(19) IQ

جمهورية العراق

مجلس الوزراء

الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية

قسم الملكية الصناعية

براءة اختراع

(12)

(11) رقم البراءة: 2954

(21) رقم الطلب: 2000/210

(22) تاريخ تقديم الطلب: 2000/9/23

(30) تاريخ طلب الاسبقية-بلد الاسبقية-رقم طلب الاسبقية

(51) التصنيف الدولي
07H19/06
/067

(52) التصنيف العراقي 6

صوره طبق الاصل

(45) تاريخ منح البراءة: 2001/9/11

عن مسجل براءات الاختراع والنماذج الصناعية
علي حميد حسون

(72) اسم المخترع وعنوانه: ١- السيد احسان عيدان عبد الكريم السيمرى
٢- د . سندس صديق بكير
جامعة البصرة/ كلية الطب/ فرع الاحياء المجهرية
٣- د . نجم عبود المسعودى

(73) اسم صاحب البراءة: المخترعون انفسهم

(74) اسم الوكيل:

(54) تسمية الاختراع: تخليق وتقييم الفعالية ضد الجرثومية وضد الطفيلية لبعض الكليوسيدات البريميدينية الجديدة لاستخدامها كمضادات حيوية مقترحة

منحت هذه البراءة استنادا لاحكام المادة 21 من قانون براءات الاختراع والنماذج الصناعية رقم 65 لسنة 1970 وعلى مسؤولية المخترع.

موقع
توقيع المسجل
رئيس الجهاز
شاكر محمود الخفاجي

C.O.S.Q.C
IRAQ

بسم الله الرحمن الرحيم

تسمية الاختراع

تخليق وتقييم الفعالية ضد الجرثومية وضد الطفيلية لبعض النكليوسيدات البريميدينية الجديدة لأستخدامها كمضادات حيوية مقترحة

Synthesis and Evaluation of Antibacterial and Antiparasitic activity of some new Pyrimidine Nucleosides as a new antibiotics candidate

اسماء المخترعين وعناوينهم

احسان عيدان عبدالكريم السيمري

سندس صديق بكر

نجم عبود المسعودي

فرع الاحياء المجهرية – كلية الطب – جامعة البصرة – جمهورية العراق

تسمية الاختراع

تخليق وتقييم الفعالية ضد الجرثومية وضد الطفيلية

لبعض النكليوسيدات البريميدينية الجديدة لأستخدامها كمضادات حيوية مقترحة

اولا": موجز الاختراع

يتضمن الاختراع تحضير مركبات نكليوسيدية محضرة لأول مرة عالميا" * من تكاثف القواعد النيتروجينية (يوراسيل ،ثايمين ، ثلاثي فلورومثيل يوراسيل ، فلوروبوزاسيل ، بروموبوراسيل وايودوبوراسيل) مع السكر الاميني (٢-استاميدو - ١،٣،٤،٦- رباعي -O - خلات -٢- ديؤكسي-D-كلوكوز) ، بوجود العامل المساعد (ثلاثي مثيل سالايل فلوروميثان سلفونات) وتحت ظروف التكثيف الارجاعي ليعطي النكليوسيدات البريميدينية (٨،١٠،١٢،١٤،١٦،١٨) . تم ازالة مجاميع الخلات في مشتق سكر النكليوسيدات بوساطة ايون الميثوكسيد لتعطي النكليوسيدات الحرة الجديدة (٩،١١،١٣،١٥،١٧،١٩) على التوالي .

تمت دراسة وتقييم الفعالية ضد الجرثومية (antibacterial activity) للنكليوسيدات الحرة(٩،١١،١٣،١٥،١٧،١٩) ضد عشرة انواع من الجراثيم المرضية بطريقتي قياس قطر منطقة تثبيط النمو Growth Inhibition zone وقياس التركيز المثبط الادنى Minimal Inhibitory (MIC) Concentration كما تم تقييم الفعالية ضد الطفيلية (ضد الرؤوس الاولية Protoscolicidal activity) لطفيلي الاكياس المائية بطريقة قياس نسب الحيوية (viability) ومقارنة كلتا الفعاليتين مع فعالية المضادات الحيوية القياسية وقد امكن الحصول على النتائج التالية :

١. اعطى التركيز (١٠٠٠) مايكروغرام/مل اكبر فعالية ضد جرثومية بطريقة الاطباق وضد طفيلية بطريقة قياس الحيوية ولجميع النكليوسيدات المحضرة .

٢. وجد ان اكبر تأثير مضاد للجراثيم المرضية هو للنكليوسيد (١٥) حيث اعطى التركيز ١٠٠٠ مايكروغرام/مل منه قطر تثبيطي مقداره (٢٦) ملم ضد جرثومة المكورات السبحية البرازية ***Strept. faecalis*** ، بينما وجد اصغر قطر تثبيطي لنفس التركيز ومقداره (٦) ملم للنكليوسيد (١٣) ضد جرثومة نايسيريا السيلان ***N. gonorrhoea*** وبالمقارنة مع المضادات الحيوية القياسية فقد بلغ اكبر قطر تثبيط لنمو الجراثيم المرضية (١٩) ملم للمضاد نايتروفيورانتوين (300 mcg) Nitrofurantoin لجرثومة الزوائف الزنجارية ***Pseudomonas aeruginosa***، واصغر قطر تثبيطي بلغ (٤) ملم للمضاد بنسلين (10 units) Pencillin G لجرثومة العصيات الرقيقة ***Bacillus subtilis***.

٣. تراوحت التراكيز المثبطة الدنيا لجميع النكليوسيدات الجديدة المحضرة من (١٥-٣٠٠) مايكروغرام/مل ، بينما بلغت هذه التراكيز للمضادات الحيوية القياسية من (١٠-٢٥٠) مايكروغرام/مل.

٤. تمكنت جميع النكليوسيدات البريميدينية الجديدة من خفض حيوية وقتل الرؤوس الاولية لطفيلي الاكياس المائية بفترات زمنية قياسية حيث خفضت حيوية الرؤوس الاولية الى الصفر بعد (٩٦-٣٦٠) ساعة من المعاملة بتراكيز من (٥٠-١٠٠٠) مايكروغرام/مل للنكليوسيدات الجديدة بالمقارنة مع نفس التراكيز للمضادات الحيوية التجارية والتي خفضت الحيوية الى الصفر بعد (٢٤-٢١٦) ساعة من المعاملة بها .

٥. ان كبر اقطار تثبيط النمو الجرثومي وصغر التراكيز المثبطة الدنيا التي اظهرتها النكليوسيدات الحرة الجديدة بالاضافة الى فعاليتها الكفوءة في خفض حيوية وقتل الرؤوس الاولية لطفيلي الاكياس المائية في فترات زمنية قياسية بالمقارنة مع معظم المضادات الحيوية تشير وبصورة مؤكدة الى ان الفعالية ضد الجرثومية وضد الطفيلية لهذه النكليوسيدات هي اكبر بكثير من فعالية المضادات الحيوية وهذا مما يجعلنا نقترح استخدامها كبديل ناجح عن المضادات الحيوية المدروسة الاخرى للتأثيرات الكبيرة التي اظهرتها تراكيز هذه النكليوسيدات على الاحياء المجهرية المدروسة .

---

* تراكيب كافة المركبات النكليوسيدية المذكورة في الأختراع موضحة في المخطط (١) .

Patent title

Synthesis and Evaluation of antibacterial and antiparasitic activity of some New pyrimidine nucleosides as a new antibiotics candidate

Patent Abstract

The patent in concerned the synthesis of some new novel nucleosides namely 1-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-B-D-glucopyranosyl) derivatives of uracil, thymine, trifluormethyluracil, fluorouracil, bromouracil and iodouracil(8,10,12,14,16 and 18), respectively, from condensation of the bases, uracil, thymine, trifluormethyluracil, fluorouuracil, bromouracil and iodouracil with 2-acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-D-glucose), in the presence of trimethylsilyltrifluoromethanesulphonate catalyst. Deblocking of the acetyl groups at 8,10,12,14,16 and 18 by treatment with methoxide ione afforded the free nucleosides(9,11,13,15,17 and 19), respectively.

The antibacterial activity of the free nucleosides 9,11,13,15,17 and 19 against ten types of bacteria have been studied and evaluated by measurment of the growth inhibition zones and the minimumal inhibitory concentrations (MICs), and the protoscolicidal activity against protoscolices of *Echinococus granulosus* by using vability methode has been also determined

These results are compared with the activity of some commercial antibiotics as following:

1. **The highest antibacterial and antiparasitic activity of all the free nucleosides, which measured by the inhibition zone and viability method respectively was recorded for concentration 1000mcg /ml.**
2. **The nucleoside(15) showed the highest activity against *Strept. faecalis* by inhibition zone (26) mm and with concentration 1000 mcg/ml, whereas the nucleoside(13) showed an inhibition zone (6) mm of the same concentration against the *N.gonorrhoea.* In comparison with the activity of some familiar antibiotics, such as Nitrofurantoin (300 mcg) which showed inhibition zone (19) mm against *Pseudomonas aeuroginosa* and Penicillin G (10 units) with inhibition zone (4) mm against *Bacillus subtilis* .**
3. **The values of MICs of all the new free nucleosides(9,11,13,15,17 and 19) were recorded between (15-300) mcg/ml while some known antibiotics showed MICs values between (10-250) mcg/ml .**
4. **All used concentrations (50-1000) mcg/ml of pyrimidine nucleosides were decrease the viability of protoscolices (larval stage of *Echinococeous granalosus*) into zero in (96-360) hrs after treatment, in comparson with the same conentrations of commercial antibiotics , in (24-216) hrs after treatment.**
5. **The highest values of inhibition zones and the smallest values of MICs of all new free nucleosides and its efficient activity in decrease the viability of the protoscolices in standerd timeperiods comparing with those shown by some commercial antibiotics indicated that the new free nucleosides have more antibacterial and antiparastic activity than those of the mentioned antibiotics. These results prompt use synthesize such new antibacterial and antiparsitic agents and use them in medicine in the future after further extensive investigations.**

m.p. 44-48 ° C; $C_{18}H_{23}N_3O_{10}$ (441.39) ,Calcd. : C,49.00; H,5.30;N,9.50. Found ; C,48.72; H,5.19;N,9.81. U.V.(λ_{max} nm) MeOH :255 (log ∈ 4.09).

النكليوسيد(١٠)

1-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β-D-glucopyranosyl) thymine

١- (٢-استاميدو - ٣،٤،٦- ثلاثي - O - خلات - D-β- كلوكوبايرانوسيل) ثايمين .

Thymine (6.86 mmol.) ; sugar (6.86 mmol.) : catalyst (7.0 mmol.) ; Yield : (2.30 g, 73%); **m.p.68-72 ° C. $C_{19}H_{25}N_3O_{10}$ (455.41) , Calcd. : C,50.11 ; H,5.53 ; N,9.22 . Found : C,49.91; H, 5.42 ; N,9.52. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 260 (log ∈ 4.12).**

النكليوسيد (١٣)

5-Trifluoromethyl–1-(2-acetamido–3,4,6-tri-O-acetyl-β-D- glucopyraosyl)uracil.

٥- ثلاثي فلورومثيل (٢-استاميدو -٣،٤،٦-ثلاثي -O – خلات -D-β – كلوكوبايرنوسيل) يوراسيل.

5-Trifluoromethyluracil (2.0 mmol.) ; sugar (2.0 mmol.) : catalyst (2.0 mmol.) ; Yield : (0.35 g,73%); m.p.78-80 ° C. $C_{19}H_{22}F_3N_3O_{10}$ (509.39) , Calcd. : C,44.80.11 ; H,4.35 ; N,8.25 . Found : C,44.71; H, 4.31 ; N,8.12. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 266 (log ∈ 4.13).

The α - anomer (21) : Yield (0.15g , 10%) ; m.p. 100-102 ° . U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 266(log ∈ 4.13).

النكليوسيد(١٤)

5- Fluro–1-(2-acetamido–3,4,6-tri-O-acetyl-β-D- glucopyraosyl)uracil.

٥- فلورو(٢-استاميدو -٣،٤،٦-ثلاثي -O – خلات -D-β – كلوكوبايرنوسيل) يوراسيل.

5-Fluroouracil (7.60 mmol.) ; sugar (7.60 mmol.) : catalyst (7.60 mmol.) ; Yield : (0.7 g,24%); m.p.122-126° C. $C_{18}H_{22}FN_3O_{10}$ (459.38) , Calcd. : C,47.06 ; H,4.82 ; N,9.14 . Found : C,46.81; H, 4.31 ; N,4.69. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 263 (log ∈ 4.15).

The α - anomer (21) : Yield (0.35g , 10%) ; m.p. 58-60 ° C decomp. U.V. ((λ_{max} nm) MeOH : 262(log ∈ 4.16).

النكليوسيد(١٦)

5- Bromo–1-(2-acetamido–3,4,6-tri-O-acetyl-β-D- glucopyraosyl)uracil.

٥- برومو(٢-استاميدو -٣،٤،٦-ثلاثي -O – خلات -D-β – كلوكوبايرنوسيل) يوراسيل.

5-Bromouracil (5.0 mmol.) ; sugar (5.0 mmol.) : catalyst (5.0 mmol.) ; Yield : (0.6 g,73%); m.p.62-65°C. $C_{18}H_{22}BrN_3O_{10}$ (520.30) , Calcd. : C,41.55 ; H,4.26 ; N,8.11. Found : C,41.69; H, 4.12 ; N,7.93. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 273 (log ∈ 4.14).

النكليوسيد (١٨)

5- Iodo–1-(2-acetamido–3,4,6-tri-O-acetyl-β-D- glucopyraosyl)uracil.

٥- ايودو(٢-استاميدو -٣،٤،٦-ثلاثي -O – خلات -D-β – كلوكوبايرنوسيل) يوراسيل.

5-Iodouracil (4.42 mmol.) ; sugar (4.42 mmol.) : catalyst (4.42 mmol.) ; Yield : (1.7 g,37%); m.p.152-154°C. decomp. $C_{18}H_{22}IN_3O_{10}$ (567.29) , Calcd. : C,38.11 ; H,3.90 ; N,7.40 . Found : C,37.62; H, 3.80 ; N,7.52. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 279 (log $\in$ 4.18).

ب- النكليوسيدات (٢-استاميدو -٣-ديؤكسي -١ - β - D - كلوكوبايرسونيل لقواعد ٥-الكيل و ٥-هالو البريميدينات) (٩،١١،١٣،١٥،١٧،١٩).

الطريقة العامة للتحضير

تم تحضير هذه النكليوسيدات من معاملة (X مليمول)من النكليوسيدات (٨،١٠،١٢،١٤،١٦،١٨) مع محلول ميثوكسيد الصوديوم [(Y مليمول) من الصوديوم مذاب في كمية مناسبة من الميثانول الجاف] ثم تم رج المزيجات لهذه التفاعلات استمراريا" في ظروف درجة حرارة الغرفة ولمدة (١٦) ساعة . تم معادلة المحاليل مع حامض الخليك حتى درجة الحامضية (PH : 5) وتبخيره حتى الجفاف ليعطي مركبات خام .
تمت تنقية المركبات من خلال اعادة بلورتها بمذيب الميثانول لتعطي مركبات ذات درجات انصهار مقبولة مع حصيلة نواتج جيدة كما مبين في ادناه :

النكليوسيد (٩)

1- (2-acetamido– 2- deoxy -β-D- glucopyranosyl)uracil.
١-(٢-استاميدو -٢ - ديؤكسي -D-β - كلوكوبايرنوسيل) يوراسيل.

Nucleoside(8) (0.55 g ,1.24 mmol.) ; sodium (37mg ,1.6 mmol.) ; Yield : (0.25 g,62%); m.p.110-115°C. amorphous. $C_{12}H_{17}N_3H_2O$(333.29) , Calcd. : C,43.24 ; H,5.74 ; N,12.60 . Found : C,42.92; H, 5.71 ; N,12.89. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 256 (log $\in$ 3.98).

النكليوسيد(١١)

1- (2-acetamido– 2- deoxy -β-D- glucopyranosyl)thymine.
١-(٢-استاميدو -٢ - ديؤكسي -D-β - كلوكوبايرنوسيل) ثايمين.

Nucleoside(10) (2.16g ,4.74 mmol.) ; sodium (0.14mg ,108 mmol.) ; Yield : (1.1g,63.5%); m.p.105-110°C. amorphous. $C_{13}H_{19}N_3O_7.H_2O$(347.32) ,Calcd.: C,4.25 ; H,6.09 ; N,12.10 . Found : C,44.74; H, 5.92 ; N,12.21. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 262 (log $\in$ 4.07).

النكليوسيد (١٣)

5-Trifluoromethyl-1- (2-acetamido– 2- deoxy -β-D- glucopyranosyl)uracil.
٥- ثلاثي فلورومثيل-١-(٢-استاميدو -٢ - ديؤكسي -D-β - كلوكوبايرنوسيل) يوراسيل.

Nucleoside(12) (200mg ,0.39 mmol.) ; sodium (10.8mg ,0.47 mmol.) ; Yield : (72 mg,54%); m.p.178-160°C. decomp. $C_{13}H_{16}F_3N_3O_7.H_2O$(401.29) , Calcd. : C,38.91 ; H,4.52 ; N,10.47. Found : C,38.81; H, 4.98 ; N,10.59. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 267 (log $\in$ 4.03).

النكليوسيد(١٥)

5-Fluoro-1- (2-acetamido– 2- deoxy -β-D- glucopyranosyl)uracil.
٥- فلورو -١-(٢-استاميدو -٢ - ديؤكسي -D-β - كلوكوبايرنوسيل) يوراسيل.

Nucleoside(14) (0.30 g ,0.65 mmol.) ; sodium (21mg,0.91 mmol.) ; Yield : (0.16 g,69%); m.p.104-110°C. decomp. $C_{12}H_{16}FN_3O_7.H_2O$(351.28) , Calcd. : C,41.03 ; H,5.16 ; N,11.96 . Found : C,41.12; H, 5.09 ; N,11.77. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 264 (log ∈ 3.99).

النكليوسيد(١٧)

5-Bromo -1- (2-acetamido– 2- deoxy -β- D- glucopyranosyl)uracil.
٥–برومو – ١–(٢–استاميدو –٢ – ديوكسي –D-β– كلوكوبايرنوسيل) يوراسيل.

Nucleoside(16) (0.35 g ,0.67 mmol.) ; sodium (21mg ,0.91 mmol.) ; Yield : (0.21 g,64%); m.p.160-162°C. decomp. $C_{12}H_{16}BrN_3O_7.H_2O$ (412.19) , Calcd. : C,34.96 ; H,4.40 ; N10.47 . Found : C,34.72; H, 4.38 ; N,10.29. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 275 (log ∈ 4.09).

النكليوسيد(١٩)

5-Iodo -1- (2-acetamido–2- deoxy -β-D- glucopyranosyl)uracil.
٥– ايودو –١–(٢–استاميدو –٢ – ديوكسي –D-β– كلوكوبايرنوسيل) يوراسيل.

Nucleoside(17) (2.0 g ,3.52 mmol.) ; sodium (105mg ,4.58 mmol.) ; Yield : (1.21 g,67%); m.p.108-110°C. $C_{12}H_{16}IN_3O_7.H_2O$(459.20) , Calcd. : C,31.39 ; H,3.95 ; N9.15. Found : C,31.10; H, 3.97 ; N,9.27. U.V. (λ_{max} nm) MeOH : 279 (log ∈ 4.17).

تم تثبيت تراكيب جميع النكليوسيدات (٨-١٩) من خلال اطياف الرنين النووي البروتوني المغناطيسي (^{1}H-NMR) وقد تم اختيار طيفي الرنين النووي المغناطيسي للمركبين (١٨) و (١٩) وكما يلي :

* ^{1}H-NMR for compound (18) (90 MHz) (δ in CDL_3) : 12:30 s (NH), 7.83 d, ($J_{NH.2'}$ = 9.0 Hz, NHAc) 7.76s (H-6); 5.89D ($J_{1',2'}$ = 10.0Hz;H-1') ; 4.35DD ($J_{2',3'}$ = 10.0 Hz, H-2') ; 5.26PT ($J_{3',4'}$ = 9.5 Hz; H-4') ; 4.52m(H-5' , H-6') ; 4.48M (H-6") ; 2.11,1.95,1.93(30Ac); 1.85(NHAc).

* ^{1}H-NMR for compound (19) (90 MHz) (δDMSO-d6) : 11:25s (NH), 7.73 d, ($J_{HN.2'}$ = 8.0 Hz) 8.00s (H-6); 5.66D ($J_{1',2'}$ = 8.5 Hz;H-4) ; 4.23-3.09m (H-2'- H-6'' and OH groups) ;1.72s (NHAc).

ثانيا": خلفية ومجال الأختراع

ان كثيرا" من المضادات الحيوية النكليوسيدية والتي تحتوي على مشتق الكلوكوسامين D-glucosamine تظهر فعالية بايولوجية عالية ضد انواع كثيرة من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام لما لهذا السكر من اهمية بايولوجية حيث يعتبر احد مكونات الغشاء الخلوي لأنواع كثيرة من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام (١) . ان اهم الامثلة على مثل هذه المضادات النكليوسيدية هو Tunicamycin والذي اثبت فعالية ضد الفطريات والفايروسات وجرثومة المكورات العنقودية *Staphycococcus* ، كما ويعتبر البورومايسين Puromycin احد الامثلة المهمة الاخرى لهذا النوع من المضادات والتي تحتوي على سكر اميني رايبوزي ، حيث يستخدم كعامل مضاد للسرطان والابتدائيات antineoplastic and antiprotozoal(٣،٢) . كما واجريت بعض الدراسات لتقييم الفعالية ضد الجرثومية وضد الفطرية وضد الطفيلية لنكليوسيدات مختلفة كال Polyxins , Nikkomycins(٤) و 2-Deoxynucleosides لمشتقات ال Benzimidazole(٥) ومجموعة من نيكليوسيدات C غير الحلقية(٦).

لقد قمنا في هذا الاختراع بتحضير نكليوسيدات تحتوي على القواعد النتروجينية البريميدينية المعروفة (اليوراسيل ، الثايمين ، الثلاثي فلورومثيل يوراسيل ، فلوراسيل ، بروموبوراسيل والايودويوراسيل) مرتبطة بالسكر الاميني D- كلوكوسامين D- glucosamine المحتوي على خمسة مجاميع خلات ، بعد ذلك تمت ازالة مجاميع الخلات لتعطي النكليوسيدات الحرة (٩،١١،١٣،١٥،١٧،١٩) .

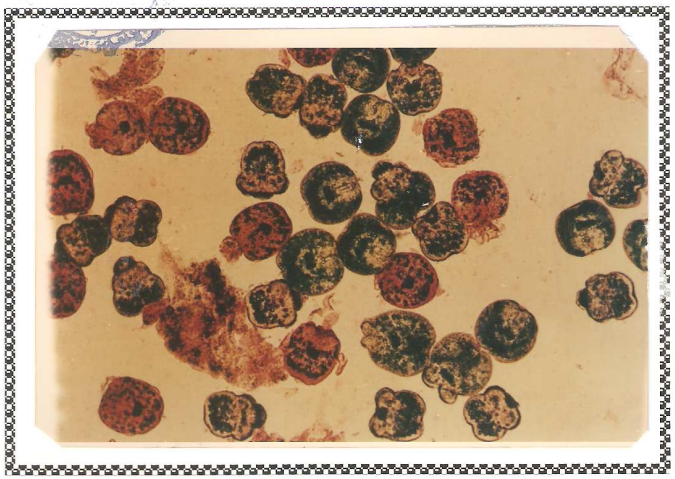
تمت دراسة الفعالية ضد الجرثومية لهذه النكليوسيدات الحرة ضد عشرة انواع من الجراثيم ومقارنة التركيز المثبط الادنى لها وتقييم الفعالية ضد الطفيلية لها ايضا" بالمقارنة مع مثيله لمضادات حيوية معروفة لأستخدامها مستقبلا" كمواد ضد جرثومية وضد طفيلية (antibacterial and antiparasitic agents) مقترحة لعلاج الامراض التي تسببها هذه الجراثيم والطفيليات ، لاسيما في ظل ظروف الحصار الاقتصادي والدوائي الظالم المفروض على قطرنا المناضل بالاضافة الى التأثيرات الجانبية السلبية الكثيرة والكبيرة لأغلب المضادات الحيوية التجارية مما تدعو الحاجة الى تطوير واكتشاف مضادات حيوية عراقية اصيلة جديدة تحضر لأول مرة عالميا" وقد تساهم في خدمة علاج الامراض البشرية مستقبلا" ، هذا هو الهدف والغاية من هذه الدراسة والله من وراء القصد

(وقل اعملوا فسيرى الله عملكم ورسوله والمؤمنون)

صورة(٣): مقارنة تأثيرات التراكيز المختلفة للنكليوسيد (١٩) على نمو الجرثومتين *Proteus sp.* (اعلى الصورة /يسارا") والـ *Bacillus subtilis* (اسفل الصورة /يسارا") مع تأثيرات اقراص المضادات القياسية على نفس الجرثومتين (اعلى واسفل الصورة /يمينا") ، الوسط: Mueller – Hinton Agar.

صورة(٤): قياس التراكيز المثبطة الدنيا (MICs Minimal Inhibitory Concentrations) بطريقة التخافيف او الانابيب Tubes / or Dilution Method تقدر بالمايكروغرام/مل mcg/ml

تقدير التركيز المثبط الادنى MIC للنكليوسيد (١١) لنمو جرثومة *Pseudomonas aeruginosa*.



صورة (٥) : قياس النسبة المئوية الرؤوس الاولية Protoscolices viability (الطور اليرقي لطفيلي الاكياس المائية *Echinococcus granulosus*) بطريقة نفاذ صبغة الآيوسين المائية ٥٪ وتفحص بأستخدام المجهر الضوئي .

قوة التكبير 100 X.

الرؤوس الاولية خضراء اللون : حية .

الرؤوس الاولية حمراء اللون : ميتة.

ثالثا": مفصل الاختراع والادعاءات

١. الجانب الكيمياوي

تحضير النكليوسيدات

أ- النكليوسيدات (٢-استاميدو -٣،٦- ثلاثي- O- خلات -٣- ديوكسي -١- β-D كلوكوبايرانوسيل لقواعد ٥- الكيل و ٥- هالوالبريميدينات) (٨،١٠،١٢،١٤،١٦،١٨).

الطريقة العامة للتحضير

تم تحضير هذه النكليوسيدات من معاملة (n مليمول) لقواعد اليوراسيل ، الثايمين ، الثلاثي فلورومثيل يوراسيل، الفلوروبوراسيل ، البروموبوراسيل والايودوبوراسيل) مع الهكسامثيل ثنائي السالايزين Hexamethyldisilazane (HMDS) وتحت ظروف التكثيف الارجاعي الجافة جدا" ولمدة ١٨ ساعة بوجود كبريتات الامونيوم كعامل مساعد . ثم ازالة HMDS تحت الضغط المخلخل ليعطي الناتج السليلي (١،٢،٣،٤،٥،٦) على التوالي . تم اذابة النواتج السليلية مباشرة في ١٠٠ مل من مذيب ١،٢-ثنائي كلوروايثان الجاف ومن ثم اضيف (X مليمول) من سكر (٢-استاميدو - ١،٣،٤،٦- رباعي -O- خلات - ٢- ديوكسي - D-كلوكوز)(٧) مذاب في (٧٠مل) من ١،٢- ثنائي كلوروايثان الى المزيج الاول ويليها مباشرة اضافة العامل المساعد trimethysilyltrifluoromethanesulphonate (Y مليمول) على شكل قطرات وتحت ظروف التكثيف الارجاعي ، بعد تبريد المزيج الى درجة حرارة الغرفة ، ثم تبخيره حتى الجفاف ومن ثم اذيب الراسب المتخلف في (٤٠مل) من الماء واستخلاصه بواسطة مذيب خلات الاثيل (٣×٦٠ مل) وتحت ظروف الاستخلاص المستمر . تم تجفيف المذيب العضوي بواسطة كبريتات الصوديوم اللامائية وترشيحه وبالتالي تبخيره الى الجفاف ليؤدي الى تكوين مركبات صلبة غير نقية .

تم تنقية النكليوسيدات الجديدة بواسطة عمود الكروماتوغرافيا حيث اذيبت في كمية قليلة من الكلوروفورم ومن ثم ادخالها في عمود من السليكاجيل (٧٠غم) . ادى استرداد المحاليل بواسطة مزيج من الكلوروفورم- الميثانول بنسبة (1:100) ماعدا فصل المركب(٨) فتستعمل النسبة (1:4) الى اعطاء المركبات النكليوسيدية المطلوبة (٨،١٠،١٢،١٤،١٦،١٨) وبحصيلة نواتج مبينة ادناه . تم فصل النواتج بصورة نقية وذلك من خلال اعادة بلورتها في مذيب خلات الاثيل .

النكليوسيد(٨)

1-(2-Acetamido -3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β – D-glucopyranosyl) uracil

١- (٢-استاميدو -٣،٤،٦- ثلاثي -O – خلات – D-β – كلوكوبايرانوسيل) يوراسيل

Uracil(8,92 mmol.) ; sugar (8.92 mmol.) ; catalyst(9.0 mmol.) ; Yield (1.30 g. 33%) ;.

References

مصادر خلفية الاختراع

1. Suhadolink , R.J. " Nucelosides Antibiotics " John Wiley and Sons , New York (1970).
2. Suhadolink , R.j. " Nuclesides and Biologicales Probes " , John Wiley and Sons , New York (1979).
3. Windholz , M. , " The Merck index " , Merck Co. Inc. ,9th Ed. (1976), P.1030.
4. Zhang, D. and Miller, M.J. " Polyxins and Nikkomycins : progress in Synthetic and biological studies . Curr.pharm. Des. (1999), 5(2) , PP: 73-99.
5. Stefanska , J.Z. , Gralewska, R. Starosciak , B.J. and Kazimierczuk, Z. " Antibacterial activity of Substituted azoles and their nucleosides, Pharmazie, (1999) 54(12) , PP: 879-884.
6. Shaban, M.A., Nasr, A.Z. and Morgaan , A.E. " Synthesis and antimicrobial activity of acyclo C. Nucleosides . Pharmazie , (2000) 55(2) , PP: 87-93.
7. Al-Saimary, I.E. " A study of antibacterial activity of Allium sativum L. (Liliaceae) extracts on different pathogenic bacteria " EMHJ . (1999) Vol. 5(4) , PP: 803-810.

الجرثومة	قطر منطقة التثبيط (ملم) عند التركيز المعين من المادة الكيمياوية الجديدة (مايكروغرام / مل)																	
	المركب (١١) (CH_3-OH)						المركب (١٧) (Br-Oh)						المركب (١٥) (F-OH)					
	١٠٠٠	٧٥٠	٥٠٠	٢٥٠	١٠٠	٥٠	١٠٠٠	٧٥٠	٥٠٠	٢٥٠	١٠٠	٥٠	١٠٠٠	٧٥٠	٥٠٠	٢٥٠	١٠٠	٥٠
Escherichia coli	١٤	٨	٥	٠	٠	٠	١٤	١٠	٦	٠	٠	٠	٢٣	١٨	١٥	١١	٧	٠
Enetrobacter sp.	١٦	١٢	٩	٤	٠	٠	٢٠	١٧	١٢	٩	٤	٠	١٧	١٤	١٠	٦	٠	٠
Klebsiella sp.	١٥	١١	٥	٠	٠	٠	١٩	١٥	١٠	٦	٠	٠	١٨	١٥	١٢	٨	٥	٤
Proteus sp.	١٠	٦	٠	٠	٠	٠	١٣	٨	٥	٠	٠	٠	١٦	١٢	٨	٤	٠	٠
Ps. aeruginosa	١٢	٩	٤	٠	٠	٠	١٧	١٣	٩	٤	٠	٠	٢٠	١٥	١٢	١٠	٦	٠
B. subtilis	١٥	١١	٨	٤	٠	٠	٢١	١٨	١٣	٨	٥	٠	٢٢	١٨	١٦	١٤	٨	٤
Strept. Faecalis	٢٠	١٧	١١	٧	٤	٠	٢٠	١٥	١٠	٦	٠	٠	٢٦	٢٢	١٨	١٢	١٠	٦
Staph. Epidermidis	٢٠	١٥	١٠	٥	٠	٠	١٤	٨	٥	٠	٠	٠	١٥	١٢	٧	٥	٠	٠
Staph. Aureus	١٦	١١	٨	٠	٠	٠	١٥	١١	٦	٠	٠	٠	٢٠	١٧	١٣	٨	٤	٠
N. gonorrhoea	١٢	٧	٤	٠	٠	٠	١٠	٥	٠	٠	٠	٠	١٤	١٠	٦	٠	٠	٠

جدول (١): تأثير التراكيز المختلفة من المركبات النكليوسيدية البريميدينية الجديدة على الانواع المختلفة من الجراثيم المرضية بطريقة الاطباق Diffusion method **(قياس مناطق تثبيط النمو** Growth Inhibition Zones.

المجموعة السابعة بدون معاملة كمجموعة سيطرة ، تمت متابعة تأثيرات مختلف النكليوسيدات على حيوية الرؤوس الاولية ولفترات زمنية متعاقبة وحتى موت جميع الرؤوس الاولية.

استخدم دليل فحص الايوسين بأستخدام صبغة الايوسين المائية aqueous eosin (0.5%) للدلالة على حيوية الرؤوس الاولية تحت القوى المختلفة للمجهر الضوئي حيث ان الرؤوس الاولية الحية تكون خضراء اللون ، بينما تكون الرؤوس الاولية الميتة حمراء اللون لنفاذ صبغة الايوسين عبر جدرانها ولأجل تقدير كفاءة تأثيرات النكليوسيدات الحرة الجديدة على الرؤوس الاولية فلقد اجريت دراسة مقارنة لتأثير المضادات الحيوية التجارية (المستخدمة في الدراسة البكتريولوجية) على حيوية الرؤوس الاولية لطفيلي الاكياس المائية.

رابعا" : المواصفات : نتائج دراسة وتقييم الفعالية البايولوجية

ان النكليوسيدات الحرة الجديدة (٩،١١،١٣،١٥،١٧،١٩) هي مركبات مقترحة لأستخدامها كمضادات حيوية بديلة مستقبلا" ولذلك اجريت هذه الدراسة لتحديد وتقييم فعاليتها ضد الجرثومية على الانواع الرئيسية من الجراثيم المرضية وتقييم فعاليتها ضد الطفيلية (ضد الؤوس الاولية protoscolicidal activity لطفيلي الاكياس المائية). ومقارنتها مع تأثيرات المضادات الحيوية القياسية على هذه الاحياء المجهرية.

أ- نتائج تقييم الفعالية ضد الجرثومية Bactericidal / or Antibacterial activity

النتائج موضحة في الجدولين (١ و ٢) والصور ١،٢،٣،٤ والشكلين (١ و ٢) ومنها يمكن ملاحظة وجود تباين في تأثير النكليوسيدات البريميدينية الجديدة على الجراثيم المرضية كما يمكن ترتيب هذه النكليوسيدات حسب اكبر فعالية ضد جرثومية وكما يلي جدول (١ و ٢) :

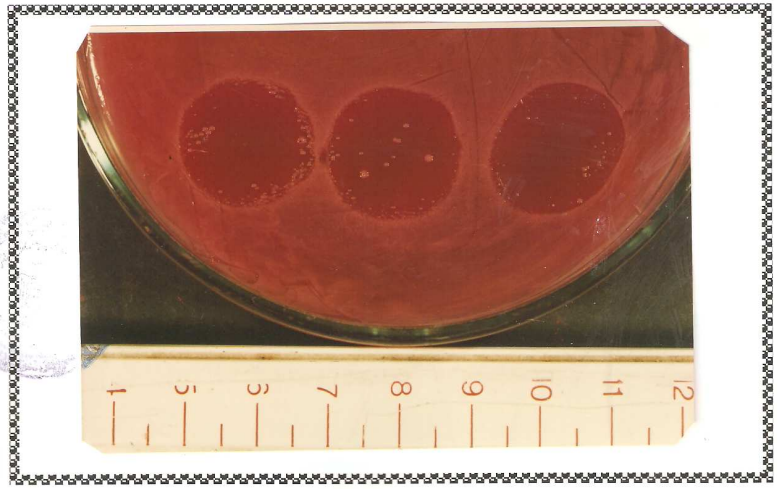
$13 < 11 < 9 < 17 < 19 < 15$ ($P < 0.01$)

وقد وجد ان اكبر قطر لتثبيط النمو هو للنكليوسيد (١٥) ومقداره (٢٦) ملم ضد جرثومة *Sterptoccus faecalis* للتركيز (١٠٠٠) مايكروغرام/مل ، بينما بلغت اكبر اقطار لتثبيط النمو لبقية النكليوسيدات كما يلي :
(٢٢)ملم للنكليوسيد (١٩) ضد جرثومتي *Ps. Aeurginosa* و *E.coli* ، (٢١)ملم للنكليوسيد (١٧) ضد جرثومة *B.subtilis*، (٢١) ملم للنكليوسيد (٩) ضد جرثومة *Klebsiella sp.*، (٢٠) ملم للنكليوسيد (١١) ضد جرثومتي *Strept. Faecalis* و *Staph. Epidermidis* ، (١٧) ملم للنكليوسيد(١٣) ضد جرثومة *Enterobacter sp.*

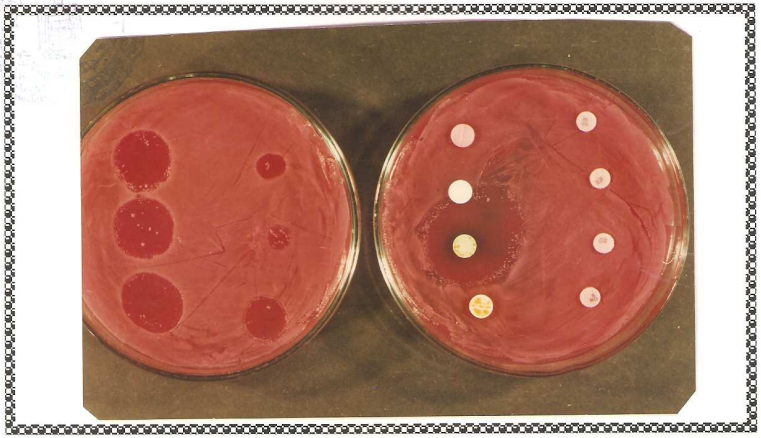
وبلغت حدود التراكيز المثبطة الدنيا لهذه النكليوسيدات من (١٥-٣٠٠) مايكروغرام/مل . وبالمقارنة مع المضادات الحيوية القياسية ، فقد بلغ اكبر قطر لتثبيط النمو (١٩) ملم للمضادين Nitrofurantoin(300 mcg) و Cephalexin(30mcg) ضد الجرثومين *Ps.aeruginosa* و *Staph. aureus* على التوالي ، واقل قطر بلغ (٤) ملم للمضاد Pencillin G(10 units) ضد جرثومة *B.subtilis* وبلغت حدود التراكيز المثبطة الدنيا للمضادات الحيوية المدروسة من (١٠-٢٥٠) مايكروغرام/مل ، الاشكال (١ و ٢).
لقد لوحظ ان الفعالية ضد الجرثومية للنكليوسيدات البريميدينية المحضرة في هذا الاختراع هي اكبر بكثير من فعالية معظم المضادات الحيوية حسب النتائج الموضحة في هذه الدراسة وهذا يشير الى امكانية الاستعاضة عن بعض المضادات الحيوية بهذه المركبات الجديدة بعد اجراء دراسات دوائية مستفيضة اخرى عليها تتناول دراستها داخل الكائن الحي In Vivo .

الجرثومة	المركب (١١) (CH_3-OH)	المركب(١٧) (Br-OH)	المركب(١٥) (F-OH)	المركب(٩) (H-OH)	المركب(١٣) (CF_3-OH)	المركب(١٩) (I-OH)
Escherichia coli	١٢٠	٦٠	٤٠	٥٠	٢٠٠	٣٠
Enetrobacter sp.	١٠٠	٤٠	٤٠	١٢٠	٢٥٠	٤٠
Klebsiella sp.	١٣٠	٥٠	٣٥	٤٠	٢٢٠	٣٥
Proteus sp.	٢٠٠	٧٥	٥٠	١٢٠	٢٥٠	٨٠
Ps.aeruginosa	١٨٠	٤٦	٣٥	١٣٠	٣٠٠	٢٥
B. subtilis	١٥٠	٣٠	٢٥	١٢٠	١٠٠	٤٠
Strept.faecalis	٦٠	٣٥	١٥	١٠٠	١٥٠	٦٠
Staph.epidermidis	٧٠	٧٠	٥٠	٥٠	١٢٠	٥٠
Staph.aureus	٩٠	٧٠	٤٠	٩٠	٢٥٠	٣٠
N. gonorrhoea	٢٠٠	٩٠	٣٠	٧٠	٢٥٠	٦٠

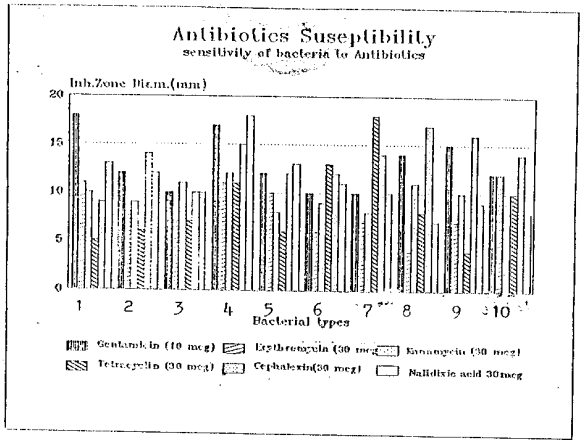
جدول (٢) قياس التراكيز المثبطة الدنيا Minimal Inhibitory concentrations (MICs) مقاسة بالمايكروغرام/مل (mcg/ml) للمركبات النكليوسيدية البريميدينية المرة الجديدة ضد مختلف انواع الجراثيم بطريقة الانابيب Tube method

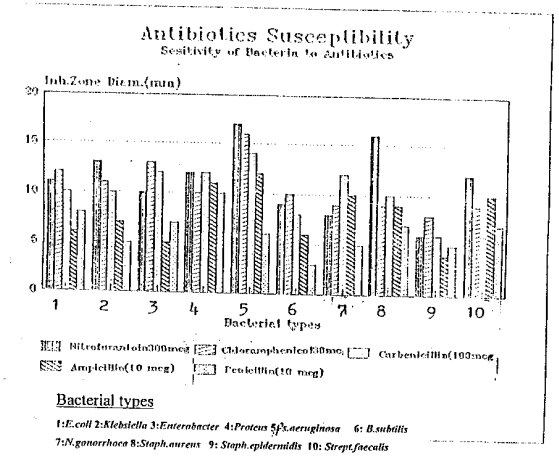


صورة (١) : مناطق تثبيط النمو الجرثومي Growth Inhibition Zones بطريقة الانتشار في الهلام او الاطباق Plate /or Agar diffusion method تقاس بالمسطرة وتقدر بالمليمتر(ملم) تأثير تراكيز الكليوسيد (١٥) على نمو جرثومة *Staphylococcus epidermidis*، الوسط: (Blood Agar base)



صورة (٢): مقارنة تأثيرات التراكيز المختلفة للكليوسيد (١٥) على نمو جرثومة (*Staphylococcus aureus*) (الطبق يسار الصورة) مع تأثيرات اقراص المضادات الحيوية الاجنبية (يمين الطبق الايمن) والعراقية (يسار الطبق الايمن) على نفس الجرثومة (استخدمت نفس انواع المضادات الحيوية للمقارنة)، الوسط: Blood Agar base

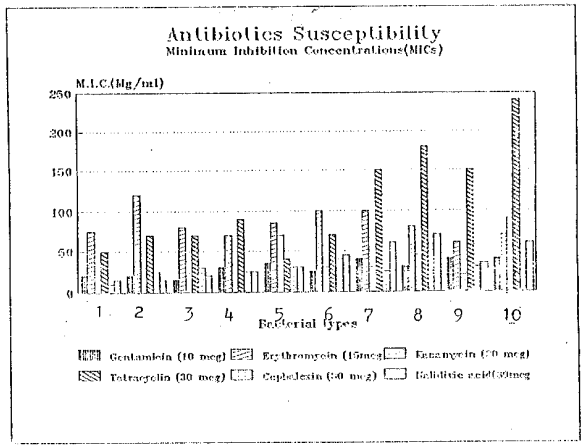


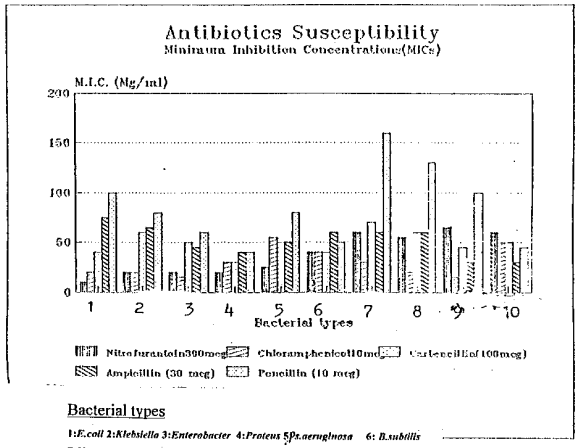


الشكل(1) : تأثيرات مختلف المضادات الحيوية على الجراثيم المرضية المختلفة .

طريقة الاطباق(الانتشار في الهلام) Plate (Agar diffusion) method :

تحديد اقطار مناطق تثبيط النمو الجرثومي Growth Inhibition Zones تقدر بالمليمترات(ملم).





Bacterial types

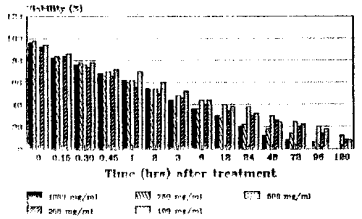
1:*E.coli* 2:*Klebsiella* 3:*Enterobacter* 4:*Proteus* 5:*Ps.aeruginosa* 6: *B.subtilis*
7:*N.gonorrhoea* 8:*Staph.aureus* 9: *Staph.epidermidis* 10: *Strept.faecalis*

الشكل(٣): تأثيرات مختلف المضادات الحيوية على الجراثيم المرضية المختلفة .

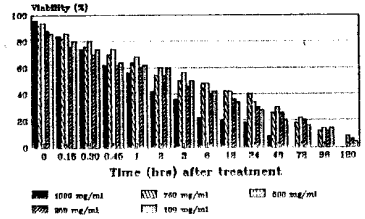
طريقة الانابيب (التخافيف) Tubes (dilution) method :

تحديد التراكيز المثبطة الدنيا Minimal Inhibitory Concentrations(MICs) لكل مضاد حيوي تقدر بالمايكروغرام/مل mcg/ml .

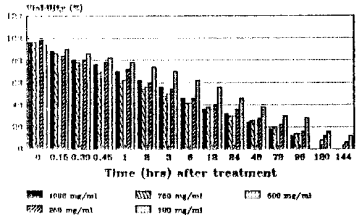
شكل(٩): التتراسايكلين Tetracyclin



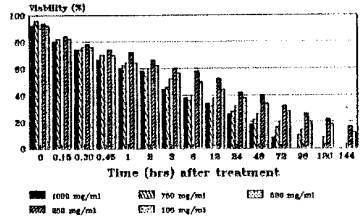
شكل(١٠): الستربتومايسين Streptomycin



شكل(١١): الامبيسيلين Ampicillin



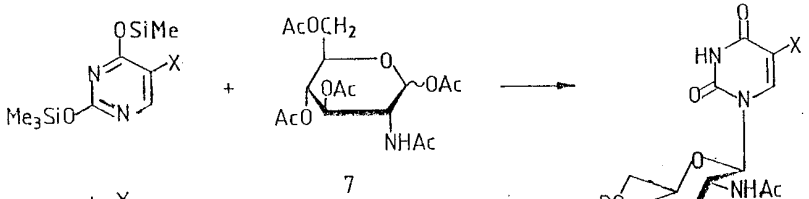
شكل(١٢): البنسلين Pencillin



الأشكال توضح النسب المئوية لحيوية الرؤوس الأولية
بعد فترات زمنية متعاقبة من المعاملة بالتراكيز المختلفة للمضادات الحيوية

الجرثومة	قطر منطقة التثبيط (ملم) عند التركيز المعين من المادة الكيمياوية الجديدة (مايكروغرام / مل)																	
	المركب (٩) (H-OH)						المركب (١٣) (CF_3-OH)						المركب (١٩) (I-OH)					
	١٠٠٠	٧٥٠	٥٠٠	٢٥٠	١٠٠	٥٠	١٠٠٠	٧٥٠	٥٠٠	٢٥٠	١٠٠	٥٠	١٠٠٠	٧٥٠	٥٠٠	٢٥٠	١٠٠	٥٠
Escherichia coli	١٨	١٢	٧	٣	٠	٠	١٤	٨	٤	٠	٠	٠	٢٢	١٧	١٢	٧	٥	٠
Enetrobacter sp.	١٢	٦	٠	٠	٠	٠	١٧	٩	٥	٠	٠	٠	٢١	١٧	١٣	١٠	٦	٤
Klebsiella sp.	٢١	١٦	١٠	٦	٠	٠	١٢	٨	٦	٠	٠	٠	٢٠	١٥	١١	٧	٤	٠
Proteus sp.	٨	٤	٠	٠	٠	٠	١١	٧	٠	٠	٠	٠	١٢	٩	٦	٠	٠	٠
Ps.aeruginosa	١٠	٧	٠	٠	٠	٠	٨	٥	٠	٠	٠	٠	٢٢	١٧	١٥	١٠	٧	٥
B.subtilis	٧	٠	٠	٠	٠	٠	١٦	١١	٨	٥	٠	٠	٢٠	١٦	١١	٧	٤	٠
Strept.faecalis	١٤	١١	٦	٤	٠	٠	١٤	١٠	٧	٥	٠	٠	١٥	١١	٨	٥	٠	٠
Staph.Epidermidis	٢٠	١٥	١١	٧	٥	٠	١٥	١١	٦	٤	٠	٠	١٦	١٢	٧	٤	٠	٠
Staph.aureus	١٥	١١	٨	٤	٠	٠	١٠	٧	٦	٠	٠	٠	٢١	١٧	١٣	١٠	٥	٤
N. gonorrhoea	١٨	١٣	١٠	٥	٠	٠	٦	٠	٠	٠	٠	٠	١٣	٧	٥	٠	٠	٠

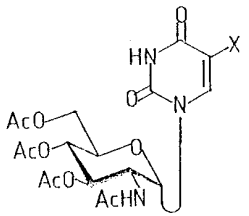
جدول (١) : تابع



7

	X
1	H
2	CH_3
3	CF_3
4	F
5	Br
6	I

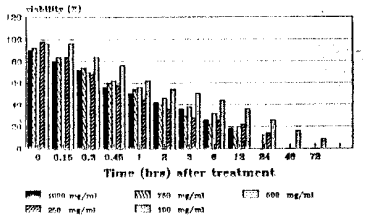
	X	R
8	H	Ac
9	H	H
10	CH_3	Ac
11	CH_3	H
12	CF_3	Ac
13	CF_3	H
14	F	Ac
15	F	H
16	Br	Ac
17	Br	H
18	I	Ac
19	I	H



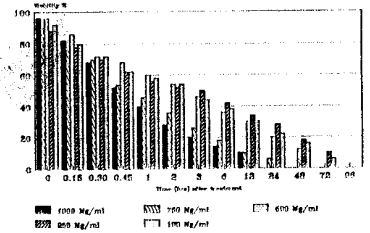
	X
20	CF_3
21	F

مخطط (١): تراكيب المركبات النكليوسيدية المذكورة في الاختراع

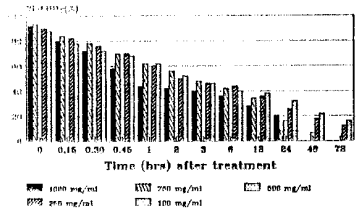
شكل(٣): الريفامبسين Rifampicin



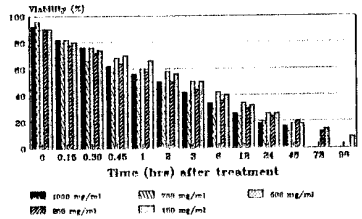
شكل(٤): الجنتاميسين Gentamicin



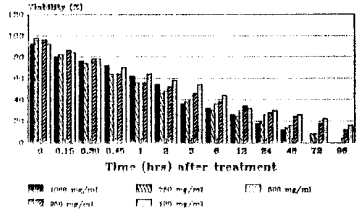
شكل(٥): السيفالكسين Cephalexin



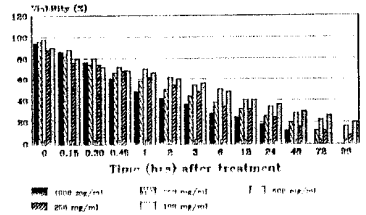
شكل(٦): الارثرومايسين Erythromycin



شكل(٧): الامبيكلوكس Ampiclox



شكل(٨): الكلورامفينيكول Chloramphenicol



الأشكال توضح النسب المئوية لحيوية الرؤوس الأولية
بعد فترات زمنية متعاقبة من المعاملة بالتراكيز المختلفة للمضادات الحيوية

ب – نتائج تقييم الفعالية ضد الطفيلية Parasiticidal activity

تبين ان للنكليوسيدات الحرة فعالية ضد طفيلية وبالاخص فعالية مضادة للرؤوس الاولية Protoscolicidal activity حيث تمكنت مختلف تراكيز النكليوسيدات الجديدة من خفض حيوية الرؤوس الاولية وقتلها في فترات زمنية قياسية ويمكن ترتيب النكليوسيدات حسب اكبر فعالية ضد الرؤوس الاولية كما يلي جدول رقم (٣) :

11<9<13<19<17<15 (P<0.01)

حيث تمكنت التراكيز (١٠٠٠، ٧٥٠، ٥٠٠، ٢٥٠، ١٠٠، ٥٠) مايكروغرام/مل للنكليوسيد (١٥) من خفض النسب المئوية لحيوية الرؤوس الاولية الى الصفر بعد (٩٦، ١٢٠، ١٢٠، ١٤٤، ١٦٨، ٢٤٠) ساعة من المعاملة بالتراكيز اعلاه على التوالي ، وكانت نتائج فعالية النكليوسيدات الجديدة الأخرى في خفض حيوية الرؤوس الأولية الى الصفر كما يلي :

بعد (١٢٠، ١٤٤، ٢٤٠) ساعة من المعاملة بالتراكيز (١٠٠٠ & ٧٥٠ ، ٥٠٠ & ٢٥٠ ، ١٠٠ & ٥٠) مايكروغرام/مل للنكليوسيد(١٧).

بعد (١٢٠، ١٤٤، ١٦٨، ٢٤٠، ٣٦٠) ساعة من المعاملة بالتراكيز (١٠٠٠، ٧٥٠ & ٥٠٠ ، ٢٥٠، ١٠٠، ٥٠) مايكروغرام/مل للنكليوسيد(١٩).

بعد (١٢٠، ١٤٤، ١٦٨، ٢٤٠، ٣٦٠) ساعة من المعاملة بالتراكيز (١٠٠٠، ٧٥٠ ، ٥٠٠ & ٢٥٠، ١٠٠، ٥٠) مايكروغرام/مل للنكليوسيد(١٣).

بعد (١٤٤، ١٦٨، ٢٤٠، ٣٦٠) ساعة من المعاملة بالتراكيز (١٠٠٠ & ٧٥٠ ، ٥٠٠ ، ٢٥٠، ١٠٠ &٥٠) مايكروغرام/مل للنكليوسيد(٩).

بعد (١٤٤، ١٦٨، ٣٦٠) ساعة من المعاملة بالتراكيز (١٠٠٠ ، ٧٥٠ & ٥٠٠ ، ٢٥٠ & ١٠٠ &٥٠) مايكروغرام/مل للنكليوسيد(١١).

وبالمقارنة مع المضادات الحيوية التجارية فلقد خفض التركيز الاعلى (١٠٠٠)مايكروغرام/مل النسب المئوية لحيوية الرؤوس الاولية الى الصفر وحسب الترتيب الاكبر فعالية كما يلي الاشكال (٣-١٢) :

Rifampicin و **Gentamicin** بعد (٢٤) ساعة من المعاملة .

Cephalexin ، **Erythromycin** ، **Ampiclox** و **Chloramphenicol** بعد ٤٨ ساعة من المعاملة .

Sterptomycin بعد (٧٢) ساعة من المعاملة .

Tetracyclin و **Pencillin** بعد ٩٦ ساعة من المعاملة .

وبالنسبة لمجموعة السيطرة ، فلقد تمكن المحلول الحافظ ((محلول الملح الفسيولوجي NS + سائل الكيس المائي HCF بنسبة ١:٤)) من المحافظة على حيوية الرؤوس الاولية ولغاية ٦٠٠ ساعة من الحفظ بدون معاملة .

خامسا": العناصر الجديدة المراد حمايتها

١. حضرت النكليوسيدات (٨-١٩) وهي مركبات كيمياوية جديدة ، لأول مرة عالمياً ولم تحضر سابقا" حسب ما هو مدون في الادبيات العلمية (وحسب مسح الادبيات الذي اجري للسنوات الخمسين الماضية) .

٢. وجد ان للنكليوسيدات البريميدينية الحرة الجديدة (٩، ١١، ١٣، ١٥، ١٧، ١٩) فعالية ضد جرثومية وضد طفيلية وهذا يؤكد فعلها المؤثر على الجراثيم المرضية والطور اليرقي لطفيلي الاكياس المائية ويمكن ترتيب النكليوسيدات الحرة الجديدة حسب اكبر فعالية ضد جرثومية كما يلي : (P< 0.01)

13<11<9<17<19<15

ويمكن ترتيبها حسب اكبر فعالية مضادة للرؤوس الاولية كما يلي : (P < 0.01)

11<9<13<19<17<15

٣.ان الفعالية ضد الجرثومية وضد الطفيلية للنكليوسيدات البريميدينية الحرة الجديدة تتفوق في اغلب الاحيان على فعالية معظم المضادات الحيوية التجارية المستخدمة في علاج الامراض البشرية مما يجعلنا نتأمل اقتراحها مستقبلا" كمضادات حيوية عراقية جديدة بعد اجراء دراسات مستفيضة تتناول تأثيراتها الدوائية داخل جسم الكائن الحي.

دراسة وتقييم الفعالية البايولوجية

أ- تقييم فعالية النكليوسيدات الحرة الجديدة ضد انواع الجراثيم المرضية

استخدمت عشرة انواع من الجراثيم المرضية مختلفة الصفات والأهمية الطبية والمعزولة من الحالات السريرية المختلفة لغرض دراسة الفعالية ضد الجرثومية للنكليوسيدات الحرة الجديدة وهذه الجراثيم هي :

* جراثيم عصوية سلبية الغرام Gr-ve bacilli :

الأشريشيا القولونية *Escherichia coli* ،العصويات المعوية *Enterobacter sp.* ، الكليبسيلا *Klebsiells sp.* ، المتقلبات *Proteus sp.* ، الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*.

* جراثيم عصوية ايجابية الغرام هوائية المعيشة مكونة للسبورات Gr + ve spore forming aerobic bacilli :

العصويات الرقيقة *Bacillus subtilis*.

* جراثيم كروية ايجابية الغرام Gr + ve cocci :

المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*.

المكورات العنقودية البشرية *Staphylococcus epidermidis* .

المكورات المسبحية البرازية *Streptococcus faecalis*.

* جراثيم كروية سلبية الغرام Gr + ve cocci : نايسيريا السيلان *Neisseria gonorrhoea*.

اعتمدت طرق (٧) المحورة في دراسة الفعالية ضد الجرثومية للنكليوسيدات الجديدة (٩،١١،١٣،١٥،١٧،١٩) وبأستخدام طريقتي الأطباق والأنابيب . ففي طريقة الأطباق (قياس اقطار مناطق تثبيط النمو الجرثومي Growth Inhibition Zones) حضرت ستة تراكيز من كل نكليوسيد على حدة وهي (٥٠،١٠٠،٢٥٠،٥٠٠،٧٥٠،١٠٠٠) مايكروغرام/مل ، حيث ينشر (٠,١) سم٣ من معلق المزرعة الجرثومية بعمو (١٨-٢٤) ساعة والمنماة في وسط مرق نقيع القلب – الدماغ Brain – Heart Infusion] [Broth(Difco) (وبحيث يكون عدد الخلايا الجرثومية في هذه المزرعة ١٠ ° – ١٠ ` خلية جرثومية /سم٣ ولكل نوع جرثومي على حدة) على وسط Mueller – Hinton Agar(Difco) ثم تترك الاطباق مدة ٣٠ دقيقة لتجف وتضاف بعدها التراكيز المختلفة للنكليوسيد الجديد المعين بأستخدام ماصة دقيقة الحجم(٥) مايكرولتر لكل تركيز على سطح الوسط الملقح (وبواقع ستة تراكيز في كل طبق) وبعد حضنها في ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة تلاحظ مناطق تثبيط النمو (Growth Inhibition Zones) للتركيز المعين وتقاس بواسطة المسطرة وتقدر بالمليمترات(ملم) .

اما بالنسبة لطريقة الانابيب ففيها يتم تحديد التركيز المثبط الادنى Minimal Inhibitory Concentration(MIC) للنكليوسيد الجديد ويقدر بالمايكروغرام/مل منها . حيث يتم عمل محاليل مخففة متسلسلة من النكليوسيدات الجديدة بأستخدام مرق نقيع القلب – الدماغ ويضاف (٠,١) سم٣ من المزرعة الجرثومية ولكل نوع جرثومي على حدة ، وبعد الحضن في ٣٧°م مدة ٢٤ ساعة يتم ملاحظة الانابيب التي لا يظهر فيها نمو بالمقارنة مع السيطرة (انبوب حاوي على مزرعة جرثومية بدون معاملة وانبوي خالي من الزرع الجرثومي) حيث يعتبر آخر انبوب حاوي على تركيز معين لا يظهر فيه نمو جرثومي هو التركيز المثبط الادنى لذلك النكليوسيد.

يتم تعقيم تراكيز كافة النكليوسيدات الجديدة بأستخدام طريقة الترشيح Filtration بمرشح Seitz(ذو ثقوب اقطارها ٠,٤٥ مايكرون) ولا تستخدم طريقة التعقيم بالموصدة Autoclave خوفاً من اتلاف المركبات النكليوسيدية الجديدة بالحرارة العالية والضغط.

ب- تقييم فعالية النكليوسيدات الحرة الجديدة ضد الطور اليرقي الطفيلي الاكياس المائية

تم جمع عينات الاكياس المائية الخصبة Fertile cysts(الطور اليرقي لطفيلي الاكياس المائية *Echinococcus granulosus*) من البشر المصابين بالاكياس المائية بعد اجراء العملية الجراحية لهم وعزلت الرؤوس الاولية من الاكياس المائية وحفظت في المحلول الحافظ المعقم محلول الملح الفسيولوجي (Normal saline) 0.85 % NaCl + سائل الكيس المائي بنسبة ١:٤. قسمت الرؤوس الاولية المحفوظة الى سبع مجاميع ، عوملت المجاميع الست الاولى بالنكليوسيدات الحرة الجديدة (٩،١١،١٣،١٥،١٧،١٩) وتركت