

Cytotoxicity and Antimicrobial Activities of Dihydropyrimidine Derivatives Containing Pyrrole

Erfan Agaghantabar¹,
Hossein Najafzadeh Darzi²,
Zahra Molana³,
Roghayeh Pourbagher⁴,
Asieh Khalilpour⁵

¹ Medical Student, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

² Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

³ Assistant Professor, Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

⁴ PhD in Applied Cell Science, Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received October 14, 2024; Accepted February 22, 2025)

Abstract

Background and purpose: Given the important role that heterocyclic compounds play in the pharmaceutical and medical industries; it is essential to understand their unique properties. In particular, the presence of two heterocyclic rings in these compounds enhances their biological activity and makes them valuable in various therapeutic applications. Numerous studies have shown that heterocyclic compounds derived from pyrimidine and pyrrole exhibit various biological activities, including antimicrobial, antifungal, antiviral, and antitumor properties. Therefore, this study aims to evaluate the antimicrobial and anticancer effects of synthetic compounds on several Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as normal and cancerous breast cell lines, in vitro.

Materials and methods: In this experimental study, ten derivatives of dihydropyrimidine compounds attached to pyrrole were synthesized. The antibacterial activity of these compounds was evaluated against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*, and compared with gentamicin and ciprofloxacin. Their anticancer activity was assessed in a breast cancer cell line, compared with doxorubicin, at 48 and 72 hours using an MTT assay to determine cytotoxicity.

Results: Among these compounds, compound 4e, which contains chlorine, exhibited the highest antimicrobial effect, with MIC= 3.90 µg/ml and MBC= 7.81 µg/ml, compared to gentamicin, which had MIC= 0.031 µg/ml and MBC= 0.125 µg/ml. Also, compound 4e demonstrated the highest inhibitory effect, with IC₅₀= 0.16 ± 0.009 µM, compared to doxorubicin (IC₅₀= 3.42 ± 0.10 µM), which was used as the reference drug after 48 hours.

Conclusion: The results of this research demonstrated the effectiveness of synthetic compounds against Gram-positive bacteria and cancer cells. These findings suggest that these compounds have the potential to serve as effective antimicrobial and anticancer agents.

Keywords: pyrimidine, pyrrole, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, breast cancer, normal cell lines

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (243): 27-38 (Persian).

Corresponding Author: Asieh Khalilpour - Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. (E-mail: Asieh.khalilpour@gmail.com)

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و سمیت سلولی مشتقات دی هیدروپیریمیدین متصل شده به پیرول

عرفان آقاچان تبار^۱

حسین نجف زاده درزی^۲

زهرا مولانا^۳

رقیه پور باقر^۴

آسیه خلیل پور^۵

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به نقش مهمی که ترکیبات هتروسیکلیک در صنایع دارویی و پزشکی ایفا می کنند، شناخت ویژگی های منحصر به فرد این ترکیبات ضروری است. به ویژه وجود دو حلقه هتروسیکلیک در این ترکیبات به افزایش فعالیت بیولوژیکی آنها کمک می کند و آنها را در کاربردهای مختلف درمانی ارزشمند می کند. مطالعات متعدد نشان داده است که ترکیبات هتروسیکلیک مشتق شده از پیریمیدین و پیرول فعالیت های بیولوژیکی از جمله خواص ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد توموری را نشان می دهند. بنابراین، این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی ترکیبات سنتزی بر روی چندین باکتری گرم مثبت و گرم منفی و رده های سلولی طبیعی و سرطانی پستان در شرایط آزمایشگاهی، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۱۰ مشتق از ترکیبات دی هیدروپیریمیدین متصل شده به پیرول سنتز شد. فعالیت ضد باکتریایی این ترکیبات علیه باکتری های اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس در مقایسه با داروی جنتامایسین و سیپروفلوکساسین و فعالیت ضد سرطانی آنها رده سلول سلول سرطانی و نرمال پستان در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت با تست سمیت بررسی شد.

یافته ها: در میان این ترکیبات، ترکیب (۴e) حاوی کلر بالاترین اثر ضد میکروبی ($MIC = \mu g/ml \ 3/90$) و ($MBC = \mu g/ml \ 7/81$) برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را به ترتیب در مقایسه با جنتامایسین ($MIC = \mu g/ml \ 0/031$) و ($MBC = \mu g/ml \ 0/125$) داشتند. هم چنین ترکیب (۴e) با بالاترین اثر مهار کنندگی ($IC_{50} = \mu M \ 0/16 \pm 0/009$) را در مقایسه با دوکسوروبیسین ($IC_{50} = \mu M \ 3/42 \pm 0/10$) به عنوان استاندارد پس از ۴۸ ساعت نشان داد.

استنتاج: نتایج به دست آمده از این پژوهش اثر ترکیبات سنتزی را بر روی باکتری های گرم مثبت و سلول های سرطانی نشان داد؛ بنابراین، این ترکیبات می توانند به عنوان عوامل ضد میکروبی و سرطانی موثر مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: پیریمیدین، رده سلول سرطانی و نرمال پستان، تست سمیت، حداقل غلظت بازدارنده، حداقل غلظت کشندگی

Email: Asieh.khalilpour@gmail.com

مؤلف مسئول: آسیه خلیل پور - بابل: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۱. دانشجوی پزشکی عمومی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲. استاد فارماکولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۴. دکتری علوم سلولی کاربردی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۵. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۷/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۷/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۱۲/۴

مقدمه

یک دارو و اثرهای درمانی آن بسیار حائز اهمیت است. نازگی‌ها استفاده از پیریمیدین‌ها با توجه به ویژگی‌های درمانی، زیست‌سازگاری و سمیت پایین که دارا هستند، از گزینه‌های جذابی در بحث پیشگیری و درمان سرطان است، با توجه به اثرهای این ترکیب‌ها، نوع استخلاف‌های موجود در ساختار پیریمیدین‌ها، سمیت پایین، القاء کنندگی و یا تقویت واکنش‌های ایمنی، تنظیم سیستم دفاعی می‌توان از آن‌ها در مطالعه‌ها و کاربردهای دارویی استفاده کرد (۵). در این مطالعه هدف، ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و ضد سرطانی مشتقات دی‌هیدروپیریمیدین متصل شده به پیرویل بر روی باکتری‌های *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* و رده سلول سرطانی MCF-7 و نرمال MCF-10 در دوزها و زمان‌های مختلف است. اهداف کاربردی این تحقیق استفاده از این ترکیب‌ها در پژوهش‌های مولکولی دارویی به عنوان ترکیب‌های مؤثر دارویی غیر سیتوتوکسیک و باکتری و هم‌چنین استفاده از استخلاف‌های به کار رفته در طراحی داروهای ضد سرطانی و باکتری جدید است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی - آزمایشگاهی، با کد اخلاق IR.MUBABOL.REC.1401.151 می‌باشد که در آن فعالیت ضد باکتریایی و ضد سرطانی ۱۰ مشتق سنتز شده از قبل با ساختار دی‌هیدروپیریمیدین متصل شده به پیرویل (۴) مورد ارزیابی قرار گرفته است. فعالیت ضد باکتریایی این ترکیبات علیه باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوک اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* در مقایسه با داروهای جنتامایسین و سیپروفلوکساسین و فعالیت ضد سرطانی آن‌ها بر روی رده سلول سرطانی پستان و نرمال در مقایسه با داروی دوکسوروبیسین در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت با تست تعیین سمیت (MTT assay) بررسی شد.

ترکیب‌های هتروسیکلیک اساس بسیاری از داروهای طبیعی، سنتزی، شیمیایی، گیاهی و محصول‌های دامپزشکی را تشکیل می‌دهند. یکی از اهداف اصلی شیمی آلی و بیوانفورماتیک دارویی طراحی، سنتز و تولید مولکول‌هایی با داشتن ارزش تولیدی به عنوان عوامل درمانی بشر است (۱). ساختارهای هتروسیکل متعلق به گروهی از ترکیب‌ها هستند که نقش شیمی دارویی در آن‌ها به اثبات رسیده است (۲). نوکلئوتیدهای پیریمیدین در سنتز DNA، RNA در همه ارگانیسم‌های زنده اهمیت بنیادی دارند. سیستم حلقه‌ای پیریمیدین به‌طور گسترده‌ای در طبیعت به عنوان ترکیب‌های استخلاف‌دار شده و حلقه جوش خورده و مشتق‌های آن، از جمله نوکلئوتیدها، تیامین و آلوکسان یافت می‌شود. مطالعه مربوط به روابط ساختار فعال داروهای پیریمیدین عرضه شده در بازار نشان می‌دهد که اگر یک حلقه هتروسیکلیک اشباع در روی اتم N قرار بگیرد منجر به فعالیت ضد سرطانی و ضد ویروسی ترکیب پیریمیدینی می‌شود (۳).

در دهه‌های اخیر مشتقات پیریمیدین‌های جوش خورده به عنوان دسته‌ای از ترکیب‌های هتروسیکل پر کاربرد در شیمی دارویی مطرح بوده اند. این ترکیب‌ها در حیطه دارویی دارای فعالیت‌های ضد سرطان، ضد ویروسی، ضد باکتری، خلط‌آوری، درمان عفونت ادراری دارویی، پارکینسون، عفونت دستگاه تنفسی و گوش، گشاد کننده عروق، درمان اختلال‌های کبدی، نوروپاتی محیطی و اختلال‌های وابسته به اسید اوریک خون هستند (۴).

امروزه نتایج آمارهای جهانی در رابطه با بیماری‌های مهلک و مرگ بار نشان می‌دهد که ضایعه سرطان روز به روز در حال گسترش است و پیدا کردن داروهای ایده آل ضد سرطان که بدون آسیب رساندن به بافت‌های طبیعی بدن بتوانند سلول‌های سرطانی را از میان بردارند، یکی از نگرانی‌های مهم در حوزه علوم پزشکی است. از طرفی مقدار دارو و چگونگی مصرف

بررسی حداقل غلظت کشنده

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی، از چاهک‌های فاقد کدورت (غلظت‌های MIC و بیش‌تر از آن)، مقدار ۱۰ μl در شرایط کاملاً استریل و در نزدیکی شعله برداشته و بر روی محیط بلادآگار، تلقیح و کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای °C ۳۷، کم‌ترین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها را بکشد، به عنوان رقت MBC در نظر گرفته و از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و سیپروفلوکساسین برای مقایسه قدرت مهارکنندگی آن با ترکیبات سنتزی استفاده گردید. کلیه مراحل آزمایش، سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین آن‌ها ارائه شد (۷).

همه داده‌های مربوط به تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، بررسی حداقل غلظت کشنده و فعالیت سمیت سلولی با سه بار تکرار برای هر نمونه، به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان می‌شود و با استفاده از فرمول $100 \times [(OD \text{ control} - OD \text{ sample}) / OD \text{ control}]$ در صد مهار محاسبه خواهد شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها پس از جمع‌آوری وارد نرم‌افزار آماری SPSS 20 شدند و با آزمون‌های آماری کروسکال-والیس و من-ویتنی در سطح اطمینان ۹۵ درصد آنالیز شدند.

یافته‌ها

بررسی فعالیت ضد میکروبی مشتقات بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوک اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سوبتیلیس خاصیت ضد باکتریایی ترکیبات سنتزی در مقابل باکتری‌های اشرشیاکلامی و سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان دو باکتری گرم منفی و باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس به‌عنوان دو باکتری گرم مثبت بررسی و با فعالیت دو آنتی‌بیوتیک استاندارد شناخته شده سیپروفلوکساسین و جنتامایسین مقایسه شده است.

بررسی فعالیت ضد میکروبی برای کلیه فراورده‌ها z-4a در جدول شماره ۱، نشان داده است که این ترکیبات، فعالیت ضد میکروبی بیش‌تری را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و فعالیت ضد میکروبی کم‌تری را در برابر باکتری‌های گرم منفی از خود نشان دادند. در ارتباط با نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ترکیبات مورد آزمایش در ارتباط با باکتری‌های مورد مطالعه نیز نتایج قابل قبولی به ویژه در مورد استافیلوکوک اورئوس (باکتری گرم مثبت) ذکر شده به دست آمد؛ کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد مربوط به باکتری

روش کار بررسی اثر سمیت سلولی

سلول سرطانی MCF7 و سلول‌های نرمال MCF10 برای بررسی سمیت مشتقات سنتزی با استفاده از روش استاندارد MTT [۳- (۵،۴- دی متیل تiazول-۲-ای)-۵،۲- دی فنیل تترازولیم برومید] به کار گرفته می‌شوند. سلول‌های سرطانی در محیط کشت DMEM همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (۱۰۰ U/mL پنی‌سیلین، ۱۰۰ μg/mL استرپتومایسین) در یک فلاسک کشت و سپس در انکوباتور CO₂ در دمای °C ۳۷ کشت داده شد. سپس به سلول‌های سرطانی در محیط کشت غلظت‌های مختلف از ۰، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۵۰ و ۱۲۵ نمونه‌های سنتزی اضافه و در دمای °C ۳۷ به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در انکوباتور قرار می‌گیرند. به عنوان کنترل یک محیط کشت سلول سرطانی بدون نمونه سنتزی در نظر گرفته و برای روش سمیت، ۵۰ میلی لیتر از محلول MTT (۵ mg/mL) به همه محیط کشت‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای °C ۳۷ در انکوباتور قرار داده شد، سپس کریستال‌های MTT فورمازان بنفش حل شده در ایزوپروپانول اسیدی در ۱ میلی لیتر DMSO حل شده و دانسیته نوری OD در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شوند (۸).

جدول شماره ۱: فعالیت ضد میکروبی مشتقات z-4a بر روی باکتری های اشرشیا کلی، استافیلوکوک اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سوبتیلیس

compounds	gram negative (µg/ml)				Gram positive (µg/ml)			
	Escherichia coli		Pseudomonas aeruginosa		B. subtilis		S. aureus	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4a	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۶۲/۵	۱۲۵
4b	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰
4c	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۳۱/۲۰	۶۲/۵	۳۱/۲۰	۶۲/۵	۱۵/۶۰	۳۱/۲۰
4d	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵۰
e۴	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۳/۹۰	۷/۸۱
4f	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۱۵/۶۲
4g	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰
4h	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰
4i	۶۲/۵۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵
4j	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵
ciprofloxacin	۰/۰۱۶	۰/۰۶۲	۰/۰۶۲	۰/۱۲۵	۰/۰۳۱	۰/۰۶۲	۰/۰۳۱	۰/۱۲۵
gentamicin	۴	۸	۱۲۸	-	۴	۸	۰/۵	۱

کار در این بررسی، سنجیدن میزان کارایی ترکیبات سنتز شده در مهار کردن رشد و یا نابود کردن این سلول سرطانی است. در بررسی سمیت این ترکیبات، از غلظت‌های مختلف ۷/۵، ۱۵، ۳۱، ۶۲ و ۱۲۵ µg/mL آن‌ها در مهار کردن رشد و یا نابود کردن سلول‌های سرطانی استفاده شده است. همچنین این مطالعات بعد از گذشت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تکرار شده است. لازم به ذکر است از یک نمونه فاقد ترکیبات سنتزی به عنوان کنترل منفی و از ترکیب دو کسورویسین (Doxorubicin) به عنوان کنترل مثبت در این بررسی‌ها استفاده شده است. درصد زنده ماندن سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شده است.

$$100 \times \text{جذب کنترل} / \text{جذب نمونه} = \text{درصد زنده ماندن سلولی}$$

ارتباط مهار کنندگی رشد سلول‌ها با غلظت‌های مورد استفاده در سلول‌های سرطانی (MCF-7) برای ترکیبات سنتزی z-4a در مقایسه با رده سلولی طبیعی (MCF-10) در ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهند که ترکیبات سنتزی مورد مطالعه بر روی سلول سرطانی مورد آزمایش دارای سمیت سلولی در اکثر غلظت‌ها بوده‌اند. در همه موارد با افزایش غلظت نمونه‌های سنتزی، درصد زنده ماندن سلول کاهش می‌یابد که این بیانگر افزایش مهار کنندگی رشد سلول‌ها در غلظت‌های بالاتر است، به طوری که در همه موارد، کم‌ترین مهار شدگی

استافیلوکوک اورئوس و ترکیب 4e است که گمان می‌رود گروه عاملی کلر متصل به موقعیت پارا، با فعالیت ضد میکروبی خود باعث ایجاد خاصیت ضد باکتریایی شده باشند. در مقایسه دو باکتری گرم مثبت، باکتری استافیلوکوک اورئوس نسبت به ترکیبات سنتزی حساس‌تر بودند و بیش‌ترین مقدار غلظت مربوط به باکتری اشرشیا کلائی و ترکیب 4h است که فاقد استخلاف می‌باشد. حداقل غلظت کشندگی ۷/۸۱ µg/ml مربوط به ترکیب 4e و باکتری استافیلوکوک اورئوس می‌باشد و حداکثر غلظت کشندگی ۵۰۰ µg/ml و ترکیب 4h می‌باشد که مربوط به باکتری‌های گرم منفی که میزان MBC با MIC برابر بود، به طوری که همان غلظتی که باعث ممانعت از رشد باکتری‌ها می‌شود سبب کشته شدن باکتری‌ها نیز می‌گردد. در بررسی هر کدام از مشتقات (z-4a) نسبت به داروی سیپروفلاکسین به عنوان کنترل منفی و جتتامایسین به عنوان کنترل مثبت مشاهده شد اختلاف بین میانگین‌های MIC و MBC ترکیبات مختلف مورد سنجش با داروی استاندارد برای باکتری‌های گرم منفی و مثبت معنی‌دار است.

بررسی اثر سمیت ترکیبات سنتزی بر روی سلول سرطانی پستان

به منظور بررسی سمیت ترکیبات سنتزی، از سلول‌های سرطانی پستان یعنی MCF7 استفاده شد. اساس

در کمترین غلظت ($7/5 \mu\text{g/mL}$) و بیشترین مهارشدگی در بالاترین غلظت ($125 \mu\text{g/mL}$) مشاهده شده است. هم‌چنین بررسی میزان مهارکنندگی ترکیبات مختلف پس از زمان‌های مختلف (۴۸ و ۷۲ ساعت) نشان می‌دهد در زمان ۴۸ ساعت برای همه ترکیبات مهارکنندگی مشاهده می‌شود. ولی وقتی زمان به ۷۲ ساعت افزایش یافت در برخی موارد کاهش مهارکنندگی مشاهده می‌شود که این می‌تواند یا ناشی از سازگاری سلول‌های سرطانی باشد و یا کاهش اثرگذاری این ترکیبات بر سلول سرطانی پس از گذشت زمان طولانی تر ۷۲ ساعت باشد (۸).

جدول شماره ۲: فعالیت ضد سرطانی ترکیبات 4a-ز در برابر رده‌های سلولی MCF-7 (سرطان سینه) و MCF-10 (طبیعی) از طریق سنجش MTT پس از ۴۸ ساعت

ترکیبات	IC50±SDa (μM) MCF-7	IC50±SDa (μM) MCF-10
1	4a	۲۵/۵۶±۰/۱۲
2	4b	۱۱/۸۱±۰/۰۷
3	4c	۲۳/۳۷±۰/۰۹
4	4d	۵۵/۷۵±۰/۰۸
5	4e	۲۳/۴۱±۰/۰۱
6	4f	۸۵/۸۷±۰/۰۱
7	4g	۴۸/۱۱±۰/۰۹
8	4h	۴۵/۳۸±۰/۰۱۵
9	4i	۱۱/۹۳±۰/۰۱
10	4j	۱۸/۸۷±۰/۰۱
11	4j	۲۷/۱۱±۰/۰۰۹
12	دوکوروسین	۳/۴۲±۰/۱۰

مقادیر IC50 برای ترکیبات سنتزی 4a-ز پس از گذشت زمان ۷۲ ساعت، در جدول شماره ۳ آورده شده است. در بین این ترکیبات، 4e و 4f که شامل استخلاف کلر می‌باشند، کم‌ترین مقدار IC50 مقدار $0/05 \pm 0/07$ ($\mu\text{g/mL}$) برای ترکیب 4e و مقدار $0/40 \pm 0/07$ ($\mu\text{g/mL}$) برای ترکیب 4f و بیشترین اثر مهارکنندگی را از خود نشان داده‌اند. ترکیبات 4c، 4d، 4i و 4j شامل استخلاف متوکسی به‌عنوان گروه الکترون دهنده، سمیت متوسط از خود نشان دادند. ولی ترکیبات سنتزی 4a، 4b، 4g و 4h (فاقد استخلاف) کم‌ترین سمیت را نشان دادند. به‌طور کلی، این مقایسه با کنترل مثبت (دوکوروسین) که پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، IC50 معادل $0/68 + 0/10 \mu\text{g/mL}$ دارد، صورت گرفته است. از آنجایی که ترکیب 4f کم‌ترین اثر سیتوتوکسیک را در برابر آن نشان داد رده سلولی نرمال ($IC_{50} = 52/46 \mu\text{g/mL}$)، موثرترین ترکیب در بین تمام ترکیبات در این مطالعه در نظر گرفته شده است. مقایسه

مقادیر IC50 برای ترکیبات سنتزی 4a-ز پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت، در جدول شماره ۲ آورده شده است. در بین این ترکیبات، 4e و 4f که شامل استخلاف کلر می‌باشند، کم‌ترین مقدار IC50 مقدار $0/16 \pm 0/09$ ($\mu\text{g/mL}$) برای ترکیب 4e و مقدار $0/17 \pm 0/07 \mu\text{g/mL}$ برای ترکیب 4f و بیشترین اثر مهارکنندگی را از خود نشان داده‌اند.

جدول شماره ۲: فعالیت ضد سرطانی ترکیبات 4a-ز در برابر رده‌های سلولی MCF-7 (سرطان سینه) و MCF-10 (طبیعی) از طریق سنجش MTT پس از ۴۸ ساعت

ترکیبات	IC50±SDa (μM) MCF-7	IC50±SDa (μM) MCF-10
1	4a	۲۵/۵۶±۰/۱۲
2	4b	۱۱/۸۱±۰/۰۷
3	4c	۲۳/۳۷±۰/۰۹
4	4d	۵۵/۷۵±۰/۰۸
5	4e	۲۳/۴۱±۰/۰۱
6	4f	۸۵/۸۷±۰/۰۱
7	4g	۴۸/۱۱±۰/۰۹
8	4h	۴۵/۳۸±۰/۰۱۵
9	4i	۱۱/۹۳±۰/۰۱
10	4j	۱۸/۸۷±۰/۰۱
11	4j	۲۷/۱۱±۰/۰۰۹
12	دوکوروسین	۳/۴۲±۰/۱۰

ترکیبات 4c، 4d، 4i و 4j شامل استخلاف متوکسی به‌عنوان گروه الکترون دهنده، سمیت متوسط از خود نشان دادند. ولی ترکیبات سنتزی 4a، 4b، 4g و 4h (فاقد استخلاف) کم‌ترین سمیت را نشان دادند. به‌طور کلی، این مقایسه با کنترل مثبت (دوکوروسین) که پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، IC50 معادل $\mu\text{g/mL}$

شاهرگی و درمان عفونت‌های دستگاه ادراری این دسته از ترکیب‌های دارویی می‌شود (۹-۱۱). هم‌چنین نشان داده‌اند پیریمیدین بر تنظیم مسیرهای متابولیسم سلولی و مسیرهای سرطانی در جهت درمان مؤثر است (۱۲).

پیریمیدین و پیرول دو ترکیب آلی شناخته شده از هتروسیکل‌ها می‌باشند که در تعداد زیادی از ترکیبات مهم موجود در طبیعت وجود دارند. هم‌چنین مقالات اخیر نشان داده‌اند که از بعضی از ترکیبات حاوی هسته پیریمیدین و پیرول، به عنوان یک هتروسیکل منحصر به فرد و یا همراه با سایر هتروسیکل‌ها می‌توانند خواص ضد باکتری، ضد سرطانی، ضد قارچی و ضد ویروسی قابل توجهی از خود نشان دهند (۱۳-۱۶).

مقاومت ضد میکروبی یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان است و بر هزینه‌های مربوط به درمان، بستری شدن در بیمارستان و روش‌های کنترل عفونت، به بار اقتصادی کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه مؤثر است. بخشی از نقش مطلوب پیریمیدین‌ها در بیماری‌های عفونی ممکن است از خواص ضد باکتریایی آن‌ها ناشی شود. مشتقات کلردار در مطالعه حاضر فعالیت ضد باکتریایی بر روی باکتری‌های گرم مثبت در شرایط آزمایشگاهی را نشان دادند. 4e بهترین عملکرد ضد باکتریایی را نشان داد و ترکیبات با استخلاف متوکسی و بدون استخلاف در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

در مطالعه Patel و همکاران در سال ۲۰۲۱، که در زمینه ارزیابی بیولوژیکی برخی از مشتقات پیرول و دی هیدروپیریمیدین به عنوان عوامل ضد میکروبی بالقوه انجام دادند، تمامی مشتق‌ها از نظر فعالیت ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی با روش میکرو برات رقیق سازی و خاصیت ضد سلولی در شرایط آزمایشگاهی با روش میکروپلیت آلامار بلو ارزیابی شدند. ترکیبات z۳ و l۱ حاوی گروه‌های -OH و -CH₃ به عنوان ضد میکروبی قوی و کاندیدهای ضد سل با سمیت سلولی نسبتاً کم بر روی سلول‌های VERO عمل کردند (۱۷).

بین نمونه کنترل با مشتقات با آزمون تی تست در سطح $P = 0/01$ اختلاف معنی داری داشت. هم‌چنین مقایسه بین زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی دار نشد ($P = 0/593$).

جدول شماره ۳: فعالیت ضد سرطانی ترکیبات z۴-a در برابر رده‌های سلولی MCF-7 (سرطان سینه) و MCF-10 (طبیعی) از طریق سنجش MTT پس از ۷۲ ساعت

ترکیبات	IC50±SDa (µM) MCF-10	IC50±SDa (µM) MCF-7	۱
4a	۵/۰۴±/۰۰۴	۹/۲۲±/۰۰۱۵	۲
4b	۲۹/۱۸±/۰۰۱۴	۱۲/۷۹±/۰۰۰۹	۳
4c	۰/۰۰۳±/۰۰۰۸	۰/۹±/۰۰۰۷	۴
4d	۷/۸۸±/۰۰۰۸	۵/۷۴±/۰۰۰۴	۵
4e	۴۴/۰۵±/۰۰۱	۰/۳۲±/۰۰۰۵	۶
4f	۵۲/۴۶±/۰۰۰۸	۰/۴۰±/۰۰۰۷	۷
4g	۳۱/۱۲±/۰۰۰۴	۱۷/۰۷±/۰۰۱	۸
4h	۴۴/۶۴±/۰۰۱۱	۲۳/۱۶±/۰۰۱۴	۹
4i	۵۲/۷۸±/۰۰۰۶	۶/۷۱±/۰۰۰۸	۱۰
4j	۴/۶۴±/۰۰۰۹	۷/۶۳±/۰۰۰۷	۱۱
-	-	۰/۶۸±/۰۰۱۰	۱۲ دوکوروسین

بحث

مطالعه روابط ساختار فعال (SAR) مربوط به داروهای پیریمیدین عرضه شده در بازار نشان می‌دهد که اگر یک حلقه هتروسیکلیک اشباع در موقعیت A قرار بگیرد منجر به فعالیت ضد سرطانی و ضد ویروسی ترکیب پیریمیدینی می‌شود. اگر پیریمیدین از دومین موقعیت یعنی ناحیه B توسط حلقه‌های ۵ یا ۶ عضوی هتروسیکل اشباع استخلاف دار شود، باعث بروز فعالیت ضد پارکینگسون، خلط‌آوری و درمان اختلال‌های گوارشی و نوروپاتی محیطی، استخلاف دار شدن توسط گروه‌های کتوننی یا آمینو ویا هر دو می‌شود. در موقعیت‌های ۲ و ۴ حلقه پیریمیدینی یعنی نواحی B منجر به فعالیت ضد سرطان، ضد ویروس، ضد باکتری، ضد قارچ، درمان عفونت دستگاه تنفسی و اختلال‌های کبدی می‌شود. استخلاف‌دار شدن در موقعیت پنجم ناحیه C حلقه پیریمیدینی با آمین‌ها یا حلقه هتروسیکل اشباع باعث بروز فعالیت ضد باکتری و ضد سرطانی می‌شود. موقعیت‌های ۵ و ۶ حلقه پیریمیدین ناحیه D جوش خورده با حلقه‌های هتروسیکل استخلاف دار شده در موقعیت اورتو، متا و پارا با حلقه‌های آریل، باعث فعالیت ضد سرطان، ضد ویروس، ضد باکتری، تأخیر خونریزی

پایین تری از سمیت سلولی هستند (۱۹). نتایج مطالعات فوق با مطالعه حاضر همخوانی داشت که در مشتقات مطالعه حاضر هم گروه الکترون کشنده کلر نسبت به سایر ترکیبات اثر ضد میکروبی و سیتو توکسیک قوی نشان داد. داروی ایده آل ضد سرطان باید بدون آسیب رساندن به بافت‌های طبیعی بدن بتواند سلول‌های سرطانی را از میان بردارد. تاکنون راهکارهای زیادی برای درمان سرطان پیشنهاد شده است که بسیاری از آن‌ها تنها در سطح تحقیق‌های دانشگاهی مطرح هستند و در سطح بالینی موفقیت آمیز نبوده است. از روش‌های درمانی که امروز مطرح هست استفاده از ترکیب‌های هتروسیکلیک در درمان سرطان است (۲۰). نوکلئوتیدهای پیریمیدین در سنتز DNA، RNA در همه ارگانسیم‌های زنده اهمیت بنیادی دارند (۲۱). نتایج پژوهش حاضر نشان داد این ترکیب‌ها در کم‌ترین بازه زمانی و با غلظت‌های مشخص دارای اثر مهار رشد بر روی سلول‌های سرطانی هستند، مطالعه‌های قبلی نشان داد پیریمیدین‌ها دارای اثر ضد سرطانی است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب‌ها ناشی از ظرفیت بالای آن‌ها در انتقال الکترون‌ها، شلاته کردن یون‌های آهن و روبش گونه‌های واکنشگر اکسیژن است (۲۲). در سنتز این ترکیب‌ها یکی از اهداف مورد توجه اضافه کردن استخلاف به این ترکیب‌ها جهت بازدهی بالای آن‌ها است. انتخاب این استخلاف‌ها براساس مطالعه‌های انجام شده در این زمینه‌ها است. در مطالعه‌ای مشخص شده است که حضور استخلاف ۹ متوکسی در ساختار این ترکیب‌های حلقوی در ایفای نقش آن به عنوان یک عامل ضد ویروسی بسیار مؤثر است (۲۳). هم‌چنین احتمال داد شده که استخلاف‌های کلر و برم این ترکیب‌ها در بروز خاصیت ضد سرطانی بودن آن مؤثر است (۲۴). در مطالعه حاضر استخلاف‌هایی نظیر کلر، متوکسی استفاده شد که پیش‌تر به عنوان یک استخلاف مهم و تأثیرگذار در سمیت مشتق‌ها عنوان شده بودند. ترکیب‌های سنتزی و هم‌چنین غلظت‌های متفاوت آن‌ها بر روی رشد و تکثیر سلول‌های نرمال MCF-10 و سلول‌های سرطانی MCF-7 بررسی شد. در مطالعه Zhang

در مطالعه حاضر نیز مشتقات کلردار تأثیرات ضد میکروبی خوبی بروی باکتری مثبت داشتند که همانند مطالعه فوق نشان دهنده اثرات ضد میکروبی و ضد سلولی ترکیبات دارای ساختار پیریمیدین هستند و نتایج همخوانی داشتند.

مطالعه Mughal و همکاران در سال ۲۰۱۸ تحت عنوان طراحی، سنتز و ارزیابی بیولوژیکی مشتقات جدید دی‌هیدروپیریمیدین-۲-تیون به عنوان عوامل ضد میکروبی قوی، رویکرد اتصال تجربی و مولکولی انجام دادند. فعالیت ضد باکتریایی، ترکیبات ۵، ۱۲ و ۱۳ بیش‌ترین ناحیه مهار را در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مقایسه با داروی استاندارد سفیکسیم نشان دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اکثر ترکیبات سنتز شده در مقایسه با داروی استاندارد در برابر همه سویه‌های باکتریایی آزمایش شده فعال‌تر بودند که با نتایج تجربی و نظری آشکار شد (۱۸). در مطالعه حاضر نیز همانند مطالعات فوق اثرات ضد میکروبی در مقابل باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با داروی استاندارد جتنامایسین اثر مهار و کشندگی خوبی را نشان داد.

مطالعه Desai و همکاران در سال ۲۰۱۸، تحت عنوان سنتز و فعالیت ضد میکروبی دی‌هیدروپیریمیدینون‌های حاوی فلئور و حاوی پیرازول انجام دادند. ترکیبات 4b، 4c، 4f، 4g، 4i و 4j فعال‌ترین مشتقات شناسایی شده در فعالیت ضد میکروبی بودند. بر اساس فعالیت ضد باکتریایی، مشاهده شد که ترکیبات b و 4c در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با حداقل غلظت مهار ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب فعالیت از خود نشان دادند. از مطالعات مربوط به فعالیت ساختار، می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌های الکترون کشنده نقش مهمی در افزایش اثرات ضد میکروبی و سیتو توکسیک ترکیبات عنوان شده داشتند. علاوه بر این، نتایج مطالعات سمیت سلولی نشان داد که ترکیبات 4b، 4c، 4g و 4j دارای سطوح

و همکاران مشتقات ۹ بنزوهتروسیکل پیریدوپیریمیدین طراحی و سنتز شد. این گروه فعالیت ضد تکثیری ۶۹ ترکیب جدید سنتزی سلول‌های لوسمی پرومی لوسیتیک 9 انسان (HL-60) سرطان معده انسان (BGC-823) و رده سلول سرطانی هپاتوم انسانی (SMMC-7721) مورد ارزیابی قرار دادند. ترکیب‌های با استخلاف‌های نیتروبنزیلی و هالوبنزیلی (فلوئور و برم) بیش‌ترین اثر سمیت بر روی این چهار رده سلول سرطانی را از خود نشان دادند. مکانیسم اثر گزارش شده توسط این گروه، بازدارندگی آنزیم Top 1 در مرحله تکثیر سلولی است (۲۵، ۲۶). در راستای این مطالعه نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب‌های پیریمیدینی که حاوی استخلاف‌های کلر از گروه الکترون کشنده به تنهای هستند، دارای بیش‌ترین تأثیر در غلظت و زمان‌های مشخص بر کاهش رشد سلول‌های سرطانی سینه هستند و از طرفی بر روی سلول‌های نرمال در این غلظت‌ها اثر سمیت نشان ندادند.

در مطالعه Metwally و همکاران در سال ۲۰۱۹، تحت عنوان طراحی، سنتز، ارزیابی ضد سرطان، اتصال مولکولی و تجزیه و تحلیل چرخه سلولی مشتقات ۳-متیل-۴،۷-دی هیدروپیرازول (۱ و ۵) پیریمیدین به عنوان مهارکننده‌های قوی هیستون لیزین دمیلازا KDM و القاء کننده آپوپتوز را انجام دادند، برخی از ترکیبات انتخاب شده از این سری برای اثر سیتوتوکسیک روی رده‌های سلولی بدخیم پستان MCF-7 و HeLa از طریق سنجش MTT مورد آزمایش قرار گرفتند. ترکیبات ۵، 7e و 7i فعالیت سیتوتوکسیک بیش‌تری را در مقابل دو رده سلولی سرطانی که دو کسورویسین به عنوان داروی کنترل مصرف می کردند، نشان دادند (۲۷). مطالعه حاضر این نتایج قوی را بر روی رده سلولی سرطانی در مقابل داروی دو کسورویسین به عنوان کنترل داشت و هم‌چنین دوزهای مصرفی از این ترکیب‌ها بدون داشتن اثر سمیت بر روی سلول‌های نرمال را نشان داد. مقاله‌های مختلفی در کنار بررسی اثر سیتوتوکسیک ترکیب‌های پیریمیدینی، به بررسی مکانیسم‌های احتمالی

اثر این ترکیب‌ها پرداخته‌اند و فرضیه‌هایی را در این زمینه بیان نموده‌اند (۲۸). در مطالعه اصغری و همکاران در سال ۲۰۱۸، ترکیبات سنتز شده از نظر سمیت سلولی علیه رده‌های سلولی سرطانی HeLa با استفاده از روش MTT ارزیابی و بررسی شدند. نتایج نشان داد که سمیت سلولی با غلظت افزایش می‌یابد. در میان ترکیبات آزمایش شده، 4e و 4f که حاوی یک استخلاف کلر هستند، اثرات سیتوتوکسیک بیش‌تری (به ترتیب $9/90 \pm 0/2 \mu\text{M}$ و $10/36 \pm 0/60 \text{ IC}_{50}$) در مقایسه با دو کسورویسین ($3/40 \pm 0/20 \text{ IC}_{50}$) پس از ۴۸ ساعت نشان دادند. علاوه بر این، ارزیابی آنتی‌اکسیدانی نشان داد که استخلاف (الکترون دهنده یا اهدای کننده) روی حلقه آروماتیک به طور قابل توجهی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارند (۶).

در بررسی اثرات ضد میکروبی مشتقات، مشتق 4e نسبت به مشتقات دیگر اثرات بهتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت داشته ولی بر روی باکتری‌های گرم منفی اثرات ضد باکتری ضعیفی داشتند و خاصیت میکروبی آن‌ها نسبت به داروی استاندارد کم تر بوده ولی با توجه به تایید اثرات ضد میکروبی این مشتقات در مطالعات متعدد دیگر می‌توان با بررسی‌های بیش‌تر بر روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت و با اضافه کردن استخلاف‌های الکترون کشنده در ساختار مشتقات ترکیباتی با خاصیت ضد میکروبی خوبی تهیه نمود. هم‌چنین در این مطالعه مقایسه بین نتایج نشان داد درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی در ترکیب 4e در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت از سایر مشتق‌ها بیش‌تر بوده است؛ بنابراین گروه عاملی کلر توانسته نسبت به سایر مشتق‌ها نقش مؤثرتری بر کاهش رشد سلول‌های سرطانی ایفا کند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی و نتیجه طرح تحقیقاتی با کد رهگیری ۷۲۴۱۳۴۵۷۱، صورت پذیرفت. کمال تشکر و قدردانی را از کسانی که در این پژوهش یاری رساندند داریم.

References

- Heydari A, Taghizadeh Armaki M, Jafarzade J, Vahidi B, Yazdizadeh M, khafri S, et al. Evaluation of the Efficacy of Synthetic Indole-HydrazonoThiazolidinone Compounds on Candida Isolates from Oral Infections. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2024; 34 (237): 30-39. (Persian).
- Abd Rehan T. Review on different five-membered heterocyclic aromatic compounds and their pharmaceutical applications. *Thamer Abd Rehan thamer. abd. rehan@ kus. edu. iq College of Science, Alkarth University of Science* 2024; 12(6):2320-9186.
- Abdullahi SR, Shafi AM, Raghav S, MA'ARUF AM. Pyrimidine derivatives: Recent discoveries and development towards its medicinal impact. *GSC Advanced Research and Reviews* 2024; 20(1):114-128.
- Brown DJ. *Fused Pyrimidines, Part 3: Pteridines*. John Wiley & Sons; 2009.
- Katritzky AR, Rees CW, Scriven EF V. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II: A Review of the Literature*. 2nd ed; 1982-1995.
- Khalilpour A, Asghari S. Synthesis, characterization and evaluation of cytotoxic and antioxidant activities of dihydropyrimidone substituted pyrrole derivatives. *Med Chem Res* 2018; 27:15-22.
- Hu X, Sun L, Nie T, Yang Y, Wang X, Pang J, et al. Evaluation of Agar Dilution Method in Susceptibility Testing of Polymyxins for Enterobacteriaceae and Non-Fermentative Rods: Advantages Compared to Broth Microdilution and Broth Macrodilution. *Antibiotics* 2022; 11(10): 1392 PMID: 36290050.
- Khalilpour A, Asghari S, Pourshab M. Synthesis and characterization of novel Thiazolo [3, 2-a] pyrimidine derivatives and evaluation of antioxidant and cytotoxic activities. *Chemistry & Biodiversity*. 2019 May; 16(5): e1800563 PMID: 30740903.
- Mohana R, Selvara J, Rajesh S. Synthetic chemistry of pyrimidines and fused pyrimidines: a review. *Synthetic Communications* 2016; 46(8): 645-672.
- Estrada E, Peña A. In silico studies for the rational discovery of anticonvulsant compounds. *Bioorg Med Chem* 2000; 8(12): 2755-2770 PMID: 11131167.
- Mancini A, Fallacara AL, Zamperini C, Iovenitti G, Molinari A, Rango E, et al. Preclinical development of novel pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines structure-based TKIs for the treatment of glioblastoma. *Cancer Res* 2019; 79(13):2201-2201.
- Yeh HW, Lee SS, Chang CY, Hu CM, Jou YS. Pyrimidine metabolic rate limiting enzymes in poorly differentiated hepatocellular carcinoma are signature genes of cancer stemness and associated with poor prognosis. *Oncotarget* 2017; 8(44):7 7734-77751 PMID: 29100421.
- Kumar D, Khan SI, Ponnann P, Rawat DS. Triazine-pyrimidine based molecular hybrids: Synthesis, docking studies and evaluation of antimalarial activity. *New J Chem* 2014; 38(10): 5087-5095.
- Hamama WS, Ibrahim ME, Metwalli AE, Zoorob HH. New synthetic approach to coumarino [4, 3-b] pyridine systems and potential cytotoxic evaluation. *Medicinal Chemistry Research* 2014; 23(5): 2615-2621.
- Reddy OS, Suryanarayana CV, Narayana KJ, Anuradha V, Babu BH. Synthesis and cytotoxic evaluation for some new 2, 5-disubstituted pyrimidine derivatives for

- anticancer activity. *Med Chem Res* 2015; 24: 1777-1788.
16. Mohamed MS, Youns MM, Ahmed NM. Novel indolyl-pyrimidine derivatives: synthesis, antimicrobial, and antioxidant evaluations. *Medicinal Chemistry Research* 2014; 23(7): 3374-3388.
17. Patel BY, Karkar TJ, Bhatt MJ. Synthesis of 5-substituted-1, 3, 4-oxadiazole clubbed pyrazole and dihydropyrimidine derivatives as potent bioactive agents. *European Chemical Bulletin* 2021; 10(1):13-20.
18. Mughal EU, Sadiq A, Hamayun M, Zafar MN, Fatima N, Yameen MA, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel dihydropyrimidine-2-thione derivatives as potent antimicrobial agents: experimental and molecular docking approach. *Letters in Drug Design & Discovery* 2018; 15(11): 1189-1201.
19. Desai N, Vaghani H, Patel B, Karkar T. Synthesis and Antimicrobial Activity of Fluorine Containing Pyrazole-clubbed Dihydropyrimidinones. *Indian J Pharm Sci* 2018; 80(2): 242-252.
20. Buron F, Méroux JY, Akssira M, Guillaumet G, Routier S. Recent advances in the chemistry and biology of pyridopyrimidines. *Eur J Med Chem* 2015; 95: 76-95 PMID: 25794791.
21. Irwin WJ, Wibberley DG. Pyridopyrimidines: I, 3, 5-, I, 3, 6-, I, 3, 7-, and I, 3, 8-Triazanaphthalenes. *Advances in Heterocyclic Chemistry* 1969; (10):149-198.
22. Khalilpour A, Asghari S, Pourshab M. Synthesis and Characterization of Novel Thiazolo [3, 2-a] pyrimidine Derivatives and Evaluation of Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Chem Biodivers* 2019; 16(5): e1800563 PMID: 30740903.
23. Dansena H, Dhongade HJ, Chandrakar K. Pharmacological potentials of pyrimidine derivative: a review. *Asian J Pharm Clin Res* 2015; 8(4): 171-177.
24. Wan QL, Meng X, Fu X, Chen B, Yang J, Yang H, et al. Intermediate metabolites of the pyrimidinemetabolism pathway extend the lifespan of *C. elegans* through regulating reproductive signals. *Aging (Albany NY)* 2019; 11(12): 3993-4010 PMID: 31232697.
25. Zhang JP, Huang J, Liu C, Lu XF, Wu BX, Zhao L, et al. Discovery of a series of pyridopyrimidine derivatives as potential topoisomerase I inhibitors. *Chinese Chemical Letters* 2014; 25(7): 1025-1028.
26. Li Z, Ding L, Li Z, Wang Z, Suo F, Shen D, et al. Development of the triazole-fused pyrimidine derivatives as highly potent and reversible inhibitors of histone lysine specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A). *Acta Pharm Sin B* 2019; 9(4):794-808 PMID: 31384539.
27. Metwally NH, Mohamed MS, Ragb EA. Design, synthesis, anticancer evaluation, molecular docking and cell cycle analysis of 3-methyl-4, 7-dihydropyrazolo [1, 5-a] pyrimidine derivatives as potent histone lysine demethylases (KDM) inhibitors and apoptosis inducers. *Bioorganic chemistry*. 2019 Jul 1; 88: 102929 PMID: 31015179.
28. Saurat T, Buron F, Rodrigues N, De Tauzia ML, Colliandre L, Bourg S, et al. Design, synthesis, and biological activity of pyridopyrimidine scaffolds as novel PI3K/mTOR dual inhibitors. *J Med Chem* 2014; 57(3): 613-131 PMID: 24345273.