

طراحی، سنتز، مطالعه داکینگ مولکولی و ارزیابی بیولوژیکی مشتقات هتروآریل ۲-فنوکسی پیریدین-۳-ایل به عنوان مهارکننده آنزیم لیپواکسیژناز

زینب نجاری^۱، زهره میرجلیلی^۱، حمید ندری^۱، فائزه ربانی^۱، علیرضا مرادی^{۱*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: آنزیم لیپواکسیژناز در بیوسنتز لوکوترین‌ها نقش دارد که اثرات فارماکولوژیک مختلفی در بدن دارند. اثرات درمانی مهار این آنزیم در برخی از بیماری‌ها مانند آسم، سرطان و آلزایمر به اثبات رسیده است. لذا مهارکننده‌های این آنزیم می‌توانند به عنوان درمان دارویی در برخی از شرایط پاتولوژیک و بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند. در این مطالعه مشتقات هتروآریل ۲-فنوکسی پیریدین-۳-ایل سنتز و اثرات مهار آن‌ها بر آنزیم لیپواکسیژناز بررسی شده است.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی-کاربردی، مشتقات مورد نظر به عنوان مهارکننده لیپواکسیژناز به روش‌های مرسوم طی چند مرحله سنتز شدند. سپس ساختار ترکیبات با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز، جرمی و رزونانس مغناطیسی هسته مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت اثرات مهار لیپواکسیژناز این ترکیبات بررسی و مطالعات داکینگ مولکولی روی قوی‌ترین ترکیب صورت گرفت.

نتایج: ترکیبات با بازده بالا سنتز شده و اثرات مهار لیپواکسیژناز خوبی ($IC_{50} = 100-179 \mu M$) در مقایسه با استاندارد کوئرستین ($IC_{50} = 58.5 \mu M$) از خود نشان دادند. در این بین ترکیب ترکیب 7a (۵-۲-فنوکسی پیریدین-۳-ایل)-۱-و ۳-اکسادیازول-۲-یل-۳H-تیون (قوی‌ترین اثرات را از خود نشان داد و مطالعات داکینگ مولکولی روی این ترکیب نشان داد که به خوبی می‌تواند در اکتیو سایت آنزیم قرار گیرد).

نتیجه‌گیری: ترکیبات سنتز شده اثرات مهار خوبی بر آنزیم لیپواکسیژناز از خود نشان دادند و مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد این ترکیبات به خوبی در اکتیو سایت آنزیم قرار می‌گیرند. لذا می‌توانند به عنوان ترکیب اولیه جهت مطالعات بیشتر در جهت کشف داروهای جدید مهارکننده لیپواکسیژناز مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: مهارکننده‌های لیپواکسیژناز، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی، مشتقات ۲-فنوکسی پیریدین-۳-ایل

ارجاع: نجاری زینب، میرجلیلی زهره، ندری حمید، ربانی فائزه، مرادی علیرضا. طراحی، سنتز، مطالعه داکینگ مولکولی و ارزیابی بیولوژیکی مشتقات هتروآریل ۲-فنوکسی پیریدین-۳-ایل به عنوان مهارکننده آنزیم لیپواکسیژناز. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۷): ۵۸۳-۹۸.

۱-گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
*(نویسنده مسئول): تلفن ۰۳۵۳۸۲۰۳۴۱۹، پست الکترونیکی: moradiar@ssu.ac.ir، صندوق پستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۴۹

مقدمه

آنزیم‌های لیپواکسیژناز از دسته پروتئین‌های آهن‌دار فاعد گروه هم و سولفور هستند که مسئول اکسایش اسیدها و استرهای چرب غیر اشباع شامل آراشیدونیک اسید و لینولئیک اسید به مشتقات هیدروپراکسی در گیاهان، قارچ‌ها و حیوانات می‌باشند. لیپواکسیژنازها به واسطه موقعیت اکسیژناسیون آراشیدونیک اسید به چهار گروه اصلی ۵-، ۸-، ۱۲- و ۱۵- لیپواکسیژناز طبقه بندی می‌شوند (۳-۱). فسفولیپیدهای غشاء سلول در اثر فعالیت آنزیم فسفولیپاز به آراشیدونیک اسید تبدیل می‌گردند. واسطه‌های لیپیدی تولید شده از آراشیدونیک اسید به دنبال فعالیت لیپواکسیژنازها شامل لکوترین‌ها، لیپوکسین‌ها و فرم‌های مختلف محصولات اکسیدی فسفولیپیدها شامل هیدروکسی ایکوزاتترانوئیک اسیدها و هپوکسیلین‌ها نقش مهمی در فرآیندهای التهابی، فاگوسیتوز و اتوفاژی ایفا می‌کنند (۸-۳). لکوترین‌ها توسط گلوبول‌های سفید ترشح می‌شوند و نقش عمده‌ای را در ایجاد عارضه‌های التهابی دستگاه تنفسی ایفا می‌نمایند که آنزیم ۵- لیپواکسیژناز انسانی (5-LOX) به عنوان هدفی مناسب جهت کاهش تولید لوکوترین‌ها و بهبود عارضه آسم، رینیت، التهاب‌های حاد و مزمن، آترواسکلروز و آرتریت شناخته و تثبیت شده است (۹،۱۰). در حالی که نقش آن در ایجاد سرطان هنوز مشخص نگردیده است (۱۱،۱۲). بر اساس مطالعات اخیر، از آن جایی که متابولیت‌های حاصل از آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز در روند ایجاد و پیش روی آتروژنز (۱۳،۱۴) و سرطان‌های خاصی (۱۵) از جمله سرطان پروستات تاثیرگذار است بنابراین آنزیم مذکور به عنوان هدف جالب توجه جهت درمان برخی از سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی - عروقی معرفی شده است (۱۶). آنزیم 15-LOX توانایی اکسیژناسیون اسیدهای چرب موجود در غشاهای بیولوژیکی و لیپوپروتئین‌ها (Low Density Lipoprotein) را دارا بوده و اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها در شکل‌گیری مراحل اولیه آترواسکلروز نقش اساسی و محوری را ایفا می‌کنند (۱۷). آنزیم 15-LOX در هنگام عارضه آترواسکلروز به میزان قابل توجهی در ماکروفاژها

بیان می‌شود. لذا می‌توان فرض نمود که مهار این آنزیم باعث کاهش اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها گشته و در نتیجه خطر به روز این بیماری را کاهش خواهد داد (۱۳،۱۴). هم چنین تحقیقات نشان داده است که آنزیم 15-LOX در تولید متابولیت‌های حاصل از اکسایش آراشیدونیک اسید و لینولئیک اسید به عنوان عوامل پیش التهاب و پیش درد ایفای نقش می‌نماید (۸،۱۷،۱۸). سه مسیر اساسی به منظور مهار فعالیت لیپواکسیژناز شناخته شده است (۱۷) که عبارتند از: الف) بازدارنده‌های کاهشی یا آنتی اکسیدان‌ها که در چرخه کاهشی 15-LOX تداخل ایجاد می‌نمایند. ب) عوامل کمپلکس دهنده با آهن ج) بازدارنده‌های رقابتی غیر کاهشی که با آراشیدونیک اسید و یا سایر اسیدهای چرب غیر اشباعی ۱ و ۴ به منظور اتصال به جایگاه فعال آنزیم رقابت می‌نمایند. از جمله مهارکننده‌های لیپواکسیژناز می‌توان به ترکیبات آریل هتروسیکل (اکسادی آزول (۲۱-۱۹)، تری آزول (۲۴-۲۲) و پیریدین (۲۶،۲۵،۲۲) و فنوکسی (۲۷) اشاره کرد. مشتقات ۴،۳،۱- اکسادی آزول از دسته ترکیبات هتروسیکل هستند که طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی شامل اثرات بارز آنتی پرولیفراتیو (۲۸)، ضد هیپاتیت (۲۹)، ضد تومور (۳۰)، ضد سرطان (۳۱)، ضد التهابی (۳۲) از خود نشان داده‌اند. مشتقات ۴،۲،۱- تری آزول نیز از دسته ترکیبات هتروسیکل می‌باشند که به خوبی در منابع علمی به دلیل فعالیت‌های فارماکولوژیکی گسترده ضد ویروسی (۳۴، ۳۳)، ضد باکتری (۳۶، ۳۵)، ضد قارچی (۳۷)، ضد تشنجی (۳۸)، ضد دردی (۴۰، ۳۹)، ضد آریتمی (۴۱) و ضد التهابی (۴۳، ۴۲) شناخته شده‌اند. مشتقات مختلف پیریدین به عنوان مولکول‌های جدید با اثر ضد التهابی (۴۴)، ضد ویروسی (۴۶، ۴۵)، ضد میکروبی (۴۸، ۴۷)، ضد درد (۴۴)، ضد سرطان (۴۵، ۴۴)، ضد سایکوز (۴۹) و فعالیت‌های حشره کشی (۵۰) مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. با توجه به مطالعات، مشتقات فنوکسی پیریدین نیز دارای اثرات ضد انعقادی (۵۲، ۵۱)، ضد میکروبی (۴۷)، ضد ویروسی (۵۳)، ضد آلزایمر (۵۴)، ضد سرطان (۵۴) و ضد تشنج (۵۵) می‌باشد. با توجه به اثرات فارماکولوژیک برجسته و

حلال با استفاده از دستگاه روتاری (Rotary Evaporator , Heidolph Hei-VAP Value Digital) تحت خلا حذف شده و پودر به دست آمده در ارلن مناسب مقاوم به حرارت ریخته شد. پودر حاصل در زیر هود حرارت داده شد تا ذوب شود و بعد از ذوب شدن با همزن شیشه‌ای به مدت پنج دقیقه همزده شد. بعد مخلوط کنار گذاشته شد تا سرد شود و بعد از سرد شدن تا دمای اتاق به آن ۲۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد. بعد از حل شدن کامل رسوب به مخلوط واکنش قطره قطره اسید کلریدریک شش نرمال اضافه شد تا زمانی که رسوب جدیدی تشکیل نشود. رسوب به دست آمده صاف و با استفاده از کریستالیزاسیون مجدد خالص سازی شد.

۲- فنوکسی نیکوتینیک اسید

$C_{12}H_9NO_3$; MW: 215; Yield, 80%; mp 181-183 °C; IR (KBr) 3120-2801 (OH), 1716 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 13.3 (bs, 1H, COOH), 8.27-8.25 (m, 2H, $H_{4,6}$, Pyr), 7.43-7.39 (m, 2H, $H_{3,5}$, Ph-O), 7.24-7.19 (m, 2H, H_4 , Ph-O, H_5 , Pyr), 7.11-7.10 (m, 2H, $H_{2,6}$, Ph-O).

۲- (۲-کلروفنوکسی) نیکوتینیک اسید

$C_{12}H_8ClNO_3$, MW: 249.5; Yield, 51%; mp 185-187 °C; IR (KBr) 3088-2806 (OH), 1700 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 13.40 (bs, 1H, COOH), 8.30-8.27 (m, 1H, H_4 , Pyr), 8.24-8.22 (m, 1H, H_6 , Pyr), 7.56 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H_3 , Ph-O), 7.42-7.39 (m, 1H, H_5 , Ph-O), 7.30-7.27 (m, 2H, $H_{4,6}$, Ph-O), 7.25-7.22 (m, 1H, H_5 , Pyr).

۲- (۴-فلوروفنوکسی) نیکوتینیک اسید

$C_{12}H_8FNO_3$; MW: 233, Yield, 63%; mp 188-190 °C; IR (KBr) 3078-2817 (OH), 1700 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 13.27 (bs, 1H, COOH), 8.26-8.24 (m, 2H, $H_{4,6}$, Pyr), 7.26-7.21 (m, 3H, $H_{3,5}$, Ph-O, H_5 , Pyr), 7.17-7.14 (m, 2H, $H_{2,6}$, Ph-O).

روش کلی سنتز مشتقات اتیل ۲-فنوکسی نیکوتینات

مقدار ۱۰ میلی‌مول از اسید سنتز شده در مرحله قبل در ۲۰ میلی لیتر اتانول مطلق حل شده و به آن ۱ سی سی اسید

اثرات مهارکنندگی لیپواکسیژناز ذکر شده حلقه های فنوکسی پیریدین، اکسادی‌آزول و تری‌آزول؛ مشتقات هتروآریل ۲- فنوکسی پیریدین ۳- ایل به روش هیبریداسیون (ترکیب گروه فارماکوفوری فنوکسی پیریدین با حلقه اکسادیازول و تریازول) طراحی، سنتز و بررسی اثرات مهارکنندگی لیپواکسیژناز آن‌ها انجام گرفت.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع بنیادی- کاربردی بوده و با استفاده از آنزیم در محیط آزمایشگاه صورت گرفته است. تمام مواد مورد استفاده در سنتز و تست‌های بیولوژیک از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد و بعد از تایید ساختار به روش طیف سنجی مادون قرمز بدون خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت. پیشرفت واکنش‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از ورقه‌های آلومینیمی آماده پوشش داده شده با سیلیکاژل، ساخت شرکت Merck، در طول موج ۲۵۴ نانومتر کنترل شد. نقطه ذوب ترکیبات با استفاده از دستگاه اندازه گیری نقطه ذوب الکتروترمال (Electrothermal Engineering Ltd., UK) ثبت شد. طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (1H NMR) با استفاده از دستگاه بروکر ۳۰۰ (Bruker FT-300 , Bruker Bioscience, USA) , MHz انجام شد و از تترامیل سیلان (TMS) به عنوان استاندارد داخلی و کلروفرم دوتره ($CDCl_3$) به عنوان حلال استفاده شد. طیف‌های مادون قرمز ترکیبات با استفاده از دستگاه طیف سنج مادون قرمز (Perkin-Elmer 240-C, Beaconsfield, UK) گرفته شد. جهت خالص‌سازی نیز از روش کریستالیزاسیون مجدد با حلال مناسب و یا روش کروماتوگرافی ستونی با سیلیکاژل (مش ۲۳۰-۷۰) استفاده شد.

روش کلی سنتز مشتقات ۲-فنوکسی نیکوتینیک اسید

ابتدا مقدار ۲/۲ میلی مول از فلز سدیم به ۲۰ میلی لیتر متانول با احتیاط اضافه شده و کنار گذاشته شد تا واکنش سدیم با متانول خاتمه پیدا کند. سپس به این مخلوط، یک میلی مول نیکوتینیک اسید و یک میلی مول فنل مورد نظر اضافه شد و به ۱۰ دقیقه مخلوط واکنش هم زده شد. سپس

سولفوریک غلیظ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۸ ساعت حرارت داده شد. سپس اتانول با دستگاه روتاری تا حد امکان حذف شده و به باقی مانده بعد از سرد کردن توسط حمام یخ ۲۰ سی سی محلول سدیم کربنات ۱۰٪ اضافه شد و استر حاصل ۲ بار با کلروفرم (۱۰ میلی لیتر) از فاز آبی استخراج شد. فاز کلروفرمی حاصل توسط سدیم سولفات انیدر خشک شده و بعد از حذف حلال استر به دست آمد. استر حاصل با استفاده از کروماتوگرافی ستونی (سیلیکاژل) و مخلوط حلال اتیل استات - اتردوپترول (۷۰-۳۰) خالص شد.

اتیل-۲- فنوکسی نیکوتینات

$C_{14}H_{13}NO_3$; MW: 243; Yield, 68%; mp 48-50 °C; IR (KBr) 1731 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.27-8.25 (m, 2H, $H_{4,6}$, Pyr), 7.41 (t, J = 8.0 Hz, 2H, $H_{3,5}$, Ph-O), 7.21 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H_4 , Ph-O), 7.16 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $H_{2,6}$, Ph-O), 7.05 (dd, J = 7.5, 4.5 Hz, 1H, H_5 , Pyr), 4.40 (q, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2), 1.39 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3);

اتیل-۲- (۲- کلرو فنوکسی) نیکوتینات

$C_{14}H_{12}ClNO_3$; MW: 277.5; Yield, 70%; mp 58-59 °C; IR (KBr) 1710 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.29 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 1H, H_4 , Pyr), 8.23 (dd, J = 5.0, 2.0 Hz, 1H, H_6 , Pyr), 7.47 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, H_3 , Ph-O), 7.35-7.31 (m, 1H, H_5 , Ph-O), 7.26 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H, H_6 , Ph-O), 7.21-7.18 (m, 1H, H_4 , Ph-O), 7.07 (dd, J = 7.5, 5.0 Hz, 1H, H_5 , Pyr), 4.43 (q, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2), 1.40 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3);

اتیل-۲- (۴- فلوروفنوکسی) نیکوتینات

$C_{14}H_{12}FNO_3$; MW: 261; Yield, 71%; mp 90-92 °C; IR (KBr) 3083(CH, aromatic), 1726 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.23-8.21(m, 2H, $H_{4,6}$, Pyr), 7.14-7.06 (m, 5H, H_5 , Pyr and arom), 4.41 (q, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2), 1.39 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3);

روش کلی سنتز مشتقات هیدرازیدی: مقدار ۱ میلی مول از استر مرحله قبل در ۱۰ سی سی اتانول حل شده و به آن ۵

میلی مول هیدرازین هیدرات اضافه شد. مخلوط به مدت ۲/۵ ساعت حرارت داده شد. سپس حجم حلال تا حدود نصف تحت خلا با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ شده و به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد تا کریستال های محصول به طور کامل تشکیل شود. سپس کریستال های حاصل صاف شده و با اتانول سرد ۲ بار شسته شد.

۲- (۴- فلوروفنوکسی) نیکوتینو هیدرازید

$C_{12}H_{10}FN_3O_2$; MW: 247; Yield, 95%; mp 202-204 °C; IR (KBr) 3320, 3192 (NH), 1655 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR($CDCl_3$) δ 9.54 (bs, 1H, NH), 8.15 (dd, J = 5.0, 2.0 Hz, 1H, H_6 , Pyr), 8.04 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 1H, H_4 , Pyr), 7.27-7.21 (m, 5H, H_5 , Pyr & arom), 4.60 (bs, 2H, NH_2);

۲- فنوکسی نیکوتینو هیدرازید

$C_{12}H_{11}N_3O_2$; MW: 229; Yield, 92%; mp 201-203 °C; IR (KBr) 3320, 3272 (NH), 1642 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 9.03 (bs, 1H, NH), 8.62 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 1H, H_4 , Pyr), 8.22 (dd, J = 4.5, 2.0 Hz, 1H, H_6 , Pyr), 7.45 (t, J = 7.5 Hz, 2H, $H_{3,5}$, Ph-O), 7.30 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H_4 , Ph-O), 7.18-7.13 (m, 3H, $H_{2,6}$, Ph-O & H_5 , Pyr), 4.23 (bs, 2H, NH_2);

۲- (۲- کلرو فنوکسی) نیکوتینو هیدرازید

$C_{12}H_{10}ClN_3O_2$; MW: 263.5; Yield, 94%; mp 217-219 °C; IR (KBr) 3307, 3190 (NH), 1646 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 9.53 (bs, 1H, NH), 8.14 (dd, J = 5.0, 2.0 Hz, 1H, H_6 , Pyr), 8.09 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 1H, H_4 , Pyr), 7.56 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H_3 , Ph-O), 7.44-7.38 (m, 2H, $H_{5,6}$, Ph-O), 7.31-7.28 (m, 1H, H_4 , Ph-O), 7.23 (dd, J = 7.5, 5.0 Hz, 1H, H_5 , Pyr), 4.63 (bs, 2H, NH_2);

روش کلی سنتز مشتقات نهایی آمینواکسادیازولی

یک میلی مول از هیدرازید مربوطه در ۱۵ سی سی دی اکسان حل شده و به آن یک میلی مول بی کربنات سدیم که در یک میلی لیتر آب حل شده بود اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط هم زده شد و به آن با احتیاط کامل و در زیر

& H₅, Pyr), 4.29 (q, *J* = 7 Hz, 2H, CH₂), 1.34 (t, *J* = 7 Hz, 3H, CH₃);

۳- اتوکسی-۵- [۲- (۲- کلوروفنوکسی) پیریدین-۳- ایل]-

۴H-۴و۲و۱-تریازول

C₁₅H₁₃ClN₄O₂; MW: 316 ; Yield, 81%; mp 113-115 °C ; IR (KBr) 3165 (NH), 1572 (NH) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 13.47 (bs, 1H, NH), 8.43 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H₄, Pyr), 8.14 (dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 1H, H₆, Pyr), 7.57 (dd, *J* = 8, 1.5 Hz, 1H, H₃, Ph-O), 7.45-7.39 (m, 2H, H_{4,5}, Ph-O), 7.32-7.26 (m, 2H, H₆, Ph-O & H₅, Pyr), 4.31 (q, *J* = 7 Hz, 2H, CH₂), 1.34 (t, *J* = 7 Hz, 3H, CH₃);

۳- اتوکسی-۵- [۲- (۴- فلوروفنوکسی) پیریدین-۳- ایل]-

۴H-۴و۲و۱-تریازول

C₁₅H₁₃FN₄O₂; MW: 300; Yield, 77%; mp 157-159 °C ; IR (KBr) 3304 (NH), 1580 (NH) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 13.46 (bs, 1H, NH), 8.40 (dd, *J* = 8, 2 Hz, 1H, H₄, Pyr), 8.17 (dd, *J* = 5, 2 Hz, 1H, H₆, Pyr), 7.28-7.25 (m, 4H, Ph-O), 7.13 (dd, *J* = 8, 5 Hz, 1H, H₅, Pyr), 4.29 (q, *J* = 7 Hz, 2H, CH₂), 1.34 (t, *J* = 7 Hz, 3H, CH₃);

روش کلی سنتز مشتقات نهایی اکسادیازول-۲- تیون

ابتدا یک میلی مول هیدرازید با یک میلی مول پتاس در ۲۰ میلی لیتر اتانول مطلق ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه استیر شد. سپس به مخلوط، ۱/۵ میلی مول کربن دی سولفید اضافه شده و مخلوط واکنش به مدت ۴۸ تا ۶۰ ساعت (تا زمانی که گاز H₂S از انتهای مبرد خارج نشود) حرارت داده شد. سپس حلال به طور کامل تحت خلاء با دستگاه روتاری حذف شد و به رسوب حاصل آب اضافه شد. فاز آبی بدست آمده ۲ بار با دی کلرومتان شسته شد. در نهایت فاز آبی با اسید کلریدریک رقیق اسیدی شد. رسوب حاصل صاف و با آب شسته شد. جهت ساخت مشتقات متیل تیو مربوطه، یک میلی مول رسوب حاصل در این مرحله بعد از خشک شدن در پنج میلی لیتر اتانول مطلق حل شده و به آن سه میلی لیتر محلول سود ۱۰٪ اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه هم زدن، به آن ۱/۵ میلی مول متیلیدید

هود ۱/۵ میلی مول سیانوژن بروماید اضافه شد و به مدت حدود ۲ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. بعد از اتمام واکنش حلال با دستگاه روتاری تحت خلاء تبخیر شده و رسوب حاصل با استفاده از کروماتوگرافی ستونی (سیلیکاژل) و مخلوط کلروفرم/اتانول (۱:۲۰) خالص شد.

۵- [۲- (۲- کلوروفنوکسی) پیریدین-۳- ایل]-۴و۳و۱-

اکسادیازول-۲- آمین

C₁₃H₉ClN₄O₂; MW: 288; Yield, 85%; mp 213-215 °C ; IR (KBr) 3328 (NH), 1662 (NH) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.26 (dd, *J* = 7.5, 2 Hz, 1H, H₄, Pyr), 8.18 (dd, *J* = 5, 2 Hz, 1H, H₆, Pyr), 7.57 (dd, *J* = 8, 1 Hz, 1H, H₃, Ph-O), 7.44-7.40 (m, 1H, H₅, Ph-O), 7.36-7.30 (m, 5H, H₅, Pyr & H_{4,6}, Ph-O & NH₂);

۵- [۲- (۴- فلوروفنوکسی) پیریدین-۳- ایل]-۴و۳و۱-

اکسادیازول-۲- آمین

C₁₃H₉FN₄O₂; MW: 272; Yield, 91%; mp 181-183 °C; IR (KBr) 3421 (NH), 1638 (NH) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.24-8.20 (m, 2H, H_{4,6}, Pyr), 7.34 (bs, 2H, NH₂), 7.29-7.19 (m, 5H, H₅, Pyr & arom);

روش کلی سنتز مشتقات نهایی تریازولی

مقدار یک میلی مول مشتق آمینواکسادیازول سنتز شده در مرحله قبل در میلی لیتر اتانول مطلق حل شده و به آن ۱/۲ میلی مول پتاس اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک شب حرارت داده شد. سپس حلال تحت خلاء تبخیر شده و رسوب حاصل با آب شسته شد. محصول به دست آمده با کروماتوگرافی ستون (سیلیکاژل) و مخلوط کلروفرم/اتانول (۱:۲۰) خالص شد.

۳- اتوکسی-۵- [۲- (۲- فنوکسی) پیریدین-۳- ایل]-۴H-

۴و۲و۱-تریازول

C₁₅H₁₄N₄O₂; MW: 282; Yield, 78%; mp 95-97 °C ; IR (KBr) 3409 (NH), 1580 (NH) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 13.44 (bs, 1H, NH), 8.38 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H₄, Pyr), 8.17 (dd, *J* = 5, 2 Hz, 1H, H₆, Pyr), 7.43 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{3,5}, Ph-O), 7.27-7.20 (m, 4H, H_{2,4,6}, Ph-O

NMR (CDCl₃) δ 8.32 (d, J = 7 Hz, 1H, H₄, Pyr), 8.20 (d, J = 4 Hz, 1H, H₆, Pyr), 7.44 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H_{3,5}, Ph-O), 7.28-7.21 (m, 4H, H_{2,4,6}, Ph-O & H₅, Pyr), 2.67 (s, 3H, SCH₃);

۲- (۲- (۲- کلرو فنوکسی) پیریدین -۳- ایل) -۵- متیل تیو- او۳- اکسادیازول

C₁₄H₁₀ClN₃O₂S; MW: 319; Yield, 75%; mp 128-130 °C; IR (KBr) 3082 (CH, aromatic) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.43 (dd, J = 7.5, 2 Hz, 1H, H₄, Pyr), 8.29 (dd, J = 4.5, 2 Hz, 1H, H₆, Pyr), 7.60 (t, J = 8.5 Hz, 1H, H₃, Ph-O), 7.44-7.41 (m, 1H, H₅, Ph-O), 7.38-7.30 (m, 3H, H_{4,6}, Ph-O & H₅, Pyr), 2.76 (s, 3H, SCH₃);

۲- (۲- (۴- فلوروفنوکسی) پیریدین -۳- ایل) -۵- متیل تیو- او۳- اکسادیازول

C₁₄H₁₀FN₃O₂S; MW: 303; Yield, 78%; mp 160-162 °C; IR (KBr) 3049 (CH, aromatic) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.21 (dd, J = 7.5, 2 Hz, 1H, H₄, Pyr), 8.16 (dd, J = 4.5, 2 Hz, 1H, H₆, Pyr), 7.23 (dd, J = 7.5, 4.5 Hz, 1H, H₅, Pyr), 7.17 (t, J = 8.5, 2H, H_{3,5}, Ph-O), 7.13-7.09 (m, 2H, H_{2,6}, Ph-O), 2.66 (s, 3H, SCH₃);

روش سنجش مهار آنزیم لیپواکسیژناز

میزان مهار لیپواکسیژناز ترکیبات مورد نظر توسط یک روش اسپکتروفوتومتریک که قبلاً گزارش شده است، با کمی تغییرات اندازه گیری شد (۵۶). بدین منظور مواد مورد نظر در دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شده و رقت های مختلفی از آن تهیه شد، به نحوی که غلظت های مختلف به توانند آنزیم را بین ۲۰ تا ۸۰ درصد مهار کنند. جهت تهیه محلول آنزیم، پودر لیوفیلیزه آن در بافر فسفات (pH = 8) که حاوی ۲۵ درصد گلیسرین بود حل شد. محلول سوبسترا نیز با حل کردن لینولئیک اسید در اتانول تهیه شد. جهت انجام تست در کووت از جنس کوارتز، بافر فسفات (pH = 8) به میزان سه میلی لیتر و آنزیم (غلظت نهایی 167 U/ml (Soybean lipoxygenase) اضافه شد. سپس مخلوط به مدت ۴ دقیقه در دمای ۲۵ درجه

اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۱-۲ ساعت با همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس به آن ۱۰ میلی لیتر آب اضافه شد و محصول با دی کلرومتان استخراج شد. فاز دی کلرومتان با سدیم سولفات بدون آب خشک شده و حلال تحت خلا با استفاده از روتاری حذف شد. به وسیله کروماتوگرافی ستون و فاز متحرک دی کلرومتان/متانول (۱:۲۰) خالص سازی شد.

۵- (۲- فنوکسی پیریدین -۳- ایل) -۴- او۳- اکسادیازول -۲- تیون

C₁₃H₉N₃O₂S; MW: 271; Yield, 91%; mp 217-219 °C; IR (KBr) 3200 (NH), 1495 (NH), 1339 (C=S) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.33-8.29 (m, 2H, H_{4,6}, Pyr), 7.43 (t, J = 8 Hz, 2H, H_{3,5}, Ph-O), 7.32 (dd, J = 7.5, 5 Hz, 1H, H₅, Pyr), 7.25 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H₄, Ph-O), 7.16 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H_{2,6}, Ph-O);

۵- (۲- (۲- کلرو فنوکسی) پیریدین -۳- ایل) -۴- او۳- اکسادیازول -۲- تیون

C₁₃H₈ClN₃O₂S; MW: 305; Yield, 84%; mp 225-227 °C; IR (KBr) 3044 (NH), 1347 (C=S) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.35 (dd, J = 7.5, 2 Hz, 1H, H₄, Pyr), 8.29 (dd, J = 4.5, 2 Hz, 1H, H₆, Pyr), 7.57 (dd, J = 8, 1.5 Hz, 1H, H₃, Ph-O), 7.44-7.41 (m, 1H, H₅, Ph-O), 7.38-7.30 (m, 3H, H_{4,6}, Ph-O & H₅, Pyr);

۵- (۲- (۴- فلوروفنوکسی) پیریدین -۳- ایل) -۴- او۳- اکسادیازول -۲- تیون

C₁₃H₈FN₃O₂S; MW: 289; Yield, 89%; mp 211-213 °C; IR (KBr) 3200 (NH), 1499 (NH), 1341 (C=S) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.23 (dd, J = 7.5, 2 Hz, 1H, H₄, Pyr), 8.19 (dd, J = 4.5, 2 Hz, 1H, H₆, Pyr), 7.25 (dd, J = 7.5, 4.5 Hz, 1H, H₅, Pyr), 7.18 (t, J = 8.5 Hz, 2H, H_{3,5}, Ph-O), 7.13-7.09 (m, 2H, H_{2,6}, Ph-O);

۲- (متیل تیو) -۵- (۲- فنوکسی پیریدین -۳- ایل) -۴- او۳- اکسادیازول : C₁₄H₁₁N₃O₂S; MW: 285; Yield, 81%; mp 109-111 °C; IR (KBr) 3057 (CH, aromatic) cm⁻¹; ¹H

شد $size_x=15$, $size_y=15$, $size_z=15$, $center_x=19.693$, $center_y=0.054$, $center_z=17.628$, $exhaustiveness=100$ سایر پارامترهای داکینگ بر اساس مقادیر پیش فرض تنظیم شدند. در نهایت بهترین نحوه قرارگیری بر اساس بهترین انرژی اتصال به رسپتور از نتایج داکینگ استخراج شد و اتصالات لیگاند با پروتئین با استفاده از نرم افزار Chimera 1.12 مورد مطالعه قرار گرفت (۶۰).

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تایید شده است. (کد اخلاق: IR.SSU.MEDICINE.REC.1394.286)

نتایج

شیمی

ترکیبات طراحی شده با بازده بالایی (۹۱-۷۵ درصد) طی چند مرحله سنتز شدند (شماتیک ۱). در هر مرحله جهت اطمینان از پیشرفت واکنش از کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. بعد از جداسازی و خالص سازی محصول در هریک از مراحل سنتز، ساختار ترکیبات توسط روش طیف سنجی مادون قرمز (IR) و رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) تایید شد. ساختار ترکیبات سنتز شده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن ها در جدول ۱ آمده است. بعد از تأیید ساختار نهایی ترکیبات روی آنزیم لیپواکسیژناز تست شدند.

مهار آنزیم لیپواکسیژناز

نتایج حاصل از تست آنزیم لیپواکسیژناز نشان داد که این ساختار ها قابلیت مهار آنزیم را با قدرت قابل قبولی دارند که اثرات ترکیبات قابل مقایسه با ترکیب استاندارد کوئرستین می باشد (جدول ۱). همان گونه که در نتایج آمده است ترکیبات سنتز شده با غلظت بین ۱۷۹-۱۰۰ میکرومول بر لیتر توانسته اند ۵۰ درصد فعالیت آنزیم را مهار کنند، در مقابل کوئرستین به عنوان استاندارد با غلظت ۵۸/۵ میکرومول بر لیتر توانست ۵۰ درصد فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز را مهار کند. در بین ساختار های سنتز شده، ترکیب 7a بهترین اثر را از خود

سانتی گراد انکوبه شده و به آن سوبسترا (لینولنیک اسید غلظت نهایی ۱۳۴ میکرومولار) اضافه شد. سپس جذب مخلوط در طول موج ۲۳۴ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه اندازه گیری شد. جهت اندازه گیری میزان مهار ترکیبات سنتز شده، بعد از اضافه کردن آنزیم در مرحله قبل، مهارکننده به مخلوط اضافه شده و بعد از انکوبه کردن مانند قبل سوبسترا اضافه شده و جذب مخلوط به مدت ۶۰ ثانیه اندازه گیری شد. میزان درصد مهار برای هر آزمایش از فرمول زیر محاسبه شد.

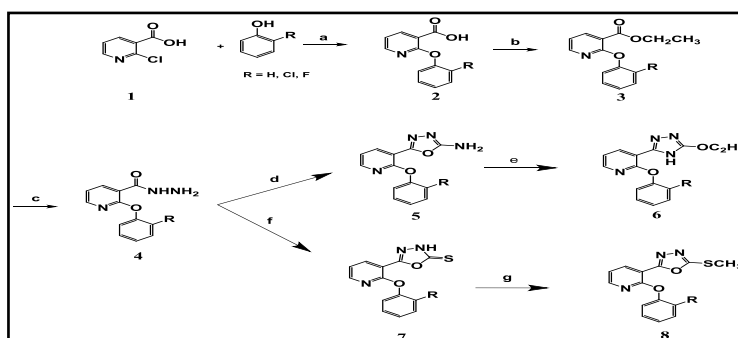
$$100 \times \left(1 - \frac{\text{میلنگین شیب نمودارهای جذب آنزیم در حضور مهار کننده}}{\text{میلنگین شیب نمودارهای جذب آنزیم به تنهایی}} \right) = \text{درصد مهار}$$

در نهایت با استفاده از درصد مهار آنزیم میزان IC_{50} به روش گرافیکی (رسم نمودار لگاریتم غلظت ماده در برابر درصد مهار با استفاده از نرم افزار میکروسافت اکسل ویرایش ۲۰۱۶) تعیین گردید. تمام آزمایش ها سه بار تکرار شد و اندازه گیری ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UNICO Double Beam صورت گرفت.

مطالعات داکینگ مولکولی

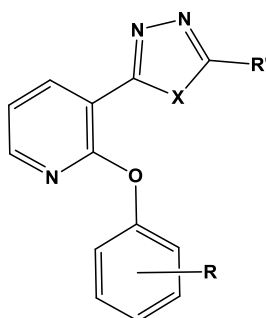
مطالعات داکینگ مولکولی با استفاده از یک کامپیوتر هشت هسته ای تحت سیستم عامل لینوکس Ubuntu 18.04 انجام شد. برای مطالعه نحوه قرارگیری ترکیبات در اکتیو سایت آنزیم، از نرم افزار Autodock Vina 1.1.2 استفاده شد (۵۷). بدین منظور ابتدا ساختار سه بعدی آنزیم لیپواکسیژناز (ID: 1IK3) از بانک اطلاعاتی پروتئین به آدرس www.rcsb.org گرفته شد. سپس مولکول های آب و سایر مولکول های متفرقه موجود در ساختار کریستالی حذف شدند. پروتئین حاصل با استفاده از نرم افزار Autodock Tools 1.5.6 به فرمت مناسب جهت داکینگ تبدیل شد (۵۸). برای این کار از پارامترهای پیش فرض نرم افزار استفاده شد. جهت رسم ساختار دو بعدی لیگاند نیز از MarvinSketch 5.8.3 (www.chemaxon.com) استفاده شد و ساختار رسم شده در مرحله قبل توسط نرم افزار OpenBabel 2.3.1 به فرمت سه بعدی مورد نیاز جهت داکینگ تبدیل شد (۵۹). پارامترهای داکینگ نیز بصورت زیر تنظیم

نشان داد که ترکیب ذکر شده مشتق ۴-فلوروفنوکسی بوده و روی حلقه اکسادیازول خود گروه تیول دارد.



شما تیک ۱: مسیر سنتز مشتقات طراحی شده همراه مواد استفاده شده و شرایط انجام واکنش

- a) CH₃ONa, Δ ; b) CH₃CH₂OH, H₂SO₄, reflux; c) CH₃CH₂OH, N₂H₄·H₂O, reflux; d) BrCN, NaHCO₃, Dioxane, rt, 2h; e) KOH, C₂H₅OH, reflux, overnight; f) KOH, CS₂, reflux, 48-72h ; g) NaOH, CH₃I, rt, 1-2h



جدول ۱: ساختار، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میزان مهار آنزیم ترکیبات سنتز شده بعنوان مهارکننده لیپواکسیژناز

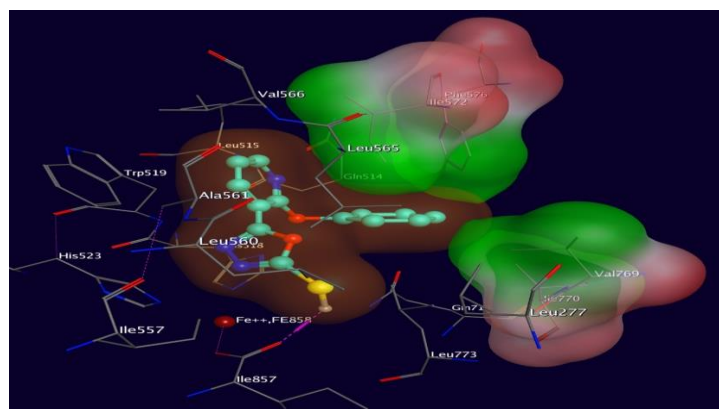
کد	X	R	R'	نقطه ذوب (درجه سانتیگراد)	بازده (درصد)	وزن مولکولی	IC ₅₀ [*] میکرومول بر لیتر
5a	O	2-Cl	NH ₂	۲۱۵-۲۱۳	۸۵	۲۸۸	۱۸۷/۳ ± ۸/۳
5b	O	4-F	NH ₂	۱۸۳-۱۸۱	۹۱	۲۷۲	۱۴۴/۱ ± ۶/۵
6a	NH	H	OEt	۹۷-۹۵	۷۸	۲۸۲/۳	۱۲۶/۶ ± ۵/۷
6b	NH	2-Cl	OEt	۱۱۵-۱۱۳	۸۱	۳۱۷	۱۷۹/۱ ± ۸/۹
6c	NH	4-F	OEt	۱۵۹-۱۵۷	۷۷	۳۰۰	۱۳۵/۸ ± ۷/۱
7a	O	H	SH	۲۱۹-۲۱۷	۹۱	۲۷۱	۱۰۰/۵ ± ۴/۳
7b	O	2-Cl	SH	۲۲۷-۲۲۵	۸۴	۳۰۶	۱۰۸/۸ ± ۵/۱
7c	O	4-F	SH	۲۱۳-۲۱۱	۸۹	۲۸۹	۱۰۲/۵ ± ۴/۸
8a	O	H	SMe	۱۱۱-۱۰۹	۸۱	۲۸۵	۱۴۱/۶ ± ۶/۳
8b	O	2-Cl	SMe	۱۳۰-۱۲۸	۷۵	۳۱۹	۱۷۳/۹ ± ۹/۴
8c	O	4-F	SMe	۱۶۲-۱۶۰	۷۸	۳۰۳	۱۳۱/۹ ± ۵/۸
Quercetin	-	-	-	۳۱۸-۳۱۶	-	۳۰۲	۵۸/۵ ± ۲/۴

* اعداد به صورت Mean ± S.D گزارش شده است و حاصل سه بار تکرار می باشد.

مطالعه داکینگ

قرار گرفت. بدین منظور بهترین نحوه اتصال لیگاند در اکتیو سایت آنزیم لیپواکسیژناز با توجه به انرژی اتصال از نتایج داکینگ استخراج شد و با استفاده از نرم افزار Chimera تداخلات آنزیم و لیگاند مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه در شکل ۱ آمده است.

تمام ترکیبات طراحی شده طبق روش ذکر شده تحت مطالعه داکینگ با استفاده از نرم افزار Autodock Vina قرار گرفتند. نتایج اولیه نشان داد که تمام ترکیبات به خوبی در اکتیو سایت آنزیم قرار می گیرند. در نهایت نتایج حاصل از داکینگ قوی ترین ترکیب جهت بررسی بیشتر مورد استفاده



شکل ۱: بهترین نحوه اتصال پیش بینی شده در مطالعه داکینگ مربوط به ترکیب 7a به اکتیو سایت آنزیم لیپواکسیژناز (رنگ سبز نشان دهنده نواحی هیدروفوب و رنگ قرمز نواحی هیدروفیل را نشان می دهد. جهت وضوح بهتر لیگاند به صورت گوی و میله ترسیم شده است. پیوند هیدروژی به رنگ صورتی مشخص شده است)

بحث

ترکیبات شیمیایی مشتق هتروآریل ۲- فنوکسی پیریدین - ۳- ایل مورد مطالعه با بازده خوبی (۷۵-۹۱ درصد) طی چهار مرحله سنتز شدند که مسیر سنتز ترکیبات در شماتیک یک آمده است. با شروع از ۲- کلرو نیکوتینیک اسید، ابتدا فنل های مختلف از طریق واکنش جانشینی نوکلئوفیلی روی حلقه آروماتیک (SNA) به نیکوتینیک اسید متصل شدند. از آن جایی که سایر روش های جانشینی نوکلئوفیلی بازده خوبی نداشت، از روش بدون حلال با ذوب کردن نمک های سدیم هر یک از ترکیبات شرکت کننده در واکنش استفاده شد. لازم به ذکر است که کنترل حرارت در این مرحله لازم است تا از افزایش دمای بیش از حد بعد از ذوب شدن مواد جلوگیری شود تا واکنش گرما تجزیه نشوند. در مرحله بعد از واکنش استری کردن ساده در حضور کاتالیزور اسید استفاده شد که در این مرحله نیز هرچقدر آب تشکیل شده در حین واکنش بیشتر از محیط واکنش خارج شود بازده واکنش افزایش می یابد. در این

مرحله جهت افزایش بازده از اتانول به عنوان حلال و واکنشگر استفاده شد تا به پیشرفت واکنش کمک کند و جهت جذب آب مقداری گرانول جاذب آب (molecular sieve) به محیط واکنش اضافه شد. در خصوص مرحله واکنش بسته شدن حلقه با کمک کربن دی سولفید زمان زیادی برای انجام واکنش لازم است. بهترین شاخص برای انجام این مرحله در واکنش ها حضور گاز هیدروژن دی سولفید بود که عدم خروج آن نشان دهنده پایان واکنش بود. بررسی اثر مهارلیپواکسیژناز این ترکیبات نشان داد که ترکیبات با قدرت نسبتاً خوبی (IC_{50} 100-179 μM) می توانند آنزیم را مهار کنند. در بین این ترکیبات ترکیب 7a مشتق اکسادیازول که روی حلقه هتروسیکل گروه سولفیدریل و روی حلقه فنوکسی هیچ استخلافی ندارد بهترین اثرات را از خود نشان داد. با توجه به نتایج نشان داده شده در جدول یک، ترکیبات 7a, 7b و 7c که روی حلقه اکسادیازول خود گروه سولفیدریل دارند بهترین اثرات را از خود نشان داده اند. در مطالعه داکینگ

که نتیجه آن در شکل یک آمده است نشان داده شده است که این گروه در تشکیل پیوند هیدروژنی با اسید آمینه ایزولوسین ۸۵۷ شرکت می کند و زمانی که روی این گروه متیل قرار گرفته است (یعنی ترکیب 8a, 8b, 8c)، اثر کاهش یافته است، چون گروه متیل تئو نمی تواند مانند گروه سولفیدریل در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت کند. البته تشکیل پیوند هیدروژنی به تنهایی نمی تواند توجیه کننده این فعالیت باشد. چون ترکیبات 5a و 5b که روی حلقه هتروسیکل خود گروه آمین دارند نیز می توانند پیوند هیدروژنی برقرار کنند، ولی ضعیف تر بوده اند. لذا احتمالاً عامل دیگری در قدرت اثر ترکیبات دارای گروه سولفیدریل نقش دارد که از جمله می توان به تمایل بالاتر اتصال گروه سولفیدریل به یون های فلزی از جمله آهن اشاره کرد. همان گونه که در شکل ۱ آمده است، گروه سولفیدریل در نزدیکی یون آهن قرار گرفته است و می تواند با آن اتصال برقرار کند و چون اتصال قوی تری نسبت گروه متیل تئو، آمین و اتوکسی می تواند برقرار کند، اثر قوی تری از خود نشان داده است. استخلاف های روی حلقه فنوکسی نیز تا حدی روی اثرات نقش داشته اند.

با توجه به جدول یک، ترکیباتی که روی حلقه فنوکسی استخلاف نداشته اند اثرات بهتری از خود نشان داده اند و ترکیباتی که روی حلقه فنوکسی گروه کلر داشته اند نسبت به ترکیبات دارای استخلاف فلوئور و فاقد استخلاف اثرات ضعیف تری نشان داده اند. چون اندازه کلر بزرگتر از فلوئور است احتمالاً عامل فضایی و ممانعت فضایی در کاهش اثر مشتقات دارای استخلاف کلر نقش داشته است. مطالعه دقیق تر نحوه اتصال نیز این فرضیه را تا حدی تایید می کند. همان گونه که در شکل یک آمده است حلقه فنوکسی به سمت یک پاکت هیدروفوب جهت گیری کرده است و خواص الکترونی روی اثرات ترکیب موثر بود، گروه کلر ترکیب را لیپوفیلتر می کند و باید باعث افزایش اثرات و اتصال بهتر به این جایگاه می شد. پس عامل فضایی و حجم استخلاف در این اتصال احتمالاً نقش

منفی دارد و باعث کاهش اثر در مشتقات کلر شده است. علاوه بر این البته عوامل دیگری نیز در اثرات این ترکیب می تواند نقش داشته باشد که بررسی نشده است و در مطالعات بعدی باید بررسی گردد. به عنوان مثال از آنجایی که مکانیسم های متفاوتی برای مهار آنزیم لیپواکسیژناز وجود دارد، ممکن است این ترکیبات از طریق مکانیسم های دیگر نیز باعث مهار آنزیم شوند که نیاز به بررسی بیشتر دارد. ضمناً یکی دیگر از نکاتی که در ادامه نیاز به بررسی دارد میزان مهار این ترکیبات روی آنزیم لیپواکسیژناز انسانی است.

از آن جایی که این مطالعه روی آنزیم جدا شده از سویا انجام شده است، بهتر است در مطالعات بعدی روی آنزیم لیپواکسیژناز انسانی نیز بررسی شود. ضمناً استخلاف هایی که روی حلقه فنوکسی قرار گرفته اند، ماهیت لیپوفیلی دارند و بهتر است در مطالعات بعدی ترکیبات دارای استخلاف با ماهیت متفاوت و موقعیت متفاوت ساخته و بررسی شوند تا بهتر به توان روی اثر استخلاف های مختلف بر فعالیت مهارتی این ترکیبات نتیجه گیری کرد. علاوه بر این همان گونه که در شکل یک آمده است، حلقه پیریدین در مجاورت اسید آمینه تریپتوفان ۵۱۹ قرار گرفته است و اتصالات هیدروفوب با این اسید آمینه برقرار می کند. یکی دیگر از مواردی که با بررسی این نحوه اتصال می توان نتیجه گرفت تغییر پل بین حلقه فنیل و پیریدین است که فاصله افزایش داده شود تا حلقه پیریدین بهتر بتواند با اسید آمینه تریپتوفان ذکر شده پیوند برقرار کند.

نتیجه گیری

ترکیبات طراحی شده در این مطالعه به روشهای معمول شیمیایی با درصد بالایی سنتز شدند. این ترکیبات با قدرت نسبتاً خوبی توانستند آنزیم لیپواکسیژناز را مهار کنند که اثرات آنها نسبت به استاندارد کوئرستین قابل قبول می باشد. مطالعه داکینگ مولکولی روی این ترکیبات نشان داد این ترکیبات به خوبی می توانند در اکتیو سایت آنزیم در نزدیکی یون آهن قرار گیرند و از طریق پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبی اتصال محکم با اکتیو سایت برقرار کنند. با توجه به نتایج فوق می توان نتیجه گرفت که ترکیبات ساخته شده می توانند به عنوان یک

نویسندگان بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را اعلام می دارند.

تعارض در منافع:

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تعارضی در منافع ندارند.

ساختار جدید مهار کننده لیپواکسیژناز جهت مطالعات بعدی در جهت افزایش قدرت اثر مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحقیقاتی دوره دکتری داروسازی می باشد که با حمایت های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام شده است و

References:

- 1- Fürstenberger G, Epp N, Eckl K-M, Hennies HC, Jørgensen C, Hallenborg P. **Role of epidermis-type lipoxygenases for skin barrier function and adipocyte differentiation.** Prostaglandins Other lipid Med 2007; 82(1-4): 128-34.
- 2- Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. **Mammalian lipoxygenases and their biological relevance.** Biochimica et Biophysica Acta 2015; 1851(4): 308-30.
- 3- Mashima R, Okuyama T. **The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives.** Redox Biol 2015; 6: 297-310.
- 4- Schneider C, Pratt DA, Porter NA, Brash AR. **Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis.** Chemistry & Bio 2007; 14(5): 473-88.
- 5- Mattsson N, Yaong M, Rosengren L, Blennow K, Månsson JE, Andersen O. **Elevated cerebrospinal fluid levels of prostaglandin E2 and 15-(S)-hydroxyecosatetraenoic acid in multiple sclerosis.** J Intern Med 2009; 265(4): 459-64.
- 6- Ackermann JA, Hofheinz K, Zaiss MM, Krönke G. **The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol Cell Biol Lipids 2017; 1862(4): 371-81.
- 7- Kühn H, O'Donnell VB. **Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases.** Prog lipid Res 2006; 45(4): 334-56.
- 8- Uderhardt S, Krönke G. **12/15-lipoxygenase during the regulation of inflammation, immunity, and self-tolerance.** J Mol Med 2012; 90(11): 1247-56.
- 9- Larsen JS, Acosta EP. **Leukotriene-receptor antagonists and 5-lipoxygenase inhibitors in asthma.** Annals Pharmac 1993; 27(7-8): 898-903.
- 10- Blaho VA, Zhang Y, Hughes-Hanks JM, Brown CR. **5-Lipoxygenase-Deficient Mice Infected with *Borrelia burgdorferi* Develop Persistent Arthritis.** J Immunology 2011; 186(5): 3076-84.
- 11- Steinhilber D, Fischer AS, Metzner J, Steinbrink SD, Roos J, Ruthardt M, et al. 5-

- lipoxygenase: underappreciated role of a pro-inflammatory enzyme in tumorigenesis*. Front Pharm 2010; 1: 143.
- 12- Park SW, Heo DS, Sung MW. *The shunting of arachidonic acid metabolism to 5-lipoxygenase and cytochrome p450 epoxygenase antagonizes the anti-cancer effect of cyclooxygenase-2 inhibition in head and neck cancer cells*. Cell Oncol 2012; 35(1): 1-8.
 - 13- Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, et al. *Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice*. J Clin Invest 1999; 103(11): 1597-604.
 - 14- Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, et al. *Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biol 2000; 20(9): 2100-5.
 - 15- Kelavkar U, Glasgow W, Eling TE. *The effect of 15-lipoxygenase-1 expression on cancer cells*. Current urology reports 2002; 3(3): 207-14.
 - 16- Schewe T. *15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme*. Biol Chem 2002; 383(3-4): 365-74.
 - 17- Rothe T, Gruber F, Uderhardt S, Ipseiz N, Rössner S, Oskolkova O, et al. *12/15-lipoxygenase-mediated enzymatic lipid oxidation regulates DC maturation and function*. J Clin Invest 2015; 125(5): 1944-54.
 - 18- Sultana C, Shen Y, Rattan V, Kalra VK. *Lipoxygenase metabolites induced expression of adhesion molecules and transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells is linked to protein kinase C activation*. J Cell Physiol 1996; 167(3): 477-87.
 - 19- Rubab K, Abbasi MA, Siddiqui SZ, Ashraf M, Shaukat A, Ahmad I, et al. *S-Alkylated/aralkylated 2-(1H-indol-3-yl-methyl)-1, 3, 4-oxadiazole-5-thiol derivatives. 2. Anti-bacterial, enzymeinhibitory and hemolytic activities*. Tropical J Pharma Res 2016; 15(7): 1525-33.
 - 20- Nafeesa K, Abbasi MA, Siddiqui SZ, Rasool S, Shah SA. *Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of different 1, 3, 4-oxadiazole and acetamide derivatives of ethyl nipecotate*. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo Uni 2017; 55(2): 333-43. [Persian]
 - 21- Sattar A, Aziz-ur-Rehman, Abbasi MA, Siddiqui SZ, Rasool S, Ahmad I. *Synthesis of some novel enzyme inhibitors and antibacterial agents derived from 5-(1-(4-tosyl) piperidin-4-yl)-1, 3, 4-oxadiazol-2-thiol*. Brazilian J Pharmaceutical Sci 2016; 52(1): 77-85.
 - 22- Pelcman B, Sanin A, Nilsson P, No K, Schaal W, Öhrman S, et al. *3-Substituted pyrazoles and 4-substituted triazoles as inhibitors of human 15-lipoxygenase-1*. Bioorganic & Med Chem Letters 2015; 25(15): 3024-9.
 - 23- Cai H, Huang X, Xu S, Shen H, Zhang P, Huang Y, et al. *Discovery of novel hybrids of diaryl-1, 2, 4-triazoles and caffeic acid as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase for cancer therapy*. Eur J Med Chem 2016; 108: 89-103.

- 24- Jiang B, Huang X, Yao H, Jiang J, Wu X, Jiang S, et al. *Discovery of potential anti-inflammatory drugs: diaryl-1, 2, 4-triazoles bearing N-hydroxyurea moiety as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase*. Organic Biomol Chem 2014; 12(13): 2114-27.
- 25- Mohamed MS, Mansour YE, Amin HK, El-Araby ME. *Molecular modelling insights into a physiologically favourable approach to eicosanoid biosynthesis inhibition through novel thieno [2, 3-b] pyridine derivatives*. J Enzyme Inhib Med Chem 2018; 33(1): 755-67.
- 26- Aliabadia A, Mohammadi-Farania A, Roodabehb S, Ahmadi F. *Synthesis and Biological Evaluation of N-(5-(pyridin-2-yl)-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl) benzamide Derivatives as Lipoxygenase Inhibitor with Potential Anticancer Activity*. Iran J Pharm Res 2017; 16(1): 165-72. [Persian]
- 27- Li Y, Chen SH, Ou TM, Tan JH, Li D, Gu LQ, Huang ZS. *Syntheses and characterization of nimesulide derivatives for dual enzyme inhibitors of both cyclooxygenase-1/2 and 5-lipoxygenase*. Bioorg Med Chem 2011; 19(6): 2074-83.
- 28- El-Din MM, El-Gamal MI, Abdel-Maksoud MS, Yoo KH, Oh CH. *Synthesis and broad-spectrum antiproliferative activity of diarylamides and diarylureas possessing 1, 3, 4-oxadiazole derivatives*. Bioorg Med Chem 2015; 25(8): 1692-9.
- 29- Tan TMC, Chen Y, Kong Kh, Bai J, Li Y, Lim SG, et al. *Synthesis and the biological evaluation of 2-benzenesulfonylalkyl-5-substituted-sulfanyl-[1, 3, 4]-oxadiazoles as potential anti-hepatitis B virus agents*. Antiviral Res 2006; 71(1): 7-14.
- 30- Zhang K, Wang P, Xuan LN, Fu XY, Jing F, Li S, et al. *Synthesis and antitumor activities of novel hybrid molecules containing 1, 3, 4-oxadiazole and 1, 3, 4-thiadiazole bearing Schiff base moiety*. Bioorg Med Chem letters 2014; 24(22): 5154-6.
- 31- Kumar D, Sundaree S, Johnson EO, Shah K. *An efficient synthesis and biological study of novel indolyl-1, 3, 4-oxadiazoles as potent anticancer agents*. Bioorg Med Chem letters 2009; 19(15): 4492-4.
- 32- Omar FA, Mahfouz N, Rahman M. *Design, synthesis and antiinflammatory activity of some 1, 3, 4-oxadiazole derivatives*. Eur J Med Chem 1996; 31(10): 819-25.
- 33- Abel S, Russell D, Whitlock LA, Ridgway CE, Nedderman AN, Walker DK. *Assessment of the absorption, metabolism and absolute bioavailability of maraviroc in healthy male subjects*. Br J Clin Pharmacol 2008; 65: 60-7.
- 34- Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK, Lissen E, Gonzalez-García J, Lazzarin A, et al. *Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients*. New England J Med 2004; 351(5): 438-50.
- 35- Turan-Zitouni G, Kaplancıklı ZA, Yıldız MT, Chevallet P, Kaya D. *Synthesis and antimicrobial activity of 4-phenyl/cyclohexyl-5-(1-phenoxyethyl)-3-[N-(2-thiazolyl) acetamido]*

- thio-4H-1, 2, 4-triazole derivatives*. Eur J Med Chem 2005; 40(6): 607-13.
- 36- Tehranchian S, Akbarzadeh T, Fazeli MR, Jamalifar H, Shafiee A. *Synthesis and antibacterial activity of 1-[1, 2, 4-triazol-3-yl] and 1-[1, 3, 4-thiadiazol-2-yl]-3-methylthio-6, 7-dihydrobenzo [c] thiophen-4 (5H) ones*. Bioorg Med Chem Lett 2005; 15(4): 1023-5.[Persian]
- 37- Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. *Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis*. New England J Med 2002; 347(6): 408-15.
- 38- Akbarzadeh T, Tabatabai SA, Khoshnoud MJ, Shafaghi B, Shafiee A. *Design and synthesis of 4H-3-(2-phenoxy) phenyl-1, 2, 4-triazole derivatives as benzodiazepine receptor agonists*. Bioorg Med Chem 2003; 11(5): 769-73. [Persian]
- 39- Tozkoparan B, Küpeli E, Yeşilada E, Ertan M. *Preparation of 5-aryl-3-alkylthio-1, 2, 4-triazoles and corresponding sulfones with antiinflammatory–analgesic activity*. Bioorg Med Chem 2007; 15(4): 1808-14.
- 40- Salgın-Gökşen U, Gökhan-Kelekçi N, Göktaş Ö, Köysal Y, Kılıç E, Işık Ş, et al. *1-Acylthiosemicarbazides, 1, 2, 4-triazole-5 (4H)-thiones, 1, 3, 4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities*. Bioorg Med Chem 2007; 15(17): 5738-51.
- 41- Bhaskaruni SV, Maddila S, Gangu KK, Jonnalagadda SB. *A Review on multi-component green synthesis of N-containing heterocycles using mixed oxides as heterogeneous catalysts*. Arabian J Chem 2017.
- 42- Amir M, Kumar H, Javed S. *Condensed bridgehead nitrogen heterocyclic system: Synthesis and pharmacological activities of 1, 2, 4-triazolo-[3, 4-b]-1, 3, 4-thiadiazole derivatives of ibuprofen and biphenyl-4-yloxy acetic acid*. Eur J Chem 2008; 43(10): 2056-66.
- 43- Navidpour L, Shafaroodi H, Abdi K, Amini M, Ghahremani MH, Dehpour AR, et al. *Design, synthesis, and biological evaluation of substituted 3-alkylthio-4, 5-diaryl-4H-1, 2, 4-triazoles as selective COX-2 inhibitors*. Bioorg Med Chem 2006; 14(8): 2507-17. [Persian]
- 44- Helal M, El-Awdan S, Salem M, Abd-Elaziz T, Moahamed Y, El-Sherif A, et al. *Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel series of pyridine derivatives as anticancer, anti-inflammatory and analgesic agents*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2015; 135: 764-73.
- 45- Hill MD. *Recent strategies for the synthesis of pyridine derivatives*. Chemistry–A Eur J 2010; 16(40): 12052-62.
- 46- Bernardino AMR, de Azevedo AR, da Silva Pinheiro LC, Borges JC, Carvalho VL, Miranda MD, et al. *Synthesis and antiviral activity of new 4-(phenylamino)/4-[(methylpyridin-2-yl) amino]-1-phenyl-1H-pyrazolo [3, 4-b] pyridine-*

- 4-carboxylic acids derivatives.** Med Chem Res 2007; 16(7-9): 352-69.
- 47- Gaonkar S, Rai KL, Prabhuswamy B. **Synthesis of novel 3-[5-ethyl-2-(2-phenoxy-ethyl)-pyridin]-5-substituted isoxazoline libraries via 1, 3-dipolar cycloaddition and evaluation of antimicrobial activities.** Med Chem Res 2007; 15(7-8): 407-17.
- 48- Patel NB, Patel HR. **Synthesis and pharmacological studies of 5-ethyl pyridin-2-ethanol analogs derivatives.** ARKIVOC 2009; 12: 302-21.
- 49- Xu M, Wang Y, Yang F, Wu C, Wang Z, Ye B, et al. **Synthesis and biological evaluation of a series of novel pyridinecarboxamides as potential multi-receptor antipsychotic drugs.** Bioorg Med Chem Lett 2018; 28(4): 606-11.
- 50- Loso MR, Benko Z, Buysse A, Johnson TC, Nugent BM, Rogers RB, et al. **SAR studies directed toward the pyridine moiety of the sap-feeding insecticide sulfoxaflor (Isoclast™ active).** Bioorg Med Chem 2016; 24(3): 378-82.
- 51- Ng HP, Buckman BO, Eagen KA, Guilford WJ, Kochanny MJ, Mohan R, et al. **Design, synthesis, and biological activity of novel factor Xa inhibitors: 4-aryloxy substituents of 2, 6-diphenoxypyridines.** Bioorg Med Chem 2002; 10(3): 657-66.
- 52- Chao H, Turdi H, Herpin TF, Roberge JY, Liu Y, Schnur DM, et al. **Discovery of 2-(phenoxypyridine)-3-phenylureas as small molecule P2Y1 antagonists.** J Med Chem 2013; 56(4): 1704-14.
- 53- Markley LD, Tong YC, Dulworth JK, Steward DL, Goralski CT, Johnston H, et al. **Antipicornavirus activity of substituted phenoxybenzenes and phenoxypyridines.** J Med Chem 1986; 29(3): 427-33.
- 54- Song X, Chen W, Lin L, Ruiz CH, Cameron MD, Duckett DR, et al. **Synthesis and SAR of 2-phenoxypyridines as novel c-Jun N-terminal kinase inhibitors.** Bioorg Med Chem Lett 2011; 21(23): 7072-5.
- 55- Pavia MR, Taylor CP, Hershenson FM, Lobbestael SJ, Butler DE. **3-Phenoxypyridine 1-oxides as anticonvulsant agents.** J Med Chem 1988; 31(4): 841-7.
- 56- Malterud KE, Rydland KM. **Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel.** J Agric Food Chem 2000; 48(11): 5576-80.
- 57- Trott O, Olson AJ. **AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading.** J Computational Chem 2010; 31(2): 455-61.
- 58- Sanner MF. **Python: a programming language for software integration and development.** J Mol Graph Model 1999; 17(1): 57-61.
- 59- O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. **Open Babel: An open chemical toolbox.** J Chem Inf 2011; 3: 33.
- 60- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. **UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.** J Comput Chem 2004; 25(13): 1605-12.

Design, synthesis, molecular docking study and biological evaluation of heteroaryl 2-phenoxypyridin-3-yl derivatives as lipoxygenase enzyme inhibitors

Zeinab Najjari¹, Johreh Mirjalili¹, Hamid Nadri¹, Faezeh Rabbani¹, Alireza Moradi^{1*}

Original Article

Introduction: Lipoxygenase enzyme is responsible for biosynthesis of leukotrienes that possess various pharmacological effects in the body. The beneficial therapeutic effects of lipoxygenase inhibitors have been proved in some diseases such as asthma, cancer and Alzheimer's disease. So, the lipoxygenase inhibitors could be used in the treatment of some diseases and pathological conditions. In this study, heteroaryl 2-phenoxypyridine-3-yl derivatives have been synthesized and evaluated as lipoxygenase inhibitors.

Methods: In this basic-applied study, the desired derivatives were synthesized in multiple steps using convenient methods. Then, the structure of compounds was validated using infrared, mass and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Finally, lipoxygenase inhibitory activity of compounds was evaluated and molecular docking studies was performed on the most active compound.

Results: All target compounds were synthesized in good yields and showed good inhibitory activity against lipoxygenase (IC_{50} = 100-179 μ M) in comparison to Quercetin (IC_{50} = 58.5 μ M) as standard inhibitor. The compound **7a** (5-(2-phenoxypyridine-3-yl)-1, 3, 4-oxadiazole-2(3H)-thione) showed the most potent activity and the molecular docking studies showed that this compound was well fitted in the active site of enzyme.

Conclusion: The synthesized compounds have shown good inhibitory activity against lipoxygenase and the molecular docking studies show that these compounds are able to fit in the active site of enzyme. Therefore, the target compounds could be used as lead compounds for further studies to find novel lipoxygenase inhibitor drugs.

Keywords: Lipoxygenase Inhibitors, Molecular Docking Simulation, 2-phenoxypyridine-3-yl Derivatives.

Citation: Najjari Z, Mirjalili Z, Nadri H, Rabbani F, Moradi A. **Design, synthesis, molecular docking study and biological evaluation of heteroaryl 2-phenoxypyridin-3-yl derivatives as lipoxygenase enzyme inhibitors.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(7): 583-98.

¹Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

*Corresponding author: Tel: 035-38203419, email: moradiar@ssu.ac.ir