

Synthesis and Antifungal Activity Evaluation of a Fluconazole Analog Derived from Dithiocarbamate

Saeed Emami¹
Yaser Mahmoudi²
Seyedeh Mahdiah Hashemi³
Hamid Badali⁴
Hamed Fakhim⁵
Mohammad Shokrzadeh⁶
Marjan Fallah⁷

¹ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Medicinal Chemistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Student in Pharmacy, Student Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Medical Mycology & Parasitology/Invasive Fungi Research Center (IFRC), Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁶ Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medicinal Plant Research Centre, Islamic Azad University, Amol, Iran

(Received January 6, 2023; Accepted May 25, 2024)

Abstract

Background and purpose: Among the different categories of antifungal drugs, azole antifungals have received more attention due to their broad spectrum, high potency, and acting on specific target enzyme. Fluconazole is one of these drugs that as a bis-triazole, was the first triazole drug to enter the market. New-generation antifungal drugs such as albaconazole and voriconazole have been designed by replacing one of the triazole rings of fluconazole with other heterocycles. Based on this strategy, in this research, a new derivative of fluconazole in which a triazole residue of fluconazole is replaced by 4-benzylpiperazine dithiocarbamate was synthesized and its effects were evaluated in vitro.

Materials and methods: The desired final compound (**6**) was obtained from the reaction of two key intermediates, oxirane, and *N*-benzylpiperazine, in the presence of carbon disulfide and triethylamine in ethanol. To prepare the oxirane derivative, the reaction of a ketonic compound namely 1-(2,4-difluorophenyl)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl) ethan-1-one with trimethylsulfoxonium iodide was used. On the other hand, for the synthesis of *N*-benzyl piperazine, benzyl chloride was refluxed with the excess of piperazine. It should be noted that the purification of the compounds was done with common methods of extraction and recrystallization and there is no need for chromatography. The structure of the final synthesized compound was confirmed by infrared (IR) nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS). The antifungal activity of the synthesized compound was investigated in comparison with fluconazole against several species of pathogenic fungi sensitive to fluconazole, including *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, and *Candida tropicalis*, as well as fluconazole-resistant isolates, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in vitro by broth micro-dilution method. In addition, the hemolytic effect on red blood cells and cytotoxicity on HepG2 cells were investigated for this compound. The docking mode of the target compound with lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) enzyme was also studied.

Results: Preliminary investigation of antifungal effects on ten fungi strains sensitive to fluconazole showed that the target compound with MIC values between 0.063 and 1 μ g/ml has strong antifungal effects on *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, and *C. tropicalis*. In general, its antifungal activity was 4-64 times more than that of fluconazole. Also, the compound showed a good anti-*Candida* profile against fluconazole-resistant species. While the MIC values of fluconazole against *C. albicans* and *C. krusei* isolates were equal to or greater than 64 μ g/ml, compound **6** effectively inhibited the growth of *C. albicans* and *C. krusei* resistant to fluconazole at concentrations of 8 or 16 μ g/ml. The MIC value of this compound against *C. parapsilosis* was equal to 0.5 μ g/ml. The results of in vitro hemolysis and cytotoxicity tests also showed that this compound is as safe for human cells as fluconazole. The docking study showed that the designed compound can interact more tightly with the lanosterol 14 α -demethylase enzyme due to the presence of a benzylpiperazine dithiocarbamate scaffold in its structure.

Conclusion: According to the obtained results, the compound synthesized in this study is a suitable candidate for conducting in vivo tests and other preclinical and pharmacokinetic tests to discover a new antifungal drug.

Keywords: antifungal azoles, fluconazole, dithiocarbamate, antifungal activity, lanosterol 14 α -demethylase

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (234): 34-47 (Persian).

Corresponding Author: Saeed Emami - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
(E-mail: semami@mazums.ac.ir)

سنتز و بررسی اثرات ضد قارچی آنالوگی از فلوکونازول، مشتق شده از دی‌تیوکاربامات

سعید امامی^۱
یاسر محمودی^۲
سیده مهدیه هاشمی^۳
حمید بدلی^۴
حامد فخیم^۵
محمد شکرزاده^۶
مرجان فلاح^۷

چکیده

سابقه و هدف: از میان دسته‌های مختلف داروهای ضد قارچ، ضد قارچ‌های آزولی به دلیل گستره عملکردی، قدرت اثر بالا و داشتن آنزیم هدف مشخص، بیش تر مورد توجه قرار گرفته‌اند. فلوکونازول یکی از این داروها است که به‌عنوان یک بیس-تریازول و به‌عنوان اولین داروی تریازولی، وارد بازار گردید. داروهای نسل جدید ضد قارچی مانند آلباکونازول و ووریکونازول با استخلاف یکی از حلقه‌های تریازول فلوکونازول با هتروسیکل‌های دیگر به وجود آمده‌اند. بر همین اساس، در این تحقیق مشتق جدیدی از فلوکونازول که در آن یک بازوی تریازولی فلوکونازول با ۴-بنزیل پیرازین دی‌تیوکاربامات جایگزین شده است، سنتز گردید و اثرات ضدقارچی آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ترکیب نهایی موردنظر (۶) از واکنش دو حد واسط کلیدی اکسیران و *N*-بنزیل پیرازین در حلال اتانول و در مجاورت کربن دی‌سولفید و تری اتیل آمین به‌دست آمد. به منظور تهیه مشتق اکسیران، از واکنش ترکیب کتونی با نام شیمیایی ۱-(۲-۴-دی‌فلوروفنیل)-۲-(۱-*H*)-۴،۵-تریازول-۱-یل) اتان-۱-اون با تری متیل سولفو کسونیوم یدید استفاده گردید. در مسیر دیگر و برای سنتز *N*-بنزیل پیرازین، ابتدا بنزیل کلراید به همراه پیرازین در حلال اتانول رفلکس شد و طی حمله نوکولوفیلی یکی از اتم‌های نیتروژن پیرازین مونوبنزیله گردید. لازم به ذکر است خالص‌سازی ترکیبات با روش‌های رایج استخراج و تبلور مجدد انجام شده و نیازی به کروماتوگرافی نمی‌باشد. ساختار ترکیب نهایی به‌دست آمده توسط طیف‌های مادون قرمز (IR) و رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR) و طیف سنجی جرمی (MS) تایید گردید. بررسی فعالیت ضد قارچی ترکیب سنتز شده در مقایسه با فلوکونازول بر علیه چندین گونه از قارچ‌های پاتوژن حساس به فلوکونازول شامل *کاندیدا آلیکس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا کروس*، و *کاندیدا تروپیکالیس*، و هم‌چنین ایزوله‌های مقاوم به فلوکونازول انجام گرفت و حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) به‌وسیله روش *Broth Micro-dilution* به‌صورت *In vitro* تعیین گردید. علاوه بر این، اثر همولیتیک روی گلبول‌های قرمز و سمیت سلولی روی سلول‌های HepG2 برای این ترکیب بررسی شد. نحوه داکینگ ترکیب مورد نظر با آنزیم لانوسترول ۱۴ α -دمتیلز (CYP51) هم مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی اولیه اثرات ضدقارچی روی ۱۰ قارچ حساس به فلوکونازول نشان داد که ترکیب سنتز شده با مقادیر MIC بین ۰/۰۶۳ تا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اثرات ضدقارچی بسیاری قوی‌تر روی *کاندیدا آلیکس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا کروس* و *کاندیدا تروپیکالیس* برخوردار است. به‌طور کلی، اثرات ضدقارچی آن ۴ الی ۶۴ برابر فلوکونازول بود. هم‌چنین این ترکیب پروفایل ضد کاندیدیایی خوبی را در برابر گونه‌های مقاوم به فلوکونازول نشان داد در حالی که مقادیر MIC فلوکونازول در برابر ایزوله‌های *کاندیدا آلیکس* و *کاندیدا کروس* معادل یا بیش تر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ترکیب 6 به‌طور موثری از رشد *کاندیدا آلیکس* و *کاندیدا کروس* مقاوم به فلوکونازول در غلظت‌های ۸ یا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر جلوگیری کرد. مقدار MIC این ترکیب در برابر *کاندیدا پاراپسیلوزیس* معادل ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. انجام آزمون‌های همولیز و سمیت سلولی هم نشان داد که این ترکیب به اندازه فلوکونازول برای سلول‌های انسانی ایمن و بدون آزار است. مطالعه داکینگ نشان داد که ترکیب طراحی شده به واسطه دارا بودن بخش بنزیل پیرازین دی‌تیوکاربامات می‌تواند ارتباط موثرتری با آنزیم لانوسترول ۱۴ α -دمتیلز برقرار نماید.

استنتاج: با توجه به نتایج به‌دست آمده، ترکیب سنتز شده در این مطالعه، کاندید مناسبی برای انجام تست‌های *in vivo* و بقیه آزمون‌های پیش بالینی و فارماکوکینتیکی در راستای کشف داروی جدید ضد قارچ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آزول‌های ضد قارچ، فلوکونازول، دی‌تیوکاربامات، اثر ضدقارچی، لانوسترول ۱۴ α -دمتیلز

E-mail: semami@mazums.ac.ir

مؤلف مسئول: سعید امامی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استادیار، مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۶. استاد، گروه سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۷. استادیار، گروه داروشناسی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۳/۵

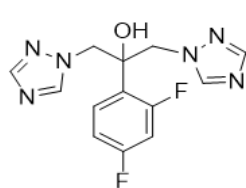
مقدمه

عفونت‌های قارچی ناشی از قارچ‌های فرصت طلب از جمله عفونت‌هایی هستند که امروزه در جوامع انسانی شیوع یافته‌اند. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که برخی از افراد که دارای ضعف سیستم ایمنی هستند، همچون بیماری نقص اکتسابی (AIDS)، بیش‌تر در معرض ابتلا به این عفونت‌ها می‌باشند. امروزه پژوهشگران به دنبال یافتن عوامل ضدقارچی جدید می‌باشند (۱-۳). مقاومت ایجاد شده بر علیه داروهای ضد قارچی از نظر اهمیت هم سطح با مقاومت ایجاد شده بر علیه عوامل ضد باکتریایی نیست. شاید دلیل اصلی این امر را بتوان به محدود بودن تعداد عوامل ضد قارچی موجود نسبت داد. امروزه مصرف ترکیبات ضد قارچی به علت دارا بودن عوارض جانبی وسیع به میزان زیادی محدود شده است. سمیت و مقاومت دارویی، دلایل اصلی تحقیقات وسیع روی ترکیبات ضدقارچی جدید و بررسی اثرات درمانی آن‌ها است. گسترش مقاومت نسبت به داروهای ضد قارچ موجود، ضرورت تحقیق جهت دستیابی به عوامل ضد قارچ جدید را روشن می‌سازد. علاوه بر این اکثر داروهای موجود دارای طیف ضدقارچی نسبتاً محدودی هستند و یا به دلیل سمیت قابل ملاحظه‌ای که دارند قابلیت مصرف سیستمیک ندارند (۴-۶). اگرچه داروهای ضد قارچ از تنوع زیادی برخوردار هستند، ولی در بین آن‌ها آزول‌های ضد قارچ، از بزرگ‌ترین دسته داروهای ضد قارچ هستند که هنوز جایگاه خود را در درمان و تحقیقات حفظ کرده‌اند. علاوه بر این آزول‌ها از معدود ترکیباتی هستند که آنزیم هدف مشخصی دارند و از ویژگی اثر نسبتاً مناسبی روی قارچ‌ها برخوردار می‌باشند (۷-۹). داروهای ضد قارچی گروه آزول بر حسب ساختمان به دو دسته ایمیدازول‌ها و تریازول‌ها تقسیم می‌شوند. فلوکونازول و ایتراکونازول از جمله داروهای تریازولی هستند که جایگاه ویژه‌ای در درمان عفونت‌های قارچی یافته‌اند (تصویر شماره ۱) (۱۰، ۱۱). فلوکونازول به دلیل داشتن وزن مولکولی کم، تمایل کم به پلاسما، حلالیت در آب و نیمه عمر طولانی، انتخاب

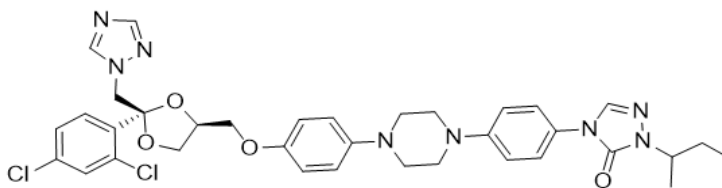
ارجحی جهت درمان عفونت‌های قارچی می‌باشد. هم‌چنین به دلیل عدم بروز عوارض جانبی شدید مثل درماتیت پوسته شونده و نارسایی کبدی در مقایسه با کتوکونازول و ایتراکونازول دارای اولویت می‌باشد (۱۰، ۱۲). به‌منظور دستیابی به آنالوگ جدیدی از فلوکونازول، در این تحقیق یکی از حلقه‌های تریازولی فلوکونازول با استخلاف ۴- بنزیل پیرازین دی‌تیوکاربامات جایگزین شده است (تصویر شماره ۲). فلوکونازول دارای بخش فارماکوفوری ۲ و ۴- دی فلوئورو فیل اتیل تریازول است، لذا بیش‌تر ترکیبات گزارش شده از این اسکلت ساختاری برخوردار هستند (۹). البته مشتقات دی تیوکاربامات هم قبلاً به‌عنوان ترکیبات ضد قارچ و قارچ کش معرفی شده‌اند که در ترکیب موردنظر، نقش زنجیره جانبی را بازی می‌کند و ممکن است خود نیز نقش فارماکوفوری داشته باشد (۱۳، ۱۴).

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، ترکیب نهایی ۶ مطابق شمای کلی نشان داده شده در تصویر شماره ۳ سنتز شده است. تمامی واکنش‌ها و ترکیبات به دست آمده به وسیله کروماتوگرافی واکنش‌ها و ترکیبات به دست آمده به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) کنترل شدند. روش TLC با استفاده از ورقه‌های نازک پلاستیکی دارای لایه نازک سیلیکاژل صورت پذیرفت و پس از قرار گرفتن در حلال مناسب و پیشرفت حلال و جدا شدن لکه‌ها روی سیلیکاژل، لکه‌ها به وسیله لامپ ماورای بنفش (UV) قابل رویت گردید. نقطه ذوب مواد به وسیله دستگاه Scientific SMP3 Bibby Stuart اندازه گیری شد. طیف مادون قرمز (IR) با استفاده از دستگاه Perkin Elmer و طیف رزونانس مغناطیسی هسته هیدروژن ($^1\text{H NMR}$) با بهره‌گیری از دستگاه اسپکترومتر Bruker 400 MHz تهیه گردید و جا به جایی شیمیایی (δ) بر حسب ppm و در مقایسه با شاهد داخلی تترا متیل سیلان (TMS) می‌باشد.

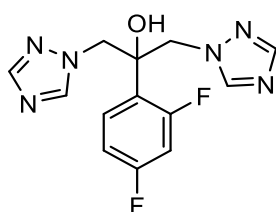


Fluconazole

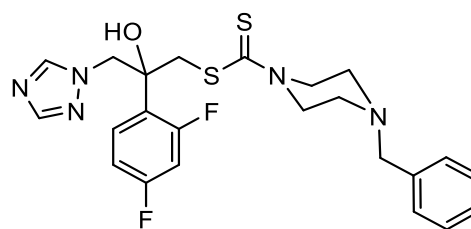
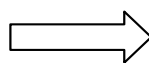


Itraconazole

تصویر شماره ۱: ساختمان دو ترکیب ضد قارچ تریازولی

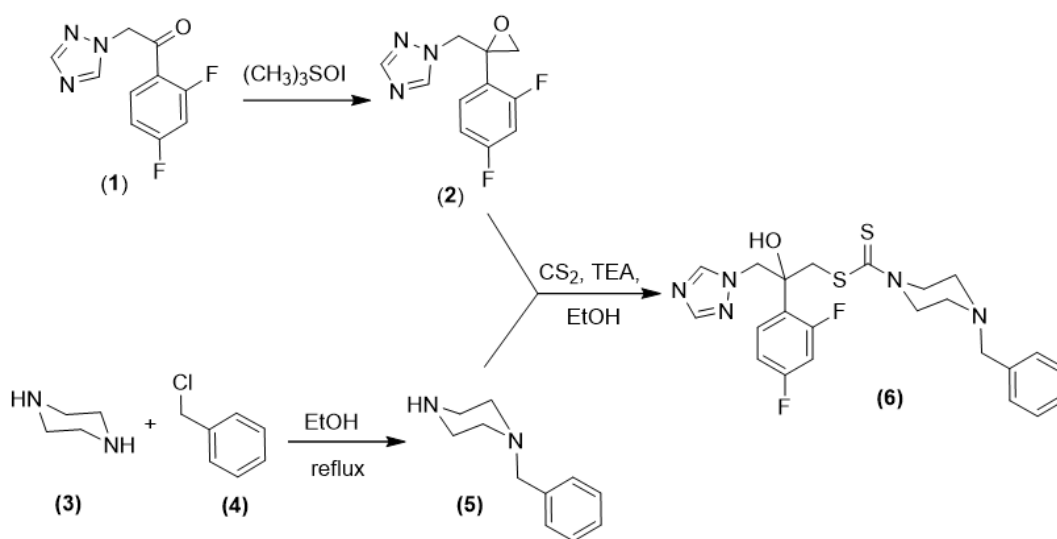


Fluconazole



Target compound

تصویر شماره ۲: ساختار ترکیب طراحی شده در این پژوهش، بر اساس تغییر یکی از حلقه های تریازولی فلوکونازول



تصویر شماره ۳: شمای کلی سنتز ترکیب نهایی ۶

تهیه اکسیران (ترکیب ۲)

مخلوط واکنش در حالی که بهم زده می‌شد، به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. پس از اتمام واکنش، محیط واکنش با ۴۰ میلی لیتر تولوئن رقیق گردید و آب سرد به آن اضافه شد. سپس فاز آلی جدا گردید و در طی دو مرحله با ۲۰ میلی لیتر

به محلول تریازولیل اتانول (ترکیب ۱، ۲۳/۷ میلی مول) در ۶۰ میلی لیتر تولوئن، تری متیل سولفو کسونیوم یدید (۳۹/۳ میلی مول) افزوده شد و سپس ۸ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۲۰ درصد اضافه گردید و

آب شستشو داده شد و بعد از آن با سولفات سدیم خشک شد. پس از تبخیر حلال تحت خلاء ترکیب مورد نظر به صورت ماده روغنی با رنگ قهوه‌ای روشن به دست آمد (۱۵،۱۶).

تهیه N- بنزیل پیرازین (ترکیب ۵)

جهت تهیه این مشتق، ۱ میلی‌مول از بنزیل کلراید (۴) با ۳ میلی‌مول پیرازین (۳) در یک بالن با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول مخلوط و به مدت ۲ ساعت رفلاکس گردید. سپس پیشرفت واکنش توسط TLC بررسی شد (حلال تانک n- هگزان). بعد از اتمام واکنش و سرد شدن محلول، ۱۰ میلی‌لیتر آب به بالن اضافه شد و سپس توسط اتیل استات استخراج و تغلیظ گردید تا ترکیب ۵ حاصل شود (۱۷).

تهیه مشتق نهایی (ترکیب ۶)

به محلولی از مشتق بنزیل پیرازین ۵ (۱ میلی‌مول) در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول، تری اتیل آمین (۱ میلی‌مول) و بعد از چند دقیقه کربن دی سولفید (۳ میلی‌مول) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در حمام یخ بهم زده شد. بعد از تمام شدن واکنشگر ۵، حد واسط اپوکساید ۲ (۱ میلی‌مول) به واکنش اضافه و ۲۴ ساعت دیگر در دمای آزمایشگاه بهم زده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر آب به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت یک شب در یخچال قرار گرفت. سپس رسوب حاصل صاف و با هگزان- اتر متبلور گردید.

بررسی اثرات بیولوژیکی ترکیب ۶

بررسی اثرات ضد قارچی

مقادیر MIC (حداقل غلظت بازدارنده) ترکیب ۶ در برابر شانزده سویه کاندیدا از پنج گونه مختلف شامل کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروسا و کاندیدا تروپیکالیس تعیین شد. تعیین مقادیر MIC با روش micro-dilution مطابق با توصیه موسسه استانداردهای بالینی و

آزمایشگاهی (CLSI) و به استاندارد M27-A3 و M27-S4 صورت گرفت (۱۸،۱۹). ملاک حساسیت یا مقاومت ایزوله‌های قارچی به فلوکونازول طبق شیوه نامه پیشنهادی CLSI به صورت زیر در نظر گرفته شد (۲۰). برای کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، و کاندیدا تروپیکالیس MIC مساوی یا کم‌تر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان حساس، MIC معادل با ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان حساس وابسته به دوز و MIC مساوی یا بیش از ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان مقاوم در نظر گرفته شد. برای کاندیدا گلابراتا MIC مساوی یا کم‌تر از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان حساس وابسته به دوز و MIC مساوی یا بیش از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان مقاوم در نظر گرفته شد. در مورد کاندیدا کروسا، MIC مساوی یا بیش از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان مقاوم لحاظ گردید. محلول استوک از فلوکونازول و ترکیب ۶ در دی متیل سولفوکسید (DMSO) تهیه شد و رقت‌های متوالی بعدی با استفاده از محیط RPMI-1640 (شرکت سیگما) بافر شده تا pH 7.0 با اسید مورفولین پروپان سولفونیک (MOPS) ۰/۱۶۵ مولار و ال-گلوتامین و بدون بی‌کربنات انجام شد. غلظت نهایی ترکیبات در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای در محدوده ۰/۰۶۳ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تنظیم گردید. دانسته نهایی سوسپانسیون‌های تلقیح سویه‌ها در محدوده 3×10^3 CFU/ml بود. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از ۲۴ ساعت به صورت ظاهری برای تعیین مقادیر MIC مورد بررسی قرار گرفتند. نقاط پایانی MIC با کمک یک آینه تعیین شد و به عنوان کم‌ترین غلظت دارویی که از هر گونه رشد قابل تشخیص (در مقایسه با کنترل بدون دارو) جلوگیری می‌کند، تعیین شد (۲۱).

سنجش همولیز

فعالیت همولیتیک ترکیب ۶ در مقایسه با فلوکونازول طبق روش گزارش شده قبلی مورد ارزیابی قرار

گرفت (۲۲). خون کامل انسان در لوله‌های Vacutainer با پوشش EDTA دی پتاسیم جمع‌آوری شد و در $500 \times g$ گرم به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. گلبول‌های قرمز به دست آمده در محلول سالین (دو بار) و سپس در سالین بافر فسفات (PBS) شسته شدند. گلبول‌های قرمز شسته شده مجدداً در PBS رقیق شدند (۱ به ۲۵). از طرف دیگر، غلظت‌های متفاوتی از ترکیبات در DMSO تهیه شد و مقدار نسبی (۱۰ میکرو لیتر) از هر غلظت به گلبول‌های قرمز رقیق (۱۹۰ میکرو لیتر) در میکرو پلیت ۹۶ خانه اضافه شد، تا غلظت‌های نهایی ۱، ۱۰ و ۵۰ میکرو گرم بر گرم حاصل شود. حلال DMSO و Triton X-100 (2 v/v درصد) به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شدند. پلیت مورد نظر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد و سپس سوسپانسیون $500 \times g$ سانتریفیوژ شد. پس از جمع‌آوری مایع رویی (۱۰۰ میکرو لیتر)، جذب آن در طول موج ۴۵۱ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد همولیز به صورت زیر تعیین شد.

$$\% \text{ Hemolysis} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{positive control}})] \times 100$$

سنجش سمیت سلولی روی سلول‌های HepG2

رده سلولی (Human Hepatocarcinoma) HepG2 از موسسه انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. میزان زنده ماندن سلول‌های HepG2 پس از قرار گرفتن در معرض ترکیب ۶ در مقایسه با فلوکونازول با استفاده از روش MTT تعیین شد که در این مطالعه به اختصار شرح داده می‌شود. ۵۰ میکرو لیتر از محیط EMEM شامل 1×10^5 سلول برای هر غلظت به ۵ چاهک اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از انکوباسیون، ۵۰ میکرو لیتر محلول ترکیب اضافه شد تا به غلظت‌های نهایی ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر برسد. سلول‌های تیمار شده با ترکیب ۶، فلوکونازول و سیس پلاتین (کنترل مثبت) به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از شستشو با نرمال سالین استریل ۰/۰۹ درصد، محتویات

چاهک‌ها دور ریخته شد. سلول‌های هر چاهک با ۳۰ میکرو لیتر MTT تیمار و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سپس محیط از چاهک‌ها خارج شد و ۳۰ میکرو لیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد تا رنگ‌های فورمازان تولید شده حل شود. در نهایت، میکرو پلیت ۹۶ خانه به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده شد و جذب توسط الایزا ریدر ($\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$) اندازه‌گیری شد (۲۳).

مطالعه داکینگ مولکولی

ساختار کریستالوگرافیک CYP51 در کمپلکس با ایتراکونازول برای کاندیدا گلابراتا (PDB ID: 5JLC) و کاندیدا آلیکنس (ID: 5V5Z) از بانک داده‌های پروتئین (PDB) به دست آمد. بسته نرم‌افزاری AutoDockTools (ADT) 1.5.4 برای آماده‌سازی تمام فایل‌های ورودی استفاده شد. هر گونه آب کریستالوگرافی در صورت وجود حذف شد و هیدروژن به ساختار اضافه شد. ساختار سه بعدی این ترکیب توسط Chem3D Ultra 8.0.3 مدل‌سازی شد و از لحاظ انرژی کمینه سازی شد. برای تعریف مکان فعال برای اتصال، شبکه گیرنده با اندازه جعبه شبکه $60 \times 60 \times 60$ با مقدار فاصله ۰/۳۷۵ تعریف شد (۲۴).

یافته‌ها

بر اساس شمای سنتز ارائه شده در تصویر شماره ۳، ترکیبات حد واسط اکسیران (۲) و بنزیل پیرازین (۵) و هم‌چنین ترکیب نهایی ۶ با بازده مناسب و قابل قبول سنتز گردیدند. لذا در مسیر اول سنتز، به منظور تهیه مشتق اکسیران، از واکنش ترکیب کنونی با تری متیل سولفو کسونیوم یدید استفاده گردید. در این مرحله، در اثر واکنش ترکیب ۱ با تری متیل سولفو کسونیوم یدید در محیط قلیایی حلقه اپوکساید بسته شده و ترکیب حد واسط اپوکساید (۲) شکل می‌گیرد. در مسیر دیگر و برای سنتز N-بنزیل پیرازین (۵)، ابتدا بنزیل کلراید به همراه پیرازین در حلال اتانول رفلاکس می‌شود و طی

حمله نوکلوفیلی یکی از اتم‌های نیتروژن پیرازین مونو بنزیدله گردید. محصول نهایی حاصل برهم کنش دو ترکیب سنتزی اکسیران و بنزیدل پیرازین در حضور کربن دی‌سولفید و تری اتیل آمین در حلال اتانول می‌باشد. در این واکنش چند جزئی ابتدا از حمله N -بنزیدل پیرازین (۵) به کربن دی‌سولفید و در حضور باز تری‌اتیل آمین، نمک دی‌تیوکاربامات تشکیل می‌شود که با حمله اتم گوگرد آن به حلقه اکسیران، این حلقه گشوده شده و تریازول الکل مربوطه یعنی ترکیب ۶ شکل می‌گیرد. در این واکنش، اتم گوگرد دی‌تیوکاربامات به کربن با ازدحام کم‌تر در اکسیران حمله کرده و باعث باز شدن آن و ایجاد ساختار تریازول الکل نهایی می‌گردد. خالص سازی ترکیب ۶ از طریق تبلور مجدد با هگزان- اتر میسر گردید و راندمان واکنش ۶۰ درصد بود. لازم به ذکر است خالص سازی ترکیبات با روش‌های رایج استخراج و تبلور مجدد انجام شده و نیازی به کروماتوگرافی نمی‌باشد. ساختار ترکیب نهایی با روش‌های طیف‌سنجی مورد تایید قرار گرفته است. نام شیمیایی، بازده واکنش، نقطه ذوب و اطلاعات طیفی شامل IR, NMR و MS برای ترکیب ۶ در جدول شماره ۱، آورده شده است.

فعالیت ضد قارچی ترکیب مورد نظر در مقابل قارچ‌های پاتوژن حساس به فلوکونازول شامل *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*،

کاندیدا کروسی، و *کاندیدا تروپیکالیس*، بررسی شد و فلوکونازول به عنوان داروی استاندارد ضد قارچ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج به دست آمده از بررسی اثرات ضد قارچی در جدول شماره ۲ و جدول شماره ۳، آورده شده است. محدوده MIC برای ترکیب ترکیب ۶ در محدوده بین ۰/۰۶۳ الی ۱ میکروگرم بر میلی لیتر بود در حالی که داروی استاندارد فلوکونازول در غلظت‌های بالاتر یعنی ۰/۵ تا ۴ میکروگرم بر میلی لیتر باعث مهار قارچ‌های مورد آزمایش می‌شود. همان گونه که می‌دانیم مقاومت در برابر عوامل ضد قارچی موجود مانند فلوکونازول در بسیاری از گونه‌های *کاندیدا* در حال گسترش است، بنابراین اثر ضد قارچی ترکیب سنتز شده بر روی گونه‌های مقاوم به فلوکونازول از جمله *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، و *کاندیدا کروسی* نیز بررسی شد. نتایج به عنوان مقادیر MIC در جدول شماره ۳، ارائه شده است.

به منظور بررسی اثرات جانبی و عوارض ترکیب طراحی شده، سمیت این ترکیب روی گلبول‌های قرمز انسان با تعیین فعالیت همولیتیک آن ارزیابی شد. ترکیب ۶ در غلظت‌های مختلف ۱، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با داروی فلوکونازول و شاهد مثبت Triton X-100 مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج حاصل در نمودار شماره ۱، به نمایش در آمده است.

جدول شماره ۱: خصوصیات فیزیکوشیمیایی و طیفی ترکیب نهایی سنتز شده (ترکیب ۶)

مشخصات مربوطه	اطلاعات فیزیکوشیمیایی و طیف‌سنجی
نام شیمیایی ترکیب	2-(2,4-Difluorophenyl)-2-hydroxy-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl 4-benzylpiperazine-1-carbodithioate
میزان بازده	Yield: 60%
نقطه ذوب	mp: 116-118 °C
طیف مادون قرمز	IR (ν_{max} , cm^{-1}): 3215, 2799, 1616, 1504, 1423, 1274, 1220, 1130, 1088, 968, 879, 696, 734, 676
طیف رزونانس مغناطیسی هسته ای	1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.48-2.61 (m, 4H, piperazine), 3.55 (s, 2H, CH_2 benzylic), 3.86-3.96 (m, 2H, piperazine), 4.01 (d, 1H, J = 14.8 Hz, H_A), 4.29 (d, 1H, J = 14.8 Hz, H_B), 4.32-4.39 (m, 2H, piperazine), 4.67 (d, 1H, J = 14.0 Hz, H_C), 4.72 (d, 1H, J = 14.0 Hz, H_D), 5.34 (s, 1H, OH), 6.79-6.87 (m, 2H, H-3 and H-5), 7.28-7.37 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5' and H-6'), 7.56-7.62 (m, 1H, H-6), 7.84 (s, 1H, triazole), 8.14 (s, 1H, triazole)
طیف سنجی جرمی	MS (m/z , %): 489 (M^+ , <1), 370 (3), 351 (7), 317 (3), 281 (3), 267 (14), 253 (82), 235 (8), 220 (100), 202 (16), 183 (63), 164 (10), 151 (26), 141 (44), 127 (66), 113 (7), 91 (36), 76 (7)
آنالیز عناصر	Anal. Calcd for $C_{28}H_{25}F_2N_5OS_2$: C, 56.42; H, 5.15; N, 14.30

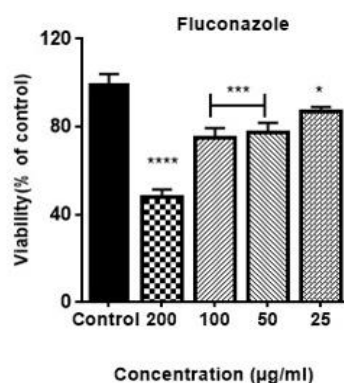
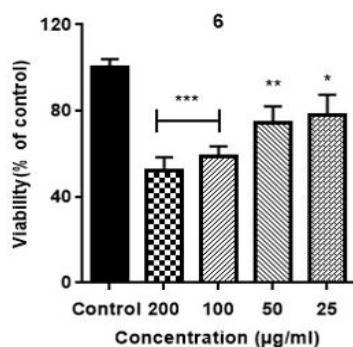
جدول شماره ۲: مقادیر MIC (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر) ترکیب ۶ در مقایسه با فلوکونازول روی گونه های قارچی کاندیدا

فلوکونازول	ترکیب ۶	قارچ
۱	۰/۱۲۵	<i>Candida albicans</i> IFRC 194
۲	۰/۰۶۳	<i>Candida glabrata</i> IFRC 339
۴	۱	<i>Candida glabrata</i> IFRC 1274
۴	۰/۰۶۳	<i>Candida glabrata</i> IFRC 1275
۲	۰/۱۲۵	<i>Candida glabrata</i> IFRC 1276
۰/۵	۰/۰۶۳	<i>Candida parapsilosis</i> IFRC 1269
۰/۵	۰/۰۶۳	<i>Candida parapsilosis</i> IFRC 1270
۱	۰/۰۶۳	<i>Candida parapsilosis</i> IFRC 1271
۴	۰/۰۶۳	<i>Candida krusei</i> IFRC 1012
۴	۰/۰۶۳	<i>Candida tropicalis</i> IFRC1057

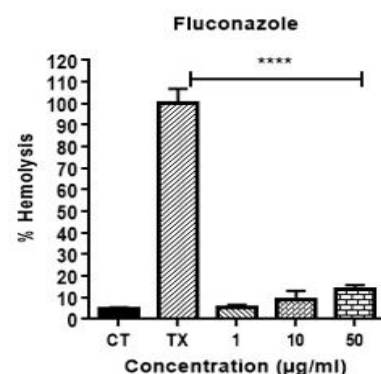
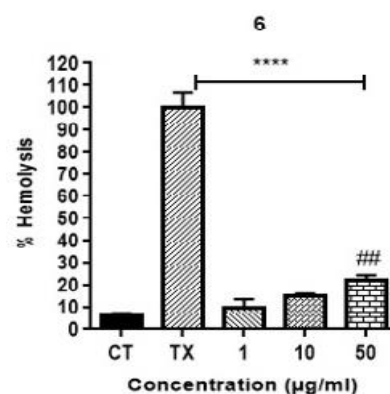
جدول شماره ۳: مقادیر MIC (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر) ترکیب ۶ در برابر ایزوله های مقاوم به فلوکونازول

فلوکونازول	ترکیب ۶	قارچ
≥ ۶۴	۸	<i>Candida albicans</i> IFRC 1260
≥ ۶۴	۱۶	<i>Candida albicans</i> IFRC 1261
≥ ۶۴	۸	<i>Candida albicans</i> IFRC 1262
≥ ۶۴	۰/۵	<i>Candida parapsilosis</i> IFRC 84
≥ ۶۴	۱۶	<i>Candida krusei</i> IFRC 1280
≥ ۶۴	۱۶	<i>Candida krusei</i> IFRC 1281

در این پژوهش اثر سمیت سلولی ترکیب ۶ بر روی سلول های کبدی HepG2 انسانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج سنجش با روش MTT در غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در نمودار شماره ۲، نشان داده است.



نمودار شماره ۲: فعالیت سیتوتوکسیک ترکیب ۶ و فلوکونازول در برابر سلول های HepG2 در غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر

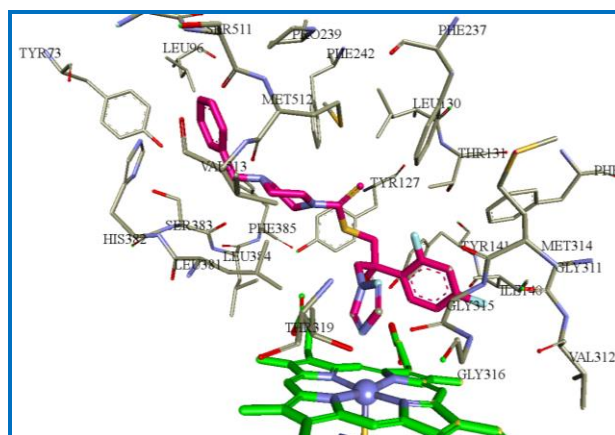


نمودار شماره ۱: فعالیت همولیتیک ترکیب ۶ و فلوکونازول در برابر گلبول های قرمز انسانی در غلظت های ۱، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر. کنترل منفی (CT) شامل گلبول های قرمز تیمار شده با DMSO و کنترل مثبت شامل گلبول های قرمز تیمار شده با Triton X-100 (TX, 2% v/v) می باشد.

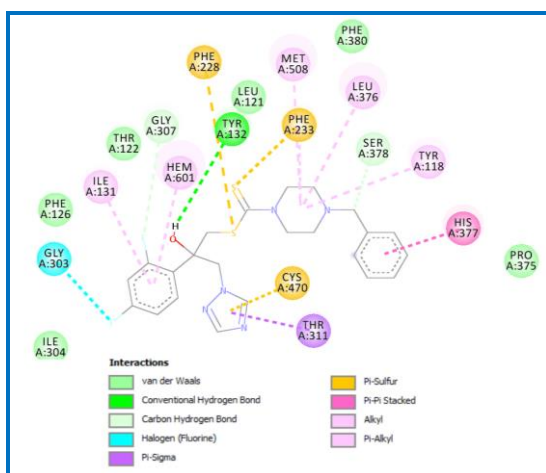
چگونگی اتصال ترکیب ۶ به آنزیم لانوسترول ۱۴α-دمتیللاز (CYP51) با روش داکینگ مورد مطالعه قرار گرفت. ساختار آنزیم های CYP51 از کاندیدا/آلیکنس (CACYP51) و کاندیدا گلابراتا (CGCYP51) برای مطالعات مدل سازی مولکولی استفاده شد. قبل از مطالعه شبیه سازی ترکیب ۶، اعتبار پروتکل داکینگ با داکینگ مجدد (Re-docking) لیگاند همراه آنزیم یعنی ایتراکونازول تایید شد. مقادیر RMSD به ترتیب معادل ۱/۵۸ و ۱/۷۱ آنگستروم برای CACYP51 و CGCYP51 موید این موضوع است. با توجه به این که

پیوند کوئوردینانسی برای فلوکونازول به ترتیب ۶/۲۷- کیلوکالری بر مول و ۲/۳۱- آنگستروم بود. همان گونه که در تصویر شماره ۵ مشاهده می‌شود قسمت دی‌فلوروفنیل ترکیب ۶-*R* در یک پاکت آبگریز قرار دارد و با Gly303، Ile304، Phe126، Thr122 و Gly307 برهمکنش دارد. قسمت پیرازینی با ریشه‌های اسید آمینه‌های آبگریز اطراف از جمله Met508، Leu376، Phe380، Leu121 و Tyr118 برهمکنش می‌کند. گروه بنزیل از طریق برهمکنش‌های آبگریز و واندروالس با Ser378، His377 و Pro375 در ارتباط است. گروه هیدروکسیل با Tyr132 پیوند هیدروژنی ایجاد می‌کند. بخش دی‌تیوکاربامات در تماس با Phe233 و Phe228 قرار دارد.

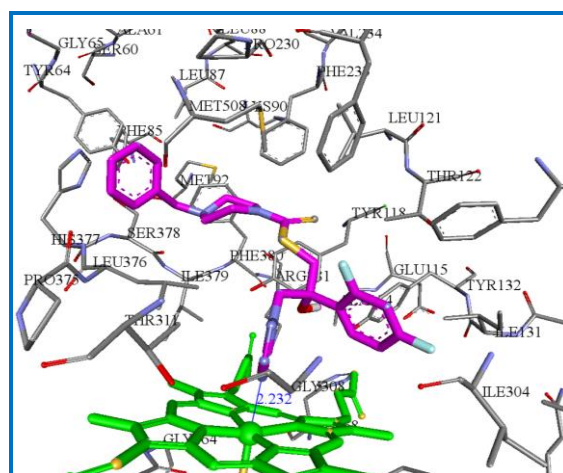
ترکیب ۶ دارای یک مرکز کایرال است، لذا مطالعه داکینگ بر روی هر دو انانتیومر آن انجام شد. هر دو استرئوایزومر *R* و *S* حالت اتصال مشابهی با CYP51 داشتند. با این حال، استرئوایزومر *R* انرژی برهمکنش کمتری را با CACYP51 در مقایسه با انانتیومر *S* دارا بود. همان طور که در تصویر شماره ۴ نشان داده شد، استرئوایزومر *R* به جایگاه فعال CGCYP51 با انرژی اتصال ۹/۸۳- کیلوکالری بر مول و پیوند کوئوردینانسی با فاصله ۲/۶- آنگستروم از آهن هم اتصال برقرار می‌کند. در مورد CACYP51، انرژی اتصال ۹/۸۵- کیلوکالری بر مول بود و اتم N4 هسته تریازول استرئوایزومر *R* با آهن هم CACYP51 با فاصله ۲/۲۳- آنگستروم کوئوردینه شده بود. لازم به ذکر است که انرژی اتصال و فاصله



تصویر شماره ۴: نمایش سه بعدی داکینگ استرئوایزومر ۶-*R* در جایگاه فعال لانوسترول ۱۴α- دمتیلاز (CGCYP51)



تصویر شماره ۵: نمایش سه بعدی داکینگ استرئوایزومر ۶-*R* در جایگاه فعال لانوسترول ۱۴α- دمتیلاز: (A) CACYP51 (A)، (B) CACYP51 (B)



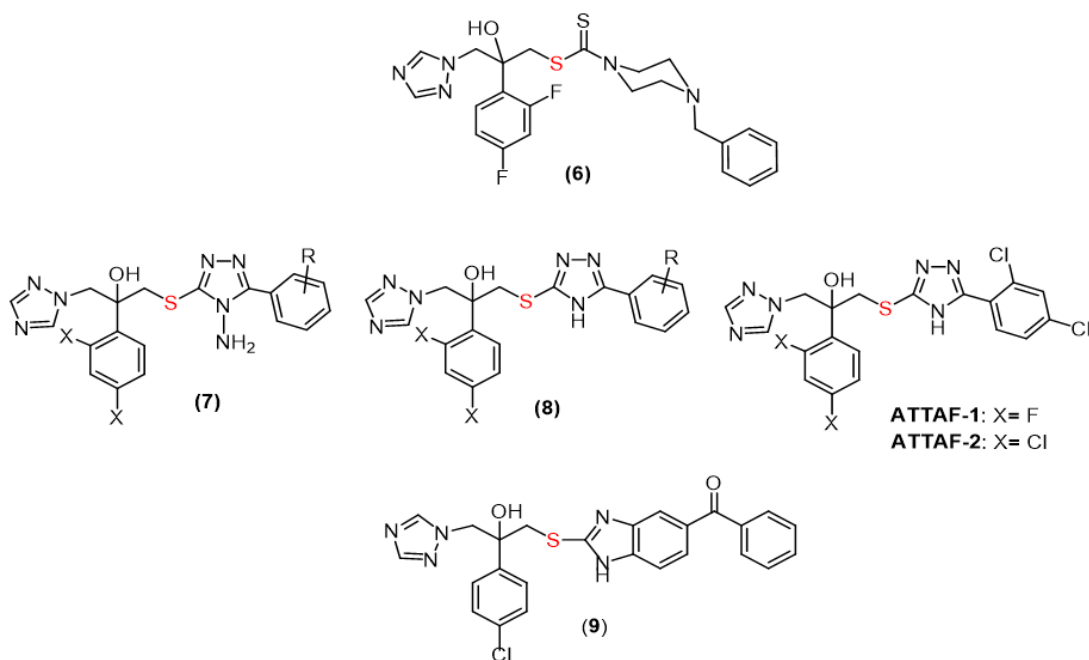
بحث

همان گونه که قبلاً اشاره شد به منظور دستیابی به آنالوگ جدیدی از فلوکونازول، در این تحقیق یکی از حلقه‌های تریازولی فلوکونازول، با استخلاف ۴-بنزیل پیرازین دی‌تیوکاربامات جایگزین شده است. با توجه به شباهت ساختاری ترکیب ۶ با فلوکونازول، سنتز آن مشابه فلوکونازول است و از حد واسط اکسیران قابل سنتز است. در بررسی طیف $^1\text{H NMR}$ ترکیب ۶ مشخص شد که کم‌ترین جابجایی شیمیایی مربوط به پروتون‌های حلقه پیرازین بوده که در ناحیه ۲/۶۱-۲/۴۸ ppm و به صورت چند شاخه ظاهر می‌شوند. سپس در طیف $^1\text{H NMR}$ این ترکیب پروتون‌های متیلن ریشه بنزیل در ناحیه ۳/۵۵ ppm به صورت تک شاخه ظاهر می‌شود. در مرتبه بعدی در ناحیه آلیفاتیک این ترکیبات، سیگنال مربوط به دو پروتون دیگر از حلقه پیرازین دیده می‌شود که به صورت پیک پهن بوده و در محدوده ۳/۸۶-۳/۹۶ ppm ظاهر می‌شوند. سپس پیک‌های مربوط به پروتون‌های متیلن مجاور اتم گوگرد در نواحی ۴/۰۱ ppm و ۴/۲۹ ppm دیده می‌شوند که به علت دیاستروئیک بودن به صورت جداگانه و به شکل دو شاخه و با ثابت کوپلاژ زیاد ۱۴/۸ هرتر ظاهر می‌گردند. هم‌چنین یک پیک پهن دیگر در ناحیه ۴/۳۹-۴/۳۲ ppm مربوط به دو پروتون دیگر حلقه پیرازین قابل مشاهده است. سیگنال مربوط به پروتون‌های متیلن مجاور حلقه تریازول در نواحی ۴/۶۷ ppm و ۴/۷۲ ppm به صورت دو شاخه و با $J=14.0$ Hz ظاهر می‌گردند. پروتون گروه هیدروکسیل به شکل پیک پهن و در محدوده ۵/۳۴ ppm ظاهر شد. پروتون‌های آروماتیک در محدوده ۶/۶۲-۶/۷۹ ppm و به تعداد لازم ظاهر شدند. در انتهای طیف و در میدان‌های ضعیف‌تر یعنی در نواحی ۷/۸۴ ppm و ۸/۱۴ ppm دو پروتون حلقه‌ی تریازولی به شکل دو پیک تک شاخه و تیز مشاهده شدند.

در این پژوهش، فعالیت ضد قارچی ترکیب سنتز شده در مقابل ۱۶ قارچ پاتوژن بررسی شد و فلوکونازول

به عنوان داروی استاندارد ضد قارچ مورد استفاده قرار گرفت. بررسی اجمالی اولیه روی ۱۰ قارچ حساس به فلوکونازول نشان داد که ترکیب سنتز شده از اثرات ضد قارچی بسیاری قوی برخوردار است و MIC آن بین ۰/۰۶۳ تا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در مجموع اثرات ضد قارچی این مشتق ۶۴-۴ برابر قوی‌تر از داروی استاندارد فلوکونازول برآورد می‌شود. از آنجایی که مقاومت در برابر عوامل ضد قارچی موجود مانند فلوکونازول در بسیاری از گونه‌های کاندیدا در حال افزایش است، بنابراین اثر ضد قارچی ترکیب سنتز شده بر روی گونه‌های مقاوم به فلوکونازول نیز بررسی شد. مقادیر MIC فلوکونازول در برابر ایزوله‌های کاندیدا آلیکنس و کاندیدا کروسی معادل یا بیش‌تر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ترکیب ۶ به‌طور موثری از رشد کاندیدا آلیکنس و کاندیدا کروسی مقاوم به فلوکونازول در غلظت‌های ۸ یا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر جلوگیری کرد. مقدار MIC این ترکیب در برابر کاندیدا پاراپسیلوزیس معادل ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بدین ترتیب، ترکیب ۶ پروفایل ضد کاندیدایی خوبی را در برابر گونه‌های مقاوم به فلوکونازول نشان می‌دهد. در سالیان اخیر مشتقات مختلفی از فلوکونازول سنتز و ارائه شده‌اند که دارای زنجیره جانبی متفاوتی روی ساختار اصلی تریازول الکل بوده‌اند (۹). اتصال زنجیره جانبی به اسکلت اصلی می‌تواند از طریق هترواتم‌هایی مثل نیتروژن، اکسیژن و گوگرد باشد. بیش‌تر تحقیقات گذشته متمرکز بر اتصال دهنده‌های نیتروژنی و اکسیژنی بوده و تعداد معدودی از مطالعات معطوف به اتصال دهنده‌های گوگردی مثل دی‌تیوکاربامات شده است که در این مطالعه به مقایسه ساختاری و عملکردی برخی از آن‌ها با ترکیب ۶، پرداخته شد.

اخیراً، مجموعه‌ای از ضد قارچ‌های تریازول الکلی ۷ و ۸ (تصویر شماره ۶) طراحی و سنتز شدند که از مرکاپتو تریازول مشتق شده‌اند (۱۵، ۱۶). بررسی اولیه ترکیبات ۷ علیه کاندیدا آلیکنس، کاندیدا



تصویر شماره ۶: مقایسه ساختاری ترکیب ۶ و برخی ترکیبات تریازول الکلی دارای اتصال دهنده گوگردی در زنجیره جانبی

ووریکونازول، آمفوتریسین B و آنیدولافانژین) مقایسه شدند. مقادیر MIC به دست آمده نشان داد که آنیدولافانژین و به دنبال آن ATTAF-1 و ATTAF-2، اثرات قوی تری در برابر تمام ایزوله های کاندیدا داشتند (۲۱). در تازه ترین تحقیقی که توسط ما به انجام رسید، سری جدیدی از ضد قارچ های تریازول الکلی که دارای زنجیره جانبی بنزایمیدازولیل تیو هستند به عنوان هیبریدهای فلوکونازول و مبندازول طراحی و سنتز شده اند و اثرات آنها روی کاندیدا آلبيکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراسیلوزیس، کاندیدا تروپیکاليس و کریپتوکوکوس نئوفورمانس بررسی شد. نتایج بهتر با مشتق ۴-کلرو ۹ به دست آمد که MIC های کم تر از ۰/۰۶۳ تا ۱ میکروگرم در میلی لیتر را از خود نشان داد (۲۵). با توجه به نتایج به دست آمده، ترکیب سنتز شده در مطالعه حاضر (ترکیب شماره ۶) که دارای ریشه جانبی ۴-بنزیل پیرازین دی تیو کاربامات می باشد، از اثرات ضد قارچی قابل مقایسه با ترکیبات گزارش شده قبلی (ترکیبات شماره ۹-۷) و قوی تر از فلوکونازول روی گونه های مختلف کاندیدا برخوردار است.

پاراسیلوزیس، و کریپتوکوکوس نئوفورمانس، در مقایسه با داروی مرجع فلوکونازول، نشان داد که فقط مشتق دی کلرو (X= Cl و R= 2,4-Cl₂) فعالیت مناسبی دارد و می تواند قوی تر از فلوکونازول عمل کند. مطالعه رابطه ساختمان و فعالیت نشان داد که حذف گروه ۴-آمینو از روی حلقه تریازول جانبی منجر به بهبود قابل توجهی در فعالیت ضد قارچی در برابر گونه های کاندیدا می شود. ارزیابی ضد قارچی مشتقات ۸ نشان داد که برخی از این ترکیبات دارای اثرات مهارتی قوی علیه کاندیدا آلبيکنس هستند. در میان ترکیبات سری ۸، مشتقات (۲، ۴-دی کلرو فیل) - تریازول یعنی ATTAF-1 و ATTAF-2 با مقادیر MIC کم تر از ۰/۰۱ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر، ۴ تا ۲۵ برابر قوی تر از فلوکونازول بودند (۱۶). هم چنین دو ترکیب ATTAF-1 و ATTAF-2 برای ارزیابی بیش تر، بر روی ۵۲ ایزوله بالینی کاندیدا از ۵ گونه مختلف شامل کاندیدا آلبيکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراسیلوزیس، کاندیدا کروسسی، و کاندیدا تروپیکاليس مورد آزمایش قرار گرفتند و با پنج داروی ضد قارچ معروف (فلوکونازول، ایتراکونازول،

بررسی فعالیت همولیتیک ترکیب ۶ روی گلبول‌های قرمز (نمودار شماره ۱) نشان داد درحالی که تریتون-۱۰۰X به میزان صد در صد همولیز ایجاد می‌کند، تیمار با ترکیب ۶ تنها همولیز محدودی در غلظت بالاتر یعنی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ایجاد می‌نماید. ترکیب ۶ و هم‌چنین فلوکونازول در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل منفی فعالیت همولیتیک معنی‌داری نشان ندادند. بنابراین، ترکیب ۶ همانند فلوکونازول حداقل سمیت را در برابر گلبول‌های قرمز انسانی در مقادیر MIC ضد قارچی دارا می‌باشد.

یکی از مسایل مهم در کشف عوامل ضدقارچی جدید، ویژگی اثر ضدقارچی و عدم آسیب به سلول‌های میزبان در غلظت‌های موثر است. طبق گزارشات قبلی، داروهای ضد قارچ آزولی ممکن است سمیت کبدی داشته باشند لذا در این پژوهش اثر ترکیب ۶ بر روی زنده ماندن سلول‌های کبدی HepG2 انسانی مورد بررسی قرار گرفت (۲۶). همان‌طور که در نمودار شماره ۲ در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم مشاهده می‌شود، زنده‌مانی سلول‌های HepG2 برای این ترکیب کم‌تر از ۵۰ درصد تحت تاثیر قرار گرفت و نتیجه مشابه فلوکونازول بود. از آن‌جایی که ترکیب ۶ می‌تواند رشد گونه‌های کاندیدا را در غلظت‌هایی حتی کم‌تر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهار کند، بنابراین اثر چندانی در این غلظت روی سلول‌های انسانی ندارد.

آنزیم مهم در مسیر بیوسنتز ارگوسترول در قارچ‌ها یعنی لانوسترول ۱۴α- دمتیلاز (CYP51) تارگت اصلی داروهای ضد قارچی آزولی است (۲۷). با توجه به ساختار مشابه ترکیب ۶ با فلوکونازول، برهمکنش آن با آنزیم CYP51 در مقایسه با فلوکونازول مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس، چگونگی اتصال ترکیب ۶ با روش داکینگ مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌گونه که بیان شد قسمت پیرازینی ترکیب ۶ با ریشه‌های اسید آمینه‌های آبگریز برهمکنش می‌کند. گروه بنزیل از طریق برهمکنش‌های آبگریز و واندروالس با Ser378،

His377 و Pro375 ارتباط موثری را برقرار می‌کند و بخش دی‌تیوکاربامات هم در تماس نزدیک با Phe233 و Phe228 به‌سر می‌برد. نتایج داکینگ نشان می‌دهد که ترکیب طراحی شده به واسطه دارا بودن بخش بنزیل پیرازین دی‌تیوکاربامات می‌تواند ارتباط موثرتری را با آنزیم لانوسترول ۱۴α- دمتیلاز (CYP51) برقرار نماید و همین باعث فعالیت بهتر آن نسبت به فلوکونازول می‌شود.

در این پژوهش، ترکیب ۶ به عنوان آنالوگی از فلوکونازول معرفی گردید که در آن ریشه بنزیل پیرازین دی‌تیوکاربامات جایگزین یکی از حلقه‌های تریازولی فلوکونازول شده است. بررسی اولیه روی ۱۰ قارچ حساس به فلوکونازول نشان داد که ترکیب سنتز شده از اثرات ضد قارچی بسیاری قویی روی کاندیدا/آلیکسس، کاندیدا/گلبراتا، کاندیدا/پاراسیلوئیس، کاندیدا/کروسی و کاندیدا/تروپیکالیس برخوردار است (مقادیر MIC بین ۰/۰۶۳ تا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در مجموع اثرات ضدقارچی آن ۴ الی ۶۴ برابر فلوکونازول است. هم‌چنین ترکیب ۶ پروفایل ضد کاندیدیایی خوبی را در برابر گونه‌های مقاوم به فلوکونازول نشان می‌دهد. انجام آزمون‌های همولیز و سمیت سلولی هم نشان داد که این ترکیب به اندازه فلوکونازول برای سلول‌های انسانی ایمن و بدون آزار است. با توجه به وجود فارماکوفور فیل اتیل آزول در مولکول معرفی شده، به نظر می‌رسد که این ترکیب می‌تواند با مهار آنزیم لانوسترول دمتیلاز و جلوگیری از سنتز ارگوسترول اثرات ضد قارچی داشته باشد؛ لذا با انجام مطالعه داکینگ ثابت شد که ترکیب طراحی شده به واسطه دارا بودن بخش بنزیل پیرازین دی‌تیوکاربامات می‌تواند ارتباط موثرتری را با آنزیم لانوسترول ۱۴α- دمتیلاز برقرار نماید و همین باعث فعالیت بهتر آن نسبت به فلوکونازول شده است. با توجه به جمع جوانب، ترکیب حاضر کاندید مناسبی برای انجام تست‌های *in vivo* و بقیه آزمون‌های پیش‌بالینی و فارماکوکینتیکی در راستای کشف داروی جدید ضد قارچ می‌باشد.

سپاسگزاری

به پایان‌نامه دانشجوی داروسازی آقای یاسر محمودی در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد.

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت حمایت مالی (طرح شماره ۵۵۲)، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد. این اثر پژوهشی، مربوط

References

1. Neoh CF, Jeong W, Kong DC, Slavin MA. The antifungal pipeline for invasive fungal diseases: what does the future hold? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2023; 21(6): 577-594.
2. Stewart AG, Paterson DL. How urgent is the need for new antifungals? *Expert Opin Pharmacother* 2021; 22(14): 1857-1870.
3. Motahari K, Badali H, Hashemi SM, Fakhim H, Mirzaei H, Vaezi A, et al. Discovery of benzylthio analogs of fluconazole as potent antifungal agents. *Future Med Chem* 2018; 10(9): 987-1002.
4. Mourad A, Perfect JR. Tolerability profile of the current antifungal armory. *The Journal of antimicrobial chemotherapy. J Antimicrob Chemother* 2018; 73(suppl_1): i26-i32.
5. Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. Resistance to antifungal drugs. *Infect Dis Clin North Am* 2021; 35(2): 279-311.
6. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: Molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem Rev* 2021; 121(6): 3390-3411.
7. Emami S, Tavangar P, Keighobadi M. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. *Eur J Med Chem* 2017; 135: 241-259.
8. Ghobadi E, Saednia S, Emami S. Synthetic approaches and structural diversity of triazolylbutanols derived from voriconazole in the antifungal drug development. *Eur J Med Chem* 2022; 231: 114161.
9. Emami S, Ghobadi E, Saednia S, Hashemi SM. Current advances of triazole alcohols derived from fluconazole: Design, in vitro and in silico studies. *Eur J Med Chem* 2019; 170: 173-194.
10. Peyton LR, Gallagher S, Hashemzadeh M. Triazole antifungals: a review. *Drugs Today (Barc)* 2015; 51(12): 705-718.
11. Bailey EM, Krakovsky DJ, Rybak MJ. The triazole antifungal agents: a review of itraconazole and fluconazole. *Pharmacotherapy* 1990; 10(2): 146-153.
12. Benitez LL, Carver PL. Adverse effects associated with long-term administration of azole antifungal agents. *Drugs* 2019; 79(8): 833-853.
13. Bala V, Gupta G, Sharma VL. Chemical and medicinal versatility of dithiocarbamates: an overview. *Mini Rev Med Chem* 2014; 14(12): 1021-1032.
14. Shinde SD, Sakla AP, Shankaraiah N. An insight into medicinal attributes of dithiocarbamates: Bird's eye view. *Bioorg Chem* 2020; 105: 104346.
15. Hashemi SM, Badali H, Faramarzi MA, Samadi N, Afsarian MH, Irannejad H, et al. Novel triazole alcohol antifungals derived from fluconazole: design, synthesis, and biological activity. *Mol Divers* 2015; 19(1): 15-27.
16. Hashemi SM, Badali H, Irannejad H, Shokrzadeh M, Emami S. Synthesis and

- biological evaluation of fluconazole analogs with triazole-modified scaffold as potent antifungal agents. *Bioorg Med Chem* 2015; 23(7): 1481-191.
17. Wang J, Li S, Hu X, Yang J. A convenient synthesis of *N*-benzylpiperazine, 1-alkyl-4-benzylpiperazines and an isostere of idebenone, *Organic Preparations and Procedures International* 2014; 46(5): 469-474.
 18. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard 3rd ed. Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 19. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 4th informational supplement. Document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 20. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol* 2012; 50(9): 2846-2856.
 21. Fakhim H, Emami S, Vaezi A, Hashemi SM, Faeli L, Diba K, Dannaoui E, Badali H. In vitro activities of novel azole compounds ATTAF-1 and ATTAF-2 against fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 61(1): e01106-e01116.
 22. Ansari M, Shokrzadeh M, Karima S, Rajaei S, Fallah M, Ghassemi-Barghi N, et al. New thiazole-2(3H)-thiones containing 4-(3,4,5-trimethoxyphenyl) moiety as anticancer agents. *Eur J Med Chem* 2020; 185: 111784.
 23. Ansari M, Shokrzadeh M, Karima S, Rajaei S, Hashemi SM, Mirzaei H, et al. Design, synthesis and biological evaluation of flexible and rigid analogs of 4H-1,2,4-triazoles bearing 3,4,5-trimethoxyphenyl moiety as new antiproliferative agents. *Bioorg Chem* 2019; 93: 103300.
 24. Irannejad H, Emami S, Mirzaei H, Hashemi SM. Data on molecular docking of tautomers and enantiomers of ATTAF-1 and ATTAF-2 selectivity to the human/fungal lanosterol-14 α -demethylase. *Data Brief* 2020; 31: 105942.
 25. Ghobadi E, Hashemi SM, Fakhim H, Hosseini-Khah Z, Badali H, Emami S. Design, synthesis and biological activity of hybrid antifungals derived from fluconazole and mebendazole. *Eur J Med Chem* 2023; 249: 115146.
 26. Tverdek FP, Kofteridis D, Kontoyiannis DP. Antifungal agents and liver toxicity: a complex interaction. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016; 14(8): 765-776.
 27. Irannejad H, Emami S, Mirzaei H, Hashemi SM. In silico prediction of ATTAF-1 and ATTAF-2 selectivity towards human/fungal lanosterol 14 α -demethylase using molecular dynamic simulation and docking approaches. *Informatics in Medicine Unlocked* 2020; 20: 100366.