تأثير المثبطات اليوريز المنقى من البكتريا المتقلبات *Proteus vulgaris* المعزولة محلياً

فريال حياوي محمد الشكرجي

معهد إعداد المعلمات، الكرخ الثانية، بغداد، العراق

الإستلام2012/4/1 القبول 2012/5/14

الخلاصة

أختبرت فعالية اليوريز المنقى من البكتريا المتقلبات *Proteus vulgaris* بوجود ستة مثبطات مختلفة هي الثايويوريا و هيدروكسي يوريا وEDTA و بيتا ميركابتوايثانول وفلوروفاميد والبارا-بنزوكينون و قد لوحظ أن جميعها تعمل كمثبطات لليوريز وقد كان تثبيط هذه المركبات لليوريز من النوع التنافسي بإستثناء البارا-بنزوكينون فقد كان غير التنافسي. وتم دراسة آلية التثبيط للمثطبات أعلاه بوجود ميركتبواثيانول فقد إستعاد الانزيم فعالية مع بارا-بنزكينون مما يدل على وجود مجموعة السلفهايدريل (SH) في الموقع الفعال فيما لم يتاثر عمل كل من ثايويوريا و هيدركسي يوريا والـ EDTA، إما عند استعمال ايونات النيكل فان كل المثطبات قد تأثر عملها ماعدا البيتاميركتبوايثانول وبارابنزكينون فلم يستعد الانزيم فعاليته مما يدل على أن موقع إرتباط هذه المثبطات غير الموقع الفعال، ومن نتائج الدراسة الحالية ظهر أن مثبط الفلوروفاميد أعطى أعلى فعالية تثبيطية لانزيم اليوريز.

THE EFFECT OF INHIBITORS ON PURE UREASE ISOLATED FROM LOCAL ISOLATE *PROTEUS VULGARIS*

Firial H. M. Al-Shikirhy

Teacher Training Institute, Second Khark, Baghdad, Iraq.

Received1/4/2012 Accepted 14/5/2012

ABSTRACT

Examination the urease activity which purified from *Proteus vulgaris* in the presence of six inhibitors were thiourea, hydroxy urea, EDTA, ß-Mercaptoethanol, flurofamide and Para - Benzoquinon has been observed that all these compounds had been urease inhibitors, results showed that all of them where competitive inhibitors except p- benzoqinon non-competitive. The mechanism inhibition were studying of all inhibitors compounds, there ß-Mercaptoethanol has regained enzyme effectively with the p - benzoquinon, which indicates the existence of a sulfhydryl group (SH) on-site effective in not affected by the act of each thiourea and hydroxurea and the EDTA, either when using ions nickel, all inhibitors may affected by their work, except ß -mercaptoethanol and p-benzoqinon and not recovery the enzyme activity, which indicates that the binding site inhibitors is effective, and the results of the current study appeared that the inhibitor flurofamide was the most effective inhibitors of the urease.

Key words: Urease Inhibitors; Mechanism inhibition; *proteus vulgaris*; Competitive inhibition.

المقدمة

تأتي بكتريا المتقلبات *Proteus* في صدارة الممرضات البولية المنتجة لأنزيم اليوريز الذي يلعب دوراً كبيراً في عملية الإستعمار Colonization و تحصي الكلية Nephrolithiasis و كذلك في تطور خمج حويض الكلية (1،2،3) . يعمل أنزيم اليوريز على حلمهة اليوريا إلى الأمونيا و الكاربامات الذي بدوره يتفكك تلقائيا منتجا جزئ آخر من الأمونيا و حامض الكربونيك H_2CO_3 (4،5،6) يتجزأ حامض الكربونيك إلى أيونات الهيدروجين H^+ و أيون الكربونات CO_3^{-2} الذي يتحد مع أيون الكالسيوم Ca^{+2} مكونا راسباً من كربونات الكالسيوم $CaCO_3$. أما الأمونيا فإنها تتحد مع أيونات الفوسفات PO_4^{-3} و أيونات المغنيسيوم Mg^{+2} مكونة راسباً من الأملاح الثلاثية ($Mg^{+2}\ NH_4^+\ PO_4^{-3}$) التي تسبب تكون الحصى في الكلية Nephrolithiasis (7). يعد أنزيم اليوريز أحد الأنزيمات التابعة للمجموعة المميئة Hydrolases ذات الرقم التصنيفي (E.C.3.5.1.5) و هم واسع الإنتشار في الطبيعة بين البكتريا، الطحالب، الفطريات، و النباتات (6) و هو من الأنزيمات الحاوية على مجاميع الـ SH- (3). تعرف المثبطات بانها كل مادة تخفض من سرعة التفاعل الانزيمي أو تؤدي الى ايقافه وذلك من خلال تاثيرها على مجاميع معينة للانزيم (8). أن دراسة تثبيط اليوريز له أهمية طبية، بيئية و زراعية. إذ يعد اليوريز كعامل ضراوة في البكتريا المرضية مما يجعله سبباً في حدوث العديد من المشاكل الصحية مثل تكوين حصوات الكلى، التهاب الحويضة و الكلية، قرحة المعدة و غيره (6،9) و بالتالي فان التطور في إكتشاف و إستعمال مثبطات اليوريز تؤدي إلى علاج الإصابات التي تسببها البكتريا المحللة لليوريا (10) ، إذ أن مثبطات اليوريز تعد علاجات مفيدة لأنها تعمل على منع تكوين الحصوات التي تسببها الكائنات المجهرية المنتجة لليوريز عند إصابتها للمسالك البولية (11). كما انها تؤدي الى خفض تلوث البيئة من خلال تثبيط انزيم اليوريز الموجود في بذور النباتات والمساعدة على زيادة أخذ النبات للنيتروجين المضاف عن طريق الاسمدة النتروجينية (12).

صنفت مثبطات اليوريز الى مجموعتين هما المثبطات الشبيهة بالركيزة Substrate-like مثل هيدروكسي يوريا Hydroxyurea (13) و أحماض الهيدروكساميك Hydroxamic (14) .إما المجموعة الثانية فهي المثبطات المعتمدة على الآلية Mechanism-based (المثبطات الغير تنافسية) مثل فوسفورو ثنائي الأميدات Phosphorodiamidates (15،16) و الاميدازول Imidazoles مثل لانسوبرازول Lansoprazole (17) و رابيبرازول Rabeprazole (18) و أوميبرازول Omeprazole (19). كما ان هنالك العديد من الدراسات الحديثة والتي تعتمد على تصميم أنواع مختلفة من المثطبات التنافسية منها organophosphorus inhibitors والتي نجحت في ايجاد مثل هذه العقاقير والتي دخلت مجال التطبيقية على الانزيم المنتجة من بكتريا *Bacillus pasteurii* و *Proteous vulgaris* . (20).

يهدف البحث الى دراسة نوع مثطبات المختلفة على انزيم اليوريز المنتج من العزلة المحلية *Proteus vulgaris* وتحديد قيم الـ Ki لكل من هذه المثبطات وتحديد نوع التثبيط للانزيم.

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على العزلة المحلية *P.vulgaris* من قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة بغداد والمعزولة من حالات خمج المسالك البولية وقد تم تشخيصها باستعمال عدة التشخيص api-20E (21). تم إستخلاص وتنقية انزيم اليوريز وذلك وفق الطريقة الموصوفة من قبل Al-Saadi وجماعته (22) و Brown (23) كما تم تقدير الفعالية الانزيمية بطريقة الاندوفينول (11) وعرفت وحدة الفعالية بانها كمية الانزيم اللازمة لتحويل مايكرومول من اليوريا الى امونيا في دقيقة واحدة عند درجة حرارة 37ْم. أما تركيز البروتين فقد قدر وفق الطريقة الموصوفة من قبل Bradford (24).

أستعملت المركبات التالية كمثبطات لليوريزفي هذه الدراسة وهي الثايويوريا بتراكيز(0.05 إلى 1.0 مللي مولاري) وهيدروكسي يوريا بتراكيز (10 إلى 60 مللي مولاري و EDTA بتراكيز(25 إلى 150 مللي مولاري) و بيتا-مركبتوإيثانول: β-Mercaptoethanol بتراكيز (5.0 إلى 40 مللي مولاري) وفلوروفاميد بتراكيز (0.5 الى 10 مايكرومولاري) و بارا-بنزوكوينون ρ-Benzoquinon بتراكيز(0.23 إلى 0.7 مللي مولاري).

تحديد التركيز المثبط لليوريز

أضيف التركيز المطلوب من المثبط المراد دراسة تاثيره الى دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني 7.5 وبوجود محلول اليوريا الخزين وتركت الانابيب في حمام مائي عند درجة حرارة 37ْم لمدة عشر دقائق بعدها يضاف الانزيم المنقى ماعدا أنبوب الكفئ التي يضاف لها انزيم بعد ايقاف التفاعل. ثم تحضن الانابيب عند درجة حرارة 37ْم لمدة 15 دقيقة، بعدها أتبعت الخطوات السابقة في تقدير الفعالية الانزيمية (11).

آلية عمل مثبطات اليوريز:

أ) بوجود البيتا- مركبتوإيثانول

تم إضافة محلول خزين البيتا- مركتبوايثانول بتركيز 4 مللي مولاري في وسط التفاعل بعدها أضيف التركيز المطلوب من المثبط قيد الدراسة وتكرر الخطوات السابقة المذكورة في الفقرة السابقة في تقدير الفعالية الانزيمية.

ب) بوجود ايون النيكل

تم إضافة محلول الخزين كبريتات النيكل بتركيز 4 مللي مولاري في وسط التفاعل بعدها أضيف التركيز المطلوب من المثبط قيد الدراسة وتكرر الخطوات السابقة المذكورة في الفقرة السابقة في تقدير الفعالية الانزيمية.

تحديد نوع التثبيط و قيمة الـ Ki

لتحديد نوع التثبيط وقيمة ثابت Ki فقد اتبع مايلي : أضيف 10 مايكرولتر (حسب تركيز كل واحدة كما مذكور في الفقرة السابقة) من كل مثبط من المثبطات قيد الدراسة الى الانابيب الاختبار الحاوية على دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني 7.5. بعدها أضيف محلول اليوريا الخزين (بتركيز 50 ملي مولار) وحضنت الانابيب في حمام مائي عند درجة حرارة 37 ºم لمدة عشر دقائق و ذلك لمجانسة حرارة خليط الدارئ مع اليوريا.

حضر كفئ (السيطرة) و ذلك بإضافة محلول دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني 7.5 و10 مايكرولتر من المثبط قيد الدراسة. كررت جميع الخطوات السابقة مع إستبعاد إضافة المثبط و تمثل هذه الخطوة الـ Control الضابطة أضيف 10 مايكرولتير من الأنزيم المنقى إلى كل أنبوبة من أنابيب الإختبار و من ضمنها أنابيب الكفئ و الأنابيب الضابطة. حضنت جميع الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة 37 °م لمدة 15 دقيقة. تكرر الخطوات السابقة في تقدير الفعالية الانزيمية. رسمت العلاقة بين تراكيز اليوريا و فعالية الأنزيم وفق معادلة ليفريز–برك (25).

النتائج والمناقشة

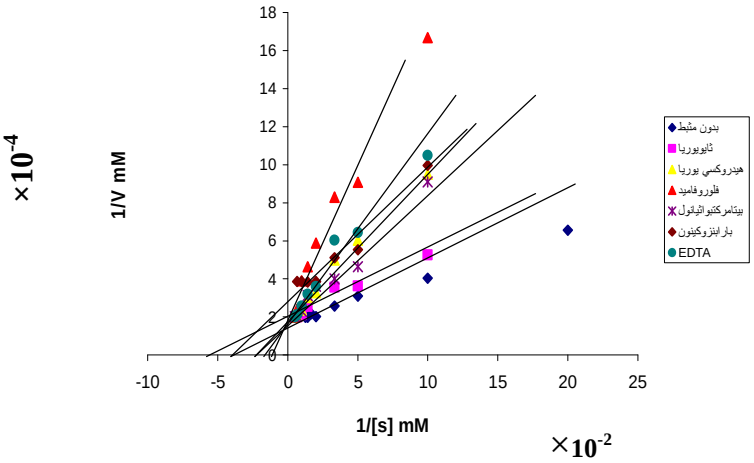
أشارت نتائج هذه الدراسة إلى أن الثايويوريا Thiourea يعد من مثبطات اليوريز إذ إنه ثبط اليوريز قيد الدراسة بنسبة 50 % عند التركيز 1 مللي مولاري و إنه من النوع التنافسي Competitive مع اليوريا الشكل (1) و قد كانت قيمة الـ K_i حوالي 30 مللي مولاري الجدول (1).

تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج Mobley و جماعته (11) الذين أشاروا إلى أن الثايويوريا مثبط اليوريز إذ عمل على تثبيط 50 % من فعالية اليوريز المستخلص من بكتريا المتقلبات ***Proteus mirabilis*** و كذلك اليوريز المستخلص من بكتريا ***Campylobacter pylori*** عند 1000 مايكروغرام/مليلتر لكل منهما. و في دراسة في باكستان قام بها Ahmed و جماعته (26) على اليوريز المستخلص من البقول Jack bean لاحظوا أن الثايويوريا يثبط 50 % من فعالية اليوريز عند التركيز 21 مايكرومولاري (1598.5 مايكروغرام/مليلتر) و إنه من النوع التنافسي مع اليوريا، بينما في دراسة أخرى على يوريز البقول Jack bean أشار كل من Lopreore و Byers (27) إلى أن الثايويوريا مثبط لليوريز و انه من النوع التنافسي مع اليوريا و قد كانت قيمة الـ K_i هي 70 مللي مولاري و 0.2 مللي مولاري على التوالي. و قد أشار Tanaka و جماعته (3) إلى أن الثايويوريا مثبط ليوريز البقول أما Todd و Hausinger (28) فقد لاحظا أن الثايويوريا لا يعد مثبط من مثبطات اليوريز المستخلص من بكتريا ***Klebsiella aerogene***.

أما الهيدروكسي يوريا Hydroxyurea فقد وجد في هذه الدراسة أنه أكثر تثبيطا لليوريز من الثايويوريا، إذ انه ثبط 50 % من فعالية اليوريز قيد الدراسة عند تركيز 90 مايكروغرام/مليلتر و إنه من النوع التنافسي مع اليوريا شكل(1) وجدول (1) و قد كانت قيمة الـ K_i هي 0.64 مللي مولاري جدول(2).

جدول(1): تاثير بعض المثبطات على فعالية اليوريز المنقى والمستخلص من العزلة المحلية

المثبط	الفعالية (وحـــــدة / مليليتر)	تركيز المثبط عند 50% تثبيط (مـــــايكروغرام /مل)	الفعاليـــة المتبقيـــة عنـــد 50% تثبيط (وحدة / مليليتر)	الفعالية المتبقية في وجود المثبط اضافة الى مركتبوايثانول (0.4 ملي مولاري) (وحدة / مليليتر)	النيكـــــل (4 مللــــــي مولاري) (وحدة / مليليتر)
الثايويوريا	3407.308	1000	(%49.88)1699.644	(%49.6)1690.73	(%24.8) 846.70
هيدروكسي يوريا	4058.229	90	(%50.3)2040.998	(%49.7)2016.934	(%68)2760.25
EDTA	4106.06	1117	(%51.73)2123.89	(%34.73)1426.03	(%76.3) 3132.8
البيتا- مركتبوايثانول	3767.38	62.5	(%52.16)1965.24		(%15.37)579.323
فلوروفاميد	3493.761	0.1	(%50) 1749.85	(%47.4)1655.08	(%72)2516.04
بارابنزوكينون	3532.383	1.8	(%52)1836.01	(%66.1)2335.12	(%14.2)501.783



شكل(1):العلاقة بين تركيز اليوريا و فعالية اليوريز المستخلص و المنقى من السلالة بطريقة رسم لينويفر - برك، في وجود و عدم وجود المثبطات قيد الدراسة.

جدول(2): تحديد قيم السرعة العظمى و ثابت ميكايلس K_m لأنزيم اليوريز المنقى و المستخلص من العزلة *Proteus vulgaris* في وجود عدد من مثبطات اليوريز مع تحديد نوع التثبيط لكل منها.

المثبط	V_{max} (وحدة/مليلتر)	K_m مللي مولاري	K_{mapp} مللي مولاري	K_i مللي مولاري	نوع التثبيط
بدون مثبط	5053.48 (4166.67)	14 (17)			
الثايويوريا	5014.85		(25) 20	(29.04) 30.65	تنافسي
هيدروكسي يوريا	4993.76		(45.45) 37	(0.628) 0.64	تنافسي
EDTA	5002.97		(55.55) 45	(0.88) 0.9	تنافسي
فلوروفاميد	5002.6738		(111)93	10×2.04^{-5} 10×2.04^{-5}	تنافسي
البيتا-مركبتوإيثانول	4982.17		(40) 33	(0.59) 0.59	تنافسي
بارا-بنزوكينون	3609.63	17		(0.032) 0.032	غير تنافسي

القيم التي داخل ( ) قدرت بطريقة لينويفر -برك، أما التي خارج ( ) فقدرت بطريقة المنحنى الزائدي.

تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج Mobley و جماعته (11) الذين أشاروا إلى أن الهيدروكسي يوريا يعد من المركبات الفعالة المثبطة لليوريز إذ وجدوا أن الهيدروكسي يوريا يثبط 50 % من فعالية اليوريز المستخلص من بكتريا المتقلبات *P. mirabilis* عند 89 مايكروغرام/مليلتر كما يثبط أيضاً النسبة نفسها من فعالية اليوريز المستخلص من بكتريا *C.pylori* عند 85 مايكروغرام/مليلتر. وقد وجد Tanaka و جماعته (6) إن الفعالية التثبيطة للهيدروكسي يوريا عند تركيز 0.1 مللي مولاري (7.6 مايكروغرام/مليلتر) تعطي نسبة ثبيط 50 % من فعالية اليوريز المستخلص من البقول Jack bean. كما أوضح Uesato و جماعته (29) إلى أن الهيدروكسي يوريا مثبط فعال لأنواع اليوريز المختلفة سواء كان مصدرها نباتي أم من الكائنات المجهرية.

أظهرت هذه الدراسة أن الـ EDTA يعد من مثبطات اليوريز إذ أن 1117 مايكروغرام/مليلتر منه تثبط 50 % من فعالية اليوريز قيد الدراسة و قد كان التثبيط من النوع التنافسي الشكل (1)والجدول (1) و قد كانت قيمة الـ K_i هي 0.9 مللي مولاري الجدول (2). و تقترب نتائج هذه من نتائج Mobley و جماعته (11) الذين قاموا بدراسة اليوريز إذ أشاروا إلى أن الـ EDTA يثبط 50 % من فعالية الأنزيم عند 1573 مايكروغرام/مليلتر و ذلك لليوريز المستخلص من بكتريا المتقلبات *P.mirabilis* و عند 2903 مايكروغرام/مليلتر لليوريز المستخلص من بكتريا *Helicobacter pylori*.

أستعمل في دراسة الحالية البيتا-مركبتوإيثانول β-Mercaptoethanol لمعرفة تأثيره على فعالية اليوريز قيد الدراسة و قد لاحظنا أن هذا المركب يعد من مثبطات اليوريز و إنه يثبط 50 % من فعالية اليوريز عند 62.5 مايكروغرام لكل مليلتر (0.8 مللي مولاري) و إنه من النوع التنافسي الشكل(1) والجدول (1) و قد كانت قيمة الـ K_i هي 0.59 مللي مولاري الجدول (2). تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج Todd و Hausinger (28) اللذان أشارا إلى أن البيتا-مركبتوإيثانول مثبط ليوريز بكتريا *K. aerogenes* و أنه من النوع التنافسي و قد كانت قيمة الـ K_i هي 0.55 مللي مولاري.

كما درس تأثير البارا-بنزوكينون p-Benzoquinone على فعالية اليوريز و قد لوحظ أن هذا المركب من المركبات الفعالة في تثبيط اليوريز و إنه قد ثبط 50 % من فعالية الأنزيم عند 1.8 مايكروغرام/مليلتر (16.65 مايكرومول) و أن التثبيط من النوع غير التنافسي Non-competitive شكل(1) وجدول (1)، وكانت قيمة الـ K_i هي 32.38 مايكرومولاري جدول(2). و تتفق النتائج مع Ashiralieva و Kleiner (30) إذ أشارا إلى أن البارا-بنزوكينون قد ثبط 50 % من فعالية اليوريز المستخلص من بكتريا المتقلبات *Proteus mirabilis* بتركيز 18 مايكرومولاري (1.95 مايكروغرام/مليلتر) و قد كان التثبيط من النوع غير التنافسي، كذلك إلى أن البارا-بنزوكينون مثبط لليوريز المستخلص من بكتريا *Bacillus pasteurii* و يوريز *Canavalia enciformis* (يوريز الباقلاء Jack bean) عند K_i 80 و 10 مللي مولاري على التوالي و قد كان التثبيط من النوع غير التنافسي.

درست آلية إرتباط كل مثبط من المثبطات المدروسة باليوريز المستخلص و المنقى من بكتريا المتقلبات *Proteus vulgaris* و ذلك بإضافة 0.4 مللي مولاري بيتا- مركبتوإيثانول في وسط التفاعل الذي يحتوي على مثبطات اليوريز، إذ يلاحظ من الجدول (1) بان فعالية اليوريزقد إزدادت بوجود البيتا- مركبتوإيثانول β-Mercaptoethanol في وسط التفاعل وفقدان جزء من القدرة التثبيطية للبارا-بنزوكوينون مما أدى إلى إستعادة اليوريز لفعاليته التي فقدها في غياب البيتا-مركبتوإيثانول بينما لم يتأثر عمل مثبطات اليوريز الأخرى قيد الدراسة بوجود البيتا- مركبتوإيثانول. من المعروف أن اليوريز ينتمي إلى مجموعة الأنزيمات الحاوية على المجموعة الوظيفية SH- (Sulfhydryl) التي توجد في الموقع الفعال للأنزيم. ومن خلال نتائج هذه الدراسة ممكن الاستنتاج بأن مثبط اليوريز بارا-بنزوكوينون p-Benzoquinone يرتبط بمجاميع الـ SH- الموجودة في الموقع الفعال لليوريز قيد الدراسة مما يؤدي إلى تثبيط الأنزيم، و لكن عند إضافة البيتا-مركبتوإيثانول المعروف باحتوائه على مجموعة SH- في تركيبه إلى وسط التفاعل فانه يعمل على الارتباط بالمثبط و بالتالي يمنع المثبط من الارتباط باليوريز مما يؤدي إلى حماية مجاميع الـ SH- الموجودة في الموقع الفعال للأنزيم وبذلك يستعيد اليوريز لفعاليته(28).

كما يبين من الجدول (1) أن إضافة أيونات النيكل بتركيز 4 مللي مولاري إلى وسط التفاعل الذي يحتوي على مثبطات اليوريز الـ EDTA و الفلوروفاميد Flurofamide و الهيدروكسي يوريا Hydroxyurea لوحظ إزدياد فعالية اليوريز مقارنه بعدم وجود أيونات النيكل . و هذا ربما دليل على أن كل من مثبطات اليوريز الـ EDTA ، الفلوروفاميد Flurofamide، و الهيدروكسي يوريا Hydroxyurea تثبط اليوريز من خلال إرتباط كلا منها بأيونات النيكل الموجودة في الموقع الفعال لليوريز مما يؤدي إلى تثبيط اليوريز، و بالتالي فإن إضافة أيونات النيكل إلى وسط التفاعل يؤدي إلى إرتباط هذه المثبطات بأيونات النيكل المضافة و ربما يؤدي ذلك إلى حماية النيكل في الموقع الفعال للأنزيم و بالتالي حماية الأنزيم من التثبيط و النتيجة نلاحظها من خلال زيادة فعالية الأنزيم. فقد أشار Suarez و جماعته (31) إلى أن وجود أيوني النيكل في الموقع الفعال لليوريز وأن هذه الأيونات مرتبطة بالماء الضروري للنشاط الحفزي للأنزيم.

كما سبق أن أشير إلى أن وجود البيتا-مركبتوإيثانول في وسط التفاعل لم يمنع عمل الهيدروكسي يوريا كمثبطات و لكن عند إضافة أيونات النيكل Ni^{2+} إلى وسط التفاعل فقد لاحظنا استعادة اليوريز لفعاليته و هذا ربما يشير إلى أن هيدروكسي يوريا تثبط اليوريز من خلال ارتباطها بأيونات النيكل الموجودة في الموقع الفعال لليوريز. فقد أشار Tanaka و جماعته (6) إلى أن إضافة أيونات النيكل Ni^{2+} إلى وسط التفاعل يعمل على استعادة اليوريز لفعاليته التي ثبطت بفعل هيدروكسي يوريا. إما إضافة ايوانات النيكل الى وسط التفاعل بوجود كل من المثطبات مركتبواثيانول وبارابنزوكينون فقد لوحظ عدم إستعادة الانزيم لفعاليته مما يدل على إرتباطهما في الموقع الارتباط وليس الموقع الفعال مما يؤدي الى تغير في شكل الموقع الفعال.

من خلال النتائج التي سجلت في الدراسة الحالية وجد أن جميع المركبات التي أستخدمت هي مثبطات لليوريز المستخلص و المنقى من بكتريا المتقلبات ***P. vulgaris*** و قد لوحظ أن الفلوروفاميد هو الأفضل فعالية من بين هذه المثبطات. كما لوحظ أن مثبطات اليوريز و هي الثايويوريا وهيدروكسي يوريا و الـ EDTA و البيتا-مركبتوإيثانول و فلوروفاميد هي مثبطات من النوع التنافسي Competitive جدول(2) ، إذ يتنافس كل من هذه المركبات مع الركيزة (اليوريا) على الإرتباط بالموقع الفعال Active site لليوريز. وعند زيادة تركيز اليوريا يقل تأثير المثبط مما يزيد من فرص إرتباط الركيزة بالأنزيم و بالتالي يستعيد الأنزيم فعاليته التي فقدها. و قد لوحظ أن زيادة تركيز اليوريا المضاف إلى وسط التفاعل أدى إلى زيادة السرعة العظمى V_{max} و عودتها إلى قيمتها قبل إضافة المثبط و في المقابل لوحظ زيادة قيمة ثابت ميكايلس K_m جدول(2) و هذا دليل أن التثبيط من النوع التنافسي (25). كما يلاحظ من الجدول (2) الى ان بارا-بنزوكينون *p*-Benzoquinone من مثبطات اليوريز قيد الدراسة و أنه من النوع غير التنافسي Non-competitive .أي إنه لا يتنافس مع اليوريا عند إرتباطه باليوريز فكل منهما له موقع إرتباطه الخاص به على الأنزيم.

و قد لوحظ أن الزيادة في تركيز اليوريا في الوسط لم يؤثر على فعالية اليوريز أي أن زيادة اليوريا لم يعيد السرعة العظمى إلى قبل إضافة المثبط، بينما لم تتغير قيمة ثابت ميكايلس K_m اذ بلغت 17 مللي مولاري وكانت قيمة Ki تساوي 0.032 مللي مولاري وهذا دليل أن التثبيط من النوع غير التنافسي Non-competitive.

و قد أشار Segal (25) إلى أن هذا النوع من التثبيط يحدث فيه إرتباط الركيزة S و المثبط I بمواقع مختلفة على الأنزيم، إن ظهور المعقد ESI يكون نتيجة لوجود أية كمية من المثبط في وسط التفاعل و أن تكونه لا يؤدي إلى تكوين ناتج و بالتالي تبقى هذه الكمية من الأنزيم بإستمرار لا تعطي ناتج أي أن الأنزيم لا يعمل بطاقته القصوى مما يؤدي إلى إنخفاض قيمة السرعة العظمى V_{max} بوجود هذا النوع من المثبطات.

المصادر

1- Amtuel, Z.; Atta-ur-Rahman, Siddiqui, R. A and Choudhary, M.I.(2002). Chemistry and mechanism of urease inhibition. *Current Med Chemist*, 9: 1323-1348.

2- Dattelbaum; J. D.; Lockatell, C.V.; Johanson, D.E.; Mobley, H.L.T.(2003). Ure R, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in expermintal urinary tract infections. Infect. *Immun*., Feb. 71(2): 1026-1030.

3- Tanaka, T.; Kawase, M. and Tani, S.(2003). Urease inhibitory activity of simple α, β-unsaturated ketones. Life Sciences. 73: 2985-2990.

4- Heimer, S.R., and Mobley, H. L.T.(2001). Interaction of *Proteus mirabilis* urease apoenzyme and accessory identified with yeast two-hybrid technology. *J. of Bacteriolo*, 183(4): 1423-1433.

5- Li, X.; Lockatel, C. V.; Johnson, D. E.; Lane, M. C.; Warren, J-W.and Mobley, H.L.T.(2004). Development of intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis. Infect. Immun*., Jan. 72(1): 66-75.

6- Tanaka, T.; Kawase, M. and Tani, S. (2004). α- Hydroxyketones as inhibitors of urease. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 12: 501-5.

7- Zhao, H.; Thompson, R. B.; Lockatel, V.; and Mobley, H. L.T.(1998). Use Of Green Fluorescent Protein To Assess Urease Gene Expression By Uropathogenic *Proteus mirabilis* During Experimental Ascending U.T.I. *Infect. And Immun*., 66: 330-335.

8- Whitaker, J. R. and Bernhard, R. A. (1972). Experiments for: *An Introduction to Enzymology*. The Whiber Press.

9- Mobley, H. L.T.; Island, M.D.; and Hausinger, R. P.(1995). Molecular Biology Of Microbial Ureases. *Microbiolo Reviews*., 59(3): 451-480.

10- Kosikowska, P.; Berlicki, L.(2011). Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: A patent Review. Expert Opin. Ther.Pat.21, 945.

11- Mobley, H.L.T., Cortesia, M.J., Rosenthal, L. E., and Jones, B.D.(1988). Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *J. of Clin Microbiol*, 26(5): 831-6.

12- الكرخي، ليلى عثمان فرحان (2006). أستخلاص وتنقية وتوصيف انزيم اليوريز من بذور نبات الحنطة *Triticum aestivum* L. ودراسة تاثير بعض المثبطات عليه. رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات.

13- Uesato, S.; Hashimoto, Y.; Nishino, M.; Nagaoka, Y. and Kumajima, H.(2002). N-sustituted hudroxyureas as urease inhibitors. *Chem. Pharm. Bull*., 50(9):1280-1282.

14- Odake, S.; Morikawa, T.; Tsuchiya, M.; Imamura, L. and Kobachi, K.(1994). Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by hydroxamic acid derivatives. *Biological Pharmaceutical Bulletin*., 17(10): 1329-32.

15- Pope, A. J.; Toseland, C. D. N.; Rushant, B.; Richardson, S.; McVey. M.; and Hills, J.(1998). Effect of potent urease inhibitor flurofamide, on *Helicobacter sp. In vivo* and *in vitro*. *Digestive Diseases and Sciences*, Jan.43(1): 109-19.

16- Faraci, W.S.; Yang, B.V.; O'Rourke, D. and Spencer, R.W.(1995). Inhibition of *Helicobacter pylori* urease by phenyl phosphorodiamidates: mechanism of action. *Bioorganic Med Chemistry*., 3(5): 605-610.

17- Nagata, K.; Satoh, H.; Iwahi, T.; Shimoyama, T.and Tamura, T.(1993). Potent inhibitory action of the gastric proton pump inhibitor lansoprazole against urease activity of *Helicobacter pylori*: Unique action selective for *Helicobacter pylori* cells. *Antimicrob. Agents and Chemother*., 37: 769-774.

18- Park, H.S.; and Hausinger, R. P.(1996). Metal Ion Interactions With Urease and Ure D-Urease Apoproteins. *Biochemis*, 35(16): 5345-52.

19- Kuhler, T.C.; Fryklund, J.; Bergman, N. A.; Weilitz, J.; Lee, A. andLarsson, H.(1995). Structure-activity relatioship of omeprazole and analogues as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *J. of Med Chemistry*,38: 4906-16.

20- Vassiliou, S.; Grabowiecka, A; Kosikowska, P.; Yiotakis, A.; Kafarski, P.; Berlicki, L.(2008). Design, synthesis and evaluation of novel organophosphorus inhibitors of bacterial ureases. *J. Med. Chem*., 51,5336.

21- Atlas, R. (1995). Laboratory Manual Of Experimental Microbiology. 1st (ed). Mosby, Inc. Missouri.

22- Al-Saddi, N. H. M.; Al-Jumaily E. F.A. and Al-Rawi, A. M. (2009). Extraction and purification of urease from *Proteus mirabilius. National J. of Chemistry*,33:138-145.

23- Brown, R. M.(1975). Resistance Of *Pseudomonas aeruginosa*.(1st)ed. John Wiley and Sons. London.

24- Bradford, M. M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem*., 72: 248-55.

25- Segal, I. H. (2002). Biochemical Calculation. 10th ed. John Wiely and Sons. Inc. U.S.A.

26- Ahmed, V.U.; Hussain, J.; Hussain, H.; Jassbi, A.R.; Ullah, F.; Lodhi, M. A.; Yasin, A.; Choudhary, M.I.(2003). First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. *Chem. Pharm. Bull*., 51(6): 719-23.

27- Lopreore, C.; and Byers, L.D.(1998). The urease- catalyzed hydrolysis of thiourea and thioacetamide. *Archives of Biochemis and Biophysics*, 349(2): 299-303.

28- Todd, M.J., and Hausinger, R. P.(1989). Competitive inhibitors of *Klebsiella aerogenes* urease. *The J. of Biologi Chemistry*, 264(27): 15835-15842.
29- Uesato, S.; Hashimoto, Y.; Nishino, M.; Nagaoka, Y.; Kumajima, H.(2002). N-sustituted hudroxyureas as urease inhibitors. *Chem. Pharm. Bull*., 50(9):1280-1282.
30- Ashiralieva, A. and Kleiner, D. (2003). Polyhalogenated benzo-and naphthoquinonesare potent inhibitors of plant and bacterial ureases. FEBS letters.555:367-370.
31- Suarez, D.; Diaz, N. and Merz, K. M. Jr.(2003). Urease: quantum chemical calculations on cluster modles. *J. Am. Chem. Soc*., Dec. 125(50):15324-15337.