جامعة الموصل

كلية العلوم

تقييم التأثيرات الكيموحيوية والجزيئية لبعض المركبات الحلقية غير المتجانسة على طفيلي اللشمانيا الأحشائية خارج الجسم الحي

هيثم لقمان شهاب الحيالي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف

الأستاذ	الأستاذ المساعد
الدكتور عبد الوهاب جعفر الحمداني	الدكتورة منتهى محمود القطان

1439 هـ

2018 م

جامعة الموصل

كلية العلوم

تقييم التأثيرات الكيموحيوية والجزيئية لبعض المركبات الحلقية غير المتجانسة على طفيلي اللشمانيا الأحشائية خارج الجسم الحي

أطروحة تقدم بها

الطالب

هيثم لقمان شهاب الحيالي

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات درجة الدكتوراه فلسفة

في

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف

الأستاذ

الدكتور عبد الوهاب جعفر الحمداني

الأستاذ المساعد

الدكتورة منتهى محمود القطان

1439 هـ

2018 م

الخلاصة Summary:

تناولت الدراسة الحالية تشييد عدد من المركبات الحلقية غير المتجانسة بما فيها الأوكسيرانات والبايروليدينات والبيريدونات ومن ثم اختبرت فاعلية هذه المركبات ضد الطور المسوط Promastigotes اللشمانيا الأحشائية *Leishmania infantum* خارج الجسم الحي.

وقد تم أولاً تشييد المركبات الأولية وهي الجالكونات التي تعد من المركبات الوسطية المستخدمة في بناء العديد من المركبات الحلقية غير المتجانسة والتي تتكون من حلقتين أروماتيتين مرتبطة مع بعضها البعض بثلاث ذرات كاربون ، ثانياً تم تشييد قواعد شيف الناتجة من تكاثف الكيتونات أو الألديهايدات مع الأمينات الأولية. بعد ذلك شيدت الأوكسيرانات ذات الحلقات الثلاثية وذلك من خلال تفاعل بيروكسيد الهيدروجين مع الجالكونات ، أما البايروليدينات ذات الحلقات الخماسية فتم تشييدها بمزج كميات متساوية من قواعد شيف مع الجالكونات ، وأخيراً فإن مركبات البيريدون ذات الحلقات السداسية قد شيدت عن طريق تفاعل مركب الأسيتامايد أو الثايوأسيتامايد مع الجالكونات.

وتجدر الإشارة إلى أن جميع المركبات المشيدة قد تم دعم تراكيبها الجزيئية باستخدام البيانات الطيفية مثل الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet (UV) والأشعة تحت الحمراء Infra Red (IR) فضلاً عن استخدام طيف الرنين النووي المغناطيسي Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

أعطت كل المركبات قيد الدراسة وبجميع تراكيزها المستخدمة تأثيراً سمياً على الطور المسوط للشمانيا النامية في الوسط الزرعي عند الفترات 72 و 120 ساعة ، وقد تراوح التركيز القاتل لـ 50% من الطفيليات Inhibitory Concentration 50 (IC_{50}) عند الطور اللوغاريتمي 120 ساعة ما بين (15–25) مايكروغرام / مل في الأوكسيرانات وبين (10–30) مايكروغرام / مل في البايروليدينات والبيريدونات.

درس أيضاً تأثير المركبات الحلقية غير المتجانسة على عدد وزمن الجيل إذ أدت إلى خفض عدد الجيل وبواقع (1.5–3.0) جيل خلال فترات التعريض كما وأدت إلى رفع زمن الجيل ما بين (5–10) ساعات.

ولغرض التعرف على الموقع المحتمل أن تؤثر عليه المركبات الحلقية تم دراسة تأثير أنواع مختلفة منها على عدد من الجينات المتعلقة ببعض المسارات داخل الخلية ، ومن تجارب استخلاص وتضاعف الدنا باستخدام تفاعل البلمرة PCR أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين *KMP II* في اللشمانيا وجود تغيير وراثي نتيجة تأثير بعض المركبات قيد الدراسة وقد ظهرت حزم بأطوال تختلف عن الحزم القياسية لهذا الجين والمركبات هي 2–(بارا–ميثوكسي بنزويل)–3–فينيل أوكسيران (O6) و 2–فينيل–3–بنزويل–4–(بارا–N ، N–داي مثيل امينو فينيل)–5–(3' ، 4'–مثيلين ديوكسي فينيل) بايروليدين (P5) و 2–فينيل–3–بنزويل–4 ، 5–[بس(3' ، 4'–مثيلين ديوكسي فينيل)] بايروليدين

(P8). وهذا قد يوفر دليل على الحد من عملية تضاعف الجسيم الحركي والتي لها علاقة بالجين وذلك لأن أي خلل في التعبير عن هذا الجين يؤدي إلى تثبيط نمو الخلية وبالتالي التقليل من أعداد الأطوار المسوطة في اللشمانيا.

كذلك فإن نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين *LPG 3* في اللشمانيا أظهرت وجود تغيير وراثي نتيجة تأثير بعض المركبات والتي أعطت أكثر من حزمة وبأطوال تختلف عن الحزم القياسية للجين والمركبات هي (O6) و(P8) والتي بدورها تعد سبباً آخر في تضاؤل أعداد الطور المسوط وذلك لأن هذا الجين هو المسؤول عن تكوين السطوح الواقية للأغشية والتراكيب الخلوية الداخلية لهذه الطفيليات وبوجود هذا التغيير قد يُفقد اللشمانيا لهذا السطح.

وفيما يتعلق بجين *MDR* و *MAT II* فقد أظهرت جميع العينات المعاملة بالمركبات الحلقية المختلفة وغير المعاملة حزم بنفس الأطوال وهذا دليل على عدم حدوث تغيير وراثي في هذه الجينات مما يؤكد على عدم حصول أي مقاومة للطفيلي ضد هذه المركبات ، وذلك لأنه تمت الإشارة إلى أن لهذين الجينين دور في مقاومة الأدوية في هذه الطفيليات وأن حدوث الطفرات أو زيادة التعبير الجيني فيهما قد يسبب تغييرات في المستوى الجزيئي مما قد يحافظ على الوظائف الحيوية ويقلل من قابلية تثبيط الخلية. أما بخصوص جين *PTR 1* فلم يظهر في هذه السلالة.

وتشير النتائج المذكورة آنفاً إلى إمكانية استخدام مركبات الأوكسيران (O1 ، O6 ، O7) والبايروليدين (P3 ، P5 ، P8) والبيريدون (Y7 ، Y8 ، Y9) بوصفها مضاداً للشمانيا وأن وجود المعوضات على الحلقة الأروماتية يزيد من التأثير التثبيطي لهذه المركبات مثل مجموعة النايترو NO_2 ، الميثوكسي OCH_3 ، المثيلين داي أوكسي $3,4\text{-}CH_2O_2$ و N,N–ثنائي المثيل وفي موقع البارا. فضلاً عن استخدام كل من جين *KMP II* و *LPG 3* بوصفها أهدافاً مستقبلية في المعالجة الكيميائية لطفيلي اللشمانيا.

University of Mosul

College of Science

Evaluation of Biochemical and Molecular Effects of Some Heterocyclic Compounds on *Leishmania infantum* Parasite *In Vitro*

Haitham Luqman Shihab Al-Hayali

Ph. D Thesis

Biology / Zoology

Supervised by

Prof. Dr.	Assist. Prof. Dr.
Abdulwahhab Jafer Al-Hamadany	Muntaha Mahmood Al-Kattan

1439 AH **2018 AD**

University of Mosul

College of Science

Evaluation of Biochemical and Molecular Effects of Some Heterocyclic Compounds on *Leishmania infantum* Parasite *In Vitro*

Ph. D Thesis Submitted by

Haitham Luqman Shihab Al-Hayali

To

The Council of the College of Science University of Mosul in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy

In

Biology / Zoology

Supervised by

Prof. Dr.
Abdulwahhab Jafer Al-Hamadany

Assist. Prof. Dr.
Muntaha Mahmood Al-Kattan

1439 AH **2018 AD**

Summary:

The present study drives at the synthesis of some heterocyclic compounds including oxiranes, pyrrolidines and pyridones and study their inhibitory effect on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes *in vitro*.

For this purpose, substituted chalcones were prepared first, the intermediate compounds which used to synthesize many heterocycles. The chalcones are consist of two aromatic rings linked to each other by three carbon atoms. In the second stage, schiff bases had been prepared by addition of primary amine to aldehyde or ketone. Then the three-membered rings, oxiranes were synthesized from the reaction between hydrogen peroxide and chalcones, while the five-membered rings, pyrrolidines were synthesized by mixing equal amounts of schiff bases and chalcones. Finally, the six-membered rings, pyridones were synthesized from the reaction of acetamide or thiocetamide with chalcones.

It is worthy to mention that the structures of all synthesized heterocycles had been supported by spectral data: Ultra Violet (UV), Infra-Red (IR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

The results showed the inhibitory effect of different concentrations of all synthesized heterocycles on *L. infantum* promastigotes growth during 72 h. and 120 h. The lethal concentration of 50% of the parasites (IC_{50}) at logarithmic phase 120 h. was (15-25) µg / ml for oxiranes and (10-30) µg / ml for pyrrolidines and pyridones.

The results also had indicated that heterocyclic compounds affected the generation number and time, by reducing (1.5-3.0) generations and increasing the generation time between (5-10) h.

Furthermore, they studied the synthesized heterocycles effect on some genes that related to different pathways in the cell. First the results of the electrophoresis of PCR amplification products of *KMP II* gene in leishmania mentioned that appearances of hetero packages in treated promastigotes refers to some genetic changes compared with control group in the compounds: 2-(p-methoxy benzoyl)-3-phenyl oxirane (O1), 2-phenyl-3-benzoyl-4-(p-N,N-dimethyl amino phenyl)-5-(3',4'-methylene dioxy phenyl) pyrrolidine (P5) and 2-phenyl-3-benzoyl-4,5-[Bis (3',4'-methylene dioxy phenyl)] pyrrolidine (P8). This may provide an evidence about the reducing of kinetoplastide replication, which was related to the gene because any defect in expression leads to cell inhibition and decreases the leishmanial promastigotes.

Also, the electrophoresis of PCR amplification products of *LPG 3* gene showed that appearances of the hetero packages in treated promastigotes refers to

some genetic changes compared with control group in (O6) and (P8) compounds. The results may added another reason for the promastigotes decreased because this gene gives a protective surface for membranes and internal cellular structures of leishmania parasites and this changes may cause its loss.

While, the *MDR* and *MAT II* genes were indicated that there is no genetic changes have occurred in all samples and this may demonstrate that there is no resistance against the heterocyclic compounds. The studies have shown that these genes play a role in drugs resistance of leishmania parasites through the mutations or increased gene expression and this may cause changes in the molecular level, which may keep on the vital functions and reduce the cell inhibition. As for the *PTR 1* gene didn't appear in this strain.

In conclusion, the up world results showed that the heterocycles: Oxiranes (O1, O6, O7), Pyrrolidines (P3, P5, P8) and Pyridones (Y7, Y8, Y9) could be used as anti-leishmanial agents and the presence of substituents like nitro, methoxy, 3,4-CH_2O_2 and N,N-dimethyl in para position may increase their inhibitory effect. As well, *KMP II* and *LPG 3* were proved a feasible target for chemotherapy in *L. infantum*.