تحوير كيميائي جديد للمضاد الحيوي الارثرومايسين ودراسة فعاليته البايولوجية ضد الجراثيم المرضية السالبة والموجبة لملون كرام

أ.م.د كريم سالم عباس أ.م.د. كوثر هواز مهدي أ.م. داود سلمان علي
قسم الكيمياء / كلية العلوم / جامعة البصرة

المقدمة :

تتميز مجموعة مركبات الارثرومايسين بكونها مضادات حياة بكتيرية Bacterial antibiotic ذات مدى واسع من الفعالية ضد مايكروبية (Stasis et. Al 1998) . وتثبط هذه المجموعة من المضادات نمو العديد من الكائنات البكتيرية الموجبة لملون كرام ، في حين بعض الكائنات السالبة لملون كرام وبعض الفايروسات الكبيرة تكون حساسة للارثرومايسين ايضاً (Alstead et al, 1969) ويعد الارثرومايسين مضاداً مثبطاً لنمو البكتريا عند التراكيز الواطئة منه بينما يكون قاتلاً للبكتريا عند استخدام تراكيز مرتفعة (Reynolds, 1982, Katzung, 1989) .

يتميز الارثرومايسين بفائدة سريرية في معالجة الكثير من الاصابات مثل الخناق وامراض ذات الرئة وامراض الاميبا المعوية (Olienick, 1975) . هذا وان فعالية الارثرومايسين في تثبيط العديد من الكائنات المجهرية تكمن في وجود مجاميع وظيفية في جزئ الارثرومايسين تشترك في التفاعل مع مواقع الربط لتكوين معقد الرايبوسوم وتشتمل تلك مجاميع هيدروكسيد 11 ، 12 ومجموعة (9-keto) على حلقة اللاكتون وكذلك مجموعة
(2 – hydroxyl) ومجموعة (3-dimethyl amine) على السكر الاميني desosamine ومجموعة (3 – methoxy) على سكر Clasinose (Mao & Putterman 1969) لغرض تحسين امتصاص المضاد من قبل القناة الهضمية والحصول على مستويات مصلية جيدة فقد جرى في هذه الدراسة تحوير كيميائي لتركيب الاثرومايسين وذلك بتحويره محلياً ومن مواد اولية رخيصة ومتوفرة وتحضيره بشكل أملاح بعملية التوسله (Tosylation) وتهدف الدراسة الحصول على مضاد حيوي محور جديد ذو فعالية عالية في النظام الحي ضد الجراثيم المرضية فضلاً على التقليل من سميته .

الخلاصة :

تم في هذه الدراسة تحوير المضاد الحيوي الارثرومايسين كيميائياً بادخال مجاميع السلفونيل والحصول على مركب جديد محور والذي ابدى فعالية عالية ضد الجراثيم المرضية القياسية السالبة والموجبة لملون كرام . بينت نتائج النقاوة والمتابعة بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وقياس درجة الانصهار (MP) ان المركب الناتج من التحوير ذو نقاوة عالية جداً . كما درست الخصائص الحيوية الاخرى للمركب المحور وذلك بتحديد التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) ، تم تقدير الجرعة القاتلة الوسطى (LD_{50}) له . كذلك تم التاكد من هوية المركب المحور عن طريق دراسة طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) وطيف الاشعة فوق البنفسجية (UV) وكذلك اختبرت ذائبيته في المذيبات العضوية واللاعضوية وقورنت النتائج مع عينة الارثرومايسين القياسية .

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المواد وطريقة العمل :

١. العازلات والجراثيم المرضية المستخدمة في هذه الدراسة هي :

1- Staphylococcus aureus NCTC 6571.
2- S. aureus ATCC 29213
3- S. aureus (clinical isolate)
4- E. coli. NCTC 5933
5- Pseudomonas auroginosa NCTC 6750.
6- Protew vulgaris NCTC 4175
7- Bascillus subtilis PCI 219
8- B. pumilis NCTC 8241
9- Serratia Sp. (clinical isolate)
10- Klebsiella pneumoniae ATCC 10031
11- Streptococcus pneumoniae ATCC 6308.
12- Streptococcus pneumoniae (clinical isolate)

٢. الارثرومايسين القياسي المستخدم في الدراسة تمثل كبسول انتاج شركة سامراء لصناعة الادوية (SDI) .

٣. البريدين مجهز من قبل شركة (Fluka) .

٤. تولوين (- 4 – سلفونايل كلوريد) مجهز من شركة (Aldrich) .

طريقة العمل :

١. طريقة عمل تحضير المشتقات التوسلية للمضادات الحيوية :

في جهاز التقطير الارجاعي (Reflux) المحمول على خلال مغناطيسي (Magnetic Stirror) وضع (0.1) مول من المضاد الحيوي الارثرومايسين والمذاب في 30سم^3 البريدين الجاف مضافاً الى (0.11) مول من تولين -4- سلفونايل كلورايد (وقد نقي باعادة بلورته من مزيج من البنزين والاثير البترولي درجة غليانه (60-40ْم) . يستمر التفاعل مع التحريك عند درجة حرارة الغرفة (25م) ولمدة ثلاث ساعات وبعد الانتهاء من التفاعل (المتابعة بواسطة تقنية الطبقة الرقيقة TLC) يسكب المزيج في (50) سم^3 من الكلورفورم و (25 سم^3 من الماء ثم يغسل بمحلول بيكاربونات الصوديوم الى ان يصبح المحيط متعادلاً . تجفف الطبقة العضوية بواسطة كبريتات الصوديوم ثم ترشح وتبخر لحد التجفيف . ان المشتق الخام الناتج تعاد بلورته بواسطة الميثانول للحصول على بلورات بيضاء .

٢. تم اختبار نقاوة المركب المحور بتقنية (TLC) باستخدام طور متحرك (mobile phase) مكون من (NH_4OH : methanol : isopropyl ether) بنسبة (75:35:2)حجماً على التوالي (Hanaa, 2000) .

٣. قيست درجة انصهار المضاد المحور باستخدام جهاز Melting point apparatus electrothermal \ England .

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

٤. تم قياس طيف امتصاص الاشعة تحت الحمراء للمضاد المحور باستخدام مطياف الاشعة تحت الحمراء (Pye-Unicam SP8-100 Spectrophotometer) وباستخدام اقراص (KBr) .

٥. سجل طيف الاشعة فوق البنفسجية عن طريق اذابة كمية قليلة من المضاد المحور في الماء باستخدام جهاز (Pye-Unicam SP8-100 Spectrophotometer)

الخصائص البايلوجية :

١. دراسة الفعالية البايلوجية للمضاد المحور مقارنة بالمضاد القياسي :

اتبعت طريقة (Bauer, 1996) اذ يحضر وسائط ميلر هنتن ملقح بكائنات الاختبارية وهي Staphylococcus aureus NCTC 657 و E. coli NCTC 5933 كلاً على حدة من مزرعة سائلة بعد ان يخفف النمو فيها الى 10^6 خلية / مل . حيث يتم غمس اقراص ورقية معقمة ذات نصف قطر (6ملم) نوع Whatman (3) في محلول المضاد المحور والقياسي كلاًعلى حده ثم تترك لتجف قليلاً . بعد ذلك توضع الاقراص المشبعة بالسائل الحاوي على تراكيز مختلفة من المضاد القياسي والمحور وتحضن بدرجة 37C مدة (24-48) ساعة بعدها تقاس اقطار مناطق التثبيط مقاسة بوحدة مليمتر .

٢. تحديد التركيز المثبط الادني (MIC_2) :

لتحديد التركيز المثبط الادنى للمضاد المحور والمضاد القياسي اعتمدت تقنية (Plate Agar Biffusion) على وسط ميلر هنتن حيث استخدمت تراكيز مختلفة تراوحت من 0.1 الى 50 مايكروغرام/ مل من كل المضاد القياسي والمحور كلا على حده اتجاه اثنى عشر سلالة جرثومية ومرضية قياسية سالبة وموجبة لملون كرام (Piddock 1990) .

٣. تحديد التركيز السام لكريات الدم الحمراء للانسان Cytotoxicity :

حدد التركيز السام المحور والمضاد القياسي ضد كريات الدم الحمراء للانسان وذلك باستخدام معلق يحتوي على ١مل من الدم المذاب في 20مل من المحلول الفسيولوجي الملحي Normal Saline حظرت تراكيز مختلفة من المضاد المحور تراوحت بين 0.05 الى 1000 جزء بالمليون وتراكيز مماثلة من المضاد القياسي ثم اذابتها في محلول ثنائي سلفوكساييد (DMSO) . اضيف حجم مقداره 100 مايكرولتر من كل تركيز الى 2مل من معلق الدم ثم تلاحظ العكورة بعد مرور 60 دقيقة . التركيز الذي ينتج عنه معلق دم رائق هو التركيز السام هو التركيز السام والمحلل لكريات الدم الحمراء (Nair et al 1989) .

٤. تعيين الجرعة القاتلة الوسطى (LD_{50}) للمضاد المحور ومقارنة مع المضاد القياسي وذلك باستخدام فئران مختبرية من نوع Albino من سلالة Balb C من جنس الذكور .

وقسمت الى اربع مجاميع بواقع عشرة فئران لكل مجموعة اضافة الى مجموعة السيطرة التي حقنت تحت الجلد ماء مقطر معقم ، ثم حقنت مجاميع الفئران الاربعة بتراكيز واطئة ومرتفعة تراوحت من (250) ملغم / كغم الى (3000) ملغم / كغم .

ثم حسبت (LD_{50}) بعد مراقبة الحيوانات المعالجة مدة (72) سعة وسجلت اعداد الوفيات وقد اجري التحليل الاحصائي بطريقة (Probbit analysis) كما وصفت من قبل (Armitage 1971) وبذلك حددت (LD_{50}) للمادة المحورة وقد قورنت مع القياسي .

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

النتائج :

دلت نتائج الاختبارات الفيزيوكماوية على ان الارثرومايسين القياسي يمتلك قابلية الذوبان في الكحولات الواطئة (ايثانول وميثانول) والمذيبات العضوية مثل الكلورفورم وخلات الاثيل ، بينما يكون عديم الذوبان في الماء في حين لوحظ ان الارثرومايسين المحور يتميز بقابليته الشديدة للذوبان في الماء بسبب ظهور مجاميع قطبية جديدة في التركيب الكيميائي للمضاد المحور . وقد تم اختبار نقاوة المضاد الحيوي المحور في استخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من خلال ظهور بقعة واحدة لاصقة (Flourecent) تحت الاشعة المرئية والاشعة فوق البنفسجية بلون ابيض مائل الى الزرقة وكانت قيمة Rf للمضاد الحيوي المحور (0.86) في حين كانت قيمة (R_f) للارثرومايسين القياسي (0.69) وكما هو موضح بالجدول رقم (5) .

كذلك اظهرت ان قياس درجة انصهار بلورات الارثرومايسين المحور هي اعلى بكثير من درجة انصهار الارثرومايسين القياسي وكما موضح بالجدول رقم (5) . أظهرت نتائج طيف الاشعة فوق البنفسجية للارثروماسين المحور الموضحة في الجدول رقم (5) والشكل رقم (1) امتلاكه قيمة امتصاص واحدة عند الطول الموجي (273nm) وبامتصاصية مقدارها (0.097) مقارنة مع الارثرومايسين القياسي الذي يمتلك قمة امتصاص واحدة في طول موجي (280nm) .

اما نتائج اختبار امتصاص طيف الاشعة الحمراء (I.R) باستخدام اقراص (KBr) فقد تم تشخيص المجاميع الفعالة الاساسية للارثرومايسين وكما هي موضحة بالجدول رقم (6) والشكل (2) مقارنة بالارثرومايسنين القياسي والمشخصة في المصدر (Clark 1974) .

تحديد اقطار التثبيط :

يشير الجدول رقم (1) الى اقطار التثبيط التي ابداها من المضاد المحور والقياسي ضد اثني عشر نوعاً من الجراثيم المرضية القياسية والعزلات السريريه ومن الجداول يلاحظ ان اقطار التثبيط للمضاد المحور اعلى بكثير من القياسي .

تحديد التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) :

حددت قيم (MIC) للمضاد المحور والقياسي ضد اثني عشر نوعاً من الجراثيم المرضية حيث يوضح الجدول رقم (2) التركيز المثبط الادنى بالمايكروغرام / مل لكل من المضاد المحور والذي كانت قيمته فيه اقل من المضاد القياسي ، مما يؤكد ان فعاليته اقوى من المضاد القياسي وهذا حصل ضد الاثني عشر جرثومة دون استثناء .

السمية الخلوية :

وجد ان المركب المحور ذو تأثير سام ومحلل لكريات الدم الحمراء للانسان عند تركيز (800) جزء بالمليون بالمقارنة مع المضاد القياسي (600) جزء بالمليون كما هو موضح في الجدول رقم (3) .

تحديد الجرعة القاتلة الوسطى (LD_{50}) :

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام ورقة وحدة الاحتمالية كما في الجدول رقم (4) ان قيمة (LD_{50}) للمضاد المحور كانت (2500) ملغرام / كغم مقارنة بالقياسي والتي كانت (1500) ملغرام / كغم .

ISSN-1994-697X

Urgent

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المناقشة :

من ملاحظة النتائج يمكننا الاستنتاج ان الارثرومايسين المحور مادة نقية قد تم الحصول عليها مختبرياً بطريقة جديدة وبسيطة وقد تم التأكد من نقاوته وذلك من خلال الدراسات الكيموحيوية ومقارنتها مع المضاد الحيوي القياسي ، كذلك تشير النتائج الحصول على مركب جديد محور اثبتت هويته الكيميائية من خلال الدراسات الطيفية ودرجة الانصهار وتقنية (TLC) .

ويمكن الاستنتاج ايضاً ان المضاد المحور قد أبدى فعالية ذات مدى واسع جداً ضد اثني عشر جرثومة مرضية موجبة وسالبة لملون كرام في الغربلة الاولية (تحديد اقطار التثبيط) وكذلك في دراسة التركيز المثبط الادنى مقارنة مع المضاد القياسي . كذلك ابدى المضاد المحور سمية متوسطة واقل من المضاد القياسي بتأثيره على كريات الدم الحمراء وكذلك الجرعة القاتلة الوسطى ضد الفئران المختبرية.

ونود ان نشير هنا الى ان المضاد المحور قد استخدم في المختبر واضيف الى الاوساط الزرعية التي يراد فيها استبعاد البكتريا الملوثة كبديل عن بعض المضادات الحيوية المستخدمة والغير متوفرة في الاسواق المحلية فأبدى فعالية واضحة في عزل العديد من الاحياء المجهرية التي يراد فيها استبعاد البكتريا الملوثة .

الاستنتاجات :

١. تم تحضير المضاد المحور من الارثرومايسين بطريقة سهلة .
٢. نقاوة عالية للمضاد المحور والذي اثبتته الدراسات الكيمياوية .
٣. فعالية واسعة ضد الجراثيم السالبة والموجبة لملون كرام وامكانية استخدامه للاغراض البحثية في مختبرات المايكروبايولوجي .

جدول رقم (1)

الفعالية الضد بكتيرية للمضاد المحور والقياسي ضد اثني عشر جرثومة مرضية الموجبة والسالبة لملون كرام

Strains	المضاد المحور IZ (mm) التراكيز بالمايكروغرام /مل						المضاد القياسي IZ (mm) التراكيز بالمايكروغرام /مل					
	50	100	150	200	250	300	50	100	150	200	250	300
1	5	11	14	17	20	23	2	7	9	12	18	21
2	5	9	11	14	17	20	1	3	7	10	12	15
3	7	11	15	18	20	30	3	5	9	13	18	22
4	1	3	7	9	12	17	1	1	4	8	11	13
5	1	1	3	5	7	11	0	0	2	6	8	8
6	0	1	3	6	8	13	0	0	0	3	6	8
7	7	9	13	18	22	30	3	7	9	11	19	22
8	7	9	14	17	23	30	7	8	11	18	20	25
9	3	6	8	11	17	22	0	2	6	7	7	13
10	0	0	3	7	12	14	0	0	2	5	9	10
11	1	1	4	8	11	18	0	0	3	7	7	10
12	5	7	11	18	20	23	0	2	2	7	11	13

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Urgent

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول رقم (2)

التركيز المثبط الادنى للمضاد المحور والقياسي ضد اثني عشر نوع من الجراثيم المرضية السالبة والموجبة لملون كرام

الجراثيم المرضية	فترة الحضن بالساعة	قيم MIC بالمايكروغرام/مل	
		المحور	القياسي
1	24	0.3	0.5
2	24	0.3	0.7
3	24	0.3	0.5
4	24	5.5	8
5	24	10	25
6	24	15	<50
7	48	2	3.5
8	48	1.5	5
9	24	3.5	10
10	48	12	25
11	48	25	<50
12	48	25	<50

جدول رقم (3)

التراكيز المستخدمة في اختبار التأثير السمي ضد كريات الدم الحمراء لكل من المضاد المحور والقياسي

المادة	التركيز ppm	السمية ضد RBC بعد ساعة واحدة
DMSO	————	Not Toxic (NT)
المضاد المحور	100	NT
	150	NT
	250	NT
	500	NT
	600	NT
	700	NT
	800	T
	900	T
المضاد المحور	100	NT
	150	NT
	250	NT
	500	NT
	600	T
	700	T
	800	T
	900	T

ISSN-1994-697X

Urgent

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول رقم (4)

التركيز القاتل النصفي للمضاد المحور مقارنة بالمضاد القياسي

المركب	LD_{50} mg\kg
المضاد المحور	2500
المضاد القياسي	1750

جدول رقم (5)

الخصائص الكيموحيوية والفيزيوكياوية لعينة الارثرومايسين المحور والقياسي

عينة الارثرومايسين	تقنية TLC		درجة الانصهار (C°)	اختبار U.V (nm)
	قيمة R_f	لون البقعة		
القياسية	0.69	زرقاء	135 – 140	280
المحورة	0.86	ابيض مائل للزرقة	230 - 235	273

جدول رقم (6)

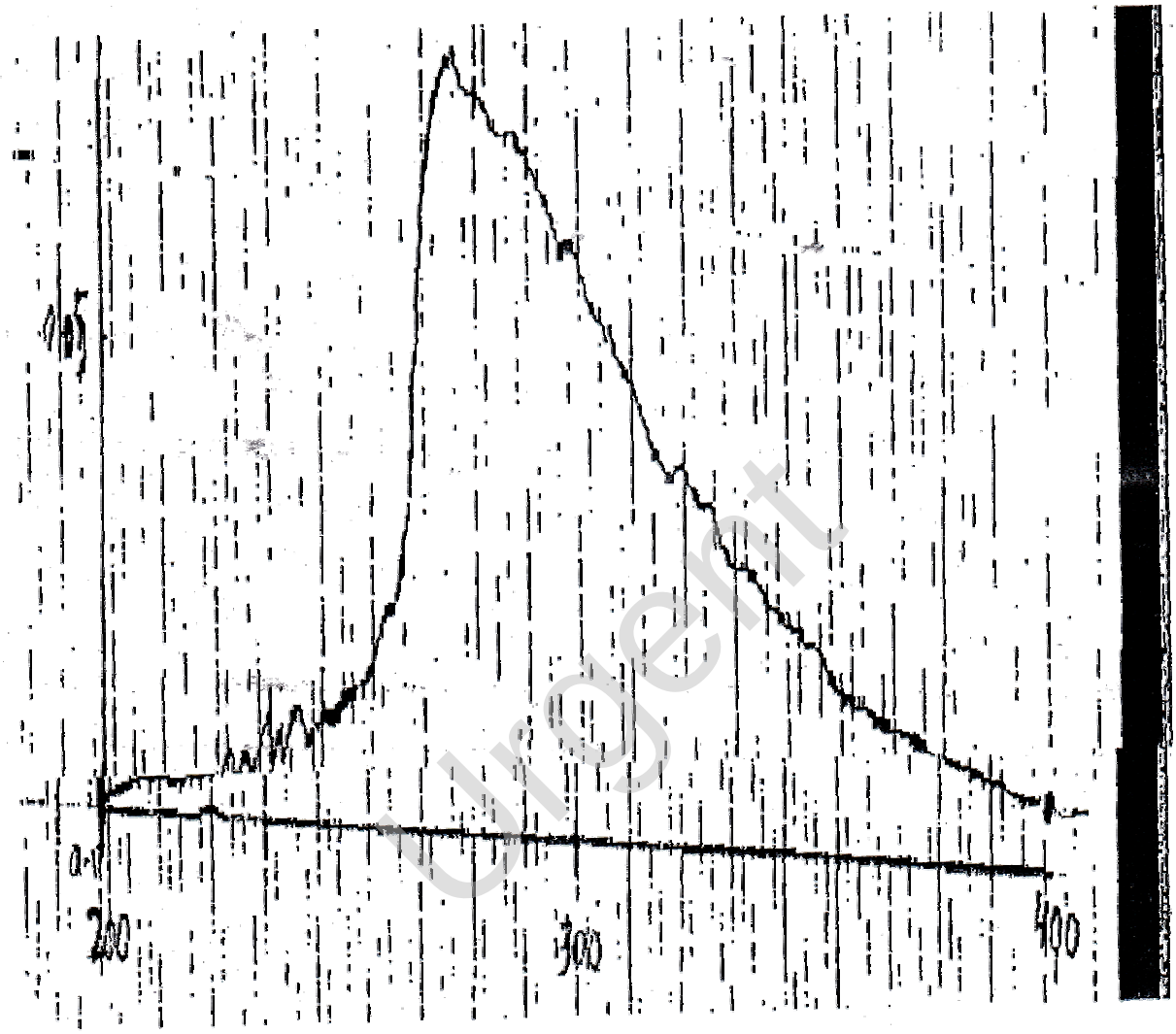
القمم الاساسية التي يظهرها طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) لكل من الارثرومايسين المحور والقياسي

التردد cm^{-1} / المجموعة الفعالة	العينة القياسية	العينة المحورة
Carbony1 (C = O) sterch	1734	1750 – 1370
Ester Amine – N $(CH_3)_2$	1168 – 1108	------
Non-Cyclic Anhydrides	1074	------
C = C Aromatic	------	1600
C – N strech	------	1420 – 1400
S – O sym. strech.	------	1170 - 1140

Urgent

ISSN-1994-697X

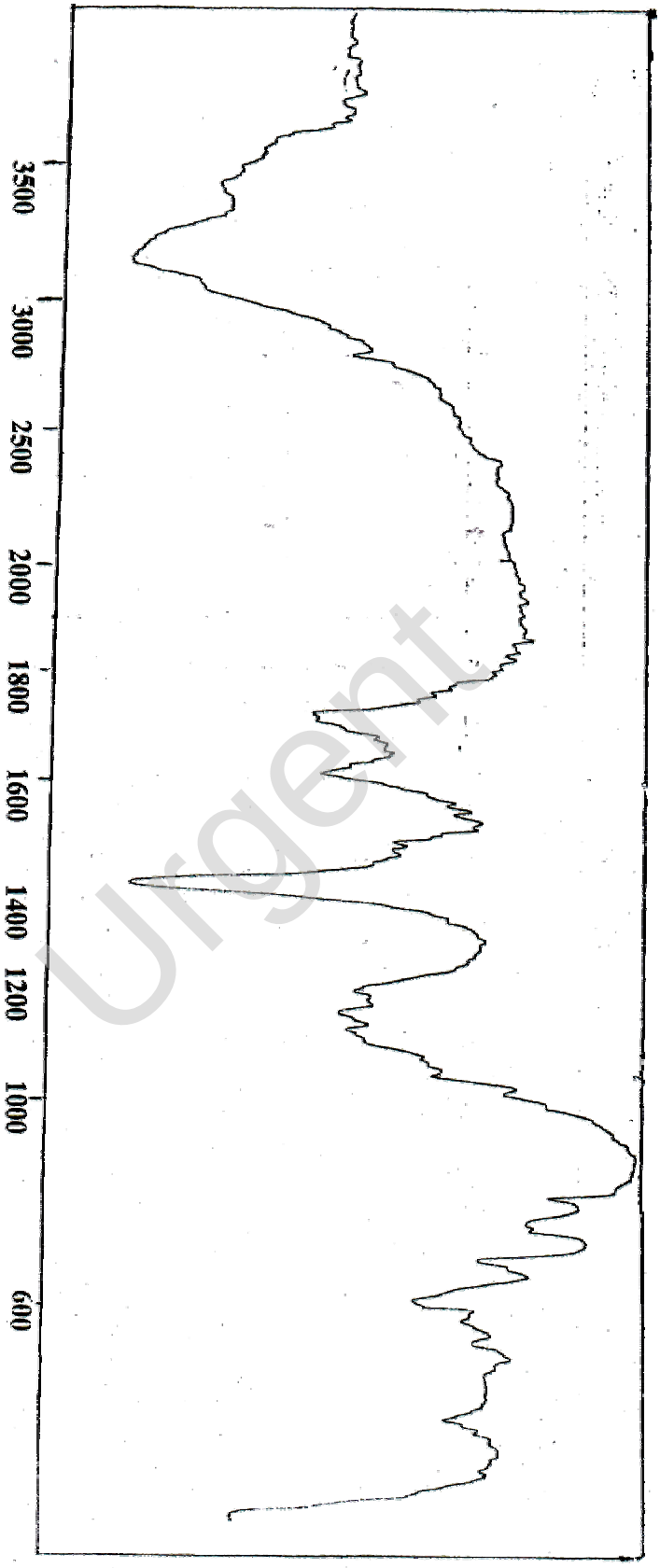
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شكل (1) طيف الاشعة فوق البنفسجية للأرثرومايسين المحور .

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



Urgent

شكل (2) طيف الأشعة تحت الحمراء للأرثرومايسين المحور .

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المصادر :

1. Alstead, S S., Macarthuk, .J.G. and Thomson, T..I. (eds.) (1969) . Antibiotics used as alternatives to penicillin , 22nd ed. (Clinical Pharmacology, Dilling.
2. Armitage , P. (1971). " Statistical Method in Medical Research", Black well Scientific Publications USA.
3. Hanna, J.J. (2000). Production of Erythromycin by saccharopoly spora erthraea isolated from the soil. M.Sc. Thesis , College of Education, University of Basrah
4. Katzung, B.G. (ed.) (1989) . Erthrocine In Cilinical Pharmacology, International edition, (along clinical manual, Prentice-Hall international Inc.) , 139-424 .
5. Moffat , A. C. , Jackson, J. V. , Moss , M. , Widdop, B. & Greenfiled, E. (1986) . " Clarck's isolation & identification of drugs" .
6. Mao, J. C. and Putter man, M. (1969) . Effects of marcolides on peptide bond formation and translocation . Biochemistry , 10 :2054-2060 .
7. Nair, M. G. , Putnam , A.R., Mishar, S.K. , Mulks , M.H. , "Taft, W. H. Keller, J. L. , Miller J.R. Zhu , P.P , Meinhart , J. D. and Lynn , D.G. (1980) . Faeriefungin : Anew broad Spectrum antibiotic from S. griseus var autotrophicus , J. of Natural products , 52 :(797-809).
8. Oleinick , N.L. (1975) . The Erythromycine. In : Antibiotics , Vol. 3 ; Mechanism of action of antinlicrobial and Antitumer agents, eds, Corcoran, J.W. and Hahn , F.E. (Springer - Verlag, Berlin) , 396 - 415 .
9. Piddock , L.J. V. (1990). " Techniques used for determination of anti microbial resistance and sensitivity in Bact." J. Appl. Bacteriol. 68: (307-318).

ISSN-1994-697X

Urgent

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10. Reynolds , J.E. (ed.) (1982) . The microlids . In : Extra pharmacopoeia ,M artin data , 28 ed . (London , The pharmaceutical press) , 1084 - 1085

11. Stassi , D. ; Post , d. ; Sather , M. ; Jackson , M. ; Main , G. (1998) Agenetically engineered strain of Saccharopolyspara erythraed that Produces, 12 – dideoxyerythronrycin as the major fermentation product . Appl. Microbiol . Biotechnol. , 49 : 725 - 731 .

Urgent

ISSN-1994-697X

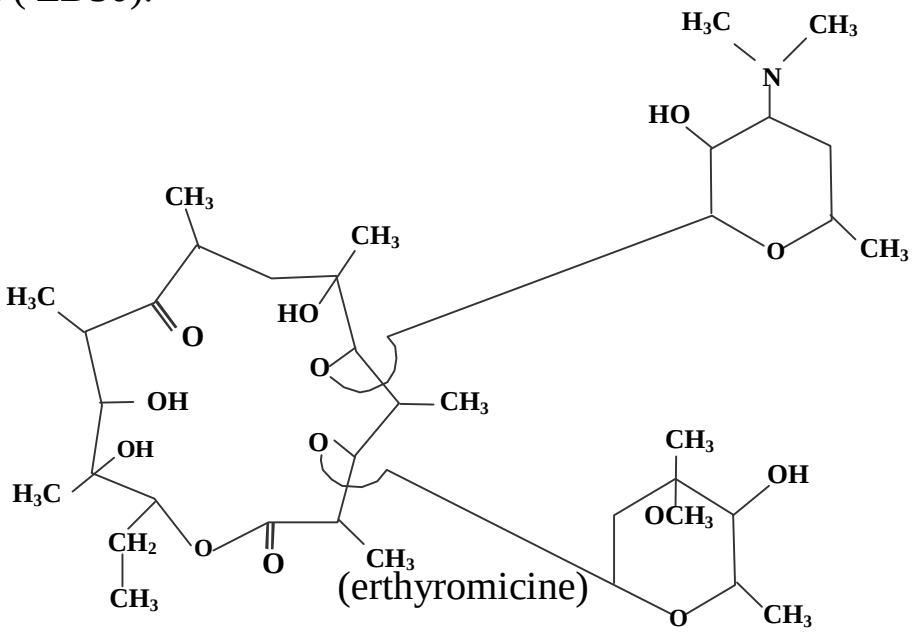
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ABSTRACT

In this study a new erythromycin derivative has been prepared for erythromycin (antibiotic) by introducing a tosyl group instead of the proton which attached to the oxygen atom (proton replacement) . This modification help us to obtain derivative with high biological activity against Gram positive and Gram negative bacteria .

The product is more highly crystalline and higher melting point (MP) by comparison with starting material (erythromycin).It was noted that the product has substituted a tosyl group at position -OH as indicated by ultraviolet(UV) and infrared (IR) spectroscopy identifications . Also the study was determined the antibacterial activity properties of the product , represented by inhibition diameters, minimum inhibitor concentration (MIC), and median lethal dose (LD50).

Urgent



(erthyromicine)

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Urgent

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com