

Hidrazon Yapısındaki On Farklı Bileşiğin Antileishmanial Aktivitesinin Araştırılması ^[1]

Şahin DİREKEL ¹ Ülkü KARAMAN ² Seda TEZCAN ³ Semra UTKU ⁴
Gönül ASLAN ³ Mehtap UYSAL ⁵ M. Fethi ŞAHİN ⁵ Nuran DELİALİOĞLU ³
Mahmut ÜLGER ⁶ Gürol EMEKDAŞ ³

^[1] 1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü sunum olarak sunulmuştur (12-16 Kasım 2011, Antalya)

¹ Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-28100 Giresun - TÜRKİYE; ² Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-52120 Ordu - TÜRKİYE; ³ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-33070 Mersin - TÜRKİYE; ⁴ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, TR-33070 Mersin - TÜRKİYE; ⁵ Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, TR-06100 Ankara - TÜRKİYE; ⁶ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-33070 Mersin - TÜRKİYE

Article Code: KVFD-2016-14967 Received: 06.01.2016 Accepted: 16.02.2016 Published Online: 16.02.2016

Özet

Leishmaniasis Türkiye ve dünyada önemli paraziter bir hastalıktır. Leishmaniasis tedavisinde sodyum stibogluconate, miltefosin, paramomisin, amfoterisin B ve pentamidin gibi anti-leishmanial ilaçlar kullanılmaktadır. Fakat leishmaniasisin kemoterapisinde kullanılan bu ilaçların nefrotoksik, hepatotoksik ve teratojenik yan etkileri görülebilmektedir. Ayrıca antimon bileşiklerine karşı direnç gelişmesi nedeniyle de yeni terapötik ajanların keşfedilmesi ve geliştirilmesine öncelik verilmesi gerektiği düşünülmüştür. Bu çalışmanın amacı, sentezlenmiş hidrazon yapısındaki on farklı bileşiğin (5a-5j) *Leishmania infantum* promastigotlarına karşı anti-leishmanial aktivitesinin mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmesidir. Hazırlanan hidrazon bileşikler, konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde RPMI-1640 besiyerlerine eklenmiş ve bileşiklerin mikropakta konsantrasyon aralığı 3 - 0.003 µg/ml olacak şekilde seri dilüsyonları yapılmıştır. Mikropaklarda mikrodilüsyon besiyeri yöntemi uygulanarak, üzerine hemositometrede hücre sayısı 2.5x10⁷ hücre/ml olacak şekilde ayarlanmış standart *Leishmania infantum* promastigotları eklenerek 27°C'de inkübe edilmiştir. Yirmi saat sonra mikropakların üzerine alamar mavisi eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. Promastigotların üremesi 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirilmiştir. Kuyucuklarda rengin maviden pembeye dönmesi parazitin ürettiği, rengin değişmeden kalması ise parazitin ümediği şeklinde değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, *Leishmania infantum* promastigotlarına karşı en etkili maddelerin 5e, 5g ve 5h bileşikler (MİK 0.187 µg/ml) olduğu, en etkisiz bileşiğin ise 5i bileşiği (MİK 3 µg/ml) olduğu saptanmıştır. Sentezlenen bileşiklerin ilaç olarak kullanılabilmesi için; gerekli olduğu düşünülen *in vitro* makrofaj kültüründe *Leishmania* amastigotlarına karşı etkinliği ve *in vivo* olarak deneysel hayvan modellerinde kontrol çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: *Leishmania infantum*, Hidrazon, Anti-leishmanial aktivite, Alamar mavisi

Investigation of Anti-leishmanial Activity of the Ten Different Hydrazone Derivatives

Abstract

Leishmaniasis is an important parasitic disease in Turkey and the world. Anti-leishmanial drugs such as sodium stibogluconate, miltefosine, paramomycin, amphotericin B, and pentamidine are used for the treatment of leishmaniasis. However, the drugs, used for the chemotherapy of leishmaniasis, have some side effects such as nephrotoxicity, hepatotoxicity, and teratogenicity. In addition, it is deemed that the discovery and development of the new therapeutic agents must be given priority due to the development of resistance against antimony compounds. The purpose of this study is detecting the anti-leishmanial activity of ten different synthesized hydrazone compounds against *Leishmania infantum* promastigotes via the microdilution method. The prepared hydrazone compounds, having the concentration of 6 µg/ml, were added to RPMI-1640 media and the dilution of the hydrazone derivatives was performed in the wells of microplates in the range of concentrations of 3 - 0.003 µg/ml. The microdilution broth method in the microplates was prepared, than the adjusted standard *Leishmania infantum* promastigotes, 2.5x10⁷ cells/mL, were added, into the mentioned microplates which was incubated in 27°C. Twenty h later, the alamar blue were added on the microplates and they were incubated for 4 h. The proliferation of promastigotes was evaluated in 24, 48, and 72 h. It was considered that changing the color from blue to pink in the wells were exhibiting the growth of parasites, while the unchanged color was not. The present study has revealed that the most effective substances against *Leishmania infantum* promastigotes were 5e, 5g, and 5h compounds (MIC 0.187 µg/ml) while the least effective compound was 5i (MIC 3 µg/ml). There is a need for further studies on *in vitro* activity against the *Leishmania* amastigotes in macrophages cultures and *in vivo* experimental animal models for the synthesized compounds showing anti-leishmanial effect in the present study.

Keywords: *Leishmania infantum*, Hydrazone, Anti-leishmanial activity, Alamar blue



İletişim (Correspondence)



+90 454 3103033



sdirekel@yahoo.com

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre; Afrika, Asya, Avrupa, Güney ve Kuzey Amerika'da toplam 98 ülke ve yerleşim yerinde yaklaşık 350 milyon insan leishmaniasis açısından risk altındadır ^[1]. Hastalık, Türkiye'nin de içerisinde yer aldığı Akdeniz havzasına kıyaslı olan ülkelerde, Ortadoğu ülkeleri, Hindistan ve Güney Amerika ülkelerinde ciddi bir sağlık problemi oluşturmaktadır ^[2,3]. Türkiye'de 2000-2014 yılları arasında toplamda 413 vaka bildirimini yapılmış olan visseral leishmaniasis (VL) enfeksiyonunun en önemli etkeni *Leishmania infantum*'dur ^[4]. En önemli etkeni *Leishmania tropica* olan kutanöz leishmaniasis (KL) vakaları 2000-2014 yılları arasında toplamda 29845 olarak rapor edilmiştir ^[4].

Parazit memeli vücuduna inoküle olurken, vektörün tükürüğündeki hyaluronidaz-maksadılan salgısı ile vazodilatör etki oluşturularak enjeksiyon bölgesinde temel immün engellerin hızla aşılması ve enfeksiyonun başlamasına yardımcı olur ^[5]. Promastigotların fagositozunu takiben, tutunma ve bağlanmada önemli rol oynayan parazit ürünleri ve virülans faktörleri, tekrar devreye girerek parazitin zarar görmeksizin makrofaj içinde yaşamasını ve çoğalmasını sağlarlar ^[5-8].

Leishmaniasis tedavisinde, sodyum stiboglukonat, miltefosin, paramomisin, amfoterisin B ve pentamidin gibi anti-leishmanial ilaçlar kullanılmaktadır ^[9]. Fakat leishmaniasisin kemoterapisinde kullanılan bu ilaçların etkileri oldukça sınırlıdır. Ayrıca bu ilaçların çoğunun nefrotoksik, hepatotoksik ve teratojenik etkiler başta olmak üzere ciddi yan etkileri bulunmaktadır ^[3,9,10]. Dünyada ve Türkiye'de KL ve VL'nin tedavisinde birincil ilaç olarak kullanılan beş değerli antimon türevleri, sodyum stiboglukonat (Pentostam®) ve megluminantimoniat (Glucantime®) 1940 yılında geliştirilmiş, ancak bu ilaçlara karşı direnç geliştiği, araştırmacılar tarafından bildirilmiştir ^[6,11-14].

Hastalığa karşı etkili bir profilaktik aşının bulunmaması, mevcut kullanılan ilaçların toksik etkileri ve bu ilaçlara karşı direncin giderek artması nedeniyle yeni terapötik ajanların keşfedilmesi ve geliştirilmesine öncelik verilmesi gerektiği bildirilmiştir ^[10,15].

Antiparaziter tedavilerde kullanılan hidrazon türevi bileşikler; aldehit veya ketonların, hidrazin veya alkilhidrazinler ile kondansasyon reaksiyonunun sonucunda sentez edilen ve kimyasal yapısı (-C=N-NH-) grubu olan bileşik sınıfının genel adıdır. Hidrazon grubunun farmakolojik ve biyolojik olarak aktif bileşiklerin merkezinde yer alması, pek çok araştırmaya ve yeni ilaç geliştirme sürecine kaynak oluşturmuştur. Hidrazonların anti-mikrobiyal, anti-tüberküler, anti-konvülzan, analjezik, anti-enflamatuvar, pıhtılaşmayı önleyici ve tümörler, virüsler ve malaryaya karşı etkinliklere sahip olduğu rapor edilmiştir ^[16,17].

Bu araştırmada alamar mavisi mikrodilüsyon yöntemi

ile aksenik kültürde VL etkeni olan *L. infantum* promastigot izolatları kullanılarak, sentezlenmiş 6-sübstitüe-3(2H)-pridazinon-2-asetil-2-(sübstitüe/nonsübstitüesetofenon) hidrazon yapısındaki on adet farklı bileşiğin (5a-5j) anti-leishmanial aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada standart aksenik *L. infantum* şuşları, hidrazon yapısındaki on farklı bileşik ve standart ilaç olarak amfoterisin B kullanılmıştır.

Leishmania Promastigotlarının Hazırlanması

Çalışmada aksenik standart *L. infantum* (MHOM/TN/19-80/IPT1) suşu kullanılmıştır. Temin edilen suşlar, içerisine %10 Fetal Bovin Serum (FBS F4135 Sigma-Aldrich USA), %1 Penisilin (P3032 Sigma-Aldrich USA) ve Streptomisin (S9137 Sigma-Aldrich USA) (100.000 ünite penisilin ve 10 mg streptomisin) eklenmiş RPMI-1640 (R8758 Sigma-Aldrich USA) besiyerinde çoğaltılmış ve pasajlanarak devamlılığı sağlanmıştır.

Promastigotlar, çoğaltıldıkları besiyerinden 20 ml alınarak steril falkon tüplerine aktarılmış ve 10 dak. 1.000 g'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerdeki süpernatant atılarak çökeltide bulunan promastigotların üzerine 10 ml steril PBS eklenmiş ve düşük devirde vortekslenmiştir. Bu hazırlanan çözelti 10 dak. 1.000 g'de santrifüj edilmiş ve işlem üç kez tekrarlanarak promastigotların yıkanması sağlanmıştır.

Hidrazon Bileşikleri

İn vitro anti-leishmanial aktivite testinde kullanılan hidrazon türevi bileşikler (5a-5j) Utku ve ark.^[18] tarafından daha önce sentezlenmiştir. Beş basmakta elde edilen sonuç ürünlerinin sentezini kısaca özetlenecek olursa; 3,6-dikloropiridazin ve 1-fenilpiperazin etanol içerisinde ısıtılmış ve ardından asetik asit ilave edilerek 6-sübstitüe-3(2H)-piridazinon türevi bileşikler sentez edilmiştir. Etil bromoasetat kullanarak 6-sübstitüe-3(2H)-piridazinon-2-il asetat türevinin sentezi yapıldıktan sonra hidrazin kullanarak hidrazon türevleri sentezi yapılmıştır. Farklı sübstitüent taşıyan aldehit türevleri kullanılarak sonuç ürünleri olan (5a-5j) türevlerinin sentezi tamamlanmıştır. Sentez edilen bileşiklerin yapıları ¹H-NMR (Varian Mercury 400 MHz FT-NMR spektrometre) ve IR (Bruker Vector 22 IR/Opus Spectroscopic Software Version 2.0) ve elemental analiz verileri (LECO 932 CHNS analizör) ile aydınlatılmıştır. Bu on farklı hidrazon bileşiği *Tablo 1*'de verilmiştir.

In Vitro Anti-Leishmanial Aktivite testi

Sentezlenmiş olan 6-sübstitüe-3(2H)-pridazinon-2-asetil-2-(sübstitüe/nonsübstitüe asetofenon) hidrazon yapısındaki on adet bileşik DMSO/H₂O (%10) içerisinde çözülerek homojen hale getirilmiş ve 0.20-µm membran filtre (Millipore, USA) ile steril edilmiştir. Üzerine konsantrasyonu 6 µg/ml

Tablo 1. Anti-leishmanial aktivitesi araştırılan hidrazon yapısındaki on farklı bileşik**Table 1.** Anti-leishmanial activity investigated the hydrazone structure ten different compounds

Sıra	Sentezlenen Bileşiğin Adı	Açıklama
1	Bileşik 5a 6-(4-fenilpiperazin)-3(2H)- piridazinon -2-asetil-2- asetofenonhidrazon	Verim%61, Erime noktası 234-235°C, ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.65 (s, 1H, N-H), 7.70-7.67 (d, 1H, piridazinon H5), 7.66-6.94 (m, 10H, aromatik protonlar), 6.84-6.81 (d, 1H, piridazinon H4), 5.04 ve 4.66 (s, s, 2H, CH ₂), 3.39-3.37 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.29-3.27 (t, 4H, piperazinb+b' protonlar), 2.23 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1705 (C=O, hidrazon), 1662 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3216(N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₆ N ₆ O ₂ :C, 66.96; H, 6.09; N, 19.52. Bulunan: C, 67.13; H, 6.30; N, 19.37
2	Bileşik 5b 6-(4-fenilpiperazin)-3(2H)- piridazinon-2-asetil-2-(4 bromoasetofenon) hidrazon	Verim%73, Erime noktası 243-244°C. ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.67 (s, 1H, NH), 7.72-7.69 (d, 1H, piridazinon H5), 7.67-6.88 (m, 9H, aromatik protonlar), 6.80-6.77 (d, 1H, piridazinon H4), 5.02 ve 4.63 (s, s, 2H, CH ₂), 3.36-3.34 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.28-3.25 (t, 4H, piperazinb+b' protonlar), 2.22 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1703 (C=O, hidrazon), 1666 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3217 (N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₅ BrN ₆ O ₂ :C, 56.59; H, 4.95; N, 16.50. Bulunan: C, 56.81; H, 5.05; N, 16.69
3	Bileşik 5c 6-(4-fenilpiperazin)-3(2H)- piridazinon-2-asetil-2-(4- kloroasetofenon) hidrazon	Verim%67, Erime noktası 252-253°C, ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.69 (s, 1H, NH), 7.73-7.70 (d, 1H, piridazinon H5), 7.68-6.91 (m, 9H, aromatik protonlar), 6.83-6.79 (d, 1H, piridazinon H4), 5.06 ve 4.68 (s, s, 2H, CH ₂), 3.36-3.34 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.28-3.24 (t, 4H, piperazinb+b' protonlar), 2.23 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1706 (C=O, hidrazon), 1665 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3214 (N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₅ ClN ₆ O ₂ :C, 62.00; H, 5.42; N, 18.08. Bulunan: C, 62.07; H, 5.54; N, 17.96
4	Bileşik 5d 6-(4-fenilpiperazin)-3(2H)- piridazinon-2-asetil-2-(4- floroasetofenon) hidrazon	Verim%81, Erime noktası 262-263°C, ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.70 (s, 1H, NH), 7.76-7.74 (d, 1H, piridazinon H5), 7.67-6.89 (m, 9H, aromatik protonlar), 6.82-6.80 (d, 1H, piridazinon H4), 5.05 ve 4.66 (s, s, 2H, CH ₂), 3.39-3.37 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.29-3.27 (t, 4H, piperazineb+b' protonlar), 2.24 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1704 (C=O, hidrazon), 1668 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3215 (N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₅ FN ₆ O ₂ :C, 64.27; H, 5.62; N, 18.74. Bulunan: C, 64.14; H, 5.74; N, 18.77
5	Bileşik 5e 6-[4-(4-florofenil) piperazin]- 3(2H)- piridazinon -2-asetil -2- asetofenonhidrazon	Verim%80, Erime noktası 271-272°C, ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.73 (s, 1H, NH), 7.77-7.75 (d, 1H, piridazinon H5), 7.72-6.96 (m, 9H, aromatik protonlar), 6.85-6.83 (d, 1H, piridazinon H4), 5.07 ve 4.70 (s, s, 2H, CH ₂), 3.39-3.37 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.30-3.28 (t, 4H, piperazinb+b' protonlar), 2.21 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1705 (C=O, hidrazon), 1666 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3213 (N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₅ FN ₆ O ₂ :C, 64.27; H, 5.62; N, 18.74. Bulunan: C, 64.04; H, 5.33; N, 18.81
6	Bileşik 5f 6-[4-(4-florofenil) piperazin]- 3(2H)- piridazinon -2-asetil -2-(4-bromoasetofenon) hidrazon	Verim%62, Erime noktası 248-249°C. ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.80 (s, 1H, NH), 7.79-7.76 (d, 1H, piridazinon H5), 7.70-6.95 (m, 8H, aromatik protonlar), 6.86-6.84 (d, 1H, piridazinon H4), 5.07 ve 4.70 (s, s, 2H, CH ₂), 3.40-3.38 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.30-3.28 (t, 4H, piperazinb+b' protonlar), 2.23 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1705 (C=O, hidrazon), 1663 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3216 (N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₄ BrFN ₆ O ₂ :C, 54.66; H, 4.59; N, 15.94. Bulunan: C, 54.82; H, 4.48; N, 16.12
7	Bileşik 5g 6-[4-(4-florofenil) piperazin]- 3(2H)- piridazinon -2-asetil -2-(4-kloroasetofenon) hidrazon	Verim%50, Erime noktası 229-230°C, ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.82 (s, 1H, NH), 7.77-7.75 (d, 1H, piridazinon H5), 7.79-6.72 (m, 8H, aromatik protonlar), 6.99-6.97 (d, 1H, piridazinon H4), 5.10 ve 4.80 (s, s, 2H, CH ₂), 3.42-3.39 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.31-3.29 (t, 4H, piperazinb+b' protonlar), 2.24 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1704 (C=O, hidrazon), 1665 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3214 (N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₄ ClFN ₆ O ₂ :C, 59.69; H, 5.01; N, 17.40. Bulunan: C, 59.81; H, 5.16; N, 17.26
8	Bileşik 5h 6-[4-(4-florofenil) piperazin]- 3(2H)- piridazinon -2-asetil -2-(4-floroasetofenon) hidrazon	Verim%40, Erime noktası 241-242°C, ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.79 (s, 1H, NH), 7.75-7.72 (d, 1H, piridazinon H5), 7.68-6.90 (m, 8H, aromatik protonlar), 6.85-6.83 (d, 1H, piridazinon H4), 5.07 ve 4.70 (s, s, 2H, CH ₂), 3.39-3.37 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.29-3.27 (t, 4H, piperazinb+b' protonlar), 2.23 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1706 (C=O, hidrazon), 1662 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3216 (N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₄ F ₂ N ₆ O ₂ :C, 61.79; H, 5.19; N, 18.02. Bulunan: C, 61.51; H, 5.36; N, 17.93
9	Bileşik 5i 6-[4-(4-klorofenil) piperazin]- 3(2H)- piridazinon -2-asetil -2- asetofenon hidrazon	Verim%56, Erime noktası 280-281°C, ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.72 (s, 1H, NH), 7.73-7.70 (d, 1H, piridazinon H4), 7.67-6.90 (m, 9H, aromatik protonlar), 6.82-6.80 (d, 1H, piridazinon H4), 5.05 ve 4.70 (s, s, 2H, CH ₂), 3.37-3.35 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.27-3.25 (t, 4H, piperazinb+b' protonlar), 2.22 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1706 (C=O, hidrazon), 1664 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3218 (N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₅ ClN ₆ O ₂ :C, 62.00; H, 5.42; N, 18.08. Bulunan: C, 62.17; H, 5.56; N, 17.98
10	Bileşik 5j 6-[4-(4-klorofenil) piperazin]- 3(2H)- piridazinon -2-asetil -2-(4-bromoasetofenon) hidrazon	Verim%48, Erime noktası 231-232°C, ¹ H-NMR (DMSO-d ₆): δ (ppm) 11.70 (s, 1H, NH), 7.77-7.75 (d, 1H, piridazinon H4), 7.65-6.90 (m, 8H, aromatik protonlar), 6.80-6.79 (d, 1H, piridazinon H4), 5.07 ve 4.70 (s, s, 2H, CH ₂), 3.38-3.36 (t, 4H, piperazina+a' protonlar), 3.28-3.26 (t, 4H, piperazinb+b' protonlar), 2.24 (s, 3H, CH ₃). FT-IR (KBr): ν 1704 (C=O, hidrazon), 1663 (C=O, 3(2H)- piridazinon), 3212 (N-H). Analitik Hesaplanan. C ₂₄ H ₂₄ BrClN ₆ O ₂ :C, 53.00; H, 4.45; N, 15.45. Bulunan: C, 53.08; H, 4.40; N, 15.35

olacak şekilde fenol red içermeyen RPMI-1640 besiyeri eklenmiştir. Besiyerine ayrıca ısı ile inaktive edilmiş %10 Fetal Bovine Serum (FBS) eklenmiştir. Hazırlanan her bir karışım sırayla 96 kuyucuklu mikropiplerin ilk kuyucuklarına 225 µl dağıtılmıştır. İçerisine 112.5 µl besiyeri eklenmiş 2. kuyucuğa ilk kuyucuktan 112.5 µl eklenerek ½ oranında dilüe edilmiştir. Aynı şekilde seri dilüsyonla 10 kuyucukta işlem tekrarlanarak son kuyucuktan alınan karışım dışarı atılmıştır.

Kuyucukların üzerine, hemositometre ile hücre sayısı 2.5×10^7 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmış 112.5 µl *Linfaantum* promastigotları eklenerek son konsantrasyonları 3 - 0.003 µg/ml olacak şekilde bileşikler sulandırılmıştır.

Pozitif kontrol olarak 11. sıradaki kuyucuklara sadece 225 µl promastigot, negatif kontrol olarak da 12. sıradaki kuyucuklara sadece 225 µl sentezlenmiş bileşik eklenmiştir. Mikropipler 27°C'ye ayarlanmış soğutmalı etüvde 20 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Hazırlanmış olan tüm kuyucuklara bu sürenin sonunda 25 µl alamar mavisi (Resazurin sodium salt R7017 Sigma-Aldrich USA) (0.1 mg/ml) eklenmiş ve tekrar 27°C'de 4 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Mikroplaklar 24, 48 ve 72 saat sonra değerlendirilerek sonuçlar kaydedilmiştir. Çalışmada kontrol ilacı olarak da amfoterisin B kullanılmıştır. Tüm testler iki kez tekrarlanmıştır.

BULGULAR

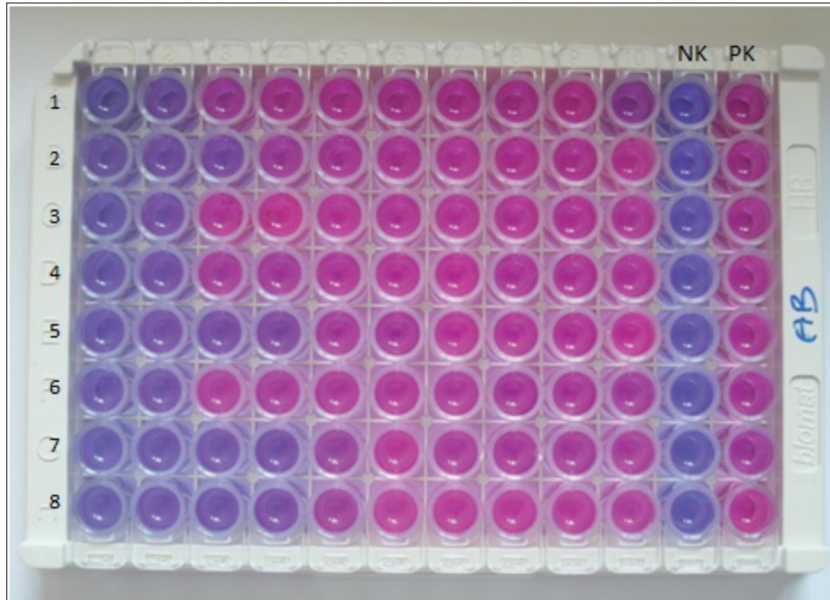
Çalışmada sentezlenmiş hidrazon yapısındaki 10 farklı bileşiğin anti-leishmanial aktivitesi 96 kuyucuklu mikroplaklarda mikrodilüsyon alamar mavisi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Kuyucuklarda rengin maviden pembeye dönmesi parazitin ürettiği, rengin değişmeden kalması ise parazitin üremediği şeklinde değerlendirilmiştir (Şekil 1).

Araştırmada beklenildiği gibi pozitif kontrol kuyucuğunda alamar maviden pembeye değişirken, negatif kontrol kuyucuğunda herhangi bir renk değişikliği gözlenmemiştir.

Çalışmada hidrazon yapısındaki on adet bileşiğin Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri Tablo2'de verilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya genelinde yaygın olan beş paraziter hastalık arasında yer alan leishmaniasis önemli bir halk sağlığı sorundur. DSÖ'ne göre her yıl çoğu gelişmekte olan ülkelerden yaklaşık 2 milyon yeni vaka bildirilmekte olup 12 milyon insanı etkilemektedir^[10].



Şekil 1. İlk 8 bileşiğe ait mikroplağın 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki görüntüsü (11.sütun negatif kontroller 12. Sütun pozitif kontroller)

Fig 1. Image of microplate belong the first eight compounds in at the 24 h incubation (11. column negative controls, 12. column positive controls)

Tablo 2. Anti-leishmanial aktivitesi araştırılan hidrazon yapısındaki on farklı bileşiğin MİK değerleri

Table 2. MIC values of ten different hydrazone derivatives investigated anti-leishmanial activity

Sıra	Sentezlenmiş Bileşik	MİK (µg/ml)
1	5a	1.5
2	5b	0.75
3	5c	1.5
4	5d	1.5
5	5e	0.187
6	5f	1.5
7	5g	0.187
8	5h	0.187
9	5i	3
10	5j	1.5
Kontrol	Amfoterisin B	0.003

Leishmaniasis tedavisinde beş değerli antimon bileşik-leri, amfoterisin B deoksikolat, miltefosin, paromomisin, sitamaquin, azoller ve pentamidin gibi farklı anti-leishmanial ajanların yanında termoterapi ve kriyoterapi gibi uygulamalar da kullanılmaktadır^[19-21].

Tedavisinde kullanılan beş değerli antimon bileşiklerinin etkinliğinin %90'ın üzerinde olduğu bildirilirken, miyalji, artralji, karın ağrısı, hepatit, pankreatit ve çeşitli laboratuvar değerlerinde yükseklik gibi nadiren lokal ve sistemik yan etkilere neden olabileceği de rapor edilmiştir^[21]. Amfoterisin B ise vücutta geniş bir yayılım göstermesi nedeniyle, infüzyon reaksiyonları, nefrotoksisite, hipokalemi ve miyokardit gibi yan etkilere sahiptir ve hasta 4-5 hafta yatarak takip edilmektedir. Amfoterisin B'nin yan etkilerini azaltmak için dalak ve karaciğer gibi organların makrofajlarında hızla konsantrasyonları yükselerek, uzun süre bu organlarda kalabilen çeşitli lipid formülasyonları (lipozomal amfoterisin B) geliştirilmiştir^[19]. Antimon bileşiklerine direnç geliştiğinde, VL tedavisinde intravenöz

veya intramüsküler olarak amfoterisin B kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlara karşı da direnç geliştiği bildirilmiştir [20]. Sunulan çalışmada da hidrozon bileşiklerinin tedavide etkili olabileceği gözlemlenmiştir. Bu durum hastalığın etkili ve kısa sürede tedavisi ile ilgili olumlu olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca tedavi sürecinde yan etkisi az olan ve etkili olan bir ilacın kullanılması hastanın yaşam kalitesi açısından da önemlidir.

Çalışmada parazitin canlılığını belirlemek için kullanılan alamar mavisini, oksidasyon-redüksiyon indikatörü olarak hücre canlılığı ve toksisite, hücresel büyüme ölçümleri için çeşitli deneylerde kullanılan ve uzun inkübasyon süresi boyunca canlı hücreler için toksik etki göstermeyen bir maddedir [22,23]. Bu özellikleri nedeniyle *Leishmania* parazitlerine karşı bileşiklerin sitotoksitesini ölçmeye yönelik farklı yöntemlerde ve kantitatif kolorimetrik testlerde kullanılmıştır. Kültür ortamında canlı *Leishmania* promastigotlarının alamar mavisini indirgeyerek rengini maviden kırmızıya dönüştürdüğünü belirten çalışmalar mevcuttur [24].

Tedavide kullanılan anti-leishmanial ilaçların toksik yan etkileri ve bu ilaçlara karşı parazitin direnç geliştirmesi nedeniyle günümüze kadar yeni moleküllerin tanımlanması ve formülasyonları ile ilgili çalışmalar yapılmıştır [3]. Sudan' da yöresel olarak KL'nin tedavisinde kullanılan *Allium sativa* (sarımsak) ve *Azadirachta indica* (Neem)'dan elde edilen etanol ekstratlarının anti-leishmanial aktivitelerinin pentostamla kıyaslandığında anlamlı bir farkı olmadığını belirten çalışmalardan [14], makrolid grubunda yer alan iki antibiyotikten azitromisin ve klaritromisine göre *L. topica* promastigot ve amastigotları üzerinen anti-leishmanial etkisinin daha yüksek olduğu vurgulayan [25] çalışmalara kadar farklı çalışmalar yapılmıştır [9,16,25-29].

Ulaşılan kaynak bilgilerde Coa ve ark.[26] on farklı kinolan-hidrazonhibridini, Alptüzün ve ark.[30] pyridinium hidrazon derivelerini, Al-Kahraman ve ark.[31] N-unsubstituted hidrazon yapıdaki 3 (benzilmonohidrazones) ve 5 (benzophenone-hidrazones) bileşiklerini ve Coimbra ve ark.[32] tarafından 7-chloro-4-quinolinyl hidrazon derivelerini kullanarak anti-leishmanial aktivitelerini denemişler ve olumlu sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada kullanılmış olan hidrazonlar diğer araştırmalardan farklı yapıdadır (Tablo 1).

Bu çalışmada kullanılan hidrazonların anti-leishmanial aktivitesi ile ilgili şimdye kadar yapılan herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre en etkili maddelerin 5e, 5g ve 5h bileşikleri (MİK=0.187 µg/ml) olduğu, en etkisiz bileşiğin ise 5i (MİK=3 µg/ml) olduğu görülmüştür (Tablo 2). Standart ilaç olarak kullanılan amfoterisin B'nin ise 0.003 µg/ml konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir. Bu durum 5e, 5g ve 5h maddelerinin parazitin tedavisi için ilaç adayı olabilecekleri şeklinde açıklanabilir.

Leishmania türlerinin promastigot şekillerinin canlılığı ve çoğalmasının saptanmasında, enzimatik belirleyiciler, H³ timin eklenmesi ve kolorimetrik metodların kullanılabileceği bildirilmiştir. Kolorimetrik metodlar arasında da alamar mavisinin tek aşamalı, uygulaması basit, düşük maliyetli, çevre dostu ve kolay transfer edilebilir oluşu ve ayrıca redoks indikatörünün hücre toksisitesinin olmaması ve uzun inkübasyon periyotlarında kullanılabiliyor olması gibi çeşitli avantajları rapor edilmiştir [3]. Mikus ve ark.[22] da, *L. major* promastigotlarıyla yapılan ilaç tarama testinde alamar mavisinin uygulanabilir kolorimetrik indikatör olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da indikatör boya olarak alamar mavisini kullanılmıştır.

Sonuç olarak; çalışmada sentezlenen 5e, 5g ve 5h (MİK = 0.187 µg/ml) bileşikleri antiparaziter olarak etkili bulunmuş olup bu hidrazonların ilaç adayı olarak ileri çalışmalarına devam edilebileceği kanısına varılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin ilaç olarak kullanılabilmesi için; gerekli olduğu düşünülen *in vitro* makrofaj kültüründe *Leishmania* amastigotlarına karşı etkinliği ve *in vivo* olarak deneysel hayvan modellerinde kontrol çalışmalarına ihtiyaç vardır. Ayrıca alamar mavisini mikrodilüsyon yönteminin, anti-leishmanial ilaç aktivitesi araştırılmasında basit, güvenilir ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. WHO: Expert Committee. Control of the Leishmaniasis. Geneva, 2010.
2. Doğan N, Bör O, Dinleyici EC, Töz SO, Ozbel Y: Investigation of anti-*leishmania* seroprevalence by different serologic assays in children inhabiting in then or the western part of Turkey. *Mikrobiyol Bul*, 42 (1): 103-111, 2008.
3. Corral MJ, González E, Cuquerella M, Alunda JM: Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *leishmania* with alamar blue. *J Microbiol Methods*, 94, 111-116, 2013. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.05.012
4. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014 Faaliyet Raporu: Şubat 2015. http://www.thsk.gov.tr/dosya/birimler/strateji_db/dokumanlar/faaliyet_raporu/2014_faaliyet_raporu.pdf; Erişim tarihi: 15.02.2016.
5. de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M: Leishmanial infection: Analysis of its first steps. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98, 861-870, 2003. DOI: 10.1590/S0074-02762003000700001
6. Dos Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, da Veiga Junior VF, Nakamura CV: Copiba oil: An alternative development of new drugs against leishmaniasis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, Article ID: 898419, 2012. DOI: 10.1155/2012/898419
7. Sacks D, Sher A: Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol*, 3, 1041-1047, 2002. DOI: 10.1038/ni1102-1041
8. Bogdan C, Rollinghoff M: The immune response to *leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*, 28, 121-134, 1998. DOI: 10.1016/S0020-7519(97)00169-0
9. Bekhit AA, Haimanot T, Hymete A: Evaluation of some 1H-pyrazole derivatives as a dual acting antimalarial and anti-leishmanial agents. *Pak J Pharm Sci*, 27 (6): 1767-1773, 2014.
10. de Araújo MV, de Souza PS, de Queiroz AC, da Matta CB, Leite AB, da Silva AE, de França JA, Silva TM, Camara CA, Alexandre-Moreira MS: Synthesis, leishmanicidal activity and theoretical evaluations of a series of substituted bis-2-hydroxy-1,4-naphthoquinones. *Molecules*, 19, 15180-15195, 2014. DOI: 10.3390/molecules190915180
11. Pourmohammadi B, Motazedian MH, Handjani F, Hatam GH,

- Habibi S, Sarkari B:** Glucantime efficacy in the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 42 (3): 502-508, 2011.
- 12. Kazemi-Rad E, Mohebbi M, Khadem-Erfan MB, Saffari M, Raoofian R, Hajjarian H, Hadighi R, Khamesipour A, Rezaie S, Abedkhozasteh H, Heidari M:** Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP approach. *Exp Parasitol*, 135, 344-349, 2013. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.07.018
- 13. Barbosa TP, Sousa SC, Amorim FM, Rodrigues YK, de Assis PA, Caldas JP, Oliveira MR, Vasconcellos ML:** Design, synthesis and antileishmanial *in vitro* activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. *Bioorg Med Chem*, 19, 4250-4256, 2011. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.05.055
- 14. Khalid FA, Abdalla NM, Mohamed HEO, Toum AM, Magzoub MMA, Ali MS:** Treatment of cutaneous leishmaniasis with some local Sudanese plants (Neem, Garlic & Garlic). *Turkiye Parazitolojisi Dergisi*, 28 (3): 129-132, 2004.
- 15. Efstathiou A, Gaboriaud-Kolar N, Smirlis D, Myriantopoulos V, Vougianniopoulou K, Alexandratos A, Kritsanida M, Mikros E, Soteriadiou K, Skaltsounis AL:** An inhibitor-driven study for enhancing the selectivity of indirubin derivatives towards leishmanial glycogen synthase kinase-3 over leishmanial cdc2-related protein kinase 3. *Parasit Vectors*, 20, 234, 2014. DOI: 10.1186/1756-3305-7-234
- 16. Gaikward ND, Patil SV, Bobade VD:** Synthesis and biological evaluation of some novel thiazole substituted benzotriazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 22, 3449-3454, 2012. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.03.094
- 17. Kaplancıklı ZA, Yurtta L, Turan-Zitouni G, Ozdemir A, Goger G, Demirci F, Mohsened UA:** Synthesis and antimicrobial activity of new pyrimidine-hydrazones. *Lett Drug Des Discov*, 11 (1): 76-81, 2014. DOI: 10.2174/15701808113109990037
- 18. Utku S, Gökçe M, Aslan G, Bayram G, Ülger M, Emekdaş G, Şahin MF:** Synthesis and *in vitro* antimycobacterial activities of novel 6-substituted-3(2H)-pyridazinone-2-acetyl-2-(substituted/nonsubstituted acetophenone) hydrazone. *Turk J Chem*, 35, 331-339, 2011. DOI: 10.3906/kim-1009-63
- 19. Sundar S, Chakravarty J:** Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother*, 14, 53-63, 2013. DOI: 10.1517/14656566.2013.755515
- 20. Monge-Maillo B, Lopez-Velez R:** Therapeutic options for visceral leishmaniasis. *Drugs*, 73, 1863-1888, 2013. DOI: 10.1007/s40265-013-0133-0
- 21. Yeşilova Y, Turan E, Altın Sürücü H, Aksoy M, Özbilgin A:** Sistemik lipozomal amfoterisin B tedavisine cevap veren kutanöz leishmaniasis olgusu. *Turkiye Parazitolojisi Dergisi*, 39, 63-65, 2015. DOI: 10.5152/tpd.2015.3761
- 22. Mikus J, Steverding D:** A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *leishmania* using the dye alamar blue. *Parasitol Int*, 48, 265-269, 2000. DOI: 10.1016/S1383-5769(99)00020-3
- 23. Palomino JC, Portaels F:** Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18, 380-383, 1999. DOI: 10.1007/PL00015025
- 24. Polat E, Kutlubay Z:** Meglümün antimoniat tedavisine dirençli dört kutanöz leishmaniasis olgusu. *Turkiye Parazitolojisi Dergisi*, 38, 177-80, 2014. DOI: 10.5152/tpd.2014.3410
- 25. Balcıoğlu İC, Ok ÜZ, Özbek Y, Girginkardeşler N, Özbilgin A:** The *in vitro* effects of azithromycin and clarithromycin on promastigotes and amastigotes of *Leishmania tropica*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (Suppl.-A): A115-A120, 2012. DOI: 10.9775/kvfd.2011.6077
- 26. Coa JC, Castrillón W, Cardona W, Carda M, Ospina V, Muñoz JA, Vélez ID, Robledo SM:** Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activity of quinoline-hydrazone hybrids. *Eur J Med Chem*, 101, 746-753, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.07.018
- 27. Dar AA, Enjamuri N, Shadab M, Ali N, Khan AT:** Synthesis of unsymmetrical sulfides and their oxidation to sulfones to discover potent antileishmanial agents. *ACS Comb Sci*, 17, 671-681, 2015. DOI: 10.1021/acscombsci.5b00044
- 28. Rodrigues KA, Dias CN, Nérés PL, Rocha Jda C, Scotti MT, Scotti L, Mascarenhas SR, Veras RC, Medeiros IA, Keesen Tde S, Oliveira TB, Lima Mdo C, Balliano TL, Aquino TM, Moura RO, Mendonça Junior FJ, Oliveira MR:** 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation *in vitro*. *Eur J Med Chem*, 106, 1-14, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.10.011
- 29. Mowbray CE, Braillard S, Speed W, Glossop PA, Whitlock GA, Gibson KR, Mills JE, Brown AD, Gardner JM, Cao Y, Hua W, Morgans GL, Feijens PB, Matheeußen A, Maes LJ:** Novel amino-pyrazole ureas with potent *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity. *J Med Chem*, 58, 9615-9624, 2015. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01456
- 30. Alptuzun V, Cakiroglu G, Limoncu ME, Erac B, Hosgor-Limoncu M, Erciyas E:** Synthesis and antileishmanial activity of novel pyridinium-hydrazone derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 28, 960-967, 2013. DOI: 10.3109/14756366.2012.697058
- 31. Al-Kahraman YM, Yasinzi M, Singh GS:** Evaluation of some classical hydrazones of ketones and 1,2-diketones as antileishmanial, antibacterial and antifungal agents. *Arch Pharm Res*, 35, 1009-1013, 2012. DOI: 10.1007/s12272-012-0608-7
- 32. Coimbra ES, Antinarelli LM, da Silva AD, Bispo ML, Kaiser CR, de Souza MV:** 7-Chloro-4-quinolinyl hydrazones: A promising and potent class of antileishmanial compounds. *Chem Biol Drug Des*, 81, 658-665, 2013. DOI: 10.1111/cbdd.12112