DOI: 10.48305/jims.v41.i705.0018

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۰۵/هفته‌ی اول فروردین ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۴ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۵ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱/۷

بررسی اثرات بیولوژیک ترکیبات جدید از دسته تترازول بر رده‌های سلول سرطانی (MCF-7 وHeLa) و میکروب‌های شایع (*Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Candida albicans*)

حجت صادقی علی آبادی[۱]، مینا میریان[۲]، سجاد علی‌نیا[۳]، مریم عباسی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ترکیبات تترازولی، دارای فعالیت‌های گوناگونی نظیر اثرات ضدویروسی، ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدالتهابی، ضد تشنج و ضدسرطان می‌باشند. به دلیل عدم وجود اثربخشی کافی و نیز بروز مقاومت‌های دارویی، در این مطالعه بر آن شدیم تا با هدف معرفی گزینه‌های دارویی جدید به بررسی اثرات زیستی تعدادی از تترازول‌های تازه سنتز شده بپردازیم.

روش‌ها: ترکیبات مختلف تترازولی که از قبل سنتز شده بود در حلال مناسب حل شده و سپس سمیت سلولی آن‌ها در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌مولار به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده‌های سلولی HeLa و MCF-7 با استفاده از تست MTT بررسی شد. اثر ضدمیکروبی این ترکیبات با تعیین مقدار MIC (Minimum inhibitory concentration) و MBC (Minimum bactericidal concentration) ترکیبات تعیین گردید.

یافته‌ها: ترکیبات مورد مطالعه، سمیت قابل توجهی در برابر رده‌های سلولی HeLa و MCF-7 از خود نشان دادند. از سوی دیگر همه‌ی ترکیبات به‌جز دو ترکیب ۵ و ۶ که به ترتیب دارای استخلاف‌های متیل و آلدئید بودند، اثر ضدمیکروبی خوبی نیز از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از مطالعات سایتوتوکسیک انجام شده روی رده‌ی سلولی HeLa نشان داد که هیچ کدام از ترکیبات در مدت ۴۸ ساعت نتوانستند درصد سلول‌های زنده را به زیر ۵۰ درصد برسانند، در حالی‌که در بررسی ۷۲ ساعته، همه‌ی ترکیبات به جز ترکیبات ۱ و ۲ (به ترتیب دارای گروه‌های متوکسی و هیدروکسیل) درصد سلول‌های زنده را به زیر ۵۰ درصد رساندند. در بررسی اثرات ضدمیکروبی، MIC و MBC برای ترکیبات ۱ تا ۴ ترتیب ۰/۰۴ میکرومولار و ۰/۰۱ میلی‌مولار بود، که نشان‌دهنده‌ی اثر ضدباکتری خوبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* و اثر ضد قارچی خوبی علیه *کاندیدا آلبیکنس* بود.

واژگان کلیدی: تترازول؛ عوامل ضدسرطانی؛ عوامل ضدمیکروبی؛ سمیت سلولی

ارجاع: صادقی علی آبادی حجت، میریان مینا، علی‌نیا سجاد، عباسی مریم. **بررسی اثرات بیولوژیک ترکیبات جدید از دسته تترازول بر رده‌های سلول سرطانی (MCF-7 وHeLa) و میکروب‌های شایع (*Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Candida albicans*)**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۰۵): ۲۶-۱۸

مقدمه

امروزه با وجود پیشرفت‌های بسیار در زمینه‌ی تشخیص و درمان بیماری‌های بدخیم، سرطان همچنان دومین دلیل اصلی مرگ و میر در جهان است. برای درمان سرطان از روش‌های مختلفی شامل جراحی، رادیوتراپی، شیمی‌درمانی، هورمون درمانی، ژن‌درمانی استفاده می‌شود. در بیشتر پروتکل‌های درمانی، شیمی‌درمانی اصلی‌ترین نقش را در کنار سایر روش‌های معمول ایفا می‌کند. ترکیبات اصلی بسیاری برای شیمی‌درمانی معرفی شده‌اند و بسیاری از ترکیبات جدید در *in vitro* و *in vivo* علیه سلول‌های سرطانی طراحی، ساخته و ارزیابی شده‌اند. آزول‌ها (Azoles)، نقش مهمی در دارودرمانی و شیمی‌درمانی بازی می‌کنند (۱). در حال حاضر، داربست آزول‌ها شامل ایمیدازول (Imidazole)، تریازول (Triazole) و تترازول‌ها (Tetrazole) است

۱- استاد، گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- داروساز، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مینا میریان: استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mina.mirian@pharm.mui.ac.ir

و به عنوان ساختار اصلی زنده و اساسی برای سنتز طیف وسیعی از عوامل ضدویروسی، ضدالتهابی، ضدتشنجی، ضدقارچی، ضدباکتریایی، و ضد توموری مؤثر در نظر گرفته می‌شود (۲). برای مثال، ترکیبات دارای استخلاف اتیل اثر ضدویروسی (۳)، مشتقات ایندانیل تترازول فعالیت ضدالتهابی (٤) و ترکیبات دارای استخلاف هیدروژن و آمین اثر ضدتشنجی (٥) دارند. همچنین، مشتقات تترازولی به عنوان ترکیبات آنتی‌باکتریال (همانند سفونیسید و فلوموکسف) در انسان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (٦).

ترازول‌ها، گروهی از هتروسیکلیک‌های آلیستزی هستند که یک حلقه حاوی چهار نیتروژن و یک کربن دارند. دی‌متیل تیازولیل دیفنیل تترازولیوم بروماید (MTT) یک ترازول شناخته شده است که در ارزیابی میزان زنده ماندن سلول‌ها به کار می‌رود (۷).

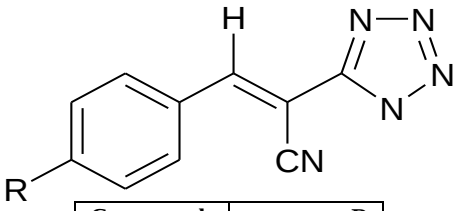
در سال‌های اخیر، تلاش‌های بسیاری برای سنتز و به کارگیری مشتق‌های نوین ترازول برای استفاده به عنوان عوامل مسکن (۸)، ضدفشار خون (۹، ۱۰)، آنتی‌باکتریال (۱۱)، ضدقارچ (۱۲) و ضدسرطان (۱۳) شده است. بعضی از این داروها دارای تأییده FDA (Food and Drug Administration) بوده و در بسیاری از کشورها وارد بازار دارویی شده‌اند، مانند لوزارتان (Losartan) والزارتان (Valsartan). در بعضی از این مشتق‌ها، ترازول به عنوان بخش اصلی در سنتز کمپلکس‌های فلزی به کار رفته است. برای مثال، فعالیت ضد توموری کمپلکس‌های پلاتینوم II (Platinum II) که از Ttrazoloquinolines سنتز شده‌اند بررسی شده است (١٤).

اخیراً، نشان داده شد که کمپلکس‌های دو قطبی پلاتینوم که توسط تترازول به هم متصل شده‌اند (tetrazole briedged binuclear platinum) سمیت سلولی بیشتری علیه رده‌های سلولی HU60 و NSCLC دارند (١٤). همچنین، کمپلکس‌های پلاتینوم حاوی ترازول، می‌توانند به عنوان پلتفورم‌هایی برای طراحی مواد ضدسرطانی جدید علیه رده‌های سلولی مختلف (١٥) و مقاومت دارویی به سیس پلاتین (Cisplatin) به کار بروند (١٦، ١٧). بیشتر این ترکیبات در غلظت‌های میکرومولار فعالیت ضدسرطانی خوب و قابل قبولی نشان دادند. 5-oxo، 5-thiotetrazole و چندین ترکیب مرتبط دیگر به عنوان عوامل ضدسرطانی خوب و امیدبخش شناسایی شده‌اند (١٨).

در سال‌های اخیر با توجه به موارد جدید عفونت‌های قارچی و باکتریایی و بروز روز افزون سرطان‌های مختلف، عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی معمول و نیز مقاومت دارویی به داروهای موجود، محققان بر آن هستند که با طراحی و سنتز ترکیبات تترازول جدید بر این مشکلات غلبه کنند. بنابراین در مطالعه‌ی پیش‌رو، برآن شدیم تا با هدف معرفی گزینه های دارویی جدید به بررسی اثرات زیستی تعدادی از تترازول‌های تازه سنتز شده بپردازیم و ویژگی‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی و کشندگی سلولی را برای شش تترازول جدید گزارش دهیم.

روش‌ها

آماده‌سازی محلول استوک داروهای تترازولی: تترازول‌های مورد بررسی در این مطالعه (به نام‌های T1 تا T6) دارای استخلاف‌های متفاوت هستند و توسط خود محققان از ۱ تا ٦ نامگذاری شده‌اند (شکل ۱). به منظور آماده‌سازی غلظت‌های مورد نظر از این ترکیبات، مقدار مناسب از نمونه بر اساس وزن مولکولی ترکیبات با ترازویی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن شده و به آن ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO (سیگما آلدریچ، ایالات متحده) اضافه کرده و با بافر فسفات (زیست ایده، ایران) حجم آن را به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد تا محلول استوک ۱ میلی‌مولار به دست آید. سپس با روش Serial dilution غلظت‌های بعدی (۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌مولار) با نسبت ۱ به ۹ از ترکیب مورد نظر و حلال ساخته شد.



Compounds	R
T1	OCH_3
T2	OH
T3	Br
T4	NO_2
T5	CH_3
T6	CHO

شکل ۱. ساختار مولکولی ترکیبات ترازول سنتز شده در این مطالعه

کشت سلولی: رده‌های سلولی HeLa (سرطان دهانه‌ی رحم انسانی) و MCF-7 (سرطان پستان انسانی) به ترتیب از مؤسسه‌ی پاستور و مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی (ایران، تهران) خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 (زیست ایده، ایران) کشت داده شدند. ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS (Fetal bovine serum) (گیبکو، ایالات متحده)، ۱ درصد پنی‌سیلین (۱۰۰U/m)/ استرپتومایسین (۱۰۰µg/ml) (سیگما آلدریچ، ایالات متحده) به محیط کشت اضافه شد. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2 و رطوبت ۹۵ درصد انکوبه شدند.

اثر سمیت سلولی ترکیبات ترازول: برای بررسی سمیت سلولی، سلول‌ها در پلیت ۹٦ خانه (۵۰۰۰ سلول در چاهک) کشت و به مدت

۲٤ ساعت انکوبه شدند. سپس با ترکیبات (T1,T2,T3,T4,T5,T6) در محدوده‌ی غلظت‌های ۰/۱ میلی‌مولار تا ۱ میلی‌مولار تیمار شده و برای ٤۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2 و رطوبت ۹۵ درصد انکوبه شدند. بعد از گذشت این زمان‌ها، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (سیگما آلدریچ، ایالات متحده) (۵mg/mL) به هر چاهک اضافه شده و بعد از سه ساعت انکوباسیون، محیط کشت و محلول MTT خارج شدند. ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد تا کریستال‌های بنفش فورمازان را حل کنند. در نهایت، چگالی نوری (Optical density) OD فورمازان‌های تشکیل شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش شد. این تست حداقل سه بار تکرار شده است.

تست AnnexinV/PI برای بررسی مکانیسم مرگ سلولی بعد از تیمار با ترکیبات تترازول مورد مطالعه، از کیت AnnexinV/PI (Biolegend، ایالات متحده) استفاده شد. برای این تست، از هر ردهٔ سلولی تعداد 1×10^{5} از ردهٔ سلول سرطانی در هر چاهک یک پلیت ٦ خانه و در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۲٤ ساعت در شرایط مناسب انکوبه گردید. سپس سلول‌ها با غلظت IC50 ترکیبات مؤثر واجد اثر سمیت سلولی که قبلاً از تست MTT به دست آمده، تیمار گردید. پس از ۲٤ ساعت، سلول‌ها تریپسینه شد و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلول‌ها طبق پروتکل کیت در ۱۰۰ میکرولیتر محلول برچسب‌گذاری Annexin V-FITC/PI معلق شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵-۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه گردیدند. آنگاه ۵۰۰ میکرولیتر بافر انکوباسیون به سلول‌ها افزوده شد و به وسیله‌ی دستگاه flow cytometer (FACSCalibur, BD, USA) ارزیابی گردید.

فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی ترکیبات تترازول: کم‌ترین غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration) MIC، ترکیبات تترازول با روش MTT تعیین شد (۱۹). برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی این ترکیبات، *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albinos*) بر روی محیط سابرود دکستروز آگار (Sabouraud's Dextrose Agar) و *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) بر روی محیط مولر هیلتون آگار (Mueller Hinton Agar) کشت داده شدند و یک شب در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ظهور کلنی‌های باکتریایی بر روی محیط کشت، کلونی‌های تازه هر یک از گونه‌ها در نرمال‌سالین حل شدند تا در طول موج ٦۲۰ نانومتر به چگالی نوری ۰/۸ نانومتر برسند. برای بلانک از نرمال‌سالین فاقد باکتری استفاده شد. غلظت سوسپانسیون باکتریایی استفاده شده $1/5\times10^{8}$ CFU/mL می‌باشد. آنگاه ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی به ۹ میلی لیتر نرمال‌سالین استریل اضافه شد، در نتیجه غلظت نهایی برابر با $1/5\times10^{6}$CFU/mL بوده که از آن برای تلقیح در لوله‌ی آزمایش و ادامه‌ی کار استفاده شد.

برای به دست آوردن حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت میکروبی به هر چاهک پلیت ۹٦ خانه اضافه شد. سپس رقت‌های سریالی از این ردیف به دست آمدند و غلظت‌های ۰/۰۰۱ تا ۰/۱ میلی‌مولار از ترکیب به دست آمد. آنگاه، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های باکتریایی و قارچی با غلظت 1×10^{6}CFU/ml به هر چاهک اضافه شد. یک ردیف دارای همه‌ی موارد به جز ترکیبات تترازولی به عنوان کنترل منفی و یک ردیف حاوی فقط محیط کشت میکروبی به عنوان بلانک در نظر گرفته شدند. برای جلوگیری از دهیدراته شدن، پلیت‌ها به‌صورت آزادانه با سلفون پوشانده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (۵mg/mL) به هر چاهک اضافه شده و سه ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. تغییر رنگ از زرد به آبی به عنوان نتایج مثبت در نظر گرفته شد. MIC پایین‌ترین غلظت از ترکیبات مورد مطالعه بود که هیچ رشدی در آن مشاهده نشد (عدم مشاهده‌ی رنگ آبی) (۱۹، ۲۰).

بعد از انجام آزمایش تعیین MIC با متد میکرودایلوشن براث-MTT از چاهک‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده شد، نمونه‌برداری و برای تعیین حداقل غلظت کشندگی ترکیبات، به روش پلیت کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده از نظر رشد میکروارگانیسم کنترل گردید. پلیتی که در آن، عدم رشد میکروارگانیسم دیده شد، به عنوان حداقل غلظت باکتری کشندگی MBC (Minimum Bactericidal concentration) آن ترکیب در نظر گرفته شد (۲۰).

نتایج به دست آمده از انجام مطالعات سایتوتوکسیک به‌صورت میانگین از ۳ تست جداگانه‌ی مختلف بر روی رده‌های سلولی MCF-7 و HeLa گزارش گردید. نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۱ (version 21, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تحلیل آماری قرار گرفت. در تحلیل آماری نتایج، اثرات غلظت‌های مختلف از هر ٦ ترکیب تترازولی سنتزی بر روی دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش قرار گرفت. برای مشخص شدن این امر که بین گروه‌های مطالعاتی تفاوت‌های آماری معنی‌داری وجود دارد یا خیر از آزمون ANOVA one way و برای روشن شدن محل تفاوت گروه‌ها از آزمون Tukey استفاده گردید و اختلاف معنی‌داری گروه‌ها ($P < ۰/۰۵$) در

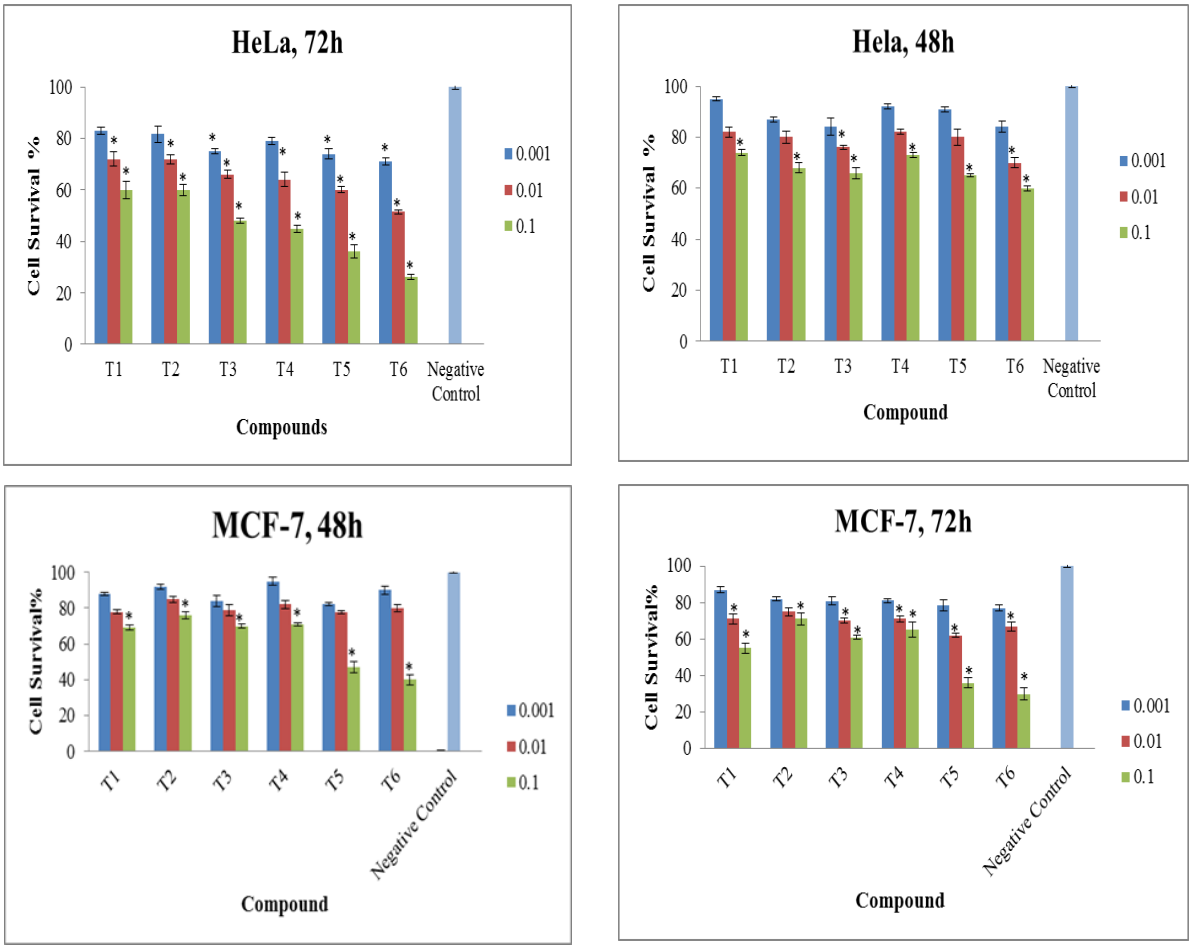
مقایسه با گروه شاهد منفی با علامت ستاره مشخص شده است.

یافته‌ها

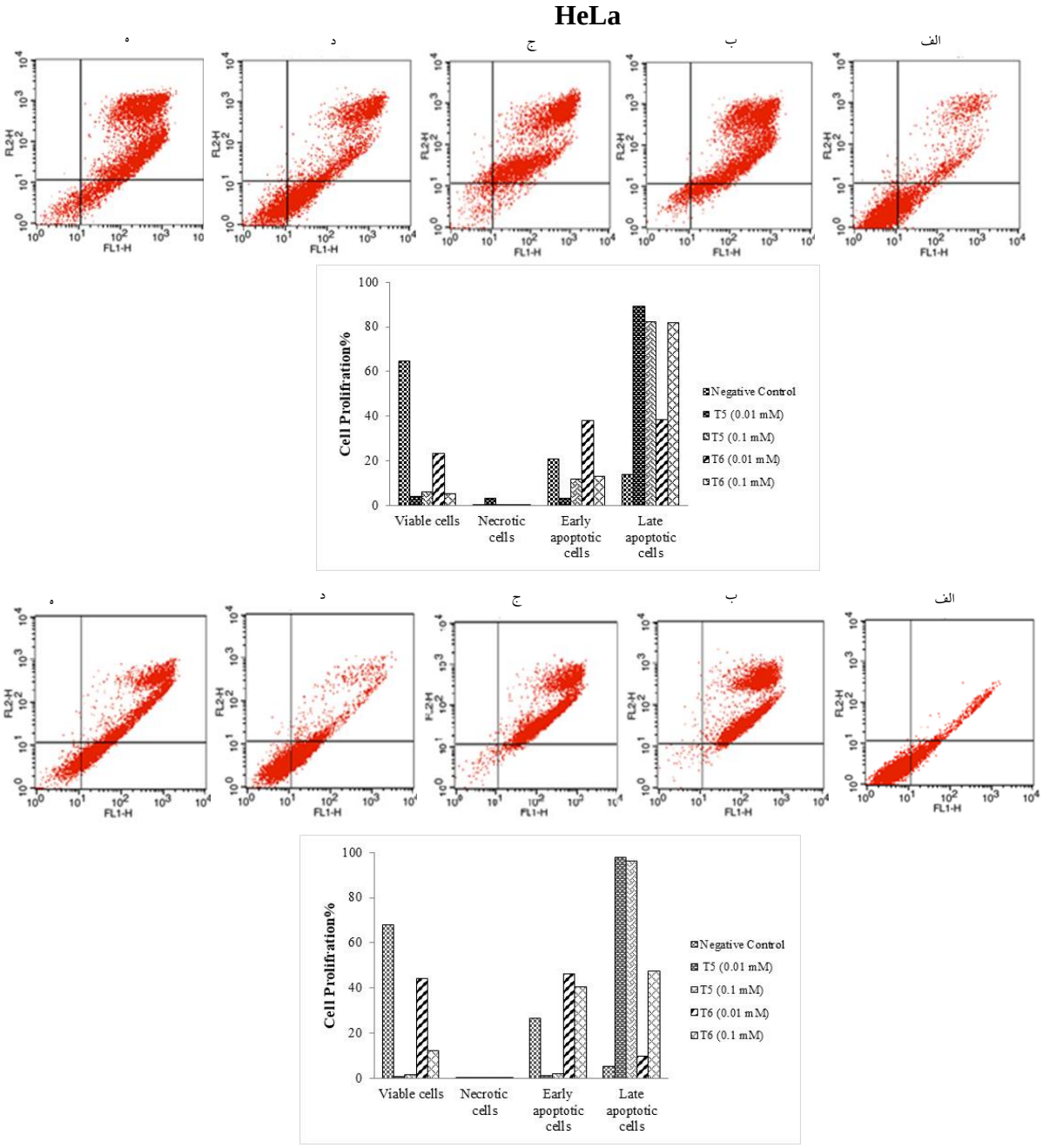
برای بررسی سمیت سلولی، شش ترکیب تترازول مورد مطالعه (T1-T6)، از تست MTT بر روی رده‌های سلولی HeLa و MCF-7 استفاده شد. ترکیبات T5 و T6 در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار سمیت نسبتاً خوبی علیه سلول‌های HeLa نشان دادند. به طوری که میزان زنده ماندن سلولی بعد از ٤٨ ساعت تیمار با این غلظت ٤٥ درصد بود. تیمار ۷۲ ساعته با همه‌ی ترکیبات، به جز T1 و T2، منجر به کاهش میزان زنده ماندن سلولی به زیر ۵۰ درصد شدند. ترکیبات مورد مطالعه سمیت بهتری علیه سلول‌های MCF-7 داشتند. ترکیبات T5 و T6 در هر دو بازه‌ی زمانی مورد مطالعه (٤٨ و ۷۲ ساعت) میزان سلول‌های زنده را به زیر ۵۰ درصد کاهش داد (شکل ۲).

ارزیابی فلوسایتومتری با کمک کیت AnnexinV/PI برای تعیین نوع مرگ سلولی القا شده توسط ترکیبات تترازول به کار گرفته شد. سلول‌های HeLa و MCF-7 با ۰۱/۱ میلی‌مولار (غلظت معادل IC_{50}) و ۰/۰۱ میلی‌مولار (غلظت غیرسمی) از ترکیبات منتخب T5 و T6 تیمار شدند. سلول‌های بدون تیمار به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. الگوی مرگ سلولی این دو رده‌ی سلولی تقریباً باهم مشابه بود (شکل ۳). بعد از تیمار با ترکیبات منتخب، میزان زنده ماندن سلولی کاهش پیدا کرد. جمعیت سلول‌های آپوپتوزی در مقایسه با کنترل افزایش نشان داد.

اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی ترکیبات مورد مطالعه علیه *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا آلبیکنس* بررسی شد. نتایج به‌صورت حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشندگی (MBC) در جدول ۱ گزارش شده‌اند. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برابر با ۰/۰٤ میلی‌مولار بود. ترکیبات T5 و T6 اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل توجهی نشان ندادند.



شکل ۲. اثر سایتوتوکسیک ترکیبات T1 تا T6 با غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ میلی‌مولار بر روی رده‌ی سلولی HeLa و MCF-7 در مدت ٤٨ و ۷۲ ساعت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند، معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد منفی در $P < ۰/۰۵$ می‌باشد و با علامت * مشخص شده است. همه‌ی تست‌ها سه بار تکرار شده‌اند.



شکل ۳. آنالیز مکانیسم مرگ سلولی در سلول‌های HeLa و MCF-7 در حضور ترکیبات تترازولی T5 وT6 (غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار) به مدت ۲۴ ساعت. (الف) شاهد منفی (سلول‌های MCF-7 بدون دارو). (ب) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار از ترکیب T5. (ج) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار از ترکیب T5. (د) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار از ترکیب T6. سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار از ترکیب T6.

بحث

تترازول‌ها، هتروسیکل‌های مهم دارویی هستند که در تعداد زیادی از داروهای تأیید شده توسط FDA مانند داروهای ضد فشارخون و آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند فلوموکسف (Flomoxef) و سفونیسید (Cefonicid) استفاده شده است (۲۱، ۲۲). همچنین ترکیبات هتروسیکلیک حاوی نیتروژن در داروهای شیمی‌درمانی در سرطان نیز به کار می‌روند. در این میان ساختارهای تترازولی به دلیل دارا بودن طیف وسیعی از اثرات بیولوژیکی و درمانی از ارزش خاصی برخوردار می‌باشند (۲۳). در این مطالعه، فعالیت ضدمیکروبی و سمیت سلولی شش ترکیب سنتزی جدید از تترازول به منظور مطالعه‌ی پتانسیل آن‌ها به عنوان عوامل درمانی بررسی شد.

جدول ۱. نتایج تعیین MBC و MIC ترکیبات تترازولی علیه *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا آلبیکنس*

ترکیبات	*Escherichia coli*		*Staphylococcus aureus*		*Candida albicans*	
	MBC (mM)	MIC (mM)	MBC (mM)	MIC (mM)	MBC (mM)	MIC (mM)
T1	۰/۱ ± ۲/۳	۰/۰۴ ± ۱/۲	۰/۱ ± ۳/۷	۰/۰۴ ± ۱/۴	۰/۱ ± ۳/۱۱	۰/۰۴ ± ۳/۱
T2	۰/۱ ± ۳/۰۲	۰/۰۴ ± ۲/۳	۰/۱ ± ۲/۱۱	۰/۰۴ ± ۱/۶	۰/۱ ± ۲/۲	۰/۰۴ ± ۰/۹۳
T3	۰/۱ ± ۲/۴	۰/۰۴ ± ۱/۷	۰/۱ ± ۰/۹۴	۰/۰۴ ± ۲/۷	۰/۱ ± ۱/۴	۰/۰۴ ± ۲/۷
T4	۰/۱ ± ۰/۹۲	۰/۰۴ ± ۱/۵۲	۰/۱ ± ۱/۲۹	۰/۰۴ ± ۲/۲	۰/۱ ± ۰/۹۸	۰/۰۴ ± ۲/۰۲
T5	Nb	Nb*	Nb	Nb	Nf	Nf**
T6	Nb	Nb	Nb	Nb	Nf	Nf

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. همه‌ی تست‌ها سه بار تکرار شده‌اند. *: Nb (non bactericidal، غیرکشنده برای باکتری)، **: Nf (non fungicidal، غیرکشنده برای قارچ).

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MBC: Minimum Bactericidal Concentration

بر اساس مطالعات قبلی، غلظت‌های مختلفی از ترکیبات سنتز شده تهیه و سپس اثر سایتوتوکسیک آن‌ها روی سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی نتایج حاصل از تست MTT روی رده‌ی سلولی HeLa مشخص شد که ترکیبات T5 و T6 که به ترتیب دارای استخلاف‌های متیل و آلدئید بودند در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار، اثرات سایتوتوکسیک نسبتاً خوبی داشتند به‌طوری که درصد زنده ماندن سلول‌ها در این غلظت و در زمان ۷۲ ساعت حدود ٤٥ درصد بود. در بررسی اثر ۷۲ ساعته ترکیبات، همه‌ی ترکیبات به‌جز ترکیب T1 و T2 درصد سلول‌های زنده را به زیر ۵۰ درصد رساندند، که در این خصوص می‌توان گفت اثر وابسته به زمان بوده است.

در بررسی ترکیبات سنتز شده روی رده‌ی سلولی MCF-7، ترکیبات T5 و T6 در هر دو زمان ٤٨ و ۷۲ ساعت، درصد سلول‌های زنده به زیر ۵۰ درصد تقلیل دادند. در واقع این ترکیبات اثر بهتری روی سلول‌های MCF-7 از خود نشان دادند. از طرف دیگر ترکیبات در غلظت بالاتر، اثر سایتوتوکسیک بیشتری روی سلول‌های سرطانی داشتند و لذا اثرات وابسته به غلظت ارزیابی گردید. مطالعات پیشین بر روی تترازول‌های حاوی حلقه‌ی بنزنی، نشان می‌دهد که وجود گروه هالوژن روی حلقه‌ی بنزنی این ترکیبات، اثرات سایتوتوکسیک آن‌ها را افزایش می‌دهد که این خاصیت به افزایش لیپوفیلیسیته این ترکیبات نسبت داده شده است (۱).

همچنین وجود گروه متیل بر روی حلقه‌ی بنزنی فعالیت سایتوتوکسیسیتی را به دلیل افزایش درگیری با گیرنده و یا افزایش لیپوفیلیسیته افزایش می‌دهد (۹). در همین راستا ترکیب T5 به دلیل داشتن گروه متیل اثر سایتوتوکسیک خوبی را روی هر دو رده‌ی سلول سرطانی از خود نشان داد.

حضور استخلاف نیترو در اغلب موارد باعث افزایش خاصیت سایتوتوکسیک می‌شود. ترکیب T4 به دلیل داشتن گروه نیترو اثر سایتوتوکسیک خوبی روی سلول‌های HeLa داشت که این اثر به بهبود درگیری با گیرنده و افزایش لیپوفیلیسیته ترکیب نسبت داده شد (۱، ٢٤). در مطالعات گذشته مشخص گردید که وجود گروه آلدئید بر روی حلقه‌ی بنزنی مشتقات تترازول‌ها، اثر سایتوتوکسیک آن‌ها را افزایش می‌دهد. در اینجا هم ترکیب T6 که دارای گروه آلدئید است، اثر خوبی روی سلول‌های سرطانی داشت (۹).

تترازول‌ها تاکنون در طراحی انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند فلوموکسف و سفونیسید مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که مشتقات تترازول‌ها می‌توانند به‌طور مؤثری مانع از سنتز پروتئین‌های میکروبی به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مختلف شوند که نشان‌دهنده‌ی پتانسیل بالای ترکیبات تترازولی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی جدید است (۲۲).

تحقیق و توسعه‌ی عوامل ضدمیکروبی قدرتمند و مؤثر نشان‌دهنده‌ی پیشرفت در درمان بیماری‌ها و همچنین پیشگیری از برخی از عوارض عفونی روش‌های درمان سرطان مانند شیمی‌درمانی و جراحی است. در سال‌های اخیر مسأله‌ی مقاومت میکروبی به عوامل ضدمیکروبی تبدیل به یک بحران شده است. این مسأله‌ی مهم و عمومی، تلاش برای توسعه‌ی عوامل ضدمیکروبی جدید مؤثر در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مقاوم را افزایش داده است. فارماکوفور آزول‌ها هنوز هم یک ساختار پایدار و مناسب برای سنتز عوامل ضدمیکروبی است. به همین دلیل برخی از تترازول‌ها خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی خوبی دارند.

ساختار اولیه‌ی مورد نیاز برای اثر ضدمیکروبی آزول‌ها، یک حلقه بنیادی ایمیدازولی یا تترازولی است که توسط یک پیوند NH به بقیه‌ی ساختار پیوند خورده است.

در مطالعه‌ی Ahamed و همکاران مشخص شد که ترکیبات تترازولی ۱b و ۲b و ۱c، اثر ضدباکتری خوبی دارند. ترکیب اول و دوم به دلیل داشتن گروه کلر، اثر ضدمیکروبی مناسبی علیه *اشریشیا کلای* و ترکیب سوم به دلیل داشتن گروه هیدروکسیل، اثر ضدمیکروبی خوبی

علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان دادند. ضمناً در همین مطالعه مشخص شد که وجود کلر روی حلقه‌ی بنزنی، اثرات ضدقارچی را علیه *کاندیدا آلبیکنس* افزایش می‌دهد (۲٤).

حضور گروه هالوژن و یا هیدروکسیل روی حلقه‌ی بنزنی، باعث افزایش اثر ضدمیکروبی می‌شود. اگرچه ترکیبات دارای استخلاف متیل نیز اثر ضدقارچی مناسبی داشتند (۲۵، ۲٦). در مطالعه‌ی دیگری، ترکیبات تترازولی با زنجیره‌های آلکیلی متفاوت و گروه‌های هالوژنی مختلف سنتز و مورد بررسی ضدمیکروبی قرار گرفته است و نتایج نشان داد که ترکیبات با داشتن گروه متوکسی و یا کلر اثر ضدمیکروبی خوبی علیه تمام باکتری‌ها از خود نشان داده‌اند. همچنین ترکیبات دارای گروه کلر و یا گروه آلکیل اثر ضدقارچی خوبی از خود نشان داده‌اند (۲۲).

در مطالعات ما نیز مشخص شد که ترکیبات T1، T2، T3 و T4 که به ترتیب دارای استخلاف‌های متوکسی، هیدروکسیل، برم و نیترو بودند، اثرات ضدقارچی خوبی علیه *کاندیدا آلبیکنس* و اثرات ضدباکتری مناسبی علیه *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند و در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار خاصیت باکتری‌کشندگی (Bactericide) از خود نشان دادند؛ اما ترکیبات T5 و T6 که دارای استخلاف‌های متیل و آلدئید بودند، در بروز اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی ضعیف‌تر بودند.

نتیجه‌گیری

ترکیبات حاوی حلقه‌های هتروسیکلیک خصوصاً حلقه‌های غنی از نیتروژن از جمله تترازول‌ها، می‌توانند اثرات امیدبخشی در مطالعات ضدمیکروبی، ضدقارچی و سایتوتوکسیک از خود بروز دهند که در این راستا مطالعه‌ی بیشتر بر روی گروه‌های فارماکوفور و استخلافات روی این حلقه‌ها می‌توانند مطالعات را به سمت سنتز ترکیبات مؤثرتر از قبل هدایت نموده تا با توأم نمودن نتایج حاصل از روش رابطه ساختار- فعالیت (Structure-Activity Relationship) SAR و مطالعات طراحی بتوان مشتقاتی از تترازول‌ها طراحی کرد که از نظر داشتن خواص ضدمیکروبی و سایتوتوکسیک قوی‌تر و هدفمندتر از قبل عمل نمایند.

پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده، اثر سمیت سلولی روی سایر رده‌های سلولی و اثر ضد میکروارگانیسمی روی میکروب‌های استاندارد مانند سودوموناس آئروژینوزا انجام گیرد. همچنین، بررسی برهمکنش ترکیبات سنتز شده با رسپتورهای سطحی سلول به وسیله‌ی نرم‌افزار Auto Dock می‌تواند درک بهتری از چگونگی فعالیت این ترکیبات و بهبود آن‌ها برای اتصالات بهتر ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی مقطع دکترای عمومی رشته‌ی داروسازی با شماره‌ی ۳۹۸۳۱۸ می‌باشد که در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب شد و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات کارشناسان آزمایشگاه تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Kaplancikli ZA, Yurttaş L, Özdemir A, Turan-Zitouni G, Işcan G, Akalın G, et al. Synthesis, anticandidal activity and cytotoxicity of some tetrazole derivatives. J Enzyme Inhib Med Chem 2014; 29(1): 43-8.
2. Bodey GP. Azole antifungal agents. Clinical Infectious Diseases. 1992; 14(Suppl 1): S161-S169.
3. Zarubaev VV, Golod EL, Anfimov PM, Shtro AA, Saraev VV, Gavrilov AS, et al. Synthesis and anti-viral activity of azolo-adamantanes against influenza A virus. Bioorg Med Chem 2010; 18(2): 839-48.
4. Bepary S, Das BK, Bachar SC, Kundu JK, Rouf ASS, Datta BK. Anti-inflammatory activity of indanyltetrazole derivatives. Pak J Pharm Sci 2008; 21(3): 295-8.
5. Momenzadeh M, Jamshidzadeh A, Khabnadideh S, RezaHeidari UN, Zamani L. Synthesis and Anticonvulsant Activity of 5-Substituted 1h-Tetrazoles against Pentylenetetrazole-Induced Seizures. Int J Adv Biotechnol Res 2017; 8(2): 1144-53.
6. Varadaraji D, Suban SS, Ramasamy VR, Kubendiran K, Raguraman JSK, Nalilu SK, et al. Synthesis and evaluation of a series of 1-substituted tetrazole derivatives as antimicrobial agents. Organic Communications 2010; 3(3): 45-56.
7. Li R, Mao Z, Chen L, Lv H, Cheng J, Zhao B. Vibrational spectroscopy and density functional theory study of 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2015; 135: 1-6.
8. Kabi AK, Sravani S, Gujjarappa R, Garg A, Vodnala N, Tyagi U, et al. An overview on biological evaluation of tetrazole derivatives. In: Thakur VK, Editor. Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials. Berlin, Germany: Springer; 2022. p. 307-49.
9. Wei CX, Bian M, Gong GH. Tetrazolium compounds: synthesis and applications in medicine. Molecules 2015; 20(4): 5528-53.
10. Sharma MC, Kohli DV. Probing the structural requirements for angiotensin II receptor: molecular modeling studies. Netw Model Anal Health Inform 2018; 7: 1-8.
11. Umarani N, Ilango K, Singh NK. A facile design and efficient synthesis of schiff's bases of tetrazolo [1, 5-a] quinoxalines as potential anti-inflammatory and anti-microbial agents. Der Pharma Chemica 2010; 2(1): 159-67.

12. Mohite PB, Bhaskar VH. Synthesis and antifungal activity of 3-aryl-1-(5-phenyl-1H-tetrazol-1-yl) prop-2-en-1-One. Orbital: Electron J Chem 2011; 2(3): 311-5.
13. Zhang J, Wang S, Ba Y, Xu Z. Tetrazole hybrids with potential anticancer activity. Eur J Med Chem 2019; 178: 341-51.
14. Gorle S, Maddila S, Maddila SN, Naicker K, Singh M, Singh P, et al. Synthesis, molecular docking study and in vitro anticancer activity of tetrazole linked benzochromene derivatives. Anticancer Agents Med Chem 2017; 17(3): 464-70.
15. Kumar CNSSP, Parida DK, Santhoshi A, Kota AK, Sridhar B, Rao VJ. Synthesis and biological evaluation of tetrazole containing compounds as possible anticancer agents. Med Chem Commun 2011; 2: 486-92.
16. Dhiman N, Kaur K, Jaitak V. Tetrazoles as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. Bioorg Med Chem 2020; 28(15): 115599.
17. Verma A, Kaur B, Venugopal S, Wadhwa P, Sahu S, Kaur P, et al. Tetrazole: A privileged scaffold for the discovery of anticancer agents. Chem Biol Drug Des 2022; 100(3): 419-42.
18. Popova EA, Protas AV, Trifonov RE. Tetrazole derivatives as promising anticancer agents. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2017; 17(14): 1856-68.
19. Maleki L, Sadeghian-Rizi T, Ghannadian M, Sanati MH, Shafizadegan S, Sadeghi-Aliabadi H. Antibacterial activity of Azadirachta indica leaf extracts against some pathogenic standards and clinical bacterial isolates. Avicenna J Clin Microb Infec 2017; 5(1): 12987.
20. Costa LSd, Andreazza NL, Correa WR, Cunha IBdS, Ruiz ALTG, Carvalho JEd, et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and chemical composition of extracts from the leaves and stem of Chresta sphaerocephala. Revista Brasileira de Farmacognosia 2015; 25(4): 369-74.
21. Andrassy K, Koderisch J, Gorges K, Sonntag H, Hirauchi K. Pharmacokinetics and hemostasis following administration of a new, injectable oxacephem (6315-S, flomoxef) in volunteers and in patients with renal insufficiency. Infection. 1991; 19(5): S296-S302.
22. Dai LL, Zhang HZ, Nagarajan S, Rasheed S, Zhou CH. Synthesis of tetrazole compounds as a novel type of potential antimicrobial agents and their synergistic effects with clinical drugs and interactions with calf thymus DNA. MedChemComm 2015; 6(1): 147-54.
23. Taylor AP, Robinson RP, Fobian YM, Blakemore DC, Jones LH, Fadeyi O. Modern advances in heterocyclic chemistry in drug discovery. Org Biomol Chem 2016; 14(28): 6611-37.
24. Ahamed A, Arif IA, Moydeen M, Kumar RS, Idhayadhulla A. In-vitro antibacterial and cytotoxicity evaluation of some novel tetrazole derivatives. Int J Pharm Sci Res 2018; 9(8): 3322-7.
25. Gao F, Xiao J, Huang G. Current scenario of tetrazole hybrids for antibacterial activity. Eur J Med Chem 2019; 184: 111744.
26. Wang SQ, Wang YF, Xu Z. Tetrazole hybrids and their antifungal activities. Eur J Med Chem 2019; 170: 225-34.

DOI: *10.48305/jims.v41.i705.0018*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 705, 1st Week, April 2023**

Received: 25.12.2022 Accepted: 25.01.2023 Published: 27.03.2023

Investigation of Biological Effects of New Tetrazole Compounds on Cancer Cell Lines (HeLa, MCF-7) and Common Microorganisms (*Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli, Candida Albicans*)

Hojjat Sadeghi-Aliabadi[1], Mina Mirian[2], Sajad Alinia[3], Maryam Abbasi[4]

Original Article

Abstract

Background: Tetrazole compounds have various effects such as antiviral, anti-bacterial, anti-fungal, anti-inflammatory, anticonvulsant and anti-cancer effects. To introduce new therapeutic options, we examined the biological effects of several newly synthesized tetrazoles in order to address the lack of effectiveness and the incidence of drug resistance.

Methods: Pre-synthesized tetrazole compounds were solubilized in appropriate solvent and then cytotoxic at concentrations of 0.1, 0.01 and 0.001 mM on HeLa and MCF-7 cell lines using MTT assay. The antimicrobial activity of these compounds was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of the compounds.

Findings: Evaluation of studied compounds showed significant toxicity against HeLa and MCF-7 cell lines. On the other hand, all compounds except compounds 5 and 6 that had methyl and aldehyde groups respectively, showed good antimicrobial activity against selected microorganisms.

Conclusion: Results of cytotoxic studies performed on the HeLa cell line shows that none of the compounds could reduce the percentage of living cells below 50% after 48 hours, while within 72 hours, all compounds except 1 and 2 (respectively with methoxy and hydroxyl groups) were reduced cell viability below 50. In the study of antimicrobial effects, 1, 2, 3 and 4 showed 0.04 µM and 0.1 mM for MIC and MBC, respectively, which illustrated relatively proper antibacterial effects against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and antifungal effect against *Candida albicans*.

Keywords: Tetrazole; Antineoplastic agents; Anti-microbial agents; Cytotoxicity

Citation: Sadeghi-Aliabadi H, Mirian M, Alinia S, Abbasi M. **Investigation of Biological Effects of New Tetrazole Compounds on Cancer Cell Lines (HeLa, MCF-7) and Common Microorganisms (*Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli, Candida Albicans*).** J Isfahan Med Sch 2023; 41(705): 18-26.

1- Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Pharmacist, Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran
Corresponding Author: Mina Mirian, Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: mina.mirian@pharm.mui.ac.ir