فنيلة المضاد الحيوي اوكسي تترا سايكلين

(تيرا ميسين)

ودراسة فعالية الناتج المتوقعة المضادة للبكتريا

د. كريم سالم عباس

كلية التربية الأساسية – جامعة ميسان

تحسين صدام فندي

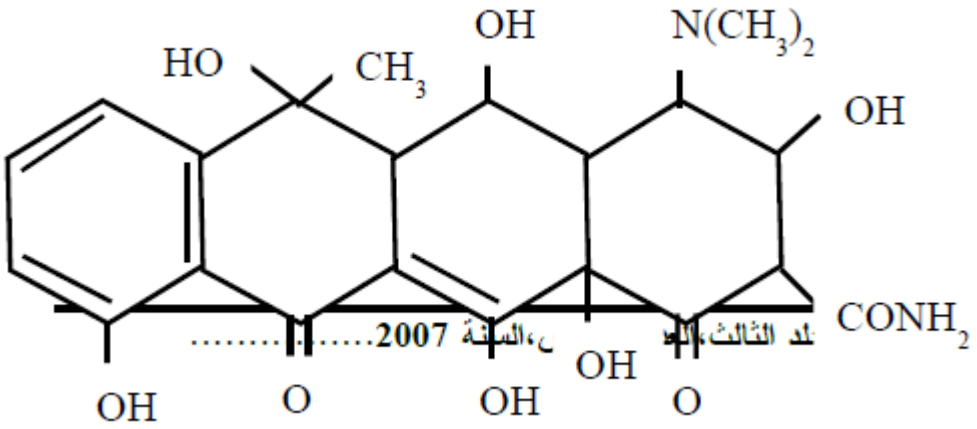
كلية التربية – جامعة ميسان

الخلاصة : في هذه الدراسة تم إجراء تحوير كيمياوي للمضاد الحيوي تيرامايسين (اوكسي تيترا سايكلين) وذلك باستبدال بروتوني مجموعة الأميد بمجموعتي فاينيل من خلال معاملة التيرامايسين مع خلات فاينيل وكاربونات البوتاسيوم وباستخدام المذيب ثنائي مثيل الفورماميد لوحظ بان الناتج قد عوض بمجموعتي فاينيل وهذا ما أشارت إليه القياسات الفيزياوية والتشخيصات الطيفية والتي شملت طيف الأشعة تحت الحمراء وطيف الأشعة فوق البنفسجية.

كذلك تم دراسة الفعالية المضادة للبكتريا للمشتق المحضر والتي تمثلت بتحديد أقطار التثبيط والتركيز التثبيطي الأدنى والسمية الخلوية .

المقدمة :

بعد التعرف على الستربتومايسين عام 1944 ازدادت البحوث الهادفة لاكتشاف العديد من المضادات الحيوية وأول اكتشاف مهم تم بعد ذلك كان في عام 1948 عندما استخلص مركبا كيميائيا من الاستنباتات البكتيرية للستربتومايسين من النوع (anreofaciens) والذي اظهر فعالية ملحوظة تجاه الحميات وبالذات التيفوئيد ولقد أطلق عليها في حينها اسم ايرومايسين (Aureomycim) بعد ذلك تم عزل مركب أخر أطلق عليه التيرامايسين (Terramycim) من استنبات الستربتومايسين من النوع (rimosus)ولقد اظهر بأنه فعّال جدا اتجاه مرض التراخوما ولقد كانت الدهشة كبيرة عندما تم تحويل الأيريومايسين إلى التيرامايسين من خلال إجراء هدرجة محفزة لليوروميسين إلى التيرامايسين وقد صنف هذا النوع من المركبات بالتتراسايكلينات (2 ، 1 [Tetracyclines]] بعد ذلك بدأت البحوث تنصب على إيجاد التراكيب الكيميائية لهذه المركبات ولقد كان التركيز منصب في البداية على إثبات تركيب التيرامايسين وكان لبحوث البروفسور وودورد (woodward) دورا بارزا في هذا المجال وقد استطاع في عام 1953 إيجاد التركيب الصحيح لمركب التيرامايسين معتمدا على ملاحظاته العلمية والحقائق التي استخلصها من التفاعلات الكيميائية وهذا التركيب هو (3).



Terramycine (oxytetracycline)

$C_{22}H_{24}N_2O_9$

إن عملية تثبيط أو قتل البكتريا من قبل المضاد الحيوي التيرامايسين تتم من خلال ارتباطه مع ثلاثين وحدة رايبوسومية عائدة للبكتريا مما يمنع حدوث الخطوات الأولية لارتباط الجزيئات اللازمة لعملية تخليق البروتين ، أما التأثير الجانبي للتيرامايسين فقد لوحظ من خلال ارتباطه مع رايبوسوم الإنسان وعند الجرعات العالية فقط [4] . المعلومات المتعلقة بالتتراسايكلين ومشتقاته هي من موضوع الأدبيات [10 – 5].

إن الهدف من البحث هو تحضير مشتق جديد من مجموعة التتراسايكلينات متوقعا له إظهار فعالية بايلوجية عالية مقارنة بالمضاد الحيوي القياسي (تيرامايسين) .

الجانب العملي:

1.تم اختبار نقاوة المركب المحور بتقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة : diethyl (مكون من mobile phase)باستخدام طور متحرك T.L.C(بنسب 60:30:10 حجما على التوالي ether: acetic : acid : methanol

قيست درجة انصهار الناتج وبدون تصحيح باستخدام جهاز:

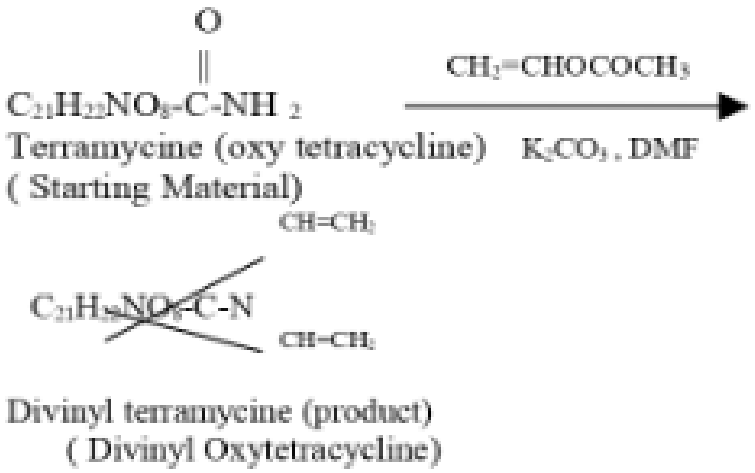
Melting point apparatus electrothermal

أما بالنسبة لطيف الأشعة تحت الحمراء للمركب المحضر فقد تم قياسه باستخدام جهاز – Pye Unicam Sp – 300 Spectrophotometerوسجل طيف الأشعة فوق البنفسجية عن طريق إذابة المركب المحور في الميثانول وبتركيز 10 مولاري وفي الماء بنفس التركيز باستخدام جهاز–Pye) Unicam Sp8– 100 Ultraviolet – Spectrophotometer)أما تحديد خواص الفعالية المضادة للبكتريا فقد أنجزت في مختبرات قسم علوم الحياة كلية العلوم جامعة البصرة.

II– طرائق العمل:

A–تحضير المركب المحور (فاينايل تيرامايسين)

إن تحضير المركب فينايل تيرامايسين (Vinyl terramycine) تم وفق المعادلة الكيميائية التالية:



في جهاز التقطير الارجاعي (reflux) المزود بخلاط مغناطيسي (magnetic stirrer) وضع (mmol,2,76g) من المضاد الحيوي التيرمايسين و (0,60g,4mmol) من كاربونات البوتاسيوم والمذابان في (ml30) من ثنائي مثيل الفورمامايد (DMF) مضاف الى المزيج زيادة من خلال الفاينايل (Vinyl acetate) وبحدود (14 ml_11) ولمدة سبع ساعات يستمر التفاعل مع التحريك عند درجة حرارة ($80C^{o}$) وبعد الانتهاء من التفاعل (المتابعة بواسطة تقنية الطبقة الرقيقة T. L.C) يسكب المزيج في (60 ml)من الايثر و (25 ml) من الماء في قمع الفصل ثم يجفف الجزء العضوي المستخلص بواسطة كبريتات الصوديوم اللامائية ثم يرشح ويبخر لحد التجفيف ، إن المشتق الخام الناتج تعاد بلورته بواسطة الأسيتون للحصول على البلورات النقية.

B–دراسة خواص الفعالية المضادة للبكتريا:

1–تحديد أقطار التثبيط:

لدراسة الفعالية العالية المضادة للبكتريا للمضاد المحور مقارنة بالمضاد القياسي ، اتبعت طريقة [11] Bauerإذ يحضر وسط ملر هنتن ملقح (E.coli NCTC 5933, Staphylococcus aureas NCTC 6571) بكائنات الاختبار وهي كلاً على حدة من مزرعة سائلة بعد أن يجفف النمو فيها إلى 10 خلية / مل، حيث يتم غمس أقراص ورقية معقمة ذات نصف قطر (mm6) نوع whatman 3 في محلول المضاد المحور والقياسي كلا على حدة ثم تترك لتجف قليلا . بعد ذلك توضع الأقراص المشبعة بالسائل على تراكيز مختلفة من المضاد القياسي والمحور وتحضن

بدرجة حرارة ($37C^{o}$) ولمدة من 24 –48 ساعة . بعدها تقاس مناطق التثبيط بوحدة المليمتر.(mm)

2. تحديد التركيز المثبط الأدنى:

لتحديد التركيز المثبط الأدنى للمضاد المحور والمضاد القياسي اعتمدت تقنية Plate Agar Diffusion) (على وسط ملر هنتن حيث استخدمت تراكيز مختلفة تراوحت من 50 – 0.1 مايكرو غرام / مل . من كل من المضاد المحور والمضاد القياسي كلا على حدة تجاه تسعة سلالات جرثومية ومرضية قياسية سالبة وموجبة لملون كرام (12).

3. تحديد التركيز السام لكريات الدم الحمراء للإنسان:(Cytotoxicity)

حدد التركيز السام للمركب المحور والمضاد القياسي ضد كريات الدم الحمراء للإنسان وذلك باستخدام معلق يحتوي على (1) مل من الدم المذاب في (20) مل من المحلول الفسيولوجي الملحي Normal ((Saline، حضرت تراكيز مختلفة من المضاد المحور تراوحت بين (1000 – 0.05) جزء بالمليون وتراكيز مماثلة من المضاد القياسي تم إذابتها في محلول ثنائي مثيل سلفوكساييد . (DMSO) نضيف حجم مقداره (100) مايكرو لتر من كل تركيز إلى (2) مل من معلق الدم ثم تلاحظ العكورة بعد مرور (60) دقيقة . التركيز الذي ينتج عن معلق دم رائق هو التركيز السام والمحلل لكريات الدم الحمراء (13).

النتائج والمناقشة:

إن التتراسايكلين القياسي (التيرامايسين) يمتلك قابلية الذوبان في الميثانول بصورة عالية مقارنة بذوبانه في المذيبات العضوية الأخرى مثل خلات الاثيل ورابع كلوريد الكاربون بينما يكون شحيح الذوبان في الماء في حين اظهر المضاد المحور (فاينايل تيرامايسين) بالإضافة إلى قابليته على

الذوبان في المذيبات العضوية قابلية ذوبان في المذيب القطبي الماء وهذا نتج عن قطبية المركب الأصلي المتأينه من وجود ست مجاميع هيدروكسيل وثلاث مجاميع كاربونيل بالإضافة إلى الزيادة التي حصلت في قطبية المركب الناتج بفعل استبدال بروتوني الأميد بمجموعتي فاينايل . لقد تم اختبار نقاوة المضاد الحيوي المحور باستخدام تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة من خلال ظهور بقعة واحدة لاصقة (Fluorecent) تحت الأشعة فوق البنفسجية وكانت قيمة Rf للمضاد المحور 0.75 . كذلك أظهرت النتائج بان قياس درجة انصهار بلورات التيرمايسين المحور أعلى من درجة انصهار التيرمايسين القياسي 174 – 178 (C° dec).

تشير نتائج القياسات الطيفية إلى صحة توقعاتنا بإحلال مجموعتي الفنايل محل بروتوني الأميد حيث اظهر طيف الأشعة فوق البنفسجية للمضاد المحور بان امتصاصه يعاني من ظاهرة الانزياح باتجاه المنطقة الحمراء (Red shilt) بفعل إحلال مجموعتي الفنايل في المركب المحضر والتي تزيد من عملية التعاقب الالكتروني بينها وبين مجموعة الأميد ، وهذا يؤدي إلى حدوث تداخلات من نوع dipole dipole interaction و التأصر الهيدروجيني H – bonding والذي بدوره يزيد من شدة الامتصاص مع زيادة قطبية المذيب وهذا ما نلاحظه عند الانتقال من الميثانول إلى الماء ومما يؤكد إحلال مجموعتي الفاينيل في المركب المحضر هو اختفاء الحزمة –NH في طيف الأشعة تحت الحمراء العائدة له . القياسات الفيزياوية والطيفية موضحة في الجدول رقم (1).

إما بالنسبة لدراسة خواص الفعالية البايولوجية فتشير إلى إن أقطار التثبيط التي أبداها المضاد المحور ضد اثنين من الجراثيم المرضية القياسية

هي أعلى بكثير من تلك التي أبداها المضاد القياسي ضد نفس الجراثيم.

(جدول 2a)

حددت قيم تركيز التثبيط الأدنى (MIC) للمضاد المحور والمضاد القياسي ضد تسع من الجراثيم المرضية حيث يوضع جدول (b2) التركيز التثبيطي الأدنى بالمايكرو غرام / مل لكل من المضاد المحور والمضاد القياسي والذي يظهر بان الـ MIC للمضاد المحور اقل من المضاد القياسي مما يؤكد ان فعالية المضاد المحور أقوى من المضاد القياسي وهذا حصل ضد التسع جراثيم المرضية دون استثناء

أما بالنسبة للدراسة السمية الخلوية (Cytotoxicity) فوجد أن المركب المحور ذو تأثير سام ومحلل لكريات الدم الحمراء عند تركيز (750) جزء بالمليون مقارنة بالمضاد القياسي (600) جزء بالمليون كما هو موضح في جدول(2c).

جدول (1) : القياسات الفيزياوية والطيفية للمضاد المحور فاينايل تيرامايسين (Viny1 terramycine

Name of product	Divinyl terramycin (divinyl oxytetracycline)
Molecular Formulae	C22H24N2O9
Molecular weight	g/mole 460
Melting point	C0 270 -- 266
معدل النسيابية(Rf)	0,75
القيم الساسية لطيف الشعة تحت الحمراء IR(التردد التساعي (Cm−1 S=Strong m=Medium w= weak	-- OH (3654 – 3658 m) C−H (2960 m) aliphatic C−H (3116 w) aromatic C=O (1710 s) ketone C=O (1664 s) amide C=C (1675 w) alkene C=C (1570 w) aromatic C−N (1260 m) vinyl −N
λmax الطول الموجي العظم(nm)	In 10 –4 MeOH in 10 –4 H2O 282 nm 292 nm

جدول رقم (2) خواص الفعالية البيولوجية للمضاد القياسي والمضاد المحور

الجرثومية	IZ للمضاد القياسي						IZ للمضاد المحور					
	التركيز بالميكروغرام / مل						التركيز بالميكروغرام / مل					
	50	100	150	200	250	300	50	100	150	200	250	300
S.aureas NCTC 6571 (+(Gr	3	9	10	14	19	20	6	13	15	19	21	23
E.coli NCTC 5933(Gr (-	2	3	5	8	12	14	3	5	8	11	13	19

2a: قيم أقطار التثبيط (IZ mm)

b 2 : قيم التركيز التثبيطي الأدنى (MIC µg/ml)

الجرثومة	فترة الحضانة بالساعة	قيم MIC بالميكروغرام / مل	
		المضاد القياسي	المضاد المحور
1	24	0.9	0.4
2	24	1.0	0.6
3	24	30	19
4	24	30	15
5	24	2	0.9
6	24	1.5	0.7
7	48	1.8	0.8
8	48	1.5	0.6
9	24	40	23

2c: قيم السمية الخلوية (Cytotoxicity ppm)

السمية ضد RBC بعد ساعة واحدة	التركيز ppm	المادة
(Not Toxic (NT	--	DMSO
NT	100	المضاد المحور
NT	150	
NT	200	
NT	250	
NT	500	
NT	600	
NT	700	
T	750	
T	850	
NT	100	المضاد القياسي
NT	150	
NT	250	
NT	500	
T	600	
T	700	
T	750	
T	850	

DMSO = Dimethyl sulfoxide

RBC= Red Blood Cell

Ppm= part per million

IZ =Inhibition zone

MIC =Minimum Inhibitory concentration

العزلت والجراثيم المرضية المستخدمة في هذه الدراسة هي :

1. Staphylococcus aureas NCTC 6571
2. Escherichia coli NCTC 5933
3. Pseudomonas auroginosa NCTC 6750

4. Klebsiella pneumoniae (clinical Isolate)

5. Protew vulgaris (Clinical isolate)

6. Bacillus subtilis PCI 219

7. B.pumilis NCTC 8241

8. P.auroginosa (clinical isolate)

9. Streptococcus pneumonia NCTC 6303

المصادر :

1. D.L.J.Clive, " The Chemistry Of Tetracyclines " Quart.

Rev.22,435 (1968) .

2 . د.رعد إسماعيل الحمداني و د. مقداد توفيق ايوب ، الكيمياء العضوية

المتقدمة، الفصل الرابع- المضادات الحيوية 137) – 139 (1990

3. Wood ward , The Total Synthesi of Cephalosporines

C.J.Am. Chem. Soc.88,852 (1966)

4.Beleh, 2003, M. Beleh, Medicinal Chemistry 412 Notes, Protein Biosynthesis pp.4-8 (2003).

5. T. Takita, Y. Muraoka, T. Nakatani and H. Naganawa, J. Antibiot., 31(1978).

6. Davis, 2001,J.Davis, There's Hope for slowing Antibiotic Ressistance. WebMD.Jan. 17,2001.Full Text (Web page.)

7.Chopra 2002, I.Chopra, New Developments in Tetracyclines Antibiotics:

Glycycyclines and Tetracycline Efflux pump Inhibitors. Drug Resistance

Updates,5(3-4) : 119-25,2002 Jul- Aug. Full Text (Web Page) / Full Text

(PDF File).

8. Bhattachrya Sk, National Institute of Cholera and Enteric Diseases (2002)." An evaluation of current cholera treatment ".Exper Opin Pharmacother

4(2),141-6,PMID 12562304.

9.Paris VK(2001), "Cholera Prim.Care. Update Ob Gyns 8 (3),106-109 PMID 11378428.

10.Berardi, 2003, R.Berardi, Therapeutics 432, Helicopacter pylori - Associated Ulcers pg 14 (2003).

11. A.Bauer, W.Kinby and M.Turck, Antibiotic Susceptibility testing by a standardization single disk, Amer.J.Clin.Pathol,45,493(1966)

12. L.J.V.Piddxk, "Techniques used for determination of ant microbial

resistance and sensitivity in Bact. "J.Appl.Bacterial, 68, pp.307 - 318 (1990).

13- M.G.Naiv; A .R.Putnam; S.K.Mi shar ;M.H.ulks;W.H.Taft;J.E.Kellar and D.G.Lynn; faerifunging; Anew proad spectrum antibiotic from S. griseus var autotrophicus, J.of Natural Products, 52, pp.797-809 (1980).

A Vinylation of Oxytetracycline (Terramycine) and study of the products Expected Antibacterial activity

Dr.Kareem. S. Abass

College of Basic Education

Missan University

Tahseen. S. Fendi

College of Education

Missan University

Abstract :

In this study chemical modification has been achieved for terramycine (oxytetracycline), antibiotic by replacement the protons of amide group by vinyl group, through the treatment of terramycine with vinyl acetate and potassium carbonate in the presence of dimethyl formamide (DMF) as solvent. It was noted that the product has substituted vinyl groups, indicated by physical measurements, and spectroscopic identifications (UV and IR spectra). Also the study was determined the antibacterial activity of the prepared derivative represented by inhibition diameters, minimum inhibitory concentrations and cytotoxicity.