مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره دوازدهم، شهریور ۱۳۹۲، ۴۳۶-۴۲۵

سنتز و بررسی اثرات ضد میکروبی مشتقات جدید N-۲- اکسو و ۲- اکسی‌ایمینو -۲- فنیل‌اتیل گتی‌فلوکساسین در شرایط In vitro

محمدحسن مصحفی[۱]، نگار محمدحسینی[۲]، فرشته صفاری[۳]، شکوه ارجمند[۴]، بهنام فرمان آرا[۴]
علیرضا فرومدی[۵]

دریافت مقاله: ۹۰/۱۲/۱۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۱/۲/۳۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۱/۶/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۱/۶/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: فلوروکینولون‌ها دسته وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف هستند که برای درمان عفونت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. مقاومت به داروهای ضد باکتریایی در حال گسترش است، پس دستیابی به داروهای ضد میکروبی جدید و درک مکانیسم عمل آن‌ها حیاتی است. مکانسیم اثر این داروها از طریق مهار آنزیم DNA- ژیراز، توپوایزومراز IV و توپوایزامراز II می‌باشد. تعویض بر موقعیت ۷، نقش کلیدی را در این مکانسیم بازی می‌کند. هدف از این تحقیق، سنتز و بررسی اثرات ضد میکروبی مشتقات جدیدی از گتی‌فلوکساسین، که حاصل از تعویض بر موقعیت ۷ کینولون است، می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، دسته‌ای از مشتقات فنیل اتیل‌گتی‌فلوکساسین (N-۲- اکسو و ۲- اکسی‌ایمینو -۲- فنیل اتیل‌گتی‌فلوکساسین)، سنتز شده و در مقابل تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استاندارد، با استفاده از روش رقیق‌سازی در آگار تست شدند.

یافته‌ها: در میان ترکیبات تست شده، آنالوگ‌هایی از گتی‌فلوکساسین (2e و 4e)، در مقایسه با گتی‌فلوکساسین، سیپروفلوکساسین و سایر ترکیبات سنتز شده، اثرات ضد میکروبی قابل توجه بر باکتری‌های گرم مثبت داشتند. این ترکیبات بر باکتری‌های گرم منفی اثر ضد میکروبی قابل توجه نداشتند.

نتیجه‌گیری: وجود استخلاف ۲و۴- دی‌کلرو بر روی حلقه بنزن در ترکیبات 2e و 4e باعث افزایش اثر ضد میکروبی آن‌ها شده است. در مجموع، ترکیبات مورد آزمایش اثر ضد میکروبی قابل توجهی نسبت به سیپروفلوکساسین و گتی‌فلوکساسین بر روی باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند، ولی بر روی باکتری‌های گرم منفی این اثر قابل توجه نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فلوروکینولون‌ها، گتی‌فلوکساسین، اثرات ضد میکروبی

۱- دانشیار، گروه آموزشی فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
(نویسنده مسئول) تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۰۵۰۱۸، دورنگار: ۰۳۴۱-۳۲۰۵۰۱۸، پست الکترونیکی: moshafi14@yahoo.com
۲- دانشجوی دکترا، گروه آموزشی شیمی‌آلی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکترا، گروه آموزشی باکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴- دانشجوی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۵- استاد گروه آموزشی شیمی‌دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مقدمه

فلوروکینولون‌ها گروهی از داروهای سنتتیک ضد باکتری می‌باشند که امروزه به طور گسترده‌ای در درمان عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. نالیدیکسیک اسید اولین عضو گروه کینولون‌ها در سال ۱۹۶۲ کشف گردید [۲]. قرار دادن اتم فلوئور در موقعیت اولین تغییر در ساختار پایه کینولون‌ها بود که قدرت ضد باکتریایی آن‌ها را بهبود بخشید و موجب گردید کینولون‌ها به عنوان داروهای مفیدی برای درمان عفونت‌های ادراری، سیستمیک و مجاری تنفسی مورد استفاده قرار گیرند. قبلاً کینولون‌ها در درمان عفونت مجاری ادراری مؤثر بودند اما بسیاری از داروهای جدید مثل گارنوکساسین، موکسی فلوکساسین و گتی‌فلوکساسین برای درمان عفونت‌های مجاری تنفسی مورد استفاده قرار می‌گیرند، به طوری که این داروها برعلیه استرپتوکوک پنومونیه *(S. Pneumonia)* و ارگانیسم‌های آتیپیک مؤثرند [۳-۷].

تغییر در ساختار پایه مولکول شامل افزایش گروه‌ها به موقعیت‌های N_1، C_5 و C_7 باعث بهبود در اثرات ضد باکتریایی می‌گردد. قرار گرفتن گروه پیپرازین در موقعیت C_7 و یک گروه سیکلوپروپیل در موقعیت N_1 که در سیپروفلوکساسین و در کینولون‌های جدیدتر مثل موکسی فلوکساسین و گتی‌فلوکساسین قابل مشاهده است باعث افزایش قدرت داروها شده است [۷]. حلقه پیپرازین و کربوکسیلیک اسید در موقعیت C_3 حالت دو قطبی ایجاد می‌کنند، قدرت نفوذ داروها در سلول‌های باکتریایی را افزایش داده و بدین ترتیب باعث افزایش قدرت اثر دارو می‌شوند. حالت دوقطبی باعث نفوذ دارو در بافت‌های انسانی نیز می‌شود. اتم فلوئور در موقعیت برای مهار آنزیم‌های هدف ضروری است [۸]. مکانیسم عمل این داروها مهار DNA ژیراز و توپوایزومراز IV می‌باشد. DNA ژیراز همان توپوایزومراز II باکتریایی می‌باشد که کنترل توپولوژیکی مارپیچ دوتایی DNA را در طی فرآیندهای همانندسازی و ترجمه به عهده دارد [۹-۱۰]. مهار DNA ژیراز یا توپوایزومراز IV و قدرت نفوذ کینولون‌ها در سلول‌ها تحت تأثیر استخلاف موقعیت C_7 ساختار استاندارد ۴- کینولون-۳- کربوکسیلیک اسید است. به علاوه اعتقاد بر این است که برای ارگانیسم‌های گرم مثبت، افزایش جرم مولکولی و حجم استخلاف در موقعیت C_7 مانع نفوذ مولکول نمی‌باشند [۱۱-۱۳].

به طور کلی استخلاف در موقعیت ۷ کینولون‌ها نقش مهمی در رابطه با اثرات ضد میکروبی، فارماکوکینتیک و عوارض این داروها دارد [۱۴]. با توجه به این مسأله، قبلاً چندین هیبرید از ۵-(نیتروآریل) –۱، ۳و ۴- تیادی آزول و کینولون‌های مختلف از جمله مشتقات سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، انوکساسین و لووفلوکساسین ۷ با قدرت ضد باکتریایی قوی‌تر علیه ارگانیسم‌های گرم مثبت در مقایسه با ترکیبات والد خود ساخته شدند [۱۵-۱۷]. عوارض جانبی و ناخواسته، مثل واکنش‌ها در سیستم عصبی مرکزی، اثر متقابل دارو- دارو، فتوتوکسیسیتی، آسیب کبد و قلب از چندین کینولون جدید گزارش شده است. از سوی دیگر، مقاومت باکتریایی برای بسیاری از پاتوژن‌ها اثبات شده است و مطالعه

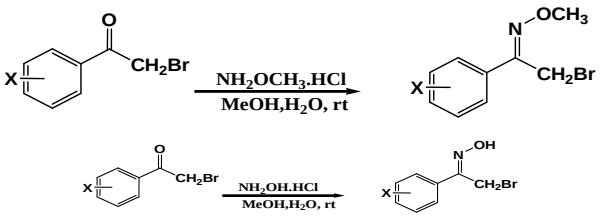
باکتری‌های مختلف نشان می‌دهد که مقاومت در طی چند سال می‌تواند افزایش و توسعه یابد. مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها به خصوص انواع قدیمی‌تر مثل سیپروفلوکساسین در حال افزایش است. این مقاومت چند دارویی موجب گردیده تلاش برای دستیابی به کینولون‌های جدید دوچندان گردد.

نسل جدید کینولون‌ها باید بتوانند از یک سو بر مقاومت چند دارویی غلبه نمایند و از سوی دیگر دارای عوارض جانبی کمتر باشند [۱۹-۱۸، ۸]. گتی‌فلوکساسین یک فلوروکینولون جدید (نسل چهارم) با اثرات ضد باکتریایی قوی‌تری در مقایسه با فلوروکینولون‌های قدیمی‌تر مثل سیپروفلوکساسین برعلیه باکتری‌های گرم مثبت و بی‌هوازی می‌باشد [۲۰]، اما اختلال در متابولیسم قند خون بعنوان عارضه جانبی این دارو منجر به جمع‌آوری آن در بازارهای آمریکایی شد [۲۱]. پس تلاش برای سنتز مشتقات گتی‌فلوکساسین با اثرات بهتر و تحمل بالاتر ضروری به نظر می‌رسد تا به محدودیت‌های گتی‌فلوکساسین غلبه شود. در این تحقیق اثرات ضد میکروبی یک سری از مشتقات سنتز شده N-۲-اکسو و ۲- اکسی ایمینو -۲- فنیل اتیل گتی‌فلوکساسین در محیط برون تنی (in vitro) مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۳۸۹ در مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه‌های علوم پزشکی تهران و کرمان انجام شد. مواد خریداری شده شامل مشتقات استوفنون، هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، o- متیل هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، متانول، سیلیکاژل، کلروفرم، DMF (N,N- دی‌متیل‌فرمامید) بوده که از شرکت مرک آلمان تهیه شده و بدون خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. ماده آلفا برمو تهیه شده است.

الف – سنتز مشتقات حد واسط و نهایی: تهیه مشتقات حد واسط آلفا- برمو اکسیم و آلفا- برمو- O- متیل اکسیم: از واکنش هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، O- متیل هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، با ۲- برومو-۱- (کلرو، دی کلرو، برمو، فلورو) فنیل اتانون در حلال متانول، در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) مشتقات آلفا- برمو اکسیم و آلفا- برمو- O- متیل اکسیم به دست آمدند (شکل ۱).



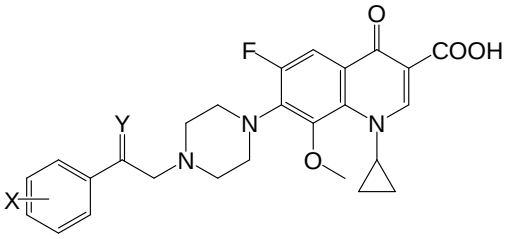
شکل ۱- مشتقات حد واسط

روش تهیه ۲- برومو-۱- (کلرو، دی کلرو، برمو، فلورو) فنیل اتانون اکسیم: به ۰/۱۹ گرم (۰/۱ میلی‌مول) از ۲- برومو-۱- (کلرو، دی کلرو، برمو، فلورو) فنیل اتانون، ۰/۷۹ گرم (۰/۲ میلی‌مول) هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، ۳ میلی‌لیتر آب و ۹ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و در دمای آزمایشگاه هم زده شد. سپس به ظرف واکنش ۹ میلی‌لیتر آب افزوده شد و رسوبات حاصل صاف گردید [۲۴-۲۲].

روش تهیه ۲- برومو-۱- (کلرو، دی کلرو، برمو، فلورو) فنیل اتانون-O- متیل اکسیم: به ۰/۱۹ گرم (۰/۱ میلی‌مول) از ۲- برومو-۱- (کلرو، دی کلرو، برمو، فلورو) فنیل اتانون، ۰/۷۹ گرم (۰/۲ میلی‌مول) O- متیل هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، ۳ میلی‌لیتر آب و ۹ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و در دمای آزمایشگاه هم زده شد. سپس به ظرف واکنش ۹ میلی‌لیتر آب افزوده شد و رسوبات حاصل صاف گردید (۲۲-۲۴).

سنتز مشتقات نهایی: از واکنش ۸۰ میلی‌گرم (۰/۲۵ میلی‌مول) گتی فلوکساسین، ۲۱ میلی‌گرم (۰/۲۵ میلی‌مول) بیکربنات در ۱۱ میلی‌لیتر DMF با ۰/۲۸ میلی‌گرم از مشتقات آلفا برمو-۱- فنیل اتانون یا مشتقات آلفا برمو-۲- استیل اکسیم و یا آلفا برمو -۲- استیل – O - متیل اکسیم، در دمای اطاق مشتقات نهایی بدست آمد که مشخصات فیزیکی آن‌ها در جدول ۱ ذکر گردیده اند.

پس از پایان واکنش ۹ میلی‌لیتر آب سرد به ظرف واکنش افزوده و رسوبات حاصل صاف گردید. رسوبات بدست آمده در حلال اتانول-آب متبلور شد [۲۴-۲۲] (شکل ۲).



شکل ۲- فرمول شیمیایی ترکیبات مورد آزمایش

خلوص ترکیبات سنتز شده به وسیله کروماتوگرافی بر روی لایه نازک و با استفاده از حلال‌های مختلف با قطبیت متفاوت مورد تأیید قرار گرفت و نقطه ذوب این ترکیبات به وسیله دستگاه Electrothermal IA 9100 ساخت کشور آلمان، تعیین شد. همچنین تعیین ساختمان ترکیبات مورد نظر به وسیله طیف سنج مادون قرمز (دستگاه IR مدل Bruker ساخت کشور آمریکا) طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای (دستگاه NMR مدل IRSSO Magna Nicolet ساخت کشور آلمان) و طیف سنج جرمی (دستگاهMass مدل shimadzu ساخت کشور ژاپن) انجام شد

جدول۱- فرمول شیمیایی و مشخصات فیزیکی ترکیبات مورد آزمایش

شماره ترکیب	X	Y	نقطه ذوب (درجه سانتی‌گراد)	راندمان (درصد)	فرمول بسته مولکولی
2a	H	O	۲۵۷-۲۵۸	۳۵	$C_{27}H_{28}FN_3O_5$
2b	2-Cl	O	۲۴۷-۲۴۸	۴۲	$C_{27}H_{27}ClFN_3O_5$
2c	3-Cl	O	۲۴۵-۲۴۶	۴۰	$C_{27}H_{27}ClFN_3O_5$
2d	4-Cl	O	۲۶۰-۲۶۲	۴۷	$C_{27}H_{27}ClFN_3O_5$
2e	$2,4\text{-}Cl_2$	O	۲۴۲-۲۴۴	۴۶	$C27H26Cl_2FN_3O_5$
2f	4-F	O	۲۵۹-۲۶۱	۲۷	$C_{27}H_{27}F_2N_3O_5$
2g	4-Br	O	۲۶۴-۲۶۵	۴۳	$C_{27}H_{27}BrFN_3O_5$
3a	H	NOH	۲۵۵-۲۵۷	۳۳	$C_{27}H_{29}FN_4O_5$
3b	2-Cl	NOH	۲۴۵-۲۴۶	۴۰	$C_{27}H_{28}ClFN_4O_5$
3c	3-Cl	NOH	۲۴۲-۲۴۳	۳۸	$C_{27}H_{28}ClFN_4O_5$
3d	4-Cl	NOH	۲۵۹-۲۶۱	۴۶	$C_{27}H_{29}ClFN_4O_5$
3e	$2,4\text{-}Cl_2$	NOH	۲۴۰-۲۴۱	۴۴	$C27H27Cl_2FN_4O_5$
3f	4-F	NOH	۲۵۷-۲۶۸	۲۵	$C_{27}H_{28}F_2N_4O_5$
4a	H	NOMe	۲۵۸-۲۵۹	۳۲	$C_{28}H_{31}FN_4O_5$
4b	2-Cl	NOMe	۲۴۸-۲۴۹	۴۰	$C_{28}H_{30}ClFN_4O_5$
4c	3-Cl	NOMe	۲۴۶-۲۴۷	۳۷	$C_{28}H_{30}ClFN_4O_5$
4d	4-Cl	NOMe	۲۶۲-۲۶۳	۴۵	$C_{28}H_{30}ClFN_4O_5$
4e	$2,4\text{-}Cl_2$	NOMe	۲۴۳-۲۴۴	۴۳	$C_{28}H_{29}Cl_2N_4O_5$

ب- بررسی فعالیت ضد میکروبی: میکروارگانیزم‌های مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران، [Persian Type Culture Collection (PTCC)] از مرکز پژوهش‌های علمی-صنعتی ایران خریداری شدند و عبارتند از: استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC=۱۱۱۲)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC=۱۱۱۴)، باسیلوس سابتیلیس (PTCC=۱۰۲۳)، سودوموناس ائروژینوزا (PTCC=۱۰۷۴)، کلبسیلا نومونیا (PTCC=۱۰۵۳) و اشریشیاکلی (PTCC=۱۳۳۰). فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات سنتز شده مورد اشاره با روش رقیق‌سازی در محیط جامد (Agar Dilution Method) مورد بررسی قرار گرفت [۲۱]. محیط تیوگلیکولات جهت انتقال میکروب‌ها از حالت لیوفیلیزه به محیط [Soybean Casein Dextrose Agar (SCDA)] به کار رفت. محیط SCDA برای فعال کردن میکروب‌ها و نگهداری آن‌ها و محیط [Soybean Casein Dextrose Broth (SCDB)] جهت فعال کردن سوش‌های میکروبی قبل از انجام آزمایش استفاده شد. محیط کشت مولر هینتون آگار جهت سنجش اثرات ضد میکروبی مواد مورد آزمایش استفاده شد. خلوص ترکیبات سنتز شده به وسیله کروماتوگرافی بر روی لایه نازک و با استفاده از حلال‌های مختلف با قطبیت متفاوت مورد تأیید قرار گرفت و نقطه ذوب این ترکیبات به وسیله دستگاه Electrothermal IA 9100 ساخت کشور آلمان، تعیین

شد. همچنین تعیین ساختمان ترکیبات مورد نظر به وسیله طیف سنج مادون قرمز (دستگاه IR مدل Bruker ساخت کشور آمریکا) طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای (دستگاه NMR مدل IRSSO Magna Nicolet ساخت کشور آلمان) و طیف سنج جرمی (دستگاهMass مدل shimadzu ساخت کشور ژاپن) انجام شدکلیه لوازم شیشه‌ای با استفاده از آون و محیط‌های کشت، سرم فیزیولوژی و سرپیچ‌های لاستیکی در اتوکلاو استریل شدند. تمام مراحل آزمایش زیر هود میکروبیولوژی جهت رعایت شرایط استریلیتی انجام شد. مشتقات سنتز شده ابتدا در حلال [Dimethylsulfoxide (DMSO)] حل شدند. محلول ذخیره با غلظت ۱۲۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و در حجم‌های کم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سویه‌های میکروبی ابتدا از حالت لیوفیلیزه خارج شده و در محیط کشت اختصاصی رشد داده شدند. میکروب‌های کشت شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد همراه با گلیسرول برای طولانی مدت و به صورت شیب دار در ۴ درجه سانتی‌گراد برای مصرف روزانه نگهداری شد. به دلیل این که اثرات ضد میکروبی ترکیبات ناشناخته است در مرحله اول تمامی مشتقات در غلظتی معادل بالاترین حد [Minimum Inhibitory Concentration (MIC)]، برای داروی خالص سیپروفلوکساسین تست شدند. به طور خلاصه ابتدا باکتری در محیط مولر هینتون به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از آن کدورت محلول میکروبی با استاندارد نیم مک فارلند مطابقت داده شد. ابتدا محلول نیم مک‌فارلند را به نسبت ۱:۲۰۰ رقیق کرده و ۱۰ میکرولیتر برای تلقیح برداشتیم. در مرحله اول بررسی، تمامی باکتری‌ها در محیط مولر هینتون آگار حاوی۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر مشتق کشت داده شد، رشد در مجاورت این غلظت نشان‌دهنده اثر ضد میکروبی مطلوب نمی‌باشد و به همین دلیل این غلظت انتخاب شده تا اثر بخشی نسبی هر مشتق مشخص گردید. در مرحلهٔ بعد نمونه‌هایی که سبب مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت و یا گرم منفی شدند در غلظت پایین‌تر مورد بررسی قرار گرفتند و MIC هر مشتق برای هر باکتری تعیین شد. از کینولون‌های استاندارد (سیپروفلوکساسین و گتی‌فلوکساسین) جهت مقایسه اثرات ضد میکروبی به عنوان کنترل استفاده شد. هر تست حداقل ۳ بار تکرار شد و جواب آزمایش بر اساس سه مرتبه تست کردن نمونه‌ها گزارش شد.

نتایج

نتایج مربوط به حداقل غلظت ممانعت‌کننده ترکیبات نهایی سنتز شده بر روی میکروب‌های مورد اشاره در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس این جدول، ترکیب شماره 2e و 4e بیشترین اثر ممانعت‌کننده از رشد را روی باکتری‌های گرم مثبت داشتند که در مقایسه با گتی‌فلوکساسین و سیپروفلوکساسین، از قدرت اثر بیشتری برخوردار بودند، اما بر روی باکتری‌های گرم منفی دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی نبودند.

جدول۲- MIC ترکیبات سنتز شده بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر، در مقایسه با کینولون اصلی

شماره ترکیب	استافیلوکوکوس اورئوس	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	باسیلوس سابتیلیس	اشرشیاکلی	کلبسیلا نومونیا	سودوموناس ائروژینوزا
2a	۱/۵۶۲۵	۱/۵۶۲۵	۰/۱۹۵۳	۰/۱۹۵۳	۰/۰۹۷۷	۲۵
2b	۰/۳۹۰۶	۰/۳۹۰۶	۰/۰۴۸۸	۰/۰۴۸۸	۰/۰۲۴۴	۳/۱۲۵
2c	۰/۷۸۱۳	۱/۵۶۲۵	۰/۱۹۵۳	۰/۱۹۵۳	۰/۰۹۷۷	۱۲/۵
2d	۰/۳۹۰۶	۰/۷۸۱۳	۱/۵۶۲۵	۱/۵۶۲۵	۰/۰۹۷۷	۱۰۰
2e	۰/۰۹۷۷	۰/۰۹۷۷	۰/۱۹۵۳	۰/۱۹۵۳	۰/۰۲۴۴	۱۲/۵
2f	۰/۳۹۰۶	۰/۳۹۰۶	۵۰	۰/۳۹۰۶	۰/۳۹۰۶	۵۰
2g	۰/۷۸۱۳	۰/۷۸۱۳	۱/۵۶۲۵	۱/۵۶۲۵	۰/۳۹۰۶	۱۰۰
3a	۰/۱۹۵۳	۰/۱۹۵۳	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۳۱	۱۲/۵
3b	۰/۷۸۱۳	۰/۷۸۱۳	۱/۵۶۲۵	۱/۵۶۲۵	۰/۷۸۱۳	۵۰
3c	۶/۲۵	۶/۲۵	۱/۵۶۲۵	۱/۵۶۲۵	۰/۱۹۵۳	۱۰۰
3d	۱/۵۶۲۵	۱/۵۶۲۵	۰/۳۹۰۶	۰/۳۹۰۶	۰/۱۹۵۳	۱۰۰
3e	۱/۵۶۲۵	۰/۷۸۱۳	۰/۳۹۰۶	۰/۷۸۱۳	۰/۷۸۱۳	۵۰
3f	۰/۷۸۱۳	۱/۵۶۲۵	۱/۵۶۲۵	۰/۷۸۱۳	۰/۷۸۱۳	۱۲/۵
4a	۰/۷۸۱۳	۱/۵۶۲۵	۰/۷۸۱۳	۰/۱۹۵۳	۰/۰۹۷۷	۵۰
4b	۰/۳۹۰۶	۱/۵۶۲۵	۰/۷۸۱۳	۰/۱۹۵۳	۰/۰۹۷۷	۱۲/۵
4c	۱/۵۶۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۱/۵۶۲۵	۱/۵۶۲۵	۱۲/۵
4d	۱/۵۶۲۵	۰/۷۸۱۳	۰/۳۹۰۶	۰/۷۸۱۳	۱/۵۶۲۵	۵۰
4e	۰/۰۹۷۷	۰/۱۹۵۳	۰/۱۹۵۳	۰/۰۲۴۴	۰/۱۹۵۳	۱۲/۵
گتی‌فلوکساسین	۰/۳۹۰۶	۰/۳۹۰۶	۰/۰۲۴۴	۰/۰۴۸۸	۰/۰۲۴۴	۳/۱۲۵
سیپروفلوکساسین	۰/۱۹۵۳	۰/۱۹۵۳	۰/۰۱۲۲	۰/۰۱۲۲	۰/۰۱۲۲	۰/۳۹۰۶

بحث

به دلیل پیدایش مقاومت‌های دارویی، تحقیقات زیادی جهت سنتز کینولون‌های جدید با اثرات قوی و عوارض جانبی کمتر صورت گرفته و با توجه به همین اصل و برای افزایش تأثیر آن‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت، سعی شده است محل اثر آن‌ها در باکتری‌ها از توپرایزومراز IV به DNA ژیراز تغییر داده شود. این ترکیبات، دارای گروه نسبتاً حجیم در موقعیت C_7 بر روی حلقه پیپرازین هستند. مشاهده شده که اضافه کردن استخلاف‌های حجیم بر مولکول کینولون‌ها باعث افزایش لیپوفیلیسیتی و در نتیجه افزایش نفوذ بافتی و همچنین نفوذ به داخل ارگانیزم می‌شود و چنانچه این گروه در موقعیت C_7 قرار

گیرد باعث افزایش اثر ضد باکتریایی گرم مثبت نیز می‌شوند [۲۶-۲۵].

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد ترکیبات 2b, 2d, 2f, 3a, 4b, 4e اثرات قابل توجهی بر باکتری استافیلوکوکوس آرئوس نسبت به داروی مرجع سیپروفلوکساسین و ترکیبات 2b, 2f, 4b دارای اثرات مشابه بر این باکتری، نسبت به داروی رفرنس گتی‌فلوکساسین داشتند. ترکیبات 2b, 2e, 3a, 3b, 4e اثرات قابل توجهی بر باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نسبت به داروهای رفرنس گتی‌فلوکساسین و سیپروفلوکساسین از خود نشان داده‌اند. بر علیه باکتری باسیلوس سابتیلیس ترکیب 3a دارای بیشترین اثر بوده که در مقایسه با داروهای رفرنس نیز قابل توجه می‌باشد. ترکیبات 2b, 2e اثرات مشابهی بر باکتری کلبسیلانومونیا نسبت به داروی رفرانس گتی‌فلوکساسین از خود نشان داده‌اند، در حالیکه ترکیب 3a اثر قابل توجهی بر این باکتری نسبت به هر دو داروی رفرانس دارد. ترکیب 2b تنها ترکیب موثر بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا در میان ترکیبات سنتز شده است که اثر آن نسبت به داروی رفرنس گتی‌فلوکساسین، مشابه و نسبت به داروی سیپروفوکساسین قابل توجه نمی‌باشد.

اگرچه تاکنون اثرات ضد باکتریایی ترکیبات سنتز شده در این مطالعه، توسط محققین دیگری مورد بررسی قرار نگرفته است اما بررسی‌ها نشان می‌دهد که سنتز و بررسی اثرات ضد میکروبی مشتقات مختلف گتی‌فلوکساسین همواره مورد توجه محققین بوده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ میلادی به چاپ رسید، دسته‌ای از مشتقات N- ۲- اکسو ایمینو اتیل و پروپیل گتی‌فلوکساسین سنتز و اثرات ضد باکتری آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد این ترکیبات دارای اثرات ضد باکتری قابل توجهی هستند که در مجموع با اثرات ضد میکروبی ترکیبات سنتز شده در این مطالعه، مشابه است [۲۶]. مقایسه مطالعه حاضر با بررسی‌های انجام شده توسط Sahu و همکاران منتشر شده در سال ۲۰۱۲ میلادی بر روی اثرات ضد میکروبی یک سری از مشتقات گتی‌فلوکساسین با نام عمومی۱- سیکلوپروپیل-۶- فلورو-۸- متوکسی-۷- (۳-متیل-۴- (۲- مشتقات ایمینو اتیل) پیپرازین-- ایل)-۴- اکسو- ۱و۴- دی هیدرو کینولین -۳- کربوکسیلیک اسید نیز نشان می‌دهد که ترکیبات سنتز شده در این مطالعه در مجموع دارای اثرات ضد میکروبی بهتری می‌باشند [۲۷]. مطالعات Jazayeri و همکاران نیز حاکی از آن است که یک سری از مشتقات گتی‌فلوکساسین با گروه نیترو آریل تیادیازول متصل به حلقه پیپرازین ، فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی دارند ولی این اثرات در مقایسه با ترکیبات سنتز شده در این تحقیق ،قابل توجه نمی‌باشد [۲۸].

نتیجه‌گیری

از بین ترکیبات سنتز شده در این تحقیق، آنالوگ‌های 2e و 4e دارای قویترین اثر مهاری بر علیه باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با داروی رفرانس گتی‌فلوکساسین، سیپروفلوکساسین و سایر ترکیبات سنتز شده می‌باشد. وجود استخلاف ۲،۴- دی کلرو بر روی حلقه بنزن در این ترکیبات باعث این افزایش اثر شده است. در مجموع، ترکیبات مورد آزمایش اثر ضد میکروبی قابل توجهی نسبت به سیپروفلوکساسین و گتی‌فلوکساسین بر روی باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند، ولی بر روی

باکتری‌های گرم منفی این اثر قابل توجه نمی‌باشد. در نتیجه، قرار گرفتن مشتقات اکسی ایمینو اتیل بر موقعیت ۷ گتی‌فلوکساسین موجب افزایش اثر بر باکتری‌های گرم مثبت شده در حالیکه این تغییر، بر اثر گتی‌فلوکساسین نسبت به باکتریهای گرم منفی بی‌تأثیر بوده است.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان جهت تأمین اعتبار این طرح تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

[1] Hooper DC. New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin Infect Dis* 2000; 30(2): 243-54.

[2] Lesher GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of ehemotherapeutic agents. *J Med Farm Chem* 1962; 5: 1063-8.

[3] Ball P, Fernald A, Tillotson G. Therapeutic advances of new fluoroquinolones. *Expert Opin Investig Drugs* 1998; 7(5): 761–83.

[4] Tillotson GS. Quinolones: structure–activity relationships and future predictions. *J Med Micro Biol* 1996; 44(5): 320-4.

[5] Domagala M. Structure–activity and structure–side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33(4): 685-706.

[6] Emami S, Shafiee A, Foroumadi A. Structural features of new quinolones and relationship to antibacterial activity against Gram-positive bacteria. *Med Chem* 2006; 6(4): 375- 86.

[7] Andersson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(Suppl1): 1–11.

[8] Takahashi H, Hayakawa I, Akimoto T. The history of the development and changes of quinolone antibacterial agents. *Yakushigaku Zassh* 2003; 38 (2): 161-79.

[9] Hooper DC. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs* 1999; 58(Suppl2): 6-10.

[10] Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 1996; 379(6562): 225-32.

[11] Efthimiadou EK, Katsaros N, Karaliota A, Psomas G. Synthesis, characterization, antibacterial activity, and interaction with DNA of the vanadyl-enrofloxacin complex. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17(5): 1238-42.

[12] Coleman K. Recent advances in the treatment of Gram-positive infections. *Drug Discovery Today Therapeutic Strategies* 2004; 1: 455-60.13.

[13] Foroumadi A, Emami S, Mansouri S, Javidnia A, Saeid-Adeli N, Shirazi FH, et al. Synthesis and antibacterial activity of levofloxacin derivatives with certain bulky residues on piperazine ring. *Eur J Med Chem* 2007; 42(7): 985-92.

[14] Higgins PG, Fluit AC, Schmitz FJ. Fluoroquinolones: structure and target sites. *Curr Drugs Targets* 2003; 4(2): 181-90.

[15] Foroumadi A, Mansouri S, Kiani Z, Rahmani A. Synthesis and in vitro antibacterial evaluation of N-[5-(5-Nitro-2-thienyl)-1,3,4-thiadiazole-2-yl] Piperazinyl quinolones. *Eur J Med Chem* 2003; 38(9): 851-4.

[16] Foroumadi A, Mansouri S, Emami S, Mirzai J, Sorkhi M, Saeid-Adeli N, et al. Synthesis and antibacterial activity of nitroaryl thiadiazole-levofloxacin hybrids. *Arch Pharm* 2006; 339 (11): 621-4.

[17] Foroumadi A, Soltani F, Moshafi MH, Ashraf-Askari R. Synthesis and in vitro antibacterial activity of some N-(5- aryl-1,3,4- thiadiazole-2-yl) piperazinyl quinolone. *Farmaco* 2003; 58(10): 1023-8.

[18] Pendeya SN, Sriram D, Nath G, Declercq E. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of norfloxacin mannich bases. *Eur J Med Chem* 2000; 35(2): 249-55.

[19] Foroumadi A, Emami S, Pournourmohammadi S, Kharazmi A, Shafiee A. Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of 2-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-5-substituted-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Eur J Med Chem* 2005; 40: 1346-50.

[20] Perry CM, Barman Balfour JA, Lamb HM. Gatifloxacin. *Drugs* 1999; 58(4): 683-96.

[21] Kondo H, Sakamato F, Kodera Y, Tsukamoto G. Studies on prodrugs. 5. Synthesis and antibacterial activity of N- (oxoalkyl) norfloxacin derivatives. *J med chem* 1986; 29(10): 2020-4.

[22] Foroumadi A, Mohammadhosseini N, Emami S, Letafat B, Faramarzi MA, Samadi N, et al. Synthesis and *In Vitro* Cytotoxic Activity of *N*-2-(2- Furyl)-2-(chlorobenzyloxyimino) Ethyl Ciprofloxacin Derivatives. *Arch Pharm* 2007; 340(1): 47-52.

[23] Letafat B, Emami S, Mohammadhosseini N, Faramarzi MA, Samadi N, Shafiee A, et al. Synthesis and antibacterial activity of new N-[2-(thiophen-3-Yl) ethyl] piperazinyl quinolones. *Chem Pharm Bull* 2007; 55(6):894-8.

[24] Foroumadi A, Emami S, Rajabalian S, Badinloo M, Mohammadhosseini N, Shafiee A. Effect of new synthetically prepared quinolone ethyl-1,4-dihydro-

8-nitro-4-oxoquinoline-3-carboxylate on human leukemia cell line HL-60 without/with presence of UVA irradiation. *Biomed Pharmacother* 2009; 63(3): 216-20.

[25] Hooper DC. Focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2001; 32(1): 59-515.

[26] Yun Ch, Ming-Liang L, Kai L, Lian-Shun F, Su-Jie L, Lan-Ying S, Shuo W, Hui-Yuan G. Synthesis and in vitro antibacterial activity of a series of novel gatifloxacin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 4267-4273.

[27] Sahu SK, Pandeya SN, Pathak AK. Synthesis and antimicrobial evaluations of N-substituted piperazinyl Schiff bases of Gatifloxacin. *Medicinal Chemistry & Drug Discovery* 2012; 3(1) 1-10.

[28] Jazayeri S.S, Moshafi MH, Firoozpour L, Rajabalian S, Haddad M, et al. Synthesis and antibacterial activity of nitroaryl thiadiazole–gatifloxacin hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 44: 1205-1209.

Synthesis and in vitro Antibacterial Activity of 2-oxo and 2- Oxyimino-2-Phenyl Ethyl Gatifloxacin Derivatives

M.H. Moshafi[1], N. Mohammadhosseini[2], F. Saffari[3], Sh. Arjomand[4], B. Farmanara[4], A. Foroumadi[5]

Received: 04/03/2012 Sent for Revision: 19/06/2012 Received Revised Manuscript: 11/09/2012 Accepted: 17/09/2012

Background and Objective: Fluoroquinolones are an important group of antimicrobial agents that are used widely in the treatment of various infectious diseases. Because resistance to antimicrobial drugs is widespread, new antimicrobial and understanding of their mechanisms of action are vital. The mechanism of action of these drugs is mediated by inhibition of DNA gyrase, topoisomerase II, IV. Here, substituent on the 7-position would play a key role. The aim of this study was the synthesis and evaluation of antimicrobial effects of new derivatives of Gatifloxacin, derived from substitution on the 7-position of quinilone.

Materials and Methods: In this laboratoty study, a series of gatifloxacin derivatives (2-oxo and 2- oxyimino-2-phenyl ethyl derivatives) were synthesized and evaluated for in-vitro antibacterial activity against a panel of standard gram positive and gram negative bacteria, using conventional agar dilution method.

Results: Among the tested compounds, in comparison with Ciprofloxacin, Gatifloxacin and other synthesized compounds, some analogues of Gatifloxacin (2e and 4e) was the most potent against gram positive bacteria. These compounds had no significant antibacterial activity against gram negative bacteria.

Conclusion: The presence of 2,4-dichloro on benzene ring could increase the antibacterial activity of those compounds. Totally, in comparison with Ciprofloxacin and Gatifloxacin, the tested compounds had the most potent antibacterial activity against gram positive bacteria. All compounds showed no significant activity against gram-negative bacteria.

Key words: Florouquinolones, Gatifloxacin, Antibacterial activity

Funding: This research was funded by Kerman University of Medical Sciences.

Conflict of Interest: None declared.

Athical Approval: The Ethical Committee of Kerman University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Moshafi MH, Mohammadhosseini N, Saffari F, Arjomand Sh, Farmanara B, A. Foroumadi. Synthesis and in vitro Antibacterial Activity of 2-oxo and 2- Oxyimino-2-Phenyl Ethyl Gatifloxacin Derivatives. *J Rafsanjan Univ Med Scie* 2013; 12(6): 425-36 . [Farsi]

1- Associate Prof., Dept. of Pharmaceutics, Pharmaceutical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran (Corresponding Author) Tel:(0341) 3205018, Fax: (0341) 3205018, E- mail: moshafi14@yahoo.com
2- Ph.D Student, Dept. of Chemistery, Islamic Azad University, North Tehran Branch,Tehran, Iran
3- Ph.D Student, Dept. of Bacteriology Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4- Student of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5- Prof., Dept. of Farmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center ,Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran