

بررسی اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی و سیتوتوکسیک برخی ترکیبات جدید اسپیرواکسی ایندولها

صغرا خواب‌نادیده^۱، راضیه ثابت^{۲*}، کامیار زمردیان^۳، معصومه دیور^۴، فرنوش سلیمانی غربی^۵، بهاره حسنی^۶

تاریخ دریافت ۱۴۰۱/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۲/۳۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: برای بررسی اثرات داروهای جدید بر آن شدیم که دوازده مشتق جدید با ساختار پایه‌ی spirooxindoles که قبلاً سنتز شده بودند را مورد بررسی ضد میکروبی و ضد قارچی و ضد سرطانی قرار دهیم.

مواد و روش کار: این مطالعه کارآزمایی تجربی ۱۲ مشتق اسپیرواکسی ایندول مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر مهارکنندگی ترکیبات با استفاده از روش برات میکروداپلوشن بر اساس پروتکل‌های CLSI بر روی ۱۶ گونه مختلف باکتری و قارچ مورد مطالعه قرار گرفت. سپس ۶ ترکیب انتخاب شد و اثرات سمیت سلولی آن‌ها بر روی ۲ رده سلولی MCF-7 و A-549 در مقایسه با دوکوروبیسین بر اساس روش MTT بررسی شد. جهت انجام محاسبات آماری نتایج به‌دست‌آمده از هر آزمایش از نرم‌افزار Excel 2013 و برای رسم نمودارها و تعیین IC₅₀، از نرم‌افزار GraphPad Curve Expert 1.4 با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

یافته‌ها: ترکیبات مورد بررسی در محدوده غلظت ۵۱۲-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار رشد یا نابودی قارچ‌ها و باکتری‌های مورد بررسی نبودند. تنها ترکیب I12 در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانست رشد رده سلولی MFC-7 را به میزان ۴۹/۲۳ درصد مهار کند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به عدم اثرگذاری مؤثر این ترکیبات در مهار رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها، برای استفاده بهینه از این ترکیبات در درمان عفونت‌های قارچی و باکتریایی لازم است تغییرات بیشتری روی ساختمان این ترکیبات انجام گیرد. در بررسی سایتوتوکسیک به نظر می‌رسد حضور استرجهیم در موقعیت N حلقه ایزاتین و همچنین CN متصل به حلقه پیریدین در اثربخشی این مشتق مؤثر بوده است.

کلیدواژه‌ها: ضد باکتری، ضد قارچ، سمیت سلولی، میکروداپلوشن، سنجش MTT، اسپیرواکسی ایندول‌ها

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره اول، ص ۴۵-۳۵، فروردین ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی، تلفن: ۰۹۱۷۳۰۱۲۵۲۳

Email: Sabet_r@sums.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر به علت افزایش موارد نقص ایمنی و استفاده از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، شیمی‌درمانی و همچنین اپیدمی‌های ویروس ایدز، شاهد افزایش بیماری‌های قارچی سیستمیک بوده‌ایم. از سوی دیگر بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و افزایش شیوع بیماری‌های عفونی مقاوم به درمان سبب افزایش میزان مرگ‌ومیر و هزینه‌های درمانی شده است. از این‌رو نیاز به داروهای ضد میکروبی با طیف اثر وسیع افزایش یافته است.

ایساتین (1-H indole-2,3-Dione) یک ترکیب هتروسیکلیک با اهمیت ویژه در شیمی پزشکی است. ایساتین یک مولکول سنتتیک است که به‌عنوان پیش‌ساز برای سنتز تعداد زیادی از ترکیبات دارای فعالیت فارماکولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). مولکول ایساتین از نظر ساختاری دارای یک حلقه‌ی ایندولی است. گروه کتو در موقعیت شماره‌ی ۲ و به‌ویژه موقعیت شماره‌ی ۳ می‌تواند در واکنش‌های افزایشی در باند CO و همچنین واکنش‌های تراکمی شرکت کنند. در بین گروه‌های آمیدی اولیه، ترکیبات

^۱ استاد گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

^۲ استادیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استاد گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

^۴ پژوهشگر، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

^۵ پژوهشگر، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

^۶ پژوهشگر، مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

مواد و روش کار

ترکیبات مورد بررسی: در این پژوهش از ۱۲ مشتق جدید از spirooxindoles (I1-I12) استفاده شده است. ساختار شیمیایی، نام و کد اختصاری ترکیبات در جدول ۱ نشان داده شده است. اثر ضد میکروبی و ضد قارچ رشته‌ای و ضد مخمری ترکیبات I1-I12 مورد بررسی قرار گرفته است. اثرات سمیت سلولی ترکیبات I1, I3, I8, I9, I11, I12 بر روی دو رده‌ی سلولی MCF7 و A549 توسط تست MTT مورد بررسی قرار گرفته است.

۱. بررسی اثر ضد میکروبی و ضد قارچی ترکیبات

میکروب‌های مورد بررسی: بررسی حساسیت ضد باکتریایی (مستند M07-A9)، ضد قارچ‌های رشته‌ای (مستند M38-A2) و ضد مخمرها (مستند M27-A3) طبق شیوه‌نامه‌ی clinical and laboratory standards institute (CLSI) مورد بررسی قرار گرفته است (۷). گونه‌های استاندارد میکروب‌ها در این پژوهش شامل *Aspergillus fumigatus* (ATCC 14110) و *Aspergillus clavatus* (CBS 64025) و *Candida albicans* (ATCC 10261) و *Candida tropicalis* (ATCC 750) و *Candida glabrata* (ATCC 90030) و *Cryptococcus neoformans* (ATCC 4344) و *Candida dubliniensis* (ATCC 9011) و *Exophiala dermatitidis* (CBS 120549) و *Pseudallescheria boydii* (CBS 329093) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) و *Enterococcus faecalis* (ATCC 11700) می‌باشد.

تهیه‌ی سوسپانسیون تلقیحی باکتری‌ها و قارچ‌های رشته‌ای و قارچ‌های مخمری: سوسپانسیون باکتری با کدورت برابر استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد که معادل $10^8 \times 1-1/5$ باکتری در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون می‌باشد. سپس با استفاده از محیط کشت Mueller-Hinton Broth به نسبت ۱ به 10^6 رقیق شدند تا تعداد باکتری‌ها تقریباً برابر 10^6 CFU/ml باشد. جذب سوسپانسیون قارچ رشته‌ای توسط اسپکتوفتومتر در طول موج 530×10^9 نانومتر برابر $0/11-0/09$ تنظیم شد. این مقدار معادل $10^6 \times 1/2-2$ کونیدی در هر میلی‌لیتر می‌باشد. سپس با استفاده از محیط RPMI سوسپانسیون تلقیحی قارچ رشته‌ای با رقت ۱ به ۵۰ تهیه شد. جذب سوسپانسیون قارچ مخمری توسط اسپکتوفتومتر در طول موج 530×10^9 نانومتر برابر $0/15$ تنظیم شد. این مقدار معادل $10^6 \times 1-5$ مخمر در هر میلی‌لیتر می‌باشد. سپس با استفاده از محیط RPMI سوسپانسیون تلقیحی با رقت ۱ به 1000 تهیه شد.

ایستاتین قادر به وارد شدن به واکنش‌های N آلکیلاسیون و N آسیلاسیون می‌باشند (۲). ترکیب اسپیرو به ترکیبی آلی گفته می‌شود که دارای دو حلقه کربنی متصل به یکدیگر از طریق یک اتم کربن واحد باشند. ماهیت حلقه‌های کربنی می‌توانند متفاوت باشند و معمولاً این حلقه‌ها نسبت به همدیگر دارای حالت تاب خورده‌اند. اتم کربن مشترک بین دو حلقه کربن نوع چهار بوده و اسپیرواتم یا اسپیروکربن نامیده می‌شود. مولکول‌های هتروسیکل دارای حلقه اسپیرو کاربرد بسیار گسترده‌ای در زمینه شیمی دارویی، طراحی و سنتز داروهای جدید دارند. اگر هدف سنتز spirooxindoles باشد، برای این منظور از ایستاتین جهت سنتز این مشتقات استفاده می‌شود. درواقع قسمتی از ساختار spirooxindoles ها را ایستاتین تشکیل می‌دهد. حضور کربن اسپیرو مشترک در بین حلقه‌های اسپیرو، سبب سخت شدن سیستم شده و مانع از چرخش دو حلقه‌ای که در این کربن مشترک هستند، می‌شود. درواقع همین محدودیت و استحکام ساختاری این ترکیبات، بر روی فعالیت بیولوژیکی آن‌ها تأثیر مثبت داشته است. حضور هتروسیکل‌هایی که در آن‌ها نیتروژن و یا اکسیژن استخلاف دار باشند، نقش بسیار مؤثری در شیمی دارویی بازی کرده است و به‌عنوان زیر ساختارهای مهم دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳) (۴).

روش MTT بر اساس توانایی متابولیک سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم ۳-(۴،۵-دی‌متیل تiazول ۲-یل)-۲ و ۵-دی فنیل ترازولیوم (MTT) به فرم محلول به فورمازان نا محلول بنا شده است. میزان تولید رنگ با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد.

رده سلولی MCF7، رده سلول سرطانی مجرای پستان (invasive ductal carcinoma) است. این رده سلولی دارای گیرنده استروژن و پروژسترون و فاقد Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) است. محیط مورد استفاده برای این رده سلولی RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium-1640) با غلظت ۱۰ درصد است (۵). رده سلولی A549، رده سلولی‌های آدنوکارسینوما اپیتلیال پایه آلوئولار ریه انسانی (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) است. این سلول‌ها به‌طور گسترده به‌عنوان مدل سلول‌های اپیتلیال ریوی نوع II برای بررسی متابولیسم دارویی استفاده می‌شود (۶).

در این مطالعه تأثیر ۱۲ مشتق جدید از اسپیرواکسی ایندول‌های ایستاتین را از نظر دارا بودن خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و سمیت سلولی مورد بررسی قرار داده شد و حداقل غلظت بازدارنده و کشنده ترکیبات مذکور بر روی ارگانسیم‌های مختلف را تعیین و مقایسه شد.

غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰ و ۲۵۰ و ۱۲۵ و ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکرومولار از ترکیبات I1, I3, I8, I9, I11, I12 قرار داده شدند و بعد از ۷۲ ساعت نسبت سلول‌های زنده توسط آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma, USA) با غلظت 0.5mg/ml در محیط کشت RPMI تهیه و به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محلول رویی سلول‌ها برداشته شده و (DMSO) Dimethyl sulfoxide (Tetra-chem, USA) به چاهک‌ها اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. شدت نور برای هر چاهک در ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA-reader خوانده شد. در نهایت غلظتی از داروها که ۵۰ درصد اثر مهاري بر رشد سلول‌ها داشته‌اند به‌عنوان IC₅₀ هر ترکیب محاسبه شد. جهت انجام محاسبات آماری نتایج به‌دست‌آمده از هر آزمایش از نرم‌افزار Excel 2013 و برای رسم نمودارها و تعیین IC₅₀ از نرم‌افزارهای Curve GraphPad Expert 1.4 استفاده شد. مقدار IC₅₀ و مقادیر بالاتر از آن به‌عنوان دوزهای سمی داروهای ضد سرطان محسوب می‌شوند. درصد مهارکنندگی دارو با استفاده از فرمول زیر، در مورد هر غلظت محاسبه گردید:

$$\text{OD}_{\text{Test}} = \text{OD}_{\text{Test}} - \text{OD}_{\text{Blank}}$$

$$\% \text{Inhibition} = 100 - \left[\left(\frac{\text{OD}_{\text{test}}}{\text{OD}_{\text{(untreated)}}} \right) \times 100 \right]$$

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی اثرات بیولوژیک ترکیبات سنتز شده بر گونه‌های قارچی: بررسی اثرات بیولوژیک ترکیبات سنتز شده بر گونه‌های استاندارد مخمری شامل کاندیدا آلبیکنز، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروژنی، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا دابلینینسیس نشان داد که ترکیبات مورد بررسی در محدوده غلظت ۵۱۲ - ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ اثر مهاري بر رشد مخمرهای استاندارد نداشتند. همچنین رشد گونه‌های بالینی حساس و مقاوم به آزول کاندیدا آلبیکنز در این محدوده غلظت توسط ترکیبات مورد مطالعه مهار نشد. علاوه بر مخمرهای جنس کاندیدا ترکیبات مورد نظر اثر مهاري بر رشد مخمر کریپتوکوکوس در محدوده غلظت مورد بررسی نداشتند. همچنین رشد قارچ‌های ساپروفیت جنس اسپریژیلوس شامل اسپریژیلوس فومیگاتوس، اسپریژیلوس فلاووس و اسپریژیلوس کلاواتوس و قارچ سیاه، آگروفیالا درماتیدیس در محدوده غلظت مذکور مهار نشد (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی اثرات بیولوژیک ترکیبات سنتز شده بر گونه‌های باکتری: ترکیبات سنتز شده هیچ‌گونه اثر

سنجش حساسیت دارویی به روش broth microdilution: به‌منظور محاسبه‌ی minimum inhibitory concentration (MIC) برای هر یک از ترکیبات سنتز شده بر روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش، روش broth microdilution مورد استفاده قرار گرفت. میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت (برای باکتری‌ها از محیط کشت Mueller-Hinton broth و برای قارچ‌ها از محیط کشت RPMI-1640) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد سپس چهار برابر غلظت نهایی مورد نیاز از استوک‌های دارویی ترکیبات I1-I12 (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و با محیط کشت به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد سپس به روش سریال دایلوژن تا ۱۰ مرتبه در ستون‌های پلیت ۹۶ خانه رقیق‌سازی صورت گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تلقیحی تهیه‌شده از میکروارگانیسم‌ها به چاهک‌ها اضافه شد. به‌عنوان کنترل منفی، یک سری چاهک که تنها حاوی محیط کشت هستند در نظر گرفته شد. به‌عنوان کنترل مثبت از داروهای فلوکونازول با غلظت شروع ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای و سیپروفلوکساسین با غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌ها استفاده شد که تا ۱۰ مرتبه غلظت آن‌ها به‌صورت سریال دایلوژن رقیق شد. برای تعیین MIC رشد اولین چاهکی که کدورتی در آن مشاهده نشد و به‌عبارت‌دیگر در آن میکروب کشت نداشت به‌عنوان عدد MIC منظور شد.

بررسی سمیت سلولی بعضی از مشتقات جدید (I1, I3, I11, I12):

آماده‌سازی رده‌های سلولی: رده‌های سلول سرطانی مجرای پستان (MCF7) و سلول آدنوکارسینوما ایپیتلیال پایه آلوئولار ریه انسانی (A549) یا adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells از موسسه پاستور ایران خریداری شد. از محیط کشت Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) حاوی ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco, USA) برای رشد و تکثیر سلولی استفاده شد. سلول‌ها در انکوباتور با اتمسفر حاوی ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک‌ها، از محلول 25 درصد تریپسین (Biosera, East Sussex, UK) و Phosphate buffered saline (PBS) (Merck, Germany) استفاده شد.

سنجش MTT: برای بررسی اثرات سمیت سلولی ترکیبات I1, I3, I8, I9, I11, I12 بر روی دو رده‌ی سلولی MCF7 و A549 از تست MTT استفاده شد. در پلیت ۹۶ خانه میزان ۸۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، سلول‌های کشت داده شده در مجاورت

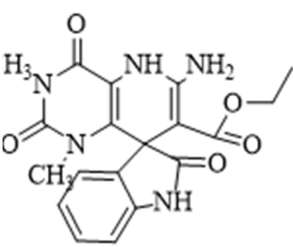
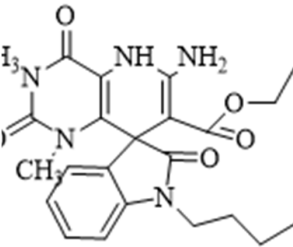
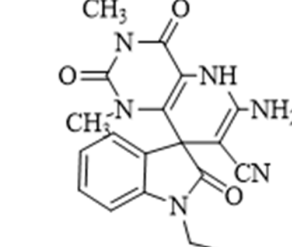
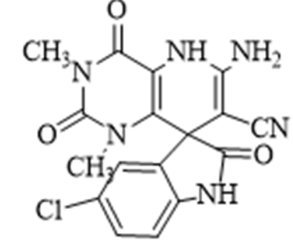
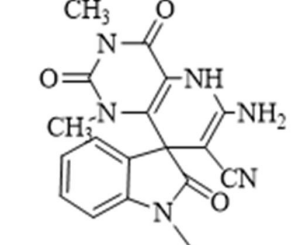
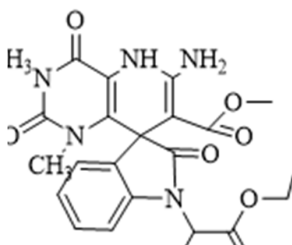
را ندارد.) اثرات ضد باکتری ترکیبات مورد بررسی علیه سویه‌های استاندارد باکتری‌های مورد بررسی در جدول ۳ نشان داده شده است.

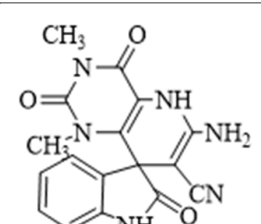
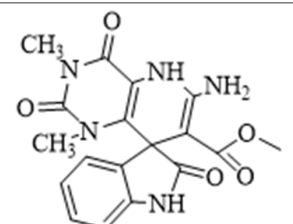
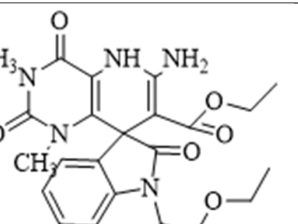
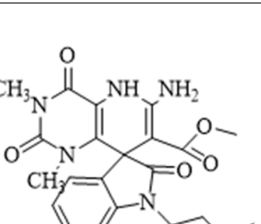
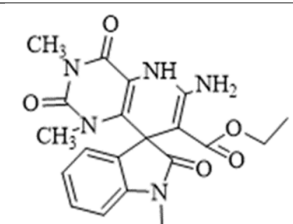
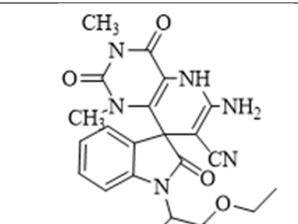
اثرات سایتوتوکسیک ترکیبات سنتز شده بر رده‌های

سلولی MCF-7 و A-549: اثرات ترکیبات I1, I3, I8, I9, I11, I12 بر روی دو رده سلولی MCF-7 و A-549 به روش MTT بررسی شده و در جدول‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. این ترکیبات در محدوده غلظت‌های مذکور در جدول هیچگونه اثر مهارکنندگی بر تکثیر رده سلول A549 نداشته‌اند. همچنین ترکیبات I1, I3, I8, I9, I11 اثربخشی مناسبی جهت مهار رشد سلولی MCF-7 نداشته‌اند، هر چند که به نظر می‌رسد ترکیب I12 در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار می‌تواند مهارکنندگی برابر با ۴۹/۲۳ درصد داشته باشد.

بازدارندگی رشد بر روی سویه‌های استاندارد باکتری مورد مطالعه نداشتند و در محدوده غلظت ۵۱۲-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، اشریشیا کلی، انتروکوکوس فکالیس و سودوموناس آئروژینوزا نبودند. در غلظت ۵۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی ترکیبات ذکر شده بررسی اثر انجام شده است (جهت انجام تست‌های حساسیت دارویی، موسسه‌ی CLSI برای داروهای ضد قارچی و ضد میکروبی رایج یک محدوده‌ی غلظت را برای بررسی در نظر گرفته است. برای مثال جهت داروهای مثل ایتراکونازول و وریکونازول و کتوکونازول محدوده‌ی غلظت برای بررسی ۱۶-۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شده است. برای داروهای سنتز شده معمولاً آزمایشات از غلظت ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و کمتر انجام می‌شود، زیرا در غلظت‌های بالاتر احتمال سمیت داروها برای سلول‌های انسانی افزایش می‌یابد و کارایی لازم

جدول (۱): ساختار شیمیایی، نام و کد اختصاری مشتقات جدید از Isatin spirooxindoles

<p>I 1</p>  <p>Ethyl 6'-amino-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carboxylate</p>	<p>I 5</p>  <p>Ethyl 6'-amino-1-butyl-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carboxylate</p>	<p>I9</p>  <p>1-Allyl-6'-amino-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carbonitrile</p>
<p>I 2</p>  <p>6'-Amino-5-chloro-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carbonitrile</p>	<p>I 6</p>  <p>Amino-1-butyl-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carbonitrile</p>	<p>II 0</p>  <p>Methyl 6'-amino-1-(1-ethoxy-1-oxopropan-2-yl)-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carboxylate</p>

<p>I 3</p>  <p>6'-Amino-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido [3,2-d]pyrimidine]-7'-carbonitrile</p>	<p>I 7</p>  <p>Methyl 6'-amino-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carboxylate</p>	<p>II 1</p>  <p>Ethyl 6'-amino-1-(1-ethoxy-1-oxopropan-2-yl)-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carboxylate</p>
<p>I 4</p>  <p>Methyl 6'-amino-1-butyl-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carboxylate</p>	<p>I 8</p>  <p>Ethyl 1-allyl-6'-amino-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidine]-7'-carboxylate</p>	<p>II 2</p>  <p>Ethyl 2-(6'-amino-7'-cyano-1',3'-dimethyl-2,2',4'-trioxo-2',3',4',5'-tetrahydro-1'H-spiro[indoline-3,8'-pyrido[3,2-d]pyrimidin]-1-yl)propanoate</p>

جدول (۲): حداقل غلظت بازدارنده مشتقات Isatin spirooxindoles علیه قارچ‌های مورد بررسی

Microorganism	Compounds µg/ml												Cntl
	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	
Candida dubliniensis(CBS 8500)	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۰/۲۵
C. krusei (ATCC 6258)	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۶۴
C. glabarata (ATCC 90030)	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۰/۵
C parapsilosis (ATCC 4344)	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۰/۲۵
C albicans (ATCC 10261)	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۱
C. tropicalis (ATCC 750)	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۲
Cryptococcus neoformance (ATCC 9011)	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۰/۲۵
Exophiala dermatitis(CBS 120549)	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۴
Aspergillus flavus (ATCC 64025)	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	>۵۱۲	۱۶

Microorganism	Compounds µg/ml												Cntl
	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	
A. fumigatus(ATCC 14110)	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	8
A. clavatus (CBS 514.65)	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	8
seudallescheria boydii (CBS 329093)	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	8

ATCC: American Type Culture Collection; Cntl: Fluconazole

جدول (۳): حداقل غلظت بازدارنده مشتقات Isatin spirooxindoles علیه باکتری‌های مورد بررسی

Microorganism	Compounds µg/ml												Cntl.
	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	
S. aureus(ATCC25923)	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	0.5
E coli(ATCC25922)	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	0.25
E. fecalis(ATCC11700)	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	0.5
P. aueruginosa(ATCC27853)	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	2

ATCC: American Type Culture Collection; Cntl: Ciprofloxacin

جدول (۴): حداقل غلظت بازدارنده (میکرومولار) مشتقات Isatin spirooxindoles بر سلول MCF-7

Drug code		Concentration (micromolar)						Control negative
		1000	500	250	125	62.5	31.25	
I1	Average	0.79	0.86	0.90	0.88	0.92	0.92	0.89
	% inhibi	11/40	3/72	- 0.36	1/64	- 3/25	- 2/99	
I3	Average	0.80	0.88	0.89	0.92	0.94	0.91	0.89
	% inhibi	10/14	1/56	- 1/86	- 2/73	- 5/44	- 1/95	
I8	Average	0.90	0.94	0.92	0.94	0.93	0.89	0.89
	% inhibi	- 1/03	- 5/56	- 2/84	- 5/26	- 4/59	- 1/08	
I9	Average	0.90	0.95	1.00	0.99	0.98	1.00	0.96
	% inhibi	5/90	0.17	- 4/20	- 4/13	- 2/39	- 4/27	
I11	Average	0.83	0.96	0.96	0.97	1.00	1.00	0.96
	% inhibi	12/70	- 0.38	- 0.17	- 1/84	- 4/86	- 5/10	
I12	Average	0.48	0.88	1.00	0.92	0.98	0.96	0.96
	% inhibi	49/23	7/67	- 4/7	3/29	- 2/39	- 0.10	

جدول (۵): حداقل غلظت بازدارنده (میکرومولار) مشتقات Isatin spirooxindoles بر سلول A-549

Drug code		Concentration (micromolar)						Cntrl negative
		1000	500	250	125	62.5	31.25	
I1	Average	0.85	0.92	0.92	0.93	0.92	0.90	0.85
	% inhibi	0	- 8/14	- 7/60	- 9/15	- 7/60	- 5/42	
I3	Average	0.86	0.88	0.93	0.92	0.95	0.93	0.85
	% inhibi	- 0.85	- 2/49	- 8/53	- 7/41	- 11/60	- 8/38	
I8	Average	0.82	0.88	0.89	0.92	0.90	0.87	0.85
	% inhibi	3/52	- 2/44	- 4/07	- 8/14	- 5/54	- 1/28	
I9	Average	0.83	0.90	0.92	0.90	0.94	0.88	0.87

Drug code	Concentration (micromolar)						Cntrl negative
	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	
I11	% inhibi	۴/۷۶	- ۲/۹۷	- ۵/۳۷	- ۲/۹۳	- ۷/۶۱	- ۰/۹۱
	Average	۰/۹۳	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۹۹	۰/۹۵	۰/۹۴
	% inhibi	- ۷/۳۱	- ۸/۹۱	- ۸/۶۴	- ۱۳/۴۸	- ۹/۴۴	- ۸/۴۵
I12	Average	۰/۵۲	۰/۹۶	۰/۹۷	۰/۹۵	۰/۹۲	۰/۸۹
	% inhibi	۴۰/۲۶	- ۱۰/۱۷	- ۱۱/۴۶	- ۹/۴۰	- ۵/۷۹	- ۱/۷۱

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ۱۲ مشتق جدید spirooxindoles که قبلاً سنتز شده بودند (I1-I12)، به منظور ارزیابی اثر ضد باکتری و ضد قارچی و شش مشتق انتخابی (I1, I3, I8, I9, I11, I12) آن به منظور بررسی اثر کشندگی سلول سرطانی (رده‌های سلولی MCF7 و A549) مورد پژوهش قرار گرفته‌اند. انتخاب این مواد به دلیل گزارش‌هایی مبنی بر آثار بیولوژیک مشتقات Isatin بوده است. داروها با مکانیسم‌های مختلفی اثر بیولوژیکی خود را اعمال می‌کنند. برای مثال آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با مکانیسم‌های مختلف از جمله اثر بر روی دیواره سلولی، غشای سلولی و یا تداخل در عملکرد آنزیم‌های حیاتی باکتری، سبب توقف رشد و یا مرگ باکتری‌ها می‌گردند. در مورد داروهای ضد قارچی، ارگوسترول غشای سلولی به‌عنوان یک هدف جهت داروهای ضد قارچی به شمار می‌رود. به‌طوری که با اثر بر روی ارگوسترول غشایی سبب مهار رشد و یا کشندگی سلول قارچی می‌شوند.

ترکیبات هتروسیکلیک به‌ویژه spirooxindoles با نیتروژن حاوی پنج حلقه، نقش مهمی در زمینه شیمی دارویی داشته و به دلیل توانایی‌های بیولوژیکی و خواص دارویی شناخته شده، به‌طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و روند تحقیق بر روی این ترکیبات مهم در سال‌های اخیر افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. آلکالوئیدهای طبیعی بسیاری با ساختار spirooxindoles شناخته شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به spirotryprostatin اشاره کرد که از متابولیت‌های ثانویه قارچ رشته‌ای اسپرژیلوس فومیگاتوس می‌باشد و سیکل سلولی سلول‌های پستانداران را در فاز G2 متوقف می‌کند (۸).

علاوه بر این انواع مختلفی از ترکیبات spirooxindoles توسط محققان با روش‌های جدید و متنوع سنتز شده‌اند و از نظر فعالیت‌های مختلف از جمله خواص ضد میکروبی، ضد توموری، ضد مالاریا، آنتی توبرکلوزیس و... مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۹). داربست ایندولی ترکیبات spirooxindoles، در واقع یک حلقه اسپیرو با واحدهای دو حلقه‌ای یا چند حلقه‌ای غیر مسطح از هتروسیکل‌های اشباع شده یا نیمه اشباع شده می‌باشد. ساختارهای غیر مسطح به‌خصوص هتروسیکلیک‌های اسپیرو، نسبت به ترکیبات آروماتیک مسطح

دارای تمایل بیشتری به پروتئین‌ها می‌باشند که باعث می‌شود این ترکیبات به‌عنوان اهداف بیولوژیکی استفاده شوند. با این حال، در طیف وسیعی از داروهای مدرن، اسپیرو به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. با این حال، تحقیق بر روی ترکیبات با ریشه اسپیرو هتروسیکل و اسپیروکربوسیکل در موقعیت کربن شماره ۲ و ۳ ایندول، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۱۰).

همانطور که ذکر شد مطالعات گسترده‌ای بر روی مشتقات spirooxindoles برای بررسی اثر ضد میکروبی و ضد قارچی این گونه ساختار تا به امروز مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج ارزیابی‌های بیولوژیکی بر روی مشتقات spirooxindoles نشان می‌دهد که افزودن گروه متیل در موقعیت نیتروژن شماره یک در بنیان پیرولیدین و یا جایگزینی در هسته ایساتینی این ترکیبات و یا حلقه آریل، به‌طور قابل ملاحظه‌ای فعالیت بیولوژیکی آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در مورد فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات، مشاهده می‌شود که افزودن گروه‌های دهنده الکترون در حلقه ایساتین سبب افزایش فعالیت ضد میکروبی آن‌ها می‌گردد. مطالعات Bhaska نشان می‌دهد که حضور گروه متیلی بر روی حلقه فنیل، سبب فعالیت ترکیب علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس می‌شود که این خاصیت با حضور گروه متیل بر روی حلقه‌های نیتروژن و فنیل به‌طور هم‌زمان، افزایش می‌یابد. همچنین حضور گروه -N استیل بر روی نیتروژن هسته ایساتین باعث می‌شود ترکیبات با این ویژگی دارای خواص ضد میکروب و ضد باکتری باشند (۱۱). در ترکیبات سنتز شده توسط Arun، ترکیبات با جانشینی -N متیل و -N متیل-۵- متیل، تأثیر ضد میکروبی قوی‌تری داشتند. ترکیبات با -N متیل - هالوژن به نسبت ترکیبات بدون -N متیل فعالیت بیشتری علیه ارگانسیم‌ها نشان دادند. همچنین ترکیبات جانشین -N آلیل و -N پروپارزیل فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی علیه سالمونلا و کلبسیلا از خود نشان داده‌اند (۱۲). در مطالعات Parthasarathy، ترکیب با حضور برم در کربن شماره ۵ هسته spirooxindoles، دارای فعالیت قابل توجهی علیه باکتری‌های گرم مثبت بوده است. بنابراین براساس مطالعات انجام شده، حضور هالوژن‌ها می‌تواند نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی ترکیبات داشته باشد (۱۳).

هدف باشد. در ارزیابی گروه استر در موقعیت C3 حلقه پیران، در مطالعات Elwarraky، ۳ گروه مختلف استری با حجم و میزان لیپوفیلی متفاوت (متیل استر، اتیل استر و ایزوپروپیل استر) به کار برده شد و این نتیجه حاصل شد که افزایش حجم گروه استری فعالیت ترکیب را علیه رده سلول‌های سرطانی سینه تقویت می‌کند. از نتایج به دست آمده این گونه استنباط می‌شود که گروه ایزوپروپیلی با بیشترین حجم، بهترین پیوند هیدروفوبی را با پروتئین هدف ایجاد می‌کند. (۱۵).

در ارزیابی نتایج حاصل از اثر ترکیبات بر روی رده سلول‌های سرطانی کولورکتال نتایج متفاوتی به دست آمده است. به طوری که قرارگیری هالوژن‌ها در موقعیت C5 حلقه ایندولی برخلاف حالت قبلی به نفع فعالیت ضد توموری ترکیب نمی‌باشد. بنابراین، اگرچه اتم هالوژن ممکن است به واکنش مناسب با پروتئین هدف کمک کند، اما به نظر می‌رسد که در مورد سلول‌های سرطانی کولورکتال آزمایش شده، حضور هالوژن‌ها از باند شدن این ترکیبات با پروتئین هدف جلوگیری می‌کند و سبب ممانعت از فعالیت آن‌ها می‌شود. در مورد حضور استر در موقعیت شماره ۳ حلقه پیران، بهترین فعالیت علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال زمانی مشاهده می‌شود که حلقه استری در کوچکترین اندازه (متیل استر) می‌باشد و ترکیبات مشابه با حلقه اتیل استر و یا ایزوپروپیل استر فعالیت کمتری دارند. از این موارد می‌توان اثبات کرد که افزایش حجم ترکیبات برخلاف حالت قبلی به نفع فعالیت ضد توموری نمی‌باشد (۱۴). نتیجه کلی به این حالت بیان می‌شود که فعالیت ضد توموری متفاوت در ترکیبات سنتز شده می‌تواند به دلیل تفاوت در پروتئین هدف در هر دو رده سلولی عنوان شود.

در مطالعه حاضر که بر روی بررسی خواص ضد میکروبی و سیتوتوکسیسیته مشتقات spirooxindoles سنتز شده انجام گرفته است، مشاهده گردید که این ترکیبات هیچگونه خواص ضد میکروبی و ضد سرطانی از خود نشان ندادند. با مقایسه ساختار ترکیبات سنتز شده در این مطالعه و مطالعات قبلی می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت ضد میکروبی مشتقات spirooxindoles تحت تأثیر عوامل مختلفی مثل حضور هالوژن‌ها بر روی هسته ایساتین و همچنین حضور گروه‌های نیترو، متیل، فنیل و ان-استیل بر روی حلقه ایساتین قرار می‌گیرد. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت سیتوتوکسیسیته مشتقات spirooxindoles به عواملی چون حجم ترکیب، میزان لیپوفیلی ترکیب، حضور هالوژن‌ها در حلقه ایندولی و حضور استرها در حلقه پیران بستگی دارد. در مطالعات قبلی ترکیبات اسپرواکسی ایندول با حلقه پنج ضلعی حاوی نیتروژن، فاقد استخلاف بوده و اثرات ضد باکتریایی از خود نشان داده‌اند که در ترکیبات بررسی شده در این مطالعه NH حلقه

اثر قابلیت کشندگی سلول سرطانی مشتقات spirooxindoles نیز مورد توجه واقع شده است. در مطالعات Arun، مطالعه اثرات سیتوتوکسیسیته این گونه ترکیبات بر روی رده سلولی آدنوکارسینومای ریه A549 انجام شده که در میان مشتقات ایساتینی جایگزین شده با N-آکیل، یک افزایش در فعالیت ضد سرطانی ترکیبات با افزایش طول زنجیره کربنی مشاهده می‌شود، این افزایش قدرت سیتوتوکسیسیته می‌تواند به دلیل افزایش خاصیت لیپوفیلی ترکیب باشد که سبب افزایش تمایل ترکیب به سلول می‌گردد (۱۲). در مطالعه‌ای اثر ضد سرطانی مشتقات spirooxindoles بر روی رده سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای کولورکتال، به روش MTT انجام شده است و با ارزیابی مشتقات مختلف مشخص گردیده است که جایگزینی اتم‌های هالوژن فلورین، کلر و یا برم در موقعیت کربن شماره ۵، توانایی مهار رشد سلول‌های سرطانی را به میزان زیادی افزایش می‌دهد. همچنین قرارگیری NO₂ در موقعیت کربن شماره ۵ باعث تشدید فعالیت ضد سرطانی می‌گردد. این افزایش در توانایی مهار سلول‌های سرطانی در مطالعات Arun نیز مشاهده می‌شود (۱۴).

بنابراین، نتیجه کلی به دست آمده می‌تواند بدین صورت عنوان شود که افزایش سایز مولکول با قرارگیری هالوژن‌ها و یا گروه نیترو در ساختار ترکیب، می‌تواند سبب افزایش قدرت سیتوتوکسیسیته آن باشد. (NO₂>Br>Cl>F) علاوه بر این، جایگزینی هالوژن‌ها در موقعیت‌های دیگر مثل C4، C6 و C7 سبب نقص در فعالیت می‌گردد. این مقایسه‌ها به روشنی نشان می‌دهد که حضور جانشین‌ها در موقعیت C5 در جهت فعالیت مهاری رشد بسیار اساسی است. همچنین، مورد دیگری که از بررسی فعالیت ضد سرطانی ترکیبات استنباط می‌شود این نکته است که افزایش تعداد فاصله در -CH₂ باعث افزایش در توانایی مهاری ترکیب می‌گردد. به طوری که ترکیبات حاوی NH، NEt، NMe و NPr دارای قدرت فعالیت بیشتری می‌باشند. (NPr> NEt >NMe>NH) در میان سیستم‌های غیراشباع، ترکیبات دارای گروه پروپارژیل فعالیت سیتوتوکسیسیته قابل ملاحظه‌ای برخلاف گروه آلیل نشان می‌دهند.

در مطالعات Elwarraky و همکاران بررسی ترکیباتی که فعالیت سیتوتوکسیسیته قابل قبولی علیه سلول‌های سرطانی سینه داشتند، نشان می‌دهد که ۳ متغیر ساختاری مهم در فعالیت ضد توموری ترکیبات شرکت دارند که عبارت‌اند از: حضور هالوژن‌ها در موقعیت C5 حلقه ایندولی و حضور استر در موقعیت C3 حلقه پیران و حضور استر در موقعیت C6 حلقه پیران (۱۵). افزایش قدرت سیتوتوکسیسیته با حضور هالوژن‌ها می‌تواند به علت درگیری اتم‌های هالوژن در واکنش‌های هیدروفوبی یا باند هالوژنی با پروتئین

همان طور که در مطالعات Agun و همکاران اشاره شد، ترکیب با حضور گروه پروپارژیل در موقعیت N-حلقه ایساتین فعالیت قابل توجهی علیه رده سلول سرطانی A549 داشته است (۱۶). از این سو به نظر می‌رسد زنجیره‌های کربنی غیر اشباع در موقعیت N-حلقه ایساتین می‌تواند اثربخشی بهتری نسبت به استخلاف‌های کربنی اشباع (مانند ترکیب I4, I5, I6) داشته باشند.

از جمله محدودیت‌های موجود در پژوهش می‌توان اشاره کرد که به دلیل بودجه ناکافی آزمایشات تنها بر روی دو رده سلول سرطانی مورد مطالعه قرار گرفته است همچنین اثر ضد قارچی و ضد باکتریایی ترکیبات سنتز شده علیه گونه‌های دیگر نیز می‌تواند بررسی شود. همچنین با توجه به اینکه مقدار محدودی از مواد سنتز شده در دسترس داشتیم فقط امکان تعداد تکرار محدودی از آزمایش برای ما فراهم شد. در مجموع با توجه به این که این ترکیبات اثربخشی مناسب نداشتند به نظر می‌رسد بهتر است حضور استخلاف‌های قطبی مانند CN، زنجیره‌های کربنی اشباع در این ترکیبات محدود گردد. همچنین بهتر است جهت بهبود اثربخشی میکروبی، در موقعیت N حلقه ایندولی و یا موقعیت ۵ حلقه ایساتین گروه‌های هالوژنی حجیم قرار گیرد. باید به این نکته نیز اشاره شود که علی‌رغم طراحی و سنتز داروهای جدید با خواص مختلف از جمله ضد میکروبی و ضد سرطانی و ... در نهایت این میکروارگانیسم زنده و یا سلول سرطانی می‌باشد که با داشتن فاکتورها و متغیرهای مختلف و به کارگیری مسیرهای مختلف در مواجهه با دارو نقش تعیین کننده‌ای را تعیین می‌کند، لذا توصیه می‌شود که ترکیبات جدید با در نظر گرفتن پتانسیل‌های متفاوت بر روی مدل‌های آزمایشگاهی به چالش کشیده شوند. امید به اینکه با ایجاد تغییرات مورد بررسی در این مطالعه و به کارگیری پیشنهادات بتوان به شناخت این داروها و تعیین حداقل دوز مصرفی و حداقل عوارض جانبی دست یافت.

تشکر و قدردانی

این مطالعه دارای تأییدیه اخلاقی به شماره ۹۴-۰۱-۳۶-۹۸۱۰ از دانشگاه علوم پزشکی شیراز است.

ایندولی دارای استخلاف بوده است، که احتمالاً به همین علت ترکیبات بررسی شده در این مطالعه فاقد اثربخشی لازم بوده‌اند. با توجه به ترکیبات بررسی شده در مطالعات قبلی و مقایسه آن با ترکیبات این مطالعه می‌توان مشاهده کرد که در ترکیبات spirooxindoles با اثربخشی ضد میکروبی، کربن اسپایرو به حلقه‌ی ۵ ضلعی متصل است در صورتی که در ترکیبات ما کربن اسپایرو به حلقه‌ی ۶ ضلعی متصل شده است.

در ترکیبات مطالعه شده قبلی توسط Bhaskar و همکاران و parthasarathy و همکاران استخلافات متصل به کربن اسپایرو معمولاً گروه‌های حجیم و حداقل دارای یک سیستم سه حلقه‌ای یا بیشتر بودند و این استخلافات معمولاً لیپوفیل بوده که احتمالاً در یک پاکت لیپوفیلی در سایت فعال آنزیم جای می‌گیرند. در صورتی که مشتقات مورد بررسی در این مطالعه، ترکیبات پلار بوده و دارای استخلافاتی همچون NH_2 و CN است که احتمالاً با سایت‌های لیپوفیل آنزیم برهم کنش لازم را ایجاد نمی‌کنند و همچنین این ترکیبات به اندازه کافی حجیم نبوده و از نظر سایز ملکولی کوچک می‌باشند.

ترکیب II2 در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار قادر به مهار رشد رده سلولی MFC-7 به میزان ۴۹/۲۳ درصد بوده است. احتمالاً وجود استر حجیم در موقعیت N حلقه ایساتین می‌تواند به اثربخشی نسبتاً مناسب ترکیب کمک کرده باشد، همان طور که در مطالعات elwarraky و همکاران نیز به نظر می‌رسد در صورتی که استر بر روی N حلقه ایساتین قرار گرفته باشد شاهد اثر مهاری مناسب بر روی رده سلولی MDA-231 خواهیم بود به این صورت که افزایش سایز استر موجب بهبود اثربخشی می‌شود (۱۵).

همچنین در ترکیب II1 حلقه پیریدین متصل به کربن اسپایرو شاهد استخلاف نسبتاً حجیم ایزوپروپیل استر هستیم، در صورتی که در ترکیب II2 این جایگاه با استخلاف قطبی CN جایگزین شده است. با توجه به عدم اثرگذاری ترکیب II1 بر روی رده سلولی MFC-7 و اثرگذاری ترکیب II2 بر روی رده سلولی مذکور احتمال می‌رود پروتئین‌های هدف دارای سایت‌های هیدروفیل بوده و به همین علت اثربخشی نسبتاً مناسب از آن مشاهده شده است.

References:

1. Pakravan P, Kashanian S, Khodaei MM, Harding FJ. Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity. *Pharmacol Rep* 2013;65(2):313-35.
2. Nath R, Pathania S, Grover G, Akhtar MJ. Isatin containing heterocycles for different biological activities: Analysis of structure activity relationship. *J Mol Struct* 2020;1222:128900.
3. Zhou L-M, Qu R-Y, Yang G-F. An overview of spirooxindole as a promising scaffold for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2020;15(5):603-25.

4. Nasri S, Bayat M, Mirzaei F. Recent strategies in the synthesis of spiroindole and spirooxindole scaffolds. *Top Curr Chem* 2021;379(4):1-37.
5. Comşa Ş, Cimpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Res* 2015;35(6):3147-54.
6. Wang Y, Jiang M, Du C, Yu Y, Liu Y, Li M, et al. Utilization of lung cancer cell lines for the study of lung cancer stem cells. *Oncol Lett* 2018;15(5):6791-8.
7. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2008.
8. Li J, Zhuang C-L. Natural Indole Alkaloids from Marine Fungi: Chemical Diversity and Biological Activities. *Pharmaceu Fronts* 2021;3(04):e139-e63.
9. Youseftabar-Miri L, Hosseinjani-Pirdehi H, Akrami A, Hallajian S. Recent investigations in the synthesis of spirooxindole derivatives by Iranian researchers. *J Iran Chem Soc* 2020;17(9):2179-231.
10. Pavlovska TL, Redkin RG, Lipson VV, Atamanuk DV. Molecular diversity of spirooxindoles. Synthesis and biological activity. *Mol Divers* 2016;20(1):299-344.
11. Bhaskar G, Arun Y, Balachandran C, Saikumar C, Perumal PT. Synthesis of novel spirooxindole derivatives by one pot multicomponent reaction and their antimicrobial activity. *Eur J Med Chem* 2012;51:79-91.
12. Arun Y, Bhaskar G, Balachandran C, Ignacimuthu S, Perumal P. Facile one-pot synthesis of novel dispirooxindole-pyrrolidine derivatives and their antimicrobial and anticancer activity against A549 human lung adenocarcinoma cancer cell line. *Bioor Med Chem Lett* 2013;23(6):1839-45.
13. Parthasarathy K, Praveen C, Jeyaveeran J, Prince A. Gold catalyzed double condensation reaction: Synthesis, antimicrobial and cytotoxicity of spirooxindole derivatives. *Bioor Med Chem Lett* 2016;26(17):4310-7.
14. Parthasarathy K, Praveen C, Jeyaveeran J, Prince A. Gold catalyzed double condensation reaction: Synthesis, antimicrobial and cytotoxicity of spirooxindole derivatives. *Bioor Med Chem Lett* 2016;26(17):4310-7.
15. Elwarrakya LM, Abdel-Fattaha M, Garyb BD, Piazzab GA, Abadia AH. An efficient and green one-pot synthesis of novel spirooxindole derivatives with potential anti-tumor activity in an aqueous solvent. *Chem Rapid Commun* 2014;2(2):33-40.
16. Arun Y, Bhaskar G, Balachandran C, Ignacimuthu S, Perumal P. Facile one-pot synthesis of novel dispirooxindole-pyrrolidine derivatives and their antimicrobial and anticancer activity against A549 human lung adenocarcinoma cancer cell line. *Bioor Med Chem Lett* 2013;23(6):1839-45.

EVALUATION OF ANTIFUNGAL, ANTIBACTERIAL AND CYTOTOXIC EFFECTS OF SOME NEW DERIVATIVES OF SPIROOXYINDOLES

Soghra Khabnadideh¹, Razieh Sabet^{*2}, Kamiar Zomorodian³, Masoumeh Divar⁴, Farnoush Soleymani Gharbi⁵, Bahareh Hassani⁶

Received: 01 February, 2023; Accepted: 21 May, 2023

Abstract

Background & Aims: In order to investigate the effects of new drugs, we decided to investigate twelve new derivatives with the basic structure of spirooxindoles that were previously synthesized for antimicrobial, antifungal and anticancer properties.

Materials & Methods: In this experimental study, we evaluated 12 spirooxindole derivatives. The inhibitory effect of the compounds has been studied using broth microdilution method based on CLSI protocols on 16 different species of bacteria and fungi. Then, 6 compounds have been selected and their cytotoxicity effects on 2 cell lines MCF-7 and A-549 compared to doxorubicin have been investigated by MTT method. Excel 2013 software was used to perform statistical calculations of the results obtained from each experiment, and GraphPad Curve Expert 1.4 software was used to draw graphs and determine IC50 with a significance level of 0.05.

Results: At the concentration range of 1-512 µg/ml, the synthesized derivatives were not able to inhibit the growth or death of the investigated fungi and bacteria. Only the compound I12 at a concentration of 1000 µg/ml was able to inhibit the growth of MFC-7 cell line by 49.23%.

Conclusion: Due to the lack of effective effect of these compounds in inhibiting the growth of bacteria and fungi, for the optimal use of these compounds in the treatment of fungal and bacterial infections, it is necessary to make more changes on their structures. Cytotoxicity assay reveals that the presence of the bulky ester in the N position of the isatin ring as well as the CN attached to the pyridine ring has been beneficial in the effectiveness of these derivatives.

Keywords: Antibacterial, Antifungal, Cytotoxicity, Microdilution, MTT Assay, Spirooxindoles

Address: Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Tel: +989173012523

Email: sabet_r@sums.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2023; 34(1): 45 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2023 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

² Assistant professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran (Corresponding Author)

³ Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁴ Researcher, Pharmaceutical Sciences Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁵ Researcher, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁶ Researcher, Medicinal and Natural Products Chemistry Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran