



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة الأنبار - كلية التربية للعلوم الصرفة

# دراسة تأثير التثبيط لأنزيم Cyclooxygenase لمجموعة من المركبات والمستخلصات النباتية

رسالة مقدمة إلى  
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة الأنبار وهي جزء من  
متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الكيمياء

من قبل

هديل جبير معيوف

بكالوريوس كيمياء

كلية التربية للنبات

جامعة الأنبار - 2011

إشراف

أ.م.د. بلال جاسر محمد عبد الراوي

كلية التربية للنبات

1434 هـ

2013 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يُسَبِّحُ لِلَّهِ مَا فِي السَّمَوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ الْمَلِكِ الْقُدُّوسِ  
الْعَزِيزِ الْحَكِيمِ ﴿١﴾ هُوَ الَّذِي بَعَثَ فِي الْأُمَمِينَ رَسُولًا مِّنْهُمْ يَتْلُوا  
عَلَيْهِمْ آيَاتِهِ وَيُزَكِّيهِمْ وَيُعَلِّمُهُمُ الْكِتَابَ وَالْحِكْمَةَ وَإِنْ كَانُوا مِنْ  
قَبْلُ لَفِي ضَلَالٍ مُّبِينٍ ﴿٢﴾

صدق الله العظيم

سورة الجمعة

الآية 1 - 2

## اقرار المشرف

أقر بأن اعداد هذه الرسالة جرى تحت اشرافي في مختبرات قسم الكيمياء/  
كلية التربية للبنات /جامعة الانبار كجزء من متطلبات نيل درجة ماجستير  
علوم في الكيمياء

التوقيع:

الاسم :أ.م.د بلال جاسر محمد عبد الراوي

المرتبة العلمية :أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للبنات- جامعة الأنبار

التاريخ : 2013/ 12 / 23

### مصادقة رئيس قسم الكيمياء

بناء على التوصيات المقدمة من قبل المشرف والمقومين العلمي واللغوي  
أرشح هذه الرسالة للمناقشة .

التوقيع :

الاسم : د. حميد خالد علي الدليمي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة

الأنبار

التاريخ : 2013/ 12 / 23

## اقرار المقوم اللغوي

أقر أني قومت رسالة الماجستير الموسومة دراسة تأثير التثبيط لأنزيم  
**Cyclooxygenase** لمجموعة من المركبات والمستخلصات النباتية  
لغويًا، وقد جري تحت إشرافنا وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير  
في علوم الكيمياء .

التوقيع:

الاسم :

المرتبة العلمية :

العنوان :

التاريخ : / / 2013

## اقرار المقوم العلمي

أقر أني قومت رسالة الماجستير الموسومة (دراسة تأثير التثبيط لأنزيم Cyclooxygenase لمجموعة من المركبات والمستخلصات النباتية) علمياً، قد جري تحت إشرافي وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الكيمياء .

التوقيع:

الاسم :

المرتبة العلمية :

العنوان :

التاريخ : / / 2013

## إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة نقر ونشهد أننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة  
**(دراسة تأثير التثبيط لأنزيم Cyclooxygenase لمجموعة من المركبات  
والمستخلصات النباتية).** لطالبة الماجستير **هديل جبير معيوف** بتاريخ 10 /  
4 / 2014 وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفي ما هو متعلق بها ونقر أنها جديرة  
بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الكيمياء بتقدير ( امتياز).

رئيس اللجنة :	عضو اللجنة :
التوقيع :	التوقيع :
الاسم : د. سلمان علي أحمد	الاسم : د. خالد فاروق عبد الغفور
اللقب العلمي : أستاذ مساعد	اللقب العلمي : أستاذ مساعد
التاريخ: 2014/ 4 / 10	التاريخ: 2014/4 / 10
العنوان: كلية العلوم- جامعة النهريين.	العنوان: كلية العلوم- جامعة الأنبار.

عضو اللجنة :	عضو اللجنة (المشرف):
التوقيع :	التوقيع :
الاسم : د. قتيبة فرحان داود	الاسم: د . بلال جاسر محمد.
اللقب العلمي : أستاذ مساعد	اللقب العلمي : استاذ مساعد.
التاريخ: 2014/ 14 / 10	التاريخ: 2014/ 4 / 10
العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة الأنبار	العنوان: كلية التربية للنبات-جامعة الأنبار.

## قرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة بجلسته ( )  
المنعقدة بتاريخ / / وقرر منحها شهادة الماجستير في علوم الكيمياء.

التوقيع :	التوقيع :
الاسم : د. عزمي توفيق حسين	الاسم :
اللقب العلمي : استاذ مساعد.	اللقب العلمي :
التاريخ: / /	التاريخ: / /
عميد كلية التربية للعلوم الصرفة	امين مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة.

## الإهداء

إلى سيد البرية وخير من نطق بالضاد  
نبينا المصطفى محمد ((ﷺ))

إلى التي الجنة تحت أقدامها  
والدتي العزيزة

إلى الذي رضا الله من رضاه  
والدي العزيز (لما أحاطني به من رعاية وعناية)  
أقول ((رب ارحمهما كما ربياني صغيراً))

إلى العيون التي لم تفارقني دموعها  
وجرت في عروقي دماؤها  
ومن اسعد الله قلبي بنقائهم وكانوا لي الساعد الأيمن  
إخوتي

إلى زهور حياتي  
ونبض دمائي  
أخواتي  
أهدي جهدي المتواضع

## شكر وامتنان

سبحان الله على كمال قدرته ، والحمد لله على تمام نعمته ، وافضل الصلاة والتسليم على خير صفوته ، الذي أنار الوجود بطلعته وأشرف خلق الله أجمعين محمد (ﷺ) وعلى اله وصحبه اجمعين ومن دعا بدعوته الى يوم الدين . ويعد .

يسرنى وانا انهي خطوتي الاخيرة في مشوار دام اكثر من سنتين قطعته بمصاعبه ومشاقه التي طغت على متعته وسهولته ، ان أحمد الله عز وجل حمداً يوافي نعمه ويكافئ مزيده الذي ألهمني ووفقتي لإكمال هذا البحث ... فاخصه بالثناء والفضل .

أتقدم بخالص الشكر والامتنان وبكل التقدير والاحترام الى استاذي الفاضل الدكتور بلال جاسر محمد عبد الراوي لاقتراحه موضوع البحث ولما بذله من جهود متواصلة في التوجيه والمتابعة التي استمرت منذ بداية البحث حتى كتابة آخر كلمة فيه ولا يسعني إلا أن ادعو له الله بدوام الصحة والتوفيق والسداد واستمرار عطائه العلمي .

وأقدم بجزيل الشكر إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم الكيمياء ومنتسبيه كما يطيب لي ان اعبر عن اعتزازي وتقديري الى عميد كلية التربية للبنات ورئيس قسم الكيمياء والى جميع أساتذتي الأفاضل في قسم الكيمياء لتسهيلهم مجريات البحث واخص منهم بالذكر الأستاذ علي كريم عليوي الذي كان لها الاثر الكبير في مساندي ودعمني راجية من الله سبحانه وتعالى ان يوفقه لخدمة العلم .

كما أتقدم بشكري وتقديري وعرفاناً بالجميل الى الأستاذ أثير عبد الحميد خشمان أحد تدريسي كلية الصيدلة ، والأستاذ ثائر عبد القادر الألوسي أحد تدريسي كلية العلوم. كما أسجل الشكر والتقدير الى زملائي وزميلاتي في الدراسات العليا وأخص بالذكر منهم (أية عامر سعيد) وان يوفقه الله في مسيرتهم العلمية.

ويقف قلبي عاجزا عن تسجيل أسمى آيات الشكر والتقدير والعرفان بالجميل إلى من كان عوناً لي في جميع أوقاتي الصعبة (عائلتي) لمساندتها ودعمها المتواصل لي وتحملها معي عناء هذا الجهد فجزاها الله عني خير الجزاء .

هذا وأسأل الله العلي العظيم ان يعينني على ذكره وشكره وحسن عبادته وان يكون عملي دائماً وابدأً خالصاً لوجهه الكريم ... انه نعم المولى ونعم النصير .

## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع
I	قائمة المحتويات
IV	قائمة الجداول
IV	قائمة الأشكال
VII	قائمة الرموز والمختصرات
VIII	الخلاصة
الفصل الأول-المقدمة	
1	1 المقدمة
2	1-1 تأريخ الأنزيم
4	2-1 الأشكال المتناظرة لأنزيمات الأكسدة الحلقية
4	1-2-1 أنزيم الأكسدة الحلقية-1
5	2-2-1 أنزيم الأكسدة الحلقية-2
5	3-2-1 أنزيم الأكسدة الحلقية-3
6	3-1 الوظائف الحيوية لأنزيمات الأكسدة الحلقية
6	1-3-1 الجهاز الهضمي
6	2-3-1 الكلى
7	4-1 التركيب البنائي لأنزيمات الأكسدة الحلقية
8	1-4-1 المجال الشبيه بعامل نمو البشرية
8	2-4-1 مجال ربط الغشاء
9	3-4-1 المجال التحفيزي
10	1-3-4-1 الموقع الفعال للأكسدة الحلقية
10	2-3-4-1 الموقع الفعال للبيروكسيداز
11	5-1 الوظيفة
12	6-1 ميكانيكية عمل أنزيمات الأكسدة الحلقية
14	7-1 الالتهاب
14	1-7-1 الالتهاب الحاد
15	2-7-1 انحلال الالتهاب

16	3-7-1 الالتهاب المزمن
17	4-7-1 الأمراض الناتجة عن الالتهاب المزمن
17	1-4-7-1 السرطان
18	2-4-7-1 مرض الزهايمر
19	5-7-1 أدوية مضادات الالتهاب
19	1-5-7-1 مضادات الالتهاب الستيرويدية
20	2-5-7-1 أدوية مضادات الالتهاب غير الستيرويدية
22	3-5-7-1 مثبطات COX-2 الانتقائية
24	6-7-1 النباتات مصدر لمضادات الالتهاب
26	8-1 الحسابات النظرية لتنشيط الأنزيم
26	1-8-1 العلاقة الكمية بين الهيكل والنشاط
27	1-1-8-1 واصفات العلاقة الكمية بين الهيكل والنشاط
28	2-8-1 الالتحام الجزيئي
30	9-1 الهدف من البحث
الفصل الثاني - المواد وطرائق العمل	
31	1-2 الأجهزة المستعملة
31	2-2 المواد الكيميائية
33	3-2 الحيوانات التجريبية
33	4-2 المواد النباتية
34	5-2 تحضير المركبات
34	1-5-2 مخططات التحضير
38	2-5-2 طرائق العمل
38	1-2-5-2 تحضير المحاليل
38	2-2-5-2 تحضير كلوريد الأيبوبروفين
38	3-2-5-2 تحضير (2) N-(4-bromophenyl)-2-(3-isobutylphenyl)propanamide
39	4-2-5-2 تحضير (3) 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic anhydride
39	5-2-5-2 تحضير حامض الدايكلوفيناك
39	6-2-5-2 تحضير 2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetic anhydride

39	2-2-5-2 تحضير 2-(2,3-dimethylphenylamino)benzoic anhydride
40	8-2-5-2 تحضير الأميدات
43	9-2-5-2 تحضير المستخلصات
43	1-9-2-5-2 تحضير مستخلص الأنثوسيانين من الملفوف الأحمر
44	2-9-2-5-2 استخلاص زيت النعناع
44	6-2 تثبيط الأنزيم
45	1-6-2 تقييم التأثير المسكن للمركبات المحضرة والمستخلصات
46	2-6-2 تقييم التأثير المضاد للالتهاب للمركبات المحضرة والمستخلصات
46	1-2-6-2 نموذج الوذمة المستحثة بواسطة زلال البيض (الألبومين)
46	2-2-6-2 نموذج الوذمة المستحثة بواسطة الكاراجينان
47	7-2 إختبار قرحة المعدة
47	8-2 التحليل الإحصائي
47	9-2 طريقة التحليل النظري بإستخدام الإلتحام الجزيئي
الفصل الثالث- النتائج والمناقشة	
48	1-3 تحضير كلوريد الأيبوبروفين (1)
49	2-3 تحضير الأنهيدريدات(14,9,3)
51	3-3 تحضير الأميدات
77	4-3 إستخلاص الأنثوسيانينات من الملفوف الأحمر
79	5-3 تثبيط الأنزيم
79	1-5-3 إختبار الصفيحة الحارة
83	2-5-3 نموذج الوذمة المستحثة بواسطة زلال البيض
89	3-5-3 نموذج الوذمة المستحثة بواسطة الكاراجينان
91	6-3 إختبار قرحة المعدة
93	7-3 الإلتحام الجزيئي
101	الإستنتاجات والتوصيات
102	المصادر

## قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1-1	مثبطات COX-1 معزولة من النباتات	25
2-1	مثبطات انتقائية لـ COX-2 معزولة من النباتات	25
1-2	الأجهزة المستعملة	31
2-2	المواد الكيميائية	31
3-2	يوضح نوع ووزن الأنهيدريدات والأمينات المستخدمة في تحضير الأميدات	41
4-2	خصائص المركبات الوسطية والمركبات النهائية	42
5-2	التحليل الدقيق للعناصر C.H.N لبعض المركبات المحضرة	43
1-3	أهم ترددات الأشعة تحت الحمراء للمركبات 14,9,3	51
2-3	الصيغة البنائية والتسمية العلمية للمركبات المحضرة	52
3-3	وقت رد الفعل على المحفزات الحرارية (بالتانية) للفرن (إختبار الصفيحة الحارة)	80
4-3	نسبة الانخفاض في تركيز PGE <sub>2</sub> لبلازما الدم بواسطة المركبات المحضرة والمستخلصات	90

## قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1-1	مجالات تركيب الأنزيم	8
2-1	أيض حامض الأراكدونك الى PGH <sub>2</sub> بواسطة أنزيمات الأكسدة الحلقية	11
3-1	انتاج البروستاغلاندينات من PGH <sub>2</sub> بواسطة أنزيمات تخليق synthases متنوعة	12
4-1	ميكانيكية عمل أنزيمات الأكسدة الحلقية	13
5-1	الصيغة البنائية لبعض مضادات الالتهاب غير الستيرويدية	21
6-1	بعض مثبطات COX-2 الانتقائية	24
1-2	الحيوانات المختبرية	33
1-3	طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب (1)	49

50	ميكانكية تحضير الأنهيدريد	2-3
51	طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 3	3-3
55	طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 2	4-3
55	طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 4	5-3
56	طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 7	6-3
56	طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 10	7-3
58	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H NMR}$ للمركب 2	8-3
58	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب 2	9-3
60	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H NMR}$ للمركب 4	10-3
60	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب (4)	11-3
62	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H NMR}$ للمركب (5)	12-3
62	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب (5)	13-3
64	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H NMR}$ للمركب (6)	14-3
64	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب (6)	15-3
66	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H NMR}$ للمركب 7	16-3
66	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب 7	17-3
68	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H NMR}$ للمركب 10	18-3
69	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب 10	19-3
71	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H NMR}$ للمركب 11	20-3
71	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب 11	21-3
73	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H NMR}$ للمركب 12	22-3
73	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب 12	23-3
74	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب 13	24-3
75	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H NMR}$ للمركب 15	25-3
76	طيف الرنين النووي المغناطيسي $^{13}\text{C NMR}$ للمركب 16	26-3
77	الهيكل البنائي للأنتوسيانينات الرئيسية	27-3
84	النسبة المئوية للتثبيت للجرعة الأولى للمركبات المشتقة من النابروكسين	28-3
84	النسبة المئوية للتثبيت للجرعة الثانية للمركبات المشتقة من النابروكسين	29-3
85	النسبة المئوية للتثبيت للجرعة الثالثة للمركبات المشتقة من النابروكسين	30-3
85	النسبة المئوية للتثبيت للجرعة الأولى للمركبات المشتقة من الدايلوفيناك	31-3

86	النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثانية للمركبات المشتقة من الدايكولوفيناك	32-3
86	النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثالثة للمركبات المشتقة من الدايكولوفيناك	33-3
87	النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الأولى للمركبات المشتقة من الميفيناميك والمستخلصات	34-3
87	النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثانية للمركبات المشتقة من الميفيناميك والمستخلصات	35-3
88	النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثالثة للمركبات المشتقة من الميفيناميك والمستخلصات	36-3
93	صور بالمجهر الضوئي توضح النسيج الطلائي للمعدة	37-3
94	إلتحام المركب 2 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-1	38-3
95	إلتحام المركب 2 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2	39-3
95	إلتحام المركب 4 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-1	40-3
96	إلتحام المركب 4 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2	41-3
96	إلتحام المركب 5 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2	42-3
97	إلتحام المركب 6 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2	43-3
97	إلتحام المركب 7 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2	44-3
98	إلتحام المركب 10 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2	45-3
98	إلتحام المركب 15 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2	46-3
99	إلتحام المركب 16 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2	47-3
100	إلتحام الكارفون مع الموقع الفعال لأنزيم COX-1	48-3
100	إلتحام الكارفون مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2	49-3

قائمة الرموز والمختصرات

الرمز أو المختصر	المعنى
AA	Arachidonic acid
COX	Cyclooxygenase
CMC	Carboxymethyl cellulose
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCU	Dicyclohexyl urea
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGF	Epidermal growth factor like domain
ELISA	Enzyme linked immuno-sorbent assay
IL-1	Interleukin-1
IF $\gamma$	Interferon gamma
LPS	Lipopolysaccharide
MBD	Membrane binding domain
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
NASIDs	Nonsteroidal antiinflammatory drugs
PG	Prostaglandins
POX	Peroxidase
PMN	Polymorphonuclear
QSAR	Qualitative structure activity relationship
RMSD	Root Mean Square Deviation
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis alpha
THF	Tetrahydrofuran
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
VEGF	Vascular endothelial growth factor



## الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة تحضير عدد من أميدات الأدوية المضادة للالتهاب وتشخيصها بواسطة استخدام اطياف الامتصاص للأشعة تحت الحمراء وأطياف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H NMR}$  و  $^{13}\text{C NMR}$  والتحليل الدقيق للعناصر C.H.N وتحضير بعض المستخلصات النباتية. وتضمن الجزء الثاني من العمل اختبار فعالية المركبات المحضرة والمستخلصات كمثبطات لأنزيمات الأكسدة الحلقية ومدى انتقائيتها داخل جسم الكائن الحي وباستخدام البرامج النظرية إذ اشتمل العمل:

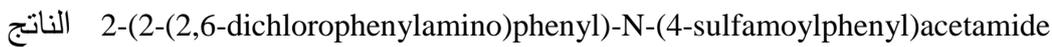
1. تحضير كلوريد الحامض من الأيبوبروفين الأنهيدريدات من النابروكسين ودايكولوفيناك الصوديوم والميفيناميك إلى الأنهيدريدات المقابلة وتحويلها إلى أميدات مختلفة عن طريق تفاعلها مع أمينات مختلفة (السلفونيل أميد، أورثونايتر أثلين 4,2 ثنائي كلوروأثلين، بارا برومو أثلين).

2. تحضير مستخلص الأنثوسيانين من اللهانة وكان المحتوى الكلي من الأنثوسيانين هو (46 ملغم/100غم) وإستخلاص الزيت من النعناع وكانت نسبة ناتج زيت النعناع 0.4%.

3. أظهرت النتائج إن المركبات المحضرة والمستخلصات فعالة كمسكنات باستخدام جرع مختلفة في الفئران وفي أوقات زمنية مختلفة عن طريق استخدام محفز حراري وقياس وقت الإستجابة ومقارنتها مع الأسيرين ودايكولوفيناك الصوديوم (الفولتارين) وهذا مؤشر لفعاليتها كمثبطات لأنزيمات الأكسدة الحلقية لأن الشعور بالألم ناتج عن فعالية أنزيمات الأكسدة الحلقية وكان أكثرها فعالية هي المركب



الناتج من دمج النابروكسين مع السلفونيل أميد والمركب



من دمج الدايكولوفيناك مع السلفونيل أميد.

4. تم قياس فعالية المركبات المحضرة والمستخلصات سريرياً كمثبطات لأنزيمات الأكسدة الحلقية باستخدام الفئران السويسرية من خلال قياس فعاليتها كمضادات التهاب باستخدام جرع مختلفة وفي أوقات زمنية مختلفة عن طريق استخدام نموذج الودمة المستحثة بواسطة

زلال البيض وقياس نسبة التثبيط لكل مركب ومستخلص ومقارنتها مع الأسبرين والفولتارين وتبين بأنها فعالة كمضادات إلتهاب وبعضها تفوق فعالية الفولتارين.

5. أظهرت النتائج بأن جميع المركبات المحضرة والمستخلصات تمتلك نشاط مسكن للألم بإستخدام جرعة مختلفة وفي أوقات زمنية مختلفة باستعمال إختبار الصفيحة الحارة وتحديد وقت الإستجابة ومقارنتها مع دايكلوفيناك الصوديوم والأسبرين، لكن كانت المركبات متباينة النشاط.

6. تم إثبات أن المركبات المحضرة والمستخلصات هي مثبطات لأنزيمات الأكسدة الحلقية عن طريق قياس مستوى البروستاغلاندين  $PGE_2$  في بلازما الدم بعد إستحداث التهاب في الجرذان وبعد حقن الجرذان بالمركبات المحضرة والمستخلصات ومضادات الالتهاب قبل إجراء التحويل ومقارنته مع المستوى الطبيعي، وبينت نتائج هذه التجربة إن بعض المركبات المحضرة تمتلك نشاط تثبيطي أعلى من الدواء الأصل وأعطت تصور جيد عن إنتقائية التثبيط لأنزيم COX-2 من خلال مقارنتها مع السليكوكسيب.

7. من النتائج الجيدة للمركبات المحضرة الجديدة أنها لا تمتلك تأثير مفرح للمعدة والذي أثبت من خلال إختبار تقرحات المعدة باستعمال جرعات عالية في الفئران السويسرية.

8. من خلال دراسات الإلتحام الجزيئي للمركبات المحضرة مع الموقع الفعال لأنزيم COX-1 و COX-2 تبين بأنها أكثر ألفة لأنزيم COX-2 وأن الكارفون الذي يشكل نسبة أكثر من 50% من زيت النعناع هو مثبط إنتقائي لـ COX-2.

# الفصل الأول

## المقدمة

أنزيمات الأكسدة الحلقية (COX) Cyclooxygenase هي أنزيمات داخل الخلايا تُحفز إضافة جزيئي أوكسجين إلى الأحماض الدهنية غير المشبعة، وأهمها حامض الأراكدونك (AA) Arachidonic acid ليتحول إلى prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) وبعدها يختزل (PGG<sub>2</sub>) إلى prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)، الذي يتحول بواسطة أنزيمات مُتخصصة إلى أنواع مختلفة من البروستاكلاندينات، وهي عبارة عن دهون نشطة بيولوجياً وهي بمثابة هورمونات موضعية autocrine أو paracrine، وتتضمن PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, وTXA<sub>2</sub><sup>(1)</sup>. وإنَّ السبب الرئيس للالتهاب هو الإفراط في إنتاج البروستاكلاندينات التي يتم تصنيعها بواسطة أنزيمات الأكسدة الحلقية<sup>(2)</sup>.

توجد ثلاثة أشكال من هذا الأنزيم هي COX-1, COX-2, COX-3. الشكل التأسيسي للأنزيم هو COX-1 ويوجد في أغلب الأنسجة وأهم أدواره هي الحفاظ على بطانة المعدة وتنظيم عملية تراكم الصفائح الدموية وتنظيم تدفق الدم الكلوي، بينما COX-2 هو الشكل المُحرّض من الأنزيم يُحفز بواسطة عدد من مُحفّزات الالتهاب مثل السيتوكينات الالتهابية Cytokines Proinflammatory ومُحفّزات الورم في عدد من الحالات المرضية مثل الالتهابات والسرطان لكنه أيضاً يُشارك في عدد من العمليات الفسلجية، أما الـCOX-3 فقد أُكتُشف مؤخراً وهو نظير أنزيمي isoenzyme لـCOX-1 وجد بتراكيز أعلى في الدماغ والقلب وقد يُفسر آلية عمل المسكنات الخافضة للحرارة<sup>(3,4)</sup>.

وإن أنزيمات الأكسدة الحلقية هي الهدف الرئيس لمضادات الالتهاب غير الستيرويدية (NSAIDs) مثل الأسبرين والنابروكسين والأيبوبروفين حيث تعمل كمثبطات لكل من COX-1 و COX-2 لذلك إستخدامها لفترات طويلة يسبب تلف الغشاء المخاطي للجهاز الهضمي<sup>(5)</sup>. وقد بينت دراسة البلورات بالأشعة السينية بأن COX-1, COX-2 يتشابهان في التركيب البنائي لكن توجد اختلافات بسيطة بينهما منها إستبدال جزيئة الحامض الأميني الفالين Valine صغيرة الحجم في المواقع 523 و434 في COX-2 بحامض أكبر، وهو الأيزوليوسين Isoleucine في ما يقابلها من المواقع في COX-1 مما يؤدي الى فتح الجيب الجانبي وزيادة حجم الموقع الفعال لـCOX-2<sup>(6)</sup>. وقد استغل الباحثون هذا الاختلاف في الحجم للموقع الفعال لتصميم مثبطات انتقائية لـCOX-2 للتخلص من الآثار الجانبية المرتبطة بإستخدام مضادات الالتهاب التقليدية، ومن هذه المثبطات هو السليكوكسيب، الروفيكوكسيب والباركوكسيب لكن عدداً منها يسبب أضرار

جانبيه خطيرة للقلب مما أدى إلى سحب عدد منها من الأسواق<sup>(7)</sup>. ومنذ القدم استخدم الإنسان النباتات في علاج الالتهابات وأظهرت فاعلية عالية وأبرزها نبات الصفصاف مصدر الأسبرين وهي أكثر أماناً لذلك اتجه الباحثون للحصول على مثبطات لأنزيمات الأكسدة الحلقية من النباتات<sup>(8)</sup>. أُستخدم النعناع في الطب الشعبي لعلاج عدد من حالات الالتهاب<sup>(9)</sup>. كما ذكرت بعض المصادر فعالية الأنثوسيانينات في الحد من الإصابة بالسرطان وأمراض القلب<sup>(10,11,12)</sup>. والملفوف الأحمر (اللهاثة) هو مصدر غني بالأنثوسيانينات Anthocyanin<sup>(13)</sup>. ونظراً للتطور في أداء أجهزة الكمبيوتر والبرامج ولتوفير الوقت وتقليل التكاليف فقد أستخدمت عدد من التقنيات الحديثة في تصميم المثبطات منها العلاقة الكمية بين الهيكل والنشاط QSAR والالتحام الجزيئي molecular docking<sup>(14,15)</sup>.

وتتص فرضية البحث إنه فيما لو تم التلاعب في مجموعة الكربوكسيل لمضادات الالتهاب التقليدية وتحضير جزيئات أكبر فأنها سوف تتحول إلى مثبطات انتقائية لـ COX-2 . وأن كلاً من مستخلص الملفوف الأحمر الحاوي على الأنثوسيانين وزيت النعناع قد تعمل على تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية.

## 1-1 تاريخ الأنزيم

استطاع الإنسان منذ مئات السنين علاج الالتهاب والحمى والصداع باستعمال نبات الصفصاف الحاوي على مادة الصفصافين Salicylic acid<sup>(8)</sup>. وبعدها تم تحضير حامض السلسليك من قبل Coble في عام 1874. وفي عام 1876 بين العالم Maclagen ان حامض السلسليك فعال في علاج الحمى الروماتيزمية<sup>(16)</sup>. بعد ذلك استطاع الكيميائي Felix Hoffman تحضير مادة Acetyl salicylic acid بإضافة مجموعة Acetyl الى حامض السلسليك. والتي أعلن عن فعاليتها كمسكن وخافض للحرارة ومضاد للالتهاب من قبل رئيس شركة للأدوية وهو Heinrich Dreser. بينما قدمت شركة باير مادة Acetyl salicylic acid كدواء يدعى الأسبرين في عام 1899<sup>(17)</sup>.

لاحظ ( Von Euler ) وآخرون منذ 1935 بأن البلازما المنوية للإنسان تتضمن عوامل قوية خافضة للتوتر الوعائي وتقلص العضلات الملساء<sup>(18)</sup>. هذه النتائج غير المتوقعة تمثل بداية السعي المميز في علم الأحياء عن تلك المواد الغامضة التي عرفت لاحقاً باسم البروستاغلاندينات

"Prostaglandins" ذلك السعي الذي لا يزال يُعمل به اليوم بنشاط من قبل الباحثين فضلا عن صناعة المستحضرات الصيدلانية وإذا نظرنا للخلف تبرز عدة معالم واضحة بالتأكيد هناك توضيح للتركيب الأصلي للبروستاغلاندين من قبل (Bergstrom) و (Sjövall) في عام 1957 وتميز وتسمية بروستاغلاندينات E و F في مستخلصات من الغدد الحويصلية للأغنام في عام 1960<sup>(20,19)</sup>.

إن الإعراف بأن البروستاغلاندينات كانت مشتقة من الأحماض الدهنية الأساسية كان اكتشاف انطلاقة أخرى. والاكتشاف العلمي بأن أنزيم ضمن الخلايا يحول المادة الأساس مثل حامض الأراكدونك (AA) Arachidonic acid الى بروستاغلاندين ظهر في الوقت نفسه في عام 1964 بواسطة فريق من شركة "Unilever" في هولندا ومعهد كارولينسكا pergstrom's "Carolinska" في ستوكهولم<sup>(22,21)</sup>. وضعت هذه التجارب المنوية الأساس لدراسة ما أصبح يعرف في ذلك الوقت "prostaglandin synthetase" التي غيرت فيما بعد إلى "synthase" prostaglandin لأن تفاعل أنزيم السايكلوأوكسيجينيز لا يحتاج الى ATP المعروف أيضا "prostaglandin H synthase" أو "prostaglandin endoperoxide synthase". وفي عام 1971 أستعمل "John Van" مجانس خلوي cell-free homogenate من رئة خنزير غينيا لإثبات أن الأسبرين والأندوميثاسين والسالييسالات (من صنف مضادات الالتهاب غير الستيرويدية) مثبطات لهذا الأنزيم وبالتالي تحديد آلية عمل هذا الصنف المهم من الأدوية، وفي عام 1972 افترض "Flower and Vane" أن فعالية الأسيتامينوفين تعود الى تثبيط أنزيم السايكلوأوكسيجينيز الذي كان موجود في دماغ الكلب وغير موجود في طحال الأرنب وفي السنة نفسها "Smith" و "Lands" ذكرا وجود اثنين من النشاطات التحفيزية المختلفة لأنزيم "prostaglandin synthase" في الغدد الحويصلية للأغنام<sup>(23)</sup>. وفي عام 1973 أكدت مختبرات "Karolenska" و "Unilever" إن تفاعل تحويل الأحماض الدهنية الأساسية إلى بروستاغلاندينات يتم عن طريق تشكيل مركبات وسطية غير مستقرة هي endoperoxides، وفي وقت لاحق سُميت "prostaglandin G2"<sup>(25,24)</sup>. وبين "Smuelsson" و زملاؤه بان أنزيم السايكلوأوكسيجينيز الذي يحفز تفاعل إضافة الأوكسجين (cyclooxygenation) كذلك يختزل الهيدروبيروكسي في (PGE2) ليُشكل prostaglandin H2(PGH2) عبر موقع البيروكسيديز الموجود على الأنزيم حيث إن أنزيمات الأوكسدة والاختزال تنتج ايزومرات متنوعة و فعالة بيولوجياً باستعمال PGH2 كمادة أساس، وفي عام 1976 تم تنقية أنزيم السايكلوأوكسيجينيز

من الحويصلات المنوية للأغنام والأبقار كونها مصدر غني بالأنزيم وذلك من خلال الترحيل الكهربائي باستخدام SDS- polyacrylamide gel حيث يتضمن نشاطات الأكسدة الحلقية والبيروكسيداز<sup>(26)</sup>. وفي ضوء هذه الخلفية أصبح الاهتمام بالبروستاغلاندينات على نطاق واسع حيث يتواجد تقريباً في أجزاء الجسم جميعها واكتشاف بعض الخصائص البيولوجية الأكثر أثارة للانتباه حيث تم اكتشاف (thromboxane A2)<sup>(27)</sup> ولاحقاً البروستاسايكلين<sup>(28)</sup>. ان مسار تخليق PGE<sub>2</sub> و PGF<sub>2</sub> قادت "Lysz" وزملاؤه ( 1988-1982 ) الى ان في الأرناب والفأر يوجد شكلين من أنزيم السايكلوأكسجيناز COX، وفي عام 1988 تم استنساخ أنزيم COX. بينما تم اكتشاف النوع الثاني من أنزيم COX في عام 1991 وهو النوع المُحرض ولأن يدعى COX-2<sup>(26)</sup>. وذكر أول تركيب بلوري لمعدن COX-1 للأغنام ومضاد الالتهاب غير الستيرويدي (Flurbiprofen) في عام 1994<sup>(29)</sup>. وفي عام 2002 عزل "Chandrasekharan" وزملاؤه وصلة مختلفة من COX-1 سُمي COX-3 أو COX-1b<sup>(4)</sup>.

## 2-1 الأشكال المتناظرة لأنزيمات الأكسدة الحلقية

### *Isoforms of cyclooxygenase*

يوجد ثلاثة أشكال (متناظرات) من هذا الأنزيم تشمل:

#### **1-2-1 أنزيم الأكسدة الحلقية-1 Cyclooxygenase-1(COX-1)**

هو أول شكل مُنقى من أنزيمات COX (EC 1.14.99.1) والذي يكون عبارة عن بروتين ذو وزن جزيئي 67 كيلو دالتون تقريباً<sup>(30)</sup>. إن المورثة الخاصة بـ COX-1 موجودة على الكروموسوم 9 وتحوي (11) Exon بطول 22 kB ويبلغ طول mRNA له 2.8 kB<sup>(31,1)</sup>. ويوجد في الشبكة البلازمية الداخلية. يُعبر عنه بشكل أساسي في كثير من الخلايا والأنسجة مثل بطانة الأوعية الدموية، بطانة المعدة، الوحيدات، أنابيب الجمع الكلوي، والحويصلات المنوية<sup>(32)</sup>. وأبرز أدواره هي حماية بطانة المعدة إذ يؤدي الى إنتاج البروستاسايكلين الذي عندما يصدر من بطانة الأوعية الدموية يكون مضاد للتخثر وعندما يصدر من الغشاء المخاطي في المعدة يقوم بالحماية الخلوية، ويؤدي الى إنتاج الثروموبوكسان مما يُسبب تكس الصفائح الدموية لمنع النزيف غير المناسب<sup>(4)</sup>.

## **2-2-1 أنزيم الأكسدة الحلقية-2 Cyclooxygenase-2 (COX-2)**

هو ثاني شكل تم تنقيته من أنزيمات الـ COX . ذو وزن جزيئي 71 كيلو دالتون تقريباً<sup>(30)</sup>. وتوجد المورثة الخاصة به على الكروموسوم 1 وتحتوي عشر إكسونات بطول 8.3kB أما mRNA له فيبلغ طوله 4.5kB<sup>(31,1)</sup>. ويوجد هذا الأنزيم في الغلاف النووي والشبكة البلازمية الداخلية. يُستحث بواسطة عدد من وسطاء الالتهاب وعوامل النمو ومحفزات الورم مثل عديد السكريد الشحمي (LPS) lipopolysaccharide و Interleukin-1 (IL-1) وعامل نخر الورم ألفا (TNF- $\alpha$ ) Tumor necrosis factor- $\alpha$  في مجموعة متنوعة من الخلايا والأنسجة مثل بطانة الأوعية الدموية والخلايا الأكلة Osteoclasts وخلايا بطانة الزلال الروماتزمي والوحيدات Monocytes والبالعات الكبيرة Macrophages إذ يُشكل البروستاغلاندينات المسؤولة عن الالتهاب، وأشارت الدراسات التي أُجريت مؤخراً ان COX-2 له وظائف محددة في الإستسناخ ووظائف الكلى وارتشاف العظم والنقل العصبي<sup>(36-33)</sup>. كما أن الأنزيم COX-2 يقبل مدىً واسعاً من الأحماض الدهنية كمادة أساس أكثر كفاءة من COX-1 وتشمل الأحماض الدهنية غير المشبعة  $\alpha$ -linolenic acid,  $\gamma$ - linolenic acid, Eicosapentaenoic acid<sup>(31)</sup>

## **3-2-1 أنزيم الأكسدة الحلقية-3 Cyclooxygenase-3 (cox-3)**

هو نوع مختلف مشتق من جين COX-1 ويحتفظ بأنثرون غير موجود في COX-1. ويوجد بوفرة في قشرة الدماغ يتم تثبيطه بدرجة كبيرة بواسطة الأدوية المسكنة الخافضة للحرارة Antipyretic analgesics مثل الباراسيتامول. إن قدرة هذه الأدوية على اختراق حاجز الدم في الدماغ والوصول الى النظام العصبي المركزي central nervous system (CNS) قد يفسر عملها كمثبطات لـ COX-3<sup>(37)</sup>

### **3-1 الوظائف الحيوية لأنزيمات الأكسدة الحلقية**

تبرز الوظائف الحيوية لأنزيمات الأكسدة الحلقية في :

#### **1-3-1 الجهاز الهضمي gastrointestinal tract (GI)**

يخضع النسيج الظهاري في الأمعاء للتجديد المستمر وإعادة البناء في الظروف الاعتيادية وعند تعرضه للتلف، إذ يكون عرضة لكثير من الكائنات الطفيلية<sup>(38)</sup>. ويتم ذلك من خلال تخليق

البروستاغلاندينات في جميع أجزاء الجهاز الهضمي عن طريق COX-1 بشكل أساسي على الرغم من أنه يتم التعبير بكميات صغيرة عن COX-2 بشكل أساسي<sup>(31)</sup>. إن البروستاغلاندينات التي تحمي الجهاز الهضمي هي البروستاسايكلين PGI<sub>2</sub> بشكل أساسي، وكذلك PGE<sub>2</sub>. وتقوم بالحماية عن طريق التقليل من إفراز حامض المعدة من قبل الخلايا الجدارية في المعدة وزيادة تدفق الدم في الغشاء المخاطي ويحفز إفراز المخاط اللزج الذي يقوم بدور دفاعي ضد الإصابة المخاطية بواسطة حامض المعدة<sup>(39)</sup>. بالإضافة إلى توفير حاجز بدني قد يصنع المخاط طبقة من البيكربونات المفرزة على الغشاء الطلائي وبالتالي تساعد على معادلة أيونات الهيدروجين ونشرها مرة أخرى في تجويف الغشاء المخاطي<sup>(40)</sup>.

## *Kidneys*

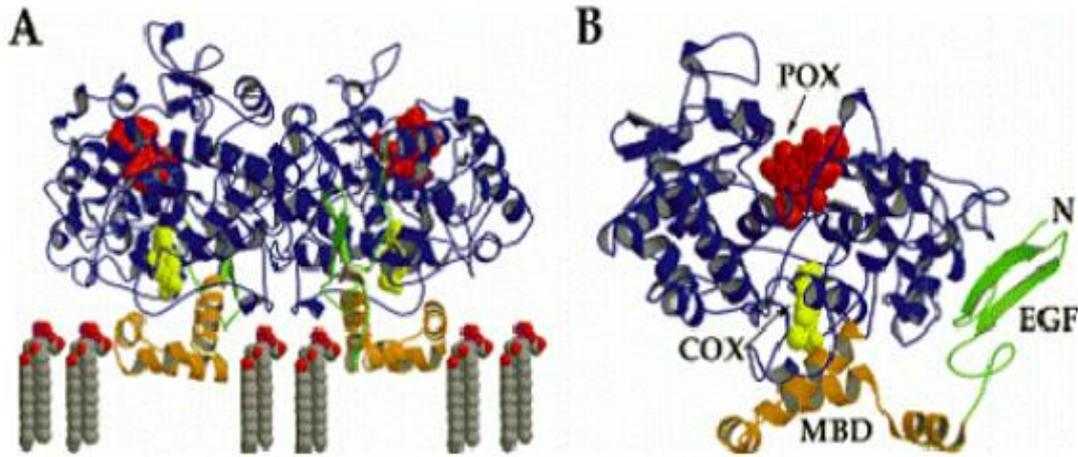
## *1-3-2 الكلى*

البروستاغلاندينات وسائط مهمة في تنظيم تقلص وانبساط الأوعية الدموية والتدفق الطبيعي للدم وتوازن الماء والملح في كلى الثدييات. حيث بينت الدراسات بأن PGE<sub>2</sub> هو المسؤول الأول عن الحفاظ على وظائف الكلى الطبيعية باستعمال نماذج حيوانية والمرضى المصابين بقصور القلب الإحتقاني، تشمع الكبد أو القصور الكلوي<sup>(7)</sup>. حيث تشمل وظائفها تعديل في حركية الدم الكبيبية، وإعادة الامتصاص الأنبوبي للملح والماء وتنظيم إفراز أنزيم الرينين<sup>(41)</sup>. تنتج قشرة الكلى الطبيعية بشكل رئيس PGE<sub>2</sub> و PGI<sub>2</sub> مع كميات قليلة من الثرومبوكسان TXA<sub>2</sub> بينما اللب الكلوي غالباً ينتج PGE<sub>2</sub> بكمية تفوق إنتاج القشرة بـ 20 مرة تقريباً، البروستاغلاندينات تثبط إعادة امتصاص الصوديوم الأنبوبي وتقلل نقل الكلوريد في الطرف الصاعد من عروة هنلي<sup>(26)</sup>. ويشترك COX-2 في وظائف الكلى الطبيعية ويوجد في كلاً من البقعة الكثيفة لكلي الفئران<sup>(41)</sup> والخلايا الخلوية للحليمات الكلوية<sup>(42)</sup> حيث يلعب دوراً في البقعة الكثيفة في التوسط للتداخل بين الترشيح الكبيبي وإعادة امتصاص وتنظيم إفراز الرينين<sup>(43)</sup> والتحكم في تدفق الدم والتي تكون بدورها مسؤولة عن توازن الملح وحجم السائل في الجسم. حيث وجد إن الحرمان المزمن من الملح يؤدي إلى زيادة مستويات COX-2 في البقعة الكثيفة للكلية<sup>(44)</sup>.

## *1-4 التركيب البنائي لأنزيمات الأكسدة الحلقية*

تشابه بروتينات COX-1 و COX-2 في تسلسل الأحماض الأمينية إذ تشترك في (60-65)% من تسلسل الأحماض الأمينية لكن توجد عدد من الاختلافات الهيكلية التي تُعد مهمة عند

البحث في المجموعة الدوائية من مضادات الالتهاب، إذ يتألف COX-1 من 602 حامض أميني بينما COX-2 يتألف من 604 حامض أميني، يتم ترقيم مخلفات الأحماض الأمينية وفقاً للتسلسل في الأغنام والفئران لتوحيد المقارنات الهيكلية والوظيفية<sup>(45)</sup>. يوجد اختلاف مهم بين COX-1 و COX-2 وهو غياب تسلسل 17 حامض أميني عند النهاية الأمينية للبيتيد وإدخال تسلسل 18 حامض أميني عند النهاية الكربوكسيلية حيث إن إدخال 18 حامض أميني يكون بعد أربعة أحماض أمينية من النهاية الكربوكسيلية، مما يؤدي إلى اختلاف الترقيم للمخلفات المتشابهة في الأنزيمات (مثلاً Ser 530 في COX-1 يكون ترقيمه 516 في COX-2)<sup>(46)</sup>. لكن الأرقام التي تستخدم هنا تشير إلى التسلسل في COX-1 حيث يجب أن يطرح الرقم 14 من التسلسل لـ COX-1 لتدل على الترقيم الصحيح في COX-2. تعد أنزيمات COX دايمرات متجانسة إذ ترتبط المونومرات معاً عن طريق التداخلات المحبة للماء، التآصر الهيدروجيني والجسور الملحية بين مجالات العامل الشبيه بعامل نمو البشرة لكل مونومير<sup>(47,48)</sup>. يحتوي COX-1 على ثلاث وحدات من قليل السكريد، و يحتوي COX-2 على أربع وحدات تُسهل إنطواء البروتين، كل مونومير يتألف من ثلاث مجالات تركيبية هي المجال الشبيه بعامل نمو البشرة (EGF)، مجال ربط الغشاء (MBD) والمجال التحفيزي كما موضح في الشكل (1-1)<sup>(7)</sup>.



شكل (1-1) مجالات تركيب الأنزيم A تمثل دايمر متجانس لـ COX-1 مرتبط مع الفلورايبيروفين في الموقع الفعال و B تمثل مونومر COX-1 مرتبط مع الفلورايبيروفين.

## 1-4-1 المجال الشبيه بعامل نمو البشرة

### *Epidermal growth factor like domain (EGF)*

يخلق كل من مجال عامل نمو البشرة والمجال التحفيزي الواجهة للوحدة الفرعية في الدايمر حيث يشكل مجال EGF جزء كبير من واجهة الدايمر مجالات EGF شائعة في كثير من أصناف الأغشية والبروتينات التي تفرزها. يقع مجال EGF عند التسلسل الأولي للنهاية التي ترتبط بالغشاء بحيث تقع هذه المجالات على الوجه الخارجي للسايتوبلازم من الغشاء. ويلعب EGF دوراً في إدخال COX الى الطبقة الثنائية الدهنية<sup>(6)</sup>. وتوجد ثلاث أوامر ثنائية الكبريت تربط هذا المجال سوية في بنية تشبه عامل نمو البشرة والأصرة ثنائية الكبريت الرابعة تربط هذا المجال مع المجال التحفيزي الكروي<sup>(47)</sup>.

### 1-4-2 مجال ربط الغشاء *Membrane binding domain(MBD)*

يتكون هذا المجال من تسلسل (73-116). حيث يقترن أنزيم COX مع وجه واحد للغشاء الثنائي لذلك يُعد مجال ربط الغشاء monotopic ويتألف من أربعة حلزونات  $\alpha$  قصيرة لها التسلسل (A-D) تكون قصيرة ومتعاقبة ومحبة وكارهة للماء (Amphipathic). إذ تقع ثلاثة من الحلزونات الأربعة في المستوى نفسه، بينما الحلزون الأخير يميل صاعداً الى المجال التحفيزي<sup>(49)</sup>. تبرز المخلفات الهيدروفوبية والأروماتية من الحلزونات لتخلق سطح محب للماء الذي يتداخل مع وجه آخر من الغشاء الدهني ثنائي الطبقة. ويشكل مجال MBD المدخل والنصف الأول من القناة المحبة للماء<sup>(33)</sup>.

### 1-4-3 المجال التحفيزي *Catalytic domain*

يكون الجزء الأكبر من تركيب الأنزيم تقريباً 80% من البروتين. ويكون كروي مع اثنين من الفصوص المتميزة المتشابكة، وواجهة هذه الفصوص تكون على السطح العلوي للأنزيم أي السطح الأبعد عن الغشاء. ويحتوي هذا الموقع على المواقع الفعالة للأكسدة الحلقية و البيروكسيداز<sup>(47)</sup>.

### 1-3-4-1 الموقع الفعال لأنزيم الأكسدة الحلقية

### *Cyclooxygenase active site*

تحتوي كل من مونوميرات COX-1 و COX-2 على قناة هيدروفوبية (A 25) تكون طويلة وضيقة ومسدودة حيث يكون المدخل محاط بإطار من أربعة حلزونات محبة وكارهة للماء من مجال ربط الغشاء، إذ تنشأ عند مجال ربط الغشاء وتمتد إلى مركز للمجال التحفيزي الكروي. يشكل MBD المدخل والنصف الأول من القناة وتسمح لحامض الأراكدونك والأوكسجين الجزيئي للدخول مباشرة من المدخل القطبي (a polar compartment) من الغشاء الدهني ثنائي الطبقة<sup>(50)</sup>. توجد عدد من الأحماض الأمينية التي تُشكل صف في الموقع الفعال للأوكسدة الحلقية ذو الطبيعة الهيدروفوبية مع عدد من الاختلافات بين COX-1 و COX-2 حيث يُستبدل حامض الأيزوليوسين Ile في المواقع 523 و 434 لـ COX-1 بحامض الفالين Val لنفس المواقع لـ COX-2 ويُستبدل حامض الهستيدين His 513 في COX-1 بحامض الأرجنين Arg513 في COX-2. الأحماض الأمينية التي تُبطن الموقع الفعال لأنزيمات الأوكسدة الحلقية تتضمن Val (344) Phe209 , Phe205, Arg120 , Leu117 , Ser353 , Leu352 , Val349 , Tyr348 , Ile345 , Tyr385 , Leu384 , Phe381 , Leu359 , Tyr355 , Ala527 , Gly526 , Glu524 , Ile\Val523 , Phe518 , Ile\Val434 , Trp387 , His\Arg513 , (Leu534 , Gly533 , Leu531 , Ser530).

توجد عدد من الأحماض الأمينية في القناة تكون ذات أهمية فريدة لعمل أنزيمات الأوكسدة الحلقية تشمل Tyr385 عندما يكون في شكل الجذر الحر هو المسؤول عن تجريد الهيدروجين من الكاربون 13 لـ AA ويخلق جذر الأراكيدونيل Arachidonyl<sup>(51,6)</sup>. و Ser530 هو موقع الأسيلة بواسطة الأسبرين و Arg120 الذي يقع في حوالي منتصف المسافة بين المدخل والقمة للموقع الفعال يرتبط إلى مجموعة الكاربوكسيلات في الأحماض الدهنية وكثير من مضادات الالتهاب غير الستيرويدية. حيث تكون Ser530 و Val349 مهمة في توجيه الكيمياء الفراغية لهجوم الأوكسجين على الكاربون 15 لإنتاج PGG2<sup>(52)</sup>. المتخلفات Arg120, Glu524 هي أحماض أيونية تبرز من القناة وتشكل شبكة مفيدة بالهيدروجين. وكذلك Tyr355 يلعب دوراً في إرتباط المادة الأساس ومضادات الالتهاب غير الستيرويدية<sup>(53)</sup>.

### **1-4-3-2 الموقع الفعال للبيروكسيداز (POX) Peroxidase active site**

هو إخدود كبير يقع في الجانب المعاكس لمجال ربط الغشاء ويتضمن هذا الموقع مجموعة الهيم heme والحديد الثلاثي في مركز الهيم. الحديد الثلاثي في مركز الهيم متناسق بواسطة His388 و His207 عن طريق أصرة (حديد-هستيدين) حيث يتمركز في الجزء السفلي من الشق السطحي.

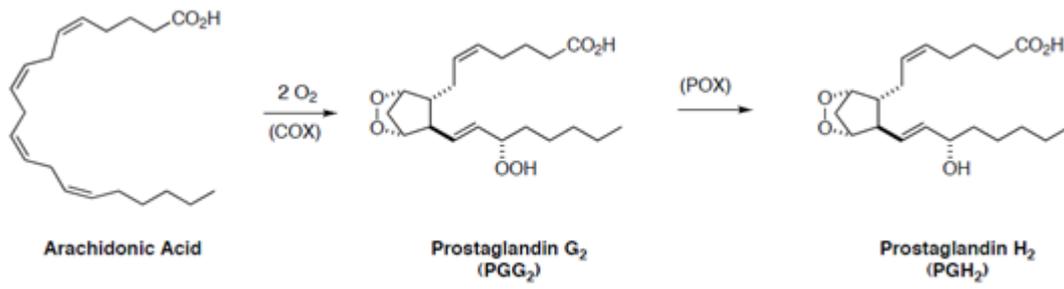
هذا التركيب يوفر إمكانية وصول مذيبات مهمة الى الهيم مع استثناء عنقود من عدد من الأحماض الأمينية الهيدروفوبية التي تشكل قبة على جزء من الشق. إنَّ تركيب الموقع الفعال يساعد في تفسير تخصص المادة الأساس لنشاط البيروكسيديز في أنزيمات الأكسدة الحلقية الذي يستبعد مدىً واسعاً من الهيدروكسيدات العضوية الأولية والثانوية أي أن الأنزيم يفضل البيروكسيدات العضوية على  $H_2O_2$  (54).

وتتشكل القناة على شكل حرف L مقلوب الذي ينشأ في مجال ربط الغشاء عند Gly 533 والذي يقع بالقرب من واجهة الدايمر ويكون اتصال هيدروفوبي مع النهاية أوميگا لحمض الأراكدونك حيث يكون نشاط البيروكسيديز هو المسؤول عن تشكيل الجذر الحر لـ (Tyr 385) المطلوب لنشاط الأكسدة الحلقية إذ إن التشكل الفريد لمواقع لأحماض الدهنية يجعل الهيدروجين في الكاربون 13 Pro-S Hydrogen عند التايروسين التحفيزي (56,55). حامض الكلوتامين (Glu 203) كذلك مهم في عملية التحفيز حيث أن التغيرات في (Glu203, His207) تؤدي الى تقليل أو حذف نشاط البيروكسيديز. ويرتبط أنزيم COX بواحد مول من ferric-protoporphyrin لكل مول من المونومير للفعالية القصوى (57).

## Function

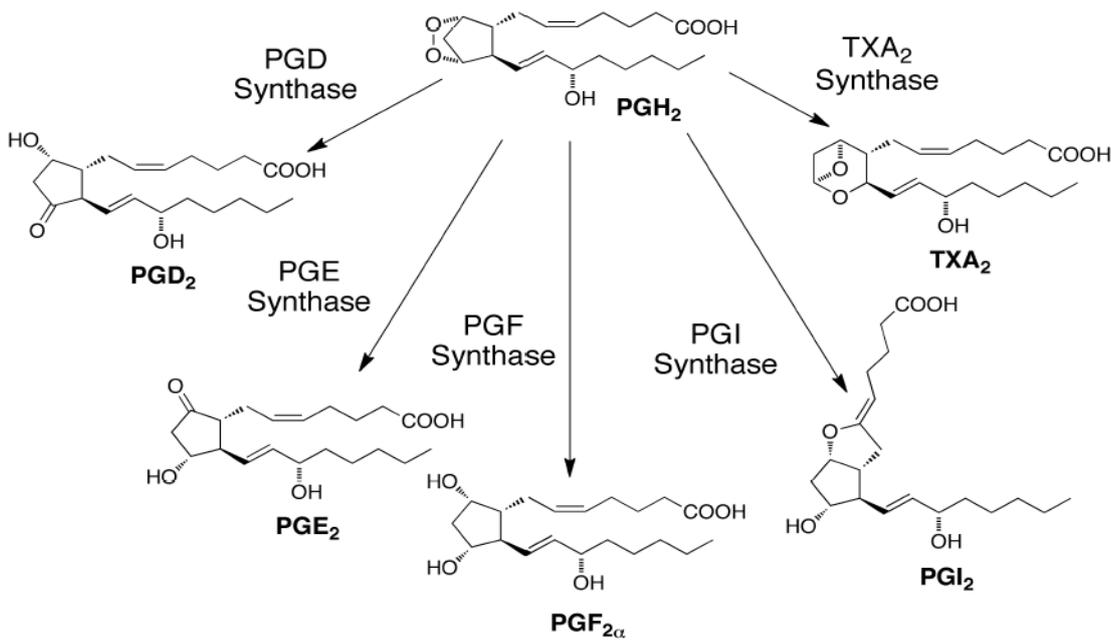
## 5-1 الوظيفة

أنزيمات الأكسدة الحلقية تحفز bis dioxygenation ويليهما اختزال الأحماض الدهنية الداخلية كمادة أساس والأكثر أهمية بيولوجياً من هذه الأحماض الدهنية الأساسية هو حامض الأراكدونك (AA) Arachidonic المتكون من 20 ذرة كاربون، ويحوي على أربع أواصر مزدوجة من نوع Cis الذي يتحول الى Prostaglandin  $G_2$ ، ثم الى Prostaglandin  $H_2$ . أنزيمات الأكسدة الحلقية تُنجز هذا التحول من خلال الموضعين الفعالين هما COX و POX. في البداية تجري عملية إضافة أوكسجين محددة فراغياً Stereo specific cyclation على AA عند موقع السايكلوأوكسيجينيز ليشكل مجموعة Endoperoxide غير المستقرة نسبياً ومجموعة البيروكسي لـ Prostaglandin  $G_2$  كما في الشكل (2-1) (59,58).



شكل (1-2) أيض حامض الأراكدونك الى  $\text{PGH}_2$  بواسطة أنزيمات الأكسدة الحلقية

بعد ذلك  $PGG_2$  ينتقل الى موقع البيروكسيديز الذي يحوي على الهيم كعامل مساعد مما يؤدي الى اختزال مجموعة الكحول في  $PGG_2$  مكوناً  $PGH_2$  (60). بعد ذلك تتحول  $PGH_2$  الى البروستاغلاندينات. وكان يُعتقد بأنها تنشأ أصلاً من غدة البروستات Prostate gland لذلك سُميت بهذا الاسم من قبل العالم "Von Euler" على الرغم من إنها تتشكل طبيعياً في الحويصلة المنوية (61). وضح العالم "Bergstrom" وزملاؤه هياكل البروستاغلاندينات حيث انها تشترك في الهيكل الكربوني (مكون من 20 ذرة كاربون) ويتضمن أنماطاً متماثلة من عدم التشبع. إن البروستاغلاندينات هي الناتج النهائي لعملية التمثيل الغذائي لحمض AA. يتم تنظيم إنتاج البروستاغلاندينات من خلال أنزيمات تصنيع البروستاغلاندين والتي تكون متخصصة لكل نسيج tissue specific synthase ولكل نوع من البروستاغلاندينات وتشمل البروستاغلاندينات Prostaglandin  $D_2$  ( $PGD_2$ ) prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), Prostaglandin  $I_2$  ( $PGI_2$ ) Prostacyclin, Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ), Thromboxane  $A_2$  ( $TXA_2$ ) حيث انها تمثل نواتج أيضاً  $PGH_2$  كما في الشكل (3-1) (63,62).



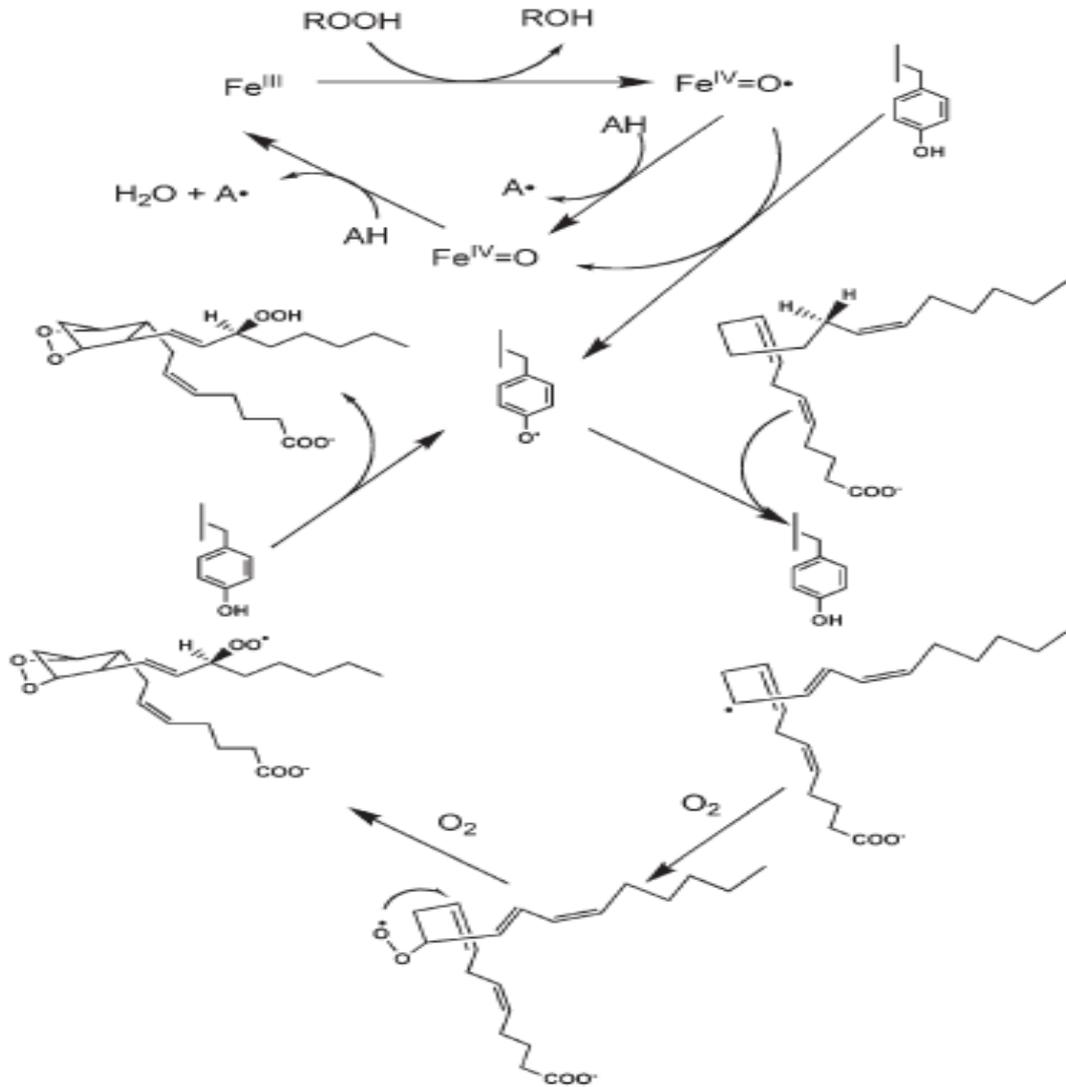
شكل (3-1) انتاج البروستاغلاندينات من  $PGH_2$  بواسطة أنزيمات تخليق (synthases) متنوعة

### 6-1 ميكانيكية عمل أنزيمات الأكسدة الحلقية

#### ***Mechanism of the cyclooxygenase reaction***

بعد أن يتحرر حامض الأراكدونك من غشاء الخلية بواسطة أنزيم phospholipase  $A_2$  الذي يتم تنشيطه بواسطة عدد من المحفزات. يتحول AA الى  $PGG_2$  وهذا يتطلب أولاً تنشيط

أنزيمات الأكسدة الحلقية. وتعتمد عملية التنشيط على نشاط البيروكسيداز Peroxidase، حيث إن عملية اختزال إلكترونين من مادة البيروكسيد تنتج عن طريق أكسدة هيم الحديدك Fe(III) إلى جذر ferryl-oxo(Fe(IV) protoporphyrin. ويُنشط الحامض الأميني Tyr 385 الذي يقع داخل الموقع الفعال COX عن طريق انتقال إلكترون واحد من Tyr 385 إلى جذر ferryl-oxo(Fe(IV) protoporphyrin لينتج جذر التايروسيل. إن الخطوة الأولى لتحويل AA إلى PGG<sub>2</sub> كما في الشكل (4-1)



شكل (4-1) ميكانيكية عمل أنزيمات الأكسدة الحلقية

هي تجريد الهيدروجين pro-s hydrogen من الكربون رقم 13 لـ AA عن طريق جذر التايروسيل مولداً جذر الأراكدونيل arachidonyl radical. أما الخطوات التي تتبع؛ فتتوافق مع آلية التفاعلات غير الأنزيمية لإنتاج بيروكسيدات الدهون لذلك الدور الرئيس لـ COX هو تقييد

الخيارات المتاحة لتجريد الهيدروجين وفرض الكيمياء الفراغية للتفاعل، بعد ذلك يتفاعل جذر الكاربون عند الموقع 11 لحمض الأراكدونك مع جزيئة الأوكسجين وتتكون أصرة مزدوجة عند الموقع 12 لينتج جذر البيروكسيل مولداً بيروكسيد حلقي. بعدها يعاني الجذر المتمركز عند الكاربون رقم 8 لـ AA يُضاف الى الأصرة المزدوجة عند الكاربون رقم 12 مولداً بيروكسيد ثنائي الحلقة والجذر الأليلي. ويتفاعل جذر الكاربون عند الموقع 15 مع جزيئة أوكسجين مولداً جذر البيروكسي الذي يُختزل الى PGG<sub>2</sub> بواسطة Tyr 385 مولداً جذر التايروسيل للجولة القادمة من التحفيز بواسطة COX لذلك يمكن إجراء تنشيط COX لجلولات متعددة بدون تكرار خطوة التنشيط. بعد ذلك ينتقل PGG<sub>2</sub> الى موقع البيروكسيديز حيث يتم اختزال مجموعة الهيدروبيروكسي عند الكاربون 15 لـ AA الى مجموعة كحول مولداً PGH<sub>2</sub> (67,66,65,64,63).

## Inflammation

## 7-1 الالتهاب

### *Acute inflammation*

### *1-7-1 الالتهاب الحاد*

الالتهاب هو استجابة ضرورية من الجهاز المناعي لاستعادة التوازن بعد إصابة أي نوع من الأنسجة، تظهر أعراض الالتهاب بعد ثواني من إصابة النسيج والتي تشمل تمدد الأوعية الدموية، زيادة في تدفق الدم، زيادة في نفاذية الشعيرات الدموية وهجرة الخلايا المتعادلة Neutrophils إلى المناطق الخلوية، وتنتج عن هذه الفعاليات الأعراض التقليدية للالتهاب التي تشمل الاحمرار والانتفاخ والحرارة والألم<sup>(68)</sup>. تنتج الخلايا مجموعة متنوعة من وسطاء الالتهاب في موقع الإصابة مثل البروستاغلاندينات والليوكوترينات Leukotrienes والهستامينات histamines. وهذه الوسائط ترتبط مع مستقبلات الخلايا البطانية وتسبب توسع الأوعية الدموية والانسلال diapedesis (عملية الترشيح للكريات البيض الى الأنسجة المحيطة تدعى الانسلال diapedesis أو التسرب extravasation لكريات الدم البيض)<sup>(69)</sup>. تنتقل البروستاغلاندينات المولية للالتهاب التي تنتج بفعالية COX-2 بالتوسع الوعائي وتدفق الدم<sup>(70)</sup>. كذلك تُعيد الخلايا الدموية المحيطة بالغشاء القاعدي ترتيب نفسها استجابة لوسطاء الالتهاب وتُسهل ترشيح الجزيئات الكبيرة في البلازما إلى الأنسجة المجاورة، مما يؤدي إلى تقلص العضلات الملساء في موقع الإصابة ويصبح تدفق الدم بطيئاً داخل الشعيرات الدموية الأصغر<sup>(71)</sup>. ونتيجة لذلك فإن معظم الكريات الدموية البيض تستطيع الالتصاق على جدران الشعيرات الدموية. فضلاً عن ذلك تزيد المسافة بين الخلايا البطانية في الأوعية الدموية الصغيرة بسبب انكماش الخلايا البطانية وهذه العملية تزيد قطر

الأوعية الدموية وهذا يدعى بتوسع الأوعية الدموية<sup>(72)</sup>. تمثل الخلايا البطانية على الجدران الداخلية للشعيرات الدموية جزيئات الالتصاق، جزيئات الالتصاق هذه تُعلق على integrins (هي مستقبلات عبر الغشاء التي تتوسط التعلق بين الخلية ومحيطها) الموجودة على الكريات البيض<sup>(73)</sup>. الخلايا العدلة Neutrophils هي ميزة الخلايا المناعية تكون موجودة بوفرة في موقع الإصابة في حالة الالتهاب الحاد<sup>(74)</sup>. وهذه الخلايا هي بلعمية في طبيعتها وتستطيع ابتلاع الكائنات الحية الدقيقة أو الجسيمات وتوليد أنواع الأوكسجين الفعال وأنزيمات التحلل المائي لتحطمها<sup>(75)</sup>. تنتج الخلايا في المواقع المصابة Interleukin 8, Interferon  $\gamma$  والبروتينات التكميلية Integrins وبروتينات الانجذاب الكيميائي إلى الوحيدات Monocyte chemotactic proteins في الاستجابة للإصابة التي تولد حركة الانجذاب الكيميائي Chemotactic للخلايا المتعادلة نحو موقع الإصابة<sup>(77,76)</sup>. فضلاً عن ذلك تحدث إزالة للتحبيب degranulation من الخلايا العدلة حيث يتم تحرير جيلاتيناز، كاثاسبين، ديفينسين، كاثيليسيدين، لاكتوفيرين وبروتينات الزيادة البكتيرية Bactericidal increasing proteins لتدمير الجسيمات الغريبة أو المستضدات والإسراع في العملية الالتهابية<sup>(74)</sup>.

الالتهاب الحاد عملية مفيدة جداً في الحفاظ على توازن الأنسجة فهو ينشط الصفائح الدموية<sup>(78)</sup>. ويوفر الأجسام المضادة<sup>(79)</sup> ويبسر التصاق الكائنات الحية الدقيقة إلى الخلايا البلعمية<sup>(80)</sup>. يتم تحطيم Peptidoglycan بفعالية الخلايا العدلة من خلال إفرازاتها المتمثلة بـ Cathelidins و Defensins و Lysozymes وتحلل البيبتيدات وتستطيع إبطال مفعول LPS<sup>(81)</sup>. فضلاً عن ذلك فإنه يعوض عن الطلب المتزايد من العناصر الغذائية في موقع الإصابة ويحرم الميكروبات من الحديد من خلال توفير Transferrin<sup>(82)</sup>. ومما تجدر الإشارة إليه أن أنشطة البلعمة في الالتهاب الحاد تزيد تسلل الكريات البيضاء والخلايا اللمفية التي تقتل الخلايا المصابة والمُحملة بالمستضد<sup>(83)</sup>.

## **Resolution of Acute Inflammation**

## **2-7-1 انحلال الالتهاب**

الخلايا العدلة في حالة الالتهاب الحاد هي الخلايا المحببة الأساسية التي تتراكم في موقع الإصابة لذلك إزالة الخلايا العدلة المتراكمة هي خطوة ضرورية في مرحلة انحلال الالتهاب، إن البلاعم في موقع الإصابة تُحرر Interleukin-1 (IL-1) و TNF- $\alpha$  لتحفيز الخلايا القاتلة الطبيعية (NK) natural killer cell والخلايا للمفاوية T لتحرير الأنترفيرون كما IF $\gamma$ .

يرتبط IF $\gamma$  مرة أخرى إلى الخلايا البالعة ويتسبب في تحرير عامل نمو الخلايا الليفية fibroblasts growth factor (FGF) لبدء إعادة بناء الأنسجة<sup>(85,84)</sup>. تتكاثر الخلايا الليفية والخلايا البطانية وتكون شبكة من الشعيرات الدموية الجديدة، يتسرب الكولاجين ليُكون نسيج ندبي رابط لإغلاق المنطقة المكشوفة. وتلعب الوسطاء المشتقة من الدهون دوراً مهماً في انحلال الالتهاب<sup>(86)</sup>.

يحدث تفاعل بين الصفائح الدموية وكريات الدم البيضاء خلال الالتهاب ليؤدي إلى تكوين lipoxen A<sub>4</sub> و lipoxen B<sub>4</sub>. هذه اللابيوكسينات هي إشارة لانحلال الالتهاب التي تحول من غير تجديد الخلايا المحببة في الأوردة الشعيرية<sup>(87)</sup>. في هذه المرحلة PGGs تنشط النسخ من 15-lipooxygenase التي تحفز تكوين اللابيوكسينات من AA بدلاً من PGGs<sup>(88)</sup>. ويعزز Interleukin-6 الموت المبرمج Apoptosis للخلايا متعددة النوى Polymorphonuclear (PMN) والبالعات تبتلع PMN الميتة. بالإضافة إلى ذلك lipoxin A<sub>4</sub> يحفز الخلايا البالعة لتحرير Interleukin 10 (IL-10) و Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) اللذان قد يساعدان في التليف fibrosis<sup>(89)</sup>. وفي نهاية العملية وبعد إزالة الأنقاض تغادر البالعات موقع الالتهاب وتذهب إلى أقرب عقد لمفاوية<sup>(90)</sup>.

## **Chronic Inflammation**

## **3-7-1 الالتهاب المزمن**

إن الانحلال الناجح للالتهاب الحاد لا يوفر الكثير من الفرص للتحول إلى التهاب مزمن. إلا إنه قد يتحول إلى التهاب مزمن نتيجة الفشل لوسطاء الانحلال الداخلية والإبطال غير المكتمل لمحفزات الالتهاب أو الهجوم المستمر من المحفزات<sup>(85)</sup>. يتميز الالتهاب المزمن بزيادة تكوين الأوعية الدموية Angiogenesis<sup>(91)</sup>، تكون الألياف<sup>(92)</sup>، تسلل وحيدات النواة<sup>(93)</sup> والنخر<sup>(94)</sup>. ظاهرة Angiogenesis هي عملية تكوين أوعية دموية جديدة من واحدة موجودة. وعندما يصبح غير مسيطر على هذه العملية ربما يؤدي إلى الالتهاب المزمن.

كثير من الخلايا معروفة لإنتاج عوامل مولدة للأوعية مثل الخلايا الليفية، الخلايا البدنية والضامة، الخلايا البدنية هي مصدر قوي للعوامل المولدة للأوعية الدموية<sup>(95)</sup>. هنالك عدد من الوسطاء تعمل بصورة مباشرة أو غير مباشرة على الخلايا البطانية وتشجع تكوين الأوعية الدموية تشمل عامل تحفيز المستعمرة المحببة (G-Granulocyte colony stimulating factor

Vascular endothelial growth factor (VEGF)، عامل نمو بطانة الأوعية الدموية، عامل نمو الخلايا الليفية القاعدية (bFGF)، عامل نمو الخلايا الليفية القاعدية (bFGF)، (TGF- $\beta$ )، TNF- $\alpha$ ، PGE<sub>2</sub>، IL-1، NO، IL-6، وIL-8<sup>(91)</sup>. إن العامل (TGF- $\beta$ ) الناتج من البالعات يعمل على الخلايا الليفية fibroblasts والبدء بالتليف<sup>(96)</sup> ينتج الثرومبين في عملية تجلط الدم ويعتبر من الجزيئات الموالية للالتهاب. ويُنشط الخلايا البطانية لإنتاج IL-6 وبروتين الجذب الكيميائي Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) ويعتبر رابط بين الحاد والتحول إلى مزمن<sup>(97)</sup>. إذ يجذب MCP-1 الوحيدات الالتهابية إلى خلايا بطانة الأوعية الدموية وبعد الانسلاخ تُهاجر إلى أنسجة معينة وتحولها إلى بالعات لمزيد من الالتهاب<sup>(98)</sup>.

في الالتهاب المزمن يتم استبدال الخلايا العدلة بالوحيدات وتتحول إلى أنسجة ضامة، والخلايا الضامة يمكن أن تنشط بواسطة الخلايا الليفية، المعقدات المناعية والبروتينات التكميلية<sup>(99)</sup>. بعدها تُحرر البالعات المنشطة أنزيمات التحلل المائي لحل بروتينات C3a و C3b، الثرموبولاستين و الأوكسيداز متعدد الأمين Polyamine oxidase لتُحلل خلايا الورم. عند وجود محفزات المستضد الثابتة تبدأ البالعات المنشطة بتدمير الأنسجة الطبيعية بواسطة هذه الأنشطة وتسبب الأمراض التي منشؤها الالتهاب المزمن<sup>(100)</sup>.

### ***1-4-7-1 الأمراض الناتجة عن الالتهاب المزمن Inflammation Related Chronic Diseases***

إذا لم تُعالج مشكلة الالتهاب الحاد بشكل صحيح قد تؤدي إلى التهاب مزمن. وإن الجهود المتواصلة من الجهاز المناعي في حالة الالتهاب المزمن للتعافي من الإصابة تنتج تغييراً في وظائف الأنسجة المحيطة وتدمير الخلايا المجاورة وتحرير الساييتوكينات والكيموكينات في مجرى الدم. وقد تنتج عنه مجموعة كبيرة من الأمراض نتيجة للاستجابة النظامية مثل السرطان، مرض الزهايمر، تصلب الشرايين، التهاب المفاصل<sup>(101)</sup>.

### ***Cancer***

### ***1-4-7-1 السرطان***

السرطان هو نتيجة النمو غير المنضبط للخلايا التي تغزو الأنسجة المحيطة بها وتضعف وظيفة الأنسجة، كما قد تنتشر الخلايا المسرطنة في الأنسجة الأخرى وتضعف وظيفتها أيضاً، عملية التسرطن بشكل عام تنقسم إلى ثلاث مراحل هي البدء والنمو والانتشار. فالإلتهاب يكون له

تأثير على كل من المراحل الثلاث<sup>(102)</sup>. في عام 1863 "Rudolph Virchow" وجد الكريات البيض في الأورام وأقترح أن الالتهاب المزمن منشأ للسرطان<sup>(103)</sup>.

التعبير عن COX-2 هو أساسي في الالتهاب المزمن لأنه يحفز تشكيل PGs. إذ بينت الأدلة بأن الإفراط في التعبير عن COX-2 في سرطان القولون يسبب هجرة الخلايا البطانية وتكوين الأوعية الدموية بسبب تكوين PGs والعوامل الموائية لتكوين الأوعية الدموية<sup>(104)</sup>. بينما وجد أن COX-2 في حالة سرطان الكبد يسبب زيادة تكوين الأوعية الدموية عن طريق مسار (VEGF)<sup>(105)</sup>. وأظهرت دراسة سرطان عنق الرحم البشري إن زيادة التعبير عن COX-2 تؤدي إلى زيادة نمو الورم والإنبثاث من خلال التعبير عن (VEGF)<sup>(106)</sup>. كذلك لوحظت زيادة التعبير عن COX-2 في المراحل البدائية من سرطان المعدة، و لوحظ تعبير أعلى لهذا الأنزيم في العقد اللمفاوية المنبثة للأنسجة المنتشرة الناشئة عن الورم<sup>(107)</sup> ومما يؤيد دور COX-2 في السرطان، وقد ثبت أن الأدوية المضادة للالتهابات غير الستيرويدية (NSAIDs) والمثبطات الانتقائية لـ COX-2 هي مركبات واعدة والأكثر ترشيحاً للوقاية السريرية من سرطان القولون والمستقيم إذ إنها تمنع تشكيل الورم وتقلل الأصابة والوفيات من هذا المرض. وأن الأسبرين والسليكوكسيب قد يكون فعالاً في الوقاية من الأورام في المرضى بعد استئصال الورم<sup>(108)</sup>.

## *Alzheimer's Disease (AD)*

## *1-7-4-2 مرض الزهايمر*

هو مرض يحدث في الدماغ ويؤثر على أجزاء من المخ التي تتحكم في الذاكرة والتفكير واللغة ويحدث عموماً بعد سن الـ 60 عام<sup>(109)</sup>. تشير الأبحاث الى إن الإجهاد التأكسدي Oxidative stress هو السبب الرئيس لمرض الزهايمر في الأشخاص المسنين وهو إنخفاض امتصاص النحاس وزيادة خروجه من داخل الخلايا، كما يجعله غير متوفر للأنزيمات المضادة للأكسدة مثل superoxide dismutase الذي يعتمد على النحاس لإداء وظيفته بشكل سليم<sup>(110)</sup>. وبالتالي تزيد هذه العملية من الإجهاد(الحمل) التأكسدي للخلية، مما يؤدي إلى أكسدة دهون الأغشية وتنشيط الجزيئات الموائية للالتهاب. إن زيادة الإجهاد التأكسدي تؤدي إلى تكوين لويحات أميلويد amyloid plaques والتشابك الليفي العصبي عن طريق أكسدة البروتينات<sup>(111)</sup>; لويحات أميلويد والخلايا الميتة تمثل إشارة المستضد وتحفز الخلايا المناعية لتحرير السايوتوكينات الالتهابية<sup>(112)</sup>. إذ تستجيب الخلايا الدبقية والخلايا العصبية للمستضدات الالتهابية وتحرر السايوتوكينات الالتهابية. وبمجرد أن تصبح هذه الخلايا نشطة تبدأ بتحرير IL-1 الذي يسبب تحرير

IL-6 وكل من هذه الأنترلوكينات تحفز تحرير Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) <sup>(113)</sup>. في حين إن البالعات والوحدات الالتهابية يتم تجنيدتها الى المنطقة المصابة وتبدأ السلسلة الالتهابية.

وأظهرت دراسة لـ1285 مريضاً تتراوح أعمارهم بين (62-85) سنة وجود علاقة إيجابية بين علامات الالتهاب الحاد مثل IL-6، والإمراض الوعائية العصبية في المرضى الأكبر سناً الذين يعانون من التدهور الإدراكي Cognitive decline <sup>(114)</sup>. وتمت مقارنة أنسجة قرن آمون التي تم الحصول عليها بتشريح الجثث التابعة لأشخاص مصابين بمرض الزهايمر وأخرى لغير المصابين ووجدت زيادة التعبير عن COX-2 في قرن آمون لمرضى الزهايمر مقارنة بغير المصابين <sup>(115)</sup>.

وأشارت الأدلة الى إن مضادات الالتهاب تخفض خطر الإصابة بمرض الزهايمر لأن المرضى الذين يعانون من التهاب المفاصل الروماتيزمي وهشاشة العظام تبين لديهم ارتباط عكسي مع تطور مرض الزهايمر. لكن التجارب السريرية لمضادات الالتهاب أظهرت أن الروفيكوكسيب والنابروكسين غير قادرة على إيقاف تقدم المرض. وهذا يقود إلى إفتراض أن مضادات الألتهاب قد تكون مفيدة لمنع حدوث المرض لكن تصبح غير فعالة بمجرد حدوث المرض <sup>(116)</sup>.

## **Anti-inflammatory Drugs 5-7-1 أدوية مضادات الالتهاب**

### **1-5-7-1 مضادات الالتهاب الستيرويدية**

#### **Steroidal anti-inflammatory drugs**

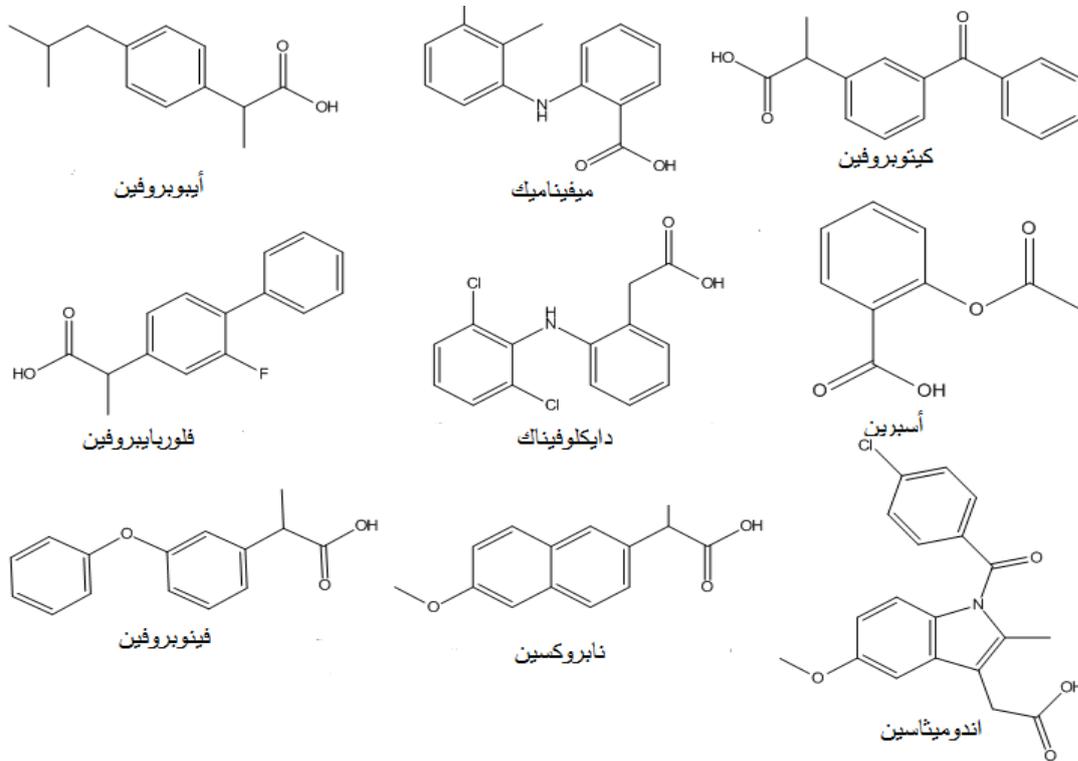
الستيرويدات هي مركبات كيميائية تفرز بواسطة الغدة الكظرية وتعمل كمضادات للالتهاب بأليات مختلفة. كمثال على ذلك كلايكورتيكود glucocorticoids وهي هورمونات ستيرويدية ترتبط مع مستقبلات الخلية وتسبب نشاط مضاد للالتهاب. وترتبط مستقبلات كلايكورتيكود مع بروتينات الصدمة الحرارية في السيتوبلازم بعد تنشيط مستقبلات النقل من وإلى النواة وتعديل النشاطات النسخية <sup>(117)</sup>. يعزز الكلايكورتيكود التعبير عن ما يقرب من 130 جيناً التي تشمل مضادات الالتهاب والبلعمة ومكافحة الإجهاد التأكسدي ويقمع الجينات الموالية للالتهاب <sup>(118)</sup>. فضلاً عن ذلك قد تغير كلايكورتيكود مسارات غير جينية بواسطة تقييد نشاطات استهلاك ATP وهذه التأثيرات أسرع بكثير من التأثيرات الجينية <sup>(119)</sup>. الكورتيكوستيرويدات Corticosteroids

هي نوع آخر من الهرمونات الستيرويدية يثبط نشاط أنزيم فوسفولايبيز Phospholipase A<sub>2</sub> وتقلل إنتاج AA عند تنشيط الخلايا بواسطة الجزيئات المولية للالتهاب، وبالتالي تثبيط PGs والليكوترينات بواسطة الستيرويدات القشرية من خلال عمل أنزيم phospholipase A<sub>2</sub> (120). مع ذلك كشفت بعضاً من الآثار الجانبية كنتيجة لاستعمال كلايكورتيكويد في الأمراض الالتهابية إذ إنه يحسن مستويات الكلوكوز بواسطة انحلال البروتينات والتحويل الجزئي لأيض الأحماض الدهنية. هذا التدخل التقويضي بواسطة الكورتيكوستيرويد يؤدي إلى إعادة بناء الأنسجة وهشاشة العظام ومقاومة الأنسولين ومرض السكري. (121) ويُذكر أن الاستخدام الطويل لكلايكورتيكويد يزيد من الموت المبرمج للخلايا الغضروفية مفرطة التصنيع في صفيحة النمو مما يقلل من النمو الطولي للعظم. (122)

### 1-7-5-2 أدوية مضادات الالتهاب غير الستيرويدية

#### non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

إن مضادات الالتهاب غير الستيرويدية تتضمن مجموعة واسعة من المركبات مثل الأسبرين والفينوبروفين والأيبوبروفين والأندوميثاسين والفلوربايبروفين والنابروكسين والدايكلوفيناك والكيوتوبروفين والميفيناميك الشكل (5-1).



شكل (5-1) الصيغ البنائية لبعض مضادات الالتهاب غير الستيرويدية

فضلاً عن تأثيرها المضاد للالتهاب فإنها تمتلك خصائص خافضة للحرارة ومسكنة للألم. فهي تحد من الألم والالتهاب من خلال تثبيط أنزيمات COX اللازمة لإنتاج البروستاغلاندينات، وهي غالباً مثبطات لكلا متناظري الأنزيم على الرغم من أن كل متناظر يثبط بمستوى مختلف<sup>(123)</sup>. وتثبط الأنزيم تثبيط عكسي أو غير عكسي من خلال التنافس مع المادة الأساس على الموقع الفعال للأنزيم<sup>(31)</sup>. إلا إن الاستعمال طويل الأمد لـ NSAIDs يسبب قرحة المعدة ومضاعفات الجهاز الهضمي وسبب ذلك هو تثبيط أنزيم COX-1 المسؤول عن إنتاج البروستاغلاندينات الوقائية التي تحافظ على سلامة بطانة المعدة<sup>(5)</sup>.

لقد حقق الأسبرين نجاحاً ملحوظاً في علاج الالتهاب ولايزال له استخدامات فريدة من نوعها في الوقاية من تجلط الدم لأنه ينجح في التثبط غير العكسي لـ COX-1 عن طريق أستلة السيرين في الموقع 530 من الموقع الفعال<sup>(124)</sup>. حيث إن الأستلة لـ Ser 530 تمنع تجريد الهيدروجين من AA في COX-1 بواسطة الإعاقة الفراغية لـ AA من الارتباط بوفرة في الموقع الفعال للأنزيم، وعلى النقيض من ذلك يحدث تجريد للهيدروجين عند أستلة COX-2 ويتكون جذر الأراكونيل لكن لا تحدث عملية تكوين الحلقة (cyclization) ولا يتكون الأندوبيروكسيد مما يؤدي الى إنتاج (15 HETE) 15-R-hydroxyeicosotetraenoic acid بدلاً من PGH<sub>2</sub><sup>(26)</sup>. والأسبرين يقلل من إمكانية انسداد الأوعية والشرايين التاجية والأوعية الدماغية حيث يثبط تجلط الصفائح الدموية<sup>(124)</sup>.

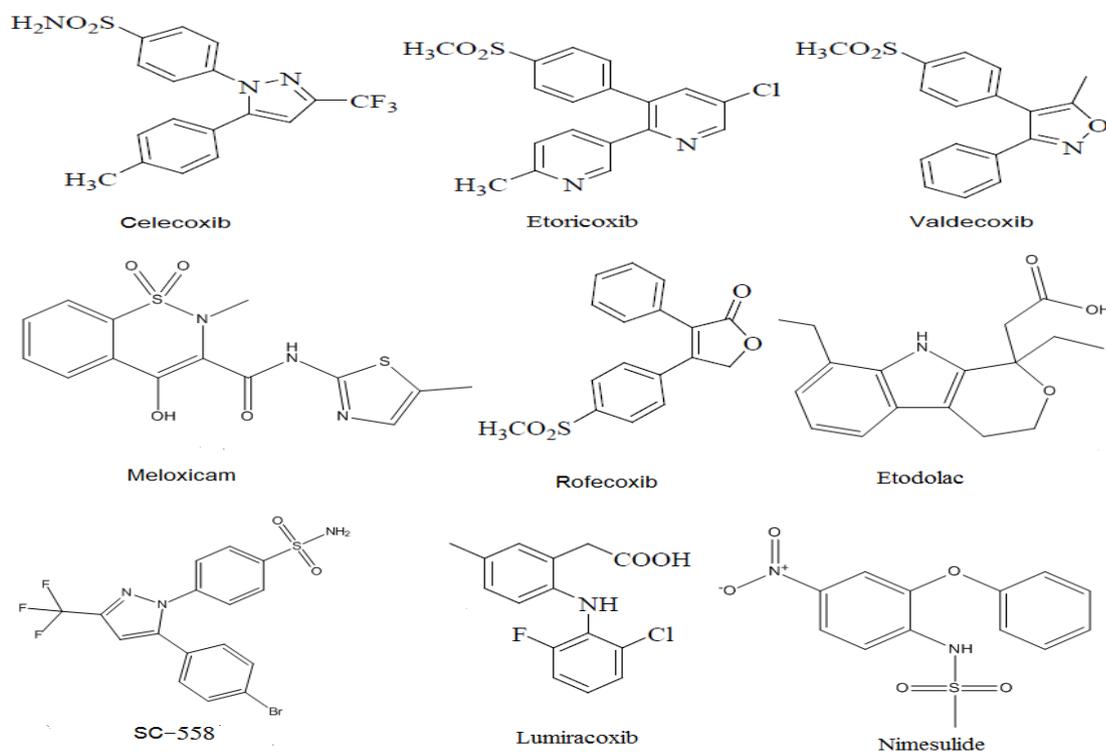
تعتمد آلية عمل مضادات الالتهاب التقليدية على قدرتها على اختراق مدخل القناة في الموقع الفعال الذي يتألف من المخلفات القطبية مثل Arg 120, Glu 524 إذ أن المثبطات التي تحتوي على مجموعة الكاربوكسيل تتجه نحو مدخل COX في الموقع الفعال حيث يكون الموقع مناسباً للتداخل مع Glu524, Arg120 عن طريق الأواصر الهيدروجينية والتداخلات الألكتروستاتيكية ولا تعتمد على الوقت لأنها لا تتطلب اختراق الشبكة الهيدروجينية<sup>(26,6)</sup>.

### **1-7-3 مثبطات COX-2 الانتقائية Selective COX-2 inhibitors**

نظراً لكون COX-1 مسؤولاً عن إنتاج البروستاغلاندينات الوقائية التي تحافظ على سلامة بطانة المعدة وتحافظ على الوظيفة الطبيعية للكلية مثل PGE<sub>2</sub> و PGI<sub>2</sub>، بينما COX-2 مسؤول عن إنتاج البروستاغلاندينات الموالية للالتهاب في حالة الأمراض الالتهابية، فقد إتجه الباحثون

لتصميم مثبطات إنتقائية لأنزيم COX-2 للتغلب على الأضرار الجانبية التي تسببها مضادات الالتهاب التقليدية مع الحفاظ على النشاط المسكن والمضاد للالتهاب<sup>(4,3)</sup> ومما ساعدهم في ذلك هو الأختلاف في التركيب البنائي بين COX-1 و COX-2 حيث يستبدل Ile في المواقع 523 و434 لأنزيم COX-1 بحامض أميني أصغر وهو الفالين وكذلك إستبدال حامض الهستيدين عند الموقع 513 لأنزيم COX-1 بحامض الأرجنين عند نفس الموقع لـ COX-2 مما يؤدي إلى زيادة 25% لحجم القناة والموقع الفعال لأنزيم COX-2 مقارنة بـ COX-1 وتكوين جيب جانبي في الموقع الفعال لـ COX-2 إذ توفر هذه الفروقات مرونة لربط المثبط في الموقع الفعال، وكذلك تقلل الازدحام الأيوني والفراغي في مدخل القناة، مما يسمح للجزيئات الكبيرة للارتباط مع الموقع الفعال لـ COX-2 وعدم أو قلة الارتباط بالموقع الفعال لـ COX-1<sup>(31,6)</sup>. إن مركبات (NSAIDs) التي سوتت وُعدت مضادات التهاب غير ستيرويدية أكثر أماناً وهي Meloxicam (Mobic)، nimesulide، etodolac (Lodine) تبين بعد اكتشاف الأيزومر COX-2 بأنها مثبطات تفضيلية لـ COX-2<sup>(125)</sup>. في عام 1999 تم تسويق أول المثبطات الانتقائية Celecoxib (Celebrex) و Rofecoxib (Vioxx) وكل منهما فعال كمضاد التهاب قياسي في علاج التهاب المفاصل الروماتيزمي وهشاشة العظام والألم بعد جراحة العظام وجراحة الأسنان لكن تم سحب الروفيكوكسيب من الأسواق في عام 2004 لأن الاستعمال الطويل له يسبب احتشاء عضلة القلب<sup>(126)</sup>. ومن الأدوية الأخرى التي سوتت كمضادات التهاب انتقائية لـ COX-2 هي Etoricoxib و Valdcocixib (Bextra)، لكنها سحبت من الأسواق لأنها تسبب أمراض القلب والأوعية الدموية، وكذلك تم تسويق Lumiracoxib وبعد ذلك سحب من الأسواق نظراً للقلق بشأن سمية الكبد. حيث تمثل المثبطات الانتقائية لـ COX-2 مثبطات غير عكسية وتعتمد على الوقت لأنها تحتاج للوقت لكي تخترق شبكة الأواصر الهيدروجينية التي تتألف من Arg 120, Glu 524, Tyr 355, His 90، التي تشكل بوابة لموقع الارتباط وتستقر في الموقع الفعال للأنزيم<sup>(127)</sup>. إذ أن تحقيق الاستقرار لهذه المثبطات في الموقع الفعال لا يعتمد على Arg 120 لكن يعتمد على عدد من التداخلات الهيدروفوبية والأواصر الهيدروجينية. لقد تم وضع الأساس الهيكلي للانتقائية التي تبديها هذه المركبات من خلال التركيب البلوري للمثبط الانتقائي SC558 داخل الموقع الفعال لـ COX-2 حيث مجموعة SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> ذات الخاصية الدوائية في موقع البار لـ SC558 كما في الشكل (1-6)، تلعب دوراً حاسماً في الانتقائية إذ تدخل الجيب الثانوي وتخضع لتداخلات ملائمة مع مخلفات الأحماض الأمينية في بطانة الجيب

الثانوي (Phe518, Arg513, His90, Glu192) داخل موقع COX. والبروم على موقع البارا حلقة الفينيل الثانية يتجه نحو الأعلى (القمة) لموقع COX-2 يتموضع بطريقة بحيث يخضع لتداخلات هيدروفوبية مع Phe513, Tyr385, Phe381, Trp387, Leu384 . مجموعة CF<sub>3</sub> في الموقع 3 من حلقة البايرازول ترتبط الى الجيب الهيدروفوبي الذي يتألف من (Met113, Val116, Val134, Tyr355, Leu359, Ieu531)<sup>(128)</sup>. قد تسبب المثبطات الانتقائية أمراض القلب والأوعية الدموية وسبب هذه السمية هو تثبيط تصنيع البروستاسايكلين PGI<sub>2</sub> الذي يصنع بواسطة جدران الأوعية الدموية وله خصائص مضادة للتخثر بحيث يمنع تراكم الصفائح الدموية ويحافظ على التوازن مع الثرومبوكسان TXA<sub>2</sub> . وزيادة نشاط الثرومبوكسان مما يسبب تخثر الدم وزيادة خطر الجلطات القلبية<sup>(129)</sup>.



شكل (6-1) بعض مثبطات COX-2 الانتقائية

### 6-7-1 النباتات مصدر لمضادات الالتهاب

#### *Plants as sources of COX-2 inhibitors*

منذ فترة طويلة استعملت النباتات والمركبات المعزولة من النباتات في مجال الطب وهي احد المصادر الرئيسية للأدوية الطبية النباتية، وكنماذج للأدوية الصناعية ومصدر المواد الفعالة التي تدخل في تحضير الدواء ، على شكل خلاصات المواد الفعالة التي تستعمل بوصفها مادة خام

لإنتاج كثيراً من المركبات الكيماوية ، التي تعد النواة للتخليق الكيماوي لمجموعة من المواد الدوائية المهمة ، إن التنوع الكيماوي والبيولوجي لمكونات النبات في المزيج مع توفر الإنتاج العالي من الاختبارات البيولوجية وتوفر أساليب أكثر حساسية لتوضيح الهياكل قد أدت إلى اهتمام أوسع في الأدوية من النباتات. وحقيقة إن النباتات غنية بالمركبات المتنوعة والنشطة بيولوجياً كل هذا يحفز البحث عن مثبطات COX في النباتات. في البحث عن منتجات طبيعية مضادة للالتهاب تم عزل عدد من المركبات كمثبطات لـ COX-1 من المستخلصات النباتية<sup>(130-132)</sup> كما في الجدول

(1-1) جدول (1-1) مثبطات COX-1 معزولة من النباتات

النباتات	المركبات المعزولة	المصدر
<i>Ipomea pes-caprae</i> (L.)	Eugenol, 4-Vinylguaicol, Mellein, 2-Hydroxy-4,4,7trimethyl-1(4H)-Naphthalenone	133
<i>Vantanea peruvana</i> Macbr	Ouratea-catechin, Ouratea proanthocyanidin	134
<i>Atuna racemosa</i> Raf. Ssp. racemosa	Galocatechin, 4 MeO-(-)-galocatechin-(+)	134
<i>Alphitonia ziziphoids</i> (Spreng) A.Gray.	Alphitol, Betulinic acid	135
<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertner.	Vavain, Vavain 3'-O-β-D-glucoside, (+)-Catechin	136

ومنذ اكتشاف أنزيم COX-2 في عام 1990 فقد أنصب الاهتمام على البحث عن مثبطات

انتقائية لـ COX-2 من النباتات كما في الجدول (2-1)

جدول (2-1) مثبطات انتقائية لـ COX-2 معزولة من النباتات اكتشاف أنزيم COX-

النباتات	المركبات المعزولة	المصدر
<i>Plantago major</i>	Ursolic acid	137
<i>Emblica officinalis</i>	3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Gallic acid)	138
Chamomile	Extract	139
<i>Rubia cordifolia L.</i>	Alizarin (RUC-1) primveroside(RUC-3) Mollugin (RUC-2)•Lucidin	140
<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	Isoliquiritin apioside(Gly-1) Kaempferol(Gly-2) Glycyrrhizic acid(Gly-3)	140

2 في عام 1990 فقد أنصب الاهتمام على البحث عن مثبطات انتقائية لـ COX-2 من النباتات

كما في الجدول (2-1)

جدول (2-1) مثبطات انتقائية لـ COX-2 معزولة من النباتات

المصدر	المركبات المعزولة	النباتات
137	Ursolic acid	Plantago major
138	3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Gallic acid)	Emblica officinalis
139	Extract	Chamomile
140	Alizarin (RUC-1) primveroside(RUC-3) Mollugin (RUC-2)·Lucidin	<i>Rubia cordifolia L.</i>
140	Isoliquiritin apioside(Gly-1) Kaempferol(Gly-2) Glycyrrhizic acid(Gly-3)	<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>

### 8-1 الحسابات النظرية لتثبيط الأنزيم

تصميم الدواء هو أداة هامة في مجال الكيمياء الطبية. حيث يتم تحضير مركبات جديدة من خلال إحداث تغييرات في المجموعة العاملة للمركب القائد lead compound ويتم استعمال أجهزة الكمبيوتر لتوقع ارتباط الجزيئات الصغيرة (المثبطات) إلى ما يعرف بالتركيب الهدف (الأنزيم) ومدى فعالية هذه المثبطات<sup>(141)</sup>. ولتحديد القدرة التثبيطية للمثبط يتم حساب IC<sub>50</sub> (تمثل تركيز المثبط الذي يعطي نصف القيمة القصوى للتثبيط)<sup>(142)</sup> ومن التقنيات المستخدمة لتصميم المثبطات وحساب مدى فاعليتها وميكانيكية عملها هي:

### 1-8-1 العلاقة الكمية بين الهيكل والنشاط

#### *Quantitative structure activity relationship (QSAR)*

هي وسيلة لإيجاد معادلة بسيطة يمكن استعمالها لحساب بعض الخصائص من التركيب الجزيئي للمركب. تحاول QSAR ربط المميزات الجزيئية (واصفات) descriptors مع الخصائص الفيزيائية والكيميائية مثل الأنشطة البيولوجية لمجموعة من المركبات من خلال الطرق

الإحصائية. وكننتيجة لذلك يتم تأسيس علاقة رياضية بسيطة. ممكن استخدام QSAR لأي غرض في التصميم الجزيئي بما في ذلك التنبؤ لأنواع مختلفة من النشاطات البيولوجية وتحسين المركب القائد lead compound والتنبؤ لمركبات جديدة في اكتشاف الأدوية<sup>(143)</sup>. عملية بناء نموذج QSAR هي متشابهة بغض النظر عن نوع الخاصية التي يتم توقعها. فهو يتألف من عدة خطوات التي يؤمل أن تؤدي الى تصميم مركبات جديدة مع النشاط المطلوب. الخطوة الأولى في بناء نموذج QSAR هي اختيار مجموعة تدريبية من المركبات مع أنشطتها التجريبية ومن الناحية المثالية يجب أن تعطي كل من هذه الأنشطة مدى من القيم الممكنة لذلك النشاط. والخطوة التالية هي حساب الواصفات التي تحتوي على ما يكفي من المعلومات المتعلقة بالنشاط البيولوجي. مع ذلك من الصعب التنبؤ بالتحسن في تغير الواصفات التي تكون ذات أهمية. وبمجرد حساب الواصفات فإنه يتم اختيار تلك التي ينبغي أن تدرج في نموذج QSAR. هنالك معامل ارتباط يعطي قياس كمي لمدى نجاح كل واصف يصف النشاط لذلك يتم اختيار الواصفات التي لها أعلى معامل ارتباط. أما الخطوة التالية فهي تحليل البيانات لحساب أفضل تعبير رياضي يربط بين الواصفات والنشاط البيولوجي إذ يتضمن المعلومات المتعلقة بالميزات الأساسية للبيانات البيولوجية والكيميائية للتركيب البنائي. وفي الخطوة النهائية يجري التحقق والتنبؤ للمركبات التي لم يتم اختبارها. مع ذلك يتم اختبار النموذج الأول تجريبياً للتحقق من قدرته على التنبؤ. ويتم ذلك من خلال الاختبارات البيولوجية لبعض المركبات الإضافية (مجموعة اختبار) في الطريقة نفسها التي عوملت بها المجموعة التدريبية ومن ثم مقارنة الحقائق التجريبية مع القيم التي تتنبأ بها نموذج QSAR. إذا كانت تنبؤات QSAR ضمن الحدود المقبولة فإنه يمكن أن يُستعمل لتنبؤات أكثر شمولاً لمزيد من المركبات وينبغي تفسير النتائج لاقتراح وتصميم مركبات جديدة تمتلك النشاط المطلوب<sup>(144-146)</sup>.

### **1-1-8-1 واصفات العلاقة الكمية بين الهيكل والنشاط QSAR descriptors**

يتم وصف الجزيئات وخصائصها الفيزيائية-الكيميائية من خلال الواصفات. إن طبيعة الواصفات المستخدمة وإلى أي مدى ترشد الى الخصائص التركيبية المتعلقة بالنشاط البيولوجي هي جزء مهم في QSAR. وتشير التقديرات إلى أن الآلاف من الواصفات الجزيئية هي الآن موجودة يمكن حساب معظمها باستعمال البرامج التجارية مثل CODESSA، DRAGON و Sybyl-X يمكن تصنيف الواصفات المستخدمة إلى بنوية، وكهربائية، وطوبولوجية، وهندسية

وكيميائية كمية. إنَّ الوصفات الطوبولوجية هي الأرقام التي تعطي معلومات عن المجموعة الترابطية في الجزيئة. وهي مشتقة من التمثيل البنائي للجزيئة وإنها محاولة لترميز الحجم ، الشكل والتفرع في المركب من خلال التعامل مع الجوانب النظرية للرسم البنائي للهياكل. بعض الأمثلة هي مؤشرات راندك *Randic indices* ومؤشر وينر *Weiner index* (هي مجموع الأواصر الكيميائية بين جميع أزواج الذرات الثقيلة في الجزيئة) وغيرها<sup>(147,143)</sup>. تعطي الوصفات البنوية وصفاً بسيطاً عن ما موجود في الجزيئة مثل عدد الذرات غير المتجانسة، وعدد الحلقات وعدد الأواصر المزدوجة. وتظهر الوصفات البنوية غالباً في معادلة QSAR عندما تكون الخاصية المتوقعة تختلف باختلاف حجم الجزيئة. أما الوصفات الكهربائية فهي القيم التي تعطي معلومات عن توزيع الشحنة في الجزيئة مثل مؤشرات القطبية والاستقطاب. والأكثر شيوعاً من الوصفات الكهربائية هي مساحة السطح القطبية الطوبولوجية (TPSA) الذي يعطي إشارة إلى جزء من سطح الجزيئة يحوي مجموعات قطبية ضد المجموعات غير القطبية. الوصف الآخر الذي يُستعمل بشكل واسع هو معامل تفريق الماء الذي يتم تحديده بواسطة مخطط تنبؤ محدد مثل *ClogP* أو *MlogP*<sup>(148)</sup>. الوصفات الهندسية هي قيم تصف حجم وشكل الجزيء وكذلك درجة تكامل الليكاند والمستلم. ويتم إعدادها من النماذج ثلاثية الأبعاد للجزيئات وتستمد من حسابات السطح الجزيئي من الأمثلة عليها عزم القصور الذاتي، حجم الجزيئة ومساحة سطح الجزيئة وغيرها من المعالم التي تصف الطول والارتفاع والعرض<sup>(145)</sup>. الوصفات الكيميائية الكمية هي إعطاء معلومات حول البنية الإلكترونية للجزيئة ويتم الحصول عليها عن طريق حساب المدار الجزيئي وتصف أساساً التداخل الإلكتروني ، وتشمل طاقة الأوربتالات الجزيئية المشغولة بدرجة عالية ( $E_{HOMO}$ ) وهو مقياس كمي للتفاعلية الكيميائية لجهد تأين المركب للجزيئة وطاقة الأوربتال الجزيئي غير المشغول الواطئ ( $E_{LUMO}$ ) الذي يفسر الألفة الإلكترونية الانكسارية والطاقة الكلية. فجوة  $E_{HOMO}-E_{LUMO}$  أو جهد التأين يمكن أن يكون واصفاً مهماً للتنبؤ بكيفية تفاعل الجزيئة<sup>(149)</sup>.

## *Molecular docking*

## **1-8-2 الالتحام الجزيئي**

الالتحام الجزيئي أو ما قد يدعى بالإرساء الجزيئي هي أداة رئيسة في مجال البيولوجيا الجزيئية والهيكلية وتصميم الأدوية بمساعدة الحاسوب<sup>(15)</sup>. وهي عملية ارتباط جزيئين مع بعضهما بعضاً في اتجاه وموقف يحددهما الشكل الهندسي والخصائص الفيزيائية لكلا الجزيئين. الأشكال

الهندسية تحدد كيف تكمل السطوح المرتبطة بعضها البعض بينما الخصائص الفيزيائية تحدد مدى قوة الارتباط لطاقات التفاعل التي تعقد الجزيئتين مع بعضهما، وبالتالي فإن الهدف لدراسات الالتحام الجزيئي لتحديد فيما إذا كانت الجزيئات تتداخل مع بعضها بعضاً وإذا تداخلت يتم تحديد الاتجاه والموقع الذي يعطي أكبر تداخل وأقل طاقة<sup>(150)</sup>. وبعبارة أخرى تحدد التشكل الصحيح لليكاند في الموقع الفعال للأنزيم والتنبؤ للألفة بينهما.

ساهمت إجراءات الالتحام الجزيئي بشكل كبير في اكتشاف الأدوية لسنوات عديدة<sup>(151)</sup>، إذ إن المحرك الرئيس لاكتشاف الأدوية هو تحديد الجزيئات الصغيرة المبتكرة التي تظهر ألفة ارتباط عالية وانتقائية للهدف. وتتوفر في الوقت الحالي كثير من الخوارزميات لتقييم وترشيد تفاعلات الليكاند مع البروتين ، والعديد من الخوارزميات تشترك في منهجيات موحدة مع ملحقات جديدة فضلاً عن التنوع في تعقيدها وسرعتها الحسابية مما يوفر مجموعة كبيرة من التقنيات للتعامل مع مشاكل تصميم الأدوية المبنية على الهيكل البنائي<sup>(152)</sup> . على افتراض توفر الهيكل البنائي للهدف والتحدي الأساسي في اكتشاف المركب القائد لذلك النهج المثالي هو معرفة التوجيه وألفة الارتباط لليكاند، وهذا يتم باستخدام الالتحام الجزيئي<sup>(153)</sup>. ونظراً للتطور الحاصل للكمبيوتر والأداء العالي للخوارزميات أصبح من الممكن ان ترسو آلاف الليكاندات ذات الأهمية الصيدلانية في وقت قصير جداً<sup>(154)</sup>. وتعتمد طرق الالتحام الناجح على مساحة البحث ودالة التهديف Scoring function التي ترتب بشكل صحيح الالتحامات المرشحة وتعتمد مساحة البحث على المعلومات المتوفرة عن موقع الارتباط إذا لم تتوفر معلومات عن الموقع الفعال، فيجب أن تشمل مساحة البحث سطح الهدف بأكمله أما إذا توفرت معلومات كافية عن موقع الارتباط سوف يكون التركيز على الموقع الفعال وتختزل مساحة البحث. دالة التهديف يجب أن تكون قادرة على التمييز بين أوضاع الارتباط التجريبية من جميع الأوضاع الأخرى التي تم اكتشافها من خلال خوارزمية البحث<sup>(15)</sup>. طرق التهديف قد تكون تجريبية أو تستند على المعلومات المتوفرة أو تستند على الميكانيك الجزيئي. من الطرق التي تستند على الميكانيك هي AMBER, OPLS, CHARMM, AUTODOCK وتستعمل مصطلحات لتمثيل التغير في الطاقة الحرة والتغير في الأنتروبي عند الارتباط. أما المساهمات الفردية للطاقة الكلية للتأصر فهي قوى فان دير فال، الأواصر الهيدروجينية، التداخلات الألكتروستاتيكية وعدد من الأواصر القابلة للتدوير في الليكاند فتعامل كمتغيرات مستقلة<sup>(151)</sup>. ويتم الحكم على نجاح الالتحام إذا كان قادراً على انشاء التشكل الملاحظ تجريبياً. ويتم تقييم نتائج إعادة الالتحام بواسطة حساب الجذر التربيعي لمتوسط الانحراف RMSD بين تشكّل الليكاند كما مبين

في X-ray وتشكل الليكاند المقترح من قبل برنامج الالتحام (RMSD) هو قياس لمتوسط الانحراف في مواقع الذرات الثقيلة بين المعقدين. ويكون الالتحام ناجحاً في إنتاج التشكل الأصلي إذا كانت RMSD أقل من 2 أنكستروم<sup>(155)</sup>. هنالك نوعان من الالتحام مرن وصلد. في الالتحام الصلد يفترض كلاً من الليكاند والبروتين صلد وأغلب الخوارزميات تفترض أن البروتين صلد والليكاند مرن وتهمل وجود جزيئات الماء مما يؤثر على دقة النتائج<sup>(156)</sup>. هنالك عدد من برامج الالتحام مثل AUTODOCK, MOE MCDOCK, GOLD, ICMDOCK ولتنفيذ عملية الالتحام يتطلب هيكل ثلاثي الأبعاد لكل من الأنزيم والمثبط ومن ثم إجراء عملية الالتحام وبعد ذلك يتم تقييم النتائج<sup>(151)</sup>.

### 9-1 الهدف من البحث

نتيجة لكون أنزيمات الأكسدة الحلقية هي الهدف الرئيس لمضادات الالتهاب غير الستيرويدية ونتيجة للاستخدام الواسع والمزمن لهذه الأدوية بسبب إنتشار أمراض الالتهاب والأمراض الخطيرة الناجمة عنها، إلا إنها تسبب أضرار جانبية خطيرة ولذا انبثقت محاور البحث الآتية :

1- إجراء تحويلات على بعض مضادات الالتهاب غير الستيرويدية من خلال إستبدال مجموعة الكاربوكسيل بالأصرة الأمايدية عن طريق تفاعلها مع أمينات أروماتية وتشخيص الأميدات الناتجة.

2- إستخلاص زيت النعناع وإستخلاص الأنتوسيانين من الملفوف الأحمر المحلي.

3- دراسة فعالية المركبات المحورة والمستخلصات كمنشطات لأنزيمات الأكسدة الحلقية عن طريق إستحداث إلتهاب في الفئران وحساب قدرتها التثبيطية ومقارنتها مع الأسبرين والفولتارين.

4- إختبار عملية إرتباط المركبات المحضرة والمستخلصات النباتية من خلال استخدام برامج حاسوبية لمعرفة فعاليتها التثبيطية لأنزيمات الأكسدة الحلقية إعتماًداً على نتائج الإلتحام الجزيئي.

5- التحقق من أن فعالية المركبات والمستخلصات كمضادات التهاب ناتجة عن تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية من خلال قياس تركيز البروستاغلاندين في بلازما الدم للجرذان.

# الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

## الجزء العملي

### 1-2 الأجهزة المستعملة Apparatus

جدول (1-2) الأجهزة المستعملة

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم الجهاز	ت
Stuart(Germany)	Hotplate-Magnetic Stirrer مسخن ذو محرك مغناطيسي	1
Stuart (Germany)	Rotary Evaporator جهاز تبخير دوار مخلخل الضغط	2
Memmert (Germany)	Electrical Dry Oven 220 C° فرن تجفيف كهربائي	3
Sartorius (Germany)	Sensitive Electrical balance ميزان كهربائي حساس	4
Stuart melting point-SMT30	Melting point Apparatus جهاز درجة الانصهار	5
FTIR Fisher-100	FT IR Spectrophotometer جهاز الأشعة تحت الحمراء	6
EURO EA (ELEMENTAL ANALYSER)	Elemental Analysis جهاز تحليل العناصر ( C.H.N )	7
Bruker 500 MHz–Avance III	( H-NMR ) C-NMR جهاز الرنين النووي المغناطيسي	8
Japan(SANYO)	Centrifuge جهاز الطرد المركزي	
Dubel beam / D80 Biotech –D80/USA	U.V. visible spectrophotometer جهاز طيف الأشعة فوق البنفسجية	

### 2-2 المواد الكيميائية Chemicals

جدول (2-2) المواد الكيميائية المستعملة ودرجة نقاوتها والشركات المصنعة لها

الشركة المجهزة والمنشأ	النقاوة	اسم المادة	ت
BDH(England)	99.7%	Benzene	1
Sigma chemical(U.S.A)	%99	Thionyl chloride	2
BDH(England)	99.9%	Acetone	3
Gainland (U.K)	99.9%	Ethanol	4
Merck(Germany)	99.5%	pyridine بريدين	5

BDH(England)	37 %	حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric Acid	6
BDH(England)	99%	بيكاربونات الصوديوم NaHCO <sub>3</sub>	7
BDH (England)	99.5%	كلوريد الصوديوم NaCl	8
BDH (England)	99.9%	Sodium Carbonate كاربونات الصوديوم	9
Applichem (Germany)	99.8%	الكلوروفورم Chloroform	10
Sigma-Aldrich(Germany)	99%	Petroleum الإيثر البترولي ether	11
Sigma-Aldrich(Germany)	99.5	Ethyl acetate خلات الأثيل	12
Reidel-Dehean(Germany)	99.8	نتراهايدروفيوران (THF)	13
HiMedia(India)	99%	Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)	14
BDH (England)	98%	Zinc dust مسحوق الزنك	15
B.D.H(England)	99.5%	حامض الخليك الثلجي acetic acid	16
HiMedia(India)	99%	دايوكسان 1,4- Dioxane	17
Sigma-Aldrich(Germany)	99.9%	Sulphanilamide سلفانيل أمايد	18
BDH (England)	99.9%	أورثو-نايتروأنلين	19
BDH (England)	99.9%	4,2 ثنائي كلوروأنلين	20
B.D.H(England)	99.9%	بارا-بروموأنلين	21
Sigma-Aldrich(Germany)	99.9%	DMSO ثنائي مثيل سلفوكسيد	22
Sigma-Aldrich(Germany)	99.5	كاربوكسي مثيل سليولوز CMC	23

## Animals

## 3-2 الحيوانات التجريبية

قد استعمل في هذه الدراسة (63) من الفئران السويسرية البيضاء و(63) جرذاً من كلا الجنسين تم الحصول عليها من البيت الحيواني في كلية العلوم - جامعة الأنبار وتراوحت أعمار هذه الحيوانات بين 5-6 أسابيع. وتراوحت أوزانها بين 25-30 غرام وبمعدل (27±2) غرام. تم حفظ الحيوانات تحت ظروف بيئية مناسبة بدرجة حرارة 20-25 م° في غرفة مكيفة الهواء وفترة الإضاءة 12 ضوء-12 ظلام. وتم وضعها في أقفاص بلاستيكية واستخدم لها كريات غذاء قياسي

وترك لها حرية الوصول للماء والغذاء. وجميع التجارب أجريت وفقاً لأخلاقيات استخدام الحيوانات المختبرية.



شكل (1-2) الحيوانات التجريبية

## Plants

## 4-2 المواد النباتية

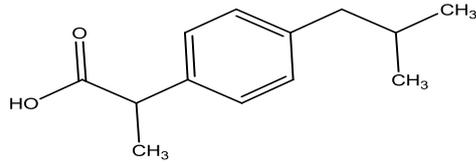
تم الحصول على الملفوف الأحمر (اللهانة) من السوق المحلية أما النعناع تم الحصول عليه من الحدائق المنزلية في مدينة الرمادي.

## 5-2 تحضير المركبات

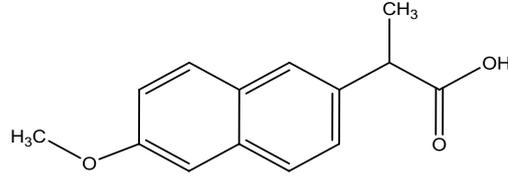
## 1-5-2 مخططات التحضير

تم إجراء التحويلات على أربعة مركبات دوائية حاوية على مجاميع الكاربوكسيل وقد تم الحصول على هذه المركبات من معمل أدوية سامراء بتركيبها القياسية وهي من منتجات شركة Sigma وبنقاوة تزيد على 99.5% وهذه المركبات الدوائية هي :

## 1-الإيبويروفين 2-(4-Isobutyl phenyl) propionic acid

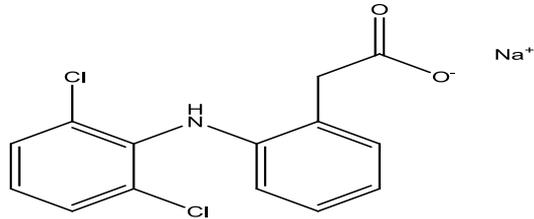


**2- النابروكسين (+)-6-methoxy-α-methyl-2-naphthalene acetic acid**

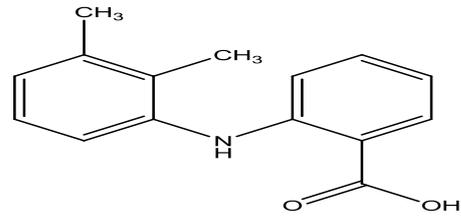


**3- دايكلوفيناك الصوديوم**

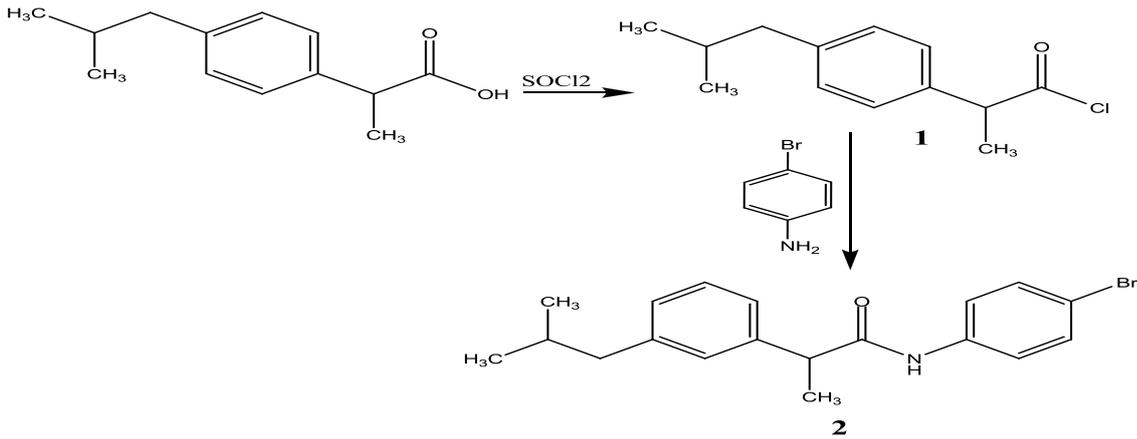
**2-[(2,6dichlorophenyl)amino] benzenecetic acid, monosodium salt**



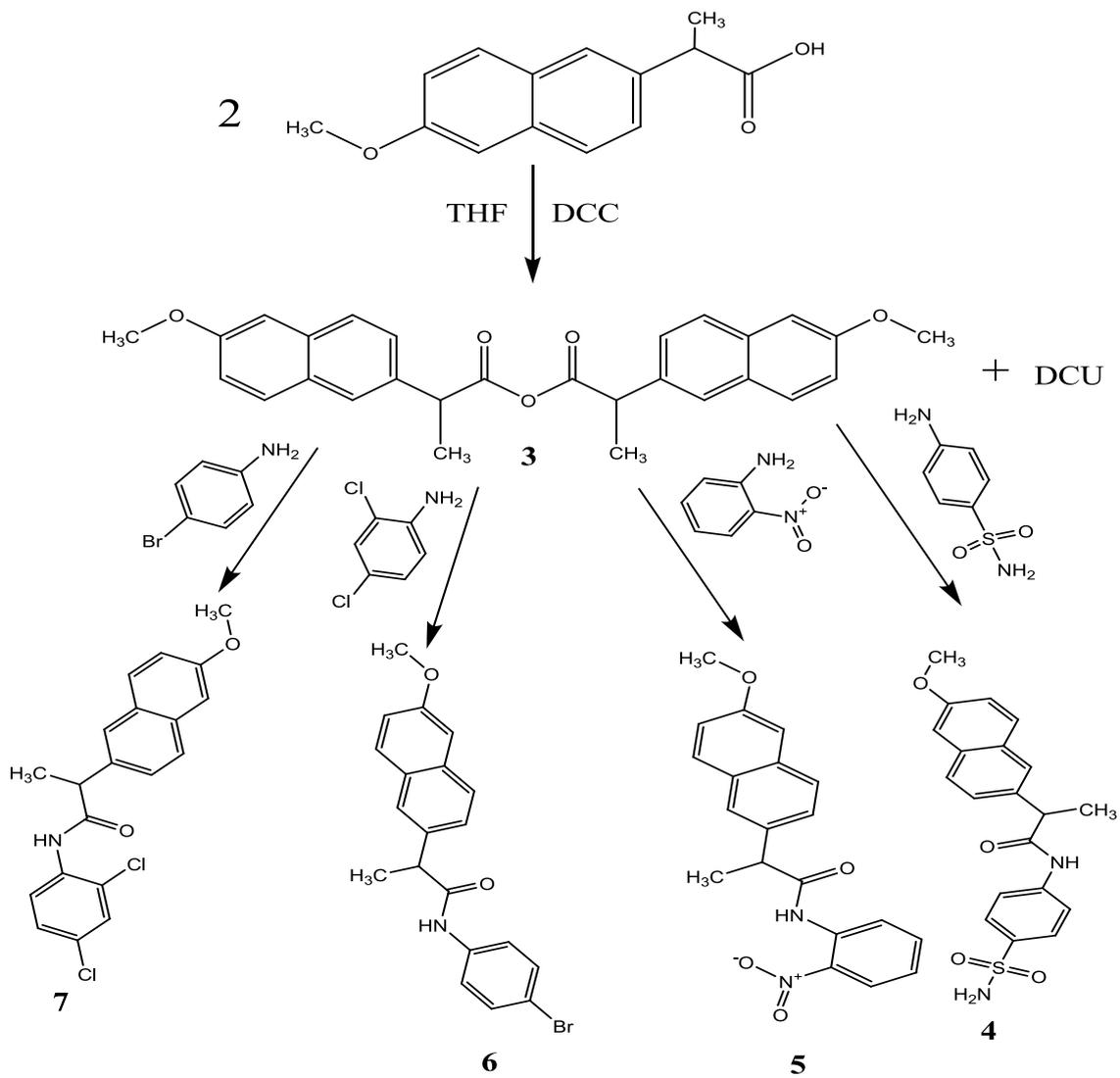
**4-الميفينامك 2-(2,3-dimethylphenyl)aminobenzoic acid**



والمخططات الآتية توضح الأدوية المحورة التي تم تحضيرها



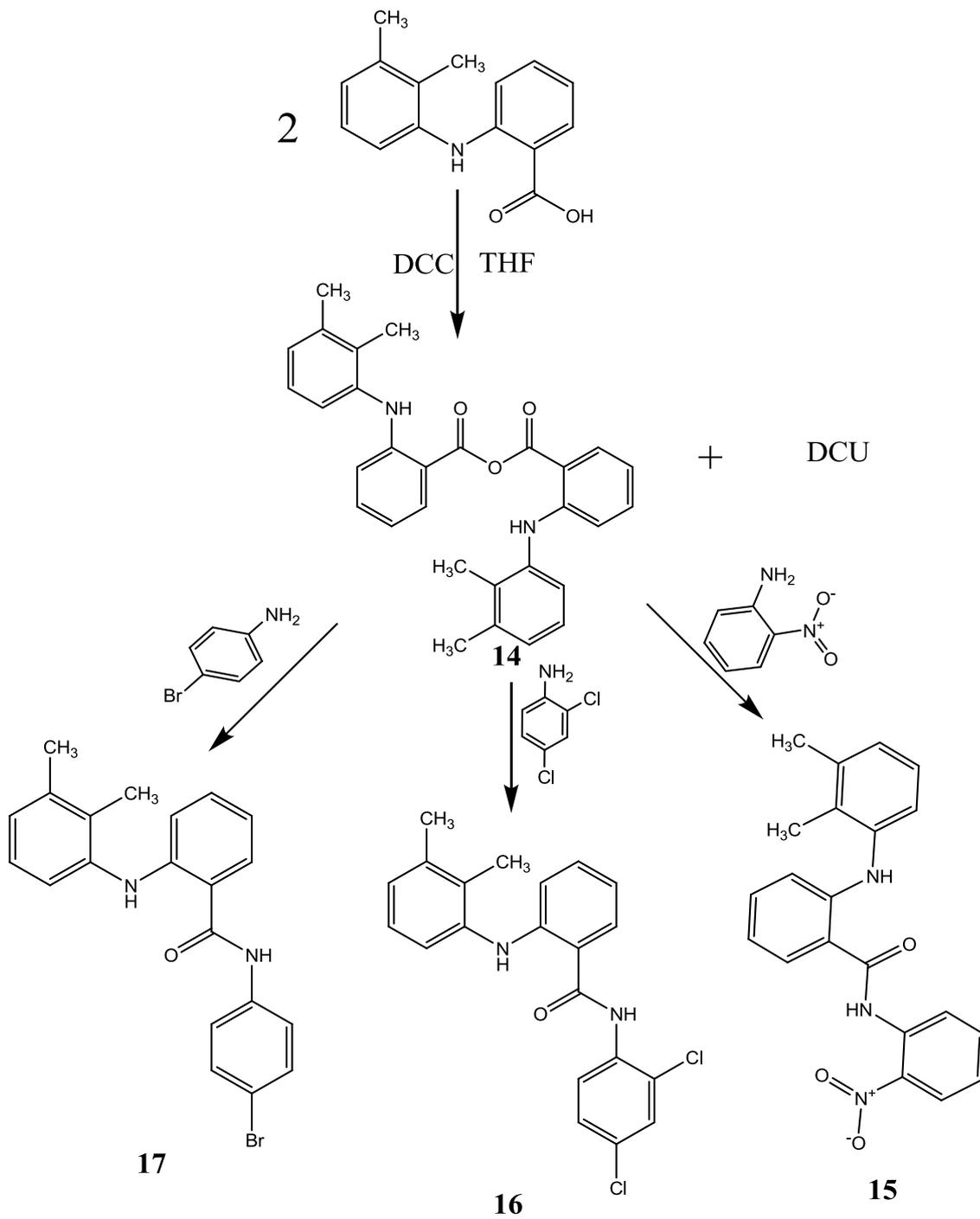
مخطط (1-2) التحوير على الأيبوبروفين



DCU:dicyclohexyl urea

مخطط (2-2) التحويرات على النابروكسين





مخطط (4-2) التحويرات على الميفيناميك

## 2-5-2 طرائق العمل

### 1-2-5-2 تحضير المحاليل

- 1 - تحضير محلول حامض الهيدروكلوريك (1مولاري):حضر بتخفيف (8.3 مل) من حامض الهيدروكلوريك في (100مل) من الماء المقطر .
- 2- تحضير محلول بيكاربونات الصوديوم (5%): حضر بإذابة (5غرام) من بيكاربونات الصوديوم في (100مل) من الماء المقطر .
- 3- تحضير المحلول الملحي: حضر بإذابة (2غرام) من ملح كلوريد الصوديوم في (100مل) من الماء المقطر .

### 2-2-5-2 تحضير كلوريد الأيبوبروفين

#### **2-(4-isobutylphenyl)propanoyl chloride (1)**

وضع (5 غرام) من الأيبوبروفين و(5 مل) من البنزين في دورق دائري مزود بمكثف ثم أضيف إليه بصورة تدريجية (3.5 مل) من كلوريد الثايونيل وترك تحت التصعيد العكسي (reflux) لمدة أربع ساعات. بعدها تم التخلص من المذيب وكلوريد الثايونيل غير المتفاعل بالتبخير للحصول على كلوريد الأيبوبروفين كمادة زيتية ذات لون أصفر شاحب ورائحة مميزة.<sup>(157)</sup>

### 3-2-5-2 تحضير

#### **N-(4-bromophenyl)-2-(3-isobutylphenyl)propanamide (2)**

أبقي المحلول المكون من بارا-بروموأنلين (1.72 غرام) (0.01 مول) والبريديين (2 مل) والأسيتون (25مل) أبقي عند درجة حرارة (-10 °م) ثم تم إضافة محلول من كلوريد الأيبوبروفين (2.25 غرام) (0.01 مول) والأسيتون (25 مل) بصورة بطيئة مع التحريك المستمر واستغرقت الإضافة مدة (45 دقيقة). ترك المزيج تحت التحريك المستمر عند درجة حرارة الغرفة لمدة (10) ساعات ثم سكب الى مسحوق الثلج. رشح الراسب المتكون وترك ليحجف. بعدها أذيب في الكلوروفورم (100 مل) وغسل مع محلول حامض الهيدروكلوريك (1 مولاري) (50 مل) مرتين، ثم غسل مع محلول بيكاربونات الصوديوم 5% (50 مل) مرتين، وبعدها غسل مع محلول ملحي (30 مل) مرة واحدة . جففت الطبقة العضوية من الماء بواسطة كربونات الصوديوم اللامائية ثم ترك الكلوروفورم ليتبخر. وأخيراً أجريت إعادة بلورة للراسب باستخدام (مزيغ من الأيثر البترولي وخلات الأثيل بنسبة 2:1) عند درجة حرارة (60-80°م).<sup>(158)</sup>

**2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic تحضير 4-2-5-2  
anhydride (3)**

أذيب (5غرام) (0.0217 مول) من النابروكسين في (40 مل) من THF ثم أضيف إليه (2.238غرام) (0.0108 مول) من dicyclohexylcarbodiimide (DCC) وترك المزيج تحت التحريك المستمر لمدة أربع ساعات عند درجة حرارة الغرفة. رشح المحلول للتخلص من راسب dicyclohexylurea(DCU) المتكون. ثم أخذ الراشح ووضع في المبخر الدوار عند درجة حرارة (25م°) للتخلص من المذيب والحصول على الناتج.<sup>(159)</sup>

**5-2-5-2 تحضير حامض الدايلوفيناك**

**2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetic acid(8)**

أذيب (5 غرام) من ملح دايلوفيناك الصوديوم في (500 مل) من الماء المقطر ثم حمض المحلول باستخدام حامض الهيدروكلوريك (1مولاري) مكوناً راسب أبيض. رشح الراسب باستخدام قمع بخنر تحت ضغط منخفض وغسل بالماء المقطر وترك ليجف.

**2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetic تحضير 6-2-5-2  
anhydride(9)**

حُضِرَ بطريقة تحضير الأنهيدريد في الفقرة (4-2-5-2) لكن باستخدام (5غرام) (0.0168 مول) من حامض الدايلوفيناك بدلاً من النابروكسين و(1.74غرام) (0.008 مول) من DCC.

**2-(2,3-dimethylphenylamino)benzoic تحضير 7-2-5-2  
anhydride(14)**

حُضِرَ بطريقة تحضير الأنهيدريد في الفقرة (3-2-5-2) لكن باستخدام (5غرام) (0.02 مول) من حامض الميفيناميك بدلاً من النابروكسين و(2.137غرام) (0.01 مول) من DCC.

**8-2-5-2 تحضير الأميدات**

تم تحضير المركب

**2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-N-(4-sulfamoylphenyl) propanamide(4)**

بالطريقة الآتية: وضع في دورق دائري مزود بمكثف (2.655 غرام) (0.006 مول) من أنهيدريد النابروكسين و (2.066 غرام) (0.012 مول) من السلفونيل أمايد *sulphanilamide* و (0.011 غرام) من مسحوق الزنك و (1.1 مل) (0.0192 مول) من حامض الخليك الثلجي و (40 مل) من الدايبوكسان وترك المزيج تحت التصعيد العكسي (reflux) لمدة ساعتين. بُخر المذيب تحت ضغط منخفض وأذيب الراسب المتبقي في (150 مل) من خلات الأثيل. ثم غسل مع (50 مل) من بيكاربونات الصوديوم (10٪) مرتين بعدها غسل مع (50 مل) حامض الهيدروكلوريك بتركيز (1 مولاري) مرتين وبعدها غسل مع الماء المقطر مرتين. جُففت الطبقة العضوية من الماء باستخدام كربونات الصوديوم اللامائية. ثم بخر المذيب باستخدام المبخر الدوار بدرجة حرارة (25°م). بعد تجفيف الراسب أجريت له إعادة بلورة عن طريق إذابته في خلات الأثيل ثم أضيف إليه الأثير البترولي وبخرت كمية من المذيب في المبخر الدوار بدرجة حرارة (60°م) لحين حدوث تعكر في المحلول ثم وضع في حمام ثلجي لمدة ساعة وبعدها رشح المحلول وهو بارد للحصول على الناتج النهائي<sup>(160)</sup>.

وبنفس الطريقة تم تحضير المركبات الأخرى الآتية:

*2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-N-(2-nitrophenyl)propanamide* (5)

*N-(4-bromophenyl)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanamide* (6)

*N-(2,4-dichlorophenyl)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanamide* (7)

*2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)-N-(4-sulfamoylphenyl)acetamide* (10)

*2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)-N-(2-nitrophenyl)acetamide* (11)

*N-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetamid* (12)

*N-(4-bromophenyl)-2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetamide* (13)

*2-(2,3-dimethylphenylamino)-N-(2-nitrophenyl)benzamide* (15)

*N-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2,3-dimethylphenylamino)benzamide* (16)

*N-(4-bromophenyl)-2-(2,3-dimethylphenylamino)benzamide* (17)

كما موضح في الجدول (3-2)

جدول (3-2) يوضح نوع ووزن الأنهيدريدات والأمينات المستخدمة في تحضير الأميدات

المركب	الأنهيدريد المستخدم ورمزه	وزن الأنهيدريد (غرام)	الأمين المستخدم	وزن الأمين (غرام)
7	أنهيدريد النابروكسين (3)	2,655	أورثو-نايتروأنلين	1.657
8	=	=	بارا-بروموأنلين	2.064
9	=	=	4,2-ثنائي كلوروأنلين	1.944
10	أنهيدريد الدايلوفيناك (4)	3,4458	سلفانيل أميد	2.066
11	=	=	أورثو-نايتروأنلين	1.657
12	=	=	4,2-ثنائي كلوروأنلين	1.944
13	=	=	بارا-بروموأنلين	2.064
14	أنهيدريد الميفيناميك (14)	2,7876	أورثو-نايتروأنلين	1.657
15	=	=	4,2-ثنائي كلوروأنلين	1.944
16	=	=	بارا-بروموأنلين	2.064

وبعد تحضير المركبات أجريت لها القياسات الآتية:

- 1- تم قياس درجات إنصهار المركبات المحضرة بواسطة جهاز Stuart melting point-SMT30 .
- 2- تم قياس طيف الأشعة تحت الحمراء للمركبات المحضرة (I.R) باستعمال جهاز الأشعة تحت الحمراء في جامعة الأنبار -كلية التربية للبنات باستعمال أقراص KBr ضمن المدى (4000- 400)  $\text{cm}^{-1}$
- 3- تم قياس أطياف الرنين النووي المغناطيسي ( $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ ) في جامعة الأردن-كلية العلوم -قسم الكيمياء في المملكة الأردنية الهاشمية بواسطة جهاز Bruker 500 MHz-Avance III.
- 4- أجري التحليل الكمي الدقيق للعناصر (C. H . N) في الجامعة المستنصرية باستخدام جهاز .

.EURO EA (ELEMENTAL ANALYSER)

جدول (2-4) يبين خصائص المركبات الوسيطة والمركبات النهائية

نسبة الناتج	اللون	درجة الانصهار (°م)	الوزن الجزيئي (غم/مول)	الصيغة الجزيئية	المركب
60%	أصفر شاحب	زيتي	224.7	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> ClO	1
44%	أبيض	115	360.3	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> BrNO	2
73%	أبيض	100	442.5	C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	3
43%	أبيض	143	384.4	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	4
44%	أصفر	122-125	350.4	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	5
40%	أبيض	134-136	384.3	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> BrNO <sub>2</sub>	6
45%	أبيض	113-115	374.3	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	7
99%	أبيض	283-284	296.1	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	8
65%	أبيض	106-108	574.3	C <sub>28</sub> H <sub>20</sub> C <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	9
43%	أبيض	171	450.3	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	10
47%	أصفر	166	416.3	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	11
44%	أبيض	171-173	440.1	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	12
45%	أبيض	160-162	450.2	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	13
77%	أصفر	142-144	464.6	C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	14
40%	أصفر	206	361.4	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	15
44%	أبيض	216-217	361.4	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	16
42%	أبيض	218-220	395.3	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> BrN <sub>2</sub> O	17

جدول (5-2) التحليل الدقيق للعناصر C.H.N لبعض المركبات المحضرة

Compound	M.Wt gm/mol	Compound formula	Elemental (Calculated %)		
			C Calc Found	H Calc Found	N Calc Found
5	350.4	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	68.56 69.21	5.18 4.88	8.00 7.65
6	384.3	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> BrNO <sub>2</sub>	62.51 63.32	4.72 4.37	3.65 3.19
11	416.3	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> C <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	57.71 58.62	3.63 3.23	10.09 9.58
13	450.2	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	53.36 53.96	3.36 3.16	6.22 5.82
17	395.3	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> BrN <sub>2</sub> O	63.81 64.33	4.84 4.54	7.09 6.87

**9-2-5-2 تحضير المستخلصات**

تم تحضير مستخلص الأنتوسيانين من الملفوف الأحمر واستخلص الزيت العطري من النعناع وكما يأتي:

**1-9-2-5-2 تحضير مستخلص الأنتوسيانين من الملفوف الأحمر**

تم تحضير مذيب من (350 مل) من الإيثانول و(15 مل) من حامض الستريك ثم خفف بالماء المقطر إلى (500 مل) وهرس الملفوف ثم وزن (50 غرام) من الملفوف المهروس في دورق زجاجي وأضيف لها المذيب المحضر. واستغرقت عملية التفتيح 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة، ثم رشحت باستخدام قمع بخنر تحت ضغط مخلخل ثم ركز الراشح إلى درجة الجفاف باستخدام المبخر الدوار تحت ضغط منخفض. ووزن المستخلص الناتج وتم حساب النسبة المئوية للناتج وكذلك تم حساب المحتوى الكلي من الأنتوسيانينات اعتماداً على طريقة الرقم الهيدروجيني التفاضلي حيث أذيت العينة في محلول منظم من كلوريد الصوديوم وحامض الهيدروكلوريك (رقمه الهيدروجيني 1) ومحلول منظم من خلات الصوديوم المائية (CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O) (رقمه الهيدروجيني 4.5) وتم قياس الإمتصاصية عند الطول الموجي 510 نانومتر باستخدام جهاز (UV-Visible). وتم حساب عامل التخفيف للعينة بواسطة إذابتها في المحلول المنظم ذو الرقم الهيدروجيني 1 إلى أن أصبحت الأمتصاصية أقل من 1.2، وبعد ذلك أذيت العينة في المحلول المنظم ذو الرقم الهيدروجيني 1 والمحلول المنظم ذو الرقم الهيدروجيني 4.5 اعتماداً على

عامل التخفيف وبعد ذلك تم حساب الإمتصاصية عند الطول الموجي 510 نانومتر (لـ cyanidin 3-glucoside) وكذلك عند الطول الموجي 700 نانومتر (لمعامل التصحيح). أما الإمتصاصية النهائية فقد حسبت من خلال المعادلة الآتية:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH 4,5}$$

وتم حساب النسبة المئوية للأنتوسيانين من خلال تطبيق المعادلة التالية.<sup>(161)</sup>

$$TAC = \frac{A}{\epsilon \times L} \times MW \times DF \times \frac{V}{Wt} \times 100\%$$

حيث TAC تمثل المحتوى الكلي للأنتوسيانين (ملغ) لكل 100غم من العينة

$\epsilon$  تمثل معامل الإمتصاص المولاري لـ cyanidin 3-glucoside

L تمثل سمك الخلية و MW تمثل الوزن الجزيئي لـ cyanidin 3-glucoside

DF معامل التخفيف , V الحجم الكلي بعد التخفيف، Wt وزن المستخلص

## 2-9-2-5-2 إستخلاص زيت النعناع

تم إستخلاص زيت النعناع بطريقة التقطير بالماء حيث تم وزن (250غرام) من أوراق النبات ووضعت في دورق دائري وأضيف لها (100 مل) من الماء المقطر ووضع الدورق على مسخن كهربائي وربط مكثف بصورة مائلة إلى الدورق الدائري بحيث يسمح بتقطير بخار الماء المحمل بالزيت العطري، وترك تحت التسخين لحين توقف خروج الزيت (تقريباً أربع ساعات) ثم فصل الزيت العطري (أصفر اللون) من الماء بإستعمال قمع الفصل وجفف الزيت بالترشيح فوق كبريتات الصوديوم اللامائية وكانت نسبة الناتج (0.4%).<sup>(162)</sup>

## 6-2 تشييط الأنزيم

تم دراسة التأثير المثبط للمركبات المحضرة من خلال دراسة فعاليتها المضادة للشعور بالألم وفعاليتها المضادة للالتهاب

في كل من إختبار الصفيحة الحارة ونموذج الودمة المستحثة بواسطة زلال البيض تم تقسيم الفئران بشكل عشوائي إلى مجموعات كل مجموعة تتكون من (3) وهي:

المجموعة 1 : كمجموعة سيطرة أعطيت المركب الذي أذيبت فيه المركبات والمستخلصات (0.03 مل DMSO) عن طريق الحقن البريتوني.

المجموعة 2 : أعطيت الأسبرين كمجموعة مقارنة بجرعة (100ملغم/كغم) مذابة في DMSO

المجموعة 3 : أعطيت دايلوفيناك الصوديوم كمجموعة مقارنة بجرعة (3ملغم/كغم) مذابة في DMSO.

وثلاث مجاميع لكل مركب من المركبات المحضرة والمستخلصات كل مجموعة أعطيت جرعة.

كانت جرعة المركبات المشتقة من دايلوفيناك الصوديوم والنابروكسين هي :

الجرعة الأولى تكافئ (1.5ملغم/كغم) من دايلوفيناك الصوديوم.

الجرعة الثانية تكافئ (3ملغم/كغم) من دايلوفيناك الصوديوم

الجرعة الثالثة تكافئ (6ملغم/كغم) من دايلوفيناك الصوديوم

أما جرعة المركبات المشتقة من الميفينامك فقد كانت:

الجرعة الأولى تكافئ ( 3.75ملغم/كغم) من حامض الميفينامك.

الجرعة الثانية تكافئ (7.5ملغم/كغم) من حامض الميفينامك.

الجرعة الثالثة تكافئ (15ملغم/كغم) من حامض الميفينامك.

أما جرعة كل من مستخلص الأنتوسيانين وزيت النعناع فقد كانت (1000ملغم/كغم)،

(500ملغم/كغم)، (250ملغم/كغم).

## **2-6-1 تقييم التأثير المسكن للمركبات المحضرة والمستخلصات**

تم تقييم التأثير المسكن للمركبات المحضرة والمستخلصات وذلك بإستعمال إختبار الصفيحة

الحارة باستخدام طريقة (Woolfe and Mc Donald (1994)<sup>(163)</sup> . حيث وضعت الفئران

على صفيحة حارة محاطة بحاجز وتم قياس زمن وصول الفئران الى لعق القدم والقفز . ولتجنب

تلف الأنسجة تم تحديد (30 ثانية) كوقت إيقاف ("cut-off" time)<sup>(164)</sup> . بعد نصف ساعة وبعد

ساعة ونصف من حقن الأدوية وفقاً للجرع المحددة تم وضع كل حيوان في جميع المجموعات على

الصفيحة الساخنة حيث أقيمت درجة حرارة الصفيحة (55±1°م) . تنتج هذه الدرجة الثابتة نوعين من

العناصر السلوكية لدى الفئران التي يمكن قياسها إعتياداً على وقت حدوث رد الفعل وهي لعق

وتحريك القدم والقفز<sup>(165)</sup> . وتم إجراء الاختبار لمجموعة من الفئران قبل حقنها بالمركبات.

## **2-6-2 تقييم التأثير المضاد للالتهاب للمركبات المحضرة والمستخلصات**

تم تقييم الفعالية المضادة للالتهاب للمركبات والمستخلصات بإستخدام نموذج الوذمة المستحثة

بواسطة زلال البيض (الألبومين)<sup>(166)</sup> ونموذج الوذمة المستحثة بواسطة الكاراجينان

## 1-2-6-2 نموذج الوزمة المستحثة بواسطة زلال البيض (الألبومين)

وتم إعطاء المركبات والمستخلصات و المذيب المستخدم عن طريق الحقن البريتوني عند الزمن صفر وتم إستحداث الالتهاب عن طريق حقن (0.03 مل) من زلال البيض غير المخفف تحت الجلد في أسفل يد الفئران بعد نصف ساعة من إعطاء المركبات وتم قياس سمك المخلب بواسطة (vernier) عند الزمن (30، 90، 150 دقيقة) من إعطاء الأدوية . وتم حساب النسبة المئوية لتثبيط سمك الوزمة عند كل فاصل زمني والتي يمكن حسابها من متوسط التأثير في حيوانات السيطرة والمعاملة عن طريق المعادلة التالية:  $\% \text{ inhibition} = 100 [(V_c - V_t) / V_c]$  حيث  $V_c$  تمثل متوسط سمك المخلب في مجموعة السيطرة و  $V_t$  تمثل متوسط سمك المخلب في المجموعة المعاملة.<sup>(167)</sup>

## 2-2-6-2 نموذج الوزمة المستحثة بواسطة الكاراجينان

تم تقسيم (63) جرذاً بشكل عشوائي إلى (21) مجموعة وكل مجموعة تتكون من (3) جرذان مجموعتي سيطرة أعطيت المذيب CMC بتركيز 0.5% وخمسة مجاميع مقارنة أعطيت السلوكوكسيب، الأيبوبروفين (25 ملغم/كغم)، النابروكسين (7 ملغم/كغم)، دايلوفيناك الصوديوم (7.5 ملغم/كغم)، الميفيناميك (10 ملغم/كغم) كمجاميع مقارنة أما المجاميع المتبقية فقد أعطيت المركبات المحضرة والمستخلصات كل على حدة . وكانت الجرعة المستخدمة كالآتي: المركب 2 بجرعة تكافيه (25 ملغم/كغم) من الأيبوبروفين، والمركبات (7,6,5,4) بجرعة تكافيه (7 ملغم/كغم) والمركبات (13,12,11,10) بجرعة تكافيه (7.5 ملغم/كغم) من دايلوفيناك الصوديوم والمركبات (17,16,15) بجرعة تكافيه (10 ملغم/كغم) والمستخلصات بجرعة 500 ملغم/كغم، وتم إستحداث الالتهاب بعد ساعة من حقن الأدوية عن طريق حقن (0.1) مل من الكاراجينان بنسبة (1%) (وزن احجم) في محلول (0.9%) من كلوريد الصوديوم saline تحت الجلد في أسفل يد جرذان إحدى مجموعتي السيطرة والمجاميع التي حقنت بالأدوية والمركبات والمستخلصات. واستخدمت مجموعة السيطرة التي حقنت بالكاراجينان كمجموعة سيطرة موجبة. وبعد ساعة من حقن الكاراجينان تم تخدير الحيوانات باستخدام الأيثر ثم شرحت لكشف القلب وجمعت عينات الدم من كل حيوان على حدة بواسطة ثقب في القلب ووضع مباشرة في أنابيب إختبار تحتوي على EDTA. ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000rpm لمدة 15 دقيقة للحصول على البلازما. وتحفظ لحين وقت القياس بدرجة حرارة 4°C ويقاس تركيز PGE<sub>2</sub> بطريقة ELISA<sup>(168)</sup>.

## 7-2 إختبار قرحة المعدة

استخدمت الفئران في هذا الإختبار منعت الحيوانات من الطعام لمدة أربع وعشرون ساعة ثم حقنت بالمركبات المحضرة بجرعة تكافئ  $30\text{mg}\backslash\text{Kg}$  والمستخلصات بجرعة  $1000\text{ mg}\backslash\text{kg}$  وبعد 5 ساعات تم تخدير الحيوانات وشرحت للحصول على المعدة ثم أجري التحليل لنسيج المعدة وفحص النسيج باستخدام المجهر الضوئي<sup>(169)</sup>.

## 8-2 التحليل الإحصائي

لقد تم تحليل النتائج إحصائياً بإستخدام برنامج Microsoft Excel 2007 بطريقة تحليل المتغيرات ANOVA واعتبرت الفروقات معنوية التأثير عند مستوى إحتتمالية أقل من 0.01 ( $P<0.01$ )

## 9-2 طريقة التحليل النظري بإستخدام الإلتحام الجزيئي

لقد تم تحميل الهيكل البلوري ثلاثي الأبعاد لأنزيم COX-1 (رمز 1Q4G:PDB) وأنزيم COX-2 (رمز 1CX2:PDB) من بنك معلومات البروتين (PDB) Protein data bank على الأنترنت وتم بناء الهيكل ثنائي الأبعاد للمركبات بإستخدام برنامج Ultra 11.0 ChemBioDraw وبعد ذلك استخدم برنامج MOE 2009.10 لإجراء الإلتحام الجزيئي حيث تمت إضافة جزيئات الهيدروجين إلى الهيكل البلوري ثم تمت إزالة جزيئات الماء والجزيئات الأخرى الموجودة ضمن تركيب الأنزيم وهي جزيئة الهيم وعدد من السكريات وتمت إزالة إحدى وحدتي الأنزيم للإبقاء على الموقع الفعال فقط ثم أجريت إعادة الإلتحام لكل أنزيم مع المركب الموجود ضمن التركيب البلوري له ثم أجري الإلتحام الجزيئي للمركبات.

# الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

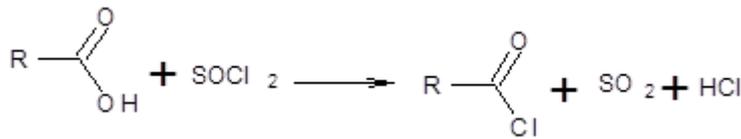
## النتائج والمناقشة

### Results and Discussion

تكتسب أنزيمات الأكسدة الحلقية أهمية خاصة في المجال الصيدلاني والدوائي. حيث تمتلك أهمية وظيفية في الجهاز الهضمي والكلية ولها أدوار مرضية مثل الالتهابات بأنواعها<sup>(4,3)</sup>. وتعمل أدوية مضادات الالتهاب غير الستيرويدية من خلال تثبيط كل من COX-1 و COX-2 وعلى الرغم من كفاءتها في معالجة الأمراض وتخفيف الأعراض، إلا أنها في الوقت نفسه تعاني من الكثير من التأثيرات الجانبية الضارة<sup>(5)</sup>. وعليه فقد إنصبت الدراسات والبحوث على تطوير وتحويل هذه الأدوية بطريقة تحجب هذه الأعراض الجانبية وتزيد من كفاءة هذه الأدوية. وتشارك معظم هذه الأدوية باحتوائها على مجموعة الكربوكسيل والتي إليها تعزى معظم التأثيرات الجانبية. وعلى هذا الأساس تم إجراء تحويلات على بعض الأدوية الحاوية على مجموعة الكربوكسيل من خلال إستبدالها بالأصرة الأمايدية لتحويلها إلى مثبطات إنتقائية لـ COX-2 وكما موضح في المخططات (1-2)، (2-2)، (3-2)، (4-2). ودراسة كفاءتها كمثبطات لهذا الأنزيم

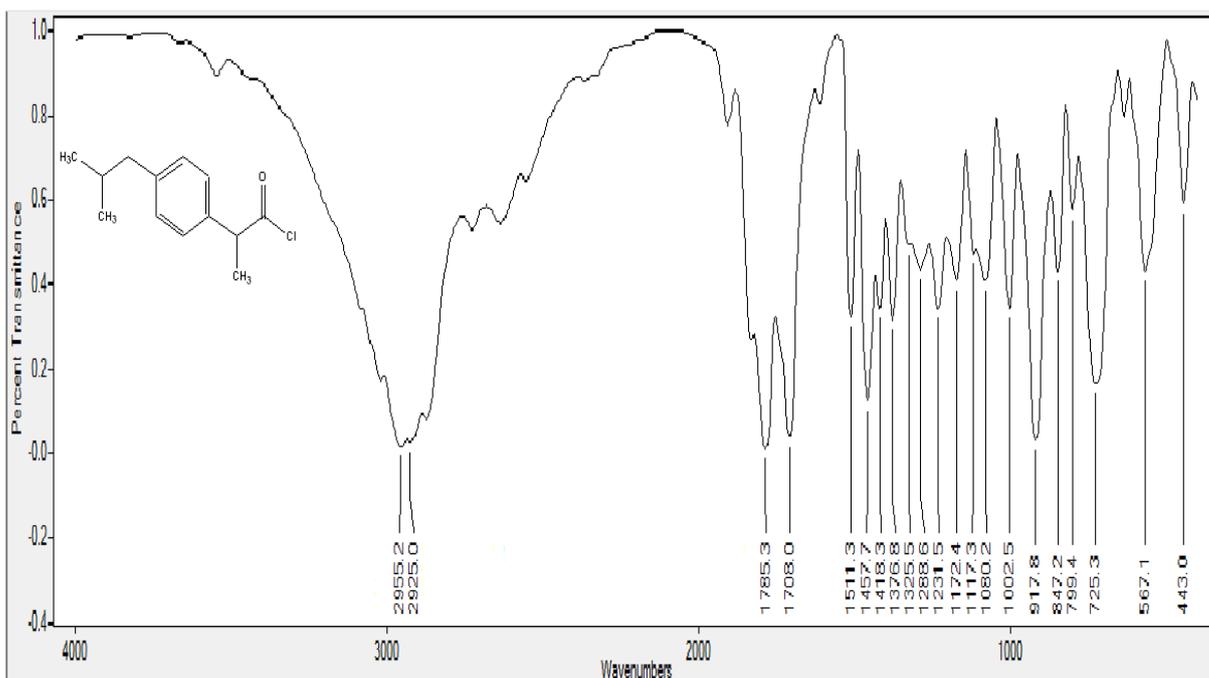
### 1-3 تحضير كلوريد الأيبوبروفين (1)

تُعدُّ كلوريدات الأحماض ذات أهمية كبيرة في التخليق العضوي ويتم تكونها نتيجة إستبدال مجموعة الهيدروكسيل في الحامض الكربوكسيلي بمجموعة الهالوجين والأكثر شيوعاً هي الكلور. وأهم عوامل الكلورة المستخدمة هو كلوريد الثايونيل  $\text{SOCl}_2$  حيث تحضر معظم كلوريدات الأحماض بمعاملة الحامض الكربوكسيلي مع كلوريد الثايونيل ويفضل هذا العامل، لأن النواتج العرضية ( $\text{SO}_2, \text{HCl}$ ) للتفاعل لا تؤدي إلى تلويث الناتج وكذلك لسهولة التخلص من الزيادة بالتقطير الإعتيادي لكلوريد الثايونيل<sup>(170)</sup>.



وقد تم تشخيص كلوريد الأيبوبروفين بإستخدام الثوابت الفيزيائية بالإضافة إلى طيف الأشعة تحت الحمراء. حيث أعطت أطياف الأشعة تحت الحمراء حزمة حادة عند  $1785 \text{ cm}^{-1}$  العائدة إلى الاهتزاز الإمتطاطي لمجموعة كربونيل الكلوريد حيث ظهرت حزمة الكربونيل عند ترددات عالية

في نهاية مدى مجموعة الكربونيل حيث تقوم ذرة الكلور بسحب الكثافة الإلكترونية من ذرة الكربون وبذلك تظهر الكربونيل أكثر حدة وأعلى تردداً فضلاً عن أن التعاقب مع مجموعة الأريل المشبعة يقلل من تردد الكربونيل ويزيحه إلى ترددات أقل. كما اظهرت أطياف الأشعة تحت الحمراء حزمة عند  $725\text{cm}^{-1}$  تعود إلى الإهتزاز الأمتطاطي لمجموعة C-Cl لكلوريد الحامض والشكل (3-1) يوضح طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب (1)

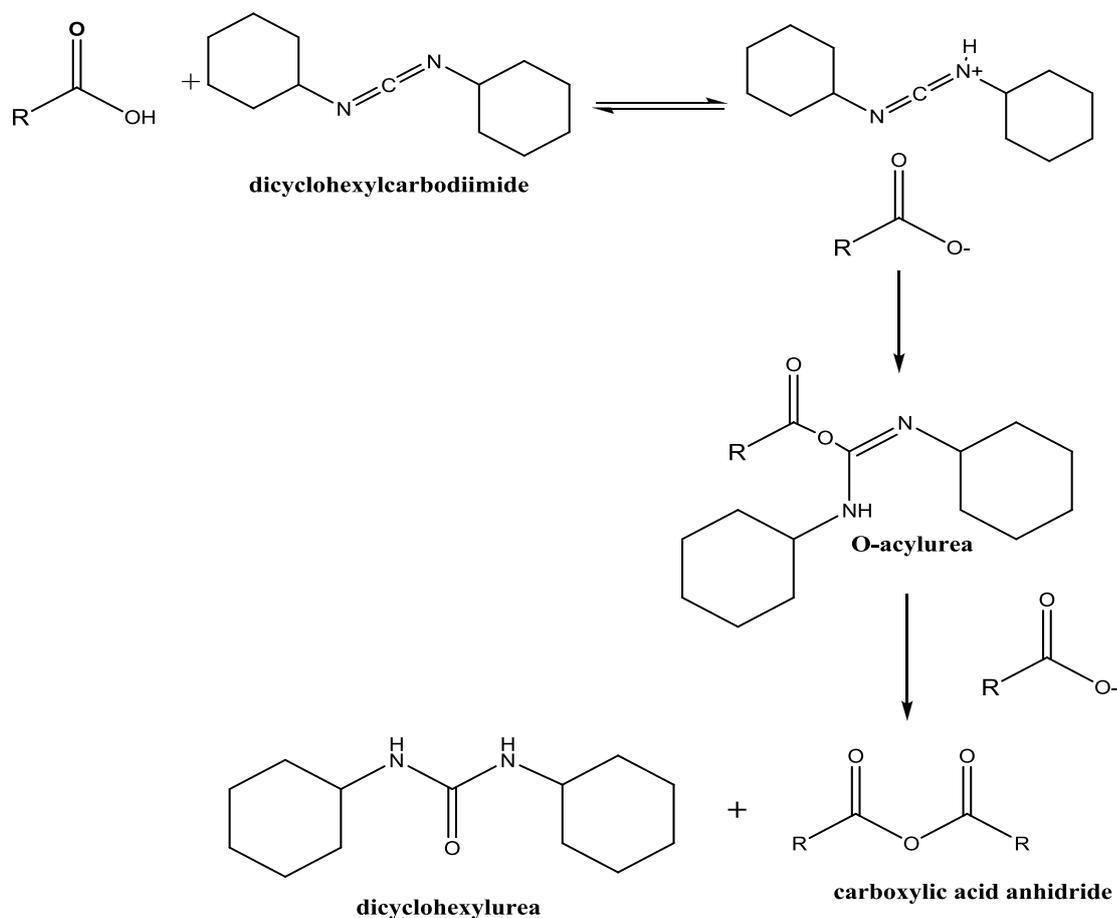


شكل (3-1) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب (1)

### 2-3 تحضير الأنهيدريدات (14,9,3)

يتم تحضير الأميدات من تفاعل الحوامض الكربوكسيلية مع الأمينات إلا إن التفاعل بين المجاميع الوظيفية وحذف جزيئة ماء لا يحدث بشكل تلقائي في درجات الحرارة الاعتيادية، ويتطلب درجات حرارة عالية جداً، وظروف تؤثر على سلامة المواد لهذا السبب من الضروري في البداية تنشيط الحوامض الكربوكسيلية عن طريق تحويل مجموعة الهيدروكسيل إلى مجموعة مغادرة جيدة قبل معاملتها مع الأمين بإستعمال عدد من كواشف الاقتران وفي هذا البحث تم تنشيط الحوامض الكربوكسيلية عن طريق تحويلها إلى أنهيدريدات باستخدام الكاشف dicyclohexylcarbodiimide (DCC) والمخطط (3-1) يوضح ميكانيكية الازدواج حيث في الخطوة الأولى يتفاعل الحامض الكاربوكسيلي مع DCC ليكون المركب الوسطي O-

acylurea الذي يكون أنهيدريد الحامض الكربوكسيلي، و dicyclohexylurea(DCU) الذي يكون غير ذائب في مذيب التفاعل ويزال بسهولة عن طريق الترشيح<sup>(171)</sup>.



شكل (2-3) ميكانيكية تحضير الأنهيدريد

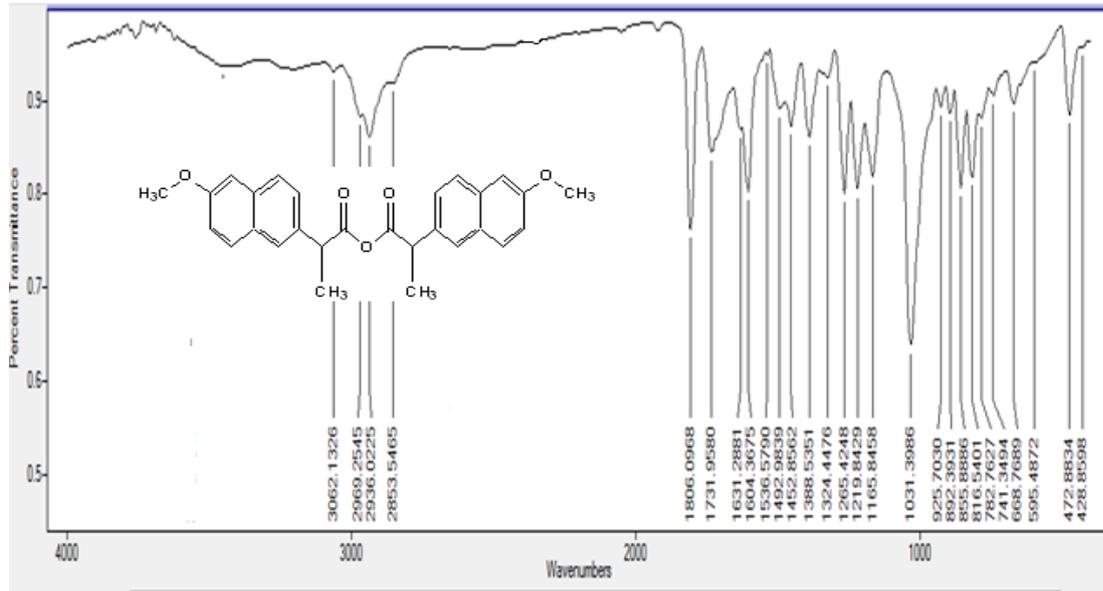
وقد تم تشخيص الأنهيدريدات المحضرة طيفياً باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء حيث أظهرت أطيف الأشعة تحت الحمراء اختفاء حزمة الأهتزاز الأمتطاطي لمجموعة الهيدروكسيل، ووجود حزمتين تعود الى مجموعة الكربونيل في الأنهيدريد تعود الأولى إلى الأهتزاز الأمتطاطي المتناظر لمجموعة الكربونيل وكانت في المواقع  $cm^{-1}$  (1820،1807،1806)، والثانية تعود إلى الاهتزاز الإمتطاطي غير المتناظر لمجموعة الكربونيل وكانت في المواقع  $cm^{-1}$  (1731,1727,1720) كما مبين في الجدول الآتي

جدول (1-3) : أهم ترددات الأشعة تحت الحمراء للمركبات 14,9,3

compound	IR $\nu$ $cm^{-1}$ (KBr)
----------	--------------------------

	C=O(band 1)	C=O(band 2)	C-O
3	1806	1731	1165, 1265, 1219
9	1807	1727	1.394, 1.265, 1.176
14	1820	1720	1.327, 1.228, 1.178

والشكل (2-3) يوضح طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب (3)

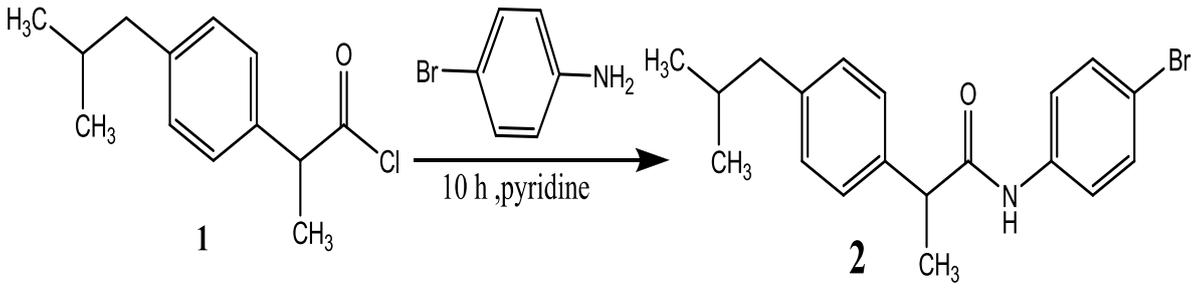


شكل (3-3) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 3

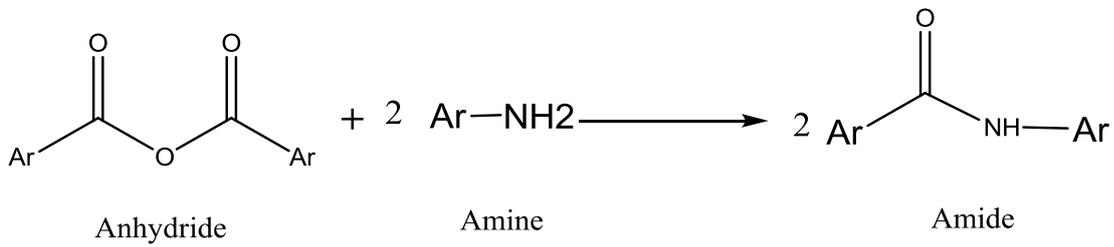
### 3-3 تحضير الأميدات

بعد أن تم تنشيط الحوامض الكاربوكسيلية عن طريق تحويل الأيبوبروفين إلى كلوريد الحامض

تمت مفاعله مع الأمين (بارا برومو أنلين) وتكون الأميد 2 كما في المعادلة الآتية:

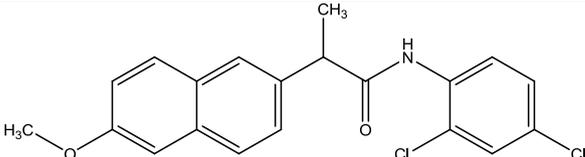
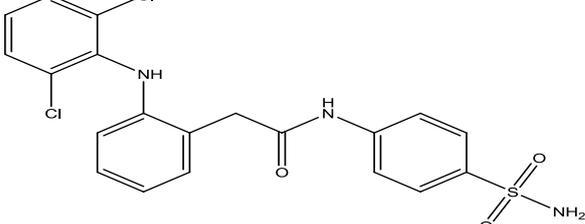
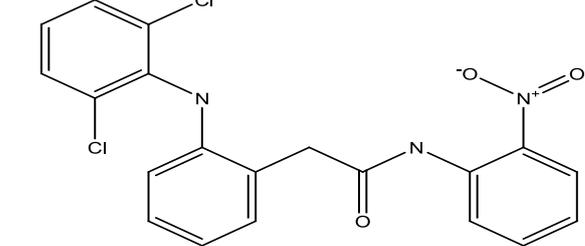
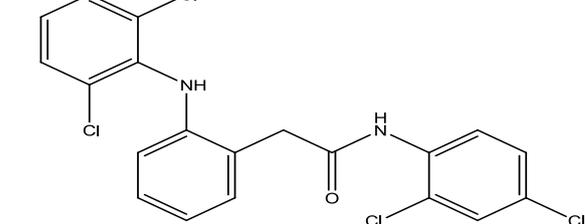
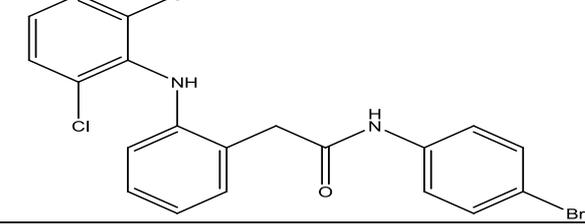
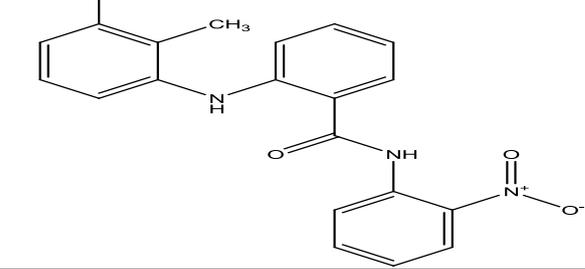
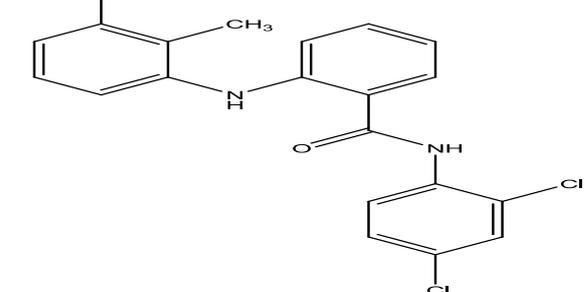


أما الأميدات المتبقية تم تحضيرها بعد تحويل الحامض الكاربوكسيلي إلى أنهيدريد عن طريق مفاعلة الأنهيدريد مع الأمين كما في المعادلة الآتية:

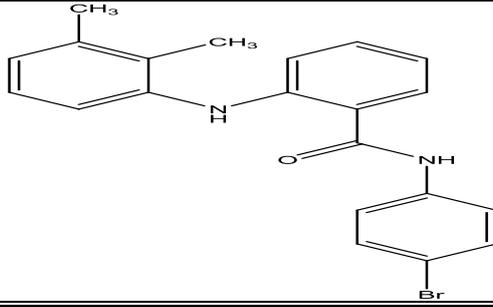


### جدول (2-3) الصيغة البنائية والتسمية العلمية للمركبات المحضرة

رقم المركب	التركيب البنائي	الاسم العلمي
2		N-(4-bromophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide
4		2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-N-(4-sulfamoylphenyl)propanamide
5		2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-N-(2-nitrophenyl)propanamide
6		N-(4-bromophenyl)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanamide

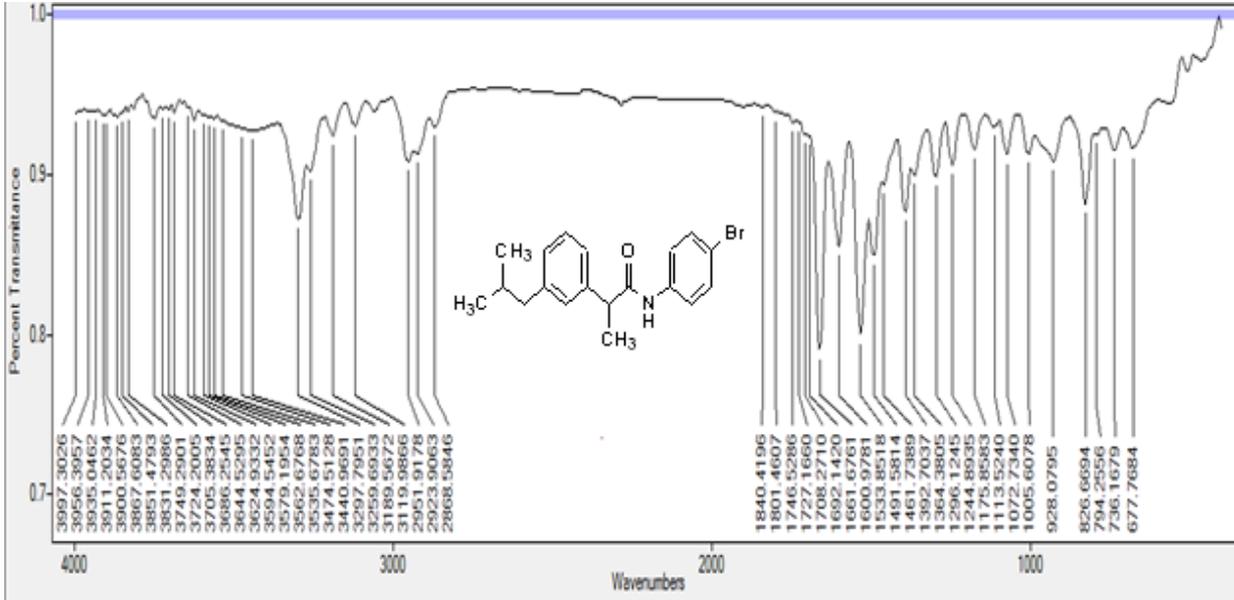
7		N-(2,4-dichlorophenyl)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) propanamide
10		2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)-N-(4-sulfamoylphenyl)acetamide
11		2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)-N-(2-nitrophenyl)acetamide
12		N-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetamide
13		N-(4-bromophenyl)-2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetamide
15		2-(2,3-dimethylphenylamino)-N-(2-nitrophenyl)benzamide
16		N-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2,3-dimethylphenylamino)benzamide

17

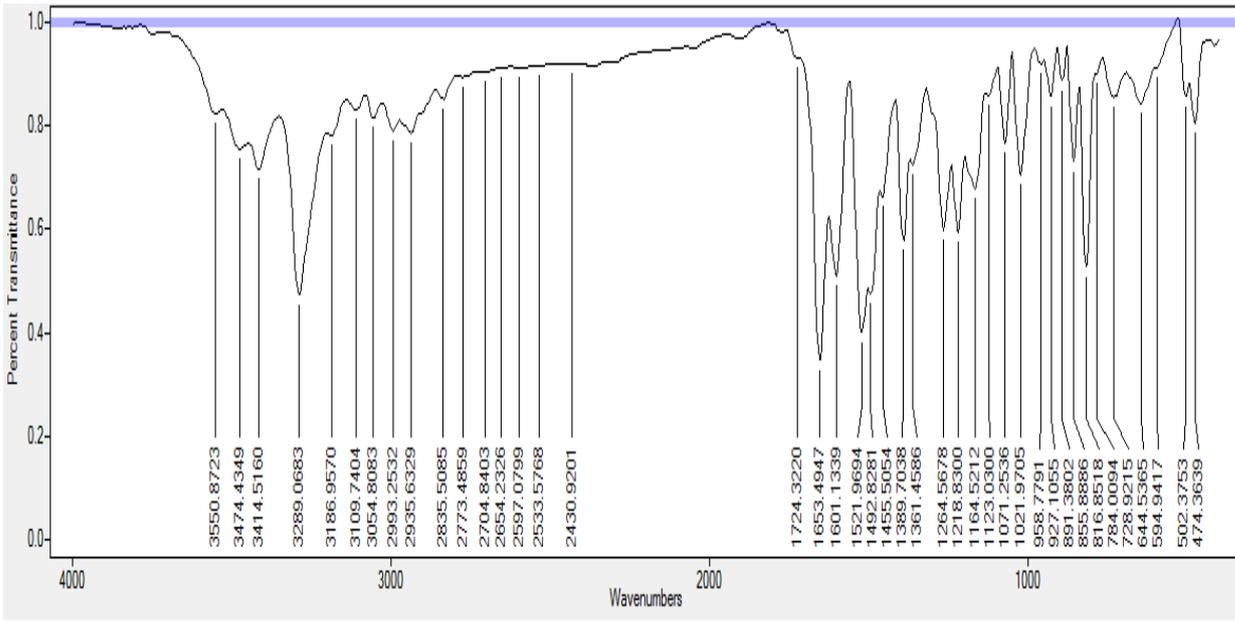


N-(4-bromophenyl)-2-(2,3-dimethylphenyl)benzamide

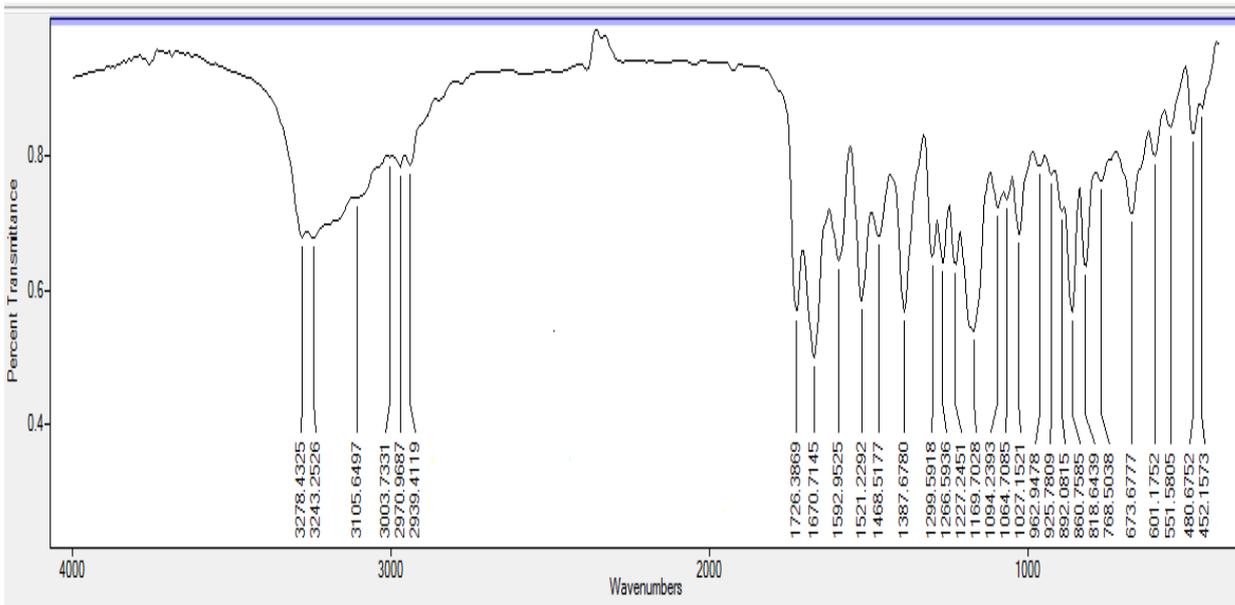
وتم تشخيص المركبات طيفياً باستعمال طيف الأشعة تحت الحمراء IR وطيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H-NMR}$  و  $^{13}\text{C-NMR}$ ، حيث أظهر طيف الأشعة تحت الحمراء حزماً عند  $(1698,1694,1692,1690,1686,1676,1670,1661,1654,1653,1652,1650)\text{cm}^{-1}$  العائدة إلى الأمتزاز الأمتطاطي لمجموعة الكربونيل الأמידية حيث ظهرت في ترددات واطئة، ويعزى ذلك إلى وجود ظاهرة الرنين في حالة الأמיד التي تعمل على تقليل صفة الآصرة المزدوجة فيقل ثابت قوة الآصرة وينخفض ترددها<sup>(172)</sup>. في حين ظهرت حزم الأمتزاز الأمتطاطي لـ N-H للأמידات الثانوية عند الترددات  $(3278,3276,3272,3323,3311,3322,3320,3318,3324,3312,3297,3289)\text{cm}^{-1}$



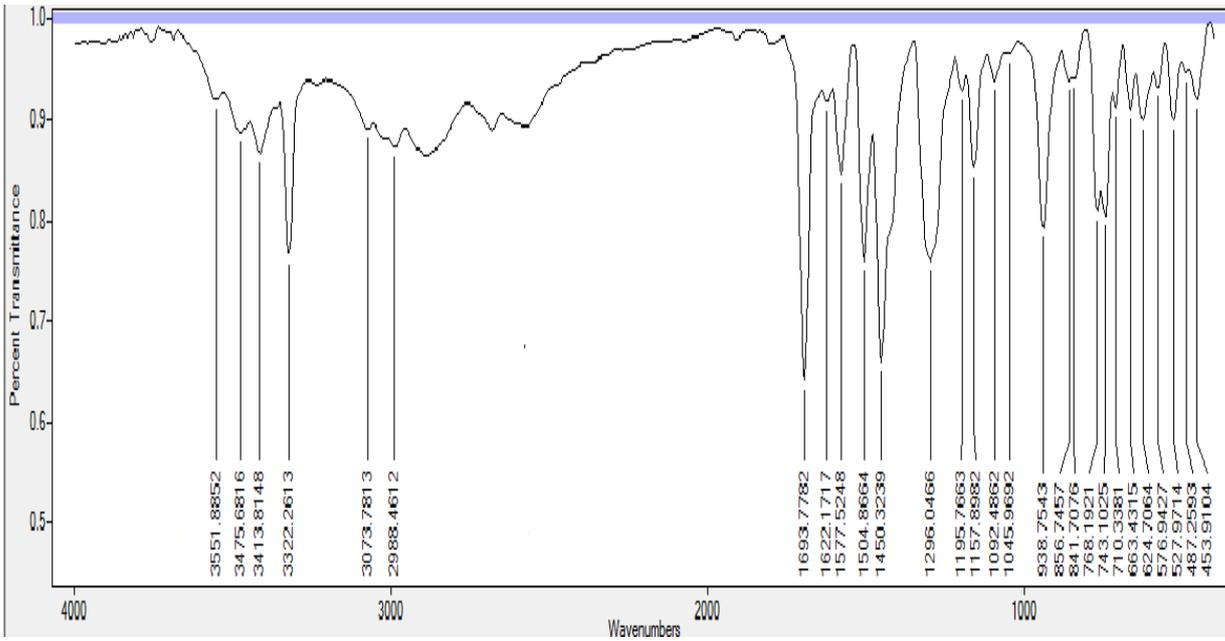
شكل (4-3) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 2



شكل (5-3) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 4

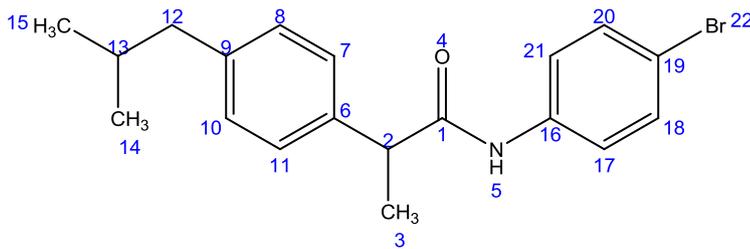


شكل (6-3) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 7



شكل (7-3) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب 10

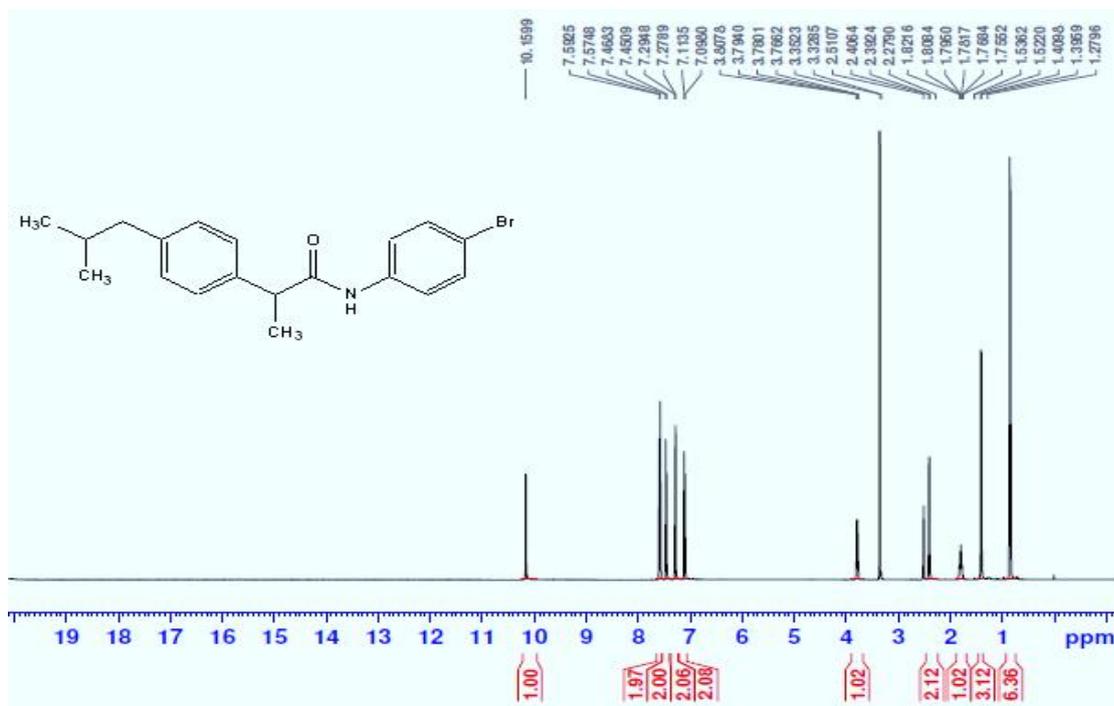
أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H NMR}$  بالنسبة للمركب 2 فقد كانت الإشارات كالتالي:



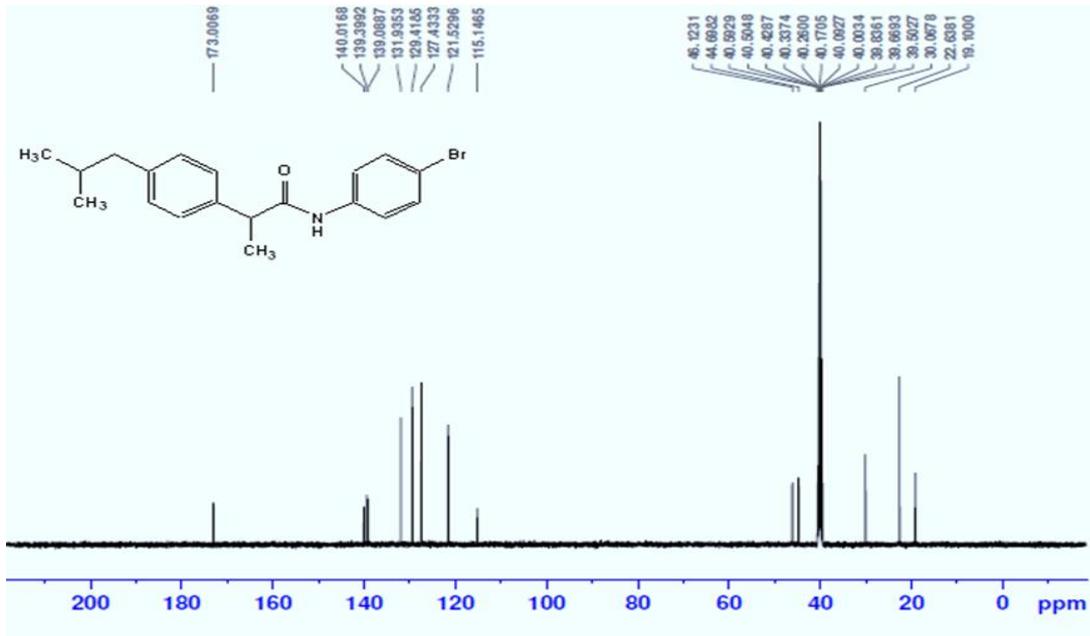
إشارة مزدوجة doublet عند ( $\delta=0.8$  ppm) تعود إلى البروتونات الستة المرتبطة بذرات الكربون 14 و 15 وإشارة مزدوجة doublet عند ( $\delta =1.4$  ppm) تعود إلى البروتونات الثلاث المرتبطة بذرة الكربون 3. إشارة متعددة multiplate عند ( $\delta =1.8$  ppm) تعود إلى البروتون الأليفاتي المرتبط بذرة الكربون 13. إشارة مزدوجة doublet عند ( $\delta =2.4$  ppm) تعود إلى البروتونات المرتبطة بذرة الكربون الأليفاتية 12. إشارة رباعية quartet عند ( $\delta =3.8$  ppm) تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون 2. وظهرت إشارات مزدوجة عند ( $\delta =7.1$  ppm) و ( $\delta =7.2$ )

(ppm) ( $\delta = 7.4$  ppm) ( $\delta = 7.5$  ppm) تعود إلى بروتونات الحلقتين الأروماتية. أما بروتون N-H فقد ظهر كإشارة منفردة singlet عند ( $\delta = 10$  ppm). أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب 2 فقد أظهر الإشارات الآتية :

إشارة واحدة عند ( $\delta = 173$  ppm) تعود إلى كاربون مجموعة الكربونيل C=O. إشارة عند 18 ppm تعود إلى ذرة الكربون 3، إشارة عند 22 ppm تعود إلى ذرتي الكربون 14,15 وإشارة عند 30 ppm تعود إلى ذرة الكربون الأليفاتية (CH) 13، كما ظهرت إشارة عند 40 ppm تعود على ذرة الكاربون 2، وظهرت إشارة عند 44 ppm تعود إلى ذرة الكاربون 12، كما ظهرت إشارة عند 115 ppm تعود إلى ذرات الكربون 17,21 الأروماتية وإشارة أخرى عند 127 ppm تعود إلى ذرة الكربون الأروماتية 19. وإشارة أخرى عند 129 ppm تعود إلى ذرات الكربون الأروماتية 11,7. وإشارة أخرى عند 132 ppm تعود إلى ذرات الكربون الأروماتية 8,10. أما ذرات الكربون الأروماتية 6,16 فقد ظهرت إشاراتها عند 139 ppm. وإشارة أخرى عند 140 ppm تعود إلى ذرة الكربون الأروماتية 9.

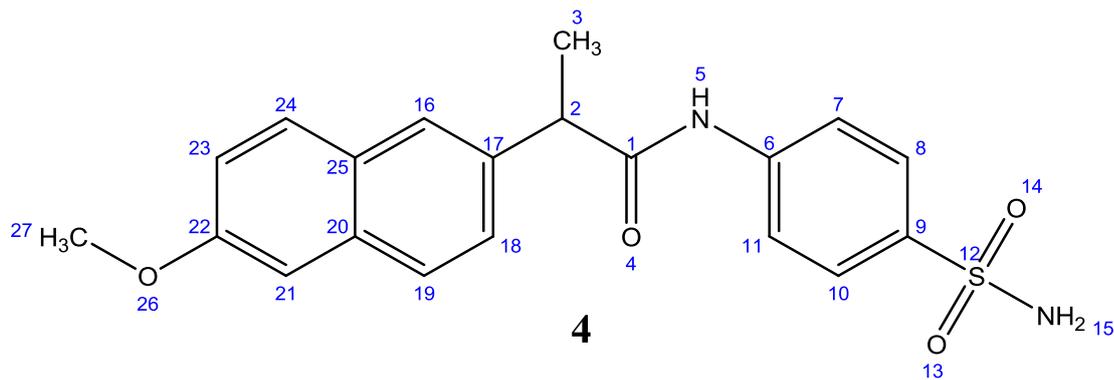


شكل (3-8) : طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب 2



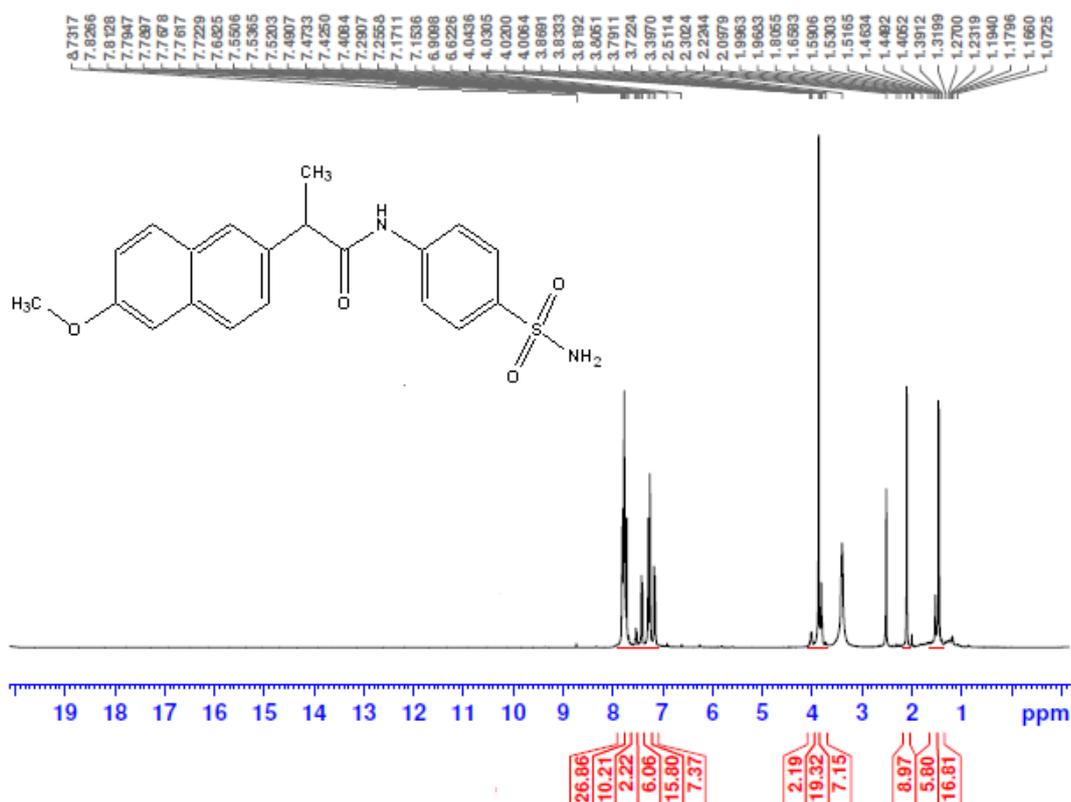
شكل (3-9) : طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب 2

أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR بالنسبة للمركب 4 فقد كانت الإشارات كالتالي:

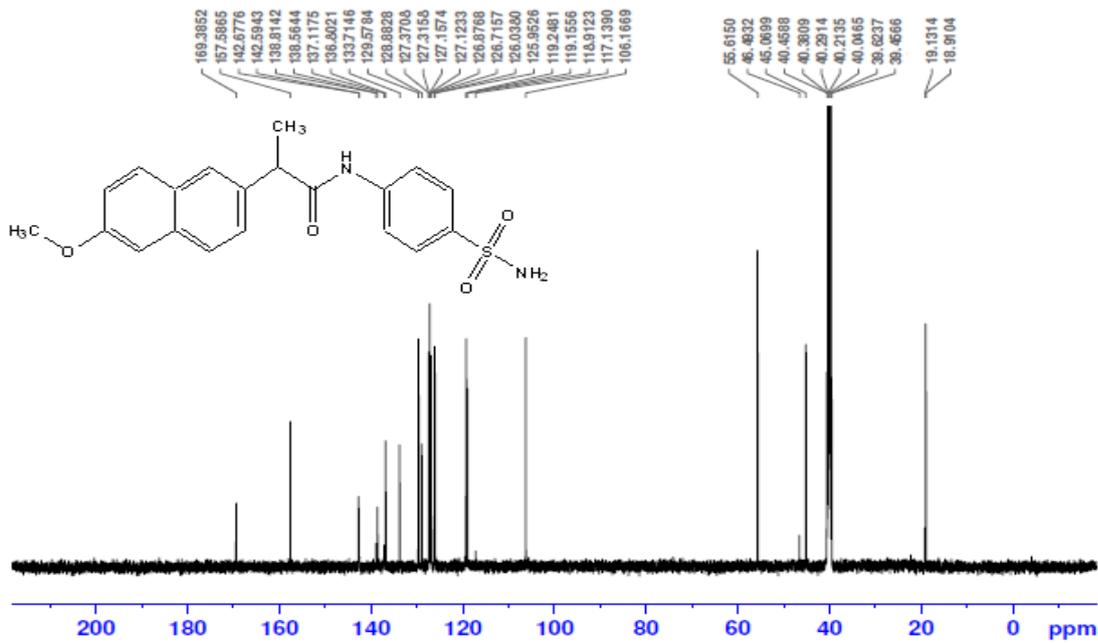


إشارة رباعية quartet عند 3.7 ppm تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون رقم 2 وإشارة منفردة singlet عند 3.8 تعود إلى البروتونات المرتبطة بذرة الكربون رقم 27. وإشارة مزدوجة doublet عند 1.3 تعود إلى البروتونات المرتبطة بذرة الكربون رقم 3. وإشارة منفردة عريضة عند (2.2 ppm) تعود إلى بروتوني ذرة النايتروجين رقم 15 في حين ظهرت إشارة بروتون NH عند 7.7 ppm. أما بروتونات الحلقات الأروماتية فقد ظهرت عند المدى

(7.1-7.9 ppm). والشكل رقم (3-10) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب 4. أما الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$ NMR للمركب 4 فقد أظهر الإشارات الآتية: ظهرت إشارة واحدة لمجموعة كاربونيل الأمايد عند 169.3ppm تعود إلى مجموعة الكاربونيل. بينما ظهرت ثلاث إشارات لذرات الكاربون الأليفاتية الثلاث عند 19,40,55ppm ذات الأرقام (27,2,3) على التوالي. بينما ظهرت إشارة مميزة عند 157 ppm تعود إلى ذرة الكاربون (22). أما ذرات كاربون حلقتي النفثالين وباقي ذرات الحلقة الأروماتية فقد ظهرت إشارات في المدى (106-142 ppm). والشكل (3-11) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (4)

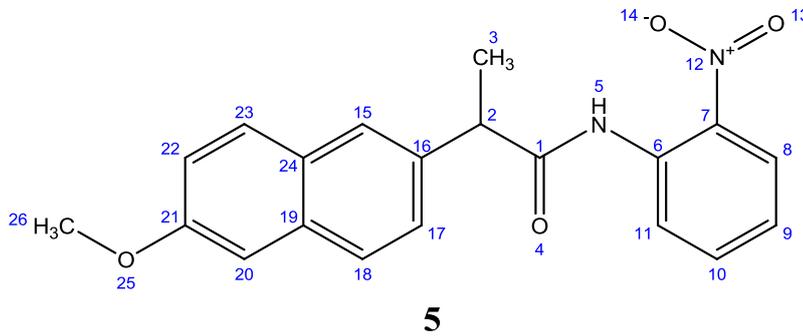


شكل (3-10) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب 4



شكل (3-11) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (4)

أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR بالنسبة للمركب 5 فقد كانت الإشارات كالتالي:

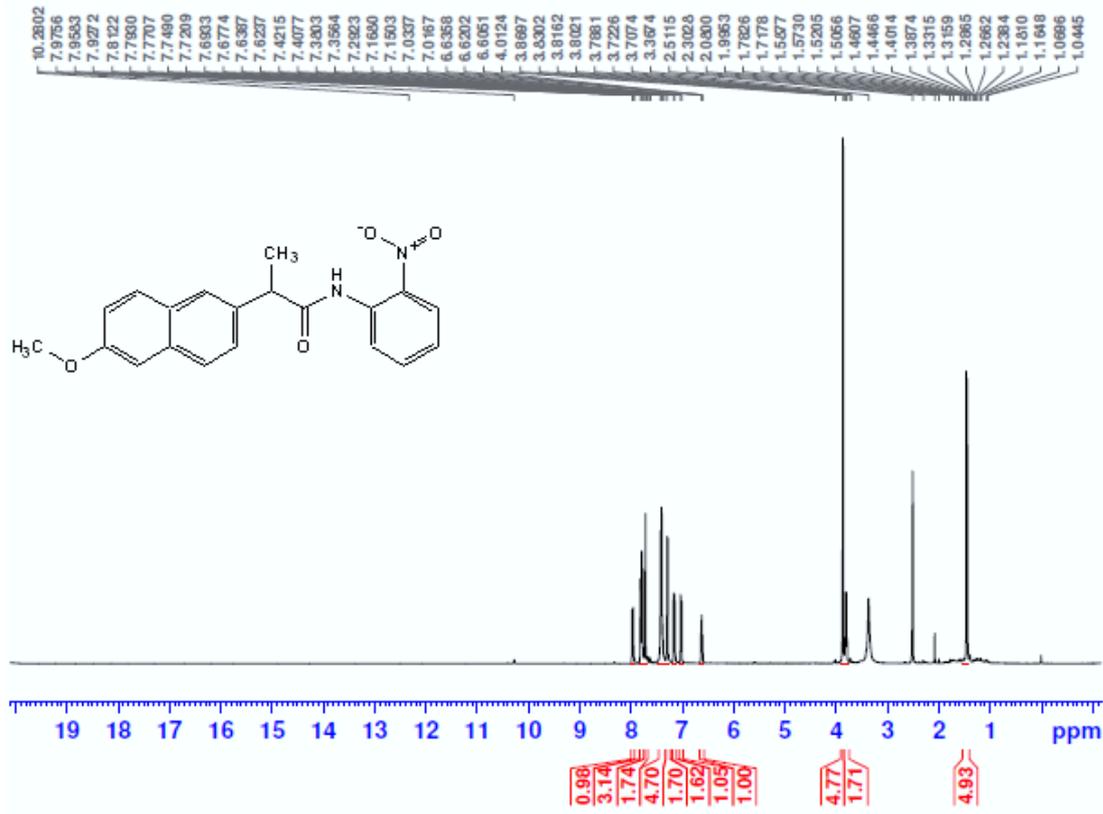


5

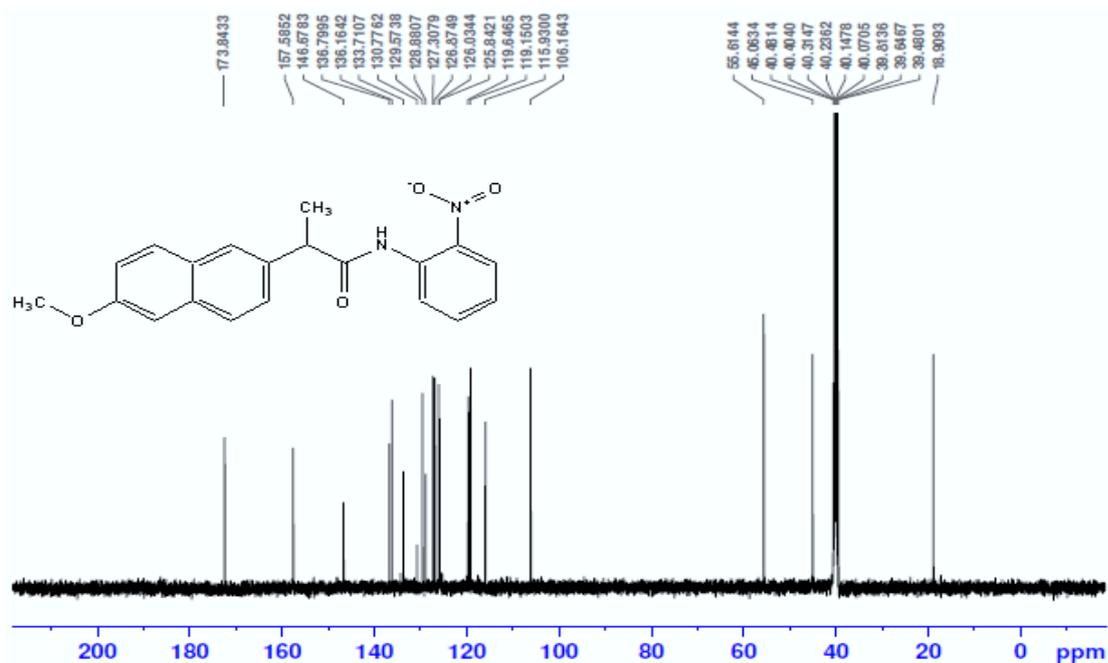
إشارة رباعية quartet عند 3.7ppm تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون رقم 2 وإشارة منفردة singlet عند 3.8 تعود إلى البروتونات المرتبطة بذرة الكربون رقم 26. وإشارة مزدوجة doublet عند 1.5 تعود إلى البروتونات المرتبطة بذرة الكربون رقم 3. في حين ظهرت إشارة بروتون NH في المجال الواسع عند 7.3ppm كإشارة منفردة عريضة وذلك كونها مرتبطة بمجموعة الأمايد الساحبة. أما بروتونات الحلقات الأروماتية فقد ظهرت عند المدى (6.6-7.8ppm) معطية أربع إشارات مزدوجة عائدة إلى البروتونات المرتبطة بذرات الكربون 22,23,17,18 على التوالي وإشارتان منفردتان عائدتان إلى البروتونات المرتبطة بذرتي الكربون 20,15. وظهرت كذلك حزمة عند (7.4ppm) تعود إلى بروتونات الذرة رقم 11. وإشارة ثلاثية

عند 6.6ppm عائدة إلى بروتونات الذرتين 10,9 . والشكل رقم (3-12) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب 5.

أما الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب 5 فقد أظهر الإشارات الآتية: ظهرت إشارة واحدة لمجموعة كاربونيل الأمايد عند 173.8ppm تعود إلى مجموعة الكاربونيل. بينما ظهرت ثلاث إشارات لذرات الكاربون الأليفاتية الثلاث عند 18.9,40,55ppm ذات الأرقام (26,2,3) على التوالي. في حين ظهرت إشارة مميزة عند 157ppm تعود إلى ذرة الكاربون (21). وقد ظهرت إشارة عند 146ppm تعود إلى ذرة الكاربون (7) المرتبطة بمجموعة النايترو. أما ذرات كاربون حلقتي النفتالين وباقي ذرات الحلقة الأروماتية فقد ظهرت إشارات في المدى (106-136ppm). والشكل (3-13) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (5)

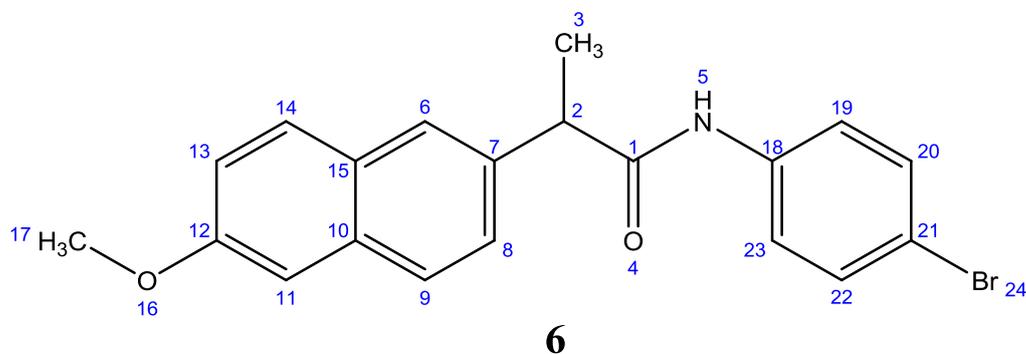


شكل (3-12) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب (5)



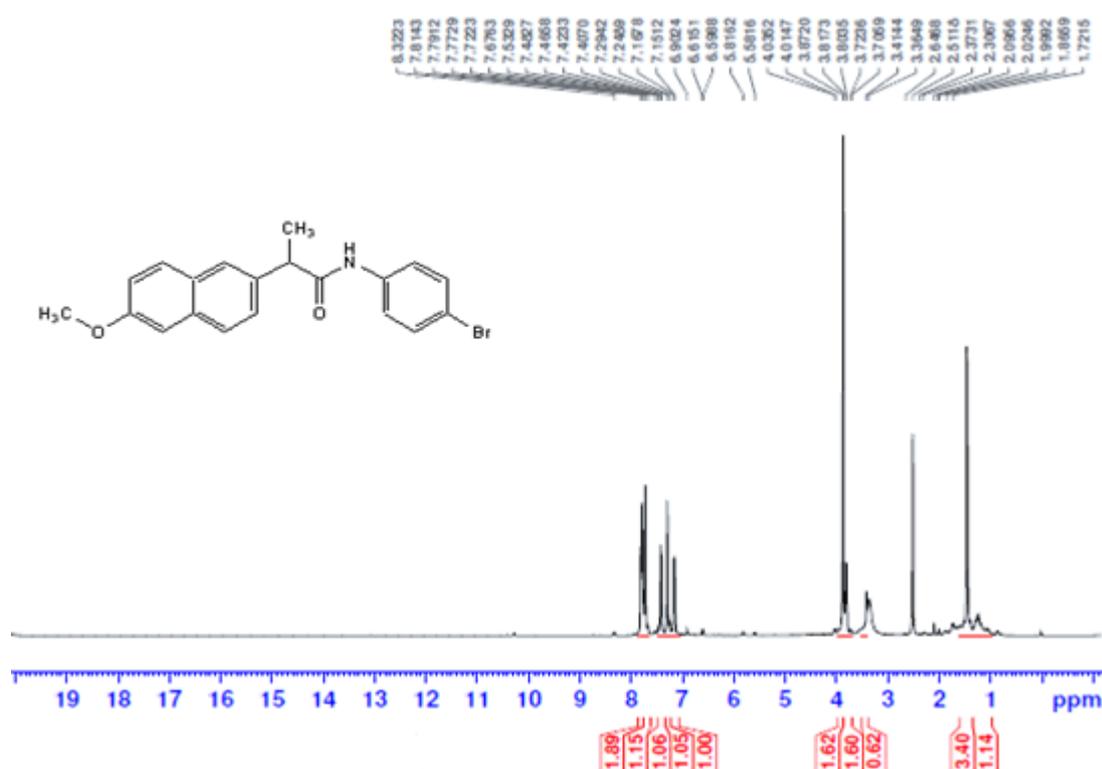
شكل (3-13) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (5)

أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR بالنسبة للمركب 6 فقد كانت الإشارات كالتالي:

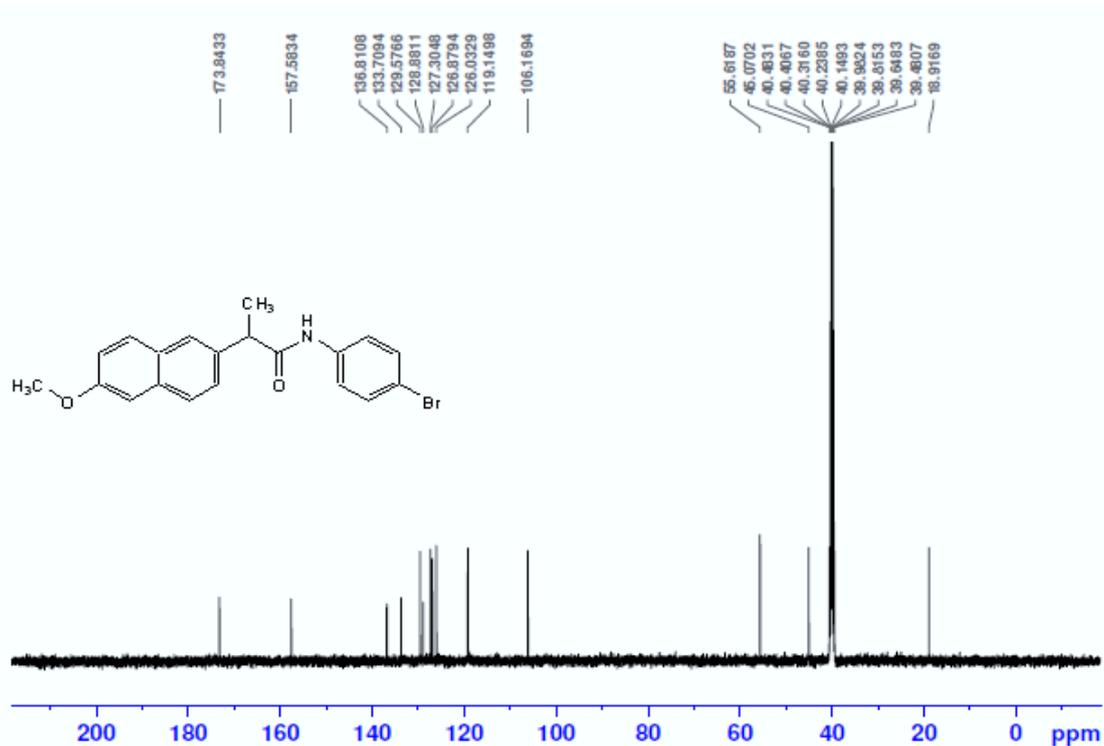


أشارة رباعية quartet عند 3.7ppm تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون رقم 2 وإشارة منفردة singlet عند 3.8 تعود إلى البروتونات المرتبطة بذرة الكربون رقم 17، وإشارة مزدوجة doublet عند 1.4 تعود إلى البروتونات المرتبطة بذرة الكربون رقم 3. في حين ظهرت إشارة بروتون NH في المجال الواطئ عند 7.8ppm كإشارة عريضة وذلك كونها مرتبطة بمجموعة الأمايد الساحبة. أما بروتونات الحلقات الأروماتية فقد ظهرت عند المدى (7.1-7.8ppm) معطية أربع إشارات مزدوجة عائدة إلى البروتونات المرتبطة بذرات الكربون 13,14,8,9 على التوالي وإشارتان منفردتان عائدتان إلى البروتونات المرتبطة بذرتي الكربون

11,6 . وتداخلت معها حزمتي الحلقة الأروماتية الأخرى. والشكل رقم (3-14) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب 6. أما الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب 5 فقد أظهر الإشارات الآتية: ظهرت إشارة واحدة لمجموعة كاربونيل الأمايد عند 175ppm تعود إلى مجموعة الكاربونيل. بينما ظهرت ثلاث إشارات لذرات الكاربون الأليفاتية الثلاث عند 19,40,55ppm ذات الأرقام (3,2,17) على التوالي. بينما ظهرت إشارة مميزة عند 157ppm تعود إلى ذرة الكاربون (12). أما ذرات كاربون حلقتي النفتالين وباقي ذرات الحلقة الأروماتية فقد ظهرت إشارات في المدى (106-136ppm). والشكل (3-15) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (6)

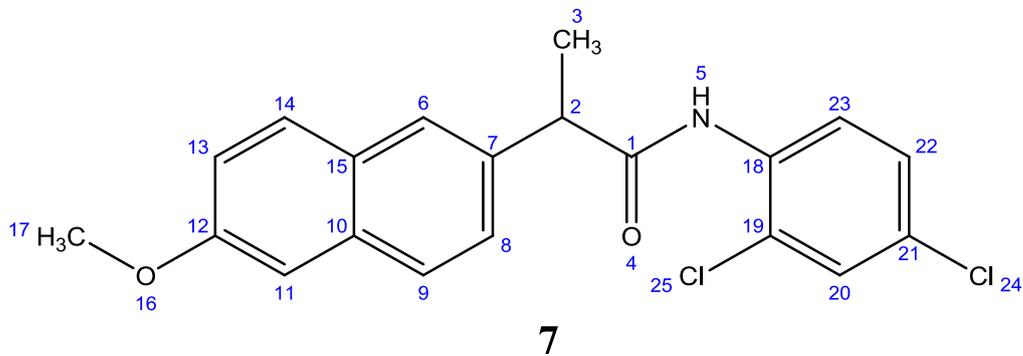


شكل (3-14) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب (6)



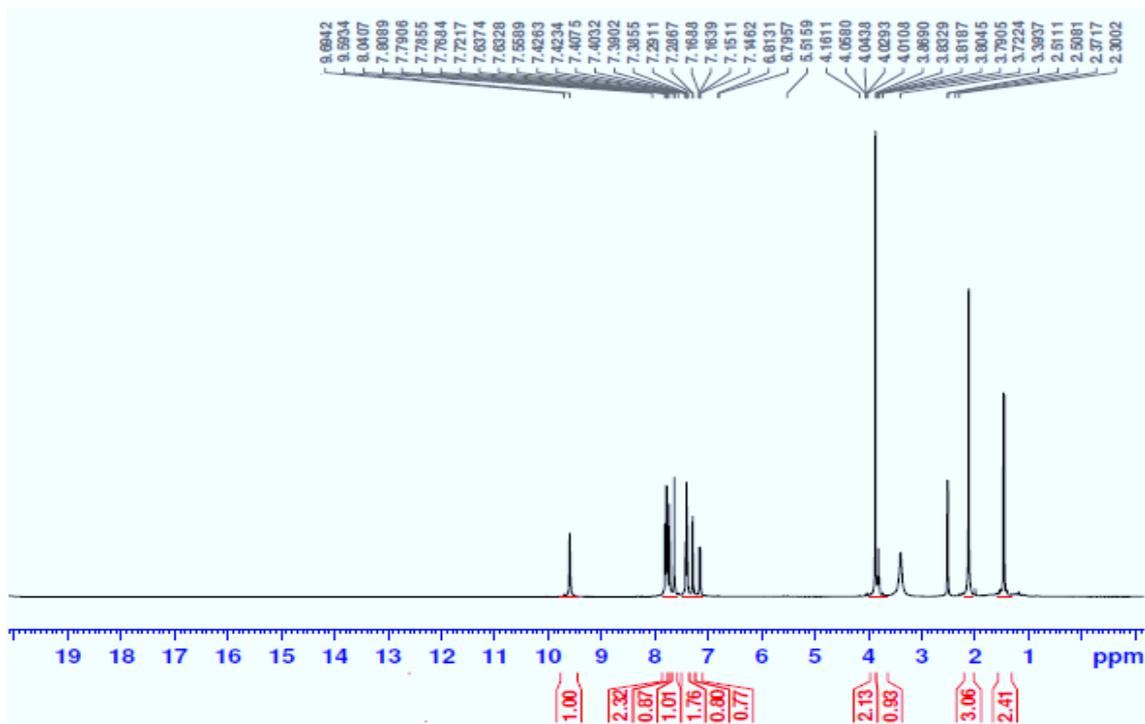
شكل (15-3) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (6)

أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR بالنسبة للمركب 7 فقد كانت الإشارات كالتالي:

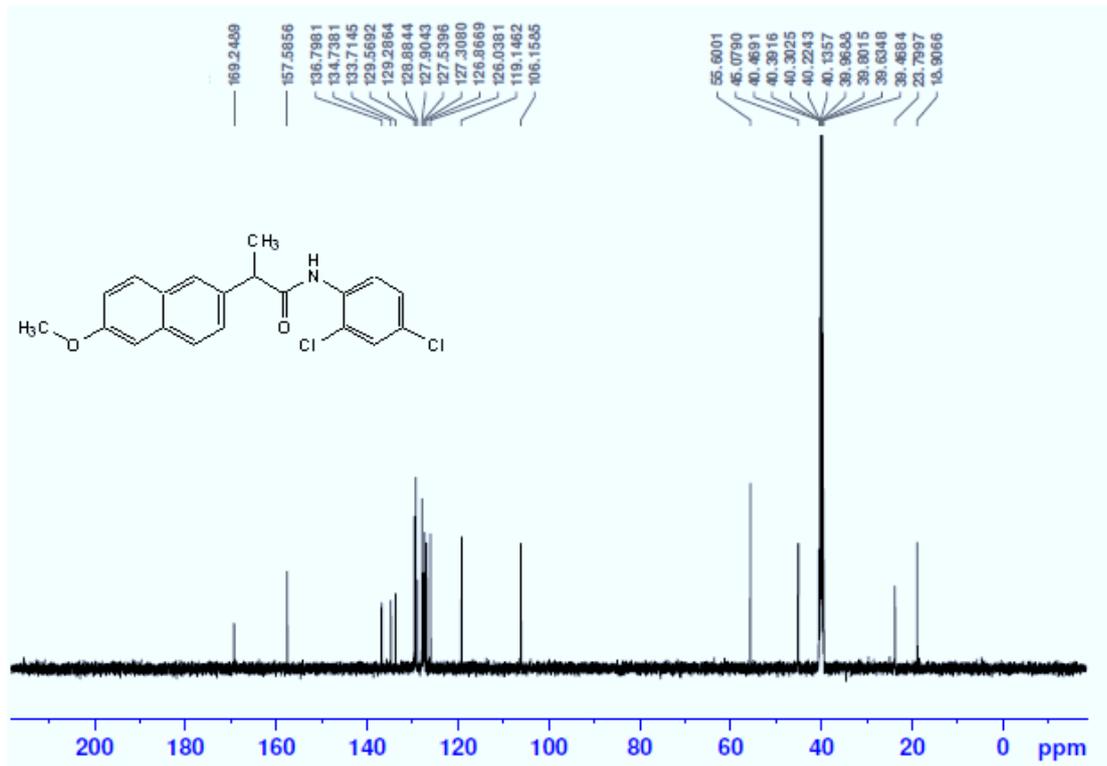


إشارة رباعية quartet عند 3.7ppm تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون رقم 2 وإشارة منفردة singlet عند 3.8 تعود إلى البروتونات المرتبطة بذرة الكربون رقم 17. وإشارة مزدوجة doublet عند 1.4 تعود إلى البروتونات المرتبطة بذرة الكربون رقم 3، في حين ظهرت إشارة بروتون -NH- عند 7.8ppm، أما بروتونات الحلقات الأروماتية فقد ظهرت عند المدى (7.1-7.8ppm) معطية أربع إشارات مزدوجة عائدة إلى البروتونات المرتبطة بذرات الكربون 13,14,8,9

على التوالي، وإشارتان منفردتان عائدتان إلى البروتونات المرتبطة بذرتي الكربون 11,6 . وتداخلت معها حزمتي الحلقة الأروماتية الأخرى. والشكل رقم (3-16) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H NMR}$  للمركب 7. أما الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C NMR}$  للمركب 6 فقد أظهر الإشارات الآتية: ظهرت إشارة واحدة لمجموعة كربونيل الأمايد عند 169 ppm .بينما ظهرت ثلاث إشارات لذرات الكربون الأليفاتية الثلاث عند 19,40,55ppm ذات الأرقام (17,2,3) على التوالي. بينما ظهرت إشارة مميزة عند 157ppm تعود إلى ذرة الكربون (12). أما ذرات كربون حلقتي النفثالين وباقي ذرات الحلقة الأروماتية فقد ظهرت إشارات في المدى (106-136ppm). والشكل (3-17) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C NMR}$  للمركب (7)

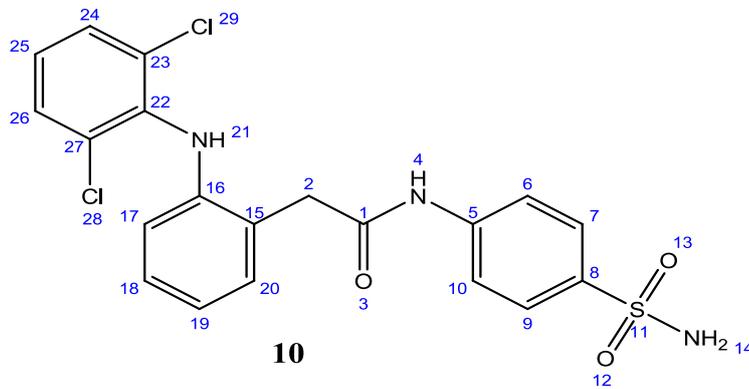


شكل (3-16) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H NMR}$  للمركب 7



شكل (3-17) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (7)

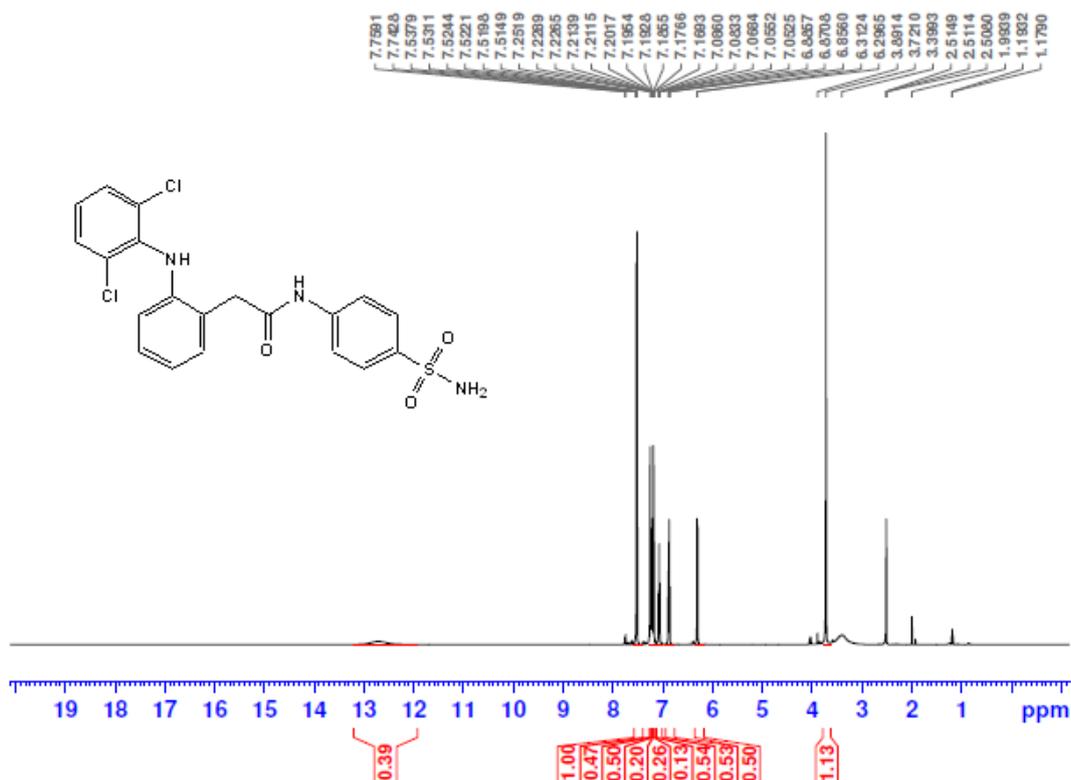
أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR بالنسبة للمركب 10 فقد كانت الإشارات كالآتي:

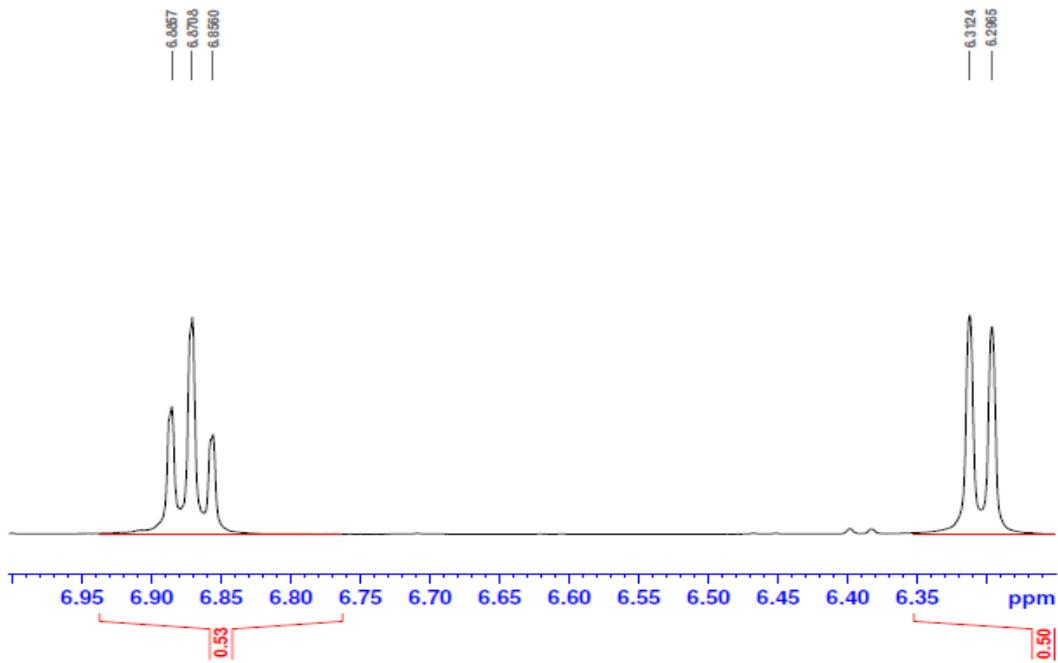


إشارة منفردة singlet عند (5.9 ppm) تعود إلى بروتون مجموعة الأمايد ، وإشارة منفردة singlet عند (2.5 ppm) تعود إلى بروتوني مجموعة (-NH<sub>2</sub>) ، وإشارة منفردة singlet عند (3.7 ppm) تعود إلى بروتوني ذرة الكربون رقم 2 أما بروتونات الحلقات الأروماتية فقد ظهرت في المدى (6.2-7.5ppm) حيث ظهرت إشارة مزدوجة doublet عند 6.2 تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون رقم 17 وإشارة ثلاثية عند (6.8 ppm) تعود إلى البروتون المرتبط بذرة

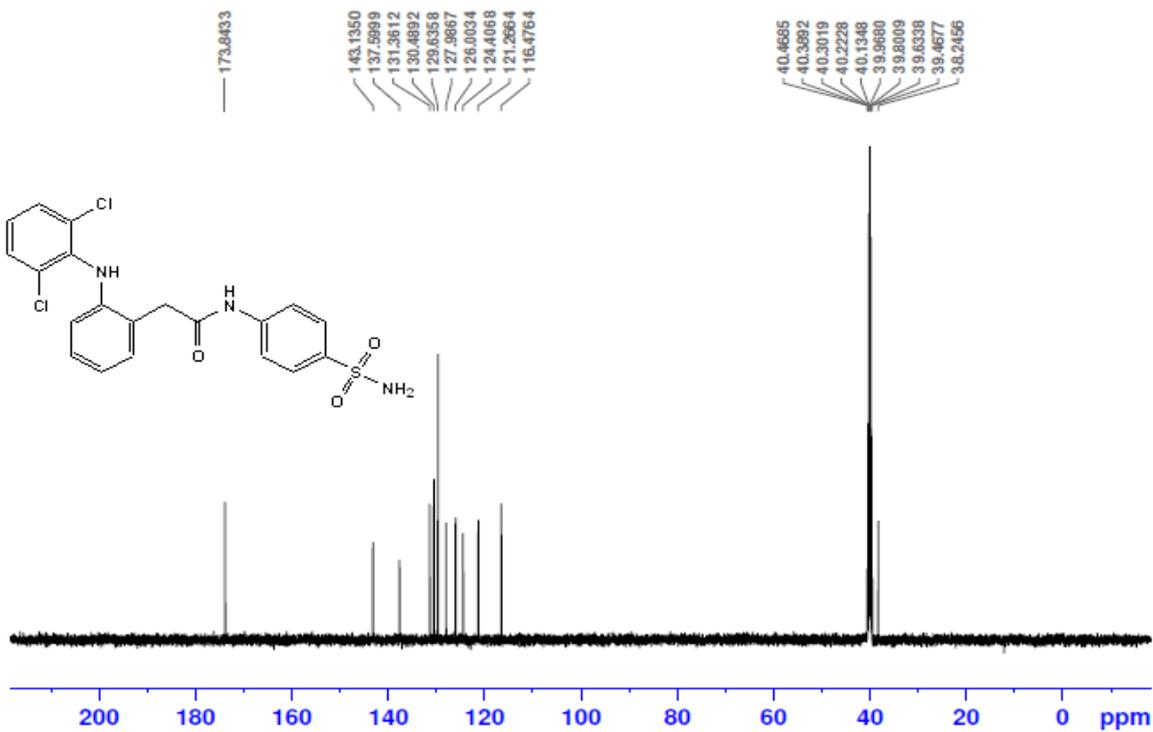
الكاربون رقم 19 وإشارتين ثلاثية وإشارة ثنائية تعود إلى البروتونات المتبقية. والشكل رقم (3-18) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب 10.

أما الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب 10 فقد أظهر الإشارات الآتية: ظهرت إشارة لمجموعة كاربونيل الأمايد عند 173.8ppm. بينما ظهرت إشارة عند (40 ppm) تعود لذرة الكاربون الأليفاتية رقم 2 وظهرت إشارة عند (143 ppm) تعود لذرة الكاربون رقم 5 كونها مرتبطة بمجموعة الأمايد الساحبة، وظهرت إشارة عند (137 ppm) تعود لذرتي الكاربون رقم 23,27 نتيجة لإرتباطهما بذرة الكلور. أما ذرات كاربون الحلقات الأروماتية المتبقية فقد ظهرت إشاراتها في المدى (106-131ppm). والشكل (3-19) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (10).



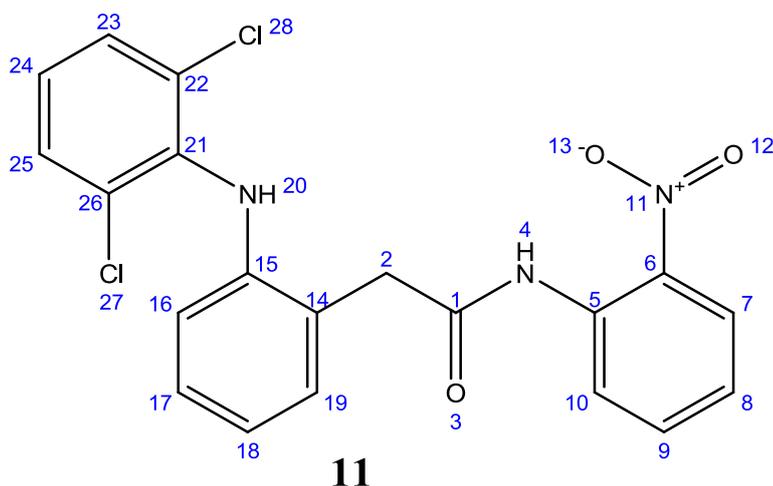


شكل (18-3) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H NMR}$  للمركب 10

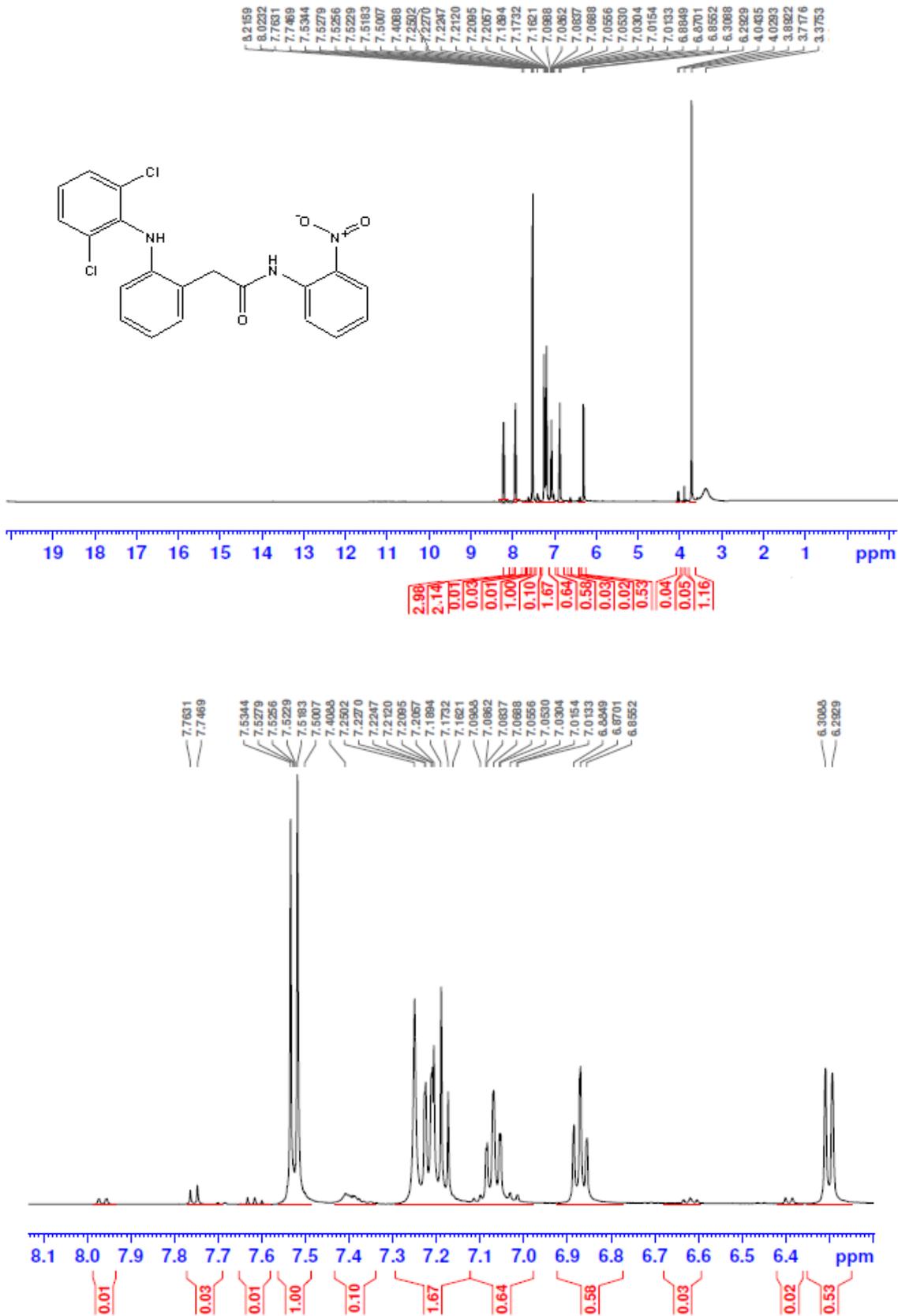


شكل (19-3) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C NMR}$  للمركب (10)

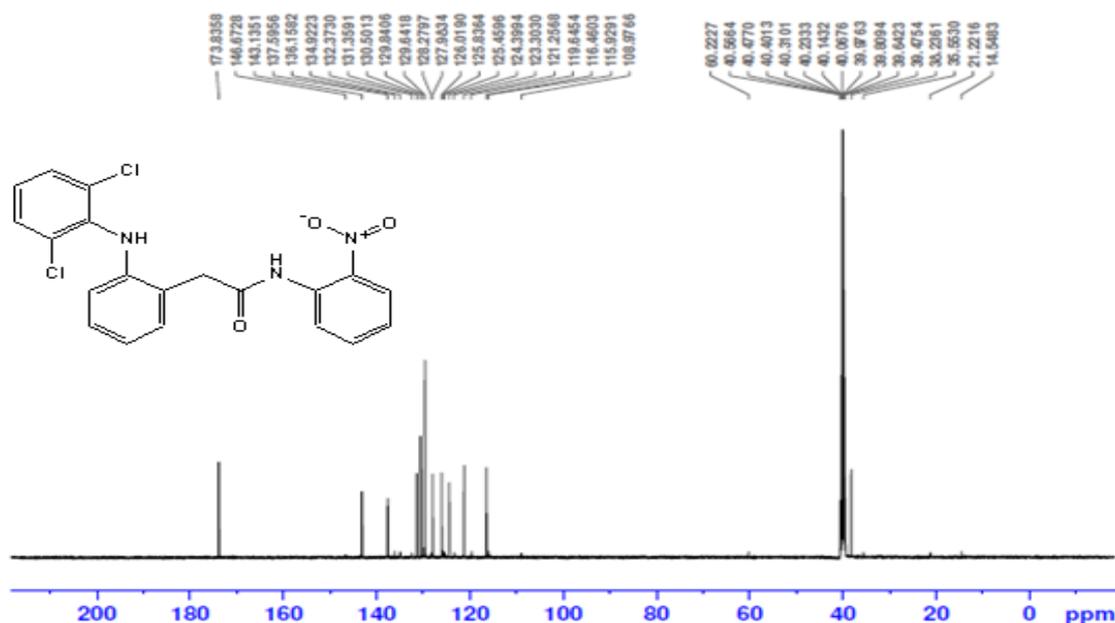
أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H NMR}$  بالنسبة للمركب 11 فقد كانت الإشارات كالآتي:



ظهرت إشارة منفردة singlet عند (6.2 ppm) تعود إلى بروتون مجموعة الأميد ، وإشارة منفردة singlet عند (2.5 ppm) تعود إلى بروتوني مجموعة (-NH<sub>2</sub>)، وإشارة منفردة singlet عند (3.7 ppm) تعود إلى بروتوني ذرة الكربون رقم 2، أما بروتونات الحلقات الأروماتية فقد ظهرت في المدى (6.2-8.2ppm) حيث ظهرت إشارة مزدوجة doublet عند 6.2 تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون رقم 17 وإشارة ثلاثية عند (6.8 ppm) تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون رقم 19 . وظهرت إشارتين مزدوجتين doublet عند (8 ppm) و(8.2 ppm) تعود إلى بروتونات ذرتي الكربون رقم 7,10. والشكل رقم (3-20) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي <sup>1</sup>H NMR للمركب 11. أما الرنين النووي المغناطيسي <sup>13</sup>C NMR للمركب 11 فقد أظهر الإشارات الآتية: ظهرت إشارة لمجموعة كربونيل الأميد عند 173.8ppm. بينما ظهرت إشارة عند (38 ppm) تعود لذرة الكربون الأليفاتية رقم 2 وظهرت إشارة عند (143 ppm) تعود لذرة الكربون رقم 5 كونها مرتبطة بمجموعة الأميد الساحبة، وظهرت إشارة عند (137 ppm) تعود لذرتي الكربون رقم 22,26 نتيجة لإرتباطهما بذرة الكلور. وظهرت إشارة عند (146 ppm) تعود لذرة الكربون رقم 6 نتيجة لإرتباطها بمجموعة النايترو أما ذرات كربون الحلقات الأروماتية المتبقية فقد ظهرت إشاراتها في المدى (106-131ppm). والشكل (3-21) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي <sup>13</sup>C NMR للمركب (11)

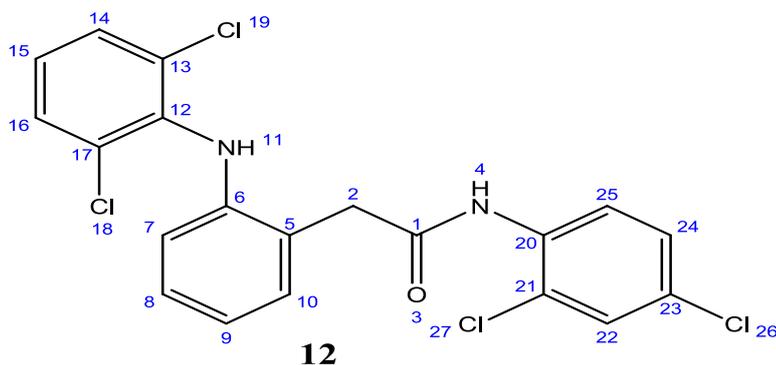


شكل (20-3) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب 11



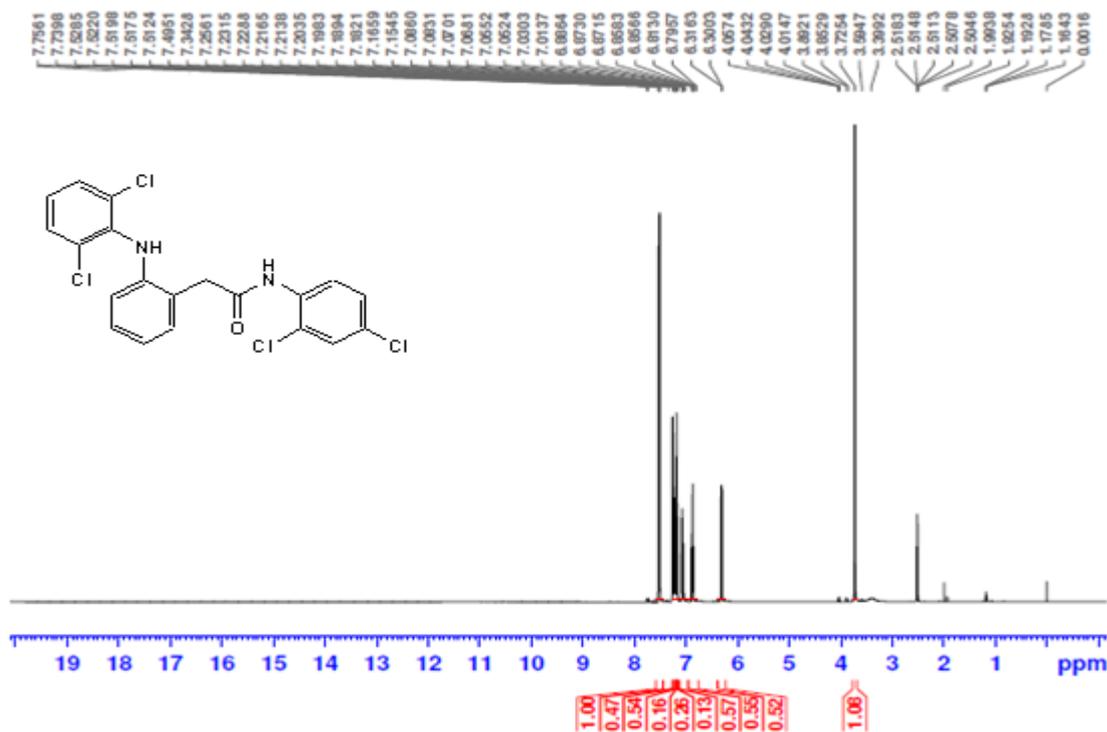
شكل (21-3) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (11)

أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR بالنسبة للمركب 12 فقد كانت الإشارات كالآتي:

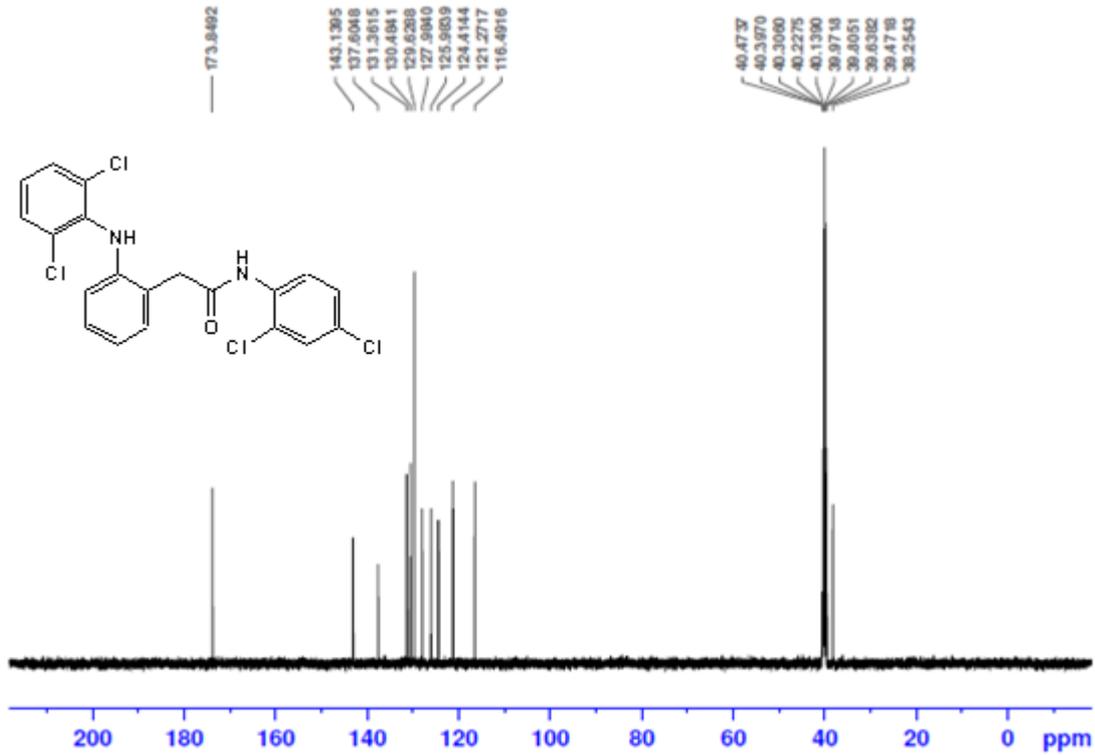


ظهرت إشارة منفردة singlet عند (7.25 ppm) تعود إلى بروتون مجموعة الأمايد ، وإشارة منفردة singlet عند (3.72 ppm) تعود إلى بروتوني ذرة الكربون رقم 2 أما بروتونات الحلقات الأروماتية فقد ظهرت في المدى (6.3-7.75 ppm) حيث ظهرت إشارة مزدوجة doublet عند 6.3 تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون رقم 7 و إشارة ثلاثية عند (6.85 ppm) تعود إلى البروتون المرتبط بذرة الكربون رقم 9. وظهرت إشارة ثلاثية عند (7ppm) تعود إلى ذرات الكربون الأروماتية 15,8 وإشارة مزدوجة عند (7.5) تعود إلى ذرة الكربون رقم 25. إما إشارات ذرات الكربون الأروماتية المتبقية فتداخلت إشاراتهما عند (7.15-7.25). والشكل رقم(22-3) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب

أما الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب 12 فقد أظهر الإشارات الآتية: ظهرت إشارة لمجموعة كاربونيل الأمايد عند 173.84ppm. بينما ظهرت إشارة عند (40 ppm) تعود لذرة الكربون الأليفاتية رقم 2 أما ذرات كربون الحلقات الأروماتية المتبقية فقد ظهرت إشارات في المدى (116-143ppm). والشكل (3-23) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (12)

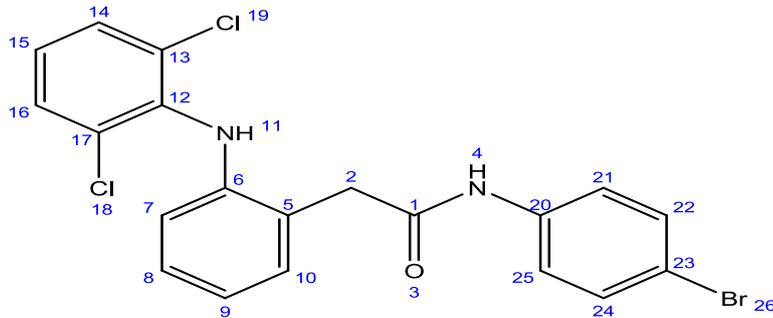


شكل (3-22) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$  NMR للمركب 12

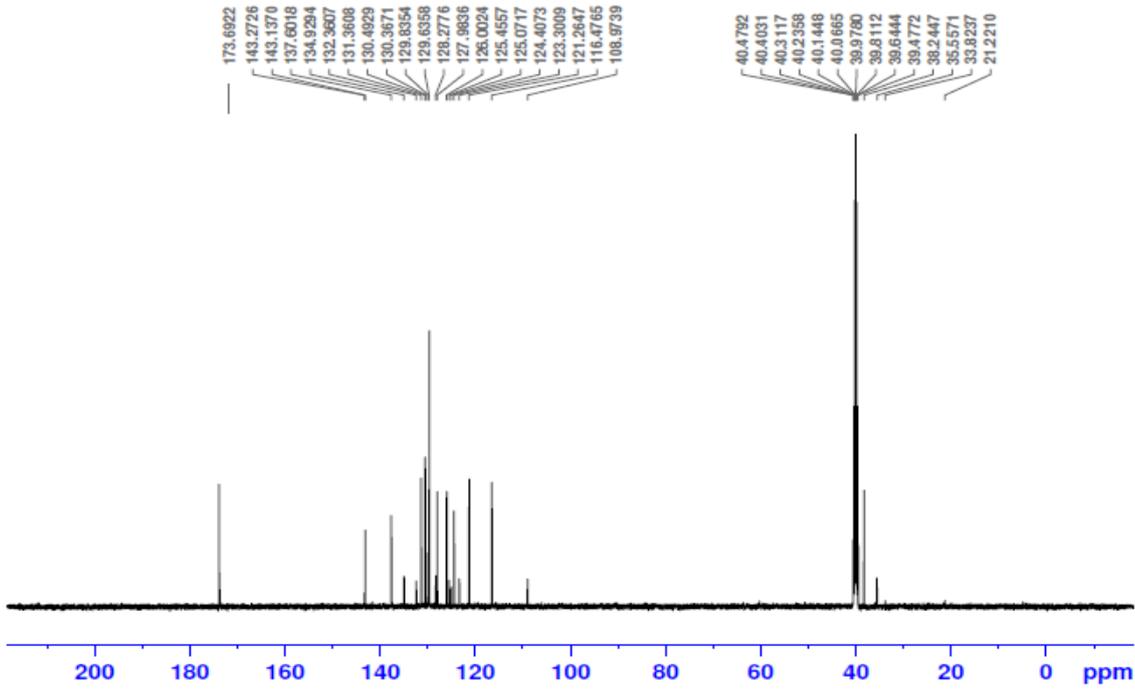


شكل (23-3) طيف الرنين النووي المغناطيسي <sup>13</sup>C NMR للمركب 12

أما طيف الرنين النووي المغناطيسي <sup>13</sup>C NMR بالنسبة للمركب 13 فقد كانت الإشارات كالتالي:

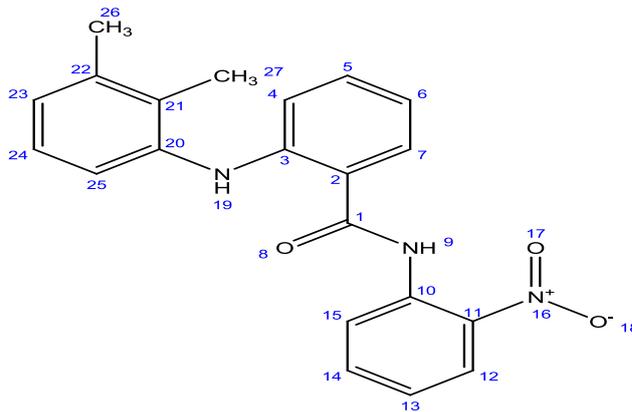


ظهرت إشارة لمجموعة كربونيل الأمايد عند 173.69ppm. بينما ظهرت إشارة عند (40 ppm) تعود لذرة الكربون الأليفاتية رقم 2، أما ذرات كربون الحلقات الأروماتية المتبقية فقد ظهرت إشاراتها في المدى (108-143ppm). والشكل (24-3) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي <sup>13</sup>C NMR للمركب (13)

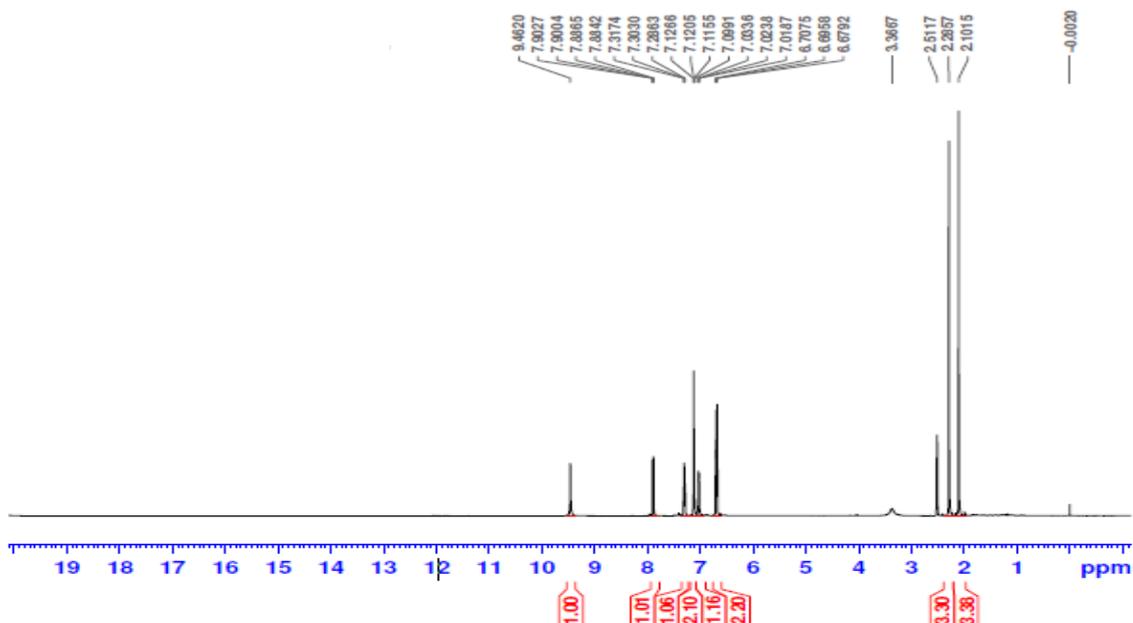


شكل (24-3) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (13)

أما طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR بالنسبة للمركب 15 فقد كانت الإشارات كالاتي:

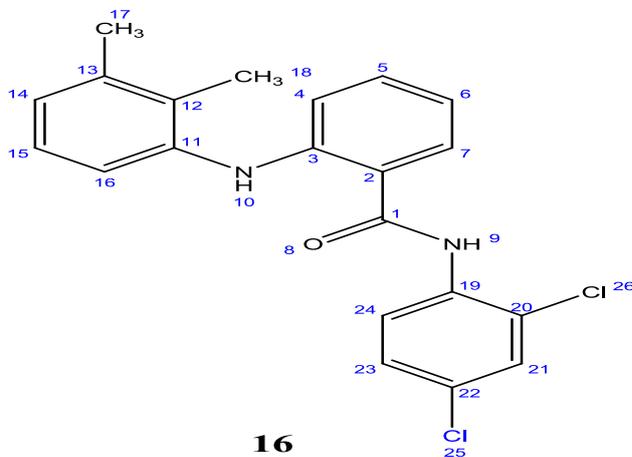


ظهرت إشارة منفردة singlet عند (9.46 ppm) تعود إلى بروتون مجموعة الأمايد ، وإشارة منفردة singlet عند (2.1 ppm) وأخرى عند (2.8 ppm) تعود إلى بروتونات ذرتي الكربون الأليفاتية رقم 27 و 28. وإشارة عند (2.5ppm) تعود لبروتون ذرة النايتروجين رقم 19. أما بروتونات الحلقات الأروماتية فقد ظهرت في المدى (6.6-7.9ppm). والشكل رقم (25-3) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H}$ NMR للمركب 15.

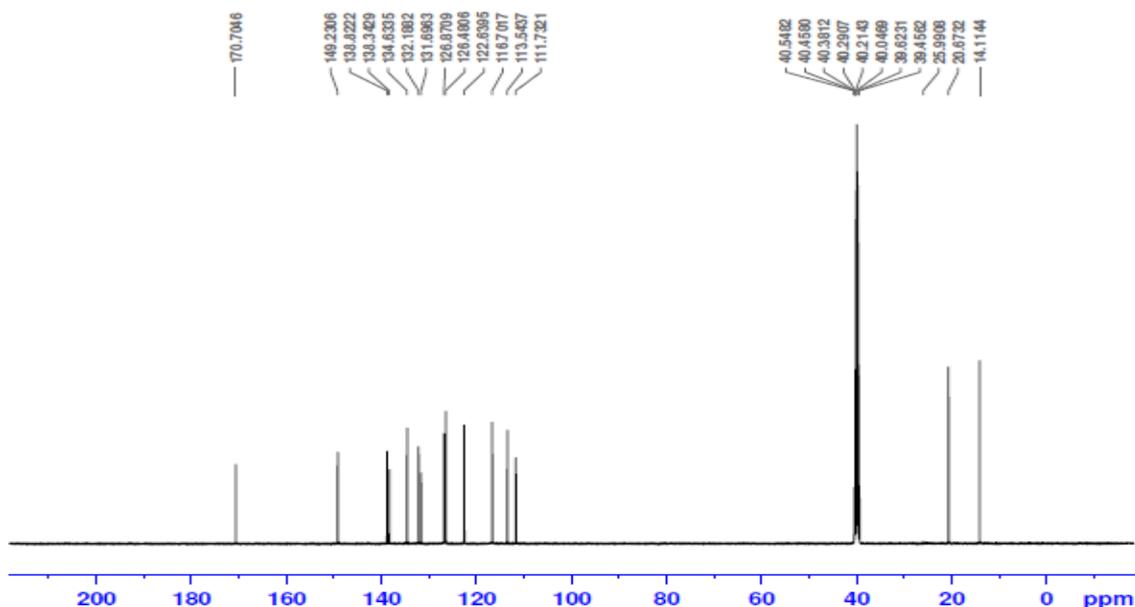


شكل (25-3) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^1\text{H NMR}$  للمركب 15

أما الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C NMR}$  للمركب 16 فقد أظهر الإشارات الآتية:



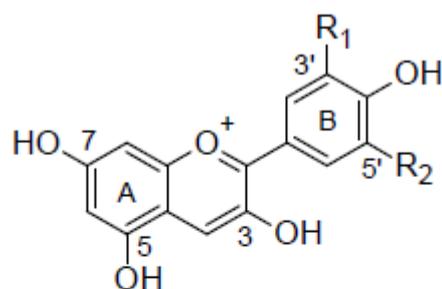
ظهرت إشارة لمجموعة كربونيل الأمايد عند 170.7ppm. بينما ظهرت إشارتين عند (14-14) ppm و (20ppm) تعود لذرتي الكربون الأليفاتية رقم 27,28 وظهرت إشارة عند (149.2 ppm) تعود لذرة الكربون رقم 3 كونها مرتبطة بذرة النيتروجين، وظهرت إشارات عند 138.8,138.2,134.6 تعود لذرات الكربون رقم 11,13,19 على التوالي أما ذرات كربون الحلقات الأروماتية المتبقية فقد ظهرت إشارات في المدى (111-132ppm). والشكل (26-3) يوضح طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C NMR}$  للمركب (16)



شكل (26-3) طيف الرنين النووي المغناطيسي  $^{13}\text{C}$  NMR للمركب (16)

### 4-3 إستخلاص الأنتوسيانينات من الملفوف الأحمر

الأنثوسيانينات تتألف من الجزء اللاسكري وهو الأنتوسياندين يرتبط إلى جزيئة أو أكثر من جزيئات السكر (مشتقات كلايكوسيدية لـ tetrahydroxy-flavylium cation - 3,5,7,3~) بينما تتواجد جزيئة سكر دائماً في الموقع 3 وغالباً ما ترتبط جزيئات سكر إضافية في المواقع 5 و 7. ونادراً ما تتشكل الأنتوسيانينات الحرة في النباتات كنقص إلكتروني للأيون الموجب مما يجعل الأنتوسيانينات الحرة فعالة جداً لذلك فإن السكر يثبت جزيئة الأنتوسيانين ويجعل التركيب الكلايكوسيدي أكثر إستقراراً من الأنتوسيانين. وقد تكون جزيئات السكر أحادية أو ثنائية السكريد أو تكون مرتبطة بجزيئة أستيل لحوامض فينولية أو أليفاتية وغالباً ما تكون جزيئات السكر هي الكلوكوز، الكالاكتورز، الرامنوز rhamnose أو الرايبينوز. وقد تحدث تعديلات أخرى على الكلايكوسيدات من خلال الأسيلة أو تكوين معقدات مع الأيونات المعدنية. تؤدي الإختلافات غير الملحوظة في pH الخلية وإمكانية تكوين المعقدات إلى تنوع غير محدود في درجة اللون. يوجد في الطبيعة حوالي 17 من الأنتوسياندينات لكن ستة أنواع منها هي الأكثر شيوعاً (سياندين، ديلفيندين، بيتيوندين، بيوندين، بيلاركوندين، مالفين).<sup>(174,173)</sup>



Anthocyanidin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Colour
Pelargonidin	H	H	Orange
Cyanidin	OH	H	Orange-red
Delphinidin	OH	OH	Bluish-red
Peonodin	OCH <sub>3</sub>	H	Orange-red
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH	Bluish-red
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Bluish-red

شكل (3-27) الهيكل البنائي للأنثوسيانينات الرئيسية

تتضمن المصادر الطبيعية للأنثوسيانينات تشكيلة من الفواكه الملونة والخضار والتوابل والمكسرات وتشمل التوت والعنب والخوخ والرمان والبصل الأحمر والملفوف الأحمر والفاصوليا السوداء والفسنق<sup>(175)</sup>. إذ يتفاوت تركيز ونوع الأنثوسيانين بشكل كبير في كل فاكهة والخضار وتم إستعمال الملفوف الأحمر في هذه الدراسة كمصدر للأنثوسيانينات حيث يحتوي فقط على مشتقات السياندين cyanidin<sup>(176)</sup>.

تم استخلاص الأنثوسيانينات بإستعمال مذيب من الإيثانول 70% والماء وتم تحميضه بحامض الستريك 3%. وتم استخدام الإيثانول والماء بسبب قابلية الذوبان الجيدة للأنثوسيانينات في المذيبات القطبية وفقاً لقاعدة المذيب يذيب شبيهه وأضيف الحامض لتحسين إستقراريته<sup>(177)</sup>.

وتم حساب المحتوى الكلي من الأنثوسيانين بطريقة pH التفاضلي وكان الأنثوسيانين الرئيس في الملفوف الأحمر هو السياندين لذلك تم استعمال cyanidin-3-glucoside كمعيار في هذه الدراسة. لكن تجري تحولات عكسية هيكلية للأنثوسيانينات مع تغير الرقم الهيدروجيني وتظهر وجود فرق صارخ في أطيف الامتصاص. إذ إن شكل الأوكسونيوم ذو اللون الأحمر وشكل الهيمي كيتال hemi-ketal عديم اللون هما اللذان يسودان عند الرقم الهيدروجيني 1 و 4.5 على التوالي. حيث توفر طريقة الرقم الهيدروجيني التفاضلي القياس الدقيق والسريع للمحتوى الكلي من الأنثوسيانينات حتى في وجود الصبغات المتحللة ومركبات التداخل الأخرى<sup>(178)</sup>. حيث إن

الصبغات المتحللة لا تغيير اللون مع تغييرات درجة الحموضة ولا يتم تضمينها في القياس لأنها تمتص الضوء في كلا رقمي الهيدروجين (1 و 4.5)<sup>(179)</sup>. وكان المحتوى الكلي من الأنثوسيانين هو (46 ملغم\100غم). بينما ذكر تايمبيرلاك Timberlake وزملاؤه 25 ملغم\100غم من المحتوى الكلي للأنثوسيانين المستخلص بواسطة الميثانول<sup>(180)</sup>. وذكر مازا Mazza أن تركيز الأنثوسيانين في الملفوف الأحمر يتراوح بين 25-495 ملغم\100غم، التغييرات في تركيز الأنثوسيانين تعتمد على الصنف المحدد والتكنولوجيا المستخدمة<sup>(181)</sup>.

### 3-5 تشييط الأنزيم

نظراً لكون أنزيمات الأكسدة الحلقية هي المسؤولة عن إنتاج البروستاغلاندينات التي تتوسط الشعور بالألم والالتهاب، حيث إن الالتهاب والألم هما مقياس لنشاط أنزيمات الأكسدة الحلقية (تحديداً COX-2)، فقد تم دراسة التأثير المثبط للمركبات المحضرة من خلال دراسة فعاليتها المضادة للشعور بالألم وفعاليتها المضادة للالتهاب في داخل جسم الكائن الحي. واستخدمت القوارض لإجراء الاختبار لأن الجهاز المناعي للتشبيبات متشابه إلى حد كبير عبر الأنواع المختلفة. حيث تمتلك وسطاء الالتهاب في القوارض تماثلاً عالياً لنظيراتها في الإنسان لذلك فنماذج الالتهاب في القوارض لها أهمية لا تقدر بثمن للتحقيق في الآليات الالتهابية وإختبار العلاجات المضادة للالتهاب الجديدة التي قد تكون قابلة للتطبيق على الإنسان<sup>(182)</sup>.

### 3-5-1 إختبار الصفيحة الحارة

أستخدم المحفز الحراري كمسبب للألم لإختبار فعالية المركبات المحضرة والمستخلصات كمسكنات وقد ثبت صحة هذا الأختبار حتى في حالة الحرمان من الإداء الحركي<sup>(183)</sup>. وأظهرت نتائج الإختبار للمركبات المحضرة والمستخلصات بعد حقنها بالبريتون للفئران أن دمج الأمين بارا برومو أنيلين مع الأيبوبروفين والنابروكسين والدايكولوفيناك والميفيناميك و4,2 ثنائي كلورو أنيلين مع كل من النابروكسين والدايكولوفيناك والميفيناميك و2-نايترو أنيلين مع كل من النابروكسين

والدايكولوفيناك والميفينامك وإضافة أمين السلفونيل أميد مع كل من النابروكسين والدايكولوفيناك يحافظ على فعاليتها كمسكنات وتبين أن كل من زيت النعناع ومستخلص اللهانة تعمل كمسكنات وأظهرت النتائج إختلافات بين المجموعات المعاملة بتراكيز مختلفة حيث يزداد التأثير المسكن بإزدياد الجرعة المعطاة للحيوان ولم تلاحظ فروقات عالية عند إزدياد الزمن بل لوحظ إنخفاض في التأثير المسكن عند الوقت 60 عن الوقت 30 في الجرعة الأولى والجرعة الثالثة من دايكولوفيناك الصوديوم والجرعة الأولى للمركب 10 والجرعة الثانية للمركب 11 والجرعة الثالثة للمركب 12 وكان المركبان 4 و 10 هما الأكثر فعالية وأن الجرعة الثانية للمركب 4 تكفي لحصول أعلى فعالية له كمسكن.

جدول (3-3) وقت رد الفعل على المحفزات الحرارية (بالثانية) للفئران (إختبار الصفيحة الحارة)

الوقت بعد المعاملة بالمركبات (دقيقة)			المجموعات المعاملة
60 ثانية	30 دقيقة	0 دقيقة	
22.00	22.54	14.53	دايكولوفيناك الصوديوم 1.5 ملغم/كغم
27.32	26.11	17.21	دايكولوفيناك الصوديوم 3 ملغم/كغم
29.11	30.00	15.39	دايكولوفيناك الصوديوم 6 ملغم/كغم
22.43	19.22	14	المركب 2 (1.5 ملغم/كغم)
25.33	22.78	16.1	المركب 2 (3 ملغم/كغم)
28.52	26.00	13.53	المركب 2 (6 ملغم/كغم)
19.20	18.11	15.21	المركب 4 (1.5 ملغم/كغم)
29.89	30.00	14.22	المركب 4 (3 ملغم/كغم)
30.00	29.69	12.95	المركب 4 (6 ملغم/كغم)
19.54	17.67	14.53	المركب 5 (1.5 ملغم/كغم)
21.00	17.31	16.00	المركب 5 (3 ملغم/كغم)
29.22	26.77	16.23	المركب 5 (6 ملغم/كغم)
25.17	22.65	17.21	المركب 6 (1.5 ملغم/كغم)
23.91	23.54	15.16	المركب 6 (3 ملغم/كغم)
27.87	26.78	13.22	المركب 6 (6 ملغم/كغم)
19.23	17.09	14.00	المركب 7 (1.5 ملغم/كغم)
27.57	23.65	18.67	المركب 7 (3 ملغم/كغم)
28.72	27.91	18.33	المركب 7 (6 ملغم/كغم)

18.00	18.77	15.57	المركب 10 (1.5 ملغم/كغم)
27.11	24.53	19.12	المركب 10 (3 ملغم/كغم)
30.00	30.00	16.56	المركب 10 (6 ملغم/كغم)
23.53	19.76	14.97	المركب 11 (1.5 ملغم/كغم)
23.17	24.00	17.45	المركب 11 (3 ملغم/كغم)
23.19	21.87	15.46	المركب 11 (6 ملغم/كغم)
19.53	17.86	13.55	المركب 12 (1.5 ملغم/كغم)
25.31	22.09	15.33	المركب 12 (3 ملغم/كغم)
27.62	26.00	14.32	المركب 12 (6 ملغم/كغم)
23.85	20.54	16.00	المركب 13 (1.5 ملغم/كغم)
28.03	27.37	15.17	المركب 13 (3 ملغم/كغم)
27.52	27.44	19.00	المركب 13 (6 ملغم/كغم)
21.32	19.53	16.42	المركب 15 (1.5 ملغم/كغم)
18.32	14.00	14.34	المركب 15 (3 ملغم/كغم)
30.00	28.21	17.40	المركب 15 (6 ملغم/كغم)
25.00	20.73	15.35	المركب 16 (1.5 ملغم/كغم)
26.97	26.11	15.33	المركب 16 (3 ملغم/كغم)
29.31	25.27	13.96	المركب 16 (6 ملغم/كغم)
22.64	20.19	16.05	المركب 17 (1.5 ملغم/كغم)
28.90	26.66	14.72	المركب 17 (3 ملغم/كغم)
27.00	27.49	15.00	المركب 17 (6 ملغم/كغم)
16.36	14.05	12.97	زيت النعناع 250 ملغم/كغم
27.21	25.67	16.00	زيت النعناع 500 ملغم/كغم
30.00	30.00	15.46	زيت النعناع 1000 ملغم/كغم
18.29	17.00	17.32	مستخلص اللهانة 250 ملغم/كغم
27.87	23.56	16.21	مستخلص اللهانة 500 ملغم/كغم
29.78	27.32	14.49	مستخلص اللهانة 1000 ملغم/كغم

استخدم النعناع *Mentha spicata* في الطب الشعبي لعلاج حالات الألتهاب. ويقلل الانتوسيانين من خطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية، والسكري، التهاب المفاصل والسرطان، وذلك بسبب خصائصه المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات<sup>(185,184)</sup>. لذلك تم دراسة فعاليتها كمسكنات وكمضادات للالتهاب وقياس مستوى البروستاغلاندين لأن آلية عملها كمضادة

للالتهاب وبعض خصائصها المضادة للسرطان قد تكون من خلال تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية. ولقد أظهرت النتائج كما مبين في الجدول (3-3) إن الجرعة الأولى من زيت النعناع ومستخلص اللهانة لم تظهر فعالية عالية كمسكنات بالمقارنة مع الدايكلوفيناك والمركبات المحضرة لكن أظهرت فعالية عالية بجرعة 500 ملغم/كغم و 1000 ملغم/كغم.

وقد يُعزى هذا التأثير المسكن إلى تثبيط إنتاج البروستاغلاندين  $PGE_2$  عن طريق تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية. ومما يؤيد ذلك هو النتائج التي تم التوصل إليها عند قياس مستوى البروستاغلاندين  $PGE_2$  في بلازما الدم.

وهذا النتائج تتوافق مع النتائج التي توصل إليها Bonina وجماعته إذ تم دراسة أسترات 1-ethyl azacycloalkane-2-one indomethacin وكانت الأسترات المحضرة أقل تهيجاً للغشاء المخاطي وأظهرت نشاط مسكن جيد في الفئران<sup>(186)</sup>. وكذلك Akgun وزملاؤه عندما قام بتحضير مركبات من الأيبوبروفين والنابروكسين والدايكلوفيناك والكيثورولاك عن طريق تفاعلها مع R-(-)-2-amino-1-butanol بوجود N, N-dicyclo hexyl carbodiimide (DCC) وأظهرت نشاط مسكن كبير<sup>(187)</sup>. وكذلك أظهرت الأسترات المحضرة من الكيتوبروفين والنابروكسين والدايكلوفيناك مع قليل الأثلين نشاط مسكن جيد<sup>(188)</sup>. وكذلك عندما تم تحويل النابروكسين، البروبيبيسيد، ديكلوفيناك، ايبوبروفين وإندوميثاسين إلى مشتقات هيدرازيد التي تم تكتيفها مع مزيد من الأسترات الكيتونية لإعطاء مشتقات Pyrazolone. وكذلك تمت مفاعلة مشتقات الهيدرازيد من البروبيبيسيد والدايكلوفيناك أيضا مع حامض الخليك ثنائي الفينيل، وهو المستقلب النشط للفينبوفين أظهرت تسكين للألم عند مقارنتها مع المركبات الأصل عند تقييمها في نماذج القوارض<sup>(189)</sup>. إلا أن تحضير عدد من الأميدات من تفاعل إسترات الإيثيل من الأحماض الأمينية الكلايسين، فينيل ألانين، تريبتوفان، آيسوليوسين، ألانين، ليوسين، حامض الكلوتاميك، وحامض الأسبارتيك. أظهر نشاط مسكن مماثل للمركب الأصل<sup>(190)</sup>.

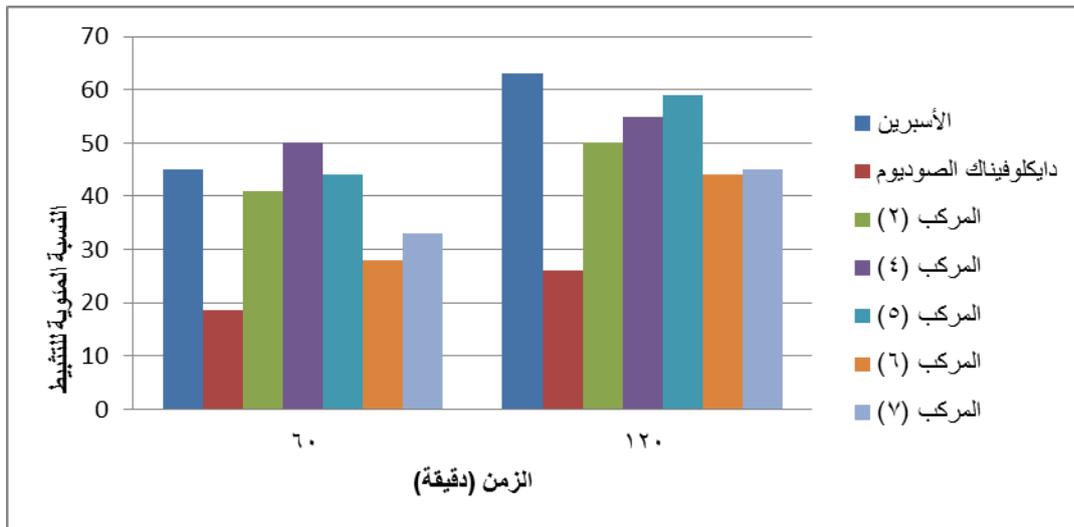
ومن النتائج التي تختلف عن النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة هي عندما تم تحضير عدد من مشتقات أستر الثايو وأسترات (N, N, N-trialkyl ammonium) alkyl من الأيبوبروفين والنابروكسين والميفيناميك وتقييم نشاطها الدوائي بينت الدراسة أن المركبات

المحضرة أظهرت إنخفاض في النشاط المسكن عن المركبات الأصل<sup>(191)</sup>. تم تحضير أسترات النابروكسين- بروبيفينازون بعد أن تم تحويل البروبيفينازون إلى 3-هيدروكسي مثل بروبيفينازون لتحسين الخصائص العلاجية ومنع مختلف سميات الجهاز الهضمي حيث أظهرت المركبات الناتجة كل من النشاط المضاد للالتهاب والنشاط المسكن وكان بعضها أقل تأثيراً على الجهاز المخاطي وأسترة النابروكسين مع أسترات ألكيلية مختلفة وأسترات الثايو أظهرت إنخفاض في النشاط المسكن لكن الأسترة مع اثيل بيبرازين حافظت على النشاط المسكن<sup>(192)</sup>.

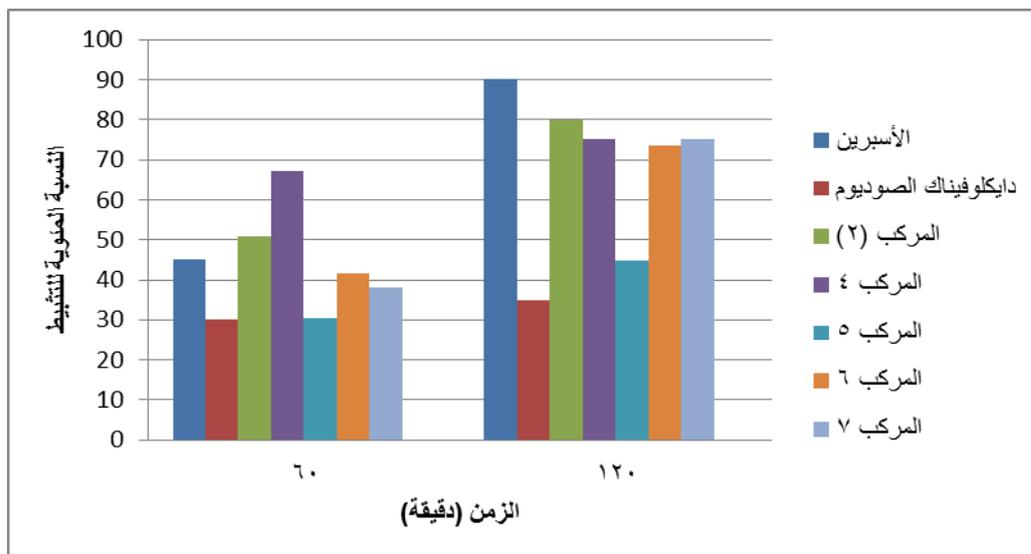
### 3-5-2 نموذج الودمة المستحثة بواسطة زلال البيض

أستخدمت في نموذج الودمة المستحثة في القوارض العديد من العوامل المهيجة مثل زلال البيض ، الكاراجينان، الهستامين والديكستران<sup>(193)</sup>. إن حقن زلال البيض في يد الفئران يؤدي إلى تكوين الودمة بشكل تدريجي لذا استخدم في هذه الدراسة نموذج الودمة المستحثة بواسطة زلال البيض لدراسة فعالية المركبات المحضرة والمستخلصات كمضادات للالتهاب واستخدم دايكولوفيناك الصوديوم والأسبرين (من مضادات الالتهاب غير الستيرويدية التي تعمل كمثبطات لأنزيمات الأكسدة الحلقية) كمرجع للمقارنة ولإثبات إن النقصان في سمك المخلب يعود إلى النشاط المضاد للالتهاب من خلال تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية.

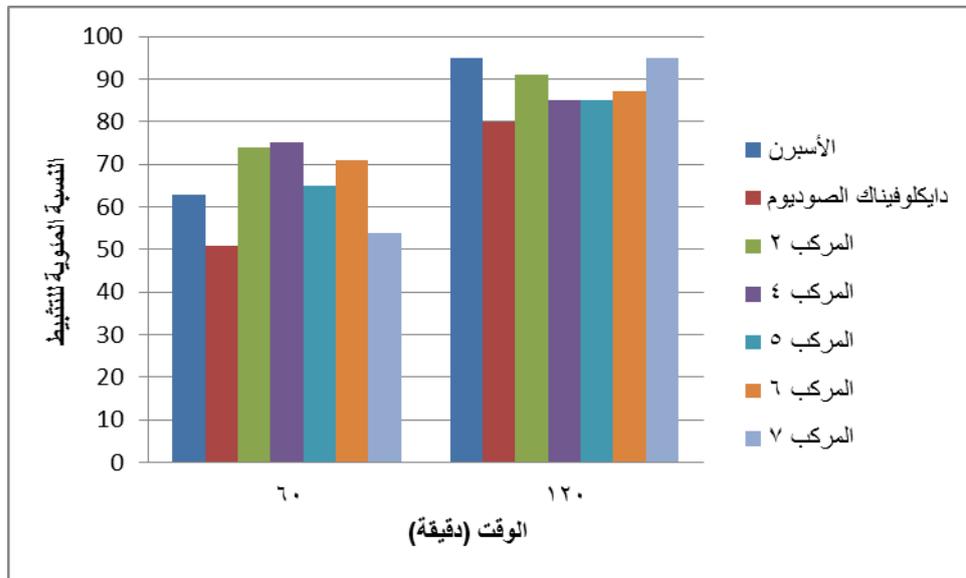
بعد إعطاء المركبات والمستخلصات والمذيب المستخدم عن طريق الحقن البريتوني عند الزمن صفر تم إستحداث الالتهاب عن طريق حقن زلال البيض غير المخفف تحت الجلد في أسفل يد الفئران. وبعد نصف ساعة وتم قياس سمك اليد بواسطة (vernier) عند الزمن (30، 90، 150 دقيقة) من إعطاء الأدوية. وأستخدمت نسب التثبيط كمؤشر لفعالية المركبات إذ أظهرت المركبات نسب تثبيط أعلى من دايكولوفيناك الصوديوم عند الوقت 30 والوقت و60 لكن أوطأ من الأسبرين وأظهرت الجرعة الثالثة من المركب 7 عند الوقت 120 أعلى نسبة تثبيط (95%) مساوية لنسبة تثبيط الأسبرين، أما زيت النعناع ومستخلص الأنثوسيانين فلم تظهر نسبة تثبيط عالية عند إستخدام جرعة 250ملغم/كغم لكن عند إستخدام جرعة 500 ملغم/كغم وجرعة 1000ملغم/كغم أظهرت نسب تثبيط عالية مقارنة بالدايكولوفيناك ويتبين من خلال النتائج إن نسبة التثبيط تزداد بإزدياد الجرعة المعطاة من المركب وكذلك تزداد نسبة التثبيط مع زيادة الوقت كما مبين في المخططات (3-28) ، (3-29) ، (3-30) ، (3-31) ، (3-32) ، (3-33) ، (3-34) ، (3-35) ، (3-36) إذ تبين المخططات نسب التثبيط في أوقات مختلفة وباستخدام جرع مختلفة:



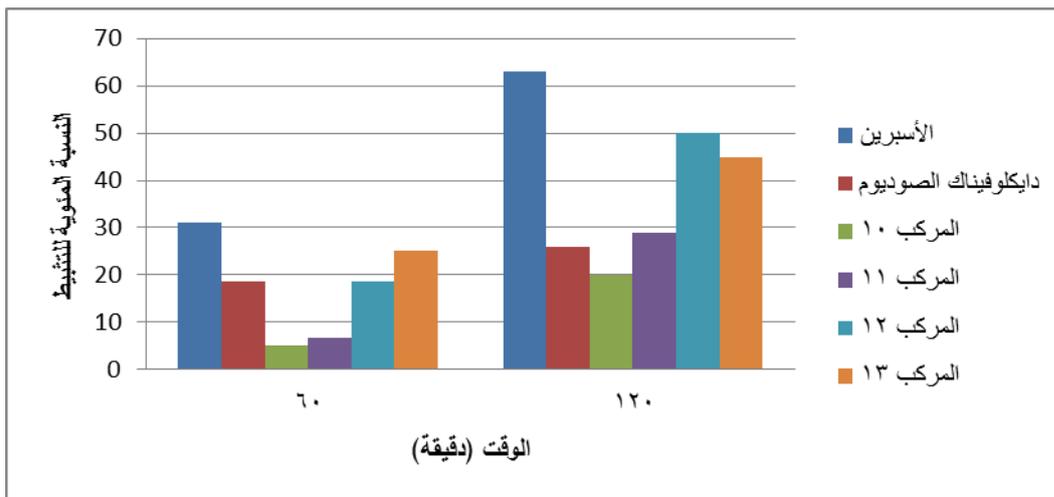
شكل (3-28) النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الأولى للمركبات المشتقة من النابروكسين



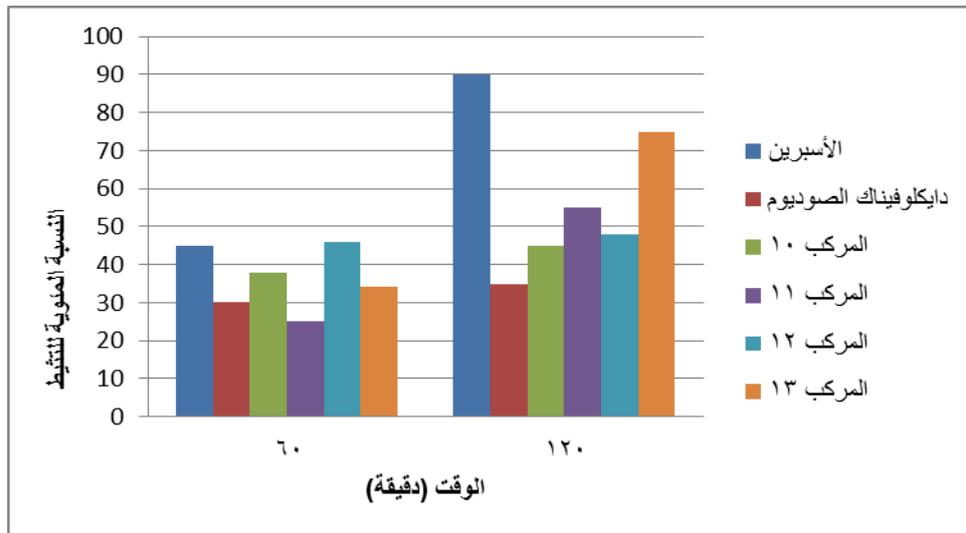
شكل (3-29) النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثانية للمركبات المشتقة من النابروكسين



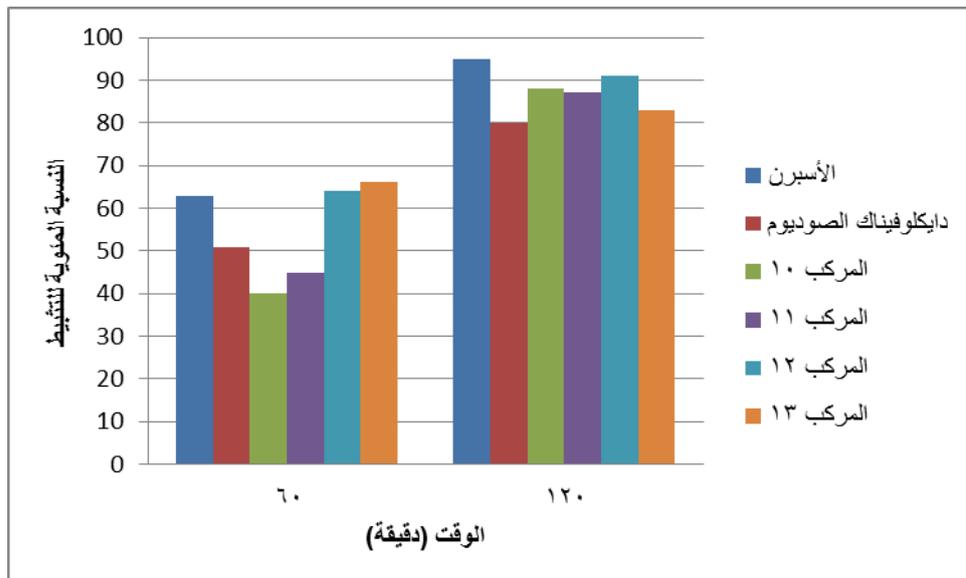
شكل (3-30) النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثالثة للمركبات المشتقة من النابروكسين



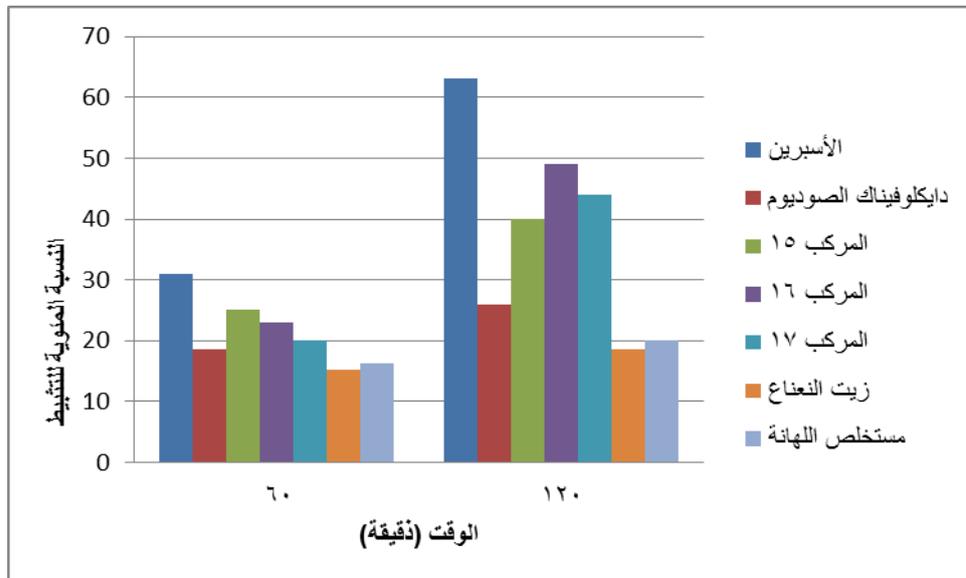
شكل (3-31) النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الأولى للمركبات المشتقة من الداكولوفيناك



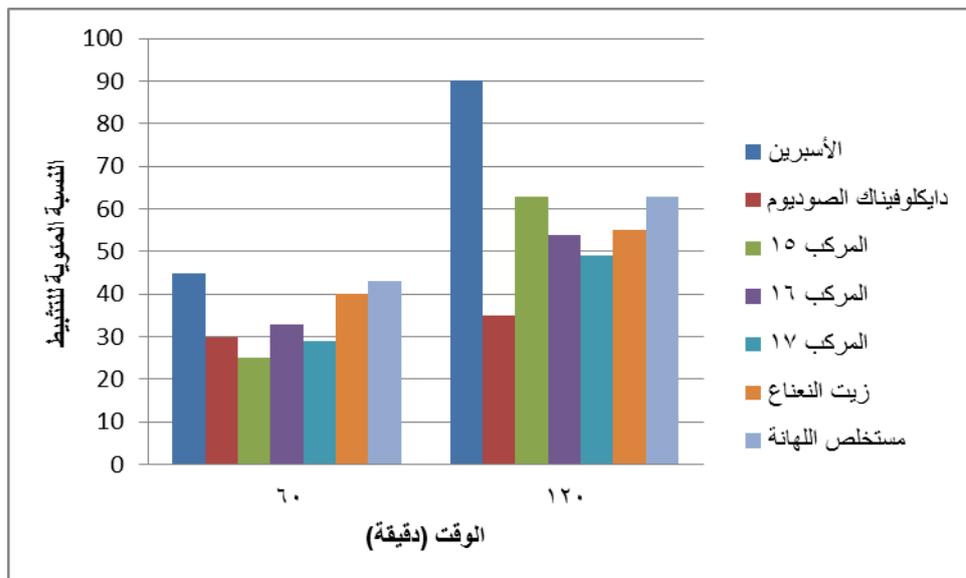
شكل (3-32) النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثانية للمركبات المشتقة من الداكولوفيناك



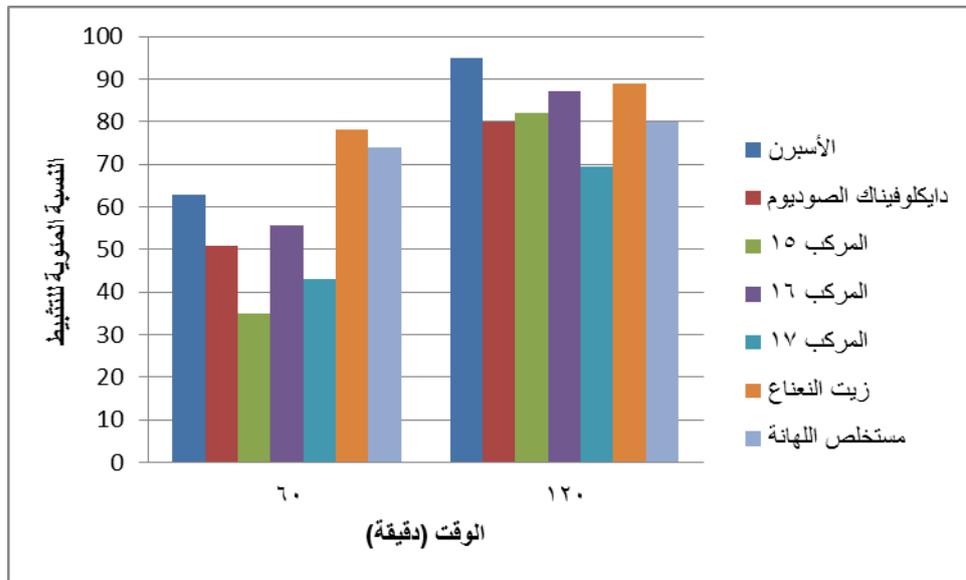
شكل (3-33) النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثالثة للمركبات المشتقة من الداكولوفيناك



شكل (3-34) النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الأولى للمركبات المشتقة من الميفيناميك والمستخلصات



شكل (3-35) النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثانية للمركبات المشتقة من الميفيناميك والمستخلصات



شكل (3-36) النسبة المئوية للتثبيط للجرعة الثالثة للمركبات المشتقة من الميفيناميك والمستخلصات

من خلال النتائج المبينة في الأشكال (34-3) و(35-3) و(36-3) أظهر مستخلص الملفوف الأحمر تثبيط للوذمة المستحثة بواسطة زلال البيض حيث أظهر مستخلص الأنتوسيانين بإستخدام جرعة 250 ملغم/كغم نسبة تثبيط أقل من الأسبرين 25 ملغم/كغم ودايكلوفيناك الصوديوم 1.5 ملغم/كغم لكن عند استخدام جرعة 500 ملغم/كغم أظهر نسبة تثبيط أقل من الأسبرين 50 ملغم/كغم وأعلى من دايكلوفيناك الصوديوم 3 ملغم/كغم وأظهر مستخلص الأنتوسيانين 1000 ملغم/كغم نسبة تثبيط أعلى من الأسبرين بجرعة 100 ملغم/كغم ودايكلوفيناك الصوديوم 6 ملغم/كغم عند الوقت 60 دقيقة وأقل من الأسبرين لكن مساوية لدايكلوفيناك الصوديوم.

ومن خلال متابعة الحيوانات لمدة ستة أسابيع بعد إجراء هذه الإختبارات لم يلاحظ عليها آثار تسمم.

وهذه النتائج تتوافق مع النتائج التي تم التوصل إليها عند تحضير أستر قليل الأتلين للأندوميثاسين ودُرست إستقراريته وفعاليته كمضادات إلتهاب وكمسكنات والنشاط المقرح في الفئران والجرذان وأظهرت نشاط مضاد للإلتهاب أفضل ومماثل للمركبات الأصل مع أنخفاض كبير في التأثير المقرح للمعدة<sup>(194)</sup>. وعندما تم تحضير أستر ثلاثي أتلين كلاكول اندوميثاسين وكان المركب الناتج قادر على تثبيط الألتهاب للوذمة المستحثة بواسطة الكاراجينان<sup>(195)</sup>. وتم تحضير وتشخيص أسترات 2-acyl phenyl و 2-formylphenyl لكل من الأندوميثاسين

والكيتوبروفين والأيبوبروفين والأسبرين وبينت الدراسة بأن أسترات 2-formyl phenyl هي عوامل مضادة للالتهاب أقوى من المركبات الأصل<sup>(196)</sup>. وتم تحضير مركبات أستر الألكيل للأيبوبروفين وأظهرت تحسن كبير في النشاط المضاد للالتهاب في نموذج الوذمة المستحثة بواسطة الكاراجينان في الجرذان وإنخفاض في قابلية تكوين القرحة في الجهاز الهضمي<sup>(197)</sup>. لكن لا تتفق مع النتائج التي توصل إليها Bhosle عندما حضر المركب الناتج من الهستدين المتقارن مع الدايكولوفيناك الناتج من كلوريد حامض الدايكولوفيناك مع كلوريد أستر الهستدين وأظهر فعالية مضادة للالتهاب أقل من الدايكولوفيناك<sup>(198)</sup>

### **3-5-3 نموذج الوذمة المستحثة بواسطة الكاراجينان**

تم إستحداث إلتهاب في يد الجرذان وقيس تركيز  $PGE_2$  في الدم ثم حقنت الجرذان بالمركبات المحضرة والمستخلصات وقيس تركيز  $PGE_2$  كما مبين في الجدول (3-4) للتأكد فيما إذا فعالية المركبات المحضرة والمستخلصات كمضادات التهاب ناتجة عن تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية لأن آلية عمل المسكنات ومضادات الإلتهاب تعتمد على تثبيط إنتاج البروستاغلاندينات عن طريق تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية حيث أعتبر  $PGE_2$  كوسيط كيميائي في الإلتهاب وينتج بوفرة في حالات الإلتهاب مقابل تركيز أقل تحت الظروف الفسلجية. إذ تبين النتائج إزدياد تركيز  $PGE_2$  في بلازما الدم للجرذان عند إستحداث التهاب بواسطة الكاراجينان لكنه ينخفض عند حقن الجرذان بالأدوية والمركبات المحضرة والمستخلصات. وتعزى الزيادة الكبيرة في تركيز  $PGE_2$  إلى التعبير عن COX-2. ومن المفترض إن المثبطات الإنتقائية تختزل الزيادة في تركيز  $PGE_2$  بعد الحقن بالكاراجينان لكن أظهر السليكوكسيب (مثبط إنتقائي لـ COX-2) إنخفاض كبير في تركيز  $PGE_2$  ويعزى ذلك إلى إنه على الرغم من إن COX-2 هو النظير الوحيد الذي يستحث في الحالات المرضية إلا إنه يتم التعبير عن COX-2 في الظروف الفسلجية.

**جدول (3-4) نسبة الانخفاض في تركيز  $PGE_2$  لبلازما الدم بواسطة المركبات المحضرة**

**والمستخلصات**

Treatment	Mean $PGE_2$ Conc $\pm$	P value	Percent of
-----------	-------------------------	---------	------------

	SEM (pg/ml)		inhibition %
Control 1 (no carrageenin)	1251 ± 82.4		
Control 2 (with carrageenin)	1805 ± 124.6		
Ibuprofen	415 ± 22.3		77.90
2	713 ± 14.2	P < 0.01	60.49
Naproxen	438 ± 29.6		75.73
4	612.4 ± 23.1	P < 0.01	66.73
5	952 ± 44.3		47.25
6	369 ± 29.5	P < 0.01	79.55
7	402 ± 26.1	P < 0.01	77.72
Diclofenac	318 ± 21.5		82.38
10	598 ± 34.7		66.86
11	441 ± 29.4	P < 0.01	75.56
12	333 ± 20.9	P < 0.01	81.55
13	336 ± 18.7	P < 0.01	81.38
Mefanemic	402.02 ± 31		77.72
15	701 ± 79.4	P < 0.01	61.16
16	648 ± 15.6		64.09
17	695.4 ± 34.7	P < 0.01	61.47
Redcabbage	513 ± 38.2	P < 0.01	71.57
Mint	460 ± 11.9		74.51
Celecoxib	668 ± 12.2	P < 0.01	62.99

بعد ان أظهر مستخلص الأنتوسيانين من الملفوف الأحمر فعاليته كمسكن للألم ومضاد التهاب وأظهر تثبيط لإنتاج البروستاغلاندين  $PGE_2$  نستنتج من ذلك أن الملفوف الأحمر يمتلك خصائص مضادة للالتهاب وان إحدى آليات عمله هي تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية حيث توجد دراسات عديدة عن فعالية الأنتوسيانينات كمضادات أكسدة في المختبر لكن عملية الأيض داخل الجسم قد تغير النشاط البيولوجي حيث أن المعلومات عن الأمتصاص والتمثيل الغذائي والتوزيع بين الأنسجة والأعضاء داخل جسم الإنسان نادرة لأنها معقدة ومكلفة ومطولة وأحياناً متناقضة مع النتائج (200,199).

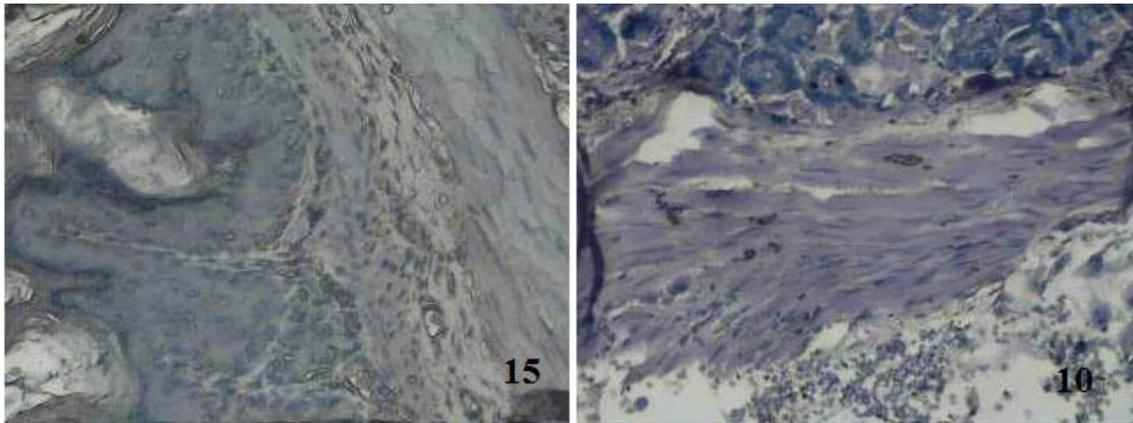
واعتبر حامض بروتوكاتشيك (Protocatechuic acid (3,4 dihydroxy benzoic acid) هو المستقلب الرئيسي لـ Cyanidin-3-glucoside<sup>(201)</sup>، لذلك المركبات الفينولية قد تفسر فعالية الأنتوسيانينات كمضادات التهاب ومضادات أكسدة أجريت هذه الدراسة للتأكد فيما لو كانت عملية تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية هي إحدى آليات عمل الأنتوسيانينات كمضادات التهاب . وذكرت

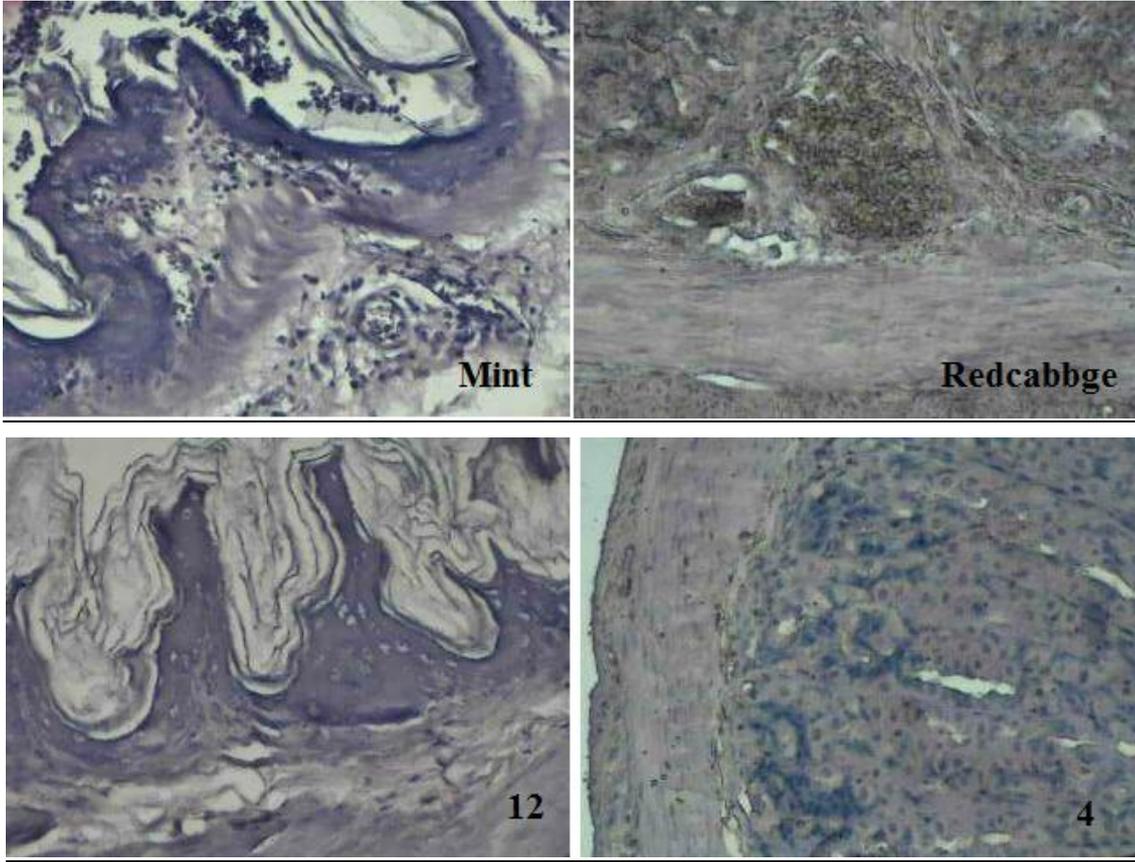
دراسات سابقة أن الأنتوسيانينات تثبط التعبير عن COX-2 سواء على مستوى mRNA أو على مستوى البروتين والأنترلوكينات المختلفة و NF-kB<sup>(202,203)</sup>. إن عمل الأنتوسيانينات كمثبطات لأنزيمات الأكسدة الحلقية يجعلها تمتلك تأثير مضاد للالتهاب. وقد ذكر بعض الكتاب ان مستخلص الكرز والتوت هي مثبطات لأنزيمات الأكسدة الحلقية<sup>(204)</sup>. وذلك يعزز دور الأنتوسيانينات للوقاية من أمراض السرطان ومرض الزهايمر، وبذلك يكون الملفوف الأحمر ذو فائدة صحية كبيرة بالإضافة الى دوره في الوقاية من السرطان والزهايمر إذ له دور في تخفيض خطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية ومرض السكري والتهاب المفاصل من خلال خصائصه المضادة للأكسدة والالتهاب<sup>(205,206)</sup>. أما زيت النعناع فيمتلك خصائص مهدئة للألم لذلك يستخدم سريرياً كمكون في العديد من الكريمات المسكنة وفي علاج إتهاب المفاصل والعضلات الهيكلية يخفف من تأثير نبضات الألم عن طريق التأثير القابض وتثير الأعصاب التي تميز الإحساس بالبرودة وهذا لا يسبب عدم الإحساس بالألم فقط بل يشجع تدفق الدم إلى الجزء المعالج من الجسم ويمكن أن يساعد النعناع في تهدئة الصداع<sup>(207)</sup>. ولا توجد دراسة سابقة حول عمل زيت النعناع كمثبط لأنزيمات الأكسدة الحلقية وفي هذه الدراسة تبين النتائج أن زيت النعناع يمتلك تأثير مسكن للألم ومضاد للالتهاب وأن إحدى آليات عمله كمسكن ومضاد للالتهاب تتم عن طريق تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية بعد أن تم قياس مستوى البروستاغلاندين PGE<sub>2</sub>.

### **3-6 اختبار قرحة المعدة**

تستخدم مضادات الالتهاب غير الستيرويدية لعلاج الألم والالتهاب إلا إنه يتم إستخدامها بشكل محدود بسبب الآثار الجانبية على الجهاز الهضمي والتي تتراوح من عسر الهضم إلى أعراض نزيف تهدد الحياة أو ثقب تقرحات المعدة لأنها تثبط إنتاج البروستاغلاندينات المسؤولة عن حماية الجهاز الهضمي<sup>(208)</sup> وللتخلص من الآثار السامة لمضادات الالتهاب غير الستيرويدية التقليدية على الجهاز الهضمي إذ تم تطوير المثبطات الانتقائية لأنزيم COX-2 ومثبطات أنزيمات الأكسدة الحلقية المانحة لأوكسيد النتريك إذ أظهرت المجاميع المانحة لأوكسيد النتريك Nitric Oxide (NO) بعض الخصائص المفيدة مثل بعض الأنشطة الوقائية المحلية بما في ذلك توسع أوعية الغشاء المخاطي والوقاية من إلتصاق الخلايا المتعادلة في الأوعية الدقيقة في كل من المعدة والأمعاء والحفاظ على سلامة خلايا الغشاء المخاطي وأثبتت تحسين الأنشطة الدوائية حيث أصبحت مثبطات أنزيمات الأكسدة الحلقية المانحة لأوكسيد النتريك Cyclooxygenase

(CINODs) (COX)-inhibiting nitric oxide donators هي صنف جديد من الأدوية التي تعمل كمسكنات من خلال تثبيط COX وسلامة الجهاز الهضمي من خلال آثار وقائية عن طريق منح أوكسيد النتريك<sup>(210,209)</sup> وفي هذه الدراسة تم إجراء تحويلات على عدد من مضادات الالتهاب للتخلص من هذه الآثار الجانبية تم استخدام جرعة 30 ملغم/كغم للمركبات المحضرة وجرعة 1000 ملغم/كغم لكل من زيت النعناع ومستخلص الملفوف الأحمر (اللهاثة) ولم تظهر النتائج أي آثار لوجود تقرحات في المعدة كما هو مبين في الشكل (3-37).





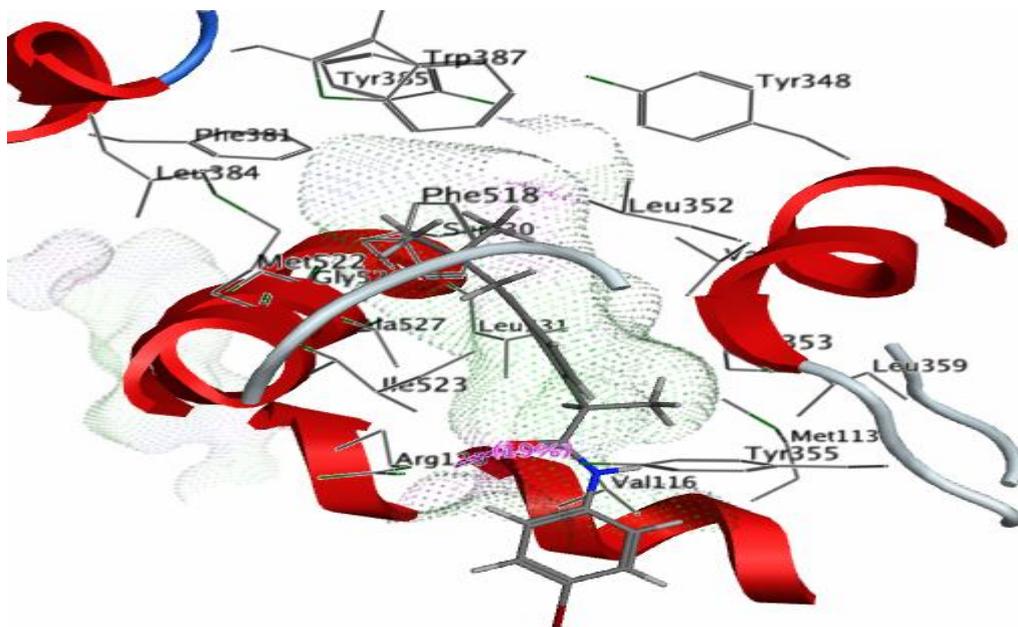
مصور (37-3) صور بالمجهر الضوئي توضح النسيج الطلائى لمعدة الفئران

### 6-3 الإلتحام الجزيئي

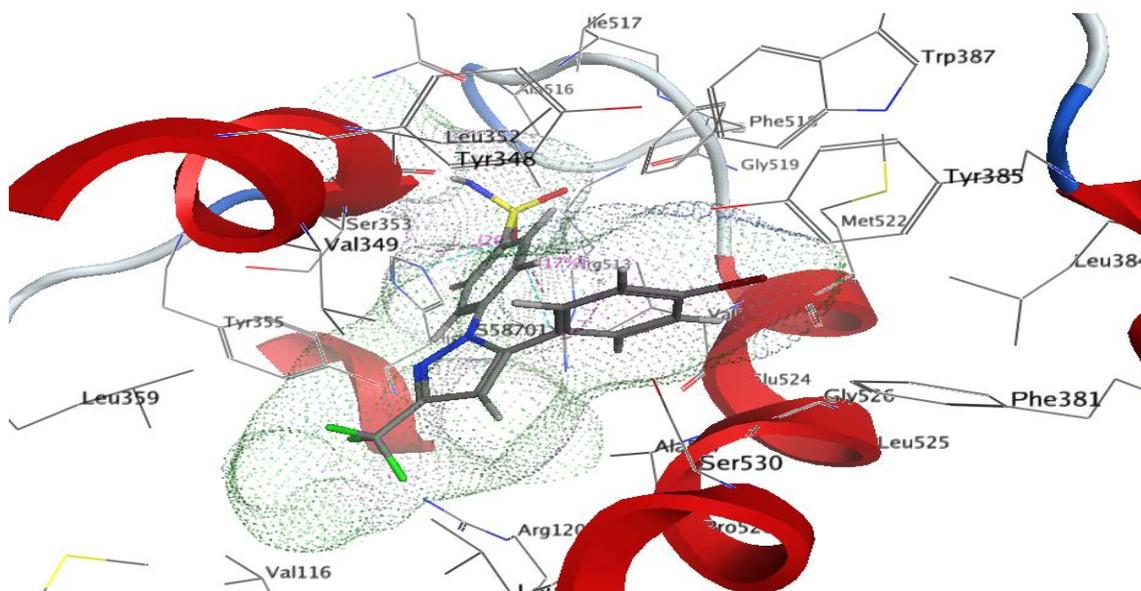
أستخدم الإلتحام الجزيئي لبيان كيفية إرتباط المركبات المحضرة في هذه الدراسة مع الموقع الفعال للأنزيم وبيان الأحماض الأمينية الحاسمة في عملية إرتباط المثبطات داخل الأنزيم بعد أن تمت إزالة جزيئات الماء والجزيئات الأخرى الموجودة ضمن التركيب البلوري للأنزيم تم اجراء عملية إعادة الإلتحام لكل من 2-(1,1'-biphenyl-4-yl)propanoic acid و SC558 الموجودة ضمن التركيب البلوري لكل من COX-2,COX-1 على التوالي وكانت قيم  $1.38\text{\AA}$  RMSD لـ 2-(1,1'-biphenyl-4-yl)propanoic acid و  $0.94\text{\AA}$  لـ SC558 إذ كانت أقل من  $2.00\text{\AA}$  التي تكون معيار لنجاح عملية الإلتحام ويكون الإلتحام ناجح عندما تكون قيمة RMSD أقل من  $2.00\text{\AA}$ . وتم إجراء الإلتحام للمركبات المحضرة بعد أن تم التأكد من نجاح عملية إعادة الإلتحام.

يتداخل المركب 2 مع الموقع الفعال للأنزيم COX-1 يكون فقط أواصر هيدروجينية مع Arg120 ( $2.82\text{\AA}$ ). أما مع COX-2 عن طريق تكوين أواصر هيدروجينية بين الأوكسجين

وArg120 (2.71 Å)، Tyr355 (4.93 Å) وتكوين تداخلات arene-cation بين الحلقة الأروماتية المعوضة بالبروم وArg513.



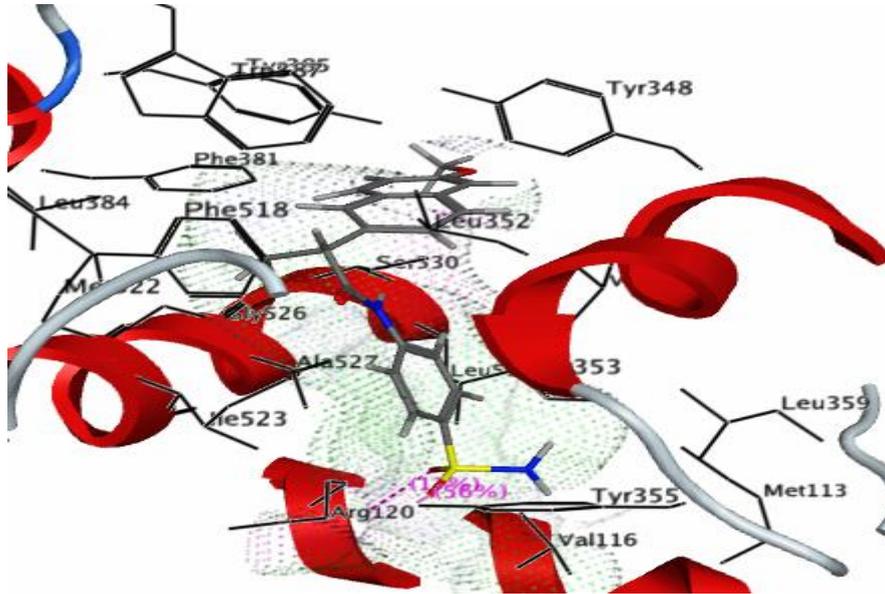
شكل (38-3) إلتحام المركب 2 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-1



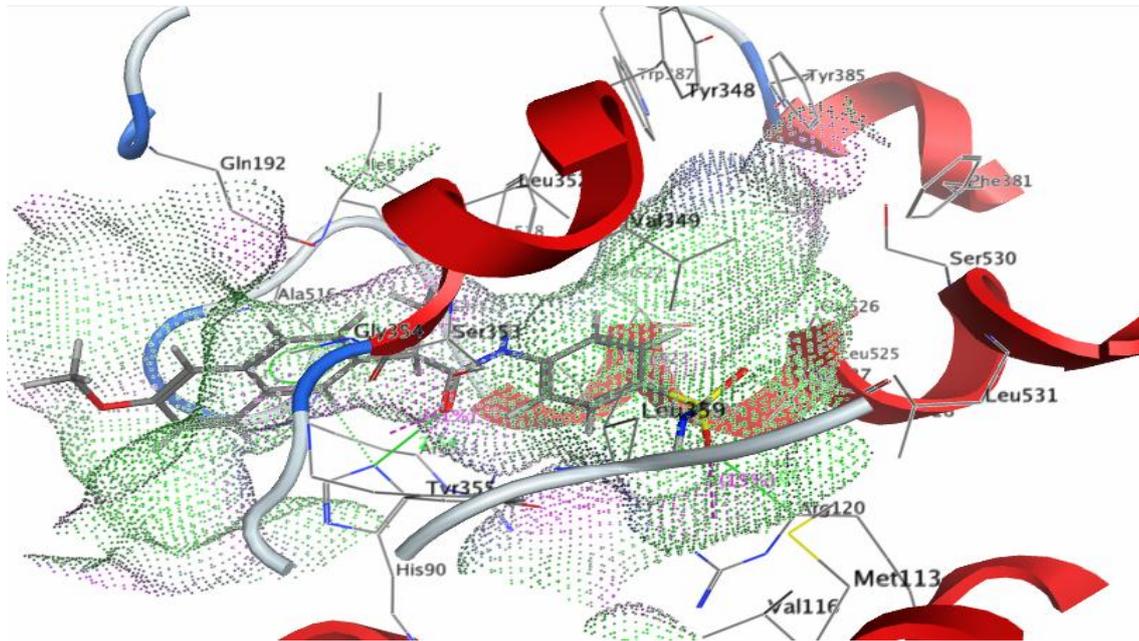
شكل (39-3) إلتحام المركب 2 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2

أما المركب 4 يتداخل مع COX-1 عن طريق التآصر الهيدروجيني مع Arg120 (4.27 Å) ويرتبط مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2 عن طريق تكوين أوامر هيدروجينية بين مجموعة السلفونيل أميد وArg120 (3.05 Å) وأصرة هيدروجينية أخرى بين

مجموعة الكاربونيل و His90 (2.64 Å) وتداخل arene-cation بين إحدى حلقتي النفثالين و Arg513.

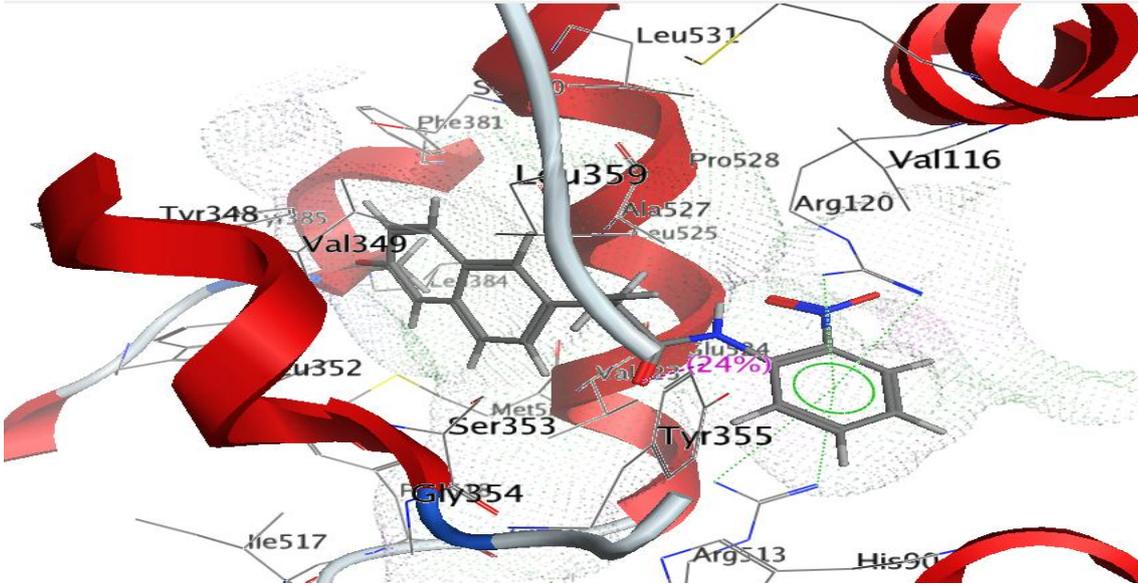


شكل (3-40) إلتحام المركب 4 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-1



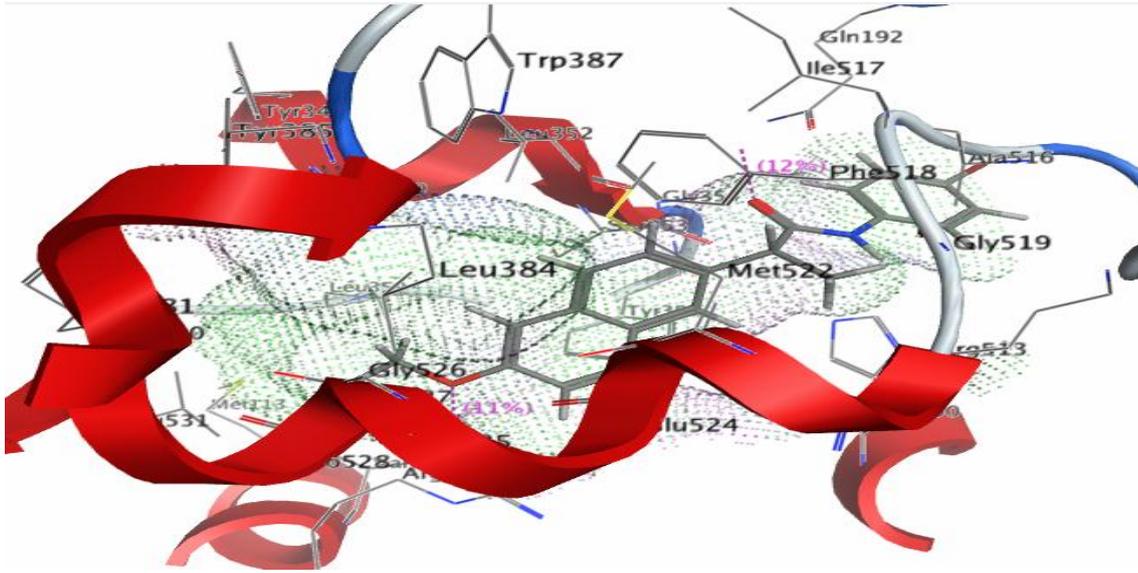
شكل (3-41) إلتحام المركب 4 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2

ويتداخل المركب رقم 5 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2 عن طريق تكوين أوامر هيدروجينية بين مجموعة الكاربونيل و Tyr355 (4.20 Å) وتداخلات بين الحلقة المعوضة بالنايترو و Arg120, Arg513.



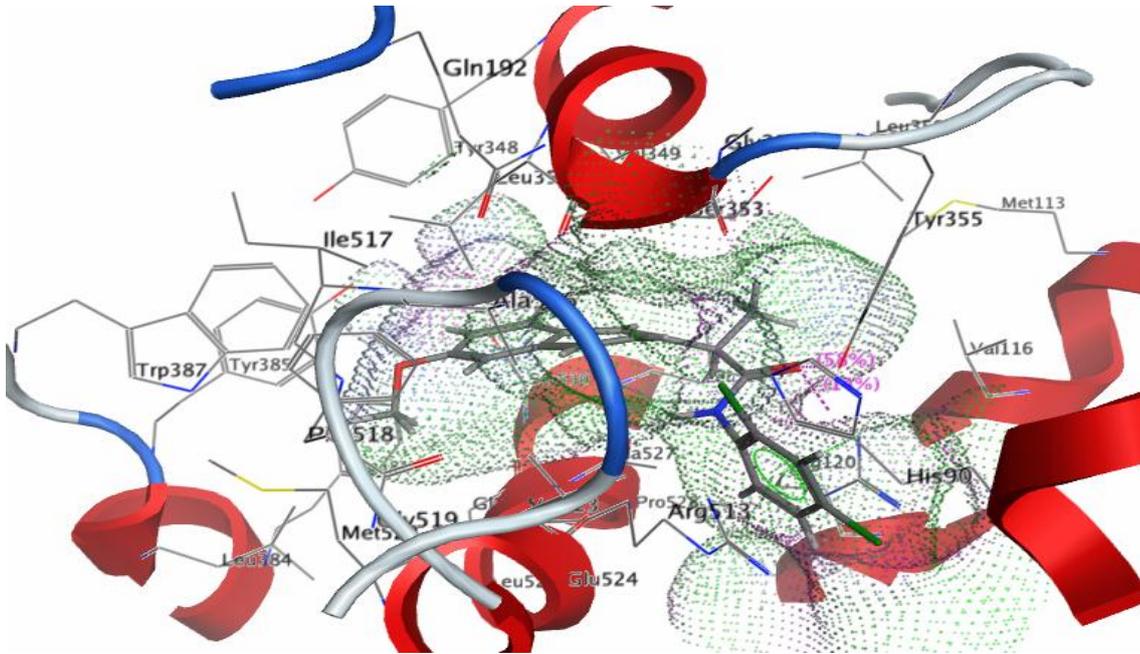
شكل (3-42) إلتحام المركب 5 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2

المركب 6 يتداخل عن طريق تكوين أوامر هيدروجينية بين مجموعة الميثوكسي و Arg120 (2.14 Å) وأوامر هيدروجينية بين مجموعة الكاربونيل و Gln192 (3.00 Å)



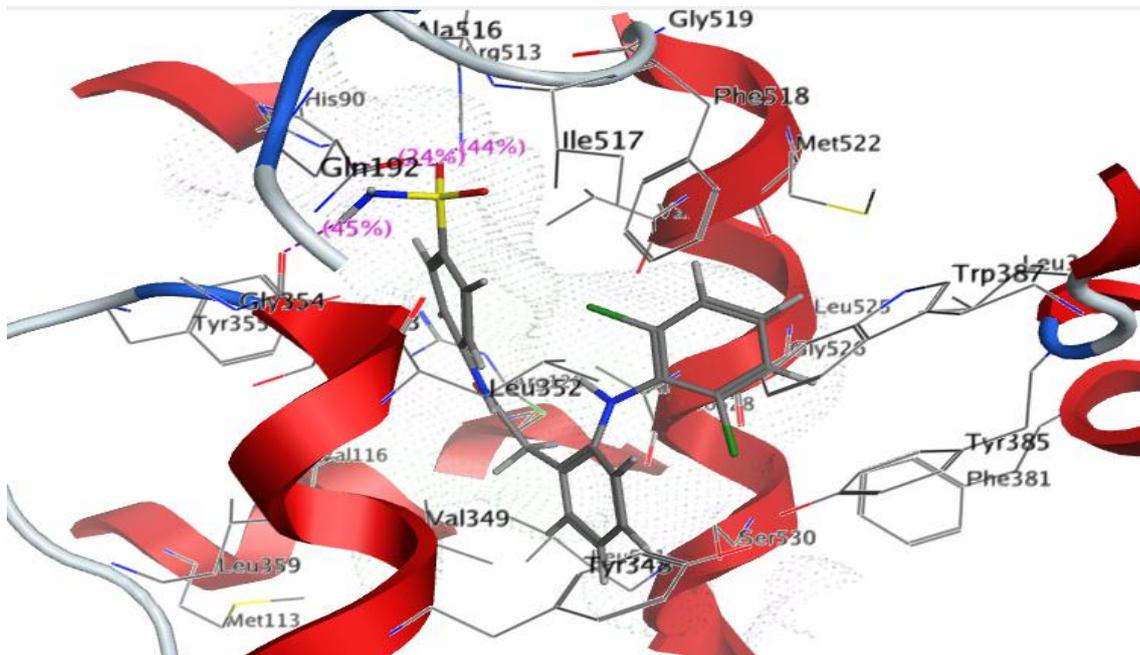
شكل (3-43) إلتحام المركب 6 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2

ويتداخل المركب 7 عن طريق التآصر الهيدروجيني بين الكاربونيل و Arg120 (4.20 Å) و Tyr355 والتداخل بين Arg120 والحلقة الأروماتية المعوضة بالكلور



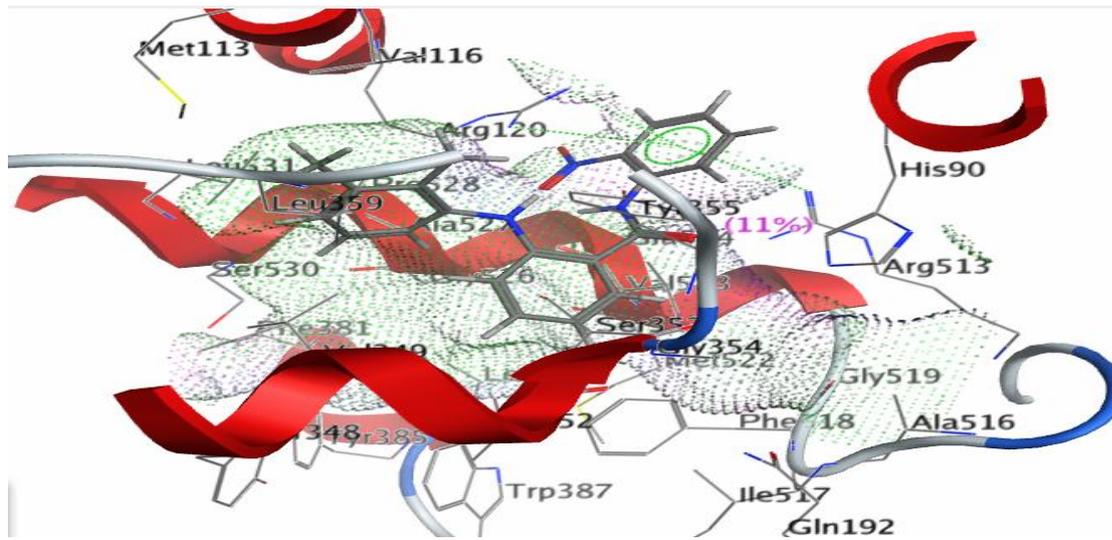
شكل (44-3) إلتحام المركب 7 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2

أما المركب 10 فيتداخل عن طريق التآصر بين مجموعة السلفونيل أميد و His90 ( $2.58 \text{ \AA}$ ) و Arg513 ( $2.67 \text{ \AA}$ ) والتآصر بين هيدروجين مجموعة السلفونيل أميد و Ser353 ( $1.66 \text{ \AA}$ )



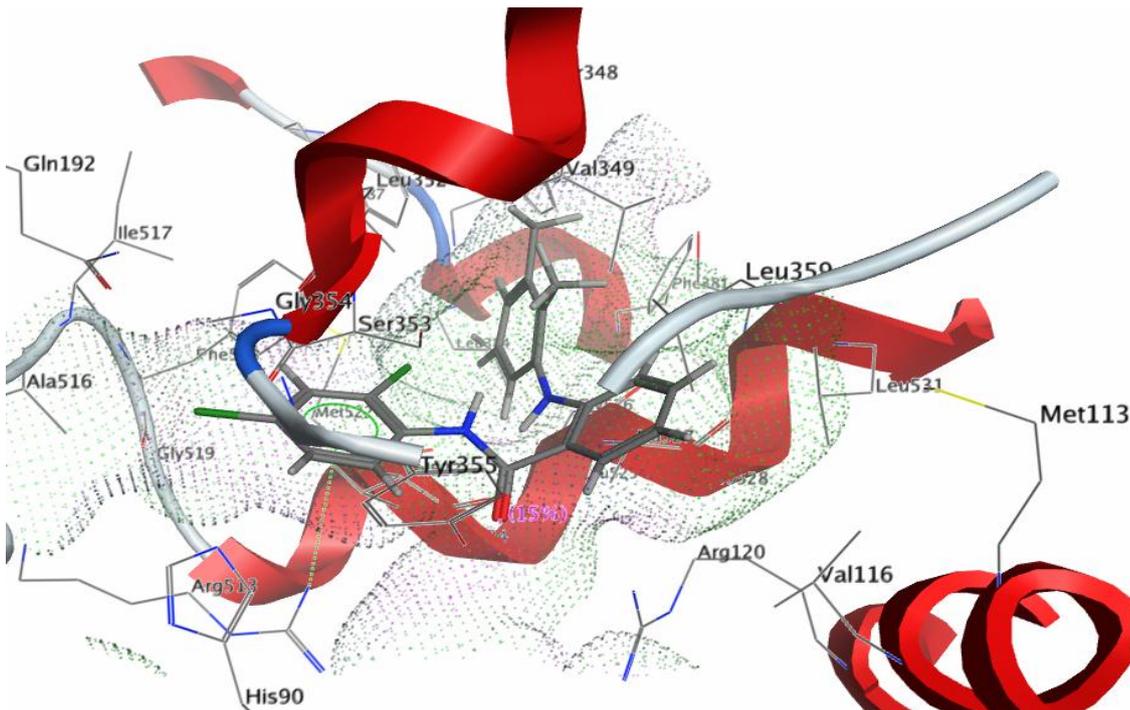
شكل (45-3) إلتحام المركب 10 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2

والمركب 15 يتداخل عن طريق التآصر الهيدروجيني بين مجموعة الكربونيل و Arg513 والتداخل بين الحلقة الأروماتية المعوضة بمجموعة النايترو و Arg120, Arg513



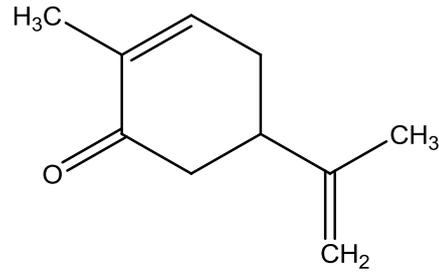
شكل (3-46) إلتحام المركب 15 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2

أما المركب 16 يتداخل مع الموقع الفعال عن طريق تكوين أوامر هيدروجينية بين مجموعة الكاربونيل و Tyr355 والتداخل بين الحلقة الأروماتية و Arg513.



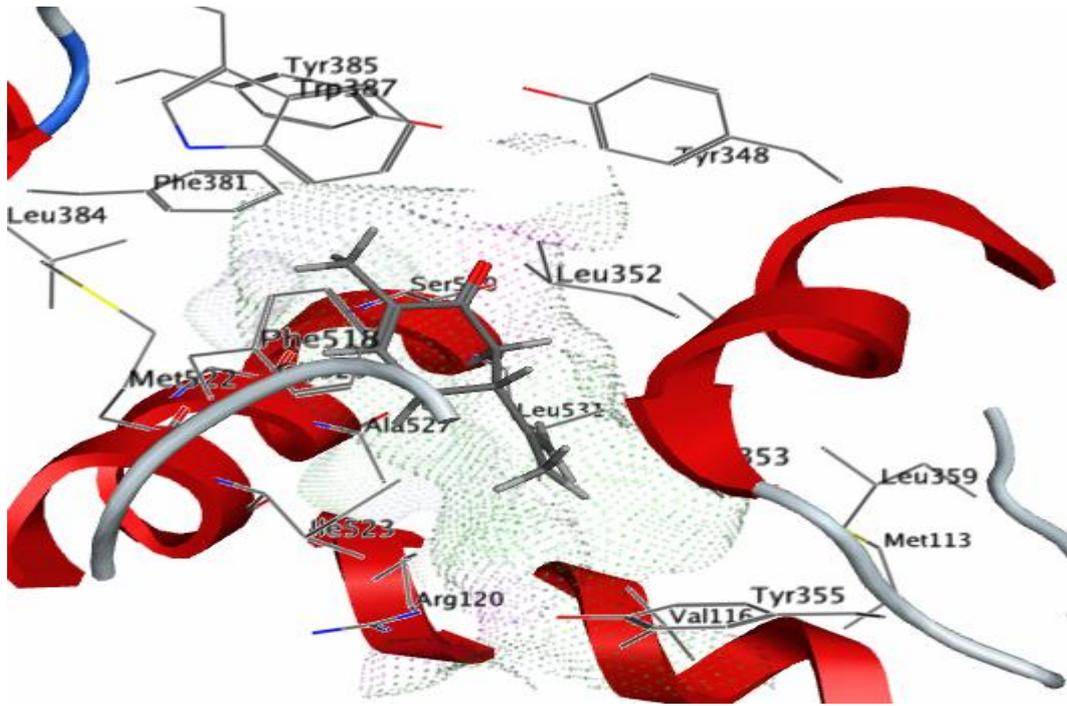
شكل (3-47) إلتحام المركب 16 مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2

من خلال دراسات سابقة تبين بأن زيت النعناع يتكون من 50.33% من 1-Carvone<sup>(211)</sup>.

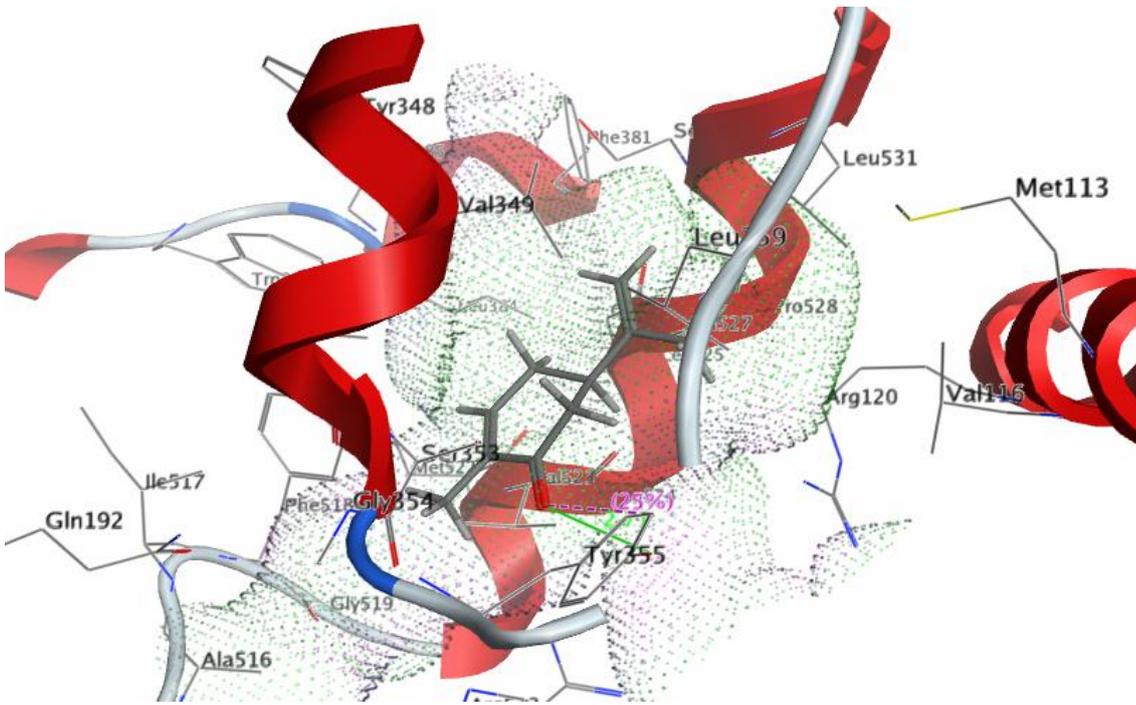


1-Carvone

ومن خلال إجراء الإلتحام الجزيئي للكارفون مع كل من COX-1 و COX-2 تبين بأن الكارفون لم يكون أي تأصر مع COX-1 لكنه يتأصر مع أنزيم COX-2 عن طريق تكوين أصرة هيدروجينية بطول (2.71 Å) مع Tyr355 ونستنتج من ذلك إنه رغم صغر حجم جزيئة الكارفون إلا إنها مثبتة إنتقائي لآنزيم COX-2.



شكل (48-3) إلتحام الكارفون مع الموقع الفعال لأنزيم COX-1



شكل (3-49) إلتحام الكارفون مع الموقع الفعال لأنزيم COX-2

# الاستنتاجات والتوصيات

## الإستنتاجات

من خلال النتائج المستحصلة من الإختبارات داخل جسم الكائن الحي ومن الألتحام الجزيئي للمركبات مع الموقع الفعال لأنزيمات الأكسدة الحلقية تبين:

1. إن تحويل مجموعة الكاربوكسيل لبعض مضادات الالتهاب المعروفة ( الأيبوبرفين، النابروكسين، دايكلوفيناك الصوديوم والميفيناميك) إلى مجموعة أمايدية يحافظ أو يزيد النشاط المضاد للالتهاب والنشاط المسكن للألم ويكوّن مركبات تُظهر نسبة إنتقائية لأنزيم COX-2 ولا تسبب أضرار للجهاز الهضمي.
2. وجد أن المركب 4 الناتج من دمج النابروكسين مع السلفونيل أمايد والمركب 10 الناتج من دمج الدايكلوفيناك مع السلفونيل أمايد هما الأكثر فعالية كمسكنات.
3. أعطى زيت النعناع 1000 ملغم/كغم فعالية مكافئة لـ 6 ملغم/كغم من الدايكلوفيناك.
4. ان كلاً من مستخلص الملفوف الأحمر (اللهاثة) وزيت النعناع تمتلك نشاط مسكن للألم ومضاد للالتهاب عن طريق تثبيط أنزيمات الأكسدة الحلقية ومن خلال الحسابات النظرية تبين أن زيت النعناع هو مثبط إنتقائي لأنزيم COX-2 .

## التوصيات

لذلك نوصي بـ :

إختبار سمية هذه المركبات وإختبار فعاليتها في المختبر على كل من COX-1 و COX-2 ويؤمل أن تستخدم مستقبلاً كمضادات إلتهاب أمنة الاستخدام.  
فصل وتنقية مركبات زيت النعناع ومستخلص الملفوف الأحمر.  
إجراء دراسة نظرية بشكل موسع قبل البدء بتحضير أي مثبط لمعرفة مدى فعاليته لتقليل التكاليف والوقت والجهد.



# المصادر

## References

1. Ivković TC. Cyclooxygenase Isoforms in Tumorigenesis. *Period boil.* **2010**; 112(4) :441-449 .
2. Somvanshi R K, Kumar A and Kant S . Surface plasmon resonance studies and biochemical evaluation of a potent peptide inhibitor against cyclooxygenase-2 as an anti-inflammatory agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **2007**; 361:37–42.
3. Sharma S K, Al-Hourani B J and Wuest M. Synthesis and evaluation of fluorobenzoylated di- and tripeptides as inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2012**; 20: 2221–2226.
4. Sharma V, Laxmi V and Chauhan S. Cyclooxygenase-3: A Review. *Am. J. PharmTech Res.* **2012**; 2:236-242.
5. Fitzgerald GA and Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Eng J Med.* **2001**; 345:433-442.
6. Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C and Browner MF. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* **1996**;3(11):927-933.
7. Rao PNP and Knaus E. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory: (NSAIDs) Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *J Pharm Pharmaceut Sci.* **2008**;11 (2): 81s-110s.
8. Vane JR and Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research.* **2003**; 110 : 255–258.
9. Okoh OO and Afolayan AJ. The effects of hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods on the chemical composition and toxicity of essential oils from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis.* *AJPP.* **2011**; 5(22):, 2474-2478.
10. Reddivari L, Vanamala J, Chintharlapalli S, Safe, S H and Miller JC. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis.* **2007**; 28(10): 2227-2235.
11. Zhao C, Giusti M M, Malik M, Moyer MP and Magnuson BA. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and

nontumorigenic colonic cell growth. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**;52(20): 6122-6128.

12. Satue-Gracia M, Heinonen M and Frankel E N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1997**; 45(9): 3362-3367.

13. Tanchev SS and Timberlake CF. The anthocyanins of red cabbage (*Brassica oleracea*). *Phytochemistry*. **1969**; 8(9): 1825-1827.

14. Ke YY, Shiao HY, Hsu YC, Chu CY, Wang WC, Lee YC, Lin WH and Chen CH. 3D-QSAR-assisted drug design: identification of a potent quinazoline-based Aurora kinase inhibitor. *ChemMedChem*. **2013**;8(1): 136-48

15. Garrett M. Morris and Marguerita Lim-Wilby, Molecular Docking, In *Molecular Modeling of Proteins Methods in Molecular Biology*, **2008**, 443.365-382.

16. Varghese M and Lockey RF. Aspirin-Exacerbated Asthma. *Allergy Clin Immunol*.**2008**;4(2):75-83.

17. Dreser H. Pharmacologisches uber Aspirin (Acetylsalicyl-saure). *Pflugers Arch*. **1899**;76:306– 18.

18. Euler US. Information on the pharmacological effect of natural secretions and extracts from male accessory glands. *Arch Exp Pathol Pharm*.**1934**; 175:78–84

19. Beaver WT. Mild analgesics: a review of their clinical pharmacology. *Am J Med Sci*. **1965**;250:577– 604.

20. Guzman F, Braun C, Lim RKS, Potter GD and Rodgers DW. Narcotic and non-narcotic analgesics which block visceral pain evoked by intra-arterial injections of bradykinin and other algesic agents. *Arch Int Pharmacodyn*. **1964**;149:571–88.

21. Van D, Beerthuis RK, Nugteren DH and Vonkeman H. The biosynthesis of prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*.**1964**; 90:204–207.

22. Bergstrom S, Danielsson H and Samuelsson B. The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid: prostaglandins and related factors 32. *Biochim Biophys Acta*.**1964**; 90:207–210.

23. Smith WL and Lands WE. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry*.**1972**; 11:3276–3285.
24. Nugteren DH and Hazelhof E. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*.**1973**;326:448–461.
25. Hamberg M and Samuelsson B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*.**1973**; 70:899–903.
26. Simmons DL, Botting RM and Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev*.**2004**; 56:387–437.
27. Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA*.**1975**; 72:2994–2998.
28. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S and Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*.**1976**; 263:663–665.
29. Picot D, Loll PJ and Garavito RM. The xray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*.**1994**; 367:243-249.
30. Garavito RM and Mulichak AM. The structure of mammalian cyclooxygenase. *Annu. Rev. Biophys. biomol. Struct.***2003**;32:183-206.
31. Vane JR, Bakhle YS and Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**; 38:97–120
32. W. L. Smith and D. L. DeWitt. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol*.**1996**; 62:167-215.
33. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM and Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell*. **1997**; 91:197-208.
34. Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, McKanna JA and Harris RC. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest*.**1999**; 103:953-961.

35. Breder CD, DeWitt DL and Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol.***1995** 355:296-315.
36. Pilbeam CC, Fall PM, Alander CB and Raisz LG. Differential effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on constitutive and inducible prostglandin G/H synthase in cultured bone cells. *J Bone Miner Res.***1997**; 12:1198-1203
37. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS and Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2002**; 99(21): 13926-13931.
38. Scheiman J M. NSAIDs, gastrointestinal injury, and cytoprotection. *Gastroenterol. Clin. N. Am.***1996**; 25(2): 279–298.
39. Zimmermann KC, Sarbia M, Schor K and Weber AA. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol.* **1998**;54(3):536-540.
40. Turini ME and DuBois RN. Cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target. *Annu. Rev. Med.* **2002**; 53:35–57.
41. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, DuBois RN and Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa in rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest.***1994**; 94: 2504–2510.
42. Guan Y, Chang M, Cho W, Zhang Y, Redha R, Davis L, Chang S, DuBois RN, Hao CM and Breyer M. Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am. J. Physiol.* **1997**; 273: F18– F26.
43. Harris RC. The macula densa: recent developments. *J. Hypertension.* **1996** 14(7), 815–822.
44. Breyer MD, Jacobson HR and Breyer RM. Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.***1996**; 7(1): 8–17.
45. Yokoyama C, Takai T and Tanabe. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett.***1988**; 231(2):347-351

46. Dwivedi A, Singh A and Srivastava AK. Quantitative structure–activity relationship based modeling of substituted indole Schiff bases as inhibitor of COX-2. *J. of Saudi Chemical Society*.**2013**
47. Malkowski MG, Ginell SL, Smith WL and Garavito RM The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science*.**2000**; 289(5486):1933–1937.
48. Thuresson ED, Lakkides KM, Rieke CJ, Sun Y, Wingerd BA, Micielli R, Mulichak AM, Malkowski MG, Garavito RM, and Smith WL Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the function of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *J Biol Chem*.**2001**; 276(13):10347–10358.
49. Smith WL, DeWitt DL and Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Ann Rev Biochem*.**2000**; 69:145-182
50. Picot D, Loll P, Garavito M .The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature (Lond)*.**1994**; 367(6460):243–249.
51. Saptarini NM, Sitorus EY, Levita J. Structure-Based *in Silico* Study of 6-Gingerol, 6-Ghogaol, and 6-Paradol, Active Compounds of Ginger (*Zingiber officinale*) as COX-2 Inhibitors. *International Journal of Chemistry*.**2013**; 5( 3): 12-18.
52. Schneider C, Boeglin WE, Prusakiewicz JJ, Rowlinson SW, Marnett LJ, Samel N, Brash AR Control of prostaglandin stereochemistry at the 15-carbon by cyclooxygenase-1 and -2. A critical role for serine 530 and valine 349. *J Biol Chem*.**2002**; 277:478–485.
53. Rieke CJ, Mulichak AM, Garavito RM and Smith WL The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J Biol Chem*.**1999**; 274:17109–17114.
54. Kulmacz RJ, Van der Donk WA, Tsai AL. Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2. *Prog. Lipid Res*.**2003**; 42: 377- 404.

55. Dietz R, Nastainczyk W, Ruf HH, Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G<sub>2</sub>. *Eur J Biochem* .**1988**; 171 (1-2): 321-8.
56. Karthein R, Dietz R, Nastainczyk W, Ruf HH. Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction. *Eur J Biochem* **1988**; 171: (1-2), 313-20.
57. Garavito RM, DeWitt DL. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*. **1999** ;23;1441(2-3):278-87.
58. Malkowski MG, Ginell SL, Smith WL, Garavito RM The Productive Conformation of Arachidonic Acid Bound to Prostaglandin Synthase. *SCIENCE*.**2000**;289: 1933-1937.
59. Hamberg M and Samuelsson B. Oxygenation of Unsaturated Fatty Acids by the Vesicular Gland of Sheep. *J. Biol. Chem.* **1967**, 242:5344-5354.
60. Dietz R, Nastainczyk W, and Ruf HH. Higher oxidation states of prostaglandin H synthase Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G<sub>2</sub>. *Eur. J. Biochem.***1988**; 171:321 -328.
61. Flower RJ. Prostaglandins, bioassay and inflammation. *British Journal of Pharmacology*. **2006**;147: S182–S192.
62. Narumiya S, Sugimoto Y and Ushikubi F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiological Reviews*.**1999**; 79 (4):1193-1226.
63. Smith WL, DeWitt DL, and Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu.Rev.Biochem.***2000**; 69: 145-182.
64. Rouzer CA, and Marnett LJ. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem.Rev.* **2003**; 103: 2239-2304.

65. van der Donk WA, Tsai AL and Kulmacz RJ. The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochemistry* .**2002**;41: 15451-15458
66. Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biology* **2004**; 5:241-6.
67. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS and Lanzo CA. Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2:mechanism of catalysis and inhibition. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274:22903-22906.
68. Serhan CN, Chiang N and Dyke Van TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews/Immunology*. **2008**; 8: 349-361.
69. Keane MP and Strieter RM. Chemokine signalling in inflammation. *Critical Care Medicine*. **2000**; 28: 13-26.
70. Williams TJ and Peck MJ. Role of prostaglandin-mediated vasodilation in inflammation. *Nature*. **1977**; 270: 530-532.
71. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI and Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Immunology*. **2007**; 7: 678-689.
72. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in Immunology*. **2003**; 24: 327-334.
73. Wang HB, Wang JT, Zhang L, Geng ZH, Xu WL, Xu T, Huo Y, Zhu X, Plow ED, Chen M and Geng JG. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nature Immunology*. **2007**; 8: 882-892.
74. Smith JA. Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edged sword. *J. of Leukocyte Biology*. **1994**; 56: 672-686.
75. Mukaida N, Matsumoto T, Yokoi K, Harada A and Matsushima K. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammatory injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8). *Inflammation Research*. **1998**; 47: 151-157.
76. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S and Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Medicine*. **2007**; 13(7) : 851-856.

77. Daniel T, Thobe BM, Chaudhary IH, Choudhary MA, Hubbard WJ and Schwacha MG. Regulation of the postburn wound inflammatory response by  $\gamma\delta$  T-Cells. *Shock*. **2007**; 28(3): 278-283.
78. Mannaioni PF, Bello MG and Masini E. Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflammation Research*. **1997**; 46: 4-18.
79. Tarkowski A, Klareskog L, Carlsten H, Herberts P and Koopman WJ. Secretion of antibodies to type I and II collagen by synovial tissue cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. **1989**; 32: 1087-1092.
80. McGeer EG, Klegeris A and McGeer PL. Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiology of Aging*. **2005**; 26: 94-97.
81. Kitchens RL, Thompson PA, Munford RS and Okeefe GE. Acute inflammation and infection maintain circulating phospholipid levels and enhance lipopolysaccharide binding to plasma lipoproteins. *J. of Lipid Research*. **2003**; 44: 2339-2348.
82. Alford CE, King TE and Campbell PA. Role of transferrin, transferrin receptors, and iron in macrophages listericidal activity. *J. of Experimental Medicine*. **1991**; 174: 459-466.
83. Kelly M, Hwang JM and Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J. of Allergy and Clinical Immunology*. **2007**; 120: 3-10.
84. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D and Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clinical Experimental Immunology*. **2005**; 142: 481-489.
85. Serhan CN and Savill J. Resolution of Inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology*. **2005**; 6: 1191-1197.
86. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K and Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunology*. **2001**; 2: 612-619.
87. Van Dyke TE and Serhan CN. Resolution of Inflammation: A new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *Journal of Dental Research*. **2003**; 82: 82-90.

88. Serhan CN, Jain A, Marleau S, Clish C, Kantarci A, Behbehani B, Colgan SP, Stahl GL, Merched A, Petasis NA, Chan L and Van Dyke TE. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-Lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *The Journal of Immunology*. **2003**; 171: 6856-6865.
89. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S and Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *The Journal of Immunology*. **2005**; 174: 4345-4355.
90. Bellingan GJ, Caldwell H, Howie SE, Dransfield I and Haslett C. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *The Journal of Immunology*. **1996**; 157: 2577-2585.
91. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA and Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *The FASEB Journal*. **1997**; 11: 457-465.
92. Bonniaud P, Margetts P, Ask K, Flander K, Gauldie J and Kolb M. TGF- $\beta$  and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *The Journal of Immunology*. **2005**; 175: 5390-5395.
93. Yamamoto T. Molecular mechanism of monocyte predominant infiltration in chronic inflammation: Mediation by a novel monocyte chemotactic factor, s19 ribosomal protein dimer. *Pathology International*. **2008**; 50: 863-871.
94. Limuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H and Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology*. **2003**; 26: 1530-1537.
95. Qu Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, Ansel JC, Butterfield JH, Planck SR and Rosenbaum JT. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *American Journal of Pathology*. **1995**; 147: 564-573.
96. Decolonne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, Gauldie J, Camus P and Bonniaud P. TGF- $\beta$ 1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *The Journal of Immunology*. **2007**; 179: 6043-6051.

97. Marin V, Julian AM, Gres S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C and Kaplanski G. The IL-6-Soluble IL-6R $\alpha$  Autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *The Journal of Inflammation*. **2001**; 167: 3435-3442.
98. Conti P and DiGiacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy and Asthma Proceedings*. **2001**; 22: 133-137.
99. Karin M, Lawrence T and Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*. **2006**; 124: 823-835.
100. Allison AC, Ferluga J, Prydz H and Schorlemmer HU. The role of macrophage activation in chronic inflammation. *Inflammation Research*. **2005**; 8: 27-35.
101. Serhan CN, Chiang N and Dyke Van TE. Resolving inflammation: dual antiinflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews/Immunology*. **2008**; 8: 349-361.
102. Mizejewski GJ. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med*. **1999**;222(2):124-38.
103. Balkwill P and Mantovani P. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The Lancet*. **2001**; 357: 539-545.
104. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M and Raymond N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. **1998**; 93: 705-716.
105. Zhao QT, Yue SQ, Cui Z, Wang Q, Cui X, Zhai HH, Zhang LH and Dou KF. Potential involvement of the cyclooxygenase-2 in hepato cellular carcinoma-associated angiogenesis. *Life Sciences*. **2007**; 80: 484-492.
106. Shi X, Chen G, Xing H, Weng D, Bai X and Ma D. VEGF-C, VEGFR-3 and COX-2 enhances growth and metastasis of human cervical carcinoma cell lines in vitro. *Oncology Reports*. **2007**; 18: 241-247.
107. Almeida PR, Ferreira FV, Santos CC, Rocha-Filho FD, Feitosa RR, Falcão EA, Cavada BK, Lima-Júnior RC and Ribeiro RA.

Immunoexpression of cyclooxygenase-2 in primary gastric carcinomas and lymph node metastases. *World J Gastroenterol.* **2012**; 18(8): 778-784.

108. Kraus S, Naumov I and Arber N. COX-2 active agents in the chemoprevention of colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res.* **2013**; 191:95-103.

109. Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H and Hofman A. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology.* **2000**; 54: S4-9.

110. Bayer TA, Schafer S, Breyhan H, Wirths O, Treiber C and Multhaup G. A vicious circle: role of oxidative stress, intraneuronal Abeta and Cu in Alzheimer' s disease. *Clinical Neuropathology.* **2006**; 25: 163-171.

111. Hardy JA and Higgins GA. Alzheimer' s disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* **1992**; 256: 184-185.

112. Hooper C and Pocock JM. Chromogranin A activates diverse pathways mediating inducible nitric oxide expression and apoptosis in primary microglia. *Neuroscience Letters.* **2007**; 413: 227-232.

113. Heneka MT. Inflammation in Alzheimer' s disease. *Clinical Neuroscience Research.* **2006**; 6: 247-260.

114. Dik MG, Jonker C, Hack CE, Smit JH, Comijs HC and Eikelenboom P. Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology.* **2005**; 64: 1371-1377.

115. Fujimi K, Noda K, Sasaki K, Wakisaka Y, Tanizaki Y, Lida M, Kiyohara Y, Kanba S and Iwaki T. Altered expression of COX-2 in subdivisions of the hippocampus during aging and in Alzheimer' s Disease: The Hisayama study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders.* **2007**; 23: 423-431.

116. Fuster-Matanzo A, Llorens-Martín M, Hernández F and Avila J. Role of Neuroinflammation in Adult Neurogenesis and Alzheimer Disease: Therapeutic Approaches. *Mediators of Inflammation.* **2013**; 260925, 9 pages.

117. Franchimont D, Kino T, Galon J, Meduri GU and Chrousos G. Glucocorticoids and inflammation revisited: The state of the art. *Neuroimmunomodulation*. **2003**; 10: 247-260.
118. Yona S and Gordon S. Inflammation: Glucocorticoids turn the monocyte switch. *Immunology and Cell Biology*. **2007**; 85: 81-82.
119. Goulding NJ. The molecular complexity of glucocorticoids actions in inflammation four-ring circus. *Current Opinion in Pharmacology*. **2004**; 4: 629-636.
120. Vane JR and Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *International Journal of Tissue Research*. **1998**; 20: 3-15.
121. Kleiman A and Tuckermann JP. Glucocorticoids receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2007**; 275: 98-108.
122. De Luca F. Impaired growth plate chondrogenesis in children with chronic illnesses. *Pediatric Research*. **2006**; 59: 625-629.
123. Saraf S. NSAIDs Nonsteroidal Antiinflammatory drugs an overview. *PharmaMed Press*. **2008**; PP.1,6,7.
124. Patrignani P, Panara MR, Greco A, Fusco O, Natoli C, Iacobelli S and Cipollone F. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther*. **1994**; 271(3):1705-1712.
125. Smith HS and Baird W. Meloxicam and selective COX-2 inhibitors in the management of pain in the palliative care population. *Am J Hosp Palliat Care*. **2003**; 20:297-306.
126. Grosser T, Fries S and Fitzgerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest*. **2006**; 116(1):4-15.
127. Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K, and Isakson PC Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J*. **1999**; 339:607-614.

128. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK and McDonald JJ. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*.**1996**; 384:644-648.
129. Kawahito Y. Clinical implication of cyclooxygenase-2 inhibitor. *inflammation and regeneration*.**2007**;27(6):552-558.
130. Wessjohann LA. Synthesis of Natural-Product-Based Compound Libraries. *Curr Op Chem Biol*.**2000**; 4: 303-309.
131. Verdine GL. The combinatorial chemistry of nature. *Nature*.**1996**;384: 11-13.
132. Ja'fer ST. The Inhibitory effect of some medicinal plants Extracts in Fungus *Aspergillus niger*. *College of Basic Education Researches J*.**2011**;10(4):521-536.
133. Pongprayoon U, Baeckstrom P, Jacobsson, U, Lindstrom M and Bohlin L. Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Med*.**1991**; 57, 515-518.
134. Noreen Y., Serrano G., Perera P and Bohlin L. Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Planta Med*. **1998**; 64: 520-524.
135. Dunstan C, Liu B, Welch CJ, Perera P and Bohlin L. Alphitol, a phenolic substance from *Alphitonia zizyphoides* which inhibits prostaglandin biosynthesis in vitro. *Phytochem*.**1998**; 48: 495-497.
136. Noreen Y, El-Seedi H, Perera P and Bohlin L. Two new isoflavones from *Ceiba pentandra* and their effect on cyclooxygenase-catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod*.**1998**;61: 8-12.
137. Ringbom T, Segura L, Noreen Y, Perera P and Bohlin L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod*. **1998**;61(10):1212-5.
138. Amaravani M, Prasad NK and Ramakrishna V. COX-2 structural analysis and docking studies with gallic acid structural analogues. *SpringerPlus*. **2012**;1(1):58-65.
139. Srivastava JK, Pandey M and Gupta S. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Life Sci*. **2009**; 85(19-20): 663-669.

140. Kaur P, Kaur S, Kumar S and Singh P. *Rubia cordifolia L.* and *Glycyrrhiza glabra L.* Medicinal Plants as Potential Source of COX-2 Inhibitors. *Am. J. Biomed. Sci.* **2010**; 2(2): 108-120.
141. Madeswaran A, Umamaheswari A and Asokkumar K. Discovery of potential cyclooxygenase inhibitors using in silico docking studies. *Bangladesh J Pharmacol* .**2012**; 7: 21-27.
142. Copeland RA, Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. *Wiley-VCH, Inc.***2000**;282
143. Liao C, Sitzmann M , Pugliese A and Nicklaus MC. Software and resources for computational medicinal chemistry. *Future Med Chem.* **2011** ; 3(8): 1057–1085.
144. Watson P, Hiden H and Woodman S. e-Science Central for CARMEN: science as a service. *Concurrency and Computation: Practice and Experience.***2010**; 22(17): 2369–2380.
145. Dudek AZ, Arodzb T and Gálvez J. Computational Methods in Developing Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR): A Review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **2006**; 9 (3): 213-228.
146. Bolboacă SD and Jantschi L, Pearson versus Spearman, Kendall's Tau Correlation Analysis on Structure-Activity Relationships of Biologic Active Compounds. *Leonardo J. of Sciences.***2006**;9:179-200.
147. Downs GM. Molecular Descriptors. In *Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery*. Bultinck P, De Winter H, Langenaeker W and Tollenaere J P. *Marcel Dekker; New York* : **2004**;515-538.
148. Winkler DA. The role of quantitative structure activity relationship (QSAR) in biomolecular discovery. *Briefings in bioinformatics.* **2002**;3(1):73-86.
149. H. Sklenar and J. Jager. Molecular structure biological activity relationships on the basis of quantum chemical calculations. *International journal of quantum chemistry.***1979**; 16(3):467-484.
150. Subasi E and Basdogan C. A New Haptic Interaction and Visualization Approach for Rigid Molecular Docking in Virtual Environments. *Presence.***2008** 17(1) : 73–90.

151. Krovat EM, Steindl T and Langer T. Recent Advances in Docking and Scoring. *Current Computer-Aided Drug Design*. **2005**; 1: 93-102
152. Kuntz ID. Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery. *Science*.**1992**; 257 :1078–1082.
153. Lybrand, T.P. Ligand—protein docking and rational drug design. *Curr. Opin. Struct. Biol.***1995**; 5(2): 224–228.
154. Abagya R, Totrov M. High-throughput docking for lead generation. *Curr. Opin. Chem. Bio.***2001**;5(2):375-382.
155. Kramer B, Rarey M and Lengauer T. Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **1999**;37: 228-241.
156. Verkhivker G M, Bouzida D, Gehlhaar D K, Rejto PA. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. *J. Comput.- Aided Mol. Des.* **2000**; 14: 731-751.
157. Bella D, Carenzi, Chiarrino, Pellacini. Pharmaceutically useful derivatives of thiazolidine-4-carboxylic acid. *European patent specification*.**1993**; 025354B1.
158. Mehta N, Thareja S, Aggarwal S, Malla P, Bhardwaj TR, and Kumar Kumar. Synthesis and *invitro* spleen cell proliferative activity of novel oxime derivative of ibuprofenamide. *Der Pharma Chemica*. **2010**; 2(4): 397-403.
159. Banerjee PK, Amidon GL. Physicochemical property modification strategies based on enzyme substrate specificities I: rationale, synthesis, and pharmaceutical properties of aspirin derivatives. *J Pharm Sci*. **1981**;70(12):1299-1303.
160. . Furniss BS, Hannaford AJ, Smith PWC, Tatchell AR. Vogel's textbook of practical organic chemistry (5th Ed.). *Longman, New York*, **1989**; 916 .
161. Amelia F, Afnani GN, Musfiroh A, Fikriyani AN, Ucche A and Murrukmihadi A. Extraction and Stability Test of Anthocyanin from Buni Fruits (*Antidesma Bunius* L) as an Alternative Natural and Safe Food Colorants. *J.Food Pharm.Sci.***2013** ;1: 49-53.
162. Sharopov FS, Sulaimonova VA and Setzer WN. Essential Oil Composition of *Mentha longifolia* from Wild Populations Growing in

Tajikistan. *J. of Medicinally Active Plants*.**2012**; 1(2):76-84.

163. Woolfe G and McDonald AD. Evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacology and Experimental Therapy*.**1994**; 70: 300-307.

164. Maleki-Dizaji N, Fathiazad1 F and Garjan A .Antinociceptive properties of extracts and two Flavonoids isolated from leaves of *Danae racemosa*. *J. Arch. Pharm. Res*.**2007**; 30(12): 1536-1542.

165. Abdon, A.P.; Cardoso, J.H.; Souza, A.N.; Morias, S.M. and Santos, C.F. Antinociceptive effect of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. *Braz J med Biol Res*.**2002**; 35 (10): 1215-1219.

166. Vogel, H.G. and Goethe, J.H.(Eds.) : Drug discover and evaluation. pharmacological assays (2<sup>nd</sup> ed). *Springer-Verlag. Berlin Heidebers*. **2002**; 751.

167. Kamble PS, Palatty PL, Kamble S. Comparative study of anti-inflammatory effects of rosiglitazone and pioglitazone with diclofenac sodium in carageenan induced rat hind paw oedema. *International J. of Basic and Applied Medical Sciences*.**2012**;2(1):1-7.

168. Prempeh AB and Mensah-Attipoe J. *In Vivo* Inhibition Of Prostaglandin E2 Production By Crude Aqueous Extract Of The Root Bark Of *Zanthoxylum Xanthoxyloides*. *Ghana Medical Journal*.**2008**;42(2):85-88.

169. Jain N, Kulkarni SK and Singh A. Acute studies on safety index of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rats. *Inflammopharmacology*.**2002** ; 9( 3): 229–240

170. A.I. Vogel, " Text book of practical organic chemistry" 3<sup>rd</sup> Ed. *Longman group Ltd. London*. **1974**; 695.

171. Valeur E and Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev*. **2009**; 38: 606–631.

172. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. Introduction to spectroscopy. 3<sup>rd</sup> Ed. *Thomson learning academic resource center*. Washington.**2006**

173. Torskangerpoll K and Andersen Ø M. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH Values. *Food Chemistry*. **2005**; 89(3): 427-440.

174. Jing P. Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemopreventive activity and structure/function relationships. PhD thesis, **2006**; The Ohio State University, U.S.A. p: 5-90
175. Wu X, Beecher GR, Holden J M, Haytowitz DB, Gebhardt S E, and Prior R L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**2006**; 54(11): 4069-4075.
176. Kühnau J. The Flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Reviews on Nutrition and Diet*.**1976**; 24: 117-91.
177. Strack D. and Wray V. Anthocyanins. In: *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. I, Plant Phenolics (P.M. Dey and J.B. Harborne. eds.).Academic Press, San Diego. **1989**.
178. Giusti MM and Wrolstad RE. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy.
179. Wrolstad RE, Durst RW and Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*.**2005**; 16(9):423-8.
180. Tanchev SS and Timberlake CF. The anthocyanins of red cabbage(*Brassica oleracea*). *Phytochemistry*.**1969**; 8(9):1825-7.
181. Mazza, G., Miniati, E. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. LONDON: CRC Press.**1993**.
182. Winter CA, Risley EA and Nuss GW . Antiinflammatory and antipyretic activities of indomethacin 1-(p chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indole-3-acetic acid. *J Pharmacol Exp Ther*.**1963**; 141:369–376.
183. Plummer JL, Cmielewski PL, Gourly GK, Owen H, Cousins M. Assessment of antinocipetive drug effects in the presence of impaired motor performance. *J Pharmacol Meth*. **1996**; 26:79.
184. Rechner AR and Kroner C. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb. Res*. **2005**; 116: 327-334.
185. Wang L.-S., Stoner G.D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett*. **2008**; 269: 281-290.

186. Bonina F, Trombetta D, Borzi A De Pasquale A, Saija A. 1-ethylazacycloalkan-2-one indomethacin esters as new oral prodrugs: Chemical stability, enzymatic hydrolysis, anti-inflammatory activity and gastrointestinal toxicity. *Int. J. Pharm.***1997**; 156: 245–250.
187. Akgun H, Tozkoparan B, Ertan M, Aksu F, Inan SY. Synthesis of some 2-aryl propionic acid amides as prodrugs. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.***1996**; 46: 891-894.
188. Bonina F, Puglia C, Santagati NA, Saija A, Tomaino A, Tita B. Oligoethylene ester derivatives of ketoprofen, naproxen and diclofenac as oral prodrugs: a pharmacological evaluation. *Pharmazie.***2002**; 57: 552-555.
189. Sharma V, Khan MSY. Prodrugs and mutual prodrugs: Synthesis of some new pyrazolone and oxadiazole analogues of few non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pharmazie.***2003**;58: 99-103.
190. Mishra A, Veerasamy R, Jain KP, Dixit VK, Agrawal RK. Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of amide prodrugs of ketorolac. *Eur. J. Med. Chem.***2008**; 43: 2464-2472.
191. Venuti MC, Young JM, Maloney PJ, Johnson D, McGreevy K. Synthesis and biological evaluation of  $\Omega$ -(*N,N,N*-trialkyl ammonium)alkyl esters and thioesters of carboxylic acid non-steroidal anti-inflammatory agents. *Pharma. Res.*1989; 6: 867–873.
192. Sheha M, Khedr A, Elsherief H. Biological and metabolic study of naproxen–propyphenazone mutual prodrug. *Eur. J. Pharm. Sci.***2002**; 17:121-130.
193. Amresh G, Zeashan H, Rao CV and Singh PN. Prostaglandin mediated anti-inflammatory and analgesic activity of *Cissampelos pareira*. *Acta Pharm. Sci.* **2007**; 49: 153–160.
194. DeCaprariis P, Palagiano F, Bonina F, Montenegro L, D'Amico M, Rossi F. Synthesis and pharmacological evaluation of oligoethylene ester derivatives as indomethacin oral prodrugs. *J. Pharm. Sci.***1994**; 83: 1578–1581.
195. Bonina FP, Montenegro L, Caprariis P, Palagiano F, Capasso A, Sorrentino L. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of triethylene

- glycol indomethacin ester as a new oral prodrug. *J. Control. Rel.* **1996**; 41: 187–193.
196. Aborodo EA, Bowden K, Huntingon AP, Powell SL. Prodrugs Part 31. 2-Formylphenyl esters of indomethacin, ketoprofen and ibuprofen and 6-substituted 2-formyl and 2-acylphenyl esters of aspirin. II *Farmaco.* 1998; 53: 95–101.
197. Bansal AK, Khar RK, Dubey R, Sharma AK. Alkyl ester prodrugs for improved topical delivery of ibuprofen. *Ind. J. Exp. Biol.* 2001; 39: 280-283.
198. Bhosle D, Bharambe S, Gairola N, Dhaneshwar SS. Mutual prodrug concept: Fundamentals and applications, *Ind. J. Pharm. Sci.*, 68, 2006; 286-294.
199. Kay CC, Mazza G, Holub BJ and Wang J. Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *Brit. J. Nutr.* 2004; 91: 933-942.
200. McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A and Stewart D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *J. Agric. Food Chem.* **2005**; 53: 5896-5904.
201. Vitaglione P., Donnarumma G., Napolitano A., Galvano F., Gallo A., Scalfi L., Fogliano V. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J. Nutr.* **2007**; 137: 2043-2048.
202. Hou D.X., Yanagita T., Uto T., Masuzaki S., Fujii M. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanism involved. *Biochem. Pharmacol.* **2005**; 70:417-425.
203. Hämäläinen M., Nieminen R., Vuorela P., Heinonen M., Moilanen E. Anti-Inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- $\kappa$ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm.* **2007**; doi: 10.1155/2007/45673.
204. Seeram N.P., Momin R.A., Nair M.G., Bourquin L.D. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyaniding glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine.* **2001**; 8: 362-369.

205. Rechner A.R., Kroner C. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb. Res.* **2005**; 116: 327-334.
206. Wang L.-S., Stoner G.D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* **2008**; 269: 281-290.
207. Peixoto ITA, Furlanetti V F, Anibal PC, Duarte MC T and Höfling, JF. Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. *J. of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences.* **2009**;30(3):235-239.
208. Albayrak A, Polat B, Cadirci E, Hacimuftuoglu A, Halici Z, Gulapoglu M, Albayrak F and Suleyman H. Gastric anti-ulcerative and anti-inflammatory activity of metyrosine in rats. *Pharmacological reports.* **2010**;62:113-119
209. Hoogstraate J, Andersson LI, Berge OG, Jonzon B, Ojteg G. COX-inhibiting nitric oxide donators (CINODs) - a new paradigm in the treatment of pain and inflammation. *Inflammopharmacology.* **2003**; 11: 423-428.
210. Whittle BJR. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**; 500: 427-439.
211. Kizil S , Hasimi N, Tolan V , Kiliç E and Yüksel U. Mineral content, essential oil components and biological activity of two mentha species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). *Turkish Journal of Field Crops,* **2010**; 15(2): 148-153.

## ***Abstract***

This study involved preparation a set of amides of anti-inflammatory drugs as well as the identification and characterization of products by FT-IR, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, and C.H.N elements data, and preparation some plants extracts. The second part of work include testing the activity of prepared compounds and plant extracts as inhibitors of cyclooxygenase and their selectivity in vivo and by using theoretical programs This work involved:

1. preparations of acid chloride from ibuprofen and anhydrides from naproxen, sodium diclofenac and mefenamic acid and then transferred them to different amides by reacting with different amines (sulphanilamide, O-nitroaniline, 2,4 dinitroaniline, P-bromoaniline)
2. Preparation of anthocyanin extract from red cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*) and The total concentration of anthocyanin was (46 mg \ 100 g) and the extraction of oil from the mint at a yield of 0.4%.
3. The results showed that the prepared compounds and extracts were effective analgesics. Using different doses in mice and in different points in time through the use of heat source give response and measure response time comparing with aspirin and sodium Diclofenac (Voltaren). These results indicate that the compounds are effective inhibitors of cyclooxygenase, because the pain caused by the effectiveness of cyclooxygenase and the most effectiveness compounds were compound [2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-N-(4-sulfamoylphenyl) propanamide] which produced from reaction between naproxen and sulphanilamide and compound [2-(2-(2,6-dichlorophenylamino) phenyl)-N-(4-sulfamoylphenyl)acetamide] which produced from reaction between Diclofenac and sulphanilamide.
4. All prepared compounds and isolated crude extract have been tested clinically using Swiss mice to show their activity as inhibitors against cyclooxygenase by testing their activity as anti-inflammatory in different doses and different times by egg-white induced oedema via determination of percentage of inhibition and compared them with sodium diclofenac and aspirin. It is found that the newly prepared compounds are effective as anti-inflammatory and some of them exceed the effectiveness of Vol.taren.

5. The results showed that all prepared compounds and extracts have analgesic activity by using different doses at different times by hot plate test and determine response time and compared it with sodium diclofenac and aspirin. But the activity were dissimilar.
6. The prepared compounds and extracts are inhibitors of cyclooxygenase, that findings have been proved by estimation the concentration of PGE<sub>2</sub> in blood plasma which determined after created inflammation in rats before and after injection of prepared compounds, extracts and the parent compounds comparing the results with the normal level. The results of this experiment showed that some prepared compounds has higher activity of inhibition than the parent medication, and give a good picture of selectivity of inhibition of COX -2 by comparing with celecoxib.
7. One of important results of new prepared compounds were that they do not have ulceration effect on stomach which could be prover through the test of stomach ulcers and the use of high doses on Swiss mice.
8. Through a molecular docking studies of prepared compounds with the active site of the enzyme COX-1 and COX-2 , it was found that the compounds have affinity for the enzyme COX-2 more than their affinity to COX-1 which support selectivity, also it is found that Carvon who constitute more than 50% of mint oil is a selective inhibitor of COX-2.

Republic of Iraq  
Ministry of Higher Education and Scientific Research  
University of Anbar  
The College of Education for pure Science



*Study of Cyclooxygenase inhibition by some compounds and plant extracts*

*Dissertation Submitted To  
The College of Education for pure Science-University of  
Anbar In Partial Fulfillment of The Requirements For  
The Master Degree of Science In Chemistry*

By

**Hadeel Gebier Maeof**  
**B. Sc. Chemistry – 2011**

**Supervised By**

**Dr. Bilal Jasir Mohammed**

**2013 AC**

**1434 H**