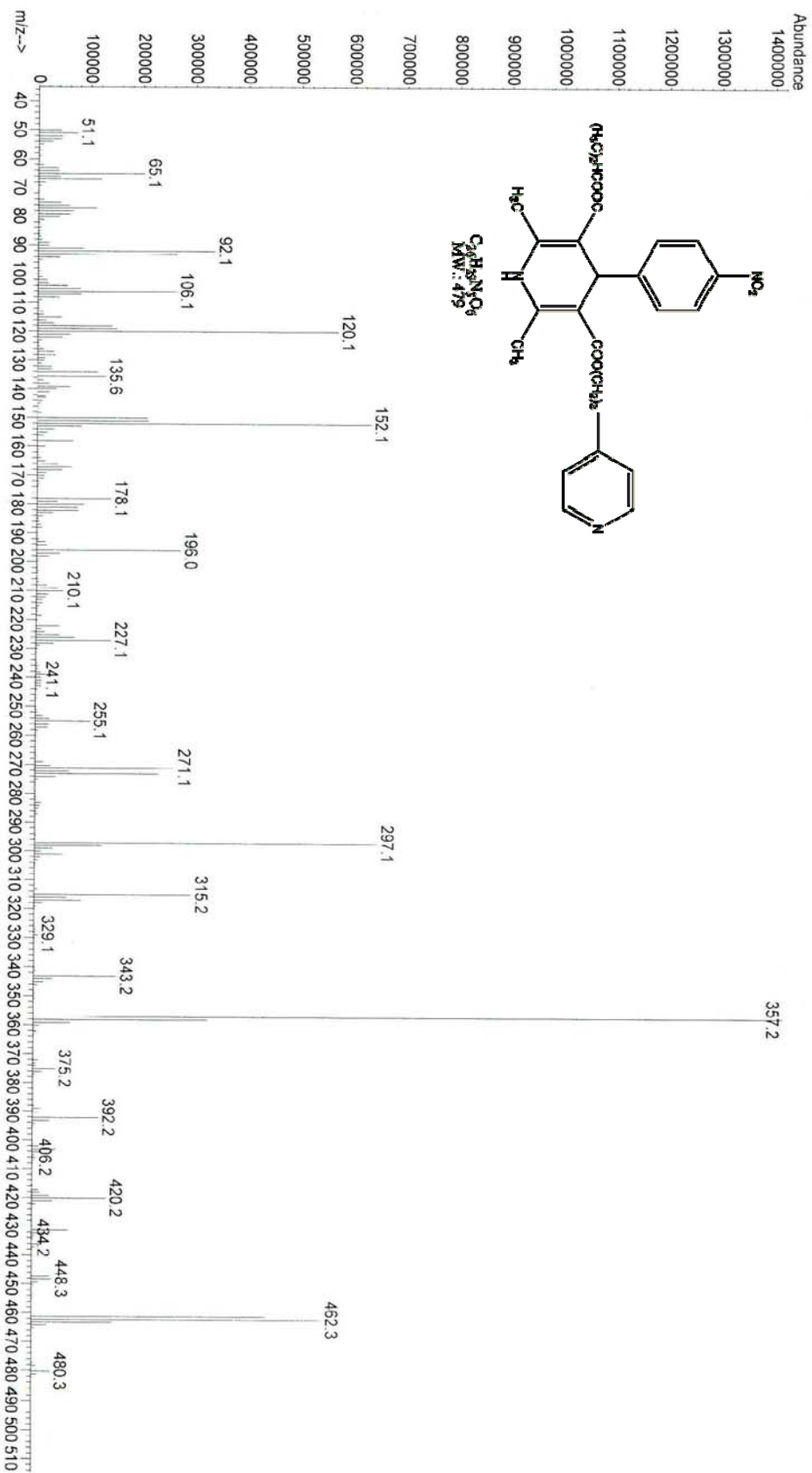
طیف ۳-۲۵- طیف جرمی مربوط به ۳- متیل-۵- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۲-۶- دی میتیل-۴- نیترو فیل)-۱-۴- دی هیدرو پیریدین-۵-۳- دی کربوکسیلات (7d)



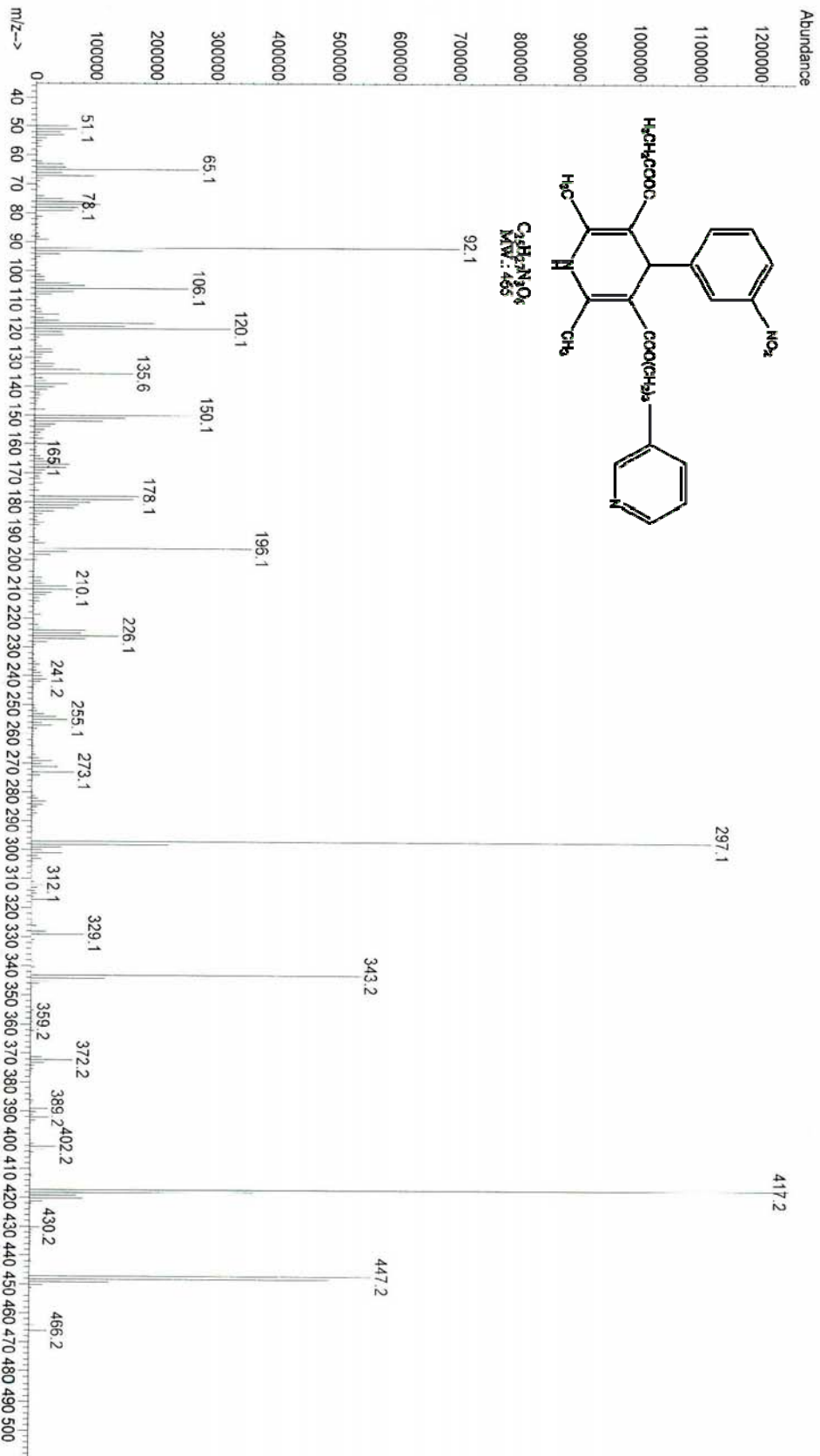
طیف ۳-۲۶- طیف جرمی مربوط به ۳- اتیل-۵- (۳- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲- دی میتیل-۴- (۳- نیترو فنیل)-۱- او-۴- دی هیدرو پیریدین-۳-۵-
دی کریوکسیلات (7e)



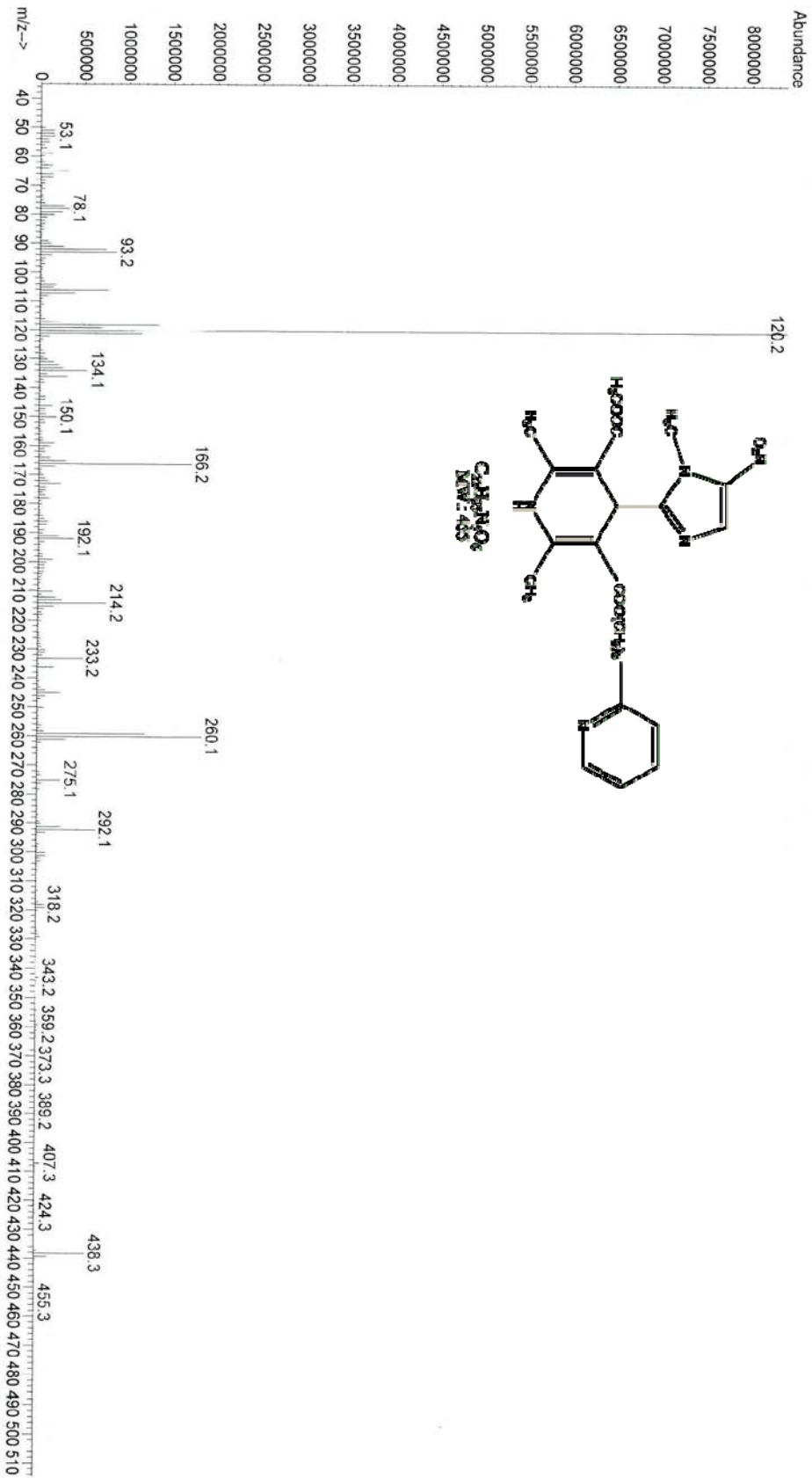
طیف ۳-۲۷- طیف جرمی مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵- (پیریدین-۲- ایل) پروپیل)-۲- ایل) نیترو فیل)- (ا۴- دی هیدرو پیریدین-۵-و۳- دی کربوکسیلات (71)



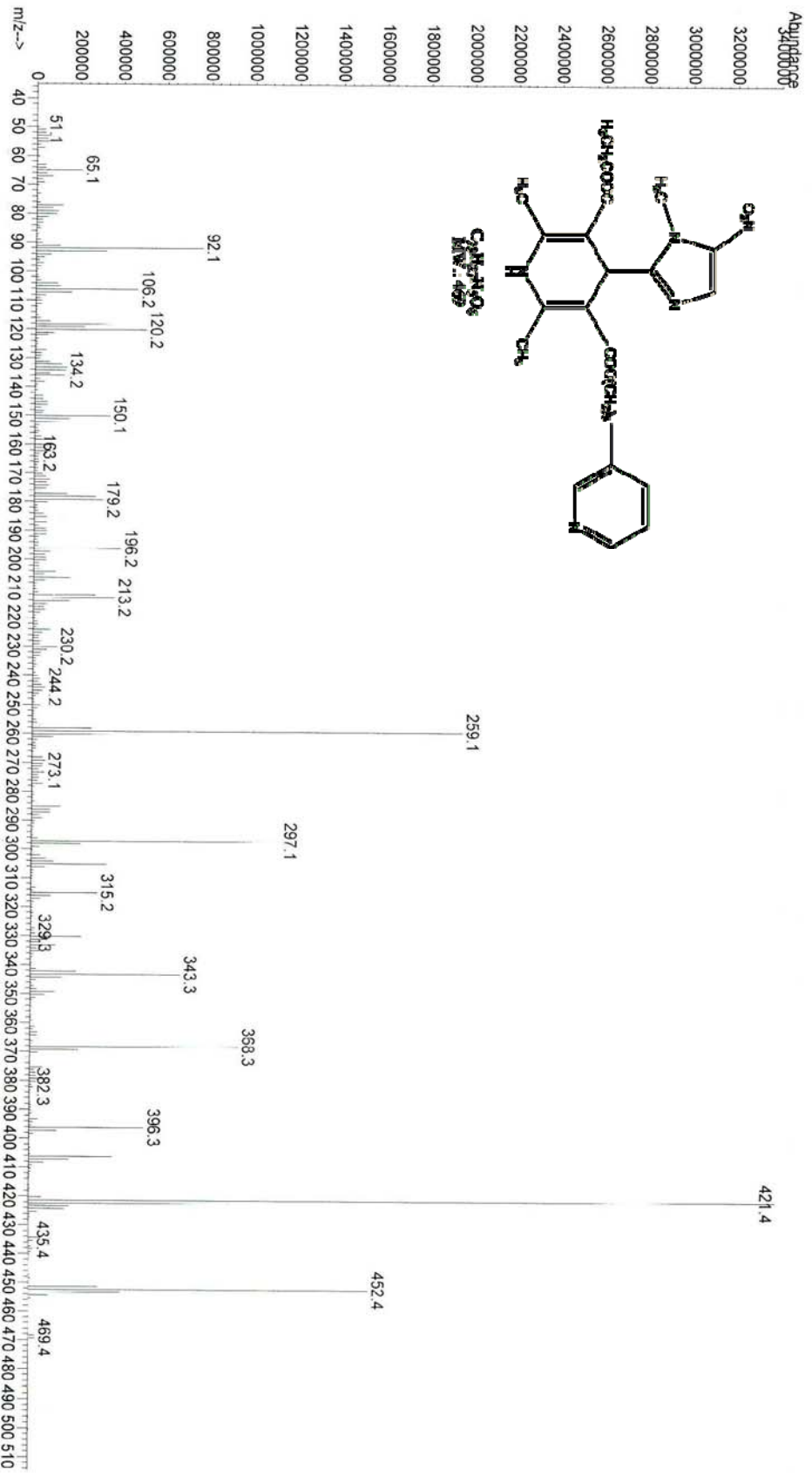
طیف ۳-۲۹- طیف جرمی مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲-او-۶- دی متیل-۴- نیترو فنیل)- او-۱- دی هیدرو پیریدین-
 ۳-۵- دی کربوکسیلات (7h)



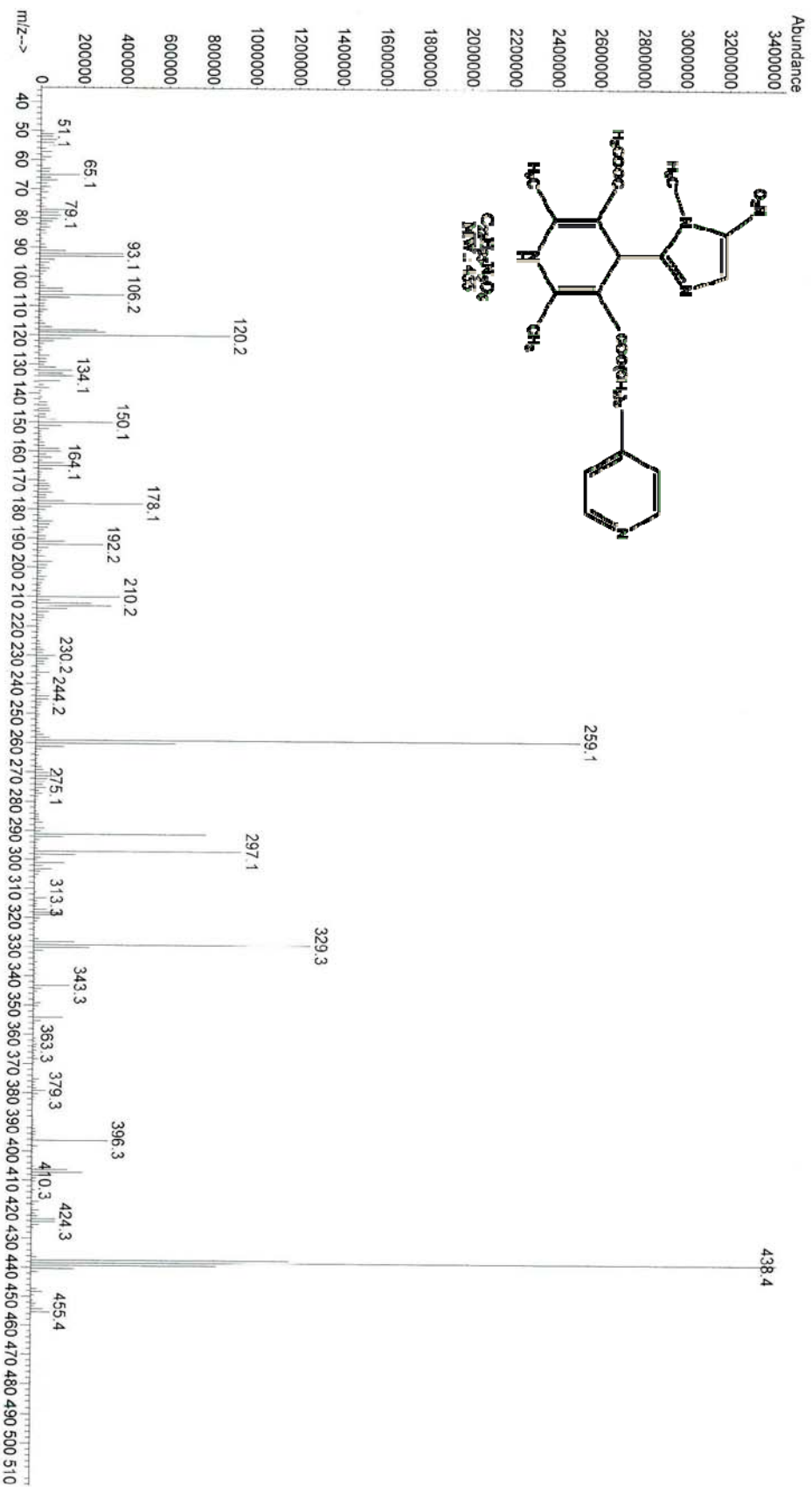
طیف ۳-۳۰- طیف جرمی مربوط به ۳- اتیل-۵- (۳- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۲-۶- دی متیل-۴- (۳- نیترو فنیل)-۱-۴- دی هیدرو پیریدین-۳- ۵- دی کریکسیلات (71)



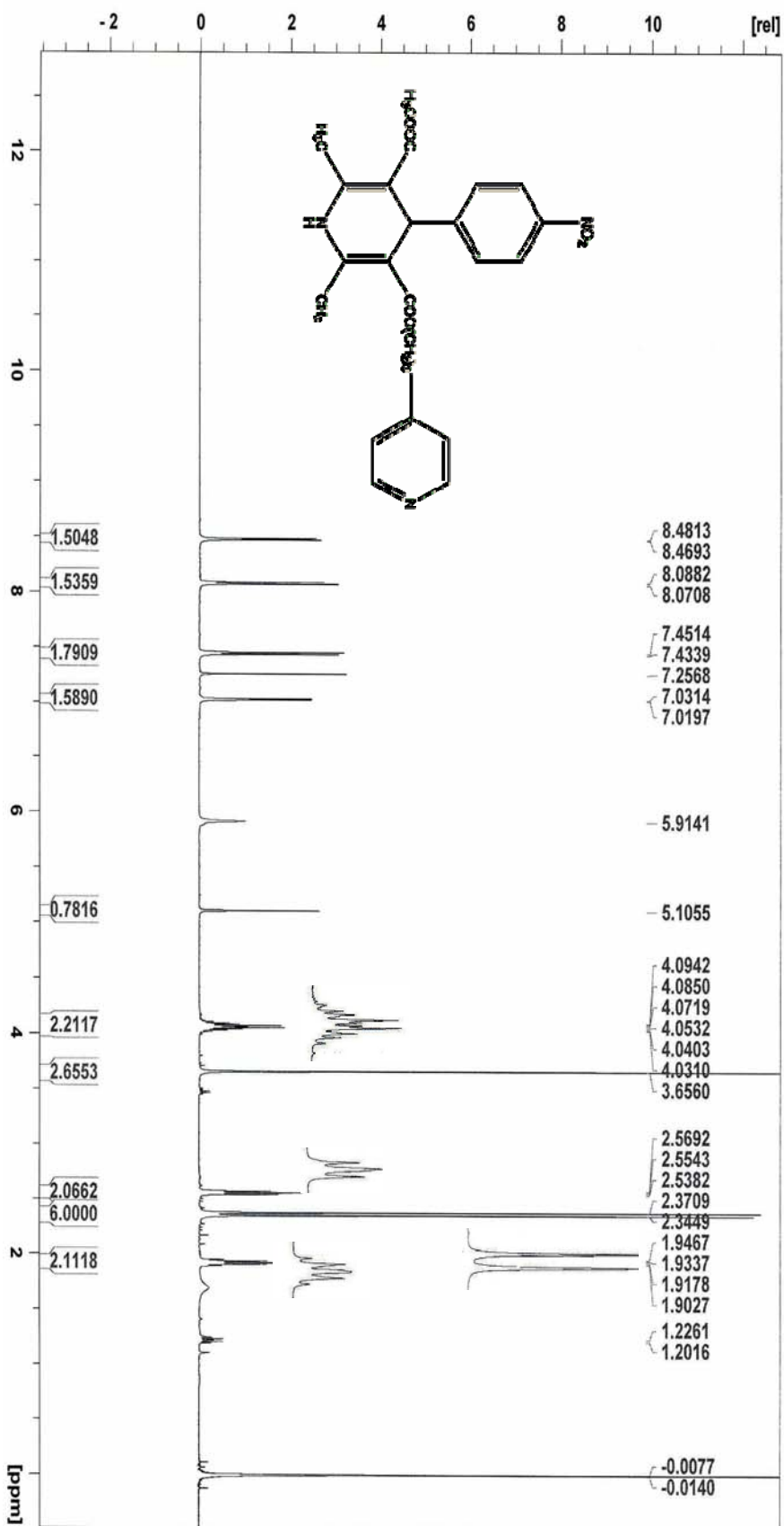
طیف ۳-۲- طیف جرمی مربوط به ۳- متیل- ۵- (پیریدین-۲- ایل) پروپیل- ۲- دی میتیل- ۴- (۱- متیل- ۵- نیترو- ۱- ایمیدازول-۲- ایل)-
 او-۴ دی هیدروپیریدین-۳- ایل-۵- دی کربوکسیلات (7k)



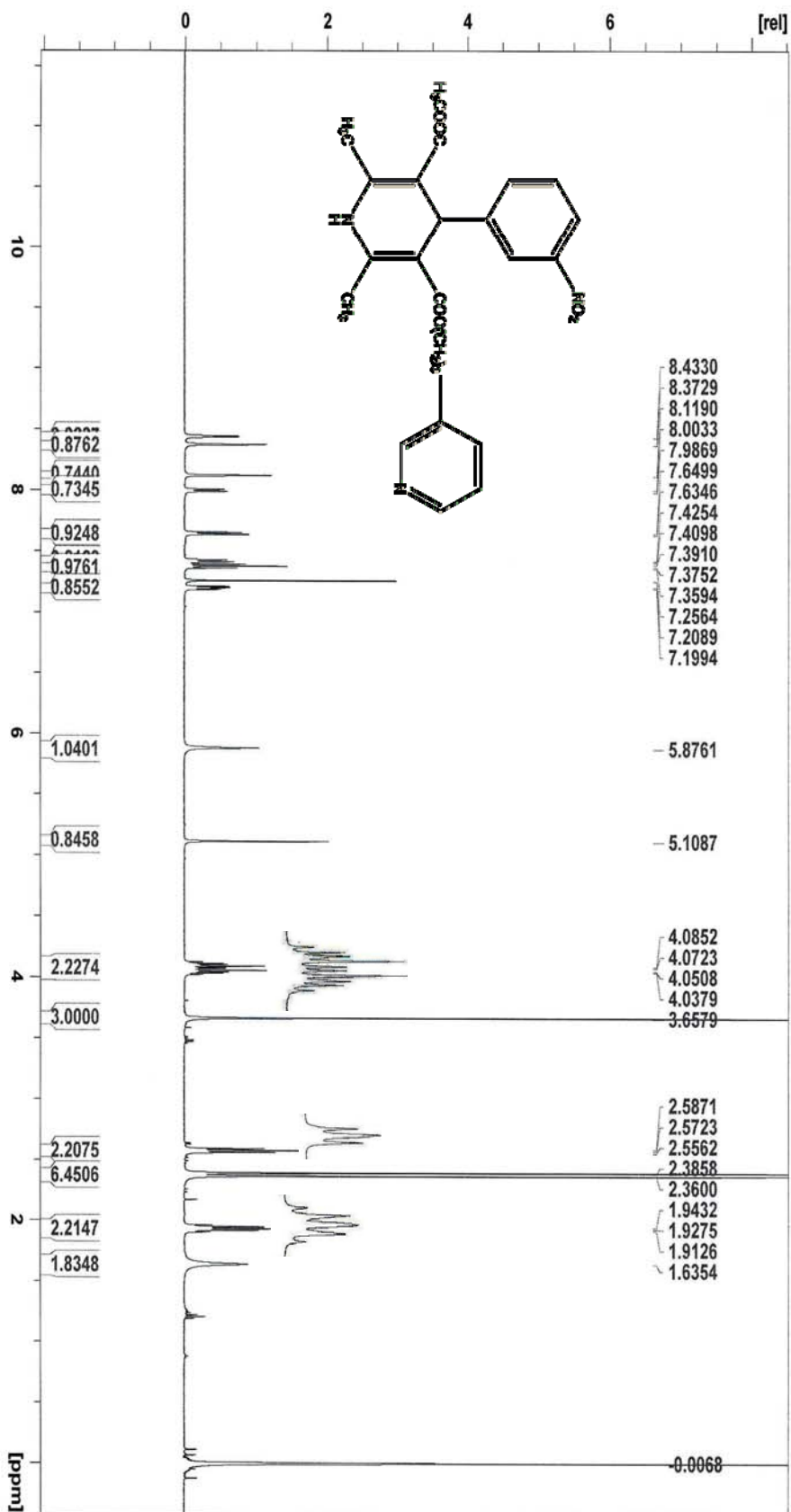
طیف ۳-۳- طیف جرمی مربوط به ۳- اتیل-۵- (۳- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل)-۶- دی متیل-۴- (۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲- ایل)-۴- دی هیدروپیریدین-۳- ایل-۵- دی کربوکسیلات (71)



طیف ۳-۳- طیف جرمی مربوط به ۳- متیل- ۵- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل)- ۲-او ۶- دی میتیل- ۴- (۱- میتیل- ۵- نیترو- ۱- ایمیدازول-۲- ایل)-
 ۱-او ۴- دی هیدروپیریدین-۳-او ۵- دی کربوکسیلات (7m)

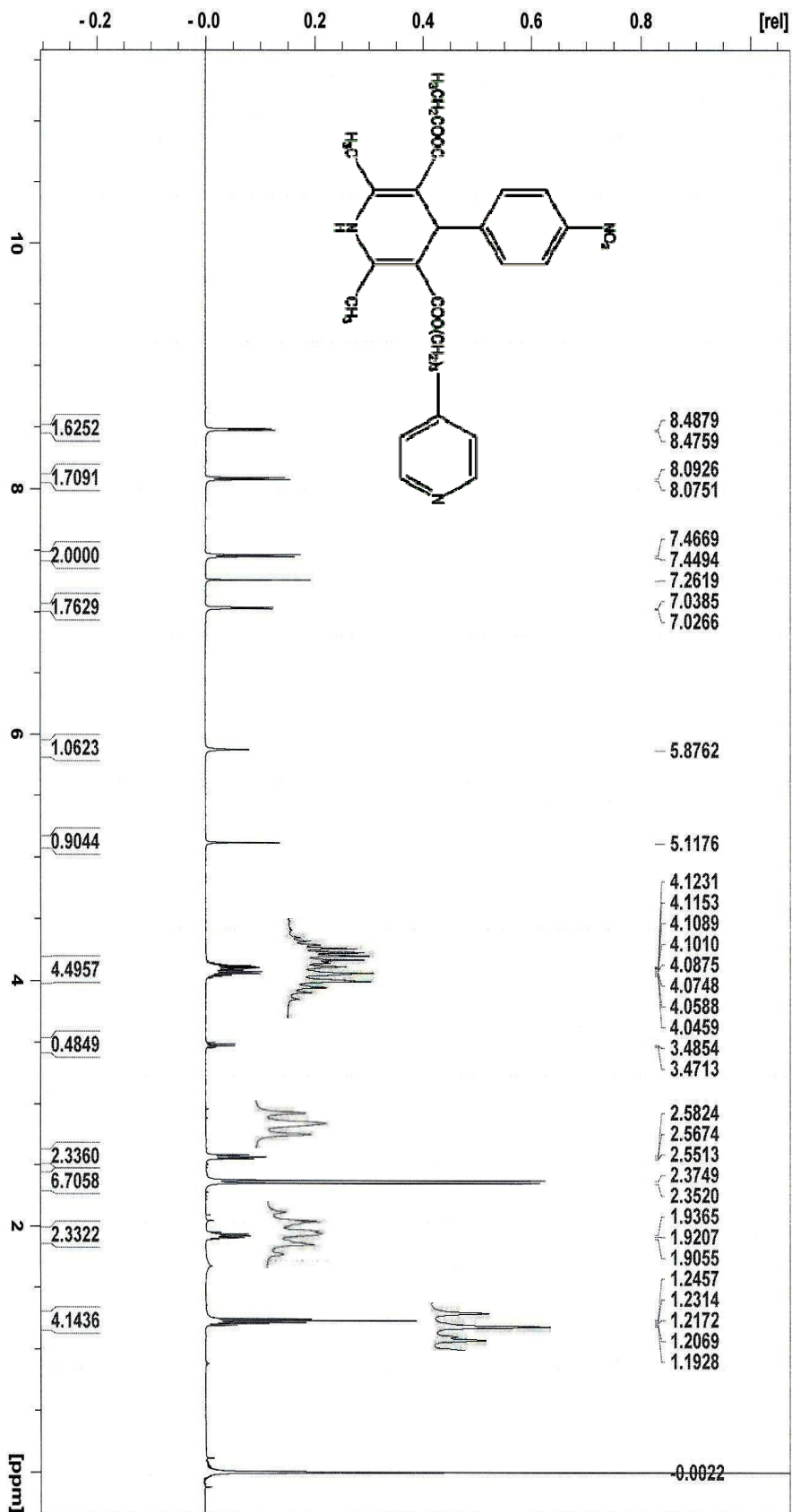


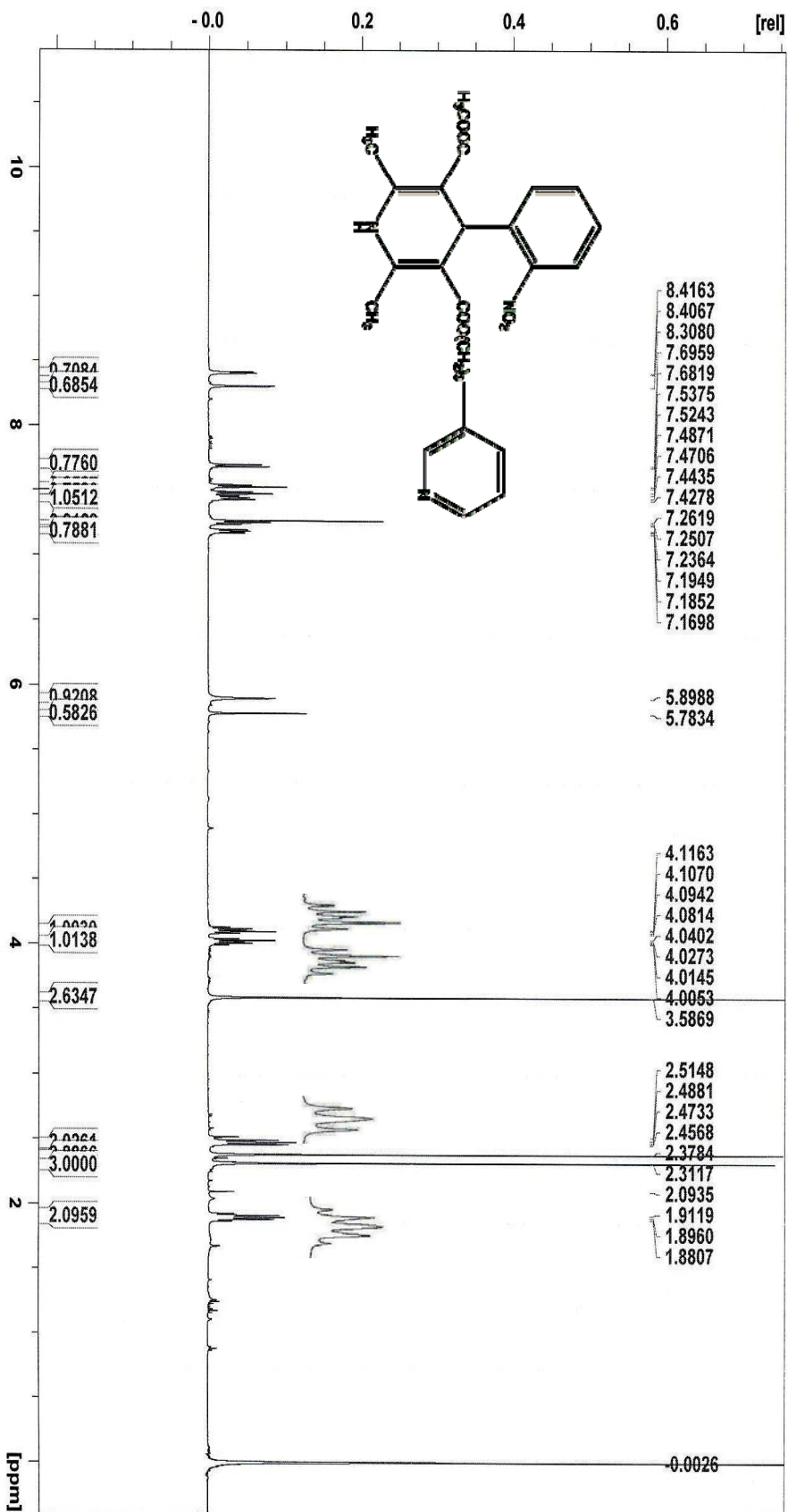
طیف ۳-۳-دی-کربوکسیلات (7a) ¹H-NMR مربوط به ۳-متیل-۵- (پیریدین-۴-یل) پروپیل-۲-دی-متیل-۴- (۴-نیتروفیل)-۱-دی-هیدروپیریدین-۳-دی-کربوکسیلات (7a)



طیف ۳-۲۱۷-¹H-NMR طیف کربوکسیلات (7b) دی هیدروپیریدین-
 ۳-متیل-۴-نیترو فیل- (او۴)-دی هیدروپیریدین-
 ۳-پیریدین-۳-یل (پروپیل)- (او۲)-دی متیل-۴-۳-نیترو فیل- (او۴)-دی هیدروپیریدین-
 ۳-مربوط به ۳-متیل-۵-۳-پیریدین-۳-یل (پروپیل)- (او۲)-دی متیل-۴-۳-نیترو فیل- (او۴)-دی هیدروپیریدین-
 ۳-۵-دی کربوکسیلات (7b)

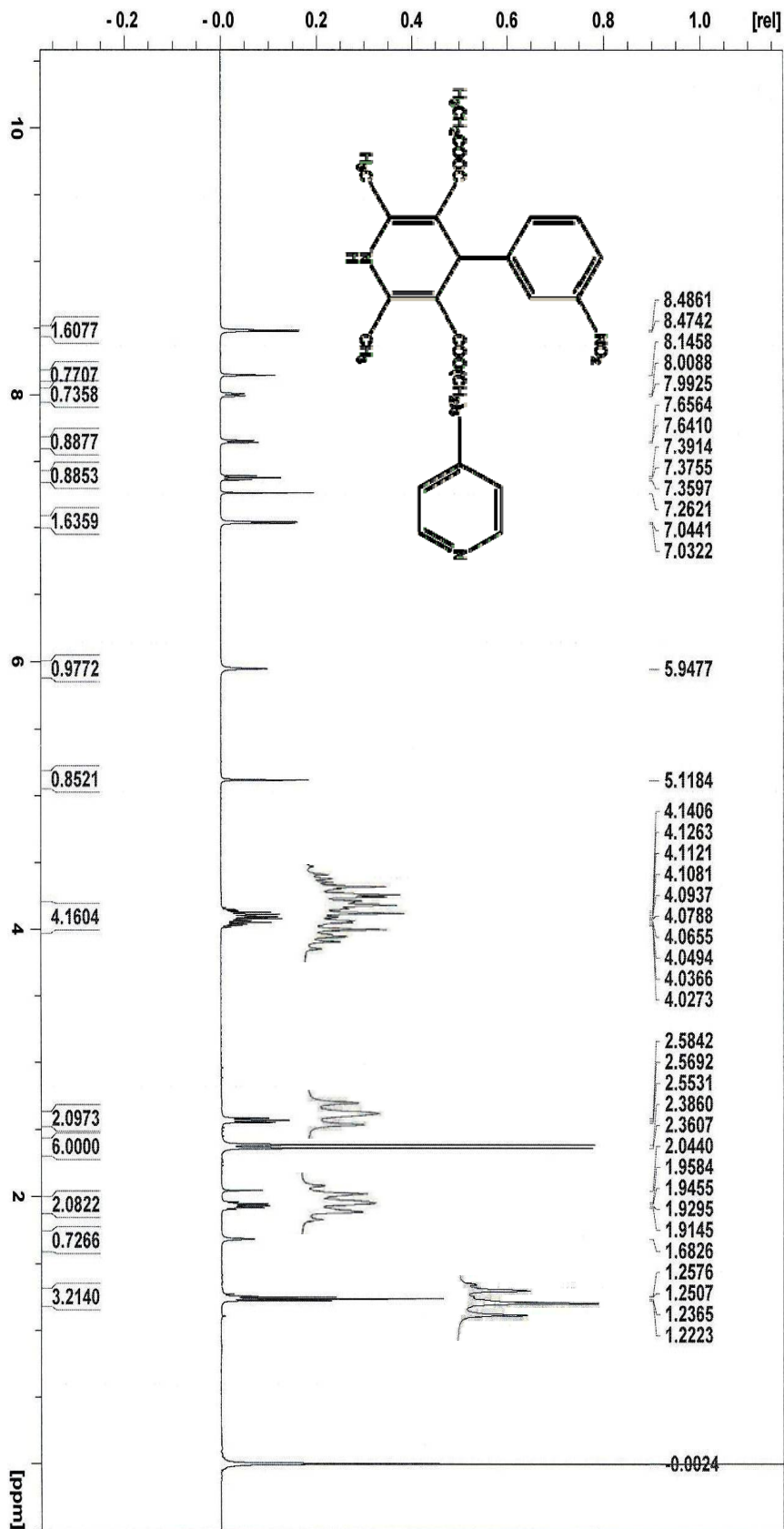
طیف ۳-۲۸-¹H-NMR مربوط به ۳- اتیل-۵- (۳- (بیریدین-۴- ایل) پروپیل)-۲- دی میتیل-۴- (۴- نیترو فیل)- (۱-۴)- دی هیدرو پیریدین-۵-۳ دی کربوکسیلات (7c)

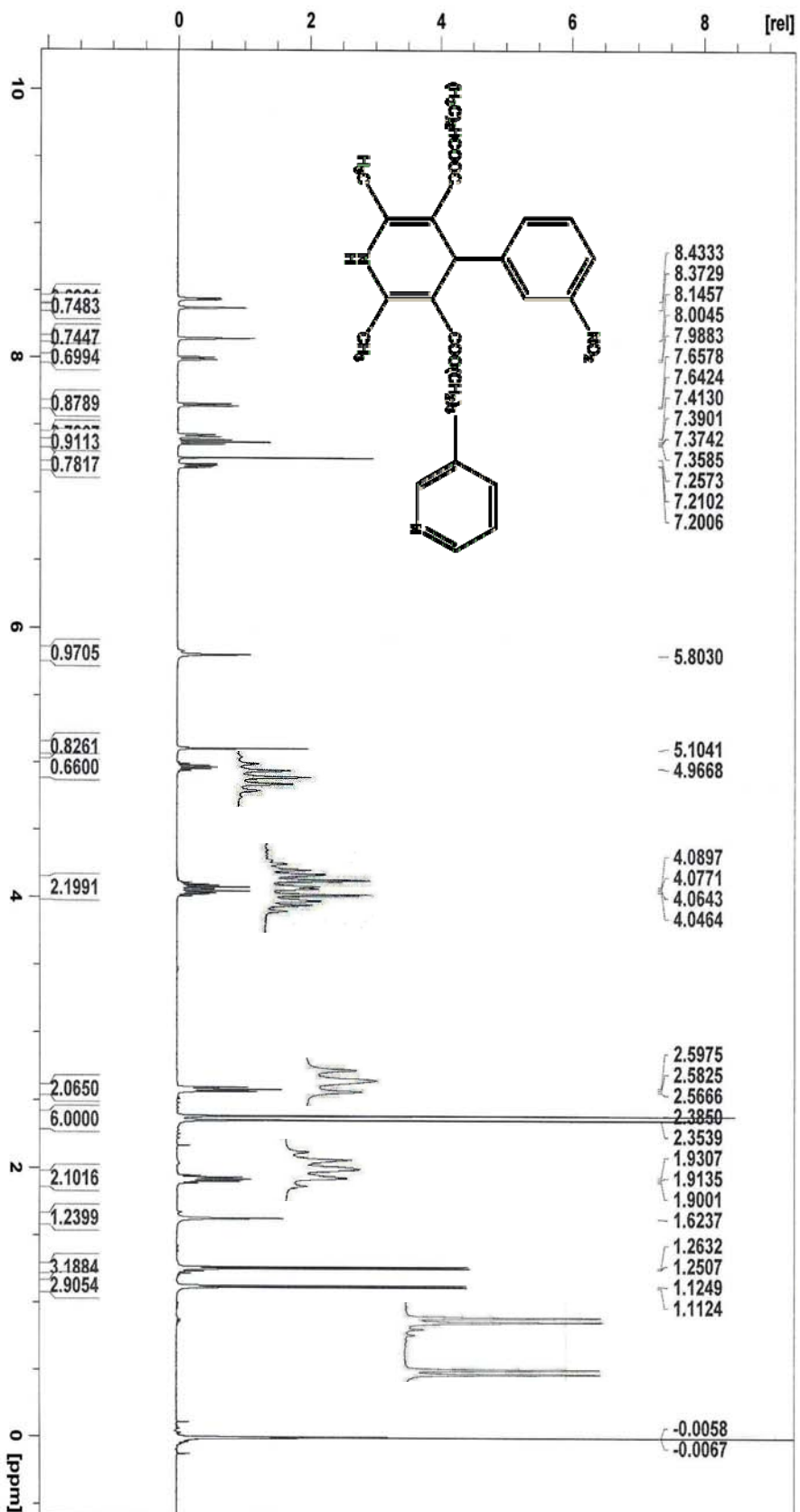




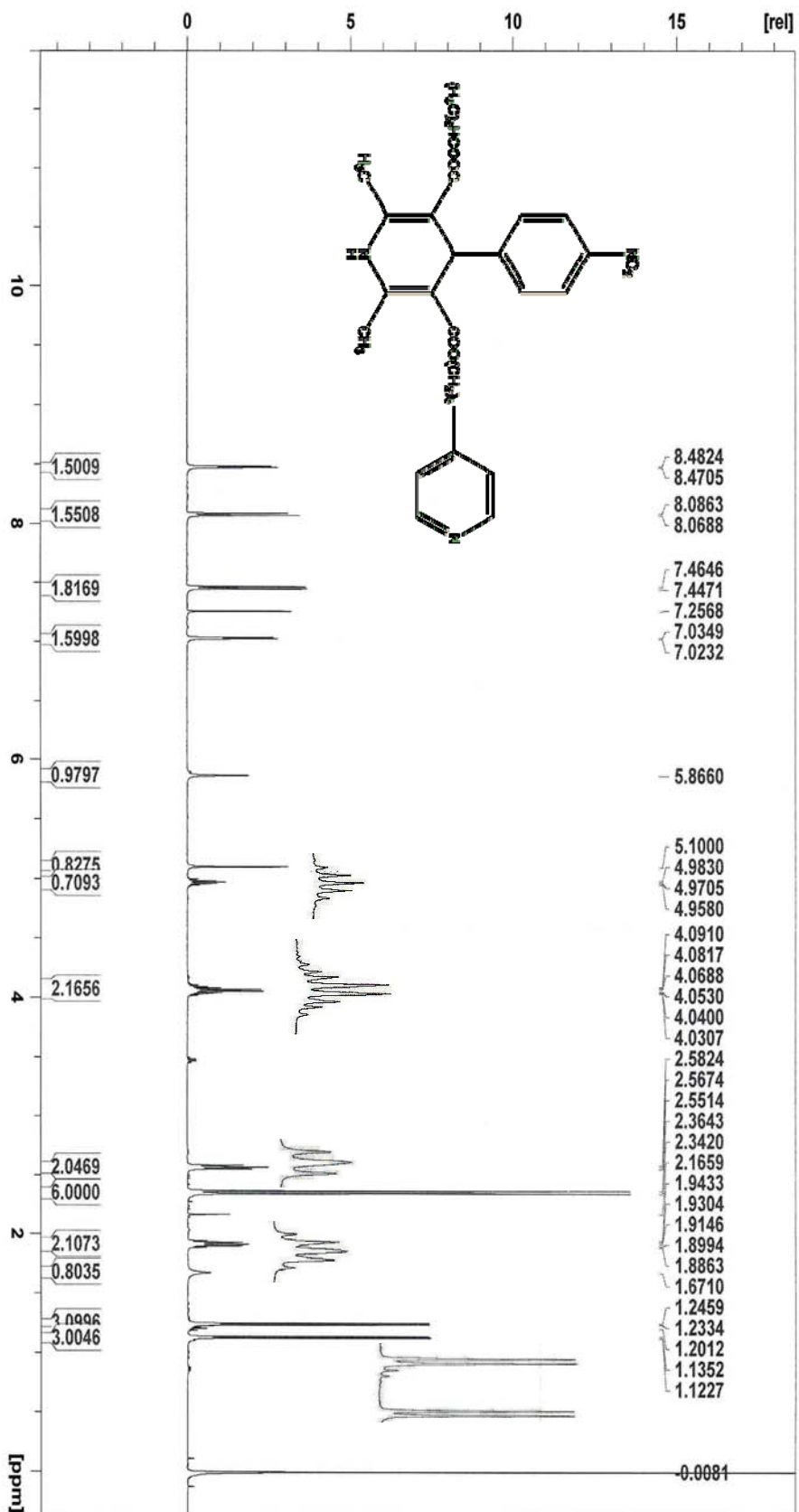
طیف ۳-۲۹-¹H-NMR مربوط به ۳-متیل-۵-(پیریدین-۳-یل)پروپیل-۴-متیل-۲-نیتروفیل-۱-اوی-۴-دی هیدروپیریدین-۵-۳ دی کربوکسیلات (7d)

طیف ¹H-NMR مربوط به ۳-اتیل-۵- (پیریدین-۴-یل) پروپیل)-۲-متیل-۴- (۳-نیترو فنیل)- (او-۴) دی هیدرو پیریدین-۳-دی کربوکسیلات (7e)

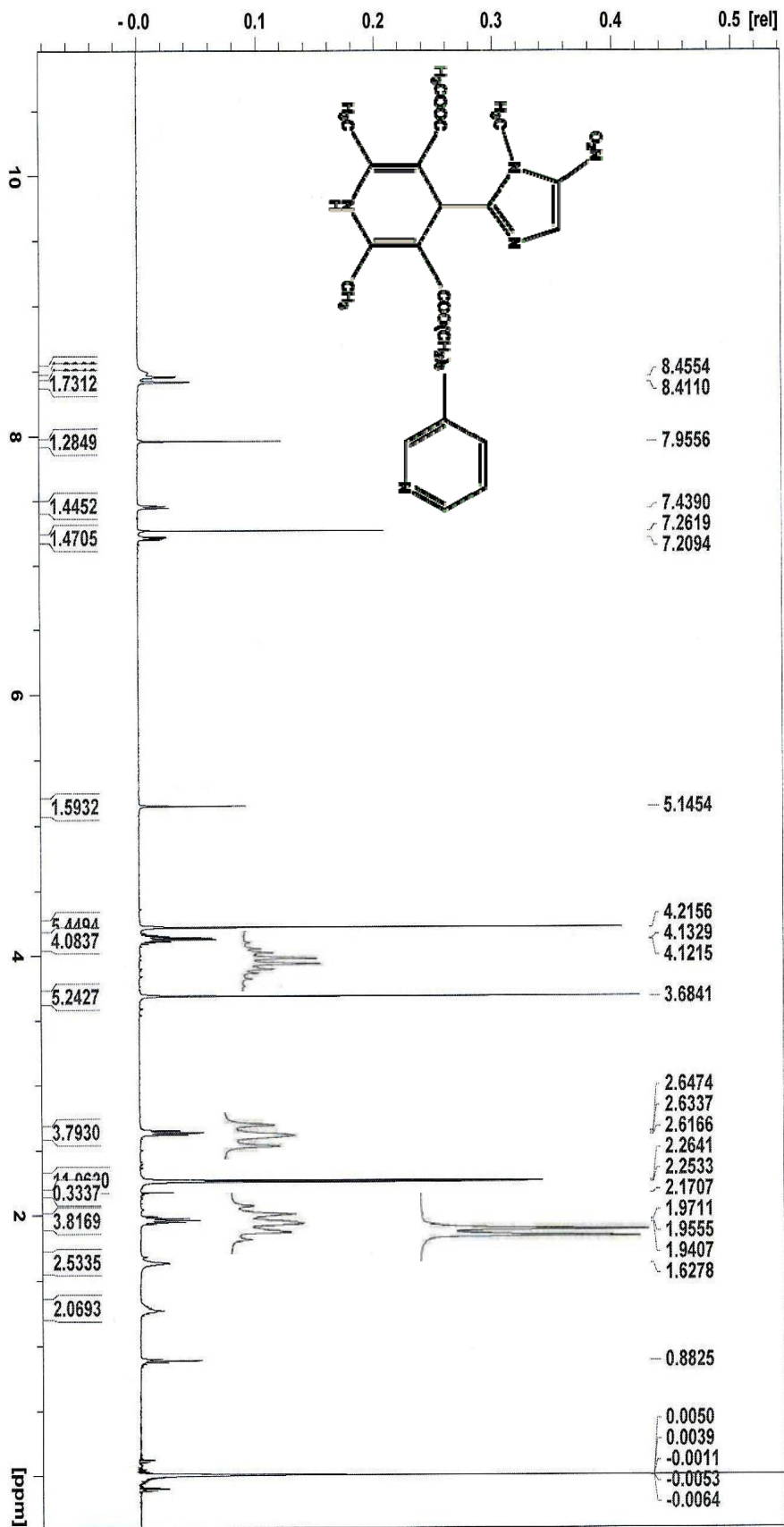




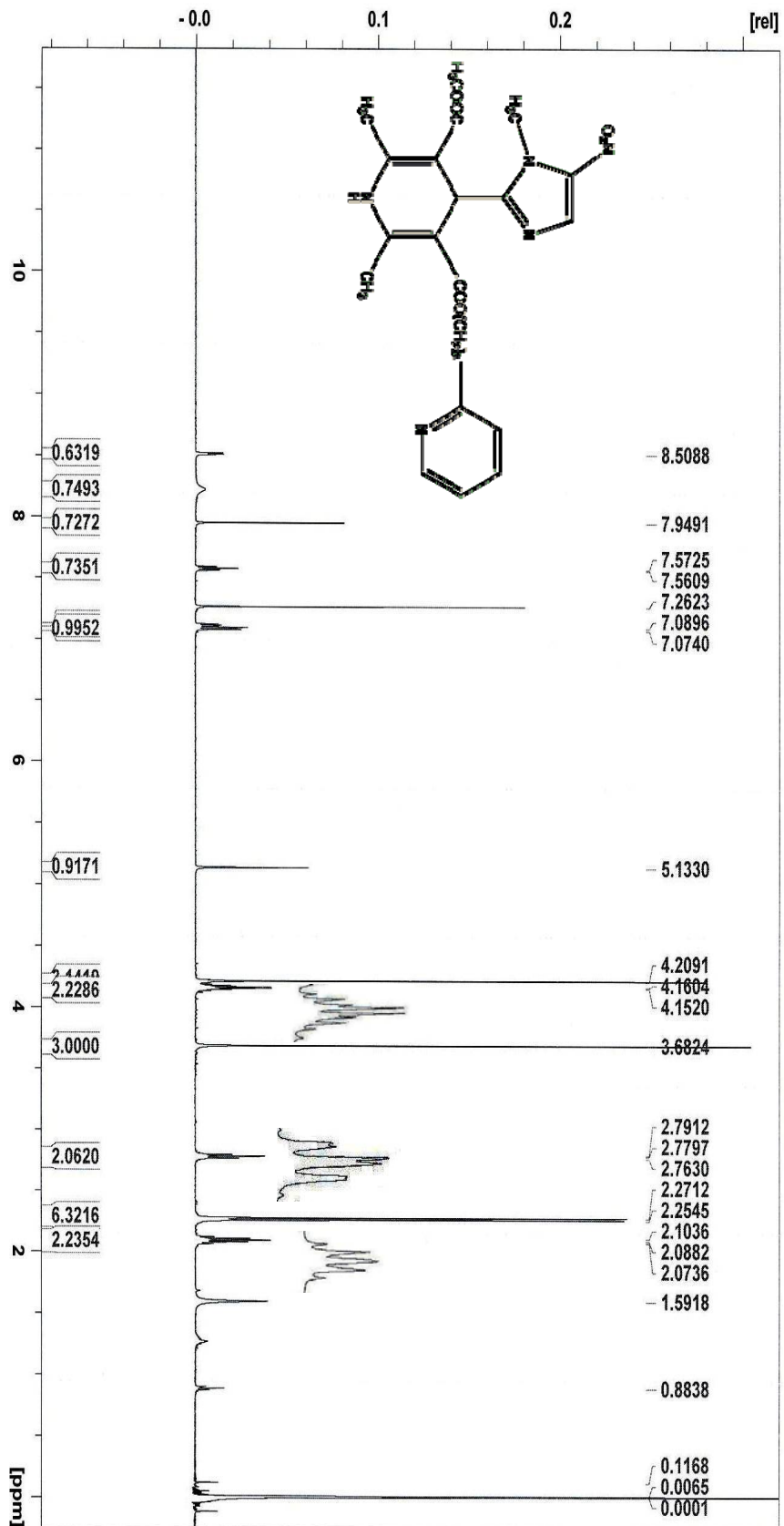
طیف ¹H-NMR مربوط به ۳-ایزوپروپیل-۵-(۳-پیریدین-۳-یل)پروپیل-۴-متیل-۳-نیتروفنیل-(۱-اوی-دی هیدروپیریدین-۳-اوی-دی کربوکسیلات) (7g)



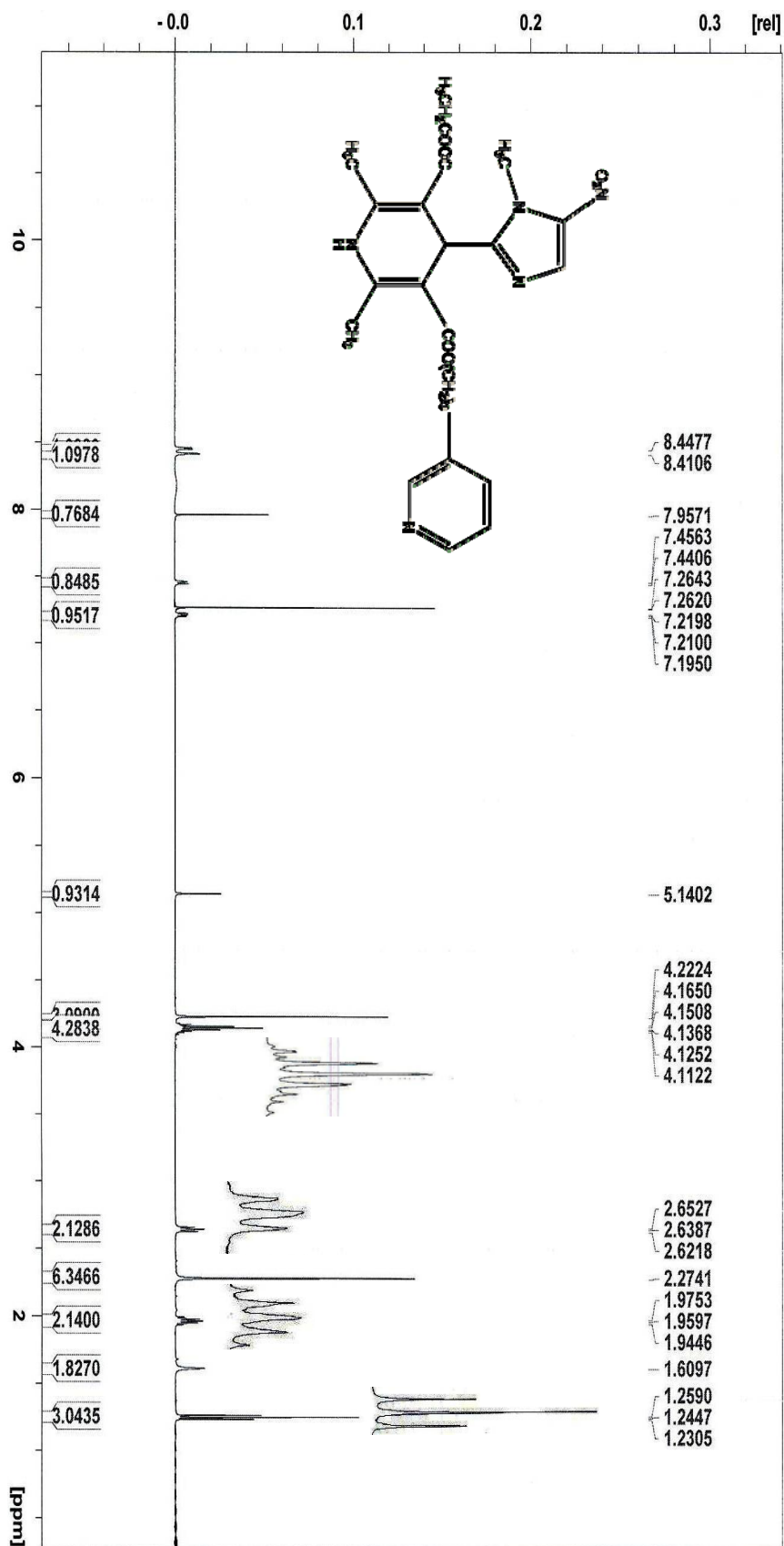
طیف ¹H-NMR مربوط به ۳-ایزوپروپیل-۵-(پیریدین-۴-یل) پروپیل-۲-و-۶-دی متیل-۴-نیترو فیل- (۱۰۴-دی هیدروپیریدین-۳-و-۵-دی کربوکسیلات) (7h)



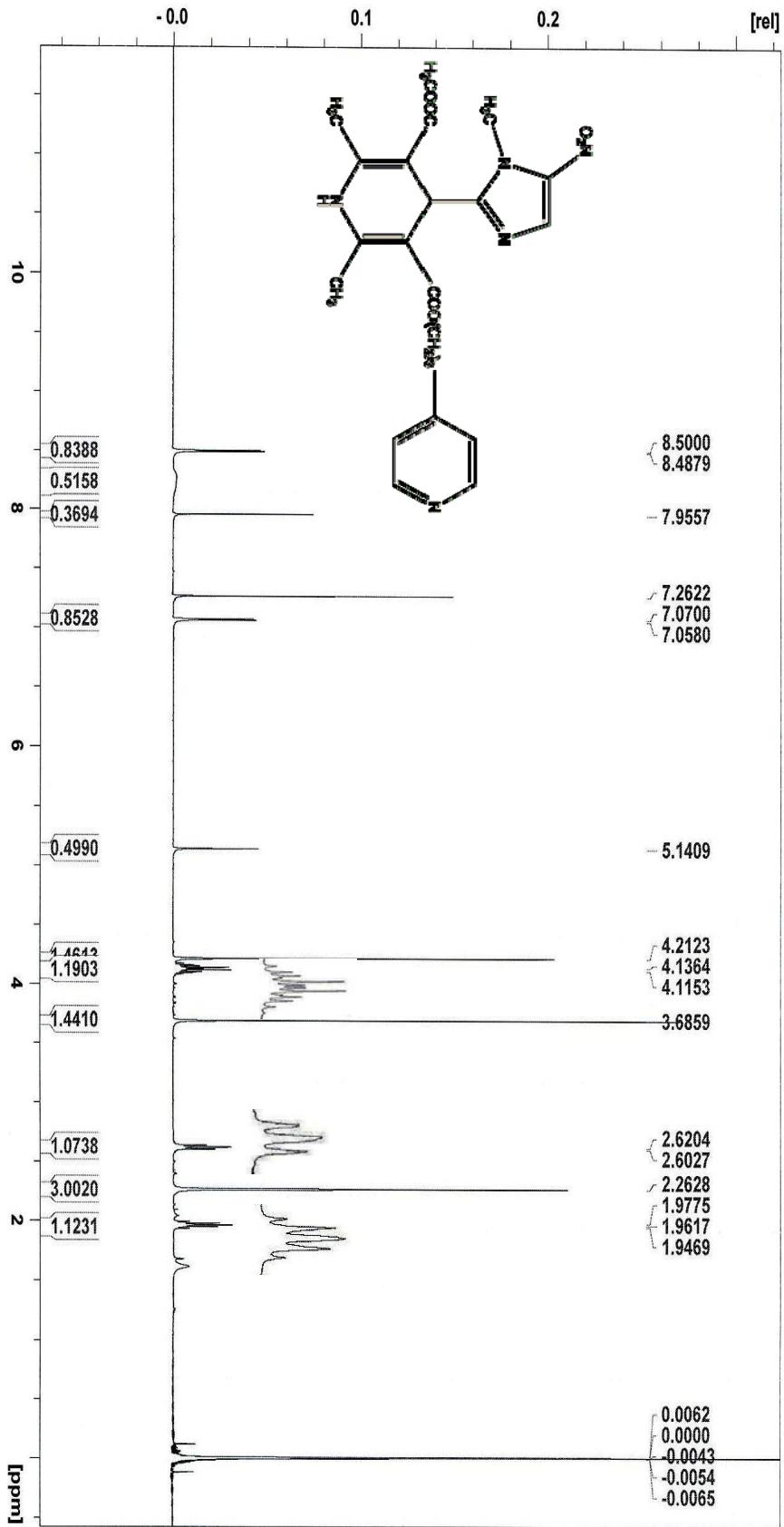
طیف ۳-۴- طیف ¹H-NMR مربوط به ۳- متیل-۵- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل-۲-۶- دی متیل-۴- (۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲- ایل)-۴- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7)



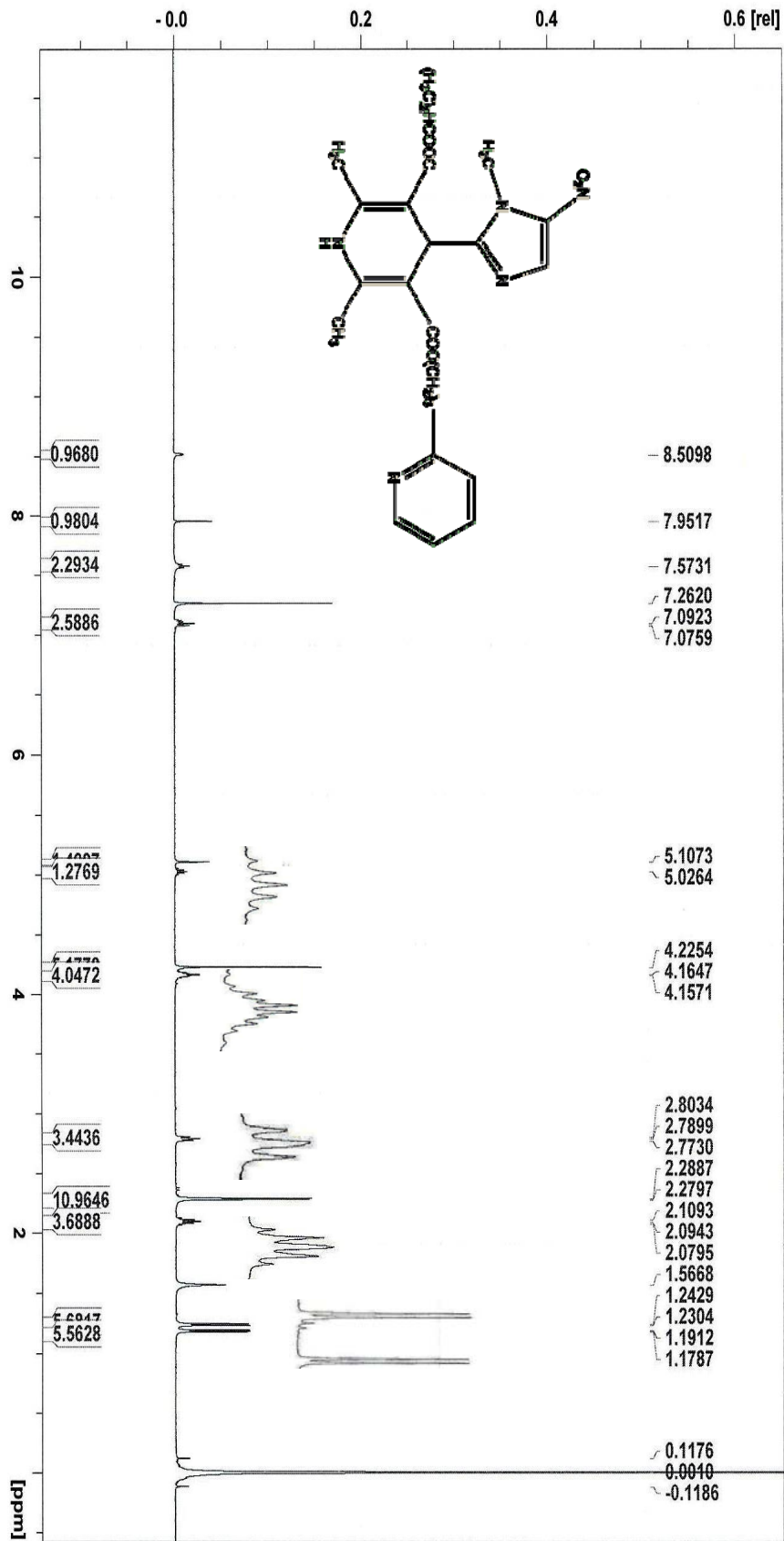
طیف $^1\text{H-NMR}$ طیف ۳-۴- ایل- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7k)
 ایل-۴-۱- ایل- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7k)
 طیف ۳-۴- ایل- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7k)
 ایل-۴-۱- ایل- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7k)
 طیف ۳-۴- ایل- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7k)
 ایل-۴-۱- ایل- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7k)



طیف ۳-۴۷-¹H-NMR مربوط به ۳-اتیل-۵- (پیریدین-۳- ایل) پروپیل (۲-دی متیل-۴- (۱-متیل-۵-نیترو-۱-ایمیدازول-۲- ایل)-
 او-۴-دی هیدروپیریدین-۳-دی-۵-دی کربوکسیلات (71)



طیف ۳-۴- طیف ¹H-NMR مربوط به ۳- متیل -۵- (پیریدین-۴- ایل) پروپیل (۲-و ۶- دی متیل -۱) -۴- متیل -۵- پیترو-۱- ایمیدازول-۲- ایل) -۱-۴- دی هیدروپیریدین-۳-و ۵- دی کربوکسیلات (7m)



طیف ۳-۴۹- طیف ¹H-NMR مربوط به ۳- ایزوپروپیل-۵- (۳- (پیریدین-۲- ایل) پروپیل)-۲-۶- دی متیل-۴- (۱- متیل-۵- نیترو-۱- ایمیدازول-۲- ایل)-۱-۴۱- دی هیدروپیریدین-۳-۵- دی کربوکسیلات (7n)

۳-۲- نتایج حاصل از آزمون سمیت سلولی

اثرات سمیت سلولی مشتقات دی هیدروپیریدینی سنتز شده بر روی ۴ رده سلول شامل Hela، Raji، LS-180 و MCF-7 آزمایش شد.

در این آزمون، با تهیه استوک از ترکیبات مورد نظر و ساخت غلظت های مختلف ۱، ۵، ۲۵ و ۱۰۰ میکرو مولار از آن ها و سپس با تهیه غلظت های مختلف دوکسوروبیسین به عنوان شاهد مثبت، اثر سمیت این ترکیبات بر روی سلول ها ارزیابی شد.

درصد میانگین مهار رشد سلول ها توسط ترکیبات مذکور با استفاده از فرمول زیر بدست آمد. درصد های مهار رشد و همچنین IC_{50} آن ها در جداول زیر آورده شده است.

$$\text{درصد مهار رشد} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

| میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) | غلظت (μM) | ترکیب | رده سلولی |
|---|------------------------|-------|-----------|
| ۸/۹ \pm ۱۶/۰ | ۱ | 7a | Hela |
| ۵/۷ \pm ۹/۹ | ۵ | | |
| ۷۶/۶ \pm ۱۰/۶ | ۲۵ | | |
| ۹۸/۸ \pm ۱/۶ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7b | |
| ۲۰/۶ \pm ۱۸/۸ | ۵ | | |
| ۴۱/۹ \pm ۱۳/۲ | ۲۵ | | |
| ۱۰۰/۴ \pm ۰/۷ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7c | |
| ۰/۸ \pm ۱/۶ | ۵ | | |
| ۴۳/۹ \pm ۱۳/۱ | ۲۵ | | |
| ۹۱/۲ \pm ۱۰/۲ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7d | |
| ۴/۸ \pm ۶/۸ | ۵ | | |
| ۴۸/۰ \pm ۱۵/۳ | ۲۵ | | |
| ۹۱/۴ \pm ۱۰/۶ | ۱۰۰ | | |
| ۶/۵ \pm ۲/۲ | ۱ | 7e | |
| ۶/۸ \pm ۱۰/۶ | ۵ | | |
| ۴۹/۱ \pm ۷/۸ | ۲۵ | | |
| ۷۱/۵ \pm ۸/۵ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7f | |
| ۱۵/۳ \pm ۱۴/۸ | ۵ | | |
| ۸۵/۷ \pm ۱۲/۳ | ۲۵ | | |
| ۹۹/۴ \pm ۱/۳ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7g | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۶۷/۴ \pm ۱۶/۵ | ۲۵ | | |
| ۹۸/۵ \pm ۲/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۴/۷ \pm ۱/۴ | ۱ | 7h | |
| ۲۰/۸ \pm ۶/۹ | ۵ | | |
| ۶۳/۳ \pm ۵/۴ | ۲۵ | | |
| ۱۰۰/۲ \pm ۰/۳ | ۱۰۰ | | |

جدول ۳-۲: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی Hela

| میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) | غلظت (μM) | ترکیب | رده سلولی |
|---|------------------------|------------------------------|-----------|
| ۱۰/۰ \pm ۶/۸ | ۱ | 7i | Hela |
| ۱۴/۹ \pm ۲۵/۳ | ۵ | | |
| ۵۳/۰ \pm ۸/۶ | ۲۵ | | |
| ۹۹/۱ \pm ۱/۸ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7j | |
| ۸/۷ \pm ۴/۸ | ۵ | | |
| ۳۱/۰ \pm ۱۴/۰ | ۲۵ | | |
| ۷۶/۷ \pm ۱۹/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7k | |
| ۱۲/۹ \pm ۱۸/۳ | ۵ | | |
| ۲۰/۲ \pm ۱۳/۷ | ۲۵ | | |
| ۵۳/۹ \pm ۲۰/۹ | ۱۰۰ | | |
| ۱۲/۱ \pm ۱۱/۱ | ۱ | 7l | |
| ۲۴/۴ \pm ۱/۸ | ۵ | | |
| ۲۲/۶ \pm ۸/۷ | ۲۵ | | |
| ۴۹/۷ \pm ۱۴/۸ | ۱۰۰ | | |
| ۱۸/۷ \pm ۱۱/۳ | ۱ | 7m | |
| ۲۴/۷ \pm ۷/۴ | ۵ | | |
| ۱۸/۷ \pm ۱۳/۹ | ۲۵ | | |
| ۵۸/۹ \pm ۱۵/۲ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7n | |
| ۴/۷ \pm ۵/۵ | ۵ | | |
| ۳۲/۲ \pm ۲۱/۷ | ۲۵ | | |
| ۴۷/۴ \pm ۹/۲ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۰/۰۱ | دوکسوروبیسین (کنترل مثبت) | |
| ۲۰/۶ \pm ۱۶/۰ | ۰/۰۵ | | |
| ۳۴/۶ \pm ۹/۵ | ۰/۲۵ | | |

ادامه جدول ۳-۲: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی Hela

| میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) | غلظت (μM) | ترکیب | رده سلولی |
|---|------------------------|-------|-----------|
| ۰/۰ | ۱ | 7a | MCF-7 |
| ۴/۹ \pm ۵/۷ | ۵ | | |
| ۴۴/۷ \pm ۸/۰ | ۲۵ | | |
| ۹۴/۲ \pm ۳/۵ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7b | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۲۹/۴ \pm ۶/۴ | ۲۵ | | |
| ۹۸/۹ \pm ۱/۹ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7c | |
| ۲۶/۸ \pm ۲/۲ | ۵ | | |
| ۵۴/۲ \pm ۱۶/۷ | ۲۵ | | |
| ۹۴/۲ \pm ۱۰/۵ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7d | |
| ۲۶/۵ \pm ۱۶/۷ | ۵ | | |
| ۴۵/۲ \pm ۷/۹ | ۲۵ | | |
| ۸۷/۰ \pm ۱۵/۰ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7e | |
| ۱/۴ \pm ۲/۸ | ۵ | | |
| ۴۰/۷ \pm ۱۱/۲ | ۲۵ | | |
| ۶۷/۰ \pm ۱۱/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7f | |
| ۷/۸ \pm ۹/۰ | ۵ | | |
| ۴۱/۲ \pm ۱۸/۵ | ۲۵ | | |
| ۹۸/۴ \pm ۳/۲ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7g | |
| ۲۱/۹ \pm ۱۶/۴ | ۵ | | |
| ۵۶/۶ \pm ۹/۱ | ۲۵ | | |
| ۹۴/۹ \pm ۷/۹ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7h | |
| ۸/۳ \pm ۶/۶ | ۵ | | |
| ۶۳/۸ \pm ۵/۸ | ۲۵ | | |
| ۹۵/۴ \pm ۵/۴ | ۱۰۰ | | |

جدول ۳-۳: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی MCF-7

| میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) | غلظت (μM) | ترکیب | رده سلولی |
|---|------------------------|------------------------------|--------------|
| ۱۸/۸ \pm ۱۱/۸ | ۱ | 7i | MCF-7 |
| ۲۵/۶ \pm ۱/۰ | ۵ | | |
| ۵۷/۷ \pm ۸/۸ | ۲۵ | | |
| ۹۰/۳ \pm ۱۱/۹ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7j | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۱۲/۵ \pm ۶/۹ | ۲۵ | | |
| ۳۶/۸ \pm ۱۱/۲ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7k | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۵/۵ \pm ۶/۰ | ۲۵ | | |
| ۳۰/۱ \pm ۱۲/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7l | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۱۷/۸ \pm ۹/۹ | ۲۵ | | |
| ۳۴/۴ \pm ۱۰/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7m | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۱۲/۷ \pm ۳/۸ | ۲۵ | | |
| ۳۳/۴ \pm ۱۲/۳ | ۱۰۰ | | |
| ۲۶/۶ \pm ۹/۴ | ۱ | 7n | |
| ۲۲/۹ \pm ۱۴/۶ | ۵ | | |
| ۳۱/۲ \pm ۹/۰ | ۲۵ | | |
| ۵۵/۳ \pm ۸/۳ | ۱۰۰ | | |
| ۱۰/۳ \pm ۱۹/۸ | ۰/۰۱ | دوکسوروبیسین (کنترل مثبت) | |
| ۲۶/۰ \pm ۱۴/۳ | ۰/۰۵ | | |
| ۴۹/۸ \pm ۱۶/۸ | ۰/۲۵ | | |

ادامه جدول ۳-۳: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی MCF-7

| میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) | غلظت (μM) | ترکیب | رده سلولی |
|---|------------------------|-------|-----------|
| ۰/۰ | ۱ | 7a | LS-180 |
| ۴/۱ \pm ۳/۷ | ۵ | | |
| ۳۵/۷ \pm ۱۳/۴ | ۲۵ | | |
| ۸۴/۶ \pm ۱۷/۵ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7b | |
| ۱۳/۹ \pm ۱۰/۷ | ۵ | | |
| ۳۱/۸ \pm ۱۱/۱ | ۲۵ | | |
| ۸۳/۲ \pm ۱۲/۸ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7c | |
| ۸/۳ \pm ۱۰/۸ | ۵ | | |
| ۳۱/۵ \pm ۹/۹ | ۲۵ | | |
| ۸۱/۶ \pm ۴/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7d | |
| ۱۱/۳ \pm ۱۱/۳ | ۵ | | |
| ۲۳/۸ \pm ۲۳/۸ | ۲۵ | | |
| ۹۰/۱ \pm ۹۰/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۱۶/۹ \pm ۴/۵ | ۱ | 7e | |
| ۵/۹ \pm ۷/۵ | ۵ | | |
| ۲۳/۶ \pm ۸/۴ | ۲۵ | | |
| ۶۶/۹ \pm ۹/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۱۲/۶ \pm ۳/۲ | ۱ | 7f | |
| ۱۲/۷ \pm ۹/۳ | ۵ | | |
| ۲۴/۹ \pm ۱۷/۷ | ۲۵ | | |
| ۹۰/۲ \pm ۷/۰ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7g | |
| ۱۳/۸ \pm ۶/۴ | ۵ | | |
| ۲۹/۵ \pm ۱۵/۷ | ۲۵ | | |
| ۹۳/۴ \pm ۶/۳ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7h | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۵۱/۳ \pm ۱۴/۷ | ۲۵ | | |
| ۶۲/۴ \pm ۱۳/۹ | ۱۰۰ | | |

جدول ۳-۴: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی LS-180

| میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) | غلظت (μM) | ترکیب | رده سلولی |
|---|------------------------|------------------------------|-----------|
| $7/2 \pm 1/6$ | ۱ | 7i | LS-180 |
| $13/3 \pm 7/3$ | ۵ | | |
| $32/5 \pm 17/1$ | ۲۵ | | |
| $77/5 \pm 16/3$ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7j | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| $2/9 \pm 2/9$ | ۲۵ | | |
| $24/4 \pm 8/2$ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7k | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۰/۰ | ۲۵ | | |
| ۰/۰ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7l | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۰/۰ | ۲۵ | | |
| $12/7 \pm 1/4$ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7m | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۰/۰ | ۲۵ | | |
| ۰/۰ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7n | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۰/۰ | ۲۵ | | |
| ۰/۰ | ۱۰۰ | | |
| $17/7 \pm 4/0$ | ۰/۰۱ | دوکسوروبیسین (کنترل مثبت) | |
| $54/7 \pm 3/0$ | ۰/۰۵ | | |
| $68/8 \pm 4/8$ | ۰/۲۵ | | |

ادامه جدول ۳-۴: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n و در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی LS-180

| میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) | غلظت (μM) | ترکیب | رده سلولی |
|---|------------------------|-------|-----------|
| ۰/۰ | ۱ | 7a | Raji |
| ۰/۷ \pm ۱/۲ | ۵ | | |
| ۳۸/۲ \pm ۲۴/۹ | ۲۵ | | |
| ۹۷/۰ \pm ۶/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7b | |
| ۸/۹ \pm ۱۵/۴ | ۵ | | |
| ۵۲/۷ \pm ۱۰/۸ | ۲۵ | | |
| ۹۲/۴ \pm ۱۲/۱ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7c | |
| ۴۵/۶ \pm ۵/۴ | ۵ | | |
| ۷۳/۳ \pm ۵/۳ | ۲۵ | | |
| ۹۵/۵ \pm ۷/۸ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7d | |
| ۳۳/۲ \pm ۲۷/۷ | ۵ | | |
| ۷۰/۱ \pm ۲۹/۶ | ۲۵ | | |
| ۸۹/۷ \pm ۱۴/۲ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7e | |
| ۱۴/۶ \pm ۲۰/۰ | ۵ | | |
| ۳۵/۴ \pm ۱۵/۳ | ۲۵ | | |
| ۸۳/۲ \pm ۴/۰ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7f | |
| ۲۰/۷ \pm ۱۷/۰ | ۵ | | |
| ۳۳/۰ \pm ۱۸/۰ | ۲۵ | | |
| ۹۵/۲ \pm ۴/۹ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7g | |
| ۲۴/۱ \pm ۱۸/۴ | ۵ | | |
| ۴۲/۲ \pm ۱۸/۷ | ۲۵ | | |
| ۹۸/۲ \pm ۳/۶ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7h | |
| ۱۰/۸ \pm ۱۰/۳ | ۵ | | |
| ۴۷/۰ \pm ۷/۸ | ۲۵ | | |
| ۹۸/۱ \pm ۲/۹ | ۱۰۰ | | |

جدول ۳-۵: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی Raji

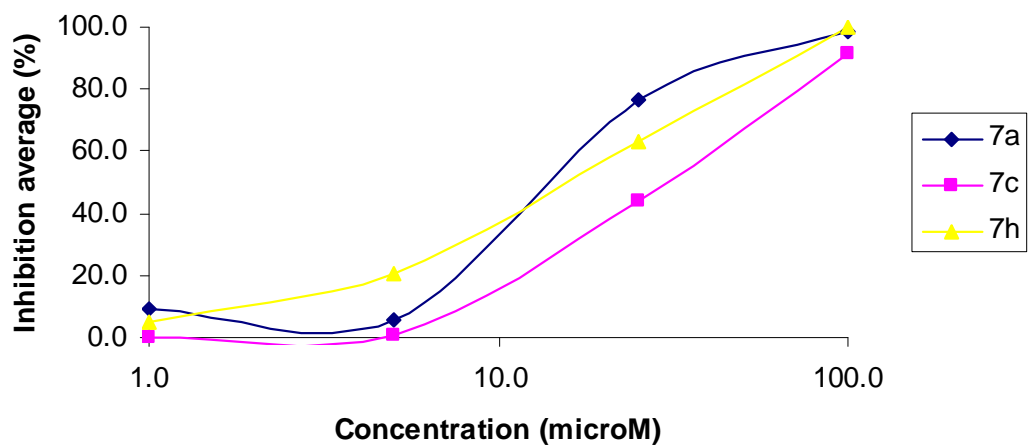
| میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) | غلظت (μM) | ترکیب | رده سلولی |
|--|------------------------|------------------------------|-------------|
| ۰/۰ | ۱ | 7i | Raji |
| ۴۱/۶ \pm ۲۴/۳ | ۵ | | |
| ۴۶/۳ \pm ۳۸/۳ | ۲۵ | | |
| ۹۳/۵ \pm ۱۱/۳ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7j | |
| ۲۴/۷ \pm ۲۳/۳ | ۵ | | |
| ۱۹/۹ \pm ۲۷/۹ | ۲۵ | | |
| ۴۳/۰ \pm ۴۳/۲ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7k | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۰/۰ | ۲۵ | | |
| ۰/۰ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7l | |
| ۲۳/۱ \pm ۱۸/۹ | ۵ | | |
| ۴۰/۷ \pm ۲۸/۰ | ۲۵ | | |
| ۴۳/۴ \pm ۹/۶ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7m | |
| ۰/۰ | ۵ | | |
| ۰/۰ | ۲۵ | | |
| ۰/۰ | ۱۰۰ | | |
| ۰/۰ | ۱ | 7n | |
| ۲۲/۲ \pm ۱۲/۰ | ۵ | | |
| ۳۵/۵ \pm ۲۴/۲ | ۲۵ | | |
| ۴۱/۳ \pm ۱۹/۴ | ۱۰۰ | | |
| ۱۲/۳ \pm ۱۴/۴ | ۰/۰۱ | دوکسوروبیسین (کنترل مثبت) | |
| ۲۸/۲ \pm ۲۰/۸ | ۰/۰۵ | | |
| ۶۲/۵ \pm ۱۷/۹ | ۰/۲۵ | | |

ادامه جدول ۳-۵: میانگین درصد مهار رشد \pm انحراف استاندارد (SD) دوکسوروبیسین و ترکیبات 7a-7n در غلظت های مختلف (۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مولار) بر روی رده سلولی Raji

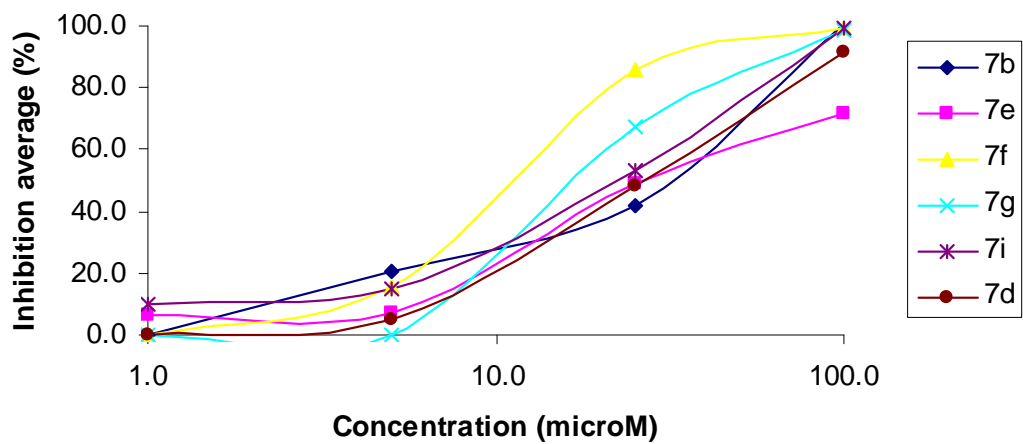
| IC₅₀ ± SD | | | | ترکیب (۱۰۰μM) |
|-----------------------------|---------------|---------------|--------------|----------------------|
| Raji | LS-180 | MCF-7 | Hela | |
| ۲۴/۷ ± ۸/۷ | ۲۶/۹ ± ۱۰/۰ | ۲۴/۳ ± ۲/۹ | ۱۳/۲ ± ۲/۶ | 7a |
| ۱۹/۵ ± ۱۱/۵ | ۴۰/۹ ± ۷/۰ | ۳۷/۵ ± ۳/۴ | ۲۴/۸ ± ۶/۴ | 7b |
| ۶/۴ ± ۲/۱ | ۳۱/۸ ± ۵/۹ | ۱۶/۰ ± ۳/۴ | ۲۷/۲ ± ۲/۴ | 7c |
| ۱۸/۴ ± ۱۳/۸ | ۴۱/۹ ± ۵/۴ | ۳۰/۹ ± ۵/۸ | ۲۶/۵ ± ۸/۵ | 7d |
| ۶۴/۴ ± ۳۴/۴ | ۶۳/۲ ± ۱۴/۱ | ۳۷/۶ ± ۱۰/۲ | ۳۳/۵ ± ۹/۵ | 7e |
| ۱۹/۳ ± ۱۰/۰ | ۳۹/۱ ± ۱۱/۸ | ۲۴/۳ ± ۷/۱ | ۱۴/۸ ± ۶/۶ | 7f |
| ۱۸/۵ ± ۸/۳ | ۲۶/۰ ± ۸/۲ | ۲۰/۳ ± ۵/۵ | ۲۰/۰ ± ۳/۵ | 7g |
| ۲۱/۷ ± ۶/۴ | ۳۸/۴ ± ۹/۲ | ۱۸/۷ ± ۳/۰ | ۱۲/۶ ± ۱/۱ | 7h |
| ۱۷/۸ ± ۱۰/۹ | ۳۹/۱ ± ۱۱/۵ | ۱۸/۱ ± ۵/۰ | ۲۲/۴ ± ۵/۲ | 7i |
| >۱۰۰ | >۱۰۰ | >۱۰۰ | >۱۰۰ | 7j |
| >۱۰۰ | >۱۰۰ | >۱۰۰ | >۱۰۰ | 7k |
| >۱۰۰ | >۱۰۰ | >۱۰۰ | >۱۰۰ | 7l |
| >۱۰۰ | >۱۰۰ | >۱۰۰ | ۶۰/۴ ± ۲۱/۲ | 7m |
| >۱۰۰ | >۱۰۰ | ۸۸/۹ ± ۵۵/۳ | >۱۰۰ | 7n |
| ۰/۱۸۴ ± ۰/۱۸۷ | ۰/۰۶۱ ± ۰/۰۱۱ | ۰/۲۳۷ ± ۰/۱۸۲ | ۱/۵۷۹ ± ۱/۸۵ | دوکسوروبیسین |

جدول ۳-۶: IC₅₀ ± انحراف استاندارد (SD) ترکیبات ۱-۴ دی هیدروپیرییدین و دوکسوروبیسین در ۴ رده سلول با غلظت ۱۰۰μM

C4: 4- nitrophenyl

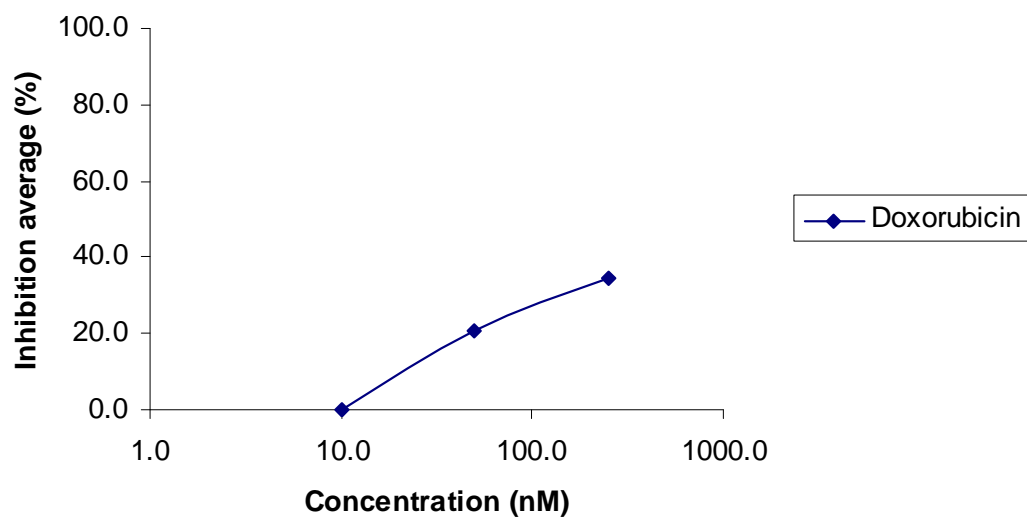
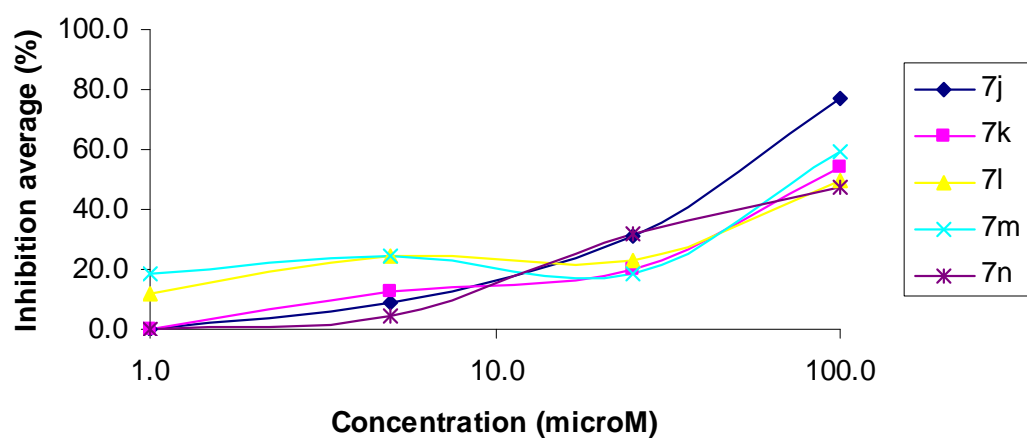


C4: 2 and 3- nitrophenyl



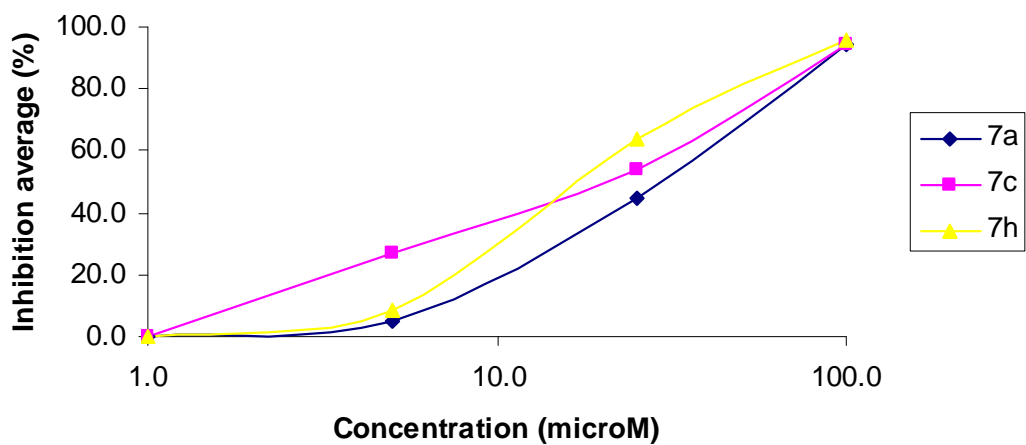
نمودار ۱-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های HeLa بر اثر ترکیبات دی هیدروپیرییدینی سنتز شده و دوکسورویسین

C4: nitroimidazole

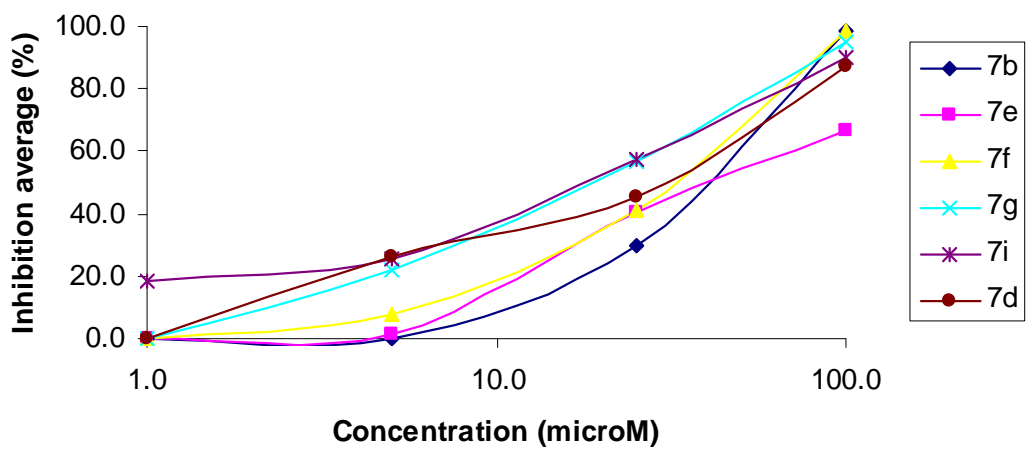


ادامه نمودار ۱-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های Hela بر اثر ترکیبات دی هیدروپیرییدینی سنتز شده و دوکسوروبیسین

C4: 4- nitrophenyl

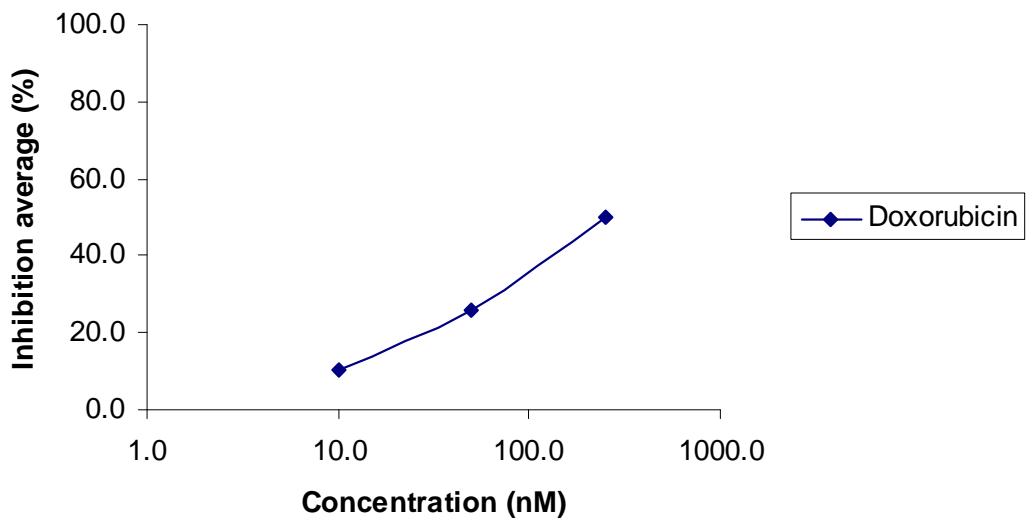
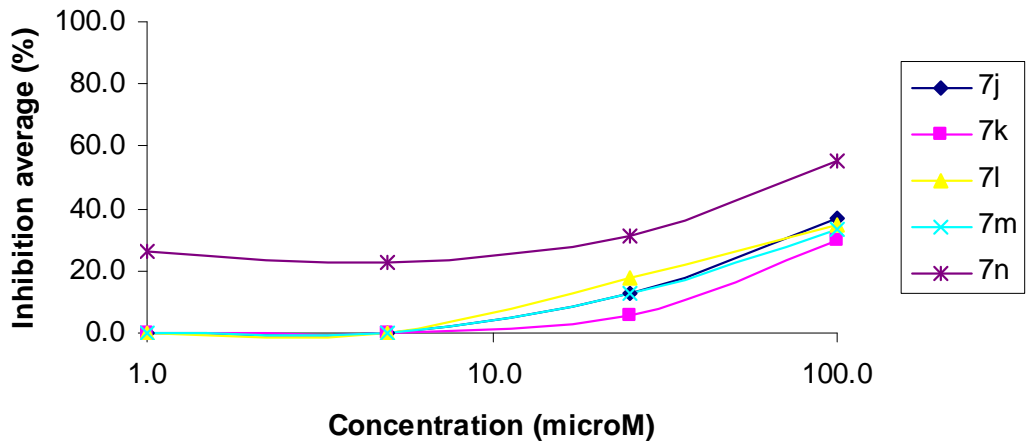


C4: 2 and 3- nitrophenyl



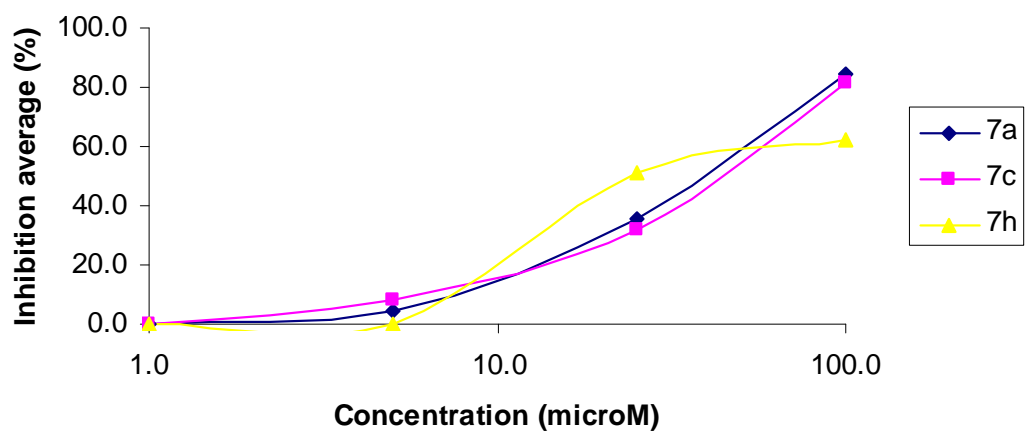
نمودار ۲-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های MCF-7 بر اثر ترکیبات دی هیدروپیرییدینی سنتز شده و دوکسوروبیسین

C4: nitroimidazole

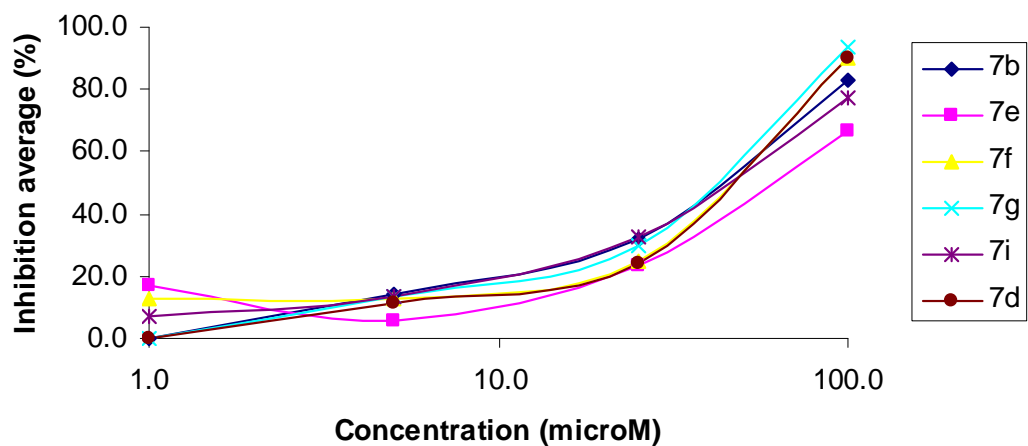


ادامه نمودار ۲-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های MCF-7 بر اثر ترکیبات دی هیدروپیرییدینی سنتز شده و دوکسوروبیسین

C4: 4- nitrophenyl

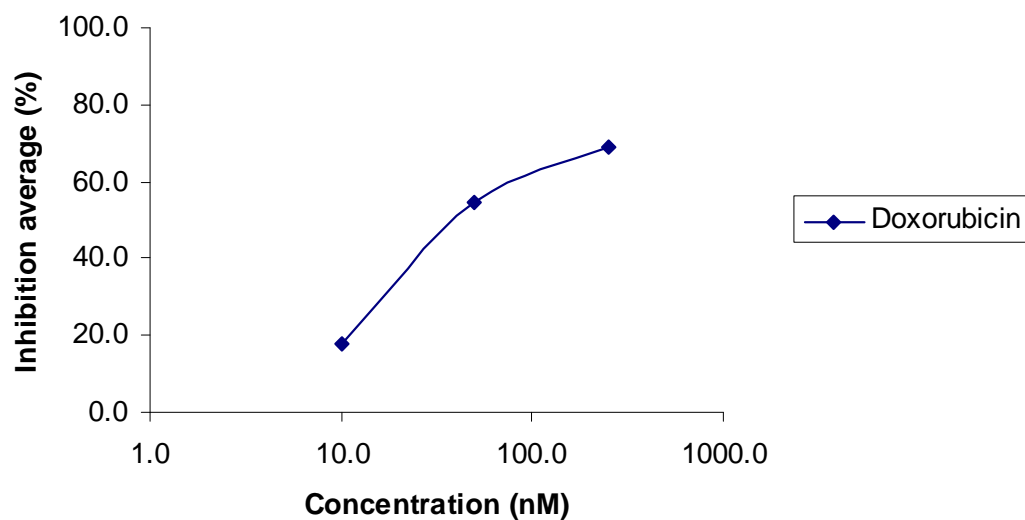
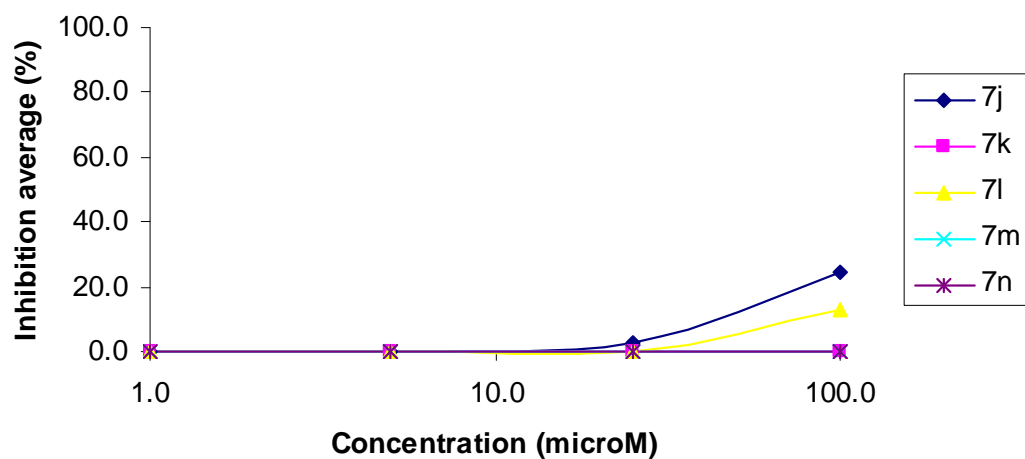


C4: 2 and 3- nitrophenyl



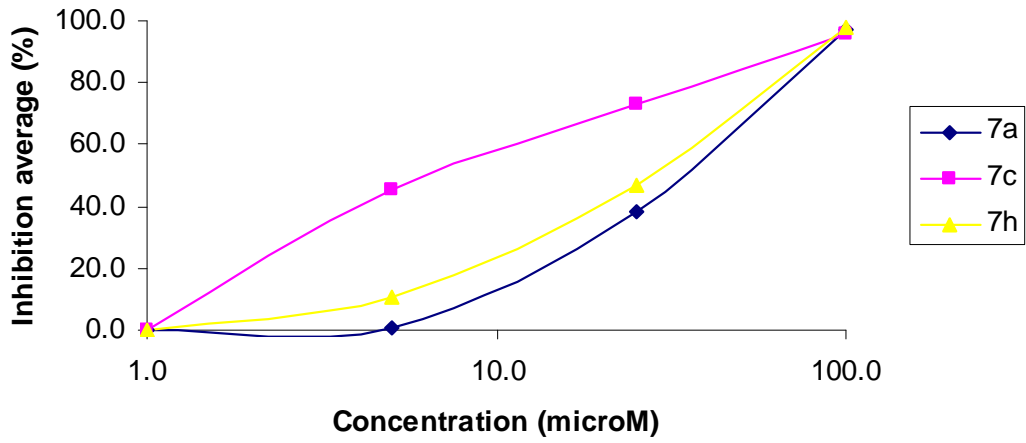
نمودار ۳-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های LS-180 بر اثر ترکیبات دی هیدروپیرییدینی سنتز شده و دوکسورویسین

C4: nitroimidazole

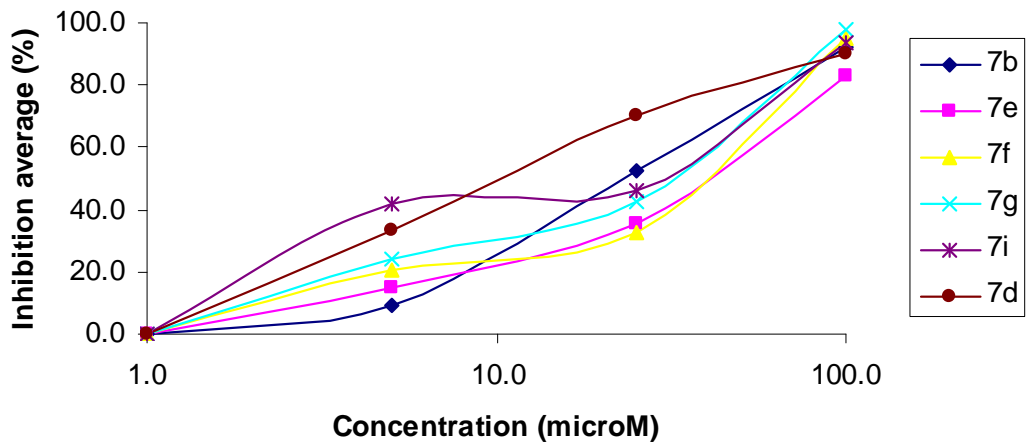


ادامه نمودار ۳-۳: میانگین درصد مهار رشد سلول های LS-180 بر اثر ترکیبات دی هیدروپیرییدینی سنتز شده و دوکسوروبیسین

C4: 4- nitrophenyl

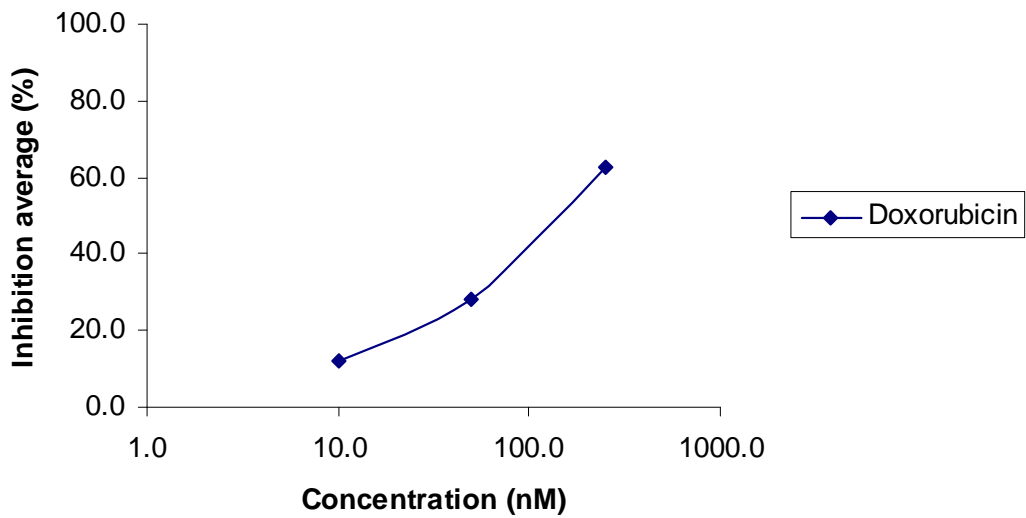
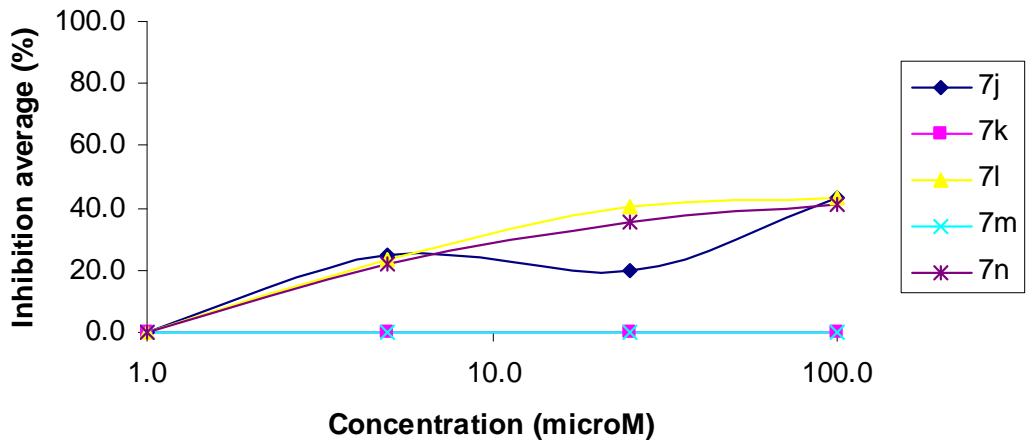


C4: 2 and 3- nitrophenyl



نمودار ۳-۴: میانگین درصد مهار رشد سلول های Raji بر اثر ترکیبات دی هیدروپیریدینی سنتز شده و دوکسورویسین

C4: nitroimidazole



ادامه نمودار ۳-۴: میانگین درصد مهار رشد سلول های Raji بر اثر ترکیبات دی هیدروپیریدینی سنتز شده و دوکسوروبیسین

۳-۳- نتایج حاصل از ارزیابی اثر فارماکولوژیک آنالوگ های (۱و۴- دی هیدروپیرییدینی

سنتز شده

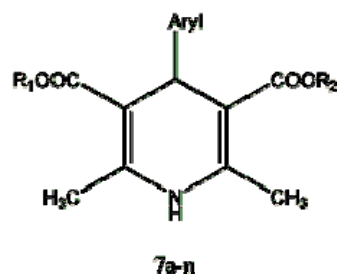
در این مطالعه فعالیت مسدودی کانال کلسیم ترکیبات جدید سنتز شده و نیفدیپین به عنوان ترکیب شاهد بر روی عضله صاف ایلئوم خوکیچه هندی، بررسی شده است. اثر شل کنندگی غلظت های متفاوت (10^{-9} - 10^{-5}) این ترکیبات بر انقباض ناشی از KCl (40 mM) اندازه گیری شده است. برای این منظور، ابتدا قطعات ایلئوم جدا شده، درون حمام بافت و در محیط محلول تیروید قرار گرفته و به ترانسدیوسر متصل گردیده و کششی معادل $0/5$ میلی گرم بر آنها وارد شد. پس از پایدار شدن بافت و به حداقل رسیدن انقباضات پایه، مقدار $0/1$ میلی لیتر KCl (2 M) به درون حمام بافت 5 میلی لیتری تزریق گردید تا انقباض فازیک ایجاد شود. این تزریقات به فواصل هر 10 دقیقه تکرار شد تا زمانی که انقباضات ایجاد شده به کمتر از 20% رسید. میانگین شدت این انقباضات به عنوان شدت انقباض 100% در نظر گرفته شد.

سپس ترکیبات مورد آزمایش از کمترین غلظت به محیط بافت تزریق شدند. بافت در هر غلظت به مدت 10 دقیقه انکوبه شد و پس از آن KCl تزریق گردید و به صورت درصدی از انقباض 100% بیان گردید. این ارزیابی تا غلظت 10^{-5} مولار ادامه یافت (معمولاً در این غلظت، انقباض ایجاد شده به صفر نزدیک می شود). بررسی هر ترکیب حداقل بر روی 4 بافت مجزا تکرار گردید.

در نهایت فعالیت مسدودی کانال کلسیم به صورت غلظت مورد نیاز برای ایجاد 50% کاهش (IC_{50}) در انقباض ناشی از KCl (40 mM) با استفاده از نرم افزار *curve expert 1.3*، میانگین IC_{50} های حاصل از آزمایشات تکرار شده به همراه خطای استاندارد با کمک نرم افزار *sigma plot I* تعیین گردید. تزریق $DMSO$ با غلظتی که در اثر افزودن محلول ترکیبات مورد آزمایش در حمام بافت، ایجاد می گردد، باعث شل شدن عضله صاف ایلئوم نمی گردد.

میانگین IC_{50} های به دست آمده در جدول ۳-۷ آورده شده است.

جدول ۳-۷: مقدار $IC_{50} \pm$ خطای استاندارد جهت شل کردن انقباض ناشی از KCl (40 mM) در ایلئوم خوکیچه هندی



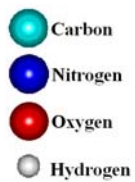
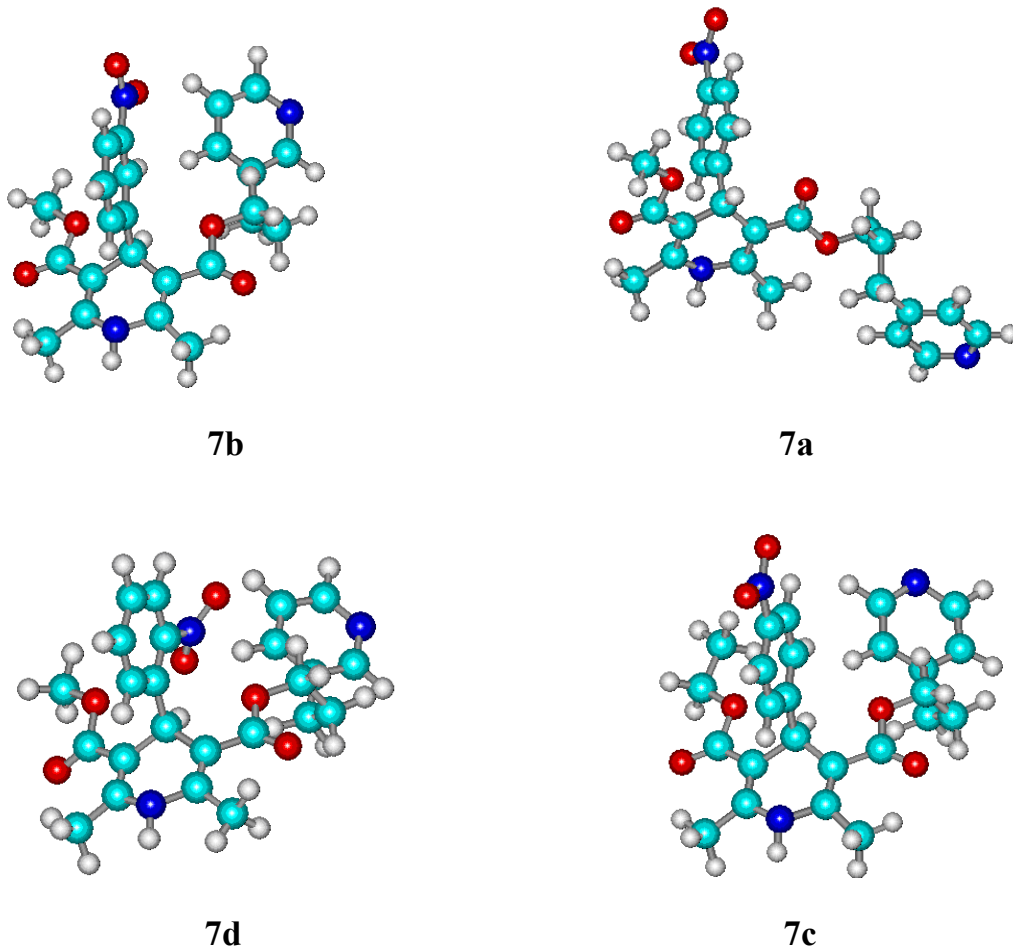
| ارزش P | تعداد تکرار | (mean \pm Se) IC_{50} | جرم مولکولی | Aryl | R ₂ | R ₁ | ترکیب |
|-----------|-------------|----------------------------------|-------------|----------------|----------------------|----------------|----------|
| **./... | ۳ | $(4/23 \pm 1/72) \times 10^{-6}$ | ۴۵۱ | 4-nitro phenyl | Pyridine-4-yl-propyl | Methyl | 7a |
| ۱/... | ۴ | $(2/93 \pm 2/28) \times 10^{-8}$ | ۴۵۱ | 3-nitro phenyl | Pyridine-3-yl-propyl | Methyl | 7b |
| **./...۲۰ | ۴ | $(4/57 \pm 1/76) \times 10^{-7}$ | ۴۶۵ | 4-nitro phenyl | Pyridine-4-yl-propyl | Ethyl | 7c |
| **./...۷ | ۳ | $(1/08 \pm 0/68) \times 10^{-6}$ | ۴۵۱ | 2-nitro phenyl | Pyridine-3-yl-propyl | Methyl | 7d |
| **./...۱ | ۴ | $(2/26 \pm 0/89) \times 10^{-6}$ | ۴۶۵ | 3-nitro phenyl | Pyridine-4-yl-propyl | Ethyl | 7e |
| ./...۷۰ | ۴ | $(2/32 \pm 1/18) \times 10^{-7}$ | ۴۷۹ | 3-nitro phenyl | Pyridine-2-yl-propyl | Isopropyl | 7f |
| **./...۱ | ۴ | $(1/39 \pm 0/52) \times 10^{-6}$ | ۴۷۹ | 3-nitro phenyl | Pyridine-3-yl-propyl | Isopropyl | 7g |
| ./۱۲۱ | ۴ | $(1/34 \pm 0/32) \times 10^{-7}$ | ۴۷۹ | 4-nitro phenyl | Pyridine-4-yl-propyl | Isopropyl | 7h |
| **./...۳ | ۴ | $(1/30 \pm 0/73) \times 10^{-6}$ | ۴۶۵ | 3-nitro phenyl | Pyridine-3-yl-propyl | Ethyl | 7i |
| ./...۸۳ | ۳ | $(2/74 \pm 1/77) \times 10^{-7}$ | ۴۵۵ | * | Pyridine-3-yl-propyl | Methyl | 7j |
| **./... | ۴ | $(4/75 \pm 1/62) \times 10^{-6}$ | ۴۵۵ | * | Pyridine-2-yl-propyl | Methyl | 7k |
| ./...۸۷ | ۴ | $(1/61 \pm 0/36) \times 10^{-7}$ | ۴۶۹ | * | Pyridine-3-yl-propyl | Ethyl | 7l |
| **./...۲۹ | ۴ | $(2/79 \pm 1/03) \times 10^{-7}$ | ۴۵۵ | * | Pyridine-4-yl-propyl | Methyl | 7m |
| **./...۱۷ | ۳ | $(3/75 \pm 0/24) \times 10^{-7}$ | ۴۸۳ | * | Pyridine-2-yl-propyl | Isopropyl | 7n |
| | ۳ | $(6/89 \pm 2/00) \times 10^{-8}$ | ۳۴۶ | 2-nitro phenyl | Methyl | Methyl | نیفدیپین |

* 1-methyl-5-nitro-1-imidazol-2-yl

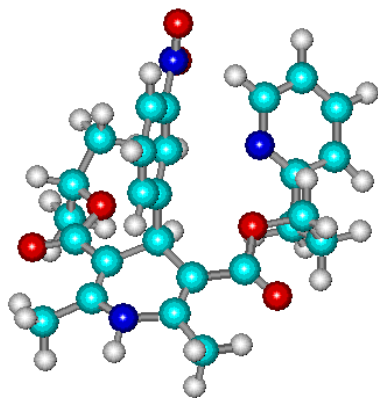
** اختلاف بین IC_{50} ترکیبات با نیفدیپین، از نظر آماری معنی دار بوده است ($P < 0/05$).

۳-۴- نتایج حاصل از آنالیز کانفورماسیون ترکیبات مورد مطالعه

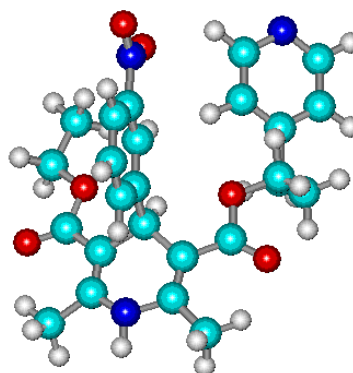
پایدارترین کانفورماسیون ترکیبات دی هیدروپیریدینی سنتز شده و نیفدیپین، با استفاده از نرم افزار Gaussian 98W توسط روش RHF/STO-3G، بازسازی گردید. شکل کانفورمر پایدار این ترکیبات، در شکل ۱-۳ نشان داده شده است.



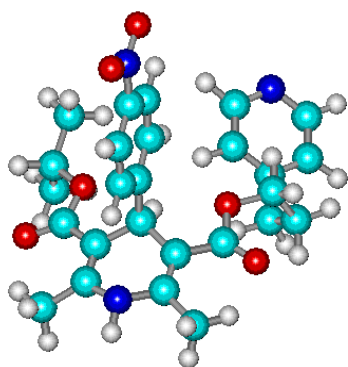
شکل ۱-۳: نمایش کانفورمر پایدار ترکیبات مورد مطالعه



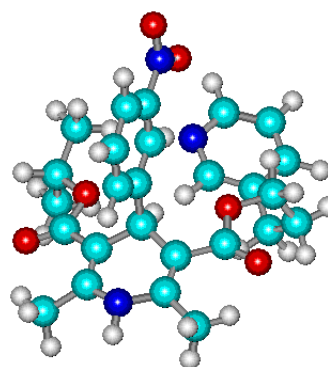
7f



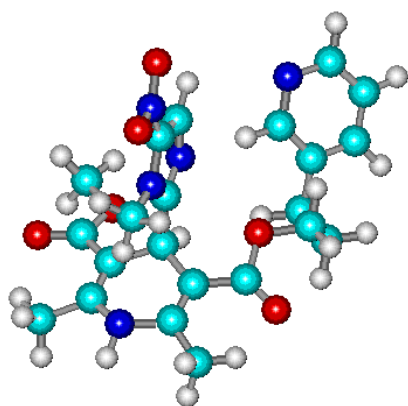
7e



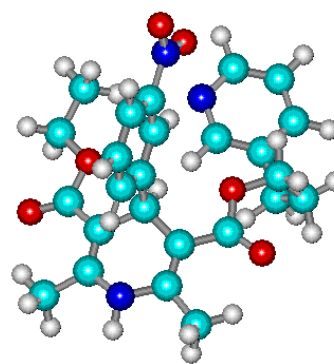
7h



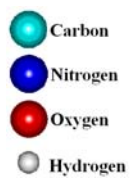
7g



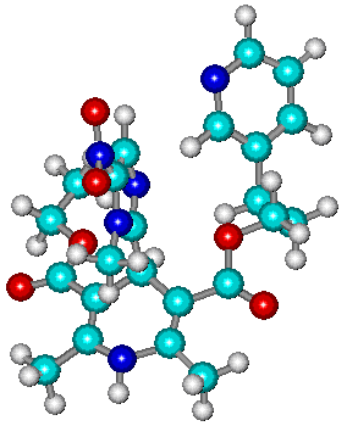
7j



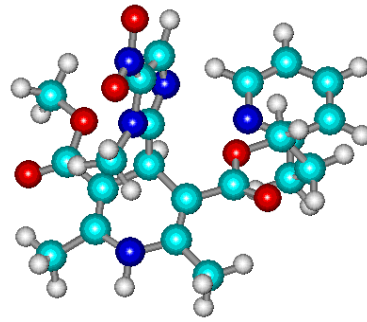
7i



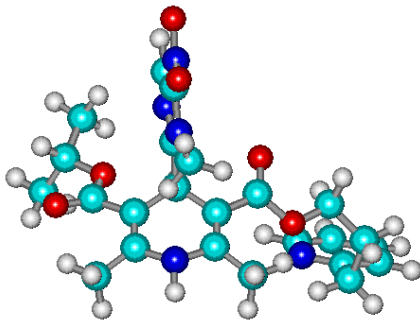
ادامه شکل ۳-۱: نمایش کانفورمر پایدار ترکیبات مورد مطالعه



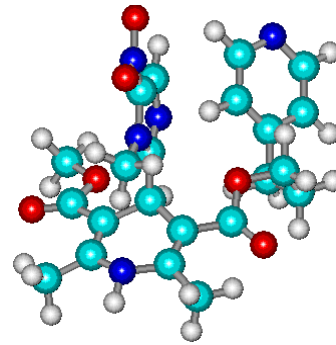
7l



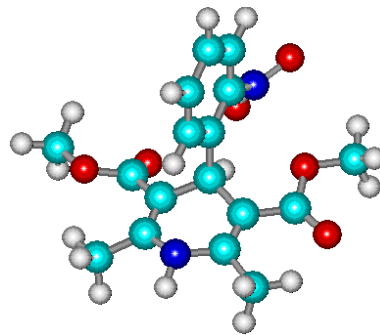
7k



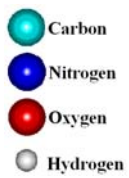
7n



7m

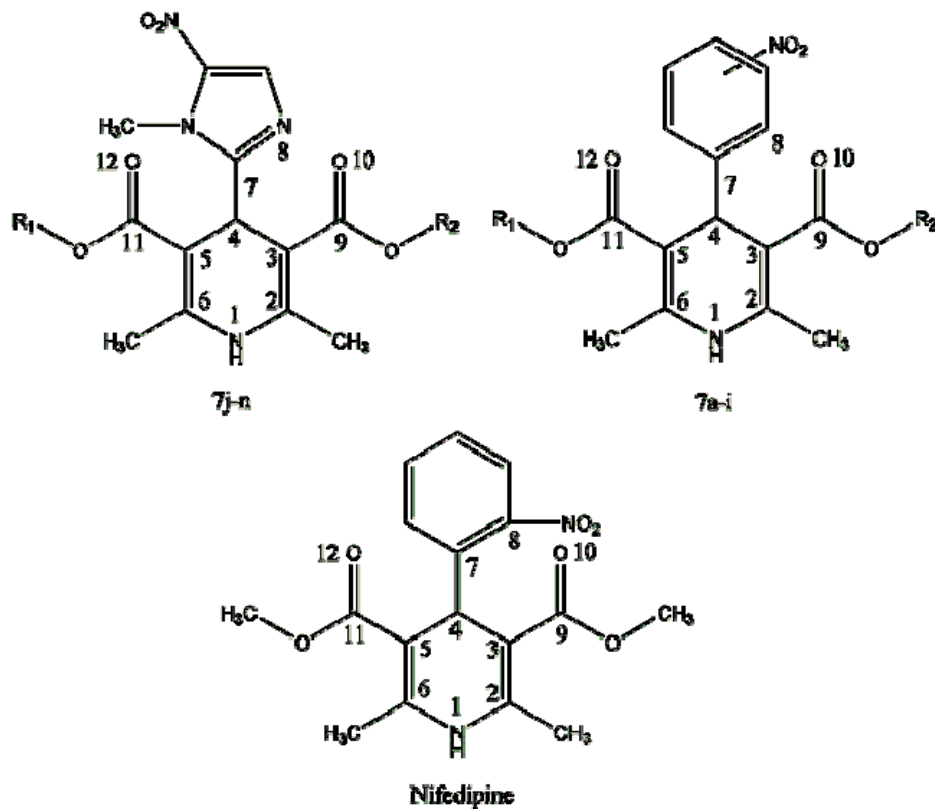


نیفدیپین



ادامه شکل ۳-۱: نمایش کانفورمر پایدار ترکیبات مورد مطالعه

به منظور مقایسه اثر جانبی ترکیبات ۱ و ۴-دی هیدروپیریدینی مورد مطالعه به عنوان عوامل مسدود کننده کانال کلسیم با نیفدیپین (داروی مرجع)، زوایای دی هیدرال مشابه این ترکیبات و نیفدیپین و نیز میزان انطباق آن ها با داروی مرجع، مورد ارزیابی قرار گرفت که در جدول ۳-۸ ذکر شده است.



| * زاویه دی هیدرال اتم ها (°) | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------|---------|---------|-----------|----------|---------|---------|---------|----------|
| ۴-۵-۱۱-۱۲ | ۴-۳-۹-۱۰ | ۳-۴-۷-۸ | ۲-۳-۴-۷ | ۶-۵-۱۱-۱۲ | ۲-۳-۹-۱۰ | ۲-۳-۵-۶ | ۴-۵-۶-۱ | ۱-۲-۳-۴ | ترکیب |
| ۱۷۸/۵۹ | -۳/۸۷ | -۱۱۵/۴۰ | ۱۰۰/۴۲ | -۰/۲۰ | ۱۷۴/۸۲ | ۰/۳۰ | ۰/۹۱ | -۱/۶۶ | 7a |
| -۱۷۶/۴۰ | -۱۷۹/۳۹ | ۱۲۱/۴۰ | ۱۰۱/۹۸ | ۲/۶۷ | ۱/۷۴ | ۰/۱۵ | -۱/۰۵ | ۰/۷۳ | 7b |
| -۱۷۷/۱۰ | ۱۷۳/۷۲ | ۱۱۵/۹۵ | ۱۰۱/۴۵ | ۱/۸۸ | -۵/۱۲ | -۰/۱۴ | -۰/۸۹ | ۱/۳۳ | 7c |
| ۱۶۵/۳۱ | ۱۷۵/۶۸ | ۱۰۷/۷۵ | ۱۰۳/۸۲ | -۱۵/۸۴ | -۳/۸۰ | -۰/۶۷ | ۰/۷۱ | ۰/۸۶ | 7d |
| -۱۷۴/۴۹ | ۱۷۹/۸۵ | ۱۲۳/۲۸ | ۱۰۱/۷۸ | ۴/۵۹ | ۱/۰۰ | ۰/۲۱ | -۱/۱۴ | ۰/۶۶ | 7e |
| -۱۷۲/۳۱ | ۱۷۳/۷۵ | ۱۲۵/۰۲ | ۱۰۱/۴۲ | ۷/۱۰ | ۷/۲۷ | ۰/۴۳ | -۱/۲۴ | ۰/۲۸ | 7f |
| -۱۷۳/۲۶ | ۱۷۳/۰۵ | ۱۱۱/۸۴ | ۱۰۰/۷۷ | ۶/۳۲ | -۶/۲۳ | -۰/۱۵ | -۰/۸۹ | ۱/۲۲ | 7g |
| -۱۷۷/۴۲ | ۱۷۳/۴۲ | ۱۱۴/۸۴ | ۱۰۰/۱۴ | ۱/۶۷ | -۵/۴۰ | -۰/۱۹ | -۰/۹۱ | ۱/۳۵ | 7h |
| -۱۷۹/۱۴ | ۱۷۰/۶۴ | ۱۱۲/۱۷ | ۱۰۰/۸۳ | ۰/۳۴ | -۸/۸۲ | -۰/۲۸ | -۰/۷۳ | ۱/۳۵ | 7i |
| -۱۶۴/۴۴ | -۱۶۶/۲۰ | ۱۲۱/۷ | ۱۱۱/۶۸ | ۱۷/۰۱ | ۱۱/۹۲ | ۰/۸۳ | ۰/۹۷ | -۲/۹۱ | 7j |
| ۱۷۹/۰۴ | ۱۵۴/۹۵ | ۱۰۴/۸۳ | ۱۱۱/۰۶ | ۰/۵۴ | -۲۶/۵۱ | -۰/۹۰ | ۲/۴۹ | -۰/۳۲ | 7k |
| -۱۶۳/۵۴ | -۱۶۶/۱۸ | ۱۲۲/۳۴ | ۱۱۱/۸۰ | ۱۷/۹۳ | ۱۱/۹۵ | ۰/۸۶ | ۰/۹۸ | -۳/۰۲ | 7l |
| -۱۶۵/۱۰ | -۱۶۹/۱۳ | ۱۲۱/۴۱ | ۱۱۱/۵۲ | ۱۶/۵۹ | ۸/۹۱ | ۰/۷۱ | ۱/۱۵ | -۲/۷۹ | 7m |
| -۱۵۷/۸۶ | ۲۰/۵۵ | ۱۲۸/۷۶ | ۱۱۰/۴۳ | ۲۳/۵۱ | -۱۵۸/۹۹ | ۰/۴۹ | ۰/۷۲ | -۱/۸۱ | 7n |
| ۳۸/۳۴ | -۱۷۴/۹۵ | ۱۱۰/۰۰۹ | ۱۰۱/۱۷ | -۱۳۹/۰۰ | ۵/۸۴ | -۰/۳۷ | ۰/۳۳ | ۰/۳۳ | نیفدیپین |

* Dihedral Angle

جدول ۳-۸: زوایای دی هیدرال ترکیبات دی هیدروپیریڈینی سنتز شده و نیفدیپین

۴- بحث و نتیجه گیری

سرطان یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر در دنیا است و تلاش برای رسیدن به روش های تشخیص زود هنگام و همچنین درمان اختصاصی سرطان، یکی از اولویت های مهم مراکز تحقیقاتی است^[۸۹]. امروزه به وسیله ۴ روش درمانی قادرند ۵۰٪ موارد سرطان های تشخیص داده شده را درمان کنند^[۸۵]. پاسخ تومورها به رژیم های شیمی درمانی به علت ایجاد موانعی از جمله مقاومت دارویی نسبت به داروهای شیمی درمانی، متفاوت است. به همین دلیل، مطالعات بسیاری برای تولید عواملی که بتوانند بر این مقاومت دارویی غلبه کنند، صورت گرفته است.

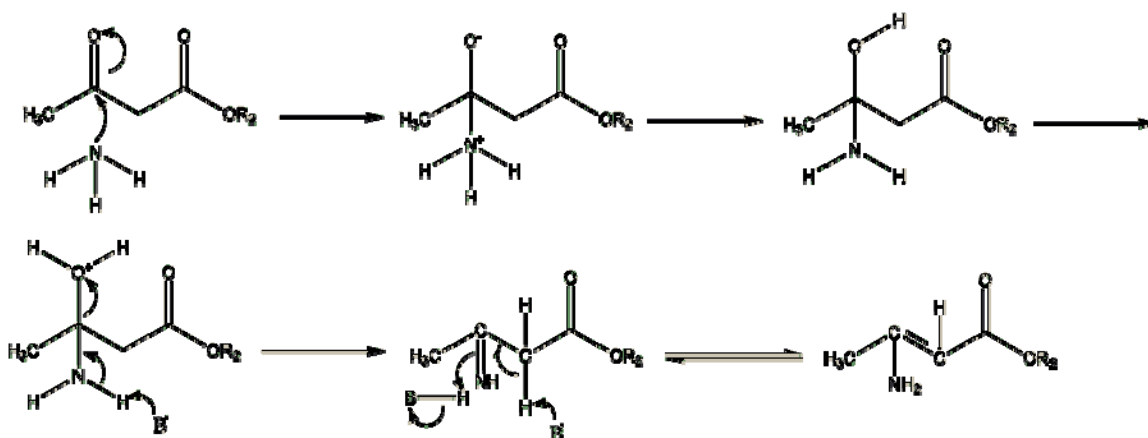
ترکیبات ۱و۴- دی هیدروپیریدین یکی از دسته های اصلی داروهای مهار کننده کانال کلسیم هستند که نشان داده شده است، دسته جدیدی از عوامل غلبه کننده بر مقاومت دارویی در درمان سرطان می باشند^[۸۶-۸۸]. مشتقات نیترو آریل به طور کلی و نیترو ایمیدازول دی هیدروپیریدین ها به طور اختصاصی، از جمله ترکیباتی هستند که بالقوه دارای اثرات سایتوتوکسیک بوده و می توانند به عنوان داروهایی در درمان سرطان مطرح شوند.

بر این اساس در این مطالعه، ترکیبات ناقربینه دی هیدروپیریدین حاوی گروه های استری آلکیل و پیریدیل پروپیل در موقعیت C₃ و C₅ و همچنین حلقه آروماتیک در موقعیت C₄ حلقه دی هیدروپیریدین، با استفاده از روش اصلاح شده هانش که توسط Dagnino مطرح شده بود، طراحی و سنتز شدند. در ادامه، اثرات سمیت سلولی این ترکیبات بر روی ۴ رده سلول سرطانی و همچنین اثر مهار کنندگی کانال کلسیم بر روی عضله صاف ایلئوم خوچه هندی بررسی شد.

جهت تهیه این ترکیبات در مرحله اول، ترکیب ۱- متیل-۵- نیترو ایمیدازول-۲- کربوکسالدید طی یک واکنش، از اکسیداسیون ۲- هیدروکسی متیل-۱- متیل-۵- نیترو ایمیدازول حاصل شد.

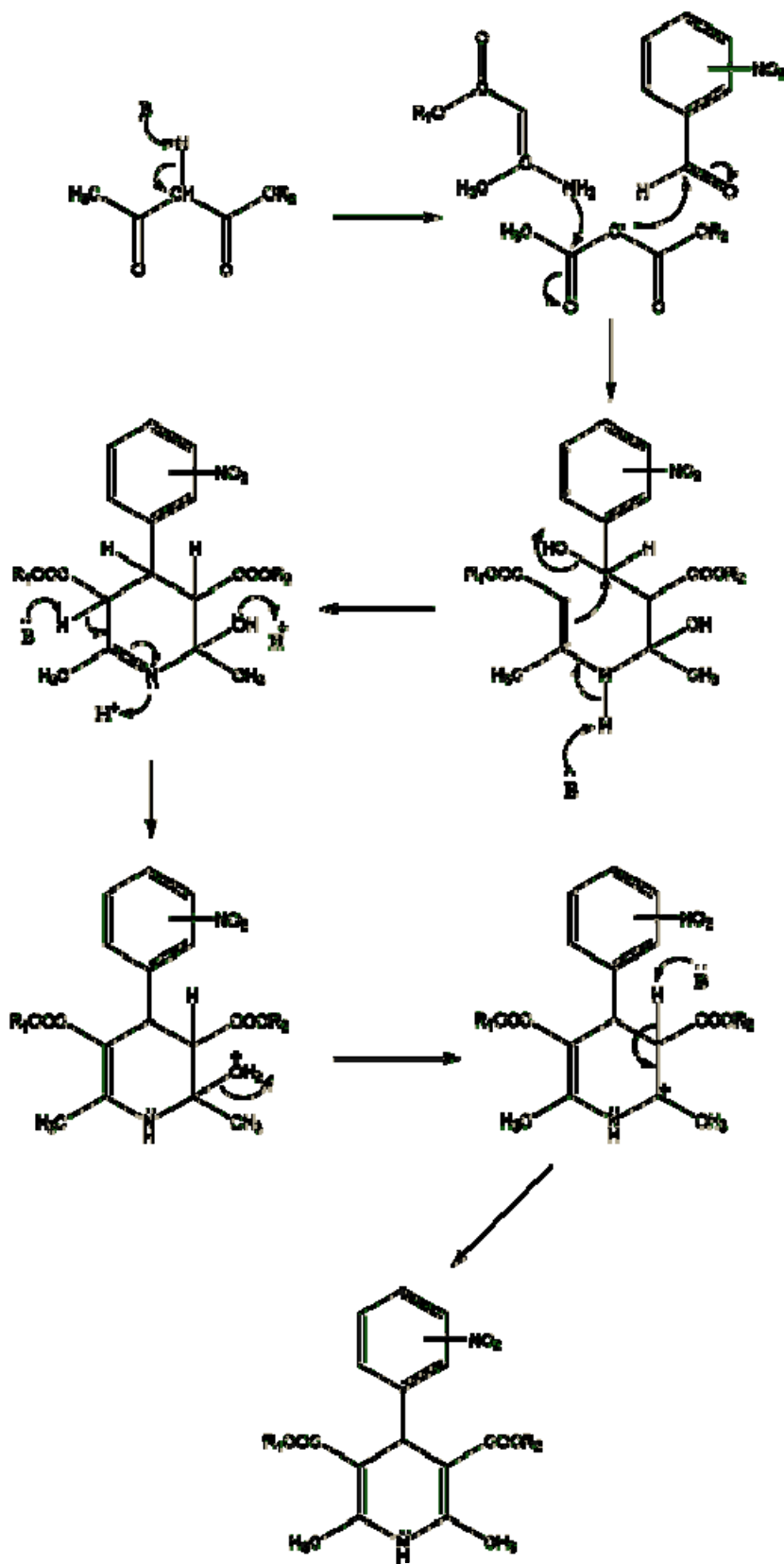
مرحله دوم، تولید استو استات های مورد نظر (**3a-c**) بود. در طی انجام این واکنش، پس از تبدیل حرارتی ۲و۲و۶-تری متیل-۴-هیدروژن-۱و۳-دی اکسین-۴-اون (2) به واسطه فعال، الکل مناسب (**1a-c**)، با آن واکنش داده و ترکیب استو استات (**3a-c**) تولید گردید. محصول واکنش به وسیله کروماتوگرافی ستونی با فاز متحرک اتیل استات-پترولیوم اتر (۰.۸۰-۰.۲۰)، به صورت مایع زرد رنگ نسبتاً چگال تخلیص شد.

در شناسایی این دسته ترکیبات توسط طیف IR، حضور یک پیک در ناحیه $1748-1742\text{ cm}^{-1}$ ، مؤید گروه استری و یک پیک در ناحیه $1717-1716\text{ cm}^{-1}$ ، مؤید گروه کتونی می باشد. در این طیف ها، پیک مربوط به OH اولیه در ناحیه 3300 cm^{-1} به طور کامل حذف شده است. در مرحله بعد، آمینوکروتونات های مورد نظر (**5a-c**) از استو استات های مربوطه (**4a-c**) تهیه شدند. در این مرحله، گروه NH_3 از آمونیوم استات به دلیل داشتن زوج الکترون غیر پیوندی، به عنوان عامل نوکلئوفیل به گروه کربونیل کتونی که دارای جزئی بار مثبت می باشد، حمله کرده و یک مولکول آب و آمینوکروتونات تولید می کند.



شکل ۴-۱- مکانیزم تشکیل آمینوکروتونات

محصول این واکنش، بدون جداسازی در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت. تشکیل محصول آمینوکروتونات توسط طیف IR به تأیید رسیده است. حضور دو پیک NH_2 در حدود 3511 cm^{-1} و 3332 پیک تک شاخه مربوط به استر در 1716 cm^{-1} و حذف پیک دوشاخه مربوط به گروه استری، مؤید تشکیل آمینوکروتونات های مورد نظر است. علت قرار گرفتن پیک مربوط به استر در عدد موج پایین تر، کنژوگه شدن آن با باند دوگانه و تشکیل پیوند هیدروژنی درون مولکولی می باشد. در نهایت جهت تولید آنالوگ های دی هیدروپیریدینی مورد نظر، ۱ مول استو استات مربوطه (3a-c) با ۱ مول آمینوکروتونات (5a-c) و ۱ مول آلدهید (6a-d) در شرایط رفلکس و دور از نور به مدت ۲۴ ساعت، قرار داده شد.



شکل ۴-۲- مکانیزم تشکیل ترکیبات ۱و۴- دی هیدروپیریدین

محصول حاصل از این واکنش ها با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در فاز متحرک کلروفورم- اتانول (۰.۵-۰.۹۵) خالص گردید. ساختمان محصول مورد نظر پس از جداسازی و تخلیص، با کمک روش های طیف سنجی جرمی، IR و $^1\text{H-NMR}$ شناسایی و تأیید شد.

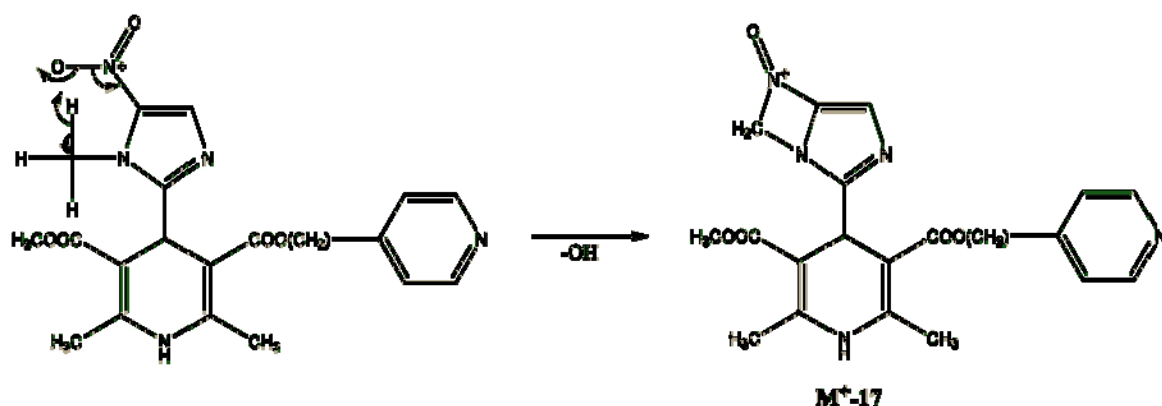
در طیف IR، پیک مربوط به NH در ناحیه حدود $3188-3438\text{ cm}^{-1}$ و پیک مربوط به CH آروماتیک در ناحیه $3075-3185\text{ cm}^{-1}$ و پیک مربوط به CH آلیفاتیک در ناحیه $2924-2979\text{ cm}^{-1}$ مشاهده گردید. پیک مربوط به CO استری در ناحیه $1667-1703\text{ cm}^{-1}$ و حضور دو پیک مربوط به NO_2 در حدود $1342-1526\text{ cm}^{-1}$ ، همگی مؤید تشکیل ساختمان های مورد نظر می باشند.

در طیف های $^1\text{H-NMR}$ ترکیبات 7a-7i، پیک تک شاخه پهن مربوط به NH حلقه دی هیدروپیریدین در حدود $5/94-5/72\text{ ppm}$ و در ترکیبات 7j-7n، این پیک در حدود $8-8/5\text{ ppm}$ آمده است. پیک تک شاخه مربوط به هیدروژن متصل به C_4 حلقه دی هیدروپیریدین در ناحیه $5/78\text{ ppm}$ و دو پیک تک شاخه مربوط به CH_3 متصل به C_2 و C_6 در ناحیه $2/38-2/25\text{ ppm}$ که البته در بعضی از ترکیبات، در این ناحیه یک پیک تک شاخه که انتگرال آن معادل ۶ هیدروژن می باشد، مشاهده می شود. پیک های تک شاخه مربوط به هیدروژن های متصل به کربن های موقعیت ۲ و ۶ حلقه دی هیدروپیریدین، به دلیل نامتقارن بودن ترکیب و وجود فضای متفاوت می باشد که در برخی از این ترکیبات، این فضا برای هیدروژن ها خیلی متفاوت نیست؛ بنابراین پیک مربوطه در یک ناحیه مشاهده می شود.

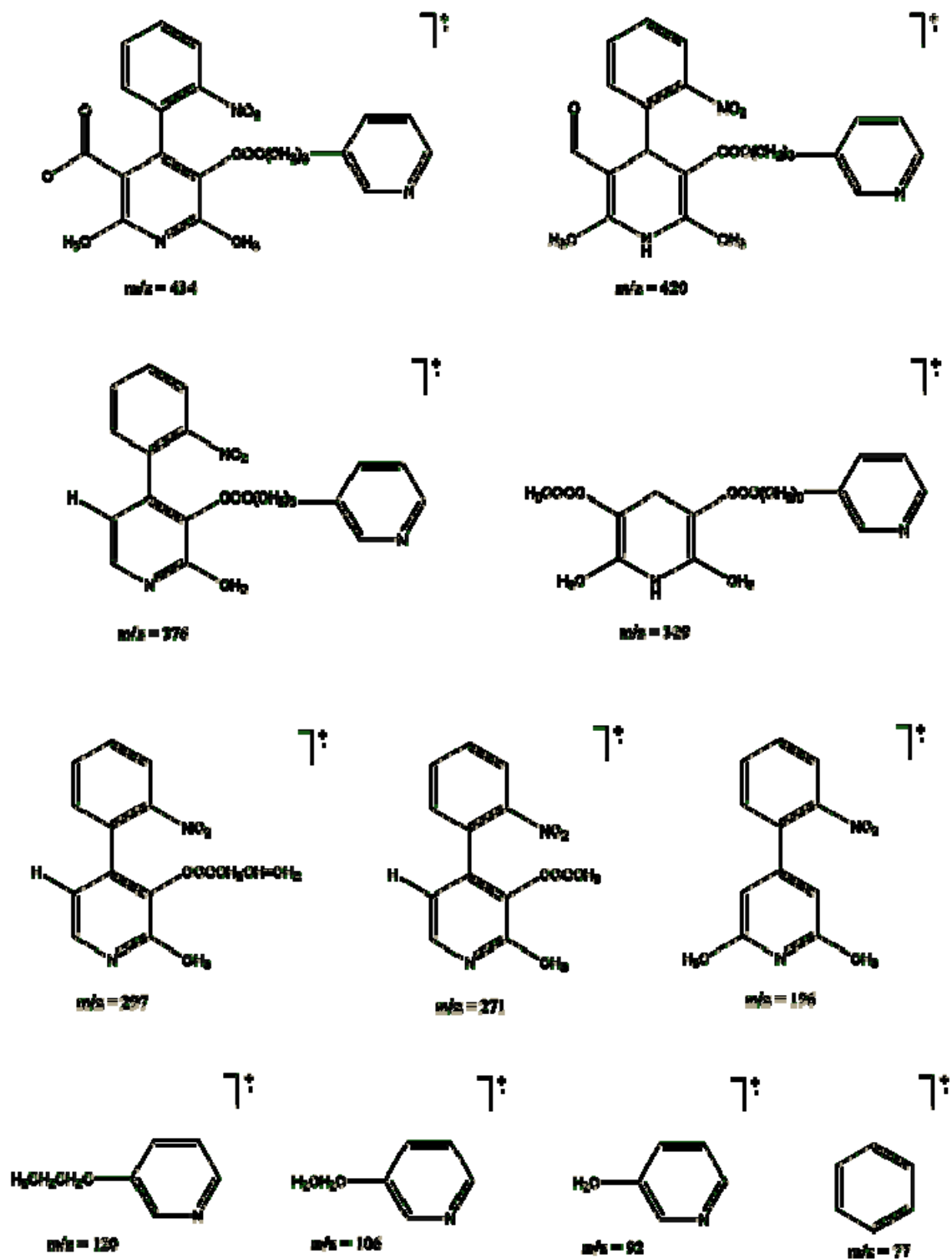
هیدروژن های مربوط به حلقه های آروماتیک، در ناحیه حدود $7-8/5\text{ ppm}$ و در ترکیبات 7j-7n، پیک تک شاخه مربوط به هیدروژن حلقه نیتروایمیدازول در ناحیه $7/95-7/94\text{ ppm}$ و نیز پیک تک شاخه مربوط به N-CH_3 در ناحیه $4/22-3/68\text{ ppm}$ قرار گرفته است. هیدروژن های مربوط به $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ متصل به C_3 به صورت یک پیک سه شاخه در ناحیه $2/47-2/78\text{ ppm}$ ، هیدروژن های مربوط به $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ متصل به C_3 به صورت یک پیک چند شاخه در ناحیه $2/10-1/86\text{ ppm}$ مشاهده می شود که چند شاخه بودن پیک به دلیل وجود ایزومر های دیاستروتوپیک

می باشد. هیدروژن های مربوط به $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ متصل به C_3 به صورت یک پیک چند شاخه در ناحیه ppm ۳/۹۹-۴/۱۸ به همراه پیک چهار شاخه مربوط به هیدروژن های مربوط به $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ متصل به C_5 در مشتقاتی که دارای استر اتیل هستند، مشاهده می شوند. پیک سه شاخه مربوط به هیدروژن های $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ متصل به C_5 در ناحیه ppm ۱/۲۳-۱/۲۴ و دو پیک دو شاخه (به دلیل دیاستروتوپیک بودن ترکیبات) مربوط به شش هیدروژن استخلاف استر ایزوپروپیل متصل به C_5 در ناحیه ppm ۱/۱۰-۱/۲۶، پیک چند شاخه مربوط به $\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$ متصل به C_5 در ناحیه ppm ۴/۹۳-۵/۰۳ و پیک تک شاخه مربوط به هیدروژن های COOCH_3 در مشتقاتی که دارای استخلاف استری متیل در C_5 هستند در ناحیه ppm ۳/۵۸-۴/۲۱ مشاهده می شود. پیک های کوچک اضافی که در بعضی از طیف ها مشاهده می شود، ناشی از آب کلروفرم و ناخالصی حلال (اتیل استات) می باشد.

در طیف جرمی این ترکیبات نیز، یون های مولکولی و یا $M+1$ قابل رؤیت هستند که به نوبه خود، تأیید کننده جرم مولکولی ماده مورد نظر می باشند. در طیف ترکیباتی که دارای حلقه نیترو ایمیدازول در موقعیت C_4 حلقه دی هیدروپیریدین هستند، نوآرایی زیر باعث ایجاد یون M^+-17 شده است:



در ادامه، تعدادی از شکست های مطلوب مربوط به ترکیب ۳-متیل-۵- (۳- پیریدین-۳-
ایل) پروپیل)-۲و۶- دی متیل-۴- (۲- نیترو فنیل)-۱و۴- دی هیدروپیریدین-۳و۵- دی کربوکسیلات
(7d)، نمایش داده شده است:



شکل ۴-۳: تعدادی از شکست های مطلوب مربوط به ترکیب ۳-متیل-۵- (۳- پیریدین-۳- ایل) پروپیل-۲-دی متیل-
 ۴- (۲- نیترو فنیل)-۱-دی هیدروپیریدین-۳-۵-دی کربوکسیلات (7d)

پس از انجام مراحل سنتز، جداسازی، تخلیص و تأیید ساختمان ترکیبات به وسیله روش های اسپکتروسکوپی IR، Mass و $^1\text{H-NMR}$ ، اثرات سمیت سلولی آن ها بر روی ۴ رده سلول سرطانی (Hela, MCF-7, LS-180, Raji)، بررسی شد که با توجه به نتایج ذکر شده در فصل قبل، تقریباً ۷۰٪ ترکیبات، اثر سمیت سلولی قابل توجهی داشتند. همانطور که قبلاً اشاره شد، ترکیبات دی هیدروپیریدینی با مهار آنزیم توپوایزومراز II و دخالت در عملکرد صحیح DNA، اثرات سمیت سلولی خود را اعمال می کنند.

برخلاف انتظار، برخی از ترکیباتی که دارای حلقه نیترو ایمیدازول در موقعیت C_4 حلقه دی هیدروپیریدین هستند، اثر سمیت سلولی قابل ذکری نداشتند. تنها دو ترکیب 7m و 7n به ترتیب بر روی رده های سلولی Hela و MCF-7، دارای IC_{50} های $60/4$ و $88/9$ میکرو مولار هستند که کمترین میزان IC_{50} نسبت به مابقی ترکیبات مؤثر را دارند که از بین این دو، ترکیب 7m بهترین اثر را دارد. با توجه به ساختمان این ترکیب، حضور استخلاف استری متیل در موقعیت C_5 و حلقه نیتروایمیدازول در موقعیت C_4 حلقه دی هیدروپیریدین نشان می دهد که اثر این دو استخلاف در افزایش سمیت سلولی ترکیب 7m کاملاً مشهود است و نیز مشاهده می شود که استخلاف ۴- نیتروفنیل نسبت به نیتروایمیدازول در موقعیت C_4 حلقه دی هیدروپیریدین در دو ترکیب 7a و 7m که دارای استخلاف های یکسان در موقعیت های C_3 و C_5 می باشند، باعث افزایش اثر سمیت سلولی ترکیب 7a می شود. نتایج حاصل از ارزیابی سمیت سلولی ترکیبات، به ترتیب میزان IC_{50} آن ها در جدول ۴-۱ آمده است.

| Raji | IC ₅₀ | LS-180 | IC ₅₀ | MCF-7 | IC ₅₀ | Hela | IC ₅₀ | ترتیب |
|------|------------------|--------|------------------|-------|------------------|------|------------------|--------------|
| 7c | ۶/۴ | 7g | ۲۶/۰ | 7c | ۱۶/۰ | 7h | ۱۲/۶ | ۱ |
| 7i | ۱۷/۸ | 7a | ۲۶/۹ | 7i | ۱۸/۱ | 7a | ۱۳/۲ | ۲ |
| 7d | ۱۸/۴ | 7c | ۳۱/۸ | 7h | ۱۸/۷ | 7f | ۱۴/۸ | ۳ |
| 7g | ۱۸/۵ | 7h | ۳۸/۴ | 7g | ۲۰/۳ | 7g | ۲۰/۰ | ۴ |
| 7f | ۱۹/۳ | 7f | ۳۹/۱ | 7f | ۲۴/۳ | 7i | ۲۲/۴ | ۵ |
| 7b | ۱۹/۵ | 7i | ۳۹/۱ | 7a | ۲۴/۳ | 7b | ۲۴/۸ | ۶ |
| 7h | ۲۱/۷ | 7b | ۴۰/۹ | 7d | ۳۰/۹ | 7d | ۲۶/۵ | ۷ |
| 7a | ۲۴/۷ | 7d | ۴۱/۹ | 7b | ۳۷/۵ | 7c | ۲۷/۲ | ۸ |
| 7e | ۴۶/۴ | 7e | ۶۳/۲ | 7e | ۳۷/۶ | 7e | ۳۳/۵ | ۹ |
| ---- | ---- | ---- | ---- | 7n | ۸۸/۹ | 7m | ۶۰/۴ | ۱۰ |
| ---- | ۰/۱۸۴ | ---- | ۰/۰۶۱ | ---- | ۰/۲۳۷ | ---- | ۱/۵۷۹ | دوکسوروبیسین |

جدول ۴-۱: ترتیب سمیت سلولی آنالوگ های دی هیدروپیریدینی سنتز شده بر اساس میزان IC₅₀ آن ها بر ۴ رده سلول سرطانی

همانطور که مشاهده می شود، تقریباً اثرات سمیت سلولی بهتری در رده سلولی Raji مشاهده می شود که نسبت به سایر رده ها، دارای تعداد بیشتری از IC₅₀ های کمتر می باشد و چون این رده سلولی مربوط به لنفومای سلول های B می باشد، می توان گفت که آنالوگ های دی هیدروپیریدینی سنتز شده در سرطان خون، اثر بهتری خواهند داشت (نسبت به solid tumors). در این رده سلولی، ترکیب 7c دارای بیشترین اثر سمیت سلولی است. این ترکیب در رده سلولی MCF-7 نیز دارای بیشترین اثر و کمترین میزان IC₅₀ است. در ساختمان شیمیایی این ترکیب (7c)، استرهای ۴- پیریدیل پروپیل و اتیل در موقعیت های C₃ و C₅ و ۴- نیتروفنیل در موقعیت C₄ حلقه دی هیدروپیریدین حضور دارند. ترکیب 7e که در ساختمان خود، دارای استر ۴- پیریدیل پروپیل و اتیل در موقعیت های C₃ و C₅ و استخلاف ۳- نیترو فنیل در موقعیت C₄ حلقه دی هیدروپیریدین می باشد، در تمام رده های سلولی دارای IC₅₀ ی پایین تری است. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و مقایسه میزان IC₅₀ ترکیبات در رده

های سلولی بررسی شده، ترکیبات 7g و 7h تقریباً دارای بیشترین فعالیت سمیت سلولی بر همه رده های سلولی هستند. در ادامه می توان ترکیبات 7a، 7c، 7i و 7f را به ترتیب، جزء ترکیبات فعال از نظر میزان سمیت سلولی، قرار داد. ترکیبات 7b، 7d و 7e دارای میزان فعالیت کمتری می باشند. همچنین، کمترین میزان فعالیت سمیت سلولی در بین همه ترکیبات فعال سنتز شده، به ترکیبات 7m و 7n تعلق دارد. در نتایج به دست آمده از این مرحله مشاهده می شود، تعداد ترکیبات فعالی که دارای گروه استری ایزوپروپیل در ناحیه C₅ حلقه دی هیدروپیریدین هستند (۳ ترکیب فعال و ۱ ترکیب با فعالیت کمتر)، نسبت به تعداد ترکیبات فعال دارای استر اتیل (۲ ترکیب فعال و ۱ ترکیب با فعالیت کمتر)، بیشتر است. همچنین، ترکیبات فعال دارای استر متیل (۱ ترکیب فعال و ۳ ترکیب با فعالیت کمتر) دارای کمترین تعداد در بین ترکیبات فعال بررسی شده هستند. بنابراین می توان گفت که اثر سمیت سلولی این ترکیبات با کم شدن تعداد کربن های R₁، کاهش می یابد.

همچنین مشاهده می شود، تعداد ترکیبات فعالی که دارای استر ۴-پیریدیل پروپیل در موقعیت C₃ حلقه دی هیدروپیریدین هستند (۳ ترکیب فعال و ۲ ترکیب با فعالیت کمتر)، بیشتر از تعداد ترکیبات فعال دارای استر ۳-پیریدیل پروپیل (۲ ترکیب فعال و ۲ ترکیب با فعالیت کمتر) است و نیز مشاهده شد که تنها یک ترکیب فعال و یک ترکیب با فعالیت کمتر، دارای استر ۲-پیریدیل پروپیل می باشد. لذا؛ اثر بیشتر استخلاف استری ۴-پیریدیل پروپیل نسبت به ۳-پیریدیل پروپیل و آن هم نسبت به ۲-پیریدیل پروپیل، کاملاً مشهود است.

اثر استخلاف آریل موقعیت C₄ حلقه دی هیدروپیریدین بر میزان فعالیت سمیت سلولی ترکیبات سنتز شده نشان می دهد که تعداد ترکیبات فعال دارای استخلاف ۴-نیتروفنیل (۳ ترکیب فعال)، بیشتر از تعداد ترکیبات فعال دارای استخلاف ۳-نیتروفنیل (۲ ترکیب فعال و ۲ ترکیب با فعالیت کمتر) است و تنها یک ترکیب فعال، دارای استخلاف ۲-نیتروفنیل می باشد. همچنین، مشاهده شد که استخلاف نیتروفنیل نسبت به نیتروایمیدازول، اثر بیشتری بر سمیت سلولی این ترکیبات دارد.

همانطور که قبلاً هم اشاره شد، ترکیبات سنتز شده، کلیه فاکتورهای لازم جهت اعمال اثرات مسدودی کانال کلسیم را دارا هستند. بنابراین، به منظور بررسی این اثر و مقایسه میزان فعالیت مسدودی کانال کلسیم توسط این ترکیبات با ترکیب نیفدیپین (ترکیب مرجع)، پس از مرحله ارزیابی اثرات سمیت سلولی این ترکیبات، اثر شل کنندگی ترکیبات سنتز شده بر روی ایلئوم خوکچه هندی منقبض شده توسط KCl (40 mM)، به عنوان عارضه جانبی ترکیبات، مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به داده های آماری ذکر شده در جدول ۳-۷، کلیه ترکیبات سنتز شده بجز ترکیب 7b، نسبت به نیفدیپین دارای اثر کمتری بودند؛ زیرا IC_{50} ی این ترکیبات نسبت به نیفدیپین بیشتر بوده و این تفاوت در بعضی از ترکیبات از نظر آماری با $P < 0.05$ معنی دار بوده است. ترکیب 7b در همه رده های سلولی نیز دارای IC_{50} ی حدود ۱۳/۲-۲۶/۹ میکرو مولار بوده که نشان می دهد این ترکیب علاوه بر اثر مسدودی خوب کانال کلسیم، اثرات سمیت سلولی قابل توجهی نیز دارد.

طبق نتایج حاصل، در بین ترکیبات سنتز شده، ترکیب 7b بیشترین اثر و ترکیب 7d کمترین اثر مسدودی کانال کلسیم را دارد که با توجه به اینکه این دو ترکیب، فقط در استخلاف موقعیت C_4 حلقه دی هیدروپیریدین با یکدیگر تفاوت دارند، می توان نتیجه گرفت که استخلاف ۳- نیتروفنیل در ترکیب 7b در مقایسه با استخلاف ۲- نیتروفنیل در ترکیب 7d، عامل اثر زیاد این مولکول در سطح گیرنده های کانال های کلسیمی بوده است. علاوه بر این، با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز کانفورماسیون ترکیبات مذکور، بیشترین اختلاف این دو ترکیب در زوایای بین استخلاف های متصل به موقعیت های C_3 و C_5 و حلقه دی هیدروپیریدین می باشد (زوایای ۱۰-۹-۴-۳ و ۱۲-۱۱-۵-۴).

در ترکیبات 7b، 7g و 7i، تنها استخلاف متصل به موقعیت C_5 حلقه دی هیدروپیریدین متفاوت است که با توجه به این که ترکیب 7b بیشترین اثر را دارد، می توان گفت که اثر استر متیل در پایین آوردن لیپوفیلیسیته این ترکیب و در نتیجه اثر بهتر آن نسبت به استر های اتیل و ایزوپروپیل کاملاً مشهود است؛ زیرا IC_{50} ی دو ترکیب 7g و 7i دارای تفاوت معنی داری از نظر آماری با ترکیب مرجع می باشند.

همچنین در نتایج به دست آمده مشاهده می شود در بین ترکیباتی که دارای استخلاف های یکسان در موقعیت های C_3 و C_5 ، ولی در موقعیت C_4 حلقه دی هیدروپیریدین دارای حلقه نیتروایمیدازول هستند، مشتقات نیتروایمیدازولیل اثر بهتری نسبت به مشتقات نیتروفنیل دی هیدروپیریدین دارند (ترکیبات $7i$ و $7l$ ، $7d$ و $7j$ ، $7f$ و $7n$ ، $7a$ و $7m$ ، که $7l$ ، $7j$ ، $7m$ و $7n$ به دلیل داشتن استخلاف نیتروایمیدازول، دارای اثر مسدودی کانال کلسیم بیشتری هستند).

۴-۱- پیشنهاد ها برای مطالعات آتی

افزایش ایجاد مقاومت نسبت به داروهای ضد سرطان و به دنبال آن، افزایش شیوع سرطان های مختلف، اهمیت تولید داروهای غلبه کننده بر این مقاومت را نشان می دهد. بنابراین، بررسی اثر مهار کنندگی MDR این ترکیبات بر رده سلولی HL60/MX1 و دیگر سلول های مقاوم، می تواند مطالعه جامعی بر مکانیسم اثر دقیق این ترکیبات باشد. همچنین، با توجه به اثر سمیت سلولی قابل توجه ترکیبات سنتز شده بر سلول های مورد بررسی، با سنتز همه ترکیبات دارای استخلاف های استری ذکر شده (پیریدیل پروپیل و آلکیل در موقعیت های ۳ و ۵ حلقه DHP) و همچنین ترکیباتی با استرهای پیریدیل اتیل و پیریدیل متیل و نیز استخلاف های آمیدی، می توان ضمن بررسی اثرات سمیت سلولی آن ها، به بررسی دقیق رابطه کمی ساختمان و اثر (QSAR) این ترکیبات پرداخت.

بررسی اثرات سمیت سلولی این ترکیبات در مدل های *in vivo* نیز می تواند به عنوان مکمل مطالعات انجام شده قرار گیرد.

References

2. Cancer Research UK (January 2007). Retrieved on **2007-06-25**.
3. WHO (February 2006). "Cancer". World Health Organization.. Retrieved on **2007-06-25**
4. American Cancer Society (December **2007**). "Report sees 7.6 million global **2007** cancer deaths". Reuters. Retrieved on **2008-08-07**
5. King, RJB.; Robins, MW. Cancer Biology (2nd Edition). London. Pearson Education. **2000**, 1-2
6. Remers. W.A.; Delgado, J.N. Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. 10th ed. Washington D.C.: J.B. Lippincott, **1998**, 344-348.
12. Morrow, CS.; Cowan, KH. Drug resistance and its clinical circumvention, In: Cancer Medicine (4th Edition). Holland JF, Frei E, Bast JC, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR. *Williams & Wilkins*. **1997**. pp. 799-815.
13. Gottesman MM. How cancer cells evade chemotherapy. *Cancer Res.* **1993** 15:747-54
15. Liscovitch, M.; Lavie, Y. Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. *IDrugs*. **2002** 5:349-55.
16. Biochemistry (Moscow), Vol. 65, No. 1, **2000**, pp. 95-106. Translated from Biokhimiya, Vol. 65, No. 1, **2000**, pp. 112-126.
17. Gudmundsson, O. Stouch TR, Progress in understanding the structur-activity relationship of P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev.* **2002** 54:315-28.
18. Krishnamachary, N. Center MS. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-KDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res.* **1993** 53:3658-61.
19. Ferrry, DR.; Traunecker, H.; Kerr, DJ. Clinical trial of P-glycoprotein reversal in solid tumours. *Eur J Cancer.* **1996** 32A:1070-81.
20. Varma, MV.; Ashokraj, Y.; Dey, CS.; Panchagnula, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res.* **2003** 48:347-59.
21. Rajesh, Krishna.; Lawrence, D. Mayer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11 (**2000**) 265–283
23. Freshney, RI. Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques. 5th Ed. John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, New Jersey. **2005**.

24. John. RW Masters. Animal Cell Culture. Third edition. Oxford University Press. **2000**.
25. Hatok, J.; Babusikova, E.; Matakova, T.; Mistuna, D.; Dobrota, D.; Racay, P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med.* **2009** Mar;9(1):1-7.
26. Freshney, RI. Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques. 5th Ed. John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, New Jersey. **2005**.
27. John. RW. Masters. Animal Cell Culture. Third edition. Oxford University Press. **2000**.
28. S.P.Cole, SP.; Bhardwaj, G.; Gerlach, JH.; Mackie, JE.; Grant, CE.; Almquist, KC.; Stewart, AJ.; Kurz, EU.; Duncan, AM.; Deeley, RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.***1992** 258:1650-4.
29. Nielsen, D.; Maare, C.; Skovsgaard, T. Cellular resistance to anthracyclines. *Gen Pharmacol.* **1996** 27:251-5.
30. Harris AL, Hochhauser D. Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncol.***1992**; 31:205-13. Abstract.
31. Gudmundsson, O.; Stouch, TR. Progress in understanding the structure-activity relationships of P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev.* **2002** 54:315-28.
32. Eisner, U.; Kuthan, J. The chemistry of dihydropyridines. *Chem. Rev.* **1972**, 72(1):1-42
33. Hantzsch, A. Ueber die synthese pyridinartiger verbindungen and acetessigather and aldehydammoniak justs liebig's. *Ann. Chem.* **1882**, 215:1-82
34. Sausins, A.; Duburs, G. Synthesis of 1,4- DHPs by condensation reactions. *Heterocycles.* **1988**, 27:269-289
35. Meye. H.; Bossert. F.; Wehinger, E.; Stopel, K.; Vater, W. synthese and Vergleichende pharmakologische untersuchungen von 1,4- dihydro-2,6- dimethyl-4(3-nitrophenyl) pyridine 3,5- dicarbonsaureestern mitnicht-identischen esterfunktionen Zrzneim-Forsch. *Drug Res.* **1981**, 31:407-409
36. Dagnino, L.; Li-Kwanong-Ken, M.C.; Wynn, H.; Triggle, C.R.; Knus, E.E. Synthesis and calcium channel antagonist activity of dialkyl 1,4- dihydro 2,6- dimethyl 4-(pyridinyl) 3,5- pyridine dicarboxylates. *J.Med. Chem.* **1986**, 29:2524-2529
37. Sausins, A.; Duburs, G. Synthesis of 1,4- dihydropyridines in cyclocondensation reactions. *Chemistry of Heterocycle Compounds.* **1992**, 28:363 -391
38. Muller, S. In enantioselective Hantzschsche dihydropyridine-synthese via metalliert's choral β - ketoester- hydroazone fotodruck. *J. Mainz. GmbH, Aachen.* **1998**, P: 75

39. Comins, D.L.; Abdullah, A.H.; Regioselective addition of Grignard reagents to aryl pyridinium salts. A convenient method for the synthesis of 4- alkyl (aryl) pyridines. *J. Org. Chem.* **1982**, 47:4315-4319
40. Sharma, G.V.M.; Reddy, K.L.; Lakshmi, P.S.; Krishna, P.R. An Efficient Catalyst for Solvent-free Hantzsch Reaction at Room Temperature: Synthesis of New Dihydropyridines.Glycoconjugationes. *Synthesis*, **2006**, 55-58
41. Alajarin, R.; Vaquero, J.J.; Garcia Navio, J.L.; Alvarez-Builla, J. Synthesis of 1,4-dihydropyridines under microwave irradiation. *Synlett* **1992**, 297-298.
42. Alajarin, R.; Jordan, P.; Vaquero, J.J.; Alvarez-Builla, J. Synthesis of unsymmetrically substituted 1,4- dihydropyridines and analogous calcium antagonists by microwave heating. *Synthesis* **1995**, 389-391
43. Zhang, Y.-W.; Shan, Z.-X.; Pan, B.; Lu, X.-H.; Chen, M.-H. Research on the synthesis of 1,4- dihydropyridines under microwave. *Synth. Commun.* **1995**, 25, 857-862
44. Khadilkar, B.M.; Chitnavis, A.A. Rate enhancement in the synthesis of some 4- aryl -1,4- dihydropyridines using methyl 3- aminocrotonate under microwave irradiation. *Ind. J. Chem.* **1995**, 34B, 652-653
45. Khadilkar, B.M.; Gaikar, V.G.; Chitnavis, A.A. Aqueous hydrotrop solution as a safer medium for microwave enhanced Hantzsch dihydropyridine ester synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8083-8086
46. Saurez, M.; Loupy, A.; Perez, E.; Moran, L.; Gerona, G.; Morales, A.; Autiè, M. An efficient procedure to obtain hexahydroquinoleines and unsymmetrical 1,4-dihydropyridines using solid inorganic supports and microwave activation. *Heterocycle. Commun.* **1966**, 2, 275-280
47. Vanden Eynde, J.J.; Rutot, D. Microwave-mediated derivatization of poly (styren-co-allyl alcohol), a key for the soluble polymer-assisted synthesis of heterocycles. *Tetrahedron* **1999**, 55, 2687-2694
48. Khadilkar, B.M.; Madyar, V.R. Hantzsch Ester Synthesis by Using an Aqueous Hydrotrop Solution as a Solvent, in Continuous Microwave Reactor (CMR). Fifth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-5), 1-30 September **2001**, <http://www.mdpi.org/ecso-5.htm>
49. Goldman, S.; Stoltzfass, J. 1,4- dihydropyridines: effects of chairality and conformation on the calcium antagonist and calcium agonist activities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30: 1559-1578
50. Bertino JR. Encyclopedia of Cancer, Vol 2. New York, NY: Academic Press, **1997**, pp 760-782.

51. Love, B.; Goodman, M.M.; Tedeschi, R.; Macko, E. "Hantzsch-type" dihydropyridine hypotensive agents. *J. Med. Chem.* 1974, 17:956-965
52. Rodenkirchen, R.; Bayer, R.T.; Steiner, R.; Bossert, F.; Meyer, H.; Moller, E. Structure activity studies on Nifedipine in isolated cardiac muscle. *Naunyn. Schmied. Arch. Pharmacol.* **1986**, 310:69-78
53. Goldman, S.; Stoltzfass, J. 1,4- Dihydropyridines: effects of chirality and conformation on the calcium agonist activities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30:1559-1578
54. Akula, M.R.; Matowe, W.C.; Wolowyk, M.W.; Knus, E.E. Synthesis and calcium channel antagonist activity of alkyl cycloalkyl esters of Nifedipine containing pyridinyl substituents. *Drug Design and Delivery.* **1989**, 5:117-123.
55. Ramesh, M.; Matowe, W.C.; Knus, E.E.; Wolowyk, M.W. Synthesis and calcium channel antagonist activity of dialkyl 1,4- dihydro-2,6- dimethyl-4-[3-(1-methoxycarbonyl-4- substituted- 1,4- dihydropyridyl)]-3,5-pyridine dicarboxylates. *Drug Design and Delivery.* **1992**, 8:313-323.
56. Mahmudian, M.; Richards, W.G. Conformational distinction between dihydropyridine calcium antagonists and agonists. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 739-741
57. Wolowyk, M.W.; Knus, E.E. Design of calcium channel modulators. In: *calcium channel modulators in heart and smooth muscle: Basic mechanisms and pharmacological aspects*. Abraham, S., Amitai, G., (Editors) *Philadelphia*, **1990**, 367-376
58. Seeman, P.; Lec, T. Antipsychotic drugs: Direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine receptors. *Science*, **1975**, 188:1217-1219
59. Seeman, P.; Lec, T.; Chang-Wong, M.; Wong, K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic / dopaminic receptors. *Nature*, **1976**, 261:717-719.
60. Gould, R.J.; Murphy, K.M.M.; Reynolds, I.J.; Snyder, S.H. Ant schizophrenic drugs of the diphenyl butyl piperidine type acts as calcium channel antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, 80:5122-5125
61. Grantham, C.J.; Main, M.J.; Cannell, M.B. Fluspiriline block of N-type calcium current in NGF- differentiated PC12 cells. *Br. J. Phamacol.* **1994**, 111:483-488
62. Borowicz, K.K.; Gasior, M.; Kleinork, Z.; Czuezwaz, S.J. Influence of isradipine, nifedipine and dantrolene on the anticonvulsive action of conventional antiepileptics in mice. *European J. of Pharmacology*, **1997**, 323:45-51
63. Kawase, M.; Shah, A.; Gaveriya, H.; Motohashi, N.; Sakagami, H.; Varga, A.; Molnár, J. 3,5-dibenzoyl-1,4-dihydropyridines: synthesis and MDR reversal in tumor cells. *Bioorg Med Chem.* **2002** 10:1051-5.

64. Zhou, XF., Zhang, L.; Tseng, E.; Scott-Ramsay, E.; Schentag, JJ.; Coburn, RA.; Morris, ME. New 4-aryl-1,4-dihydropyridines and 4-arylpyridines as P-glycoprotein inhibitors. *Drug Metab Dispos.* **2005** 33:321-8. Epub 2004 Dec 7.
65. Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Increased accumulation of vincristine and Adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.* **1982** 42:4730-3.
66. Ferry, DR.; Traunecker, H.; Kerr, DJ. Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumours. *Eur J Cancer.* **1996** 32A:1070-81.
67. Tanabe, H.; Tasaka, S.; Ohmori, H.; Gomi, N.; Sasaki, Y.; Machida, T.; Iino, M.; Kiue, A.; Naito, S.; Kuwano, M. Newly synthesized dihydropyridine derivatives as modulators of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Bioorg Med Chem.* **1998** 6:2219-27
68. Tasaka, S.; Ohmori, H.; Gomi, N.; Iino, M.; Machida, T.; Kiue, A.; Naito, S.; Kuwano, M. Synthesis and structure-activity analysis of novel dihydropyridine derivatives to overcome multidrug resistance. *Bioorg Med Chem Lett.* **2001** 11:275-7.
69. Holtt, V.; Kouba, M.; Dietel, M.; Vogt, G. Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally effective in modulating drug transport by P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* **1992** 43:2601-8.
70. Molnár, J.; Szabo, D.; Mándi, Y.; Mucsi, I.; Fischer, J.; Varga, A.; König, S.; Motohashi, N. Multidrug resistance reversal in mouse lymphoma cells by heterocyclic compounds. *Anticancer Res.* **1998** Jul-Aug; 18(4C):3033-8.
71. Zamora, JM.; Pearce, HL.; Beck, WT. Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells. *Mol Pharmacol.* **1988** Apr; 33(4):454-62.
72. Ecker, G.; Huber, M.; Schmid, D.; Chiba, P. The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance. *Mol Pharmacol.* **1999** Oct; 56(4):791-6.
73. Shinoda H, Inaba M, Tsuruo T. In vivo circumvention of vincristine resistance in mice with P388 leukemia using a novel compound, AHC-52. *Cancer Res.* **1989** 49:1722-6.
74. Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Vincristine-resistant P388 leukemia cells contain a large amount of calcium. *Gann.* **1983** 74:619-21.
75. Dodic, N.; Dumaitre, B.; Daugan, A.; Pianetti, P. Synthesis and activity against multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells of new acridone-4-carboxamides. *J Med Chem.* **1995** 38:2418-26.
76. National Cell bank of Iran (NCBI) affiliated to Pasteur Institute of Iran

77. Huguet, EL.; McMahon, JA.; McMahon, AP.; Bicknell, R.; Harris, AL. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res.* **1994** May 15;54(10):2615-21.
78. ncbi. pasteur. ac. ir/ NCBIcode=C508
79. Gastl, GA.; Abrams, JS.; Nanus, DM.; Oosterkamp, R.; Silver, J.; Liu, F.; et al. Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int J Cancer.* 1993 Aug 19; 55(1):96-101.
80. ncbi. pasteur. ac. ir/ NCBIcode=C209
81. Perry, W. L. M. Experiments with intestinal smooth muscle. In: *Pharmacological Experiments on Isolates Smooth Muscle Preparation*, 2nd ed. Churchill Livingstone Company, Edinburg, **1970**, 58-62, 152
82. Shfíee, A.; Miri, R.; Dehpour, A. R.; Soleymani, F. Synthesis and calcium channel antagonist activity of nifedipine analogues containing nitroimidazolyl substituent in guinea-pig ileal smooth muscle. *Pharmaceutical Science.* **1996**, 2: 541-543
83. Miri, R.; Dehpour, A. R.; Azimi, M.; Shafíee, A. Synthesis and smooth muscle calcium channel antagonist effect of alkyl, aminoalkyl 1,4- dihydro-2,6- dimethyl-4-nitroimidazol-3,4- pyridine dicarboxylates. *Daru.* **2001**, 9(3&4): 40-45
84. Miri, R.; Javidnia, K.; Kebriaie-zadeh, A.; Niknahad, H.; Shaigani, N.; Semnianian, S.; Shafíee, A. synthesis and evaluation of pharmacological activities of 3,5- dialkyl-1,4- dihydro-2,6- dimethyl-4- nitroimidazol-3,5- pyridine dicarboxylates. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2003**, 336: 422-428
85. Longo DL, Approach to the patients with cancer, In: Harrison's Principles of Internal Medicine (16th Edition). Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo DL, Jamson JL. *McGraw Hill.* **2005**. pp.435-41
86. Miri, R.; Mehdipour, A. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16,(2008),p. 8329-8334
87. L.Van Zuylen, K. Nooter, A. Sparreboom and J. Verweij, *invest. New drugs* 18 (2008), p. 205.
88. M. Liscovitch and Y. Lavie, *IDrugs* 5 (2002), p. 349.

منابع فارسی

- ۱- دکتر عباس شفیعی، دکتر علی خلج، دکتر کتایون جاویدنیا، دکتر حجت صادقی علی آبادی، دکتر مسعود امانلو، دکتر رامین میری، شیمی دارویی ۱، صفحات ۲۰۷-۲۰۴ (۱۳۸۸)
- ۷- دکتر زهرا رضایی، سید محمد رضا جعفری، مکانیسم عمل و شیمی دارویی داروهای ضد سرطان، انتشارات تیمور زاده، نشر طبیب، صفحات ۲۳-۲۰ (۱۳۸۶)
- ۸- دکتر زهرا رضایی، سید محمد رضا جعفری، مکانیسم عمل و شیمی دارویی داروهای ضد سرطان، انتشارات تیمور زاده، نشر طبیب، صفحه ۳۸ (۱۳۸۶)
- ۹- دکتر عباس شفیعی، دکتر علی خلج، دکتر کتایون جاویدنیا، دکتر حجت صادقی علی آبادی، دکتر مسعود امانلو، دکتر رامین میری، شیمی دارویی ۱، صفحه ۲۴۲ (۱۳۸۸)
- ۱۰- دکتر عباس شفیعی، دکتر علی خلج، دکتر کتایون جاویدنیا، دکتر حجت صادقی علی آبادی، دکتر مسعود امانلو، دکتر رامین میری، شیمی دارویی ۱، صفحه ۲۵۳ (۱۳۸۸)
- ۱۱- دکتر زهرا رضایی، سید محمد رضا جعفری، مکانیسم عمل و شیمی دارویی داروهای ضد سرطان، انتشارات تیمور زاده، نشر طبیب، صفحه ۹۹ (۱۳۸۶)
- ۱۴- دکتر زهرا رضایی، سید محمد رضا جعفری، مکانیسم عمل و شیمی دارویی داروهای ضد سرطان، انتشارات تیمور زاده، نشر طبیب، صفحه ۹۹ (۱۳۸۶)
- ۲۲- پیمانی، پیام. بررسی اثرات سیتوتوکسیک مشتقات جدید چند حلقه ای حاوی پیریدین، پایان نامه دکتری عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ص ۲۷-۳۰ و ۴۲-۴۶؛ ۱۳۸۸
- ۸۹- سلیمی، سید حسین. بررسی اثرات سمیت سلولی برخی از مشتقات قرینه نیترو ایمیدازول- دی هیدروپیریدین. پایان نامه دکتری عمومی داروسازی. دانشکده داروسازی. دانشگاه علوم پزشکی شیراز. ص ۵۸. ۱۳۸۵.

۹۰- خوشنویس زاده، مهدی. طراحی و سنتز مشتقات آریل استر ۱و۴- دی هیدروپیریدین به عنوان عوامل ضد سل و بررسی اثر فارماکولوژیک مسدودکننده کانال کلسیم، پایان نامه دکتری عمومی داروسازی. دانشکده داروسازی. دانشگاه علوم پزشکی شیراز. ص ۷۰-۶۶. ۱۳۸۴

۹۱- جعفرپور، مهرناز. سنتز، ارزیابی اثر فارماکولوژی و مطالعه رابطه کمی ساختمان- اثر مشتقات جدید بیس (۴- نیترو آریل-۱و۴- دی هیدروپیریدین) با استخلاف اتیل در ناحیه ۵ استری، پایان نامه دکتری عمومی داروسازی. دانشکده داروسازی. دانشگاه علوم پزشکی شیراز. ص ۳۴-۲۱. ۱۳۸۶

Synthesis of new asymmetrical derivatives of 1,4- Dihydropyridines with pyridyl and alkyl esters in C₃ and C₅ situations and evaluation of their biologic effects

R. Miri, K. Javidnia, O. R. Firuzi, E. Mansourabadi

Dep. of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Cancer is one of the leading causes of death in the world. However, the incidence and mortality of cancer differs among racial and ethnic groups. For the treatment of cancer, methods such as surgery, radiotherapy and chemotherapy are used and chemotherapy is the most common treatment. Resistance to cytotoxic drugs remains an obstacle in the successful therapy of various cancers. Therefore, several investigations have been focused on finding agents which reverses multiple drug resistance (MDR). 1,4-Dihydropyridines (DHPs) are one of the major classes of calcium channel blockers, and it has been shown that these agents are a new class of drug resistance reversers in cancer treatment. For the time being, researchers are trying to use drugs to have the most effects on neoplastic cells and minimum side effects on normal cells.

In this study, the new asymmetrical derivatives of DHPs (14 compounds) were designed and synthesized by a modified Hanstzch reaction, in which different aryl and alkyl esters in C₃ and C₅ of the DHP ring respectively. In addition nitro imidazolyl and nitro phenyl moiety are substituted at C₄ position of dihydropyridine ring. The compounds were purified by preparative thin layer chromatography and identified by mass spectroscopy, IR and ¹H-NMR.

The intrinsic cytotoxicity was evaluated on 4 cell lines (Hela, Raji, MCF-7, LS-180) and the results compared with doxorubicin as positive control. The range of their IC₅₀ was between 6.4-88.9 μM. The compounds 7g and 7h were the best cytotoxic drugs in all cell lines. Furthermore, their Ca²⁺ channel antagonist activity has been measured by using high K⁺ concentration in guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle as their potential adverse effects that in this section, compound 7d had the highest Ca²⁺ channel antagonist activity. According to the results, the MDR reversal activity of these compounds will be examine in the resistance cancer cell lines in future.

Key word: DHPs, Cytotoxic activity, Ca²⁺ channel blocker



امضاء

پایان نامه جهت اخذ دکترای داروسازی

الهام منصورآبادی

هیئت داوران

نام و نام خانوادگی

.....دکتر رامین میری (استاد راهنما)

.....دکتر کتایون جاوید نیا (استاد راهنما)

.....دکتر امید رضا فیروزی (استاد راهنما)

.....دکتر صغری خواب نادیده (استاد داور)

.....دکتر سارا رسول امینی (استاد داور)

.....رئیس دانشکده: دکتر حسین نیک نهاد

.....معاون پژوهشی دانشکده: دکتر زهرا رضایی

این پایان نامه با نمره ۱۹/۸۲ (نوزده و هشتاد و دو صدم) مورد تصویب قرار گرفت.

دانشکده داروسازی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان فارس

اردیبهشت ۱۳۸۹