

سنتر دی پپتیدهای جدید بر پایه تیمین و اوراسیل و بررسی داکینگ مولکولی این ترکیبات بعنوان مهار کننده سیستم کوئوروم سنسینگ در سودوموناس آئروژینوزا

اعظم حیدری^۱، نازیلا ولی خانی^۲، نادر نوشیرانزاده^{۳*}، رحمان بیگس^۳

^۱ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۲ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۳ گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۰۲

تاریخ تصحیح: ۹۷/۰۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۲۵

چکیده

در مطالعه حاضر با توجه به اهمیت ترکیبات دی پپتیدی در تشخیص بیماری یا بعنوان ترکیبات دارویی، ترکیبات جدیدی با استفاده از مشتقات پیریمیدینی تیمین و اوراسیل سنتز شد. واکنش متیل-۲-(۵-متیل-۲،۴-دی اکسو-۳-هیدرو پیریمیدین-۱(۲H)-ایل)استات با مشتقات دی آمین، منجر به تولید ترکیبات دی پپتید با بازده کاملاً خوبی گردید. همچنین با استفاده از طراحی محاسباتی دارو به روش داکینگ مولکولی، اثر مهار کنندگی ترکیبات سنتزی بر پروتئین تنظیم کننده LasR تحت کنترل سیستم کوئوروم سنسینگ در باکتری سودوموناس آئروژینوزا، که نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های بیماری‌زایی در باکتری‌ها دارد، بررسی شد. نتایج مطالعه نشان داد که ترکیبات سنتزی تاثیر قابل ملاحظه‌ای در مهار پروتئین LasR دارند.

کلمات کلیدی: دی پپتید، سنتر، تیمین، اوراسیل، داکینگ مولکولی، کوئوروم سنسینگ.

۱- مقدمه

تیمین و اوراسیل به عنوان باز نوکلئوتیدی و از مشتقات پیریمیدین هستند و به ترتیب در ساختار DNA و RNA حضور دارند. ترکیبات پیریمیدینی بعلاوه گستره وسیع خواص فارماکولوژیکی در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. بر اساس گزارشات موجود، آنالوگ‌های نوکلئوزیدی بعنوان سنگ بنای شیمی درمانی در بیماری‌های ویروسی و سرطان شناخته شده‌اند [۱-۳]. پپتیدها مولکول‌های زیستی متنوعی هستند که دارای سازگاری زیستی زیادی بوده و علاوه بر این می‌توانند بصورت ترکیبات بر پایه پپتید نیز مورد استفاده قرار گیرند. کشف و توسعه ترکیبات کارآمد و غیر سمی یکی از مشکلات اساسی در شیمی دارویی و دارو شناسی می‌باشد [۴].

یکی از چالش‌های اصلی سلامت و بهداشت عمومی در عصر حاضر، ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضد میکروبی در جامعه و بیمارستان می‌باشد که نیازمند طراحی و سنتر ترکیبات دارویی جدیدتر و موثرتر می‌باشد. با توجه به

اهمیت بالینی و دشواری ریشه‌کنی عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* به علت وجود انواعی از فاکتورهای ویروالانس^۱ (شاخص‌های شدت بیماری‌زایی)، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا و تشکیل بیوفیلم، در مطالعه حاضر اثر مهارکنندگی ترکیبات سنتزی بر سیستم کوئوروم سنسینگ^۲ در *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی می‌شود. یکی از روش‌هایی که بدون وابستگی به استفاده از آنتی‌بیوتیک می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد بهره‌گیری از آنتی‌کوئوروم سنسینگ تراپی می‌باشد [۵]. با توجه به اینکه فرایند کوئوروم سنسینگ در تنظیم بیان ژن‌های بیماری‌زایی در باکتری‌ها دخیل است، هدف مناسبی بمنظور طراحی داروهای جدید بر مبنای هدف قرار دادن مستقیم شاخص‌های بیماری‌زایی، به امید یافتن راه حل برای بحران بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد [۶].

باکتری‌ها دارای سیستمی بنام کوئوروم سنسینگ یا درک حد نصاب می‌باشند که بصورت مکانیسم ارتباطی سلول به سلول در باکتری‌ها بوده و با سنتز و بیان شاخص‌های شدت بیماری‌زایی در ایجاد بیماری‌های عفونی توسط باکتری‌های بیماری‌زا نقش دارد [۷-۹]. سیستم کوئوروم سنسینگ از تیپ LuxR بوده و دارای سه نوع متمایز LasI/LasR، RhlI/RhlR و Pqs/MvfR می‌باشد و توسط مولکول‌های سیگنالی قابل انتشار بنام خود القاگر کنترل می‌شود. مولکول‌های سیگنالی در حالت طبیعی و همزمان با رشد باکتری‌ها تولید می‌شوند. با گذشت زمان و افزایش تعداد باکتری‌ها، مقدار این مولکول‌های سیگنالی و یا خودالقاگرها نیز در محیط افزایش یافته و به محض رسیدن به حد آستانه با فعال کردن ژن‌های هدف وابسته به سیستم کوئوروم سنسینگ، اثرات فنوتیپی خاصی را القا و بیان می‌نمایند. دو نوع از این خود القاگرها از جنس *N*-آسیل هموسرین لاکتون^۳ (AHL) بوده و سیگنال نوع سوم نظیر ۳-و ۴-دی هیدروکسی ۲-هپتیل کینولون که PQS نام دارد، از ترکیبات کینولونی می‌باشد (شکل ۱) [۱۰، ۱۱]. سیگنال شیمیایی *N*-۳-اکسو دو دکانویل هموسرین لاکتون^۴ (3-oxo-C12-HSL) توسط آنزیم LasI که محصول ژن *lasI* است، تولید می‌گردد. هنگامی که غلظت سیگنال 3-oxo-C12-HSL در محیط به حد آستانه برسد، توسط پروتئین تنظیم کننده LasR شناسایی شده و از آنجا که LasR فعال کننده رونویسی است، پس از دایمریزه شدن با سیگنال شیمیایی مربوطه، به پروموتور ژن‌های هدف اتصال یافته و رونویسی از آن‌ها را کنترل می‌کند. در سیستم *rhl* نیز چنین است، بطوری که ژن *rhlI* آنزیم RhlI را کد می‌کند که در تولید بوتیریل هموسرین لاکتون^۵ (C4-HSL) نقش دارد. C4-HSL به

¹ Virulence factor

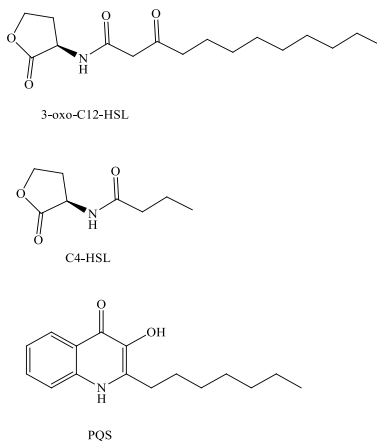
² Quorum sensing

³ N-Acyl homoserine lactone

⁴ N-3-oxododecanoyl-homoserine lactone

⁵ N-butyryl-homoserine lactone

تنظیم کننده رونویسی اختصاصی خود اتصال یافته و فعالیت پرموترهای هدف را کنترل می کند. سیستم PQS نیز که مولکول های سیگنالی کینولونی (PQS) را تولید می کند نقش ارتباطی بین سیستم Las و Rhl دارد [۷، ۱۰، ۱۱].



شکل ۱- ساختار شیمیایی سیگنال های مولکولی در سیستم کوئوروم سنسینگ

در سال های اخیر، برخی ترکیبات نظیر آنالوگ های آسیل هوموسرین لاکتون و برخی ترکیبات طبیعی بعنوان مهارکننده های کوئوروم سنسینگ در *سودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه قرار گرفته اند تا توانایی آن ها در جلوگیری از بیان ژن های تولیدکننده کوئوروم سنسینگ تعیین شود. از جمله ترکیبات طبیعی می توان به ترکیبات فعال سیر^۶، مشتقات زینگرون^۷ (از اجزای اصلی تشکیل دهنده زنجبیل)، کورکومین^۸ (جزء اصلی تشکیل دهنده زردچوبه)، فوران، پیریداکسال (ویتامین B6)، آسکوربیک اسید، برخی الیگوساکاریدهای دریایی و همچنین آنالوگ های آسیل هوموسرین لاکتون اشاره کرد [۱۲-۲۲].

در سال های اخیر، روش های محاسباتی داکینگ مولکولی جهت درک بهتر برهم کنش ها در محل اتصال گیرنده های پروتئینی تنظیم کننده کوئوروم سنسینگ و ترکیبات مهار کننده بمنظور طراحی ترکیبات کارا تر جلب شده است. به عنوان مثال سنتز آنالوگ های *N*-آسیل هوموسرین لاکتون، زینگرون و برخی ترکیبات دیگر با هدف بررسی مکانیسم مهار کنندگی کوئوروم سنسینگ به روش داکینگ با LasR و LasI مطالعه شده است [۲۲، ۲۳-۲۵]. بکارگیری روش های محاسباتی بمنظور تخمین فعالیت ترکیبات مختلف و همچنین توانایی مهار کنندگی آن ها در جهت دهی مطالعات بسیار سودمند خواهد بود. در مطالعه حاضر سنتز ترکیبات دی پپتیدی بر پایه تیمین و اوراسیل و همچنین اثر مهار کنندگی این ترکیبات بر پروتئین LasR، بعنوان

⁶ Garlic

⁷ Zingerone

⁸ Curcumine

مهم‌ترین پروتئین تنظیم کننده در سیستم کوئوروم سنسینگ *سودوموناس آئروژینوزا* بصورت محاسباتی مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- بخش تجربی

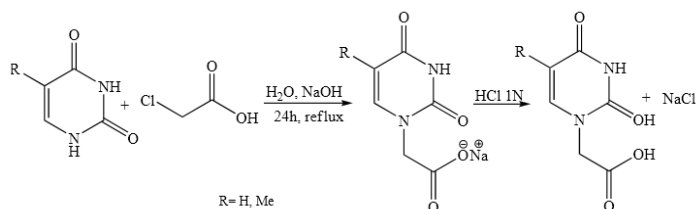
۲-۱- مواد

مواد و حلال‌های مورد استفاده از شرکت‌های مرک و سیگما-آلدریج تهیه شدند. طیف‌های مادون قرمز بوسیله اسپکتروفتومتر FT-IR Jasco 6300 تهیه گردید. طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته $^1\text{H NMR}$ و $^{13}\text{C NMR}$ با دستگاه BRUKER DRX-250 AVANCE به ترتیب در 250.13 MHz و 62.53 MHz ثبت گردید.

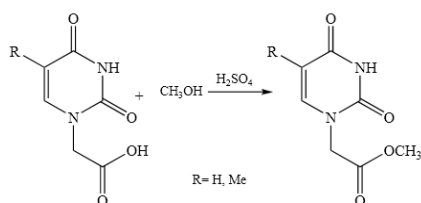
۲-۲- روش عمومی سنتز دی پپتیدهای بر پایه تیمین و اوراسیل

ابتدا جهت تهیه اسید تیمین و اسید اوراسیل در یک بالن حاوی آب مقطر و مجهز به سیستم رفلکس از ترکیبات تیمین/اوراسیل، کلرو استیک اسید و سدیم هیدروکسید به نسبت ۱:۲ ریخته و به مدت ۲۴ ساعت رفلکس شد و پیشرفت واکنش با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) بررسی گردید. در پایان واکنش به محصول بدست آمده هیدرو کلریک اسید افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. محصول بدست آمده بصورت رسوب سفید رنگی تشکیل شد که پس از صاف و خشک کردن بعنوان اسید تیمین/اوراسیل در مراحل بعدی سنتز استفاده گردید. سپس جهت تهیه استر تیمین/اوراسیل، ترکیب حاصل از مرحله قبل را در متانول حل کرده و پس از افزودن چند قطره اسید سولفوریک غلیظ بمدت ۲ ساعت رفلکس گردید. پس از تکمیل واکنش، محیط اسیدی واکنش با استفاده از بی‌کربنات سدیم خنثی گردید و محصول بدست آمده توسط روش استخراج حلالی جداسازی و سپس در دمای محیط قرار داده شد تا حلال آن تبخیر گردد. ماده حاصل بعنوان استر تیمین/اوراسیل در سنتز دی پپتید مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنتز دی پپتید نیز، ۰/۵ میلی مول استر تیمین/اوراسیل و ۰/۲۵ میلی مول از دی آمین مورد نظر (شامل ۱،۲- فنیلین دی آمین، ۱،۴- فنیلین دی آمین، بای تیازول و اتیلین دی آمین) در متانول حل شده و پس از افزودن دو قطره اسید سولفوریک به کمک همزن مغناطیسی در دمای اتاق هم زده شد. در پایان واکنش، محصول بدست آمده پس از خنثی کردن با سدیم بی‌کربنات به داخل قیف دکانتور منتقل شد و به روش استخراج حلالی با اتیل استات و آب مورد جداسازی قرار گرفت. سپس فاز آلی به داخل بشر منتقل و حلال آن در دمای محیط تبخیر شد. شکل شماتیک سنتز دی پپتیدهای تیمین و اوراسیل در شکل ۲ آورده شده است. سنتز مشتق حاصل از استر تیمین/اوراسیل و ۴،۴-بای تیازول-۲،۲-

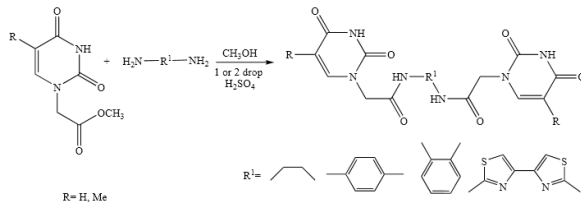
دی‌آمین به صورت سیستم رفلکس و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انجام شد. چهار مشتق سنتز شده دیگر نیاز به سیستم رفلکس نداشته و در دمای محیط سنتز شدند.



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۲- روش عمومی (الف) سنتز اسید تیمین و اوراسیل (ب) سنتز استر تیمین و اوراسیل (ج) سنتز دی‌پپتیدهای بر پایه تیمین و اوراسیل

۳-۲- داده‌های طیفی ترکیبات دی‌پپتید سنتزی

۲-۳-۱- دی‌پپتید N',N -(۲,۱-فنیلین) بیس (۲)-(۵-متیل-۲,۴-دی‌اکسو-۳,۴-دی‌هیدروپیریمیدین-۱(۲H)-ایل) استامید

(ترکیب ۱)

White solid (yield 84%). *Anal.* Calc. for $C_{20}H_{20}N_6O_6$ (MW = 440.41): C, 54.54; H, 4.58; N, 19.08%. Found: C, 54.49; H, 4.51; N, 19.14%. FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3174, 3045, 2958, 2822, 1737, 1705, 1651, 1470, 1439, 1418, 1378, 1352, 1235, 1152, 1047, 1023, 969, 908, 890, 863, 760, 725, 687 cm^{-1} . 1H NMR (250.13 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_H (ppm) 1.72 (s, 6H, 2CH₃ of methyl), 4.45 (s, 4H, 2CH₂, aliphatic), 7.22-7.75 (m, 4H, H-arom), 7.46 (s, 2H, 2CH of C=CH), 10.97 (s, 2H, 2NH of amide), 11.37

(s, 2H, 2NH of imide). ^{13}C NMR (62.19 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_{C} (ppm) 12.30 (2CH₃), 52.70 (2CH₂, aliphatic), 109.07 (2C of C=CH), 115.09 (2CH of arom), 126.07 (2CH of arom), 137.40 (2C of arom), 142.00 (2CH of C=CH), 151.37 (2C=O of imide), 164.77 (2C=O of imide), 169.17 (2C=O of amide).

۲-۳-۲ دی پپتید (۴،۱-فنیلین) بیس (۲-۵-متیل-۲،۴-دی اکسو-۳،۴-دی هیدرو پیریمیدین-۱(H۲)) (ایل) استامید (ترکیب ۲)

Brown solid (yield 83%). *Anal.* Calc. for C₂₀H₂₀N₆O₆ (MW = 440.41): C, 54.54; H, 4.58; N, 19.08%. Found: C, 54.50; H, 4.52; N, 19.13%. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3173, 3045, 2958, 2821, 1738, 1702, 1645, 1466, 1441, 1417, 1378, 1325, 1234, 1163, 1153, 1023, 969, 908, 890, 760, 725, 687 cm⁻¹. ^1H NMR (250.13 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_{H} (ppm) 1.72 (s, 6H, CH₃ of methyl), 4.45 (s, 4H, 2CH₂, aliphatic), 7.47 (s, 4H, 4CH of arom), 7.84 (s, 2H, 2CH, 2C=CH), 11.02 (s, 2H, 2NH of amide), 11.42 (s, 2H, 2NH of imide). ^{13}C NMR (62.19 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_{C} (ppm) 12.36 (2CH₃), 52.74 (2CH₂, aliphatic), 109.05 (2C, 2C=CH), 121.34 (4CH of arom), 121.91 (2C of arom), 142.02 (2CH, 2C=CH), 151.37 (2C=O of imide), 164.79 (2C=O of imide), 169.21 (2C=O of amide).

۲-۳-۲ دی پپتید (۲،۱-اتان) بیس (۲-۵-متیل-۲،۴-دی اکسو-۴،۳-دی هیدرو پیریمیدین-۱(H۲)) (ایل) استامید (ترکیب ۳)

Brown solid (yield 88%). *Anal.* Calc. for C₁₆H₂₀N₆O₆ (MW = 392.34): C, 48.98; H, 5.14; N, 21.42%. Found: C, 48.92; H, 5.09; N, 21.47%. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3169, 3039, 2958, 2921, 2824, 1739, 1698, 1651, 1468, 1410, 1378, 1353, 1235, 1153, 1024, 996, 969, 908, 890, 863, 791, 760, 726, 687 cm⁻¹. ^1H NMR (250.13 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_{H} (ppm) 1.73 (s, 6H, 2CH₃), 3.66 (s, 4H, 2CH₂, aliphatic), 4.46 (s, 4H, 2CH₂, aliphatic), 7.48 (s, 2H, 2C=CH), 8.11 (s, 2H, 2NH of amide), 11.13 (s, 2H, 2NH of imide). ^{13}C NMR (62.19 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_{C} (ppm) 12.34 (2CH₃), 42.05 (2CH₂, aliphatic), 52.17 (2CH₂, aliphatic), 109.03 (2C, 2C=CH), 142.00 (2CH, 2C=CH), 151.37 (2C=O of imide), 164.75 (4C=O of imide), 169.19 (2C=O of amide).

۲-۳-۲ دی پپتید (۴،۴' [بای تiazول]-۲،۲' دی ایل) بیس (۲-۵-متیل-۲،۴-دی اکسو-۳،۴-دی هیدرو پیریمیدین-۱(H۲)) (ایل) استامید (ترکیب ۴)

Brown solid (yield 85%). *Anal.* Calc. for C₂₀H₂₀N₈O₅S₂ (MW = 516.55): C, 46.50; H, 3.90; N, 21.69; S, 12.41%. Found: C, 46.44; H, 3.83; N, 21.75; S, 12.48%. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3465, 3194, 3062, 2963, 1746, 1705, 1656, 1470, 1248, 971, 760, 688, 561 cm⁻¹. ^1H NMR (250.13 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_{H} (ppm) 1.65 (s, 6H, 2CH₃ of methyl), 4.28 (s, 4H, 2CH₂, aliphatic), 6.76 (s, 2H, 2CH of thiazole), 7.41 (s, 2H, 2C=CH), 10.48 (s, 2H, 2NH of imide), 11.24 (s, 2H, 2NH of amide). ^{13}C NMR (62.19 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_{C} (ppm) 12.19 (2CH₃), 53.73 (2CH₂, aliphatic), 106.71 (2CH of thiazole),

108.88 (2C, 2C=CH), 129.34 (2CH, 2C=CH), 142.41 (2C of 2-thiazole), 151.39 (2C=O of imide), 164.96 (2C, thiazole), 170.04 (2C=O of imide), 170.81 (2C=O of amide).

۲-۳-۵ دی پپتید N',N - (۲،۱-فنیلین) بیس (۲- (۴،۲-دی اکسو-۳-دی هیدرو پیریمیدین-۱- (H۲) - ایل) استامید) (ترکیب ۵)

Red solid (yield 84%). *Anal. Calc.* for $C_{18}H_{16}N_6O_6$ (MW = 412.36); C, 52.43; H, 3.91; N, 20.38%. Found: C, 52.37; H, 3.85; N, 20.44%. FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3140, 3046, 2955, 2923, 2851, 1747, 1705, 1632, 1458, 1427, 1396, 1377, 1351, 1235, 1104, 984, 960, 874, 811, 760, 734, 698, 635, 598 cm^{-1} . 1H NMR (250.13 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_H (ppm) 4.49 (d, 4H, 2CH₂, aliphatic), 5.59 (s, 2CH, 2C=CH), 6.60 (d, 2H, 2CH of arom), 7.34 (s, 2H, 2CH of arom), 7.60 (d, 2H, 2CH, 2C=CH), 10.82 (s, 2H, 2NH of amide), 11.41 (s, 2H, 2NH of imide). ^{13}C NMR (62.19 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_C (ppm) 52.76 (2CH₂, aliphatic), 101.54 (2CH, 2C=CH), 128.00 (2CH of arom), 128.36 (2CH of arom), 128.63 (2C of arom), 146.32 (2CH, 2C=CH), 151.38 (2C=O of imide), 164.22 (2C=O of imide), 169.12 (2C=O of amide).

۲-۳-۶ دی پپتید N',N - (۱،۴-فنیلین) بیس (۲- (۴،۲-دی اکسو-۳-دی هیدرو پیریمیدین-۱- (H۲) - ایل) استامید) (ترکیب ۶)

Dark grey solid (yield 82%). *Anal. Calc.* for $C_{18}H_{16}N_6O_6$ (MW = 412.36); C, 52.43; H, 3.91; N, 20.38%. Found: C, 52.36; H, 3.83; N, 20.46%. FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3046, 2955, 2924, 2850, 1747, 1702, 1632, 1518, 1452, 1421, 1405, 1377, 1351, 1235, 1139, 985, 960, 874, 811, 760, 734, 699, 536 cm^{-1} . 1H NMR (250.13 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_H (ppm) 4.49 (s, 4H, 2CH₂, aliphatic), 5.58 (d, 2H, 2CH, 2C=CH), 6.91 (d, 2H, H- arom), 7.33 (d, 2H, H- arom), 7.58 (d, 2H, 2CH, 2C=CH), 10.81 (s, 2H, 2NH of amide), 11.40 (s, 2H, 2NH of imide). ^{13}C NMR (62.19 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_C (ppm) 52.76 (2CH₂, aliphatic), 101.53 (2CH, 2C=CH), 120.61 and 120.72 (4CH of arom), 142.73 (2C of arom), 146.38 (2CH, 2C=CH), 151.39 (2C=O of imide), 164.27 (2C=O of imide), 169.12 (2C=O of amide).

۲-۳-۷ دی پپتید N',N - (اتان-۲،۱-دی ایل) بیس (۲- (۴،۲-دی اکسو-۳-دی هیدرو پیریمیدین-۱- (H۲) - ایل) استامید)

(ترکیب ۷)

White solid (yield 86%). *Anal. Calc.* for $C_{14}H_{16}N_6O_6$ (MW = 364.31); C, 46.16; H, 4.43; N, 23.07%. Found: C, 46.10; H, 4.38; N, 23.13%. FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3045, 2841, 1748, 1703, 1632, 1536, 1449, 1426, 1396, 1377, 1351, 1244, 1216, 1086, 985, 960, 875, 805, 765, 734, 699, 636, 568, 546, 535 cm^{-1} . 1H NMR (250.13 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_H (ppm) 3.12 (s, 4H, 2CH₂, aliphatic), 4.48 (s, 4H, 2CH₂, aliphatic), 5.57 (d, 2H, $^3J_{HH}=7.25$ Hz, 2CH, 2C=CH), 7.57 (d, 2H, $^3J_{HH}=7.25$ Hz, 2CH, 2C=CH), 8.28 (m, 2H, 2NH of amide), 11.37 (s, 2H, 2NH of imide). ^{13}C NMR (62.19 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_C (ppm) 38.89 (2CH₂, aliphatic), 52.37 (2CH₂, aliphatic), 101.53 (2CH, 2C=CH), 146.29 (2CH, 2C=CH), 151.37 (2C=O of imide), 164.17 (2C=O of imide), 169.08 (2C=O of amide).

۲-۳-۸ دی پپتید N',N - (۴'،۴-بای تiazول-۲،۲-دی ایل) بیس (۲- (۲،۴-دی اکسو-۳-دی هیدرو پیریمیدین-۱- (H۲) - ایل) استامید) (ترکیب ۸)

Brown solid (yield 85%). Anal. Calc. for $C_{18}H_{14}N_8O_6S_2$ (MW = 502.48): C, 43.02; H, 2.81; N, 22.30; S, 12.76%. Found: C, 42.97; H, 2.75; N, 22.37; S, 12.82%. FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3302, 3118, 2950, 2843, 1747, 1709, 1633, 1529, 1449, 1426, 1459, 1396, 1377, 1349, 1334, 1248, 1120, 995, 875, 824, 810, 778, 734, 695, 634, 598, 547 cm^{-1} . 1H NMR (250.13 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_H (ppm) 4.50 (s, 4H, 2CH₂, aliphatic), 5.59 (d, 2H, $^3J_{HH}=7.25$ Hz, 2C, 2C=CH), 6.97 (s, 2H, 2CH of thiazole), 7.58 (d, 2H, $^3J_{HH}=7.25$ Hz, 2CH, 2C=CH), 6.56 (s, 2H, 2NH of imide), 11.37 (s, 2H, 2NH of amide). ^{13}C NMR (62.19 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ_C (ppm) 52.74 (2CH₂, aliphatic), 101.55 (2CH, 2C=CH), 102.73 (2CH of thiazole), 146.30 (2C of thiazole), 146.93 (2CH, 2C=CH), 151.39 (2C=O, imide), 164.20 (2C of thiazole), 168.49 (2C=O of imide), 169.08 (2C=O of amide).

۴-۲- داکینگ مولکولی

آماده سازی پروتئین: ساختار کریستالوگرافی کمپلکس پروتئین LasR باکتری سودوموناس آئروژینوزا به همراه ۳-اکسو-دودکانوایل-هموسرین لاکتون با قدرت تفکیک ۱/۸۳ آنگستروم از بانک اطلاعات پروتئین دانلود گردید (PDB ID: 2UV0). با حذف مولکول‌های لیگاند، آب، مولکول‌های اضافی و همچنین زنجیره‌هایی از پروتئین که برای داکینگ مورد نیاز نیست و سپس با افزودن هیدروژن‌های قطبی و بار به آن، پروتئین مورد نظر جهت فرایند داکینگ آماده گردید.

آماده سازی لیگاند: ترکیبات مورد بررسی را که در این برنامه لیگاند خوانده می‌شوند، با استفاده از نرم‌افزار Hyper Chem رسم و سپس از نظر انرژی با استفاده از روش‌های Molecular mechanics (MM+) و Semi empirical (AM1) بهینه شدند.

داکینگ: تمامی اتم‌های هیدروژن را به ساختار اضافه کرده و بارهای جزئی لیگاند با استفاده از روش سطح تئوری مورد نظر محاسبه گردید و گرید باکس با ابعاد $46 \times 46 \times 46$ طوری تنظیم شد که اسید آمینه‌های جایگاه فعال را در بر گیرد. از الگوریتم ژنتیک لامارکین برای داکینگ استفاده شد و سایر پارامترها بصورت پیش فرض در نظر گرفته شدند. پس از انجام داکینگ بهترین صورت بندی با کمترین میزان انرژی اتصال به عنوان صورت بندی پایدار انتخاب شد.

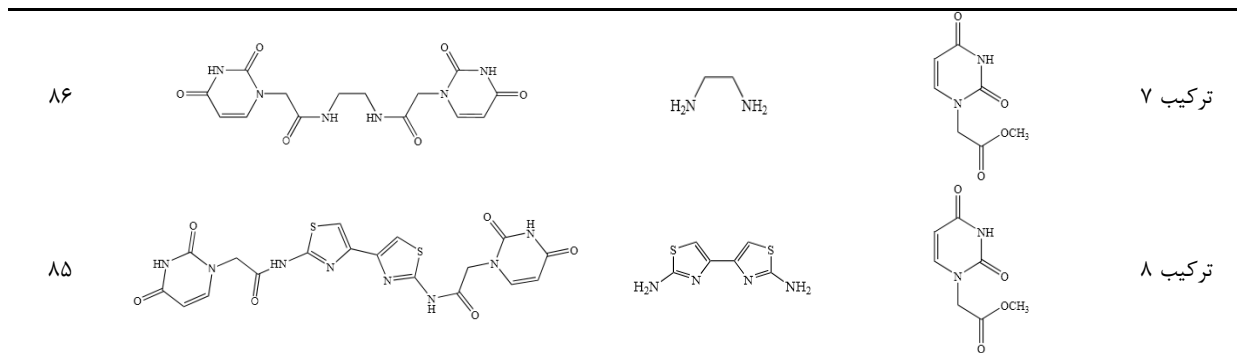
۳- بحث و نتیجه گیری

ساختار ترکیبات سنتزی دی پپتید بر پایه تیمین و اوراسیل با استفاده از روش‌های طیف سنجی مادون قرمز و رزونانس مغناطیسی هسته شناسایی و مورد تایید قرار گرفتند. با توجه به طیف مادون قرمز ترکیبات سنتزی (۱-۸) پیک‌های تایید کننده حضور گروه‌های N-H و C=N به ترتیب در محدوده $3302 - 3039$ و $1656 - 1632$ cm^{-1} ظاهر شده است. همچنین پیک قوی در محدوده $1709 - 1694$ cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه C=O می‌باشد. طیف 1H NMR ترکیبات سنتزی نیز ساختار پیشنهادی آنها را تایید می‌کند. در طیف 1H NMR یک پیک یکتایی در $1/73 - 1/65$ ppm مربوط به متیل تیمین

و پیک مربوط به هیدروژن متیلن آلیفاتیکی در ۴/۲۸ - ۴/۵۰ ppm، همچنین پیک مربوط به هیدروژن‌های آروماتیکی در ناحیه ۷/۷۵ - ۶/۶۰ ppm و پیک مربوط به C=CH حلقه پیریمیدینی در ۷/۸۴ - ۷/۴۱ ppm ظاهر شده است. علاوه بر آن پیک مربوط به N-H آمیدی و ایمیدی به ترتیب در محدوده ۱۱/۰۲ - ۸/۱۱ ppm و ۱۱/۴۲ - ۱۱/۱۳ ppm مشاهده شد. در طیف ^{13}C NMR این ترکیبات پیک کربن متیل متصل به حلقه تیمین در ۱۲/۳۶ - ۱۲/۱۹ ppm، پیک مربوط به کربن متیلن آلیفاتیکی در ۵۲/۱۷ - ۵۳/۷۳ ppm و پیک مربوط به کربن C=CH حلقه پیریمیدینی در ترکیبات تیمین در ppm در ۱۰۸/۸۸ - ۱۰۹/۰۷ و در ترکیبات اوراسیل در ۱۰۱/۵۵ - ۱۰۱/۵۳ ppm ظاهر شده است. همچنین پیک‌های موجود در ppm در ۱۴۶/۹۳ - ۱۰۲/۷۳ به کربن‌های آروماتیکی مربوط می‌باشد. علاوه بر آن پیک‌های مشاهده شده در ۱۵۱/۳۹ - ۱۵۱/۳۷ و ۱۶۹/۰۸ - ۱۷۰/۸۱ ppm به کربن آمیدی نسبت داده شده است. سنتز این ترکیبات با استفاده از روش ارائه شده دارای بازده خوبی (در حدود ۸۰ تا ۸۸ درصد) بودند که در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. ساختار ترکیبات دی‌پپتید سنتز شده بر پایه تیمین و اوراسیل

نام ترکیب	استر	دی آمین	محصول	بازده %
ترکیب ۱				۸۴
ترکیب ۲				۸۳
ترکیب ۳				۸۸
ترکیب ۴				۸۵
ترکیب ۵				۸۴
ترکیب ۶				۸۲



بمنظور درک برهم‌کنش‌های ترکیبات سنتزی در جایگاه فعال LasR، داکینگ مولکولی انجام شد. آنالیز نتایج حاصل از داکینگ ترکیبات سنتزی در جایگاه اتصال پروتئین LasR نشان می‌دهند که ترکیبات دارای انرژی اتصالی در محدوده $11/42$ تا $-8/27$ kcal/mol مهار کنندگی یا بازداری که نشان‌دهنده توانایی بازدارندگی یک لیگاند است در محدوده $4/29 - 863/55$ nM است. ثابت مهار کنندگی معادل غلظتی از لیگاند است که حداکثر ۵۰ درصد از کارایی یک گیرنده را مختل کند [۲۶]. همچنین جهت اعتبار سنجی فرایند داکینگ، مولکول ۳-اکسو-دودکانوایل هموسرین لاکتون از جایگاه فعال کمپلکس پروتئین LasR استخراج شد و سپس با پروتئین LasR آماده شده، داکینگ برگشتی انجام شد. با توجه به اینکه میزان تغییرات صورت بندی لیگاند در هنگام اتصال توسط آنالیز ریشه دوم انحراف معیار (RMSD) سنجیده می‌شود و هر چه میزان این تغییرات کمتر باشد نشان‌دهنده مناسب‌تر بودن لیگاند است، بطوریکه با کمترین تغییر در جایگاه فعال گیرنده خود جای می‌گیرد. با توجه به اینکه RMSD محاسبه شده کمتر از ۲ آنگستروم بود، صحت پارامترهای مورد استفاده مورد تایید قرار گرفت [۲۷]. بر اساس نتایج بدست آمده از محاسبات داکینگ که در جدول ۲ آورده شده است، پایدارترین صورت بندی داک شده مربوط به ترکیب ۴ می‌باشد که دارای بیشترین انرژی اتصال ($-11/42$ kcal/mol) و کمترین ثابت مهار کنندگی ($4/29$ nM) است. علاوه بر این گزارش شده است که بکارگیری روش‌های مکانیک مولکولی/مکانیک کوانتومی در محاسبات داکینگ منجر به نتایج دقیق تری می‌شود. بنابراین، لیگاند دارای بهترین انرژی اتصال بطور مجدد با استفاده از روش‌های مکانیک کوانتومی و مولکولی مورد محاسبات قرار گرفته تا نتایج بهتری حاصل شود [۲۸،۲۹].

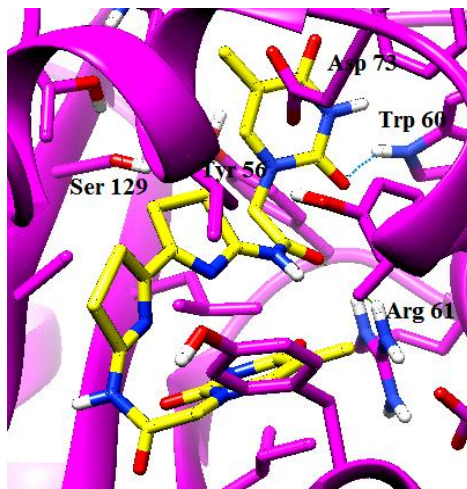
با توجه به شکل ۳ و صورت بندی ترکیب ۴ در جایگاه اتصال LasR مشاهده می‌شود که بین اتم اکسیژن گروه کربونیل حلقه پیریمیدین تیمین با آمینو اسید تریپتوفان ۶۰ پیوند هیدروژنی تشکیل شده است. بر اساس مطالعات گزارش شده از ساختار کریستالوگرافی کمپلکس طبیعی لیگاند-پروتئین (LasR; 3-oxo-C12-HSL) آمینو اسیدهای جایگاه اتصال عبارتند از تیروزین ۵۶، آرژنین ۶۱، تریپتوفان ۶۰، سرین ۱۲۹، ترئونین ۷۵ و آسپارتیک اسید ۷۳. در مطالعه حاضر، ترکیبات سنتزی با توجه به جدول ۲ در بهترین موقعیت‌های داک شده برهم‌کنش‌های هیدروژنی مشابهی با اسیدهای آمینه سرین ۱۲۹، تیروزین

۵۶، تیروزین ۶۴، تیروزین ۹۳، تریپتوفان ۶۰ و آسپارتیک اسید ۷۳ و لوسین ۱۲۵ دارند که با برهم‌کنش‌های ساختار کریستالوگرافی کمپلکس طبیعی لیگاند-پروتئین (LasR;3-oxo-C12-HSL) همسویی دارد.

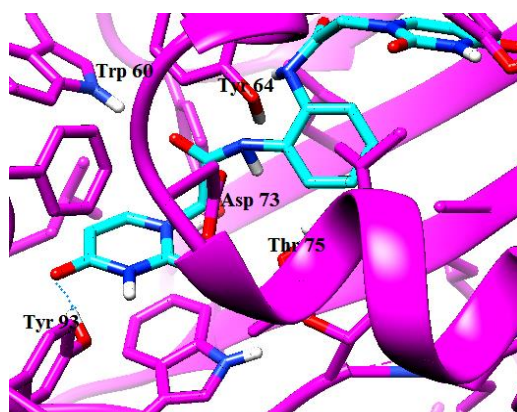
جدول ۲. نتایج داکینگ مولکولی ترکیبات دی‌پپتیدی سنتز شده بر پایه تیمین و اوراسیل در جایگاه فعال پروتئین LasR

اسید آمینه‌های درگیر در پیوند هیدروژنی	ثابت مهارکنندگی ki(nM)	تغییرات انرژی اتصال (kcal/mol)	نام ترکیب
Ser 129	۸۶۳/۵۵	-۸/۲۷	ترکیب ۱
Tyr 64, Leu 125	۸۳/۵۲	-۹/۶۶	ترکیب ۲
Trp60, Leu 125	۱۲۶/۹۶	-۹/۴۱	ترکیب ۳
Trp 60	۴/۲۹	-۱۱/۴۲	ترکیب ۴
Tyr 93	۲۱/۶۲	-۱۰/۴۶	ترکیب ۵
Trp 60, Tyr 93, Ser 129	۳۰/۰۹	-۱۰/۲۶	ترکیب ۶
Trp60, Leu 125	۶۳۱/۶	-۸/۴۶	ترکیب ۷
Tyr 56, Tyr 93, Ser 129, Asp 73	۴۲۸/۸۵	-۸/۶۹	ترکیب ۸

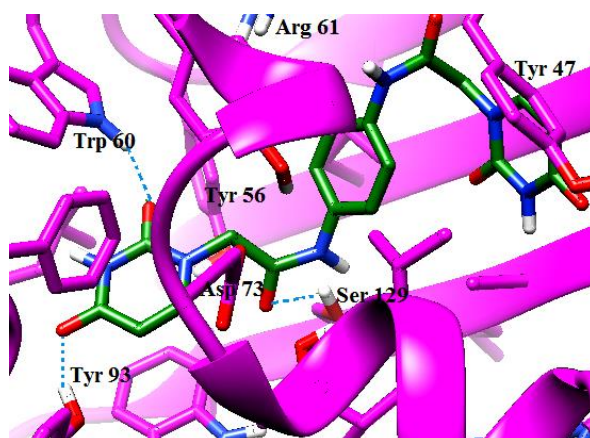
بعلاوه پایدارترین صورت‌بندی داک شده ترکیب ۵ و ۶ به ترتیب دارای انرژی اتصال kcal/mol $-۱۰/۴۶$ و $-۱۰/۲۶$ بودند که شکل مربوط به صورت‌بندی و برهم‌کنش هیدروژنی ایجاد شده بین ترکیب و جایگاه فعال به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است.



شکل ۳- صورت‌بندی داک شده و برهم‌کنش هیدروژنی ترکیب ۴ در جایگاه فعال پروتئین LasR



شکل ۴- صورت‌بندی داک شده و برهم‌کنش هیدروژنی ترکیب ۵ در جایگاه فعال پروتئین LasR



شکل ۵- صورت‌بندی داک شده و برهم‌کنش هیدروژنی ترکیب ۶ در جایگاه فعال پروتئین LasR

با توجه به برهم‌کنش‌های ایجاد شده به نظر می‌رسد که گروه اکسیژن گروه کربونیل حلقه پیریمیدینی نقش مهمی در تشکیل پیوند هیدروژنی دارد که به پایداری صورت‌بندی ترکیبات و همچنین فعالیت مهار کنندگی آن‌ها در برابر فاکتورهای ویروالانس تحت کنترل کوئوروم سنسینگ کمک می‌کند.

بطور کلی نتایج ارزیابی‌های بیوشیمیایی بیشترین همبستگی را با روش‌های محاسباتی طراحی دارو نشان می‌دهند. با توجه به اینکه روش‌هایی مانند داکینگ، رابطه کمی ساختمان-فعالیت سه بعدی و جستجوی فارماکوفور برای مدل سازی ترکیب مورد مطالعه در جایگاه فعال نقطه هدف بکار گرفته می‌شوند، بین نتایج محاسبات و نتایج ارزیابی‌های بیوشیمیایی ارتباط مستقیمی وجود دارد [۳۰]. علاوه بر این گزارش شده است که بکارگیری روش‌های مکانیک مولکولی/مکانیک کوانتومی در داکینگ (بعنوان مثال در بررسی فعالیت ضد سرطانی و ضد میکروبی ترکیباتی نظیر کینازولینون‌ها، ایمیدازول و بنزوفوران) نتایج مطلوبی نشان می‌دهند و بین نتایج ارزیابی‌های بیوشیمیایی و نتایج داکینگ همسویی خوبی قابل مشاهده است [۳۱-۳۳].

۴- خلاصه

در مطالعه حاضر تعدادی از مشتقات دی‌پپتیدی بر پایه تیمین و اوراسیل سنتز و ساختار آن‌ها توسط طیف سنجی FT-IR، $^1\text{H NMR}$ و $^{13}\text{C NMR}$ تایید گردید. همچنین با استفاده از روش محاسباتی داکینگ اثر مهارکنندگی ترکیبات سنتزی در برابر پروتئین تنظیم کننده LasR تحت کنترل کوئوروم سنسینگ در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی و تایید قرار گرفت. یافته‌های مطالعه داکینگ مولکولی با فراهم ساختن درک بیشتر از جزئیات برهم‌کنش‌های ترکیبات مهار کننده و جایگاه فعال پروتئین هدف، منجر به اصلاحات ساختاری و طراحی ترکیبات جدید با فعالیت بیشتر می‌گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از حمایت‌های دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشگاه زنجان و دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) صمیمانه تشکر می‌نمایند.

۵- مراجع

- [1] V. A. Kataev, I. N. Tyurenkov, S. A. Meshcheryakova, V. N. Perfilova, D. A. Munasipova and D. D. Borodin, *Pharm. Chem. J.*, **48** (2014) 16.
- [2] M. Dabiri, H. Arvin-Nezhad, H. R. Khavasi and A. Bazgir, *Tetrahedron*, **63** (2007) 1770.
- [3] V. Malik, P. Singh and S. Kumar, *Tetrahedron*, **61** (2005) 4009.
- [4] B. Banerji, S. K. Pramanik, U. Pal and N. C. Maiti, *Chem. Cent. J.*, **7** (2013) 91.
- [5] T. Defoirdt, N. Boon and P. Bossier, *PLoS pathog.*, **6** (2010) e1000989.
- [6] I. A. Khmel and A. Z. Metlitskaya, *Inst. Mol. Gen.*, **2** (2006) 195.
- [7] T. R. De Kievit and B. H. Iglewski, *Infect. Immun.*, **68** (2000) 4839.
- [8] L. C. M. Antunes, R. B. Ferreira, M. M. Buckner and B. B. Finlay, *Microbiology*, **156** (2010) 2271.
- [9] D. Kadhim and M. R. Ali, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, **3** (2014) 204.
- [10] C. D. Sifri, *Clin. Infect. Dis.*, **47** (2008) 1070.
- [11] E. Déziel, F. Lépine, S. Milot, J. He, M. N. Mindrinos, R. G. Tompkins and L. G. Rahme, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101** (2004) 1339.
- [12] H. S. Kim, S. H. Lee, Y. Byun, and H. D. Park, *Sci. Rep.*, **5** (2015) 8656.
- [13] L. Kumar, S. Chhibber, R. Kumar and K. Harjai, *Fitoterapia*, **102** (2015) 84.
- [14] H. Wu, Z. Song, M. Hentzer, J. B. Andersen, S. Molin, M. Givskov, and N. Høiby, *J. Antimicrob. Chemother.*, **53** (2004) 1054.
- [15] S. A. El-Mowafy, M. I. Shaaban, K. H. A. El-Galil, *J. Appl. Microbiol.*, **177** (2014) 1388.
- [16] A. Heidari, N. Noshiranzadeh, F. Haghi and R. Bikas, *Microb. Pathog.*, **112** (2017) 103.
- [17] K. Saurav, C. Valeria, V. Venturi and L. Steindler, *Marine Drugs*, **15** (2017) 53.

- [18] C.Y. Loo, R. Rohanzadeh, P.M. Young, D. Traini, R. Cavaliere, C. B. Whitchurch, and W. H. Lee. *J. Agric. Food. Chem.*, **64** (2016) 2513.
- [19] P. Tyagi, M. Singh, H. Kumari, and K. Mukhopadhyay, *PloS one*, **10** (2015) e0121313.
- [20] M. Sabbah, F. Fontaine, L. Grand, M. Boukraa, M.L. Efrit, A. Doutheau, L. Soulere and Y. Queneau, *Bioorg. Med. Chem.*, **20** (2012) 4727.
- [21] M. R. Hansen, T. H. Jakobsen, C. G. Bang, A. E. Cohrt, C. L. Hansen, J. W. Clausen, S. T. Le Quement, T. Tolker-Nielsen, M. Givskov and T. E. Nielsen. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **23** (2015), 1638.
- [22] S. Reverchon, B. Chantegrel and C. Deshayes, *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **12** (2002) 1153.
- [23] W.K. Goh, C. R. Gardner and K. V. G. Chandra Sekhar, *Bioorg. Med. Chem*, **23** (2015), 7366.
- [24] A. Bucio-Cano, A. Reyes-Arellano, J. Correa-Basurto, M. Bello, J. Torres-Jaramillo, H. Salgado-Zamora, E. Curiel-Quesada, J. Peralta-Cruz, *Bioorg. Med. Chem.*, **23** (2015) 7565.
- [25] J. N. Capilato, S. V. Philippi, T. Reardon, A. McConnell, D. C. Oliver, A. Warren, J. S. Adams, C. Wu, L. J. Perez, *Bioorg. Med. Chem.*, **25** (2017) 153.
- [26] M. Allert, S.S. Rizk, L.L. Looger, and H.W. Hellinga, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, USA*. **101** (2004) 7907.
- [27] B. Kramer, M. Rarey and T. Lengauer, *Proteins: Structure, Function and Genetics*. **37** (1999) 228.
- [28] G. Khodarahmi, P. Asadi, H. Farrokhpour, F. Hassanzadeh, M. Dinari, *RSC. Adv.*, **5** (2015) 58064.
- [29] غلامجانی مقدم، کیانا؛ هاشمیان زاده، سید مجید، مجله شیمی کاربردی، شماره ۳۶ (۱۳۹۴) صفحه ۱۷۷.
- [30] د. یانگ، طراحی محاسباتی دارو؛ ترجمه رسول امینی، سارا، دباغ، فاطمه، وثوق، فراز، چاپ اول، انتشارات جامعه نگر، تهران، ۱۳۹۱.
- [31] P. Asadi, G. Khodarahmi, A.J. Najafabadi, L. Saghaei, F. Hassanzadeh, *Iran. J. Basic. Med. Sci.*, **20** (2017) 975.
- [32] P. Asadi, G. Khodarahmi, H. Farrokhpour, F. Hassanzadeh, L. Saghaei, *Res. Pharm. Sci.*, **12** (2017) 233.
- [33] M. Dinari, F. Gharahi, P. Asadi, *J. Mol. Struct.*, **1156** (2018) 43.