

Benzimidazol Çekirdeği İçeren Bazı Bileşiklerin *M. tuberculosis* H37Rv Suşuna Karşı Antitüberküloz Aktivitesinin İncelenmesi

Investigation of Antituberculosis Activity of Some Compounds Containing Benzimidazole Core Against *M. tuberculosis* H37Rv Strain

Suna KIZILYILDIRIM^{1*}, Berfin SUCU², Senem AKKOÇ³, Fatih KÖKSAL⁴

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

² Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

³ Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

⁴ Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

ÖZET

Tüberküloz, bulaşıcı hastalıklara bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Tüberküloz tedavisinin uzun ve karmaşık olması, ilaç direncini yaygınlaştırmaktadır. Tüberküloz tedavisinde umut olacak bazı benzimidazol türevi bileşiklerin antitüberküloz aktivite sergilediği bildirilmiştir. Çalışmada, referans *M. tuberculosis* H37Rv suşuna karşı sentezlenen benzimidazol çekirdeği içeren 3 farklı bileşiğin (A1: 1-(2-metilbenzonitril)-3-(naftalen-1-il-metil)-1H-benzo[d]imidazol-3-yum klorür, A2: 1-(2-hidroksietil)-3-(2-(piperidinyum-1-il)etil) klorür)-1H-benzo[d]imidazol-3-yum bromür, A3: 1-(3-metilbenzil)-3-(2-(piperidin-1-il)etil)-1H-benzo[d]imidazol-3-yum klorür) antitüberküloz aktivitesinin tespiti amaçlandı.

Benzimidazol çekirdeği içeren bileşiklerin (A1, A2 ve A3), *M. tuberculosis* H37Rv suşuna karşı antitüberküloz aktivite in vitro şartlarda BACTEC MGIT 960 sistemi kullanılarak araştırıldı.

Çalışmada A1, A2 ve A3 bileşiklerinin *M. tuberculosis* H37Rv suşuna karşı herhangi bir antitüberküloz aktivite göstermediği tespit edildi.

Sonuç olarak, farklı benzimidazol bileşikler sentezlenerek antitüberküloz aktivite çalışmalarının devam edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antitüberküloz, BACTEC MGIT 960, *M. tuberculosis*

Alınış / Received: 13.12.2022 Kabul / Accepted: 21.03.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 13.04.2023



ABSTRACT

Tuberculosis is one of the main causes of death due to infectious diseases. As tuberculosis treatment is long and complex, drug resistance is becoming widespread. It has been reported that some benzimidazole derivative compounds that will be promising in the treatment of tuberculosis exhibit antituberculous activity. In this study, it was aimed to determine the antituberculosis activity of 3 different compounds containing benzimidazole core synthesized (A1: 1-(2-methylbenzonitrile)-3-(naphthalen-1-yl-methyl)-1H-benzo[d]imidazole-3-ium chloride, A2: 1-(2-hydroxyethyl)-3-(2-(piperidinium-1-yl)ethyl chloride)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide, A3: 1-(3-methylbenzyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-1H-benzo[d]imidazole-3-ium chloride) against the reference strain *M. tuberculosis* H37Rv.

The antituberculosis activities of benzimidazole-containing compounds (A1, A2, and A3) against *M. tuberculosis* H37Rv strain were investigated in vitro using the BACTEC MGIT 960 system.

In the study, it was determined that A1, A2, and A3 compounds did not show any antituberculosis activity against *M. tuberculosis* H37Rv strain.

As a result, it is thought that antituberculosis activity studies should be continued by synthesizing different benzimidazole compounds.

Keywords: Antituberculosis, BACTEC MGIT 960, *M. tuberculosis*



1. Giriş

Tüberkülozun (TB) etiyolojik ajanı olan *Mycobacterium tuberculosis*, önemli bir küresel halk sağlığı yükü olmaya devam etmektedir [1]. *M. tuberculosis*'in son 200 yılda 1 milyar insanı öldürdüğü tahmin edilmektedir ve dünyanın en ölümcül patojenlerinden biridir [2].

TB, birden fazla ilaçla uzun süreli tedavi gerektiren tedavi edilebilir bir hastalıktır [3]. Mevcut antitüberküloz tedavi, kombinasyon halinde dört antibiyotiği (izoniazid, rifampin, pirazinamid ve etambutol) içeren 6 ila 9 aylık birinci basamak tedaviyi içerir. Nüksetme veya direnç durumunda, aminosalisilik asit, florokinolonlar, aminoglikozidler, sikloserin, linezolid ve klofazimin gibi ikinci basamak ilaçlarla 18-24 ay boyunca, kombinasyon tedavisi yapılmaktadır [4]. Rifampisin (RIF), bakterisidal etkileri nedeniyle TB tedavisinde çok önemli bir rol oynayan ajanlardan biridir [5]. Ancak 2016 yılında, RIF'e dirençli yarım milyondan fazla yeni TB vakası bulunduğu ve bu vakaların %82'sinin de izoniazide dirençli olduğu bildirilmiştir [6]. Son yıllarda, önemli bir direnç olan özellikle çoklu ilaç direnci (ÇİD) ve yaygın ilaç direnci ortaya çıkmıştır [7]. İki yeni ilaç olan bedaquiline ve delamanid, ÇİD-TB tedavisi için onaylanmıştır ancak klinik kullanımdan sonra bir yıldan kısa bir süre içinde her iki ilaca karşı direnç bildirilmiştir ve vaka sayısı artmaya devam etmektedir [8]. ÇİD'in artan oranı, uzun süreli çok ilaçlı antitüberküloz rejimlerine uymanın zorlukları, tedaviyi kısaltan denemelerden elde edilen hayal kırıklığı yaratan sonuçlar, yeni ilaçların ve terapötik müdahalelerin geliştirilmesini teşvik etmektedir [9].

Benzimidazol çekirdeği ayrıcalıklı bileşiklerdir ve farklı süstitüe benzimidazoller, antiviral, antifungal, antimikrobiyal, antiprotozoal, antienflamatuvar, antikanser, antioksidan, antikoagulan, antidiyabetik ve antihipertansif aktiviteler dâhil geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahiptir [10]. Benzimidazol bileşiklerinin in vitro antitüberküloz aktivite gösterdiği ve yeni antitüberküloz ilaçlarının keşfi için ümit verici adaylar olabileceği bildirilmiştir [11, 12].

Çalışmada; yeni antitüberküloz ajanları sunmak amacıyla benzimidazol çekirdeği içeren farklı bileşiklerinin, referans suş *M. tuberculosis* H37Rv'ye karşı antitüberküloz aktivitesi araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışmada, 29.08.2022-14.11.2022 tarihleri arasında, benzimidazol türevi üç farklı bileşiğin, referans *M. tuberculosis* H37Rv suşuna karşı antitüberküloz aktivitesi Çukurova Üniveritesi Rektörlüğü Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi, Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarı'nda araştırılmıştır.

Benzimidazol Bileşiklerinin Sentezi

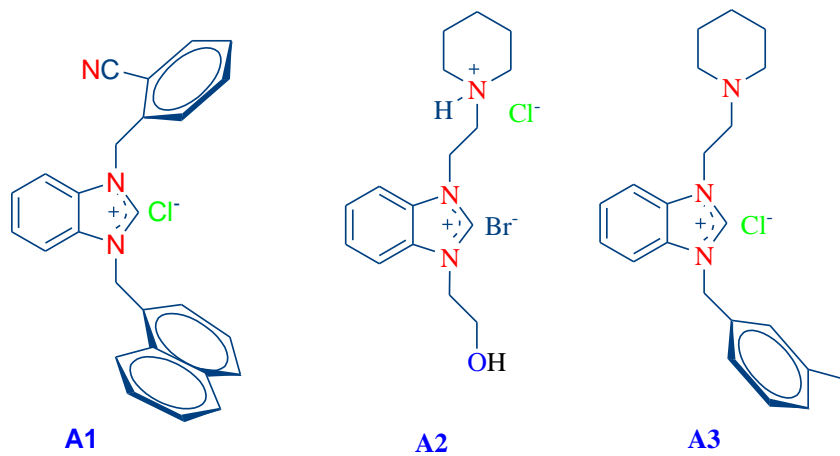
Benzimidazol bileşiklerinin (A1-3) sentezi Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. 1.5 mmol oranında potasyum hidroksit, 40 mL etil alkol içindeki 1 mmol benzimidazol çözeltisine yavaş yavaş ilave edildi. Reaksiyon karışımı bir saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra ortama 1 mmol alkil halojenür ilave edildi ve 6 saat boyunca reflux yapıldı. Ardından oluşan potasyum klorür süzülerek uzaklaştırıldı. Ürün, etil alkol içinde kristallendirilerek saflaştırıldı. Sentezlenen N-alkilbenzimidazolün dimetilformamid (DMF) çözeltisine yavaş yavaş farklı bir alkil halojenür ilave edildi ve 80°C'de 24 saat karıştırıldı. Reaksiyon bittikten sonra ortamdaki DMF vakum uygulanarak uzaklaştırıldı. Bu yöntemle, üç farklı benzimidazolyum tuzu sentezlendi ve ürünler etil alkol-dietil eter karışımında kristallendirilerek saflaştırıldı. Literatüre göre A1: 1-(2-metilbenzonitril)-3-(naftalen-1-il-metil)-1H-benzo[d]imidazol-3-yum klorür [13], A2: 1-(2-hidroksietil)-3-(2-(piperidinyum-1-il)etil klorür)-1H-benzo[d]imidazol-3-yum bromür [14], A3: 1-(3-metilbenzil)-3-(2-(piperidin-1-il)etil)-1H-benzo[d]imidazol-3-yum klorür [14] bileşikleri sentezlendi.

Benzimidazolyum Tuzlarının Antitüberküloz Aktivitelerinin İncelenmesi

Çalışmada, MGIT tüplerine 800 µl OADC (MGIT Growth Supplement, BD, ABD) ve 500 µl bakteri inoküle edilmiştir. Üreme kontrol (GC) tüpü 1: 100 oranında dilüe edilmiş bakteri inokülümü hazırlanmıştır. Test edilen her bir benzimidazol türevi bileşiklerin konsantrasyonları, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml ve 8 µg/ml ayarlanarak 6 farklı dilüsyonda değerlendirilmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri, benzimidazol türevi içermeyen GC tüpleri ile kıyaslanmıştır ve BD EpiCenter veritabanında 18-24 saatte bir kontrol edilerek analiz edilmiştir.

3. Bulgular

Antitüberküloz aktivitesi araştırılması amacıyla üç farklı benzimidazol türevi bileşik (A1, A2, ve A3) sentezlenmiştir. Çalışma için sentezlenen benzimidazol bileşiklerinin açık yapıları aşağıda verilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Sentezlenen benzimidazol bileşiklerinin açık yapıları.

Antitüberküloz aktivitesi için sentezlenen ve test edilen üç bileşiğin (A1, A2 ve A3) herhangi bir antitüberküloz etkinlik göstermediği tespit edildi. MGIT tüplerinde üç bileşiğin 6 farklı konsantrasyonunda da *M. tuberculosis* H37Rv'nin üreme yoğunluklarının hemen hemen aynı olduğu gözlemlendi.

4. Tartışma ve Sonuç

İlaça dirençli TB suşlarının endişe verici artışı, *M. tuberculosis*'e karşı etkili yeni ilaçların belirlenmesine yönelik çabalarda önemli bir artışa yol açmıştır [12]. Benzimidazol çekirdeği, anahtar bir farmakofordur ve ikame edilmiş benzimidazoller, geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna ve nispeten düşük toksisiteye sahip bileşikler olarak büyük ilgi uyandırmıştır [15].

Benzimidazol türevi bileşiklerinin antitüberküloz aktivitesi birçok araştırmada araştırılmakta ve umut verici aday ajanlar olarak sunulmaktadır. Ancak benzimidazol çekirdeği içeren bazı bileşiklerin antitüberküloz aktivitesinin araştırıldığı bu çalışmada; A1, A2 ve A3 bileşiklerinin herhangi bir antitüberküloz aktivitesi göstermediği tespit edildi. Oysaki farklı moleküler yapıda olan bazı benzimidazol türevi bileşiklerin antitüberküloz aktivitesi birçok literatürde bildirilmiştir [16, 17]. Keri ve arkadaşları, 2,5 ve 2,6-disüstitüe benzimidazol türevlerinin umut verici antitüberküloz adaylar olabileceğini bildirmişlerdir [18]. Yoon ve arkadaşları, çalışmalarında sentezledikleri benzimidazol bileşiklerinin antitüberküloz aktivite gösterdiğini ve öncü antitüberküloz ajanlar olarak benzimidazollerin önemini açıklamışlardır [19]. Bu araştırma ekibinin sentezlediği bileşiklerde benzimidazol halkası üzerinde süstitüentlerin bir, iki ve beş konumlarında bağlı olduğu görülmektedir. Gong ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada da benzimidazol halkasının bir ve iki konumlarından halka oluşturulması ile bir seri tiazino[3,2-a]benzimidazol türevi hazırlanmış ve antitüberküloz etkinliklerinin olduğu görülmüştür [16]. Halojen grupları (Cl, F ve Br) gibi elektron çekici gruplarla ikame edilen benzimidazollerin gelişmiş biyolojik aktivite gösterdiği bildirilmiştir [20]. Başka bir çalışmada ise 2,5-disüstitüe benzimidazollerin, TB'ü öldürme kapasiteleri bakımından 1,2,5-trisüstitüe bileşiklerden daha etkili olduğunu ortaya çıkarmışlardır [21]. Ancak bu çalışmada sentezlenen bileşiklerin yapısı, antitüberküloz etkinliği bildirilen çalışmalara kıyasla farklıdır ve antitüberküloz aktivite göstermeyerek herhangi bir sonuç alınamamıştır. Bu çalışmada benzimidazol halkasının bir ve üç konumlarında farklı süstitüentler bağlanılarak benzimidazolyum tuzları hazırlandı. Dolayısı ile süstitüentlerin bağlandığı konumların aktivite üzerinde önemli bir rol oynayacağı açıkça görülmektedir.

Sonuç olarak, antitüberküloz etkinlikleri araştırılmak için sentezlenen üç heterosiklik benzimidazol bileşiğinin in aktif olduğu tespit edildi. Farklı benzimidazol bileşikleri sentezlenerek antitüberküloz aktiviteye yönelik çalışmaların yapılmaya devam edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Sia, J.K., and Rengarajan, J. 2019. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbiol Spectr*, 7(4), 10.
- [2] Ortiz, A.T., Coronel, J., Vidal, J.R., Bonilla, C., Moor, D.A.J., et al. 2021. Genomic signatures of pre-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun*, 12, 7312.
- [3] Vilchèze, C., and Jacobs, W.A. 2019. The isoniazid paradigm of killing, resistance, and persistence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol*, 431(18), 3450-3461.
- [4] Tăbăran, A.F., Matea, C.T., Mocan, T., Tăbăran, A., Mihaiu, M., et al. 2020. Silver nanoparticles for the therapy of tuberculosis. *Int J Nanomedicine*, 15, 2231-2258.

- [5] Zaw, M.T, Emran, N.A., Zaw, L. 2018. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Infection and Public Health, 11, 605-610.
- [6] World health Organization, Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). 2017. https://www.who.int/tb/challenges/mdr/MDR-RR_TB_factsheet_2017.pdf 2018. (Erişim tarihi: 01.12.2022).
- [7] Xu, Y., Liu, F., Chen, S., Wu, J., Hu, Y., Zhu, B., and Sun, Z. 2018. In vivo evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients during long-term treatment. BMC Genomics, 19, 640.
- [8] Fernández-Soto, P., Casulli, J., Solano-Castro, D., Rodríguez-Fernández, P., Jowitt, T.A., et al. 2021. Discovery of uncompetitive inhibitors of SapM that compromise intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis*. Sci Rep, 11, 7667.
- [9] Tsenova, L., Singhal, A. 2020. Effects of host-directed therapies on the pathology of tuberculosis. JPatho, 250, 636-646.
- [10] Ates-Alagoz, Z. 2016. Antimicrobial activities of 1-H-Benzimidazole-based molecules. Curr Top Med Chem, 16(26), 2953-2962.
- [11] Kazimierczuk, Z., Andrzejewska, M., Kaustova, J., Klimesova, V. 2005. Synthesis and antimycobacterial activity of 2-substituted halogenobenzimidazoles. Eur. J. Med. Chem, 40, 203-208.
- [12] Stanley, S.A., Grant, S.S., Kawate, T., Iwase, N., Shimizu, M., and et al. 2012. Identification of novel inhibitors of *M. tuberculosis* growth using whole cell based high-throughput screening. Chem Biol, 7, 1377-1384.
- [13] Akkoç, S., Kayser, V., İlhan, İ.Ö., Hibbs, D.E., Gök, Y., Peter, A., et al. 2017. New compounds based on a benzimidazole nucleus: synthesis, characterization and cytotoxic activity against breast and colon cancer cell lines. Journal of Organometallic Chemistry, 839, 98-107.
- [14] Akkoç, S. 2019. Derivatives of 1-(2-(Piperidin-1-yl)ethyl)-1H-benzo[d]imidazole: Synthesis, characterization, determining of electronic properties and cytotoxicity studies' ChemistrySelect, 4(17), 4938-4943.
- [15] Moreira, J.B., Mann, J., Neidle, S., McHugh, T.D., Taylor, P.E. 2013. Antibacterial activity of head-to-head bis-benzimidazoles. Int J Antimicrob Agents, 42(4), 361-6.
- [16] Gong, J.X., He, Y., Cui, Z.L., and Guo, Y.W. 2016. Synthesis, spectral characterization, and antituberculosis activity of thiazino[3,2-A]benzimidazole derivatives. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 191(7), 1036-1041.
- [17] Zhang, H.Y., Wang, B., Sheng, L., Li, D., Zhang, D.F., Lin, Z.Y., et al. 2014. Design and synthesis of novel benzimidazole derivatives as anti-tuberculosis agents. Yao Xue Xue Bao, 49(5), 644-51.
- [18] Keri, R.S., Rajappa, C.K., Patil, S.A., and Nagaraja, B.M. 2016. Benzimidazole-core as an antimycobacterial agent. Pharmacol Rep, 68, 1254-1265.
- [19] Yoon, Y.K., Ali, M.A., Choon, T.S., Ismail, R., Wei, A.C., Kuma, R.S., and et al. 2013. Antituberculosis: synthesis and antimycobacterial activity of novel benzimidazole derivatives. Biomed Res Int, 926309.
- [20] Klimesová, V., Kocí, J., Pour, M., Stachel, J., Waisser, K., Kaustová, J. 2002. Synthesis and preliminary evaluation of benzimidazole derivatives as antimicrobial agents. Eur. J. Med. Chem. 37, 409-418.
- [21] Juárez, R.J., Chávez, W.C., Ramírez, N.J., Ramírez, G.I.C., González I. U., Mejía, G.M., et al. 2020. Synthesis and antimycobacterial activity of 2,5-disubstituted and 1,2,5-trisubstituted benzimidazoles. Front Chem, 8, 433.