

سنتز و بررسی اثر بخشی آنالوگ های جدید داروی 4 - کلرو آمودیاکین علیه دوفرم حساس و مقاوم به کلروکین پلاسمودیوم فالسیپاروم در محیط *In vitro*

افرا خسروی¹، اقباله اسدالهی²، پروفیسور پل او نیل³

1- استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، مدیر امور پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ایلام

2- کارشناس ارشد شیمی دارویی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

3- مدیریت گروه، شیمی دارویی، دانشکده شیمی، دانشگاه لیورپول

یافته / دوره دهم / شماره 4 / زمستان 87 / مسلسل 38

چکیده

دریافت مقاله: 87/12/12، پذیرش مقاله: 87/12/25

مقدمه: مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم به کلروکین به یکی از مشکلات عمده بهداشتی در کشورهای در حال توسعه تبدیل شده است. آمودیاکین یکی از ترکیبات 4-آمینوکلینولین است که علیه بسیاری از فرمهای مقاوم به کلروکین موثر است، اما بهر حال استفاده کلینیکی از آمودیاکین به جای کلروکین به شدت محدود شده است زیرا این دارو دارای اثرات هپاتوکسیکی و آگرانولوسیتوزی در مصرف کنندگان می باشد.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر آنالوگ های ایزومریک آمودیاکین در یک روش چهار مرحله ای تولید شده و علیه فرمهای پلاسمودیوم فالسیپاروم TM6 (مقاوم به کلرکین) و HB3 (حساس به کلروکین) بصورت *in vitro* آزمایش گردیده اند. انگل مالاریا بر اساس روش اصلاح شده Jensen و Trager برای کشت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در گلبولهای قرمز انسان کشت داده شد. بر اساس این روش پلاسمودیوم فالسیپاروم در محیط کشت مداوم که حاوی گلبولهای قرمز گروه خونی O انسان در محیط کشت RPMI 1640 باضافه 10 درصد سرم AB انسانی و با استفاده از گاز ترکیبی که حاوی 3 درصد دی اکسید کربن، 6 درصد اکسیژن و 91 درصد نیتروژن بود در 37 درجه سانتیگراد نگهداری شد.

یافته ها: چندین آنالوگ 4-کلرو آمودیاکین فعالیت ضد مالاریایی قوی به صورت *in vitro* علیه هر دو فرم مقاوم و حساس پلاسمودیوم فالسیپاروم نشان داده اند. آنالوگهای 5b، 5c و 5i نه تنها در مقیاسهای نانومولار فعالیت ضد انگلی قوی داشته اند بلکه مقاومت متقاطع خیلی کمتری از خود نیز نشان داده اند. اثرات ضد پلاسمودیوم فالسیپاروم این آنالوگها علیه فرم حساس به کلروکین HB3 بسیار عالی تر از کلروکین بود و تا حدودی نسبت به آمودیاکین نیز ارجحیت داشته اند اگر چه با افزایش طول زنجیره جانبی این اثرات رو به کاهش می گذاشت مثلاً در مورد آنالوگهای دی بوتیل و نیز آنالوگهای پیریدین (5g و 5j) این اثرات قابل توجه بوده است.

بحث و نتیجه گیری: در یک فرایند چهار مرحله ای 10 آنالوگ مختلف کلروآمودیاکین ساخته شد که به صورت *in vitro* علیه گونه های مقاوم و حساس به کلروکین پلاسمودیوم فالسیپاروم اثرات امیدوارکننده ای نشان دادند. یکی از مشکلات 4-آمینوکلینولینها داشتن واکنش مقاومتی متقاطع با کلروکین علیه فرمهای مقاوم به کلروکین پلاسمودیوم فالسیپاروم است که خوشبختانه بیشتر این آنالوگها چنین مقاومتی را در مقیاسهای بسیار ناچیزی نشان دادند. اگر چه چنین نتایجی دلگرم کننده است ولی مطالعات بیشتری لازم است تا اثرات ضد مالاریایی این آنالوگها علیه ایزوله های بیشتری از انگل مالاریا آزمایش گردد.

واژه های کلیدی: آنالوگهای جدید، ضد مالاریا، پلاسمودیوم فالسیپاروم، کلروکین، آمودیکین

آدرس مکاتبه: ایلام، بان گنجاب، معاونت آموزشی و پژوهشی، مدیریت پژوهش و اطلاع رسانی دانشگاه علوم پزشکی ایلام

پست الکترونیک: afrakhosravi@yahoo.co.uk

مقدمه

مقاومت پلاسمودیوم فالسیپاروم به کلروکین به یکی از مشکلات عمده بهداشتی در کشورهای در حال توسعه تبدیل شده است (1و2). این مقاومت به داروی طلایی ضد مالاریا باعث بوجود آمدن تیمهای بزرگ تحقیقاتی در سرتاسر دنیا و روی آوردن به ساخت و آزمایش داروهای جایگزین گردیده است به گونه ای که داروی جدید بتواند علیه فرم های انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم مقاوم به کلروکین پاسخ موثری ایجاد نمایند (2). آمودیاکین یکی از ترکیبات 4- آمینو کینولین است که علیه بسیاری از فرمهای مقاوم به کلروکین موثر است (1). اما بهر حال استفاده کلینیکی از آمودیاکین به جای کلروکین به شدت محدود شده است زیرا این دارو اثرات هپاتوکسیکی و آگرانولوسیتوزی ایجاد می کند (5-7).

پاراستامول (4- هیدرکسی استانیلید) دارای یک ماهیت p-hydroxyanilino است که معتقدند با واسطه P450 کاتالیز شده و یک کینون آمینی فعال از نظر شیمیایی ایجاد می کند (8). آمودیاکین نیز دارای چنین ماهیتی است به گونه ای که در شرایط *in vivo* یک کینون آمین آمودیاکین (AQI) که گلوکاتایون را به عنوان کونژوگه در بردارد را در داخل مجاری صفراوی ایجاد می کند (9و10). تشکیل چنین گونه های واکنش دهنده و ترکیب آن با ماکرومولکولها می تواند فعالیت سلول را به صورت مستقیم یا با واسطه مکانیسم های ایمونولوژیکی تحت تاثیر قرار دهد.

در بیمارانی که پاسخ نامطلوب به آمودیاکین نشان داده اند پاسخ ایمونولوژیکی از نوع IgG تشخیص داده شده است. در مورد پاراستامول افزودن فلورین به هسته آروماتیک دارو قدرت اکسیداسیون مولکول را افزایش داده و لذا مانع تبدیل مولکول به یک کینون آمین سیتوتوکسیک بصورت *in vivo* می گردد.

در مکانیسم مشابهی همکاری اتمهای فلورین با زنجیر جانبی 4-hydroxyanilino آمودیاکین، ترکیباتی با قدرت

اکسیداتیو پایدارتر و متابولیکی بالاتری بوجود می آورد. مطالعات قبلی نشان داده است که جایگزینی گروه 4- هیدروکسیل با اتم 4- فلورین آنالوگی از آمودیاکین ایجاد می کند بنام فلورو آمودیاکین که قدرت ضد مالاریایی بالایی در مقایسه با داروهای مقاوم به کلروکین حتی در مقادیر نانو مولار دارا می باشد (11و13). با جایگزینی زنجیره های جانبی 3' هیدروکسیل و 4- ما نیک آمودیاکین، آنالوگ هایی جدید تولید می گردد که فاقد خاصیت سمی متابولیت های دارو از طریق P450 می شود (3).

در مطالعه حاضر آنالوگ های ایزومریک آمودیاکین در یک روش چهار مرحله ای تولید شده و علیه فرمهای پلاسمودیوم فالسیپاروم TM6 (مقاوم به کلرکین) و HB3 (حساس به کلروکین) بصورت *in vitro* آزمایش گردیده اند.

مواد و روش ها

الف) شیمی دارو

ابتدا با استفاده از رادیکال آزاد برومی 2- فلورو-5- نیتروتولون جامد کریستالی بنزیل بروماید ساخته شد (شکل 1). این ترکیب با یک دی اتیل آمین واکنش داده و ماده 6 ساخته شد. ماده 6 در یک واکنش کاهنده با استفاده از HCl/tin به ماده بعدی تبدیل شد و سپس یک جانشینی در هسته آروماتیک با استفاده از 4- کلرین از 4و7- دی کلروکینولین برای حصول ماده 5-a صورت گرفت (شکل 2).

ب) کشت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم

انگل مالاریا بر اساس روش اصلاح شده جنسن و تراگر (14) برای کشت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در گلبولهای قرمز انسان کشت داده شد. بر اساس این روش پلاسمودیوم فالسیپاروم در محیط کشت مداوم که حاوی گلبولهای قرمز گروه خونی O انسان در محیط کشت 1640 RPMI باضافه 10 درصد سرم AB انسانی و با استفاده از گاز ترکیبی 3 درصد دی اکسید کربن، 6 درصد اکسیژن و 91

منتقل و پس از 24 ساعت نگهداری در 37 درجه، به روی فیلترهای مخصوص منتقل و به مدت یک ساعت در دمای 55 درجه خشک شدند. شمارش انگلهای دارای هیپوگزانتین با استفاده از دستگاه Wallac 1450 Microbeta Trilux Liquid Scintillation and Luminescence Counter صورت گرفت.

یافته ها

فعالیت ضد مالاریایی دارو علیه پلاسمودیوم فالسیپاروم

آزمایشات اولیه روی فرم حساس پلاسمودیوم فالسیپاروم (HB3) و فرم مقاوم آن (TM6) انجام گردید و هر دو آنالوگ آمودیاکین در آزمایشگاه دانشکده طب؟؟ لیورپول (Liverpool School of Tropical Medicine) بر روی محیط کشت انگل های پلاسمودیوم فالسیپاروم مورد آزمایش قرار گرفت. داده های مربوط به فعالیت ضد مالاریایی 4- کلرو آمودیاکین در جدول شماره 1 خلاصه شده است. چندین آنالوگ 4- کلرو آمودیاکین فعالیت ضد مالاریایی قوی به صورت *in vitro* علیه هر دو فرم مقاوم و حساس پلاسمودیوم فالسیپاروم نشان داده اند. آنالوگهای 5b، 5c و 5i نه تنها در مقیاسهای نانومولار فعالیت ضد انگلی قوی داشته اند بلکه مقاومت متقاطع خیلی کمتری از خود نیز نشان داده اند. اثرات ضد پلاسمودیوم فالسیپاروم این آنالوگها علیه فرم حساس به کلروکین HB3 بسیار عالی تر از کلروکین بود و تا حدودی نسبت به آمودیاکین نیز ارجحیت داشته اند اگر چه با افزایش طول زنجیره جانبی این اثرات رو به کاهش می گذاشت مثلاً" در مورد آنالوگهای دی بوتیل و نیز آنالوگهای پیریدین (5g و 5j) این اثرات قابل توجه بوده است که قابل توجه دیگران هم بوده است (16و 17 و 18).

جدول 1. فعالیت ضد مالاریایی داروی جدید 4- کلرو آنالوگهای آمودیاکین علیه دو فرم حساس و مقاوم به کلروکین پلاسمودیوم فالسیپاروم.

درصد نیتروژن بود در 37 درجه سانتیگراد نگهداری شد. انگلهای پلاسمودیوم فالسیپاروم شروع به تولید مثل غیر جنسی طی 48 ساعت پس از کشت دادن کردند اما مدت کوتاهی پس از این تولید مثل اولیه شروع به تولید مرحله های یکسان مثل شیزونت کردند. (15). برای ایجاد فرمهای مرحله رینگ (Synchronization) از 5 درصد سوربیتول استفاده گردید. کلیه مراحل انجام کار در زیر هودهای (Laminar flow) انجام شده و همه وسایل و تجهیزات مورد استفاده استریل شده و محیطهای کشت با استفاده از فیلترهای 0/22 میکرومتر قبل از استفاده استریل شدند. معمولاً 0/5 میلی لیتر RBC برای یک فلاسک کشت های 25cm² و یا 15 میلی لیتر برای فلاسک های 80cm² استفاده گردید. فلاسکها در یک حالت ایستا به گونه ای نگهداری می گردید تا یک لایه سلول در سطح تحتانی آن تشکیل شود و هر روز محیط کشت آنان عوض می گردید. محیطها به مدت 60 ثانیه هوادهی شده و هر 3 الی 4 روز یکبار با استفاده از RBC تازه رقیق می گردید. برای چک کردن پارازیتمی هر روز گسترش خونی تهیه و پارازیتمی ثبت می گردید.

آزمایش فعالیت آنالوگهای جدید 4- کلرو آمودیاکین

علیه انگل *in vitro*

غلظت اولیه دارو به صورت 100 درصد با DMSO (Dimethylsulphoxide) آماده گردید و غلظتهای مناسب برای تست با استفاده از محیط کشت کامل فراهم گردید. آزمایش با استفاده از 10 µl دارو برای هر خانه، در پلیت های استریل 96 خانه ای که هر خانه حاوی 200 µl از محیط حاوی انگل با پارازیتمی 2 درصد و هماتوکریت 0/5 درصد بود در مقایسه با گروه کنترل که حاوی رشد کامل انگل بدون حضور دارو بود انجام گردید. هر رقت دارو در سه خانه تکرار می گردید (Triplicate). بعد از 24 ساعت انکوبه کردن در 37 °C، 0/5 µl از Ci hypoxanthine به محیط کشت هر کدام از چاهک ها اضافه گردید. محیطهای کشت به انکوباتور

vitro علیه گونه های مقاوم و حساس به کلروکین پلاسمودیوم فالسیپاروم اثرات امیدوارکننده ای نشان دادند. یکی از مشکلات 4-آمینوکلینولینها داشتن واکنش مقاومتی متقاطع با کلروکین علیه فرمهای مقاوم به کلروکین پلاسمودیوم فالسیپاروم است که خوشبختانه بیشتر این آنالوگها چنین مقاومتی را در مقیاسهای بسیار ناچیزی نشان دادند. اگر چه چنین نتایجی دلگرم کننده است ولی مطالعات بیشتری لازم است تا اثرات ضد مالاریایی این آنالوگها علیه ایزوله های بیشتری از انگل آزمایش گردد.

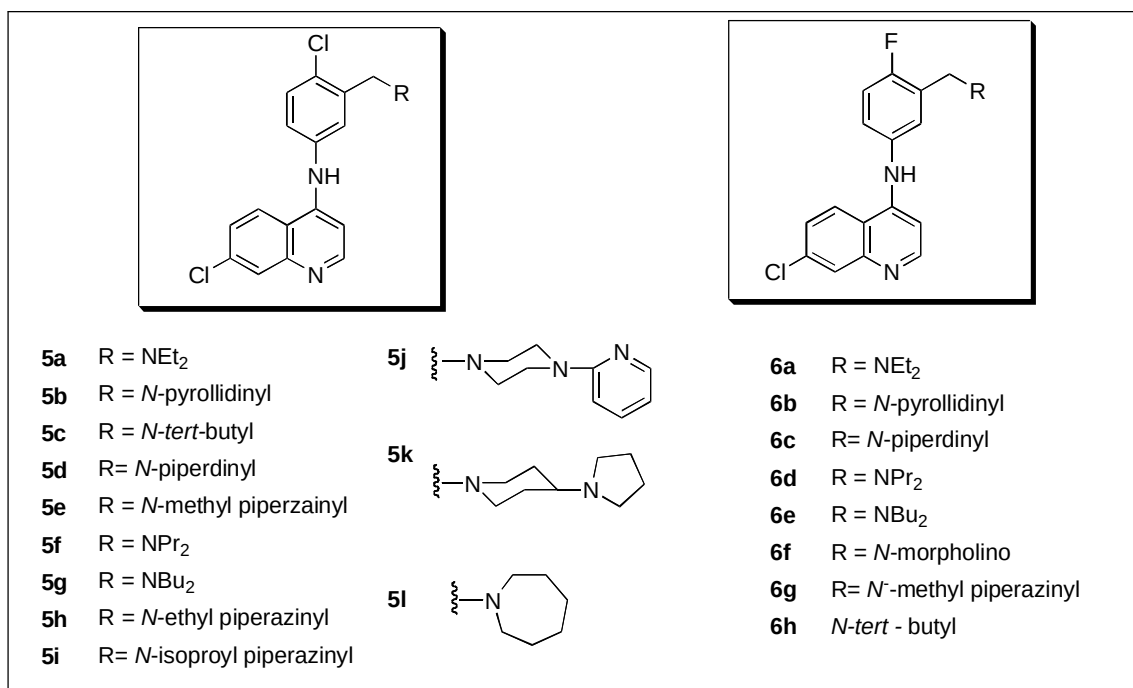
تشکر و قدردانی: بدینوسیله از مساعدتها و همکاری

معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام و تمامی کسانی که در انجام این طرح ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی میگردد.

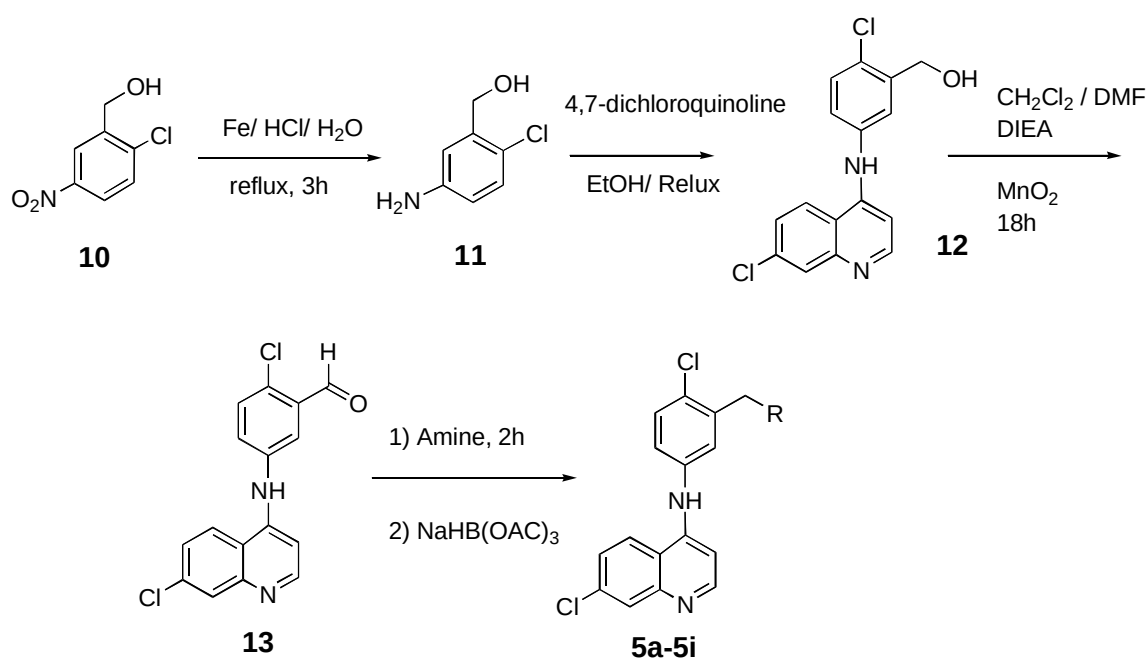
چند آنالوگ کلروآمودیاکین حداقل مقاومت علیه انگل فرم مقاوم TM6 نسبت به کلروکین از خود نشان دادند (جدول 1). اگر چه این اختلاف در مقاومت به دارو با انجام تست آماری Mann-Whitney-U test معنی دار نبوده ولی بهر حال ترکیبات 4- کلروآمودیاکین اثرات قوی ضد انگل مالاریا در آزمایش علیه انگل پلاسمودیوم به صورت in vitro نشان دادند و تعدادی از این آنالوگ ها فعالیتی حتی بهتر و یا برابر آمودیاکین از خود نشان دادند. از بین آنالوگ های ساخته شده آنالوگ 5b کاندیدای عالی برای استفاده علیه فرم های حساس و مقاوم پلاسمودیوم فالسیپاروم به کلروکین تشخیص داده شد.

بحث و نتیجه گیری

با اطلاع از سمیت متابولیکی آمودیاکین هدف مطالعه اخیر ساخت آنالوگهای جدید این دارو با استفاده از جایگزینی گروه 4-هیدروکسیل آمودیاکین با کلرین بوده است. از بین چنین آنالوگهایی می توان گروههای کاندید برای جایگزینی کلروکین معرفی نمود. در یک فرایند چهار مرحله ای 10 آنالوگ مختلف کلروآمودیاکین ساخته شد که به صورت in

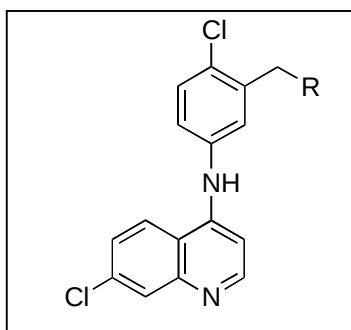


شکل ۱. ساختمان شماتیک آنالوگ های ۴- کلرو، ۴-فلوئورو آمودیاین



شکل ۲. نحوه ساخته شدن ۴- کلرو آنالوگ های آمودیاین

جدول ۱. فعالیت ضد مالاریایی داروی جدید ۴-کلرو آنالوگهای آمودیاین علیه دو فرم حساس و مقاوم به کلروکین پلاسمودیوم فالسیپاروم



Compound number	Side-chain	IC ₅₀ (nM) TM6	IC ₅₀ (nM) HB3
5a	R = NEt ₂	10.2 ± 5.3	12.3 ± 5.1
5b	R = <i>N</i> -pyrrolidinyl	4.2 ± 1.3	5.2 ± 3.7
5c	R = <i>N</i> - <i>tert</i> -butyl	3.0 ± 2.2	10.1 ± 3.2
5d	R = <i>N</i> -piperidinyl	9.4 ± 6.7	12.3 ± 3.2
5e	R = <i>N</i> -methyl piperazinyl	24.4 ± 4.8	54.5 ± 8.3
5f	R = NPr ₂	ND	ND
5g	R = NBu ₂	66.3 ± 11.3	144.3 ± 12.8
5h	R = <i>N</i> -ethyl piperazinyl	10.3 ± 4.3	9.6 ± 3.4
5i	R = <i>N</i> -isopropyl piperazinyl	6.45 ± 2.3	9.1 ± 2.1
5j		500 ± 22.4	485 ± 14.1
5k		360.3 ± 13.3	760 ± 23.3
5l		7.0 ± 1.2	16.1 ± 7.2
Chloroquine		75 ± 22.1	30.2 ± 10.1
Amodiaquine		7.2 ± 3.3	5.5 ± 3.2

^a TM6 is a chloroquine resistant strain of *P. falciparum*,

^b HB3 is chloroquine sensitive strain of *P. falciparum*

References

1. Foote S J; Cowman, A F. The Mode of Action and the Mechanism of Resistance to Antimalarial Drugs. *Acta Trop* 1994, 56, (2-3), 157-171.
2. Foley M; Tilley L, Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. *Pharmacol Ther* 1998, 79, (1), 55-87.
3. O'Neill P M; Mukhtar A; Stocks P A; Randle L E; Hindley S; Ward S A; Storr R C; Bickley J. F; O'Neil I A; Maggs J L; Hughes R H; Winstanley P A; Bray P G; Park B K, Isoquine and Related Amodiaquine Analogues: A New Generation of Improved 4-Aminoquinoline Antimalarials. *J Med Chem* 2003, 46, (23), 4933-4945.
4. O'Neill P M; Bray P G; Hawley S R; Ward S A; Park B K, 4-Aminoquinolines - Past, Present, and Future: A Chemical Perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 1998, 77, (1), 29-58.
5. Hawley S R; Bray P G; Oneill P M; Naisbitt D J; Park B K; Ward S A, Manipulation of the N-Alkyl Substituent in Amodiaquine to Overcome the Verapamil-Sensitive Chloroquine Resistance Component. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996, 40, (10), 2345-2349.
6. Neftel K A; Woodtly W; Schmid M; Frick P G; Fehr J, Amodiaquine Induced Agranulocytosis and Liver Damage. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986, 292, (6522), 721-723.
7. Lind D E; Levi J A; Vincent P C, Amodiaquine-Induced Agranulocytosis: Toxic Effect of Amodiaquine in Bone Marrow Cultures in vitro. *Br Med J* 1973, 1, (5851), 458-460.
8. Vermeulen N P; Bessems J G; Van de Straat R, Molecular Aspects of Paracetamol-Induced Hepatotoxicity and Its Mechanism-Based Prevention. *Drug Metab Rev* 1992, 24, (3), 367-407.
9. Jewell H; Ruscoe J E; Maggs J L; O'Neill P M; Storr R C; Ward S A; Park B K, The Effect of Chemical Substitution on the Metabolic Activation, Metabolic Detoxication, and Pharmacological Activity of Amodiaquine in the Mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 1995, 273, (1), 393-404.
10. O'Neill P M; Harrison A C; Storr R C; Hawley S R; Ward S A; Park B K, The Effect of Fluorine Substitution on the Metabolism and Antimalarial Activity of Amodiaquine. *Journal of Medicinal Chemistry* 1994, 37, (9), 1362-1370.
11. Harrison A C; Kitteringham N R; Clarke J B; Park B K, The Mechanism of Bioactivation and Antigen Formation of Amodiaquine in the Rat. *Biochem Pharmacol* 1992, 43, (7), 1421-1430.
12. Barnard S; Kelly D F; Storr R C; Park B K, The Effect of Fluorine Substitution on the Hepatotoxicity and Metabolism of Paracetamol in the Mouse. *Biochem Pharmacol* 1993, 46, (5), 841-849.
13. Desjardins R E; Canfield C J; Haynes J D; Chulay J D, Quantitative Assessment of Antimalarial Activity in vitro by a

- Semiautomated Technique. Antimicrob Agents Chemother 1979, 16, (6), 710-718.
14. Trager W Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976; 193:673-675.
15. Lambros C Vanderberg JP. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. J Parasitol 1979; 65:418-420.
16. Sanchez, C. P.; Stein, W.; Lanzer, M., Trans Stimulation Provides Evidence for a Drug Efflux Carrier as the Mechanism of Chloroquine Resistance in Plasmodium Falciparum. Biochemistry 2003, 42, 9383-9394.
17. Ursos L M B; Roepe P D, Chloroquine Resistance in the Malarial Parasite, Plasmodium Falciparum. Medicinal Research Reviews 2002, 22, 465-491.
18. Singh C; Malik H; Puri S K, Synthesis and Antimalarial Activity of a New Series of Trioxaquines. Bio Med. Chem. 2004, 12, 1177-1182.