



قسم الكيمياء الحيوية  
كلية علوم الطبيعة والحياة

مذكرة

مقدمة من طرف: بن سباع كريمة

لنيل شهادة الماجستير

تخصص: كيمياء حيوية تطبيقية

مميحة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بعنصر الزنك

- البحث عن سلالة بكتيرية مفرزة

- إستبيان حساسية نشاطها لمستخلصات فينولية لبذور *Nigella sativa.l*

قدّمت يوم: 10/10/2012 أمام لجنة المناقشة المكونة من السادة:

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| الرئيس (ة): د. حمامة بوريش    | أستاذة، جامعة سطيف                               |
| المشرف: د. رشيد محادي         | أستاذ محاضر جامعة سطيف                           |
| الممتحنون: د. محمد ميهوب زروق | أستاذ محاضر جامعة سطيف                           |
| د. فريدة ساحلي                | أستاذة محاضرة مكلفة<br>بالدروس المستشفى الجامعي، |

سطيف

السنة الجامعية: 2011-2012

## التشكرات

أحمد الله حمدا كثيرا أن وفقني لإتمام هذا البحث وتجاوزي كل المراحل الصعبة التي مرت بي

كما أتقدم بالشكر الخالص إلى الأستاذ المشرف الدكتور: رشيد محادي الذي أشرف على هذا العمل و تابعه باهتمام كبير ولم يبخل عليّ بتقديم النصائح من أجل إتمام هذا البحث على أكمل وجه.

أشكر السادة الدكاترة محمد ميموب زروق و فريدة ساحلي وبالأخص الدكتورة حمامة بوريش على قبولهم المشاركة في مناقشة هذا البحث.

أوجه شكري الجزيل مرة أخرى للدكتورة فريدة ساحلي بالمستشفى الجامعي سطيف لمساعدتهما في توفير السلالات البكتيرية.

كما أشكر الأستاذ نور الدين بلعطار على المساعدة التي قدمها لي.

أخيرا أشكر كل من قدم لي مساعدة ولو بشكل بسيط خلال إنجازي هذا البحث.

## الإهداء

إلى روح والدي الطاهرة: بن سباح الخوثير رحمه الله

وإلى أمي الغالية حفظها الله

|    |  |
|----|--|
| 2  | I- الإنزيمات المميهة للحلقة $\beta$ -lactam                                    |
| 2  | I-1- تطور المقاومة البكتيرية بمميئات الحلقة $\beta$ -lactam                    |
| 3  | I-2- تصنيف مميئات الحلقة $\beta$ -lactam                                       |
| 3  | I-2-1- تصنيف Ambler (أو التصنيف الجزئي)  |
| 3  | I-2-2- تصنيف Bush، Jacoby و Medeiros   |
| 4  | I-3- بنية مميئات الحلقة $\beta$ -lactam  |
| 4  | I-3-1- بنية إنزيمات مميئات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بسيرين             |
| 7  | I-3-2- بنية مميئات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون الزنك                |
| 9  | I-4- آلية وحركية النشاط التحفيزي لمميئات الحلقة $\beta$ -lactam                |
| 9  | I-4-1- آلية التحفيز لمميئات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بسيرين            |
| 13 | I-4-2- آلية النشاط التحفيزي لمميئات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك |
| 16 | II- مثبطات مميئات الحلقة $\beta$ -lactam                                       |
| 16 | II-1- أنواعها  |
| 20 | II-2- آلية وحركية التثبيط لمميئات الحلقة $\beta$ -lactam                       |
| 20 | II-2-1- مميئات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بسيرين                         |
| 24 | II-2-2- مميئات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك                      |
| 26 | II-3- المقاومة البكتيرية لمثبطات مميئات الحلقة $\beta$ -lactam                 |
| 27 | III- الفلافونويدات   |
| 28 | III-1- البنية الكيميائية والتصنيف  |
| 28 | III-2- الخصائص الفيزيائية – الكيميائية   |
| 29 | III-3- التأثيرات البيولوجية  |
| 29 | III-4- العلاقة بنية- نشاط (التثبيط)  |
| 30 | III-5- بذور <i>Nigella sativa</i> L. والفلافونويدات                            |

|         |   |
|---------|---|
| 32..... | I- المادة البيولوجية  |
| 32..... | I-1- بذور <i>Nigella sativa</i> L.  |
| 32..... | I-2- البكتيريا  |
|         | II- الطرق:  |
| 32..... | II-1- تحضير المستخلصات الفينولية من بذور <i>Nigella sativa</i> L.                       |
| 32..... | II-1-1- مستخلص فينولي غير منزوع الدسم   |
| 34..... | II-1-2- مستخلص فينولي منزوع الدسم   |
| 35..... | II-2- الدراسة الكمية للمستخلصات الفينولية لبذور <i>Nigella sativa</i> L.                |
| 35..... | II-2-1- التقدير الكمي للعديدات الفينول  |
| 35..... | II-2-2- التقدير الكمي للفلافونويدات   |
| 36..... | II-3- الدراسة النوعية لبذور <i>Nigella sativa</i> L.                                    |
| 36..... | II-4- تحضير المستخلص الخام لمميهة الحلقة $\beta$ -lactam                                |
| 37..... | II-5- تقدير كمية البروتينات   |
| 39..... | II-6- تحديد الوسائط الحركية لمميهة الحلقة $\beta$ -lactam                               |
| 39..... | II-7- دراسة حساسية المستخلصات الخام لمميهة الحلقة $\beta$ -lactam لمتبطلاتها الكلاسيكية |
| 39..... | II-7-1- التثبيط بالحمض clavulanique   |
| 39..... | II-7-2- التثبيط بـ sulbactam  |
| 40..... | II-7-3- التثبيط بـ tazobactam   |
| 40..... | II-8- حساسية المستخلصات الخام لمميهة الحلقة $\beta$ -lactam (EDTA)                      |
|         | II-9- دراسة حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية                                  |
| 41..... | الخام للمستخلصات الفينولية لبذور <i>Nigella sativa</i> L.                               |

## النتائج

|         |  |
|---------|--|
| 43..... | I- الدراسة الكمية للمستخلصات الفينولية لبذور <i>Nigella sativa</i> L.                          |
| 43..... | I-1- التقدير الكمي لعديدات الفينول   |
| 44..... | I-2- التقدير الكمي للفلافونويدات للمستخلصات الفينولية لـ <i>Nigella sativa</i> L.              |
| 45..... | II- الدراسة النوعية للمستخلصات الفينولية لبذور <i>Nigella sativa</i> L.                        |
| 49..... | III- تحضير المستخلص الخام الإنزيمي لمميهة الحلقة $\beta$ -lactam و تقدير محتواه من البروتين    |
| 50..... | VI- تحديد الوسائط الحركية للنشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام                            |
| 52..... | V- حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام لمتبطلاته الكلاسيكية (المستعملة في العلاج) |

|         |  |
|---------|--|
| 57..... | IV - حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام للـ EDTA           |
|         | -IIV حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام                    |
| 60..... | للمستخلصات الفينولية لبذور <i>Nigella sativa</i> L.                      |
|         | <b>المناقشة</b>  |
| 68..... | I - الدراسة الكمية للمستخلصات الفينولية لبذور <i>Nigella sativa</i> L.   |
| 69..... | II - الدراسة النوعية للمستخلصات الفينولية لبذور <i>Nigella sativa</i> L. |
| 69..... | III - تحضير المستخلصات الإنزيمية الخام وتقدير محتواها البروتيني          |
|         | -VI حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية                           |
| 71..... | الخام لمثبطاته الكلاسيكية (المستعملة في العلاج)                          |
| 72..... | V - حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام للـ EDTA            |
|         | -IV حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية                           |
| 72..... | الخام للمستخلصات الفينولية لبذور <i>Nigella sativa</i> L.                |
| 75..... | <b>قائمة المراجع</b>   |
|         | <b>الملحق</b>  |

## المخلص:

تم تحضير مستخلصين فينولينين منزوع وغير منزوع الدسم من طحين بذور *Nigella sativa* L. ودراسة محتوَاهما الكمي من عديدات الفينول فكان في حدود 768 و 890.66 ميكروغرام مكافئ الحمض gallique/مل، على الترتيب؛ ومن الفلافونويدات فكان 18.00 و 18.35 ميكروغرام مكافئ rutin/مل، على الترتيب. كشفت دراستهما النوعية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عن تباين ضعيف فيما بينهما. كلاهما يحتوي على الحمض غاليك، كرسيتين، ريتين؛ زيادة على هذا يحتوي غير منزوع الدسم على كونفيرول و/أو فانلين.

تم تحضير ثلاث مستخلصات خام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam ابتداء من عزلة سريرية لـ *E.coli* ولـ *K.pneumoniae* ولـ *Acinetobacter* المقاومة للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams و تقدير محتوَاها البروتيني فكان في حدود 80.30 و 48.56 و 36.73 مل/مغ مستخلص إنزيمي خام، على الترتيب. أظهرت الدراسة الحركية للنشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام للعزلة *E.coli* و *K.pneumoniae* و *Acinetobacter* أنها تميّه النيتروسيدين بثابت ميخائيليس قدره 13.51 و 17.73 و 9.42 ميكرومولار، على الترتيب؛ وبسرعات قصوى قدرها 308.64 و 108.93 و 168.35 ميكرومول/مغ/د، على الترتيب؛ مبدية تفاوتاً في شراهة التثبيط وتفاوتاً في النشاط الإماهي. بين إستنساخ هذه الدراسة الحركية في وجود EDTA أو واحد من ثلاثة مثبطات كلاسيكية علاجية (الحمض clavulanic، sulbactam، tazobactam) أن النشاط الإماهي للأول و الثاني غير حساسان لـ EDTA وحساسان للحمض clavulanic (ثا. ميخائيليس = 20.87، 23.92 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 18.43، 28.75 ميليمولار، على الترتيب) ولـ sulbactam (ثا. ميخائيليس = 23.31، 27.17 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 10.79، 14.7 ميليمولار، على الترتيب) ولـ tazobactam (ثا. ميخائيليس = 28.16، 25 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 6.14، 11.32 ميليمولار، على الترتيب) إذ تُثبَط هذه الجزينات هذا النشاط الإماهي تثبيطاً تنافسياً. بينت أيضاً أن النشاط الإماهي للتالث حساس لـ EDTA (ثا. ميخائيليس = 21.27 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 3.97 ميكرومولار) إذ يثبته تثبيطاً تنافسياً وغير حساس للمثبطات الكلاسيكية. يدعم هذا إمكانية إحتواء المستخلصين الإنزيميين الأول و الثاني على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بحمض أميني سيرين، و المستخلص الإنزيمي الثالث على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك. خلافاً للمستخلص الإنزيمي للعزلة *E.coli* و *K.pneumoniae*، بين إستنساخ نفس الدراسة الحركية في وجود المستخلص الفينولي منزوع وغير منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa* L. أن النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي للعزلة *Acinetobacter* حساس لهما وأكثر حساسية للثاني (ثا. ميخائيليس = 24.5 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 66.08، 0.38 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique، مكافئ rutin، على الترتيب) إذ يثبَط هذا النشاط الإماهي تثبيطاً تنافسياً. يمكن إرجاع هذا التثبيط إلى خاصية الفلافونويدات على إستخلاص أيونات العناصر الفلزية و هذا بحكم أن النشاط الإماهي لهذا المستخلص الإنزيمي مرده إحتوائه على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك.

الكلمات المفتاحية: مميهات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بفلز، *Nigella sativa* L.، الفلافونويدات.

## Abstract:

### Metallo- $\beta$ -lactamase.

**-Research of producing bacterial strain.**

**-Sensitivity of enzymatic activity to polyphenolic extracts from *Nigella sativa* seeds.**

Two phenolic extracts lipidic and non lipidic from *Nigella sativa* L. seeds have been prepared. The quantitative analysis of polyphenols showed that the lipidic extract contained 890.66 ug gallic acid equivalent (GAE)/ml, while the non lipidic extract contained 768 ug GAE/ml. The flavonoids concentration in lipidic and non lipidic extracts was 18.35 and 18 rutin equivalent (RE) /ml, respectively. The qualitative analysis by a thin layer chromatography showed a slight difference between the two extracts. Both of them contained gallic acid, quercetin and rutin. In addition, the lipidic extract contains kaempferol and/or vanillin.

The crude extract of  $\beta$ -lactamase had been prepared from a clinical isolates of *E. coli*, *K.pneumoniae* and *Acinetobacter* all resistant to the antibiotic  $\beta$ -lactams. Total proteins have been quantified as : 80.30, 48.56 and 36.73 mg proteins/ml crude enzymatic extract, respectively. The study of the hydrolysis kinetics of crude enzymatic extracts from *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Acinetobacter* isolates showed that all of them hydrolyse the nitrocefin with  $K_m=13.51$ , 17.73 and 9.42 $\mu$ M successively and with  $V_{max}$  of 308.64, 108.93 and 168.35  $\mu$ mol/g/min, respectively. That exhibits a difference in their affinity and hydrolysis activity. When reproducing the same kinetic study in presence of EDTA and three classical therapeutic inhibitors (clavulanic acid, sulbactam, tazobactam), it was noted that both the first and the second enzymatic extract were not sensitive to EDTA but sensitive to the clavulanic acid ( $K_m=20.87$ , 23.92  $\mu$ M;  $K_i=18.43$ , 28.75 mM), to sulbactam ( $K_m=23.31$ , 27.17;  $K_i=10.79$ , 14.7mM) and to tazobactam ( $K_m=28.16$ , 25 $\mu$ M;  $K_i=6.14$ , 11.32 mM). These molecules inhibit competitively the hydrolysis activity. It was noted equally that the hydrolysis activity of the third extract was sensitive to EDTA which inhibits it competitively ( $K_m=21.27\mu$ M,  $K_i=3.97\mu$ M) and was not sensitive to the classical inhibitors. This means that the first and second enzymatic extracts probably contain a  $\beta$ -lactamase with an active site with serine, while the third could contain a  $\beta$ -lactamase with an active site with zinc ion.

Contrarily to enzymatic extracts from isolates of *E. coli* and of *K. pneumoniae*, the reproduction of the same kinetic study in the presence of lipidic and non-lipidic phenolic extracts from *Nigella sativa* L. seeds showed that the hydrolysis activity of the enzymatic extract from *Acinetobacter* isolate was sensitive to both extract with more sensitivity toward the second ( $K_m=24.5 \mu$ M,  $K_i=66.08$ , 0.38  $\mu$ M GAE and RE, respectively). Both inhibit the hydrolysis activity in competitive manner. This inhibition can be attributed to the property of flavonoids to chelate metal ions since the hydrolysis activity of this enzymatic extract is due to the  $\beta$ -lactamase with an active site with zinc ion.

**Key words:** Metallo- $\beta$ -lactamase, *Nigella sativa* L. , Flavonoids.

## مقدمة:

يقاوم العديد من الأنواع البكتيرية موجبة وسالبة غرام تأثير المضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams بإزالة نشاط هذه الأخيرة إنزيميا. في الواقع، تنتج هذه الأنواع من البكتيريا إنزيمات (مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam) التي تميه الرابطة الأميدية للحلقة  $\beta$ -lactam وينتج عن هذه الإماهة مشتقات مفتقدة للخاصية ضد البكتيرية.

لمواجهة هذا النمط من المقاومة البكتيرية، تُتبع إستراتيجيتان. تتمثل الإستراتيجية الأولى في بناء جزيئات جديدة من مضادات حيوية أو إستعمال متلازمات من عدة مضادات حيوية. في حين تتمثل الإستراتيجية الثانية في البحث عن و/أو بناء جزيئات مثبطة للنشاط الإماهي لمميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam لأجل إستعمالها لاحقا في شكل متلازمة مع مضادات حيوية فقدت نشاطها ضد البكتيري.

تواجه هاتان الإستراتيجيتان حاليا مشكلتين رئيسيتين: تتمثل الأولى في ظهور المقاومة البكتيرية بمميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam كلما طال الاستعمال المخبري أو السريري للمضاد الحيوي الجديد. تتمثل الثانية، خصوصا عندما يتعلق الأمر بالحمض clavulanic (مثبط كلاسيكي مستعمل في العلاج مع المضاد الحيوي amoxicilline) في ظهور المقاومة البكتيرية للمثبط؛ إما بتحفيز هذا الأخير إنتاج كميات عالية من المميهاة من طرف السلالات البكتيرية، أو إنتاج هذه الأخيرة مميهاة غير حساسة لتأثيره التثبيطي. إن ظهور هذه المقاومة لمثل هذه المثبطات، يمكن أن يُعزى إلى تشابهها البنوي مع المضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -Lactams (مادة التفاعل للإنزيم).

تتميز الفلافونويدات (مركبات عديدة الفينول) بطيف تثبيط إنزيمي واسع، إذ ثبتت قدرتها على تثبيط نشاط العديد من الإنزيمات: Protein Kinase C و Phospholipase A<sub>2</sub> و Lipoxigenase و Cyclooxygenase و Elastase... إلخ. إضافة إلى هذا الأثر التثبيطي على الإنزيمات تتميز الفلافونويدات بالقدرة على إستخلاص عدد من العناصر الفلزية في شكلها المتأين كالحديد والنحاس والزنك و الألمنيوم.

في عملنا هذا حاولنا أن نستبين قدرة عديدات الفينول عموما والفلافونويدات خصوصا على تثبيط النشاط الإماهي لهذه الإنزيمات خاصة تلك التي تتميز بموقع نشط بذرة زنك. إن إختيارنا لهذه الجزيئات مرده إختلافها البنوي عن المضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams والقدرة على إستخلاص عدد من العناصر الفلزية في شكلها المتأين.

# نظرة مرجعية

## I الإنزيمات المميهة للحلقة $\beta$ -lactam :

تعمل الإنزيمات المميهة للحلقة  $\beta$ -lactam ( EC 3.5.2.6  $\beta$ -lactamases ) على كسر الرابطة الأميدية للحلقة  $\beta$ -lactam لكل من البنسيلينات والسيفالوسبورينات و Penems و Carbapenems و Monolactams. عموماً، عندما يتعلق الأمر بمقاومة هذا النمط من المضادات الحيوية فإن الآلية الأكثر شيوعاً هي إمالة هذه الرابطة (Struelens و Villalobos، 2006). وصل عدد مميئات الحلقة  $\beta$ -lactam سنة 2001 إلى أكثر من 340 نوع مختلف (Bush، 2001). تتواجد هذه الإنزيمات عند كل من البكتيريا سالبة وموجبة غرام وتفرز عند النوع الأول في الفضة بين الغشائين، أما عند النوع الثاني فتطرح في الوسط الخارجي (Page، 1999؛ Ciofu وآخرون، 2000). يمكن لنوع بكتيري واحد أن يفرز عدة أنواع من هذه المميئات (Livermore، 1995؛ Cobo وآخرون، 2008).

### I-1- تطور المقاومة البكتيرية بمميئات الحلقة $\beta$ -lactam :

مرّ التعرف على هذه المجموعة الإنزيمية ودراساتها بمراحل نوجزها فيما يلي:

إن Fleming هو أول من لاحظ سنة 1929 أن نمو بعض المجاميع البكتيرية مثل مجموعة " coli-typhoid " لا يُثبط بالبنسيلينات. تأكدت هذه الملاحظة عندما تحصل Abraham و Chain (1940)، على مستخلص لـ *Esherichia.coli* مبطل لخاصية البنسيلين ضد البكتيرية. إضافة إلى هذا تم تحديد الطبيعة الإنزيمية لهذا العامل المبطل بعد معالجة المستخلص بالحرارة و ببعض الإنزيمات الحالة للبروتينات. على إثر هذا تم إطلاق مصطلح pinicillinase على هذا الإنزيم. تم التأكد نهائياً من وجود هذا الأخير ومن تورطه في المقاومة عندما تبين لـ Kirby (1944) بعد دراسة مقارنة لعزلات سريرية من *Staphylococcus aureus* مقاومة وأخرى حساسة، أن مستخلص العزلات المقاومة يحوي الإنزيم على عكس مستخلص العزلات الحساسة. خلال المدة التي امتدت إلى الستينات، تركز الاهتمام على مميئات البنسيلينات للجنس البكتيري *Staphylococci* لأن نسبة شيوعها في هذا الجنس بلغ 95 % (Medeiros، 1984). في نفس الفترة تركز أيضاً الاهتمام على إنزيمات عصيات سالبة غرام لكثرة الالتهابات الناتجة عن هذه العصيات والمزامنة لبدء الاستعمال المكثف للبنسيلينات نصف التركيبية ذات الطيف الواسع (ampicillin و carbenicillin) ولسيفالوسبورينات الجيل الأول (cephalothin و cephaloridine).

تم استخلاص وتنقية هذه الإنزيمات المشفر بناؤها بجينات محمولة على بلازميدات لأول مرة سنة 1965 من عزلة *E.coli* مقاومة لـ Ampicillin من امرأة يونانية تدعى Temoniera وأطلق عليها إسم TEM-1 نسبة إليها. تلاه الكشف عن أنواع أخرى من هذه الإنزيمات وهي SHV و OXA و PSE عند أنواع بكتيرية أخرى سالبة غرام (Livermore، 1995).

خلال الثمانينات وبالتحديد عام 1983، سُجِّل ظهور أول مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam واسعة الطيف (Extended spectrum Beta-Lactamases) وهي في الواقع نتاج طفرات نقطية مست الجينات المشفرة لمميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam الأولى (TEM-1 و SHV-1) (Struelens و Villalobos، 2006). تميزت أيضا هذه الفترة بظهور مميهاة السيفالوسبورينات المشفر بناؤها بجينات محمولة على كروموزومات. تتميز الأنواع البكتيرية الحاملة لمثل هذه الجينات بمقاومتها لطيف واسع من المضادات الحيوية بإفراطها في بناء هذا النوع الإنزيمي (Sanders و Sanders، 1992). في بداية التسعينات سُجِّل ظهور أول مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك (bandoh وآخرون، 1992) التي يشفر بناؤها بجينات محمولة على بلازميدات مما سهل انتشارها بين أنواع إنزيمية مختلفة. تحظى حاليا هذه الانزيمات باهتمام العديد من مخابر البحث نظرا لخطورتها المتمثلة في إمامتها لغالبية المضادات الحيوية من نوع  $\beta$ -lactams. في نفس الفترة ظهرت أولى مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam غير الحساسة لتأثير المثبطات المستعملة سريريا خصوصا الحمض clavulanic (Vedel وآخرون، 1992؛ Struelens و Villalobos، 2006).

### I-2- تصنيف مميهاة الحلقة $\beta$ -lactam :

نظرا للتنوع الكبير في مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam لاختلافها بنيويا ووظيفيا وبهدف فهم العلاقة بينها، تم اقتراح عدة تصانيف لها اعتمدت على مقاييس مختلفة منها: تصنيف Sawai وآخرون (1968)؛ تصنيف Richmond و Sykes (1973)؛ تصنيف Sykes و Matthew (1976) وتصنيف Mitsunashi و Inoue (1981). أدى وجود نقائص في هذه التصانيف إلى تطوير تصنيفين جديدين أكثر شمولية هما تصنيف Ambler (1980) وتصنيف Bush، Jacoby و Meideros (1995). نذكر أن هاذان التصنيفان هما المعتمدان حاليا في تحديد نوع أو أنواع مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam عند الضرورة.

#### I-2-1- تصنيف Ambler (أو التصنيف الجزئي):

صنف Ambler (1980) مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam حسب بنيتها الأولية إلى 4 أقسام (A→D). تملك إنزيمات الأقسام A و C و D موقعا نشطا بحمض أميني سيرين في حين تملك إنزيمات القسم B موقعا نشطا بذرة أو بذرتي زنك (Struelens و Villalobos، 2006؛ Oelschlaeger، 2008؛ Borra و آخرون، 2011). عند المقاربة بين عناصر القسم الواحد نجد أنها تشترك في ميزات وتنفرد في أخرى.

#### I-2-2- تصنيف Bush، Jacoby و Medeiros:

صنفت Bush وزملاؤها (1995) مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam إلى 4 مجموعات، معتمدة في تصنيفها هذا على التنسيق بين الخصائص الوظيفية (الشرائية اتجاه مواد التفاعل والمثبطات) والبنية الجزيئية لإنزيمات ذات تسلسل معروف للأحماض الأمينية (Struelens و Villalobos، 2006). عند المقاربة بين عناصر المجموعة الواحدة نجد أنها تشترك في خصائص وتنفرد بأخرى. من جهة ثانية عند المقارنة بالتصنيف الجزئي نجد أن هذا التصنيف هو ترتيب جديد لأقسام تصنيف Ambler (الملحق 1).

### I-3- بنية مميهاات الحلقة $\beta$ -lactam :

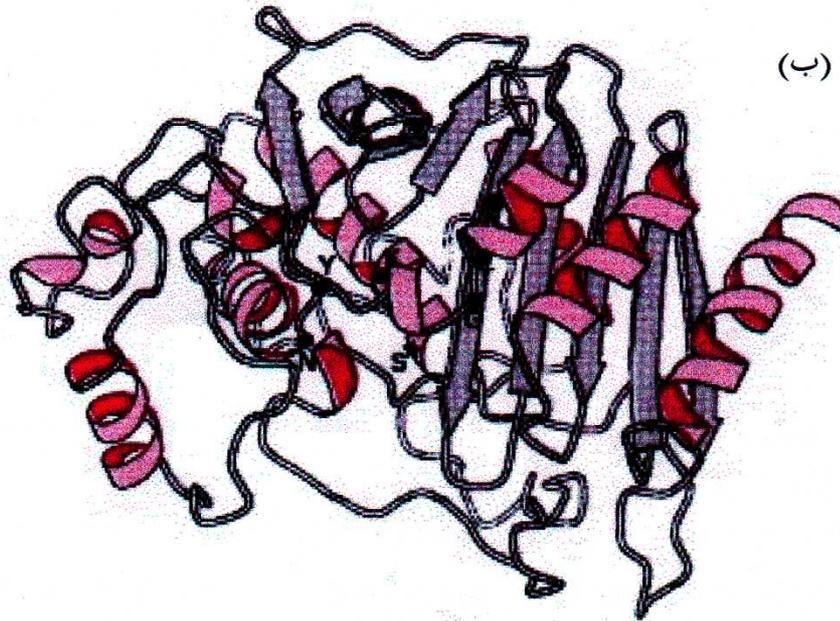
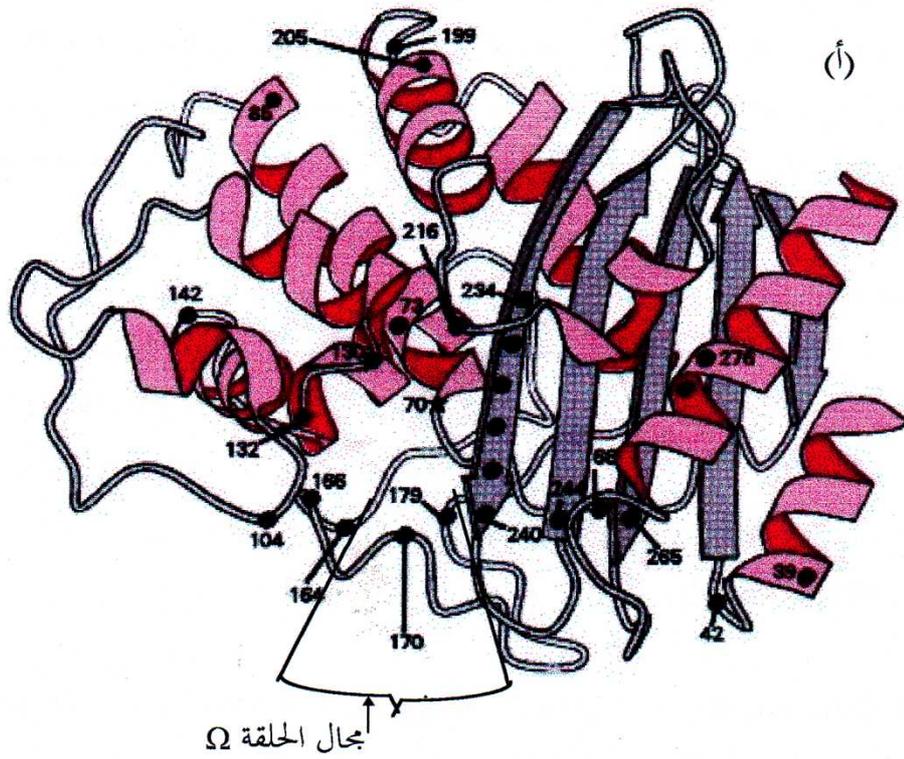
لقد شكلت عدة أسباب الدافع الرئيسي لدراسة البنية الجزيئية لمميهاات الحلقة  $\beta$ -Lactam نرتبها على النحو الآتي: (i) تصميم مضادات حيوية جديدة من النوع  $\beta$ -lactams من خلال فهم آلية تأثير المثبطات المعروفة لهذه الإنزيمات، خصوصا الحمض Clavulanic (Chen و Herzberg، 1992) و Sulbactam (Yang و آخرون، 2000) و Tazobactam (Bush و آخرون، 1993)، وكذلك من خلال فهم التأثير بين المضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams وهذه الإنزيمات. (ii) تصنيف هذه الإنزيمات بإعتماد البنية الجزيئية كمقياس (Ambler و آخرون، 1991).

في حدود معلوماتنا المرجعية، تم تحديد البنية الفراغية بأخذ صور لبلورات جزيئات الإنزيمات بالأشعة السينية لـ 12 إنزيم مميهاة للحلقة  $\beta$ -lactam من القسمين A و C (Mobashery و Massova، 1998؛ Bonomo و Rice، 1999) ولأربعة إنزيمات من القسم B (Concha و آخرون، 1996، 2000؛ Carfi و آخرون، 1998<sub>a</sub> ، 1998<sub>b</sub>) كما تم مؤخرا ولأول مرة تحديد البنية الفراغية لإنزيم واحد من القسم D (Golemi و آخرون، 2000).

### I-3-1- بنية إنزيمات مميهاات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بسيرين:

بينت الدراسات المجراة على مميهاات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بسيرين، بأنها بروتينات أحادية الوحدة، تنتظم فيها الأحماض الأمينية في سلسلة واحدة (Matagne و آخرون، 1998؛ Page، 1999) تتضمن بنى ثنائية من النوع  $\alpha$  (11 بنية حلزونية) ومن النوع  $\beta$  (5 بنى وريقية) (Traneir و آخرون، 2000). من جانب البنية الثالثة ينتظم جزيء الإنزيم عند الأقسام A و C و D في مجالين مطويين بإحكام، مجال أول مكون من بنى  $\alpha$  ومجال ثان مكون من تناوب بين بنى  $\alpha$  وبنى  $\beta$  ( $\beta/\alpha$ ). تربط المجالين مفصلتان ويشكل الفراغ بين هذين المجالين إنخماصا (منخفضا) هو في الواقع موقع ربط مادة التفاعل (الموقع النشط) (الشكل 01) (Knox و آخرون، 1996؛ Matagne و آخرون، 1998؛ Page، 1999). تدعم المفصلتين روابط هيدروجينية وجسور ملحية، تحمي الشكل الفراغي للإنزيم (Herzberg و Moulton، 1991).

تتميز بعض إنزيمات القسم A من النوع TEM و SHV باحتوائها على جسر ثنائي الكبريت بين باقي الحمض الأميني سيستين 77 في الحلزون  $\alpha_2$  وباقي الحمض الأميني سيستين 123 في الحلزون  $\alpha_4$  عند إنزيمات TEM-1 (Jelsch و آخرون، 1993؛ Vanhove و آخرون، 1997)، أو بين باقي الحمض الأميني سيستين 67 وباقي الحمض الأميني سيستين 238، عند إنزيمات مميهاات Carbapenems من القسم A. يعمل مثل هذا الجسر على خلق رابطة تكافؤية بين المجالين ضمن الإنزيم وبالتالي يُغيّر في الوضعية الفراغية للمركز النشط، حيث يُعتقد أنه مسؤول جزئيا عن الفعالية العالية لهاته الإنزيمات على إمهاة المضادات الحيوية من النوع Carbapenems (Raquet و آخرون، 1997).



**الشكل 01:** البنية الجزيئية الثالثة لميهات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بسرين: (أ) للقسم A (TEM-) (ب) للقسم (C) (مستخلص من *E.cloacea*) (Matagne وآخرون، 1998).

- موقع الحمض الأميني؛ \* باقي الحمض الأميني سيرين النشط؛ ← مجال الحلقة أوميقا

تتميز أيضا كل إنزيمات القسم A باحتوائها على بنية حلقة مرنة على شكل الحرف  $\Omega$  تدعى بالحلقة أوميقا، تتألف من سلسلة الأحماض الأمينية من 160 إلى 181، تحوي جسر ملحي بين الأرجنين 164 والأسبارجين 179، يساعد على استقرار بنيتها وبالتالي يضمن التوقع المناسب لحمض الغلوتاميك 166 للمشاركة في عملية التحفيز (Banergee وآخرون، 1998). تكون هذه الحلقة أوميقا عند إنزيمات القسم C ملتفة، وتتألف من سلسلة الأحماض الأمينية من 178 إلى 225 (Knox وآخرون، 1996)، في حين تكون غير ملتفة وقصيرة عند إنزيمات القسم D إذ تتألف من سلسلة الأحماض الأمينية من 141 إلى 159 (Golemi وآخرون 2000). لا تحوي هذه الحلقة عند القسمين A وD حمضا أمينيا يشارك في النشاط الإنزيمي (Tranier وآخرون، 2000).

### بنية المركز النشط :

أوضحت المقارنة بين البنى الثالثية لمميئات الحلقة  $\beta$ -lactam بحمض أميني سيرين، وجود أحماض أمينية محفوظة الطبيعة أو الوظيفة تدخل في تشكيل أربع عناصر (تتابع من 1 إلى 4 أحماض أمينية) تدخل بدورها في تشكيل الموقع النشط. تؤدي هذه العناصر وظيفة واحدة خلال الإماهة وتكون موجهة نحو الموقع النشط (Charlier وآخرون، 1998؛ Phillipon وآخرون، 1998؛ Matagne وآخرون، 1999) (الجدول 1).

### الجدول 1: العناصر المحفوظة والأحماض الأمينية المشكلة لها في المواقع النشطة لمميئات الحلقة

$\beta$ -lactam بموقع نشط بسيرين (Charlier وآخرون، 1998).

| القسم | العناصر |            |            |           |
|-------|---------|------------|------------|-----------|
|       | 1       | 2          | 3          | 4         |
| A     | S*XXK   | SDN<br>SDS | KTG<br>KRS | E         |
| C     | S*XXK   | YXN        | KTG        | غير محددة |
| D     | S*TFK   | YAN        | KTG        | غير محددة |

\*: باقي الحمض الأميني سيرين النشط.

تحليل الرمز بحرف واحد للأحماض الأمينية: A، ألانين؛ D، الحمض أسبارتيك؛ E، الحمض غلوتاميك؛ F، فنيل ألانين؛ G، غليسين؛ K، ليسين؛ N، أسبرجين؛ S، سيرين؛ T، ثريونين؛ R، أرجنين؛ Y، تيروزين. X، حمض أميني متغير.

يتشكل العنصر الأول من تتابع أربع أحماض أمينية، ليسين- $X_{aa}$ - $X_{aa}$ -سيرين، إثنان منها (سيرين وليسين) يدخلان بصفة مباشرة وغير مباشرة على الترتيب في الإمامة. يتوضع الحمض الأميني سيرين في النهاية الأمينية للبنية الحلزونية الثانية للمجال  $\alpha$ ، يليه الحمض الأميني ليسين بعد حمضين أمينيين متغيرين أي في آخر هذه البنية الحلزونية. تكون السلسلة الجانبية الطويلة لهذا الأخير موجهة نحو الموقع النشط (Matagne وآخرون، 1998).

يتكون العنصر الثاني من تتابع 3 أحماض أمينية، أسبارجين- $X_{aa}$ -ثيروزين عند القسمين C و D و من أسبارجين- الحمض أسبرتيك- سيرين عند إنزيمات القسم A. يدخل الحمض الأميني الأول والثالث بصورة غير مباشرة في الإمامة. يتوضع هذا العنصر على حلقة قصيرة في المجال  $\alpha$  ويشكل بذلك أحد جهات الموقع النشط، تكون السلاسل الجانبية للباقي الأول والثالث في الثلاثية موجهة نحو الموقع النشط (Phillipon وآخرون، 1998).

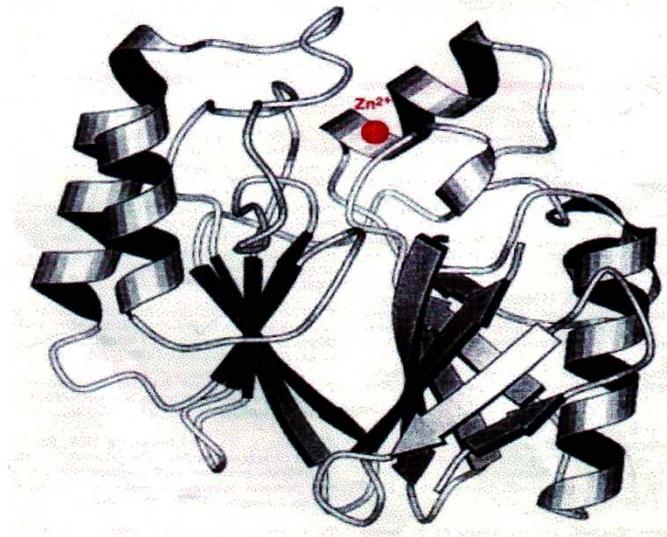
يتشكل العنصر الثالث من تتابع 3 أحماض أمينية، غليسين- ثريونين- ليسين. يدخل جميعهم بصورة غير مباشرة في الإمامة. يتوضع هذا العنصر على البنية الوريقية الثالثة في المجال  $\beta/\alpha$  مشكلا بذلك الجهة المقابلة للموقع النشط. يسمح هذا للجزء القاعدي للحمض الأميني ليسين بتكوين رابطة هيدروجينية مع المجموعة هيدروكسيل لثيروزين أو لسيرين العنصر الثاني (Charlier وآخرون، 1998).

يتشكل العنصر الرابع من حمض أميني واحد مشحون سلبا، يتمثل في حمض غلوتاميك 166 عند إنزيمات القسم A، يكون متوضعا على الحلقة أوميقا داخل السلسلة أسبارجين 170- لوسين- حمض غلوتاميك -  $X_{aa}$  - حمض غلوتاميك 166، أين يلعب دورا مع أسبارجين 170 في الحفاظ على بقاء جزيء الماء بالقرب من سيرين العنصر الأول (Chen و Herzberg، 1999). يوجد العنصر الرابع المشكل من الحمض الأميني المشحون سلبا عند إنزيمات القسمين C و D ولكنه لا يلعب دورا في الإمامة (Knox وآخرون، 1996).

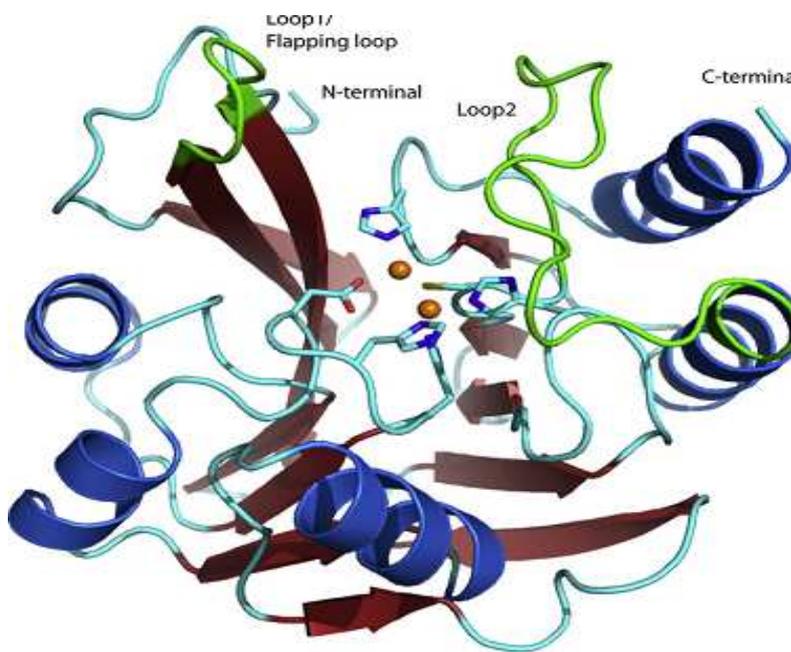
### I-3-2- بنية مميهاة الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون الزنك:

بينت المقارنة بين البنى الجزيئية لعدد من مميهاة الحلقة  $\beta$ -Lactam بموقع نشط بأيون زنك بأنها لا تظهر تشابها عاليا في البنى الأولية، ولكن تمتلك عناصر بنى ثانوية متشابهة (Galleni وآخرون، 2001)، تختلف بين بنى ثانوية من النوع  $\alpha$  (5 بني حلزونية) وبنى من النوع  $\beta$  (12 بنية ورقية) (Concha وآخرون، 1996؛ Carfi وآخرون، 1998a).

من جانب البنية الثالثة ينتظم جزيء الإنزيم في مجالين، يتكون الأول (النهاية الأمينية) من 7 بني وريقية و3 بني حلزونية، والثاني (النهاية الكربوكسيلية) من 5 بني وريقية وبنيتان حلزونيتان (الشكل 02)، يرتبط المجالين بسلسلة بسيطة من 8 أحماض أمينية من 121 إلى 128. ينطوي هذين المجالين على بعضهما البعض مشكلين شطيرة ( $\alpha/\beta/\beta/\alpha$ ) ظاهرها بني حلزونية وباطنها بني وريقية ( $\beta$ -Sandwich) (Carfi وآخرون، 1998a؛ Borra وآخرون، 2011).



(أ)



(ب)

**الشكل 02:** البنية الجزيئية الثالثة لميهات الحلقة  $\beta$ -lactam : (أ) بموقع نشط بأيون زنك من *B. Cereus* (Charlier وآخرون، 1998). (ب) بموقع نشط بأيوني زنك (Borra وآخرون، 2011)

يتوضع الموقع النشط في أعلى الأخدود المحصور بين البنيتين الوريقتين  $\beta$  للشطيرة (Carfi وآخرون، 1995؛ Borra و آخرون، 2011). نذكر أن من بين الأربع أنواع التي تمت دراسة بنيتها الفراغية ضمن هذا القسم، ثلاثة منها تتواجد ببنية أحادية وواحدة ببنية رباعية (Ullah وآخرون، 1998؛ Gallen وآخرون، 2001).

### بنية الموقع النشط:

إن عدم إجماع الباحثين حول مكونات الموقع النشط لإنزيمات هذا القسم، يواصل في جعل هذا الأخير موضوع نقاش. يبدو في حدود معلوماتنا المرجعية أن هذا الموقع النشط يتشكل من أحماض أمينية مختلفة الترتيب ومن ذرة أو ذرتي زنك (Paul-Soto وآخرون، 1998؛ Borra وآخرون، 2011). يتوضع الموقع النشط في أعلى الأخدود المحصور بين البنيتين الوريقتين من النوع  $\beta$  للشطيرة. بالمقارنة مع شكل وأبعاد التجويف الذي يأوي الموقع النشط لإنزيمات القسمين A و C، فإن هذا الأخدود يكون أوسع ومفتوح على النهايتين مما يسمح له باستقبال المضادات الحيوية ذات السلاسل الجانبية الكبيرة. يتشكل الموقع النشط الذي يشغل بذرة زنك واحدة إضافة إلى هذه الأخيرة من أحماض أمينية محفوظة هي الحمض أسبرتيك ولوسين وجليسين وجزيئي هيسثيدين. تنتظم الروابط الهيدروجينية التي تشكلها ذرة الزنك مع 3 بواقي هيسثيدين وجزيء ماء في شكل هندسي رباعي الأسطح (Carfi وآخرون، 1995). يتشكل الموقع النشط الذي يشغل بذرتي زنك، إضافة إلى هاتين الأخيرتين من أسبارجين والحمض أسبارتيك، تشكل ذرة الزنك الأولى روابط هيدروجينية مع 3 جزيئات هيسثيدين وجزيء ماء، وتشكل ذرة الزنك الثانية روابط مع كل من حمض أسبرتيك، سيستيين و هيسثيدين وجزيئي ماء. تنتظم الروابط المشكلة من قبل ذرة الزنك الثانية في شكل هندسي هرمي وتبعد عن ذرة الزنك الأولى بمسافة 3.7 أنغسترون (Concha وآخرون، 1996؛ Carfi وآخرون، 1998<sub>a</sub>).

### I-4- آلية وحركية النشاط التحفيزي لمميهات الحلقة $\beta$ -lactam :

تعمل مميهات الحلقة  $\beta$ -lactam على كسر الرابطة الأميدية للحلقة  $\beta$ -lactam المميزة للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams. حسب المعطيات المرجعية المتوفرة لدينا تم اقتراح عدة فرضيات لشرح آلية النشاط التحفيزي لمميهات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بسيرين (الأقسام A و C و D). تتقاطع هذه الفرضيات في المراحل العامة لهذا النشاط التحفيزي. تنفرد إنزيمات القسم B بألية تحفيز مميزة لاحتوائها على موقع نشط بأيون زنك.

### I-4-1- آلية التحفيز لمميهات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بسيرين:

اقترح العديد من المختصين (Herzberg و Moul، 1987؛ Lamotte-brasseur وآخرون، 1992؛ Strynadka وآخرون، 1992) نمودجا مشتركا للنشاط التحفيزي لمميهات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بسيرين. تبعا لهذا النموذج تتلخص آلية النشاط التحفيزي في ثلاث مراحل:

(i) يرتبط الحمض الأميني سيرين للموقع النشط بشكل غير تكافؤي مع المضاد الحيوي من نوع  $\beta$ -lactams (مركب ميخائيليس).

(ii) يتحول جزيء المضاد الحيوي إلى أسيل يبقى على ارتباط برابطة تكافؤية بالحمض الأميني سيرين (مركب أسيل- إنزيم).

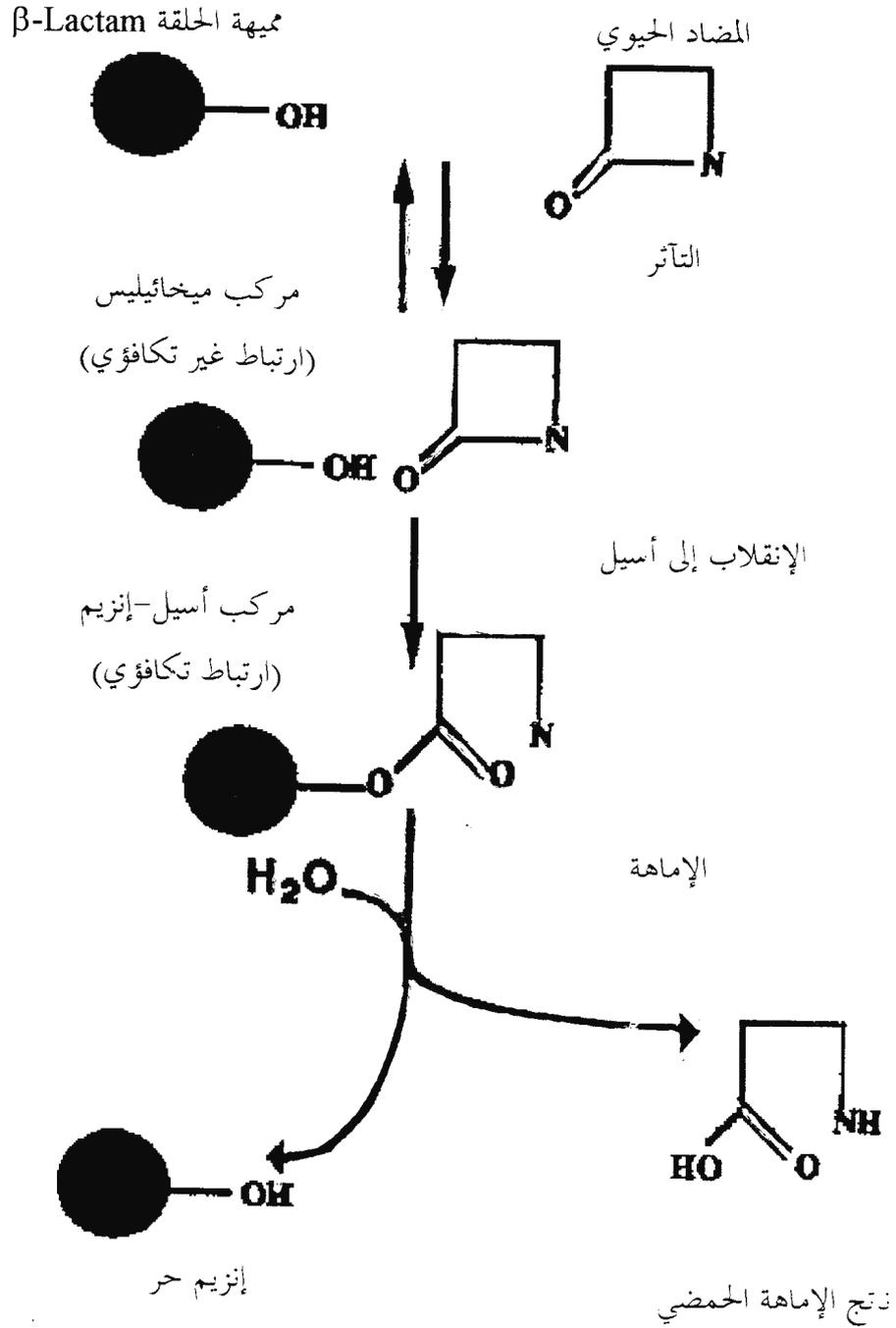
(iii) تميه هذه الرابطة التكافؤية بجزيء ماء مما يسمح بتحرير الإنزيم وناتج التفاعل في شكل حمض (الشكل 03).

لقد تم اقتراح فرضيتين لتحليل النموذج سابق الذكر في حالة إنزيمات القسم A (Matagne وآخرون، 1998، 1999؛ page، 1999):

في فرضية أولى يحدد النشاط التحفيزي في كونه من النوع حمض - قاعدة. في زمن أول تقترب ذرة الكربون لمجموعة كربونيل للحلقة  $\beta$ -lactam من ذرة الأوكسجين غاما ( $O\gamma$ ) للوظيفة الهيدروكسيلية للحمض الأميني سيرين 70. في زمن ثان تتأثر مجموعة كربوكسيل الحلقة Thiazolidine للمضاد الحيوي بروابط كهروساكنة مع الإنزيم وبالتدقيق مع الوظيفة أمونيوم لليسين 234. خلال زمن ثالث، يحدث في خطوة أولى استقلاب المضاد الحيوي إلى أسيل. يدخل في هذا الإستقلاب حمض غلوتاميك 166 كقاعدة عامة، فيعمل على نزع بروتون لجزيء ماء، الذي يسترجع بروتونه بنزعه من مجموعة هيدروكسيل لسيرين 70 (تنشيط الذرة  $O\gamma$  لسيرين 70). يهاجم بعد ذلك الأوكسجين غاما ذرة كربون لكربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam. يؤدي هذا إلى كسر الرابطة المزدوجة للأكسجين وتشكيل وسيط رباعي ظرفي سالب الشحنة يبقى على ارتباط بالإنزيم (Chen وآخرون، 1993). يثبت هذا الوسيط بتأثر ذرة أوكسجين للوظيفة كربونيل للمضاد الحيوي مع تجويف الأنيون الأكسجيني المشكل من الوظيفتين الأمينيتين لكل من سيرين 70 والأمين 237. نذكر أن ليونة الحلقة أوميقا بإمكانها إقصاء توسط جزيء الماء في تنشيط سيرين 70 بتقريب السلسلة الجانبية لحمض غلوتاميك 166 من هذا الأخير، فيتم التنشيط بصفة مباشرة (Vijayakumar وآخرون، 1995؛ Banerjee وآخرون، 1998).

يحدث في خطوة ثانية تحويل البروتون المنتزع من مجموعة هيدروكسيل لسيرين 70 على ذرة الأزوت للحلقة  $\beta$ -lactam عبر مسلك مشكل من مجموعة الأمين لكل من ليسين 73 وليسين 243، من جزيء ماء ثان ومن مجموعة هيدروكسيل لسيرين 130 مما يؤدي إلى كسر الرابطة الأميدية للحلقة  $\beta$ -lactam.

في خطوة أخيرة يُعاد تنشيط جزيء الماء الأول بنفس الحمض غلوتاميك 166 لكي يدخل في إماهة الرابطة بين سيرين 70 والمضاد الحيوي بمهاجمة ذرة الكربون لكربونيل هذا المركب، فيتحرر الإنزيم وناتج التفاعل الحمضي (الشكل 4) (Lamotte-brasseur وآخرون، 1991؛ Adachi وآخرون، 1991).



الشكل 03: المراحل الرئيسية للنشاط الإماهي لمميّهات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بباقي الحمض الأميني سيرين (Livermore، 1995).

في فرضية ثانية يحدد النشاط التحفيزي أيضا في كونه من النوع حمض - قاعدة. مقارنة بالفرضية الأولى، تنفرد هذه الفرضية في نوع الحمض الأميني الذي يلعب دور القاعدة أثناء تنشيط ذرة الأوكسيجين غاما ( $O\gamma$ ) للحمض الأميني سيرين إذ يتمثل هذا الحمض في ليسين 73. تدفع في الواقع ظروف وسط التفاعل لهذا الحمض غير المشحون إلى انتزاع بروتون  $H^+$  من مجموعة هيدروكسيل لسيرين 70. يعمل  $O\gamma$  لهذا الأخير بنفس الطريقة لإستقلاب المضاد الحيوي إلى أسيل. تنفرد أيضا هذه الفرضية في مكونات مسلك تحويل البروتون على ذرة أزوت الحلقة  $\beta$ -lactam المتمثلة في ليسين 73 وسيرين 130 على الترتيب (أنظر الشكل 4ب) (Strynadka وآخرون، 1992؛ Swaren وآخرون، 1995).

بينت الصور المشكلة ارتكازا على خارطة الكثافة الالكترونية المتحصل عليها بعد تعريض بلورات من مركب إنزيم- مضاد حيوي للأشعة السينية (X ray- Crystallography) وكذا اختبارات التطهير الموجه بأن الفرضية الأولى هي الأرجح. يؤدي في الواقع تغيير ليسين 73 بالأرجنين إلى تخفيض سرعة أسيلة الإنزيم بمئة مرة، ويؤدي استبدال الحمض غلوتاميك 166 بالحمض أسبارتيك إلى تخفيض سرعة الأسيلة ونزع الأسيلة بألفي مرة. تعزز أو تدعم هذه النتائج التجريبية أهمية دور الباقي الحمض غلوتاميك 166 كقاعدة عامة خلال التحفيز (Gibson وآخرون، 1990؛ Matagne وFrère، 1995).

تجدر الإشارة إلى أنه تم اقتراح فرضية ثالثة تختلف عن الفرضية الثانية في الكيفية التي تدفع ليسين 73 لتنشيط سيرين 70 للموقع النشط. حسب Ishigoro و Imago (1999) تعمل مجموعة كربوكسيل للحلقة Thiazolidine للمضاد الحيوي حين ارتباطها بالإنزيم على نزع بروتون من سيرين 130. يعمل هذا الأخير على استرجاع بروتونه هذا من ليسين 73 فينشطه لكي يدخل بدوره في استقلاب المضاد الحيوي إلى أسيل بنفس الطريقة الواردة في الفرضية الثانية. نذكر أنه لم يرد ذكر مكونات المسلك الذي يكون وراء تحويل البروتون على ذرة أزوت الحلقة  $\beta$ -lactam وآلية إماهة الرابطة بين سيرين 70 و المضاد الحيوي.

في حالة إنزيمات القسم C، اقترحت فرضية واحدة لتحليل مراحل نفس النموذج المشترك يحدد فيها النشاط التحفيزي أيضا في كونه من النوع حمض- قاعدة.

في زمن أول تقترب ذرة الأوكسيجين لمجموعة كربونيل للحلقة  $\beta$ -lactam من تجويف الأنيون الأوكسجيني أين تشكل روابط هيدروجينية مع مجموعتي الأمين لكل من سيرين 64 وسيرين 318. خلال زمن ثان يحدث في خطوة أولى إستقلاب المضاد الحيوي إلى أسيل. يدخل في هذا الإستقلاب الحمض الأميني تيروزين 150 كقاعدة عامة. تعمل السلسلة Alkylammonium لليسين 315 على انتزاع بروتون  $H^+$  لمجموعة فينول ليتروزين 150. يسترجع هذا الأخير بروتونه بنزعة مجموعة هيدروكسيل لسيرين 64. يهاجم على إثر هذا الأوكسيجين غاما ليسيرين 64 ذرة كربون لكربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam. يؤدي هذا إلى كسر الرابطة المزدوجة للأكسجين وتشكيل وسيط رباعي سالب الشحنة (Pratt وRahil، 1994).

تعمل المجموعتين الأمينيتين لكل من سيرين 64 وسيرين 318 على استقرار الظرفي لهذا الوسيط. نذكر أنه لم يرد ذكر مكونات المسلك الذي يكون وراء تحويل البروتون  $H^+$  على ذرة الأزوت للحلقة  $\beta$ -lactam. في خطوة أخيرة يدخل تيروسين 150 ثانية، في تنشيط جزيء ماء لكي يعمل إثر ذلك على إماهة الرابطة بين سيرين 64 والمضاد الحيوي بمهاجمة ذرة كربون لكاربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam فيتحرر الإنزيم و ينتج التفاعل الحمضي (الشكل 4ج) (Oefner وآخرون، 1990).

في حالة إنزيمات القسم D وعلى ضوء دراسة آلية النشاط التحفيزي لنوع واحد (OXA-10)، تم اقتراح فرضية واحدة لشرح مراحل النموذج المشترك، حدد فيها النشاط التحفيزي في كونه من النوع حمض-قاعدة (Golemi وآخرون، 2000). في زمن أول يحدث إستقلاب المضاد الحيوي إلى أسيل ويدخل في هذا الإستقلاب الحمض الأميني ليسين 70 كقاعدة عامة. إن تواجد الحمض الأميني ليسين 70 في تجويف مشكل من أحماض أمينية كارهة للماء يجعل منه قاعدة حرة تعمل على تنشيط سيرين 67. يهاجم الأكسجين غاما لسيرين 67 بعد تنشيطه ذرة كربون لكاربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam ويبدو أن هذا يؤدي إلى كسر الرابطة المزدوجة للأكسجين لتشكيل الوسيط الظرفي الرباعي. في خطوة أخيرة يدخل نفس الحمض الأميني ليسين 73 لتنشيط جزيء ماء الذي يدخل بدوره في إماهة الرابطة بين سيرين 67 والمضاد الحيوي لتحرير الإنزيم ونتاج التفاعل الحمضي (الشكل 4د). نذكر أنه لم يرد ذكر مكونات المسلك الذي يكون وراء تحويل البروتون على ذرة الأزوت للحلقة  $\beta$ -lactam (Strynadka وآخرون، 1992؛ Massova و Mobashery، 1998).

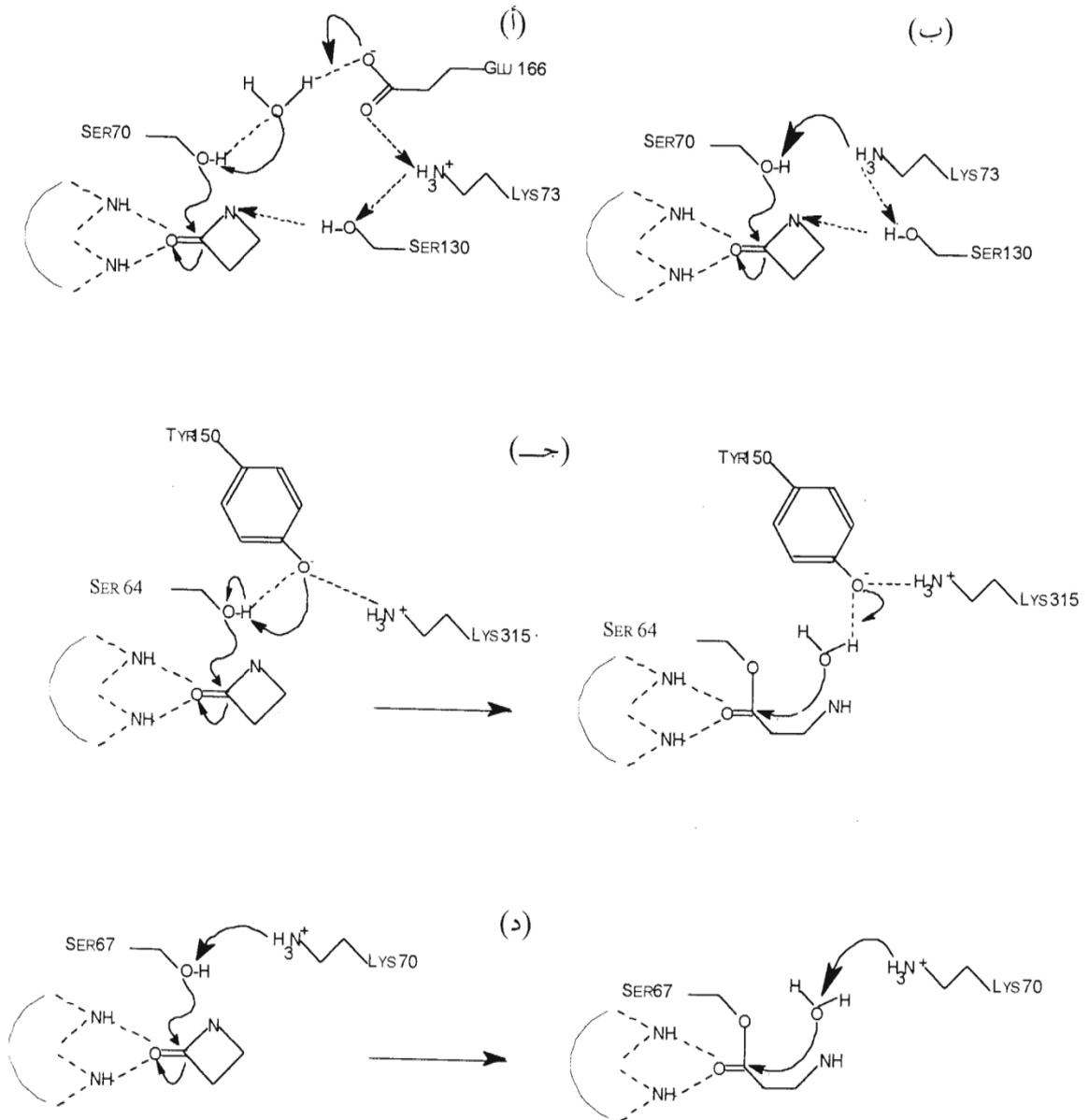
#### I-4-2- آلية النشاط التحفيزي لميهات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك:

بحكم اختلاف الموقع النشط لإنزيمات القسم B من حيث إحتوائه على ذرة زنك واحدة أو على ذرتين، فإن النشاط التحفيزي لهذه الإنزيمات ينقسم إلى نوعين:

##### النوع الذي تتوسطه ذرتي زنك:

اقترح فرضيتان لتفسير هذا النوع من النشاط التحفيزي:

في فرضية أولى (Concha وآخرون، 1997) يحدد التحفيز في كونه من النوع الذي يتوسطه فلز (metal-ion catalysis). في زمن أول تشكل مجموعة كربوكسيل للحلقة Thiazolidine روابط كهروساكنة مع مجموعة الأمين لليسين 184 ويشكل أوكسجين الوظيفة كاربونيل للحلقة  $\beta$ -lactam روابط كهرو ساكنة مع الأسبارجين 193 وذرة زنك أولى ( $Zn^1$ ). كما تدخل السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية ألانين 44 وإيزولوسين 46 و72 وفالين 152 في تكوين تجويف كاره للماء يتكامل مع السلاسل الجانبية للمضادات الحيوية من نوع  $\beta$ -lactam (تشكيل مركب ميخائيليس). في زمن ثان وفي خطوة أولى يستقلب المضاد الحيوي إلى حمض يبقى على ارتباط بالإنزيم. يدخل في هذا الإستقلاب أيون هيدروكسيل يتم تحضيره بدءاً من جزيء ماء من قبل أيوني الزنك. يهاجم هذا الأيون (مهاجمة نكليوفيلية) ذرة كربون



**الشكل 04:** آلية وحركية النشاط الإنزيمي لإنزيمات القسم A (أ) الفرضية الأولى، (ب) الفرضية الثانية، (ج) لإنزيمات القسم C، (د) لإنزيم OXA-10 من القسم D (Oefner وآخرون، 1990؛ Lamotte-Brasseur وآخرون، 1991؛ Strynadka وآخرون، 1992؛ Golemi وآخرون، 2000)

لكربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam. نذكر أن الحمض أسبارتيك 103 يدخل في توجيه مجموعة هيدروكسيل وتخفيض شدة تأثيرها مع أيوني الزنك لتسهيل المهاجمة النكليوفيلية. ينتج عن هذه المهاجمة وسيط رباعي سالب الشحنة يبقى على إرتباط بالإنزيم. يعمل التجويف المشكل من ذرة الزنك الأول والسلسلة الجانبية للحمض أسبارتيك 193 على إستقرار هذا الوسيط الظرفي إلى حين تحريره في شكل حمض.

في خطوة ثانية يمنح جزيء ماء ثان لذرة بروتونا لذرة الأزوت للحلقة  $\beta$ -lactam محررا في نفس الوقت أيون هيدروكسيل. يحل هذا الأخير محل جزيء الماء الأول ويحرر ناتج التفاعل الحمضي والإنزيم. في خطوة أخيرة يعمل جزيء ماء من وسط التفاعل على تعويض جزيء الماء الثاني المستهلك أثناء إماهة الرابطة الأמידية للحلقة  $\beta$ -lactam (الشكل 15) (Concha وآخرون، 1996، 1997).

في فرضية ثانية (Carfi وآخرون، 1998<sub>a</sub>) يحدد التفاعل أيضا في كونه من النوع الذي يتوسطه فلز. تختلف هذه الفرضية عن الأولى أساسا في نوعية الجزيئات المتأثرة ونوعية الإرتباط فيما بينها خلال تشكل المركب إنزيم – مضاد حيوي (مركب ميخائيليس). يتأثر في الواقع أوكسجين الحلقة  $\beta$ -lactam بروابط هيدروجينية مع الأسبرجين 176 وذرة زنك أولى، أما مجموعة الكربوكسيل للحلقة Thiazolidine فتشكل روابط كهروساكنة مع ذرة زنك ثانية عوضا عن ليسين 184 في الفرضية الأولى. يرتكز Carfi وآخرون (1998<sub>a</sub>) على عدم حفظ ليسين 184 في البنى الأولية لكل إنزيمات القسم B. لم يرد ذكر المسلك الذي يتم من خلاله تحويل البروتون على ذرة أزوت الحلقة  $\beta$ -lactam وكذلك آلية إماهة الرابطة بين ذرة الزنك الأولى وناتج التفاعل الحمضي.

### النوع الذي تتوسطه ذرة زنك:

اقترحت فرضيتان لتفسير هذا النوع من النشاط التحفيزي:

في فرضية أولى (Carfi وآخرون، 1998<sub>a</sub>). يحدد التحفيز في كونه من النوع الذي يتوسطه فلز. في زمن أول يتفاعل أوكسجين الحلقة  $\beta$ -lactam مع كل الأسبارجين 176 وذرة زنك، كما تتفاعل مجموعة الكربوكسيل للحلقة Thiazolidine مع الهيستيدين 206 المشحون إيجابا في زمن ثان يحدث إستقلاب المضاد الحيوي إلى حمض. يدخل في هذا الإستقلاب أيون هيدروكسيل يكون موجودا بين ذرة الزنك والحمض أسبارتيك 86. يدخل هذا الأخير كقاعدة فيعمل على انتزاع بروتون من جزيء الماء فينشطه. يهاجم الهيدروكسيل الناتج عن هذا التنشيط ذرة كربون لكربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam. ينتج عن هذه المهاجمة وسيط رباعي سالب الشحنة. تعمل كل من ذرة الزنك والحمض أسبرتيك 176 على إستقرار هذا الوسيط إلى حين تحريره في شكل حمض. لم يرد في هذه الفرضية ذكر المسلك الذي يتم من وراء تحويل البروتون إلى ذرة أزوت الحلقة  $\beta$ -lactam وكذلك آلية إماهة الرابطة بين ذرة الزنك وناتج التفاعل الحمضي (Carfi وآخرون، 1995).

في فرضية ثانية (Page، 1999) يحدد التفاعل أيضا في كونه من النوع الذي يتوسط فلز. في زمن أول تهاجم المجموعة هيدروكسيل المرتبطة بذرة الزنك مجموعة كربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam. ينتج عن هذه

المهاجمة النكليوفيلية وسيط رباعي سالب الشحنة. تتأثر ذرة الزنك مع أوكسيجين كربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam لهذا الوسيط الظرفي الرباعي.

في زمن ثان يتم تحويل البروتون على ذرة آزوت الحلقة  $\beta$ -lactam تعمل في الواقع مجموعة كربوكسيل ( $\text{COO}^-$ ) لحمض الأسبرتيك 90 على انتزاع بروتون  $\text{H}^+$  من مجموعة هيدروكسيل المرتبطة بذرة الزنك وتحويلها إلى ذرة الأزوت. ينتج عن ذلك وسيط رباعي بذرتي أوكسيجين مشحونتان سلبا. في زمن ثالث تدخل مجموعة كربوكسيل ثمانية للحمض أسبارتيك 90 لكسر الروابط الكهروساكنة بين ذرة الزنك لجزيء الإنزيم وناتج التفاعل (الشكل 5ب).

## II- مثبطات مميهاة الحلقة $\beta$ -lactam:

منذ التفتن إلى امتلاك البكتيريا الممرضة لإنزيمات مميهاة للحلقة  $\beta$ -lactam، تزايد إهتمام المختصين بإيجاد سبل تسمح بتفادي إماهة هذه الإنزيمات للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactam (Sutherland، 1995) تتمثل السبل التي تم الوصول إليها في 3 استراتيجيات. يتعلق الأمر في واحدة من هذه الإستراتيجيات بإيجاد أو بناء جزيئات مثبطة للنشاط الإماهي للحلقة  $\beta$ -lactam لاستعمالها لاحقا بشكل متلازمة مع مضادات حيوية فقدت نشاطها ضد البكتيري (Rice و Bonomo، 1999).

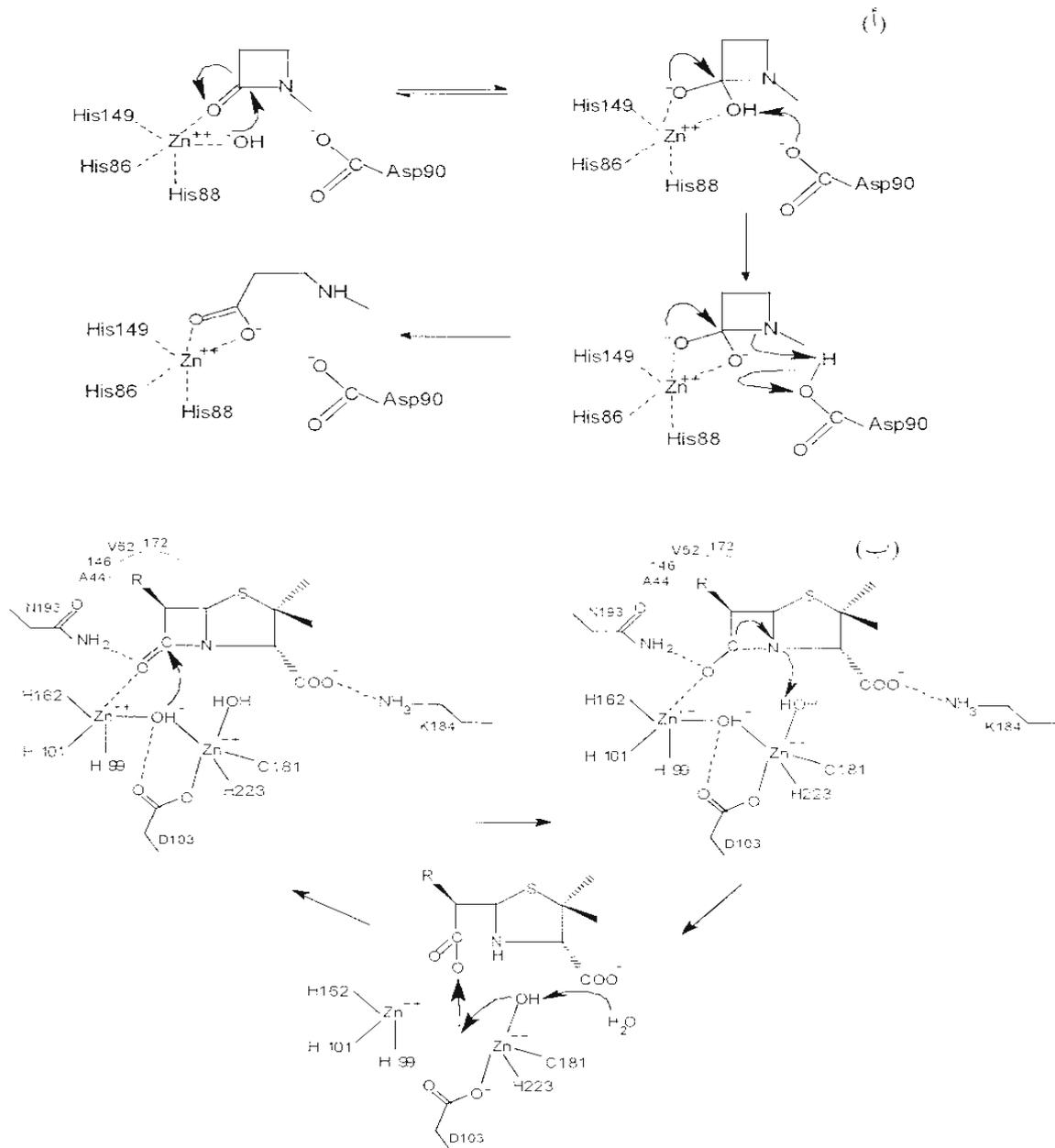
## II- 1- أنواعها:

يمكن أن نقسم هذا النوع من الجزيئات التي تم بناؤها أو اكتشافها لحد الساعة إلى مجموعتين:

### مجموعة المثبطات أشباه المضادات الحيوية $\beta$ -lactams:

#### الحمض calvulanic:

عزل هذا المثبط لأول مرة من وسط زرع السلالة الفطرية *Streptomyces Clavuligerus* (Brown وآخرون، 1976؛ Baggaley وآخرون، 1997). تختلف بنيته عن البنية العامة للبنيسيلينات بوجود ذرة أكسجين بدل ذرة كبريت في الوضعية 1، في نوع المجموعة الكيميائية المرتبطة بـ  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHC}_2$  وفي نوع السلسلة الجانبية ( $\text{H}_2$ ). تفوق سرعة دخول clavulanic acid إلى الخلية البكتيرية *Klebsella pneumoniae* سرعة دخول Tazobactam بـ 19 مرة وتفوق سرعة دخول المثبط BRL 42715 بـ 25 مرة وتفوق سرعة دخول بـ sulbactam 9 مرات (Saudagar وآخرون، 2008). يقدر وزنه الجزيئي بـ 199.16 دالتون والإسم الكيميائي لصيغته الكيميائية هو: 4-oxo-7-(2-hydroxyethylidene)-2-carboxylicacid-[3,2,0] helptone. يملك هذا الحمض نشاطية ضد بكتيرية ضعيفة (De la pena و Derendarf، 1999).



**الشكل 05:** آلية و حركية النشاط الإنمائي لإنزيمات القسم B: (أ) بموقع نشط بذرتي زنك (الفرضية الأولى) (ب) بموقع نشط بذرة زنك واحدة (الفرضية الثانية). (Concha وآخرون، 1997؛ Page، 1999).

يثبط بكيفية غير عكسية وبقوة إنزيمات القسمين A و D (التركيز المثبط لـ 50% من نشاط الإنزيم = 4.4 – 90 نانومولار (Bush وآخرون، 1993) وبدرجة ضعيفة إنزيمات القسم C (التركيز المثبط لـ 50% من نشاط الإنزيم < 100 ميكرومولار) (Reading و Farmer، 1981). يستعمل هذا المثبط مخبريا بشكل متلازمة مع العديد من المضادات الحيوية (Piperacillin، Cephaloridine...) وسريريا مع amoxicilin (Augmenten®) و مع Ticarcillin (Timentin®) (Bonfoglio و Livermore، 1994).

#### **penicillanic acid sulfone أو sulbactam**

هو مركب نصف بنائي، ورد ذكره لأول مرة تحت اسم CP- 45899 من قبل English وآخرون (1978). تختلف بنيته عن البنية العامة للبنيسيلينات بوجود ذرتي أوكسجين إضافيتين على ارتباط بذرة الكبريت في الوضعية 1. يقدر وزنه الجزيئي بـ: 233.25 دالتون والإسم الكيميائي لصيغته الكيميائية هو: (2S-cis)-3.3-Dinethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3,2,1]Haptan.carboxylic acid 4.4-dioxide. يملك نشاطية ضد بيكتيرية ضعيفة (Suh وآخرون، 1995) يثبط بكيفية عكسية وبقوة إنزيمات القسم C (التركيز المثبط لـ 50% من نشاط الإنزيم = 0.06-01 ميكرومولار) وبدرجة أقل إنزيمات القسم A (التركيز المثبط لـ 50% من نشاط الإنزيم < 100 ميكرومولار) (Fuchs وآخرون، 1993؛ Tzouveleki وآخرون، 1997b). يستعمل هذا المثبط مخبريا مع العديد من المضادات الحيوية (amoxicillin، piperacillin...). (Dyke و Gregory، 1997) وسريريا مع ampicillin (Unasyn®) ومع cefoperazone (Sulperazone®) (Maiti وآخرون، 1998).

#### **tazobactam أو triazolyl-substituted penicillanic acid sulfone**

هو مركب نصف بنائي ورد ذكره لأول مرة سنة 1984 تحت اسم YTR830 (Aronoff وآخرون، 1984). تختلف بنيته عن بنية جزيء sulbactam بباقي الحلقة triazol المرتبط بذرة كاربون الثانية C<sub>2</sub> عوضا عن إحدى مجموعتي ميثيل. يقدر وزنه الجزيئي بـ 300.30 دالتون والإسم الكيميائي لصيغته الكيميائية هو: 2β-((1,2,3-triazol-1-Y1)-methyl)-2α-methyl penam (Suh وآخرون، 1995). يثبط بكيفية غير عكسية وبقوة إنزيمات القسم A (التركيز المثبط لـ 50% من نشاط الإنزيم = 0.005-0.15 ميكرومولار) وبدرجة أقل إنزيمات القسم C (التركيز المثبط لـ 50% من نشاط الإنزيم = 6-26 ميكرومولار) وبدرجة أقل إنزيمات القسم B (التركيز المثبط لـ 50% من نشاط الإنزيم < 400 ميكرومولار) (Bush وآخرون، 1993). يستعمل هذا المثبط مخبريا بشكل متلازمة مع العديد من المضادات الحيوية (ampicillin و amoxicillin) (Lachance وآخرون، 1993) وسريريا مع piperacillin (Tazocyn®) (Micetich وآخرون، 1987؛ Maiti وآخرون، 1998).

### **C6-(N1-methyl-1,2,3 triazolyl methylene) penam أو BRL 42715**

تم ذكره لأول مرة من قبل Coleman وآخرون (1989). كما يتضح من إسمه الكيميائي، يشبه جزيء BRL 42715 إلى حد كبير البنية المشتركة للمضادات الحيوية من النوع penams ويختلف عنها في الجزء (N1, Methyl-1,2,3 triazolyl methylene) الذي يخلف السلسلة الجانبية للحلقة  $\beta$ -lactam. لم يرد ذكر توفره على نشاطية ضد بكتيرية (Campos وآخرون، 1993) لكنه يثبط بفعالية إنزيمات مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam لبعض الأنواع البكتيرية. (Aldridge، 1993؛ Payne وآخرون، 1994).

### **(2 $\beta$ -alkenyl penicillanic acid sulfone) Ro 84-1220**

تم ذكره لأول مرة من قبل Richter وآخرون (1996)، تختلف بنيته عن بنية sulbactam في وجود الجزء alkenyl بدل مجموعة  $\text{CH}_3$  في الوضعية  $\text{C}_2$ . لم يرد ذكر توفره على نشاطية ضد بكتيرية ولكنه يثبط بفعالية إنزيمات القسم A (التركيز المثبط لـ 50% من نشاطية الإنزيم = 0.05 - 0.27 ميكرومولار) وبدرجة أقل إنزيمات القسم C (التركيز المثبط لـ 50% من نشاطية الإنزيم = 0.5 - 0.8 ميكرومولار) (Tzouveleki وآخرون، 1997<sub>a</sub>؛ Bush، 1999).

### **المركب J110-441**

تم ذكره لأول مرة من قبل Nagano وآخرون (1999). هو أحد مشتقات  $\beta$  methyl carbapenem. يختلف عنها في الجزء Benzothienylthio الذي يكون مرتبطا بالوضعية  $\text{C}_2$ . لم يرد ذكر إمتلاكه لنشاط ضد بيكتيري لكنه يثبط بكيفية غير عكسية وبقوة إنزيمات القسم B (ثابت تثبيط = 0.0037 - 1 ميكرومولار) وبدرجة أقل إنزيمات القسم C (ثابت تثبيط = 0.037 ميكرومولار) وإنزيمات القسم A (ثابت تثبيط = 2.54 ميكرومولار) (Nagano وآخرون، 1999).

### **المركب Syn 2190**

تم ذكره لأول مرة من قبل Nishida وآخرون (1999). هو أحد مشتقات monobactams، يختلف عنها في احتوائه على جزء 1.5dihydroxy-4-pyridone الذي يرتبط في الوضعية  $\text{C}_3$  للحلقة monobactam. لم يرد ذكر إمتلاكه لنشاط ضد بكتيري لكنه يثبط بكيفية غير عكسية وبقوة إنزيمات القسم C (التركيز المثبط لـ 50% من نشاطية الإنزيم = 0.002-0.01 ميكرومولار). لم يشرع بعد في استعماله سريريا لكنه تم اختباره على متعضيات حيوانية مخبرية (Nishida وآخرون، 1999). (الملحق 2) يلخص البنى الكيميائية لهذه المجموعة من مثبطات مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam.

## مثبطات أخرى:

### البروتين المثبط لمميهات الحلقة $\beta$ -lactam:

عزل هذا المثبط لأول مرة من وسط زرع نفس السلالة الفطرية *Streptomyces calvuligerus* التي تنتج الحمض clavulanic (Doran وآخرون، 1990). حسب المعطيات المرجعية المتوفرة لدينا فإن البروتين المثبط لمميهات الحلقة  $\beta$ -lactam هو أول جزيء بروتيني إتضح أن له القدرة على تثبيط هذا النوع من الإنزيمات (Palzkill و Rudgers، 1999). لهذا البروتين وزن جزيئي يقدر بـ 17.5 كيلو دالتون ويتشكل الجزيء الواحد منه من 165 حمض أميني (Huang وآخرون، 1998). يأخذ هذا الجزيء تقريبا شكل قرص تنتظم بناه الثانوية في مجالين، يحوي كل مجال 4 بنى وريقية شديدة التحذب تغلف بنيتين حلزونيتين، تكون على ارتباط فيما بينها بنى حلقيه (الشكل 06). من بين الأحماض الأمينية المشكلة للجزيء، 23 منها عطري، تتوزع 13 منها بصورة غير منتظمة في الجهة المقعرة لبنى الوريقية، يرفع موضعها هذا من مساحة تماسها مع وسط التفاعل (Strynadka وآخرون، 1994).

يثبط هذا البروتين بنوعية إنزيمات القسم A (ثابت تثبيط = 40 بيكومولار) (Palzkill و Rudgers، 1999). لم يرد ذكر استعماله سريريا، لكنه ورد ذكر الارتكاز على تأثير هذا البروتين لتطوير مثبطات بروتينية أخرى أكثر فعالية (Gregory و Dyke، 1997).

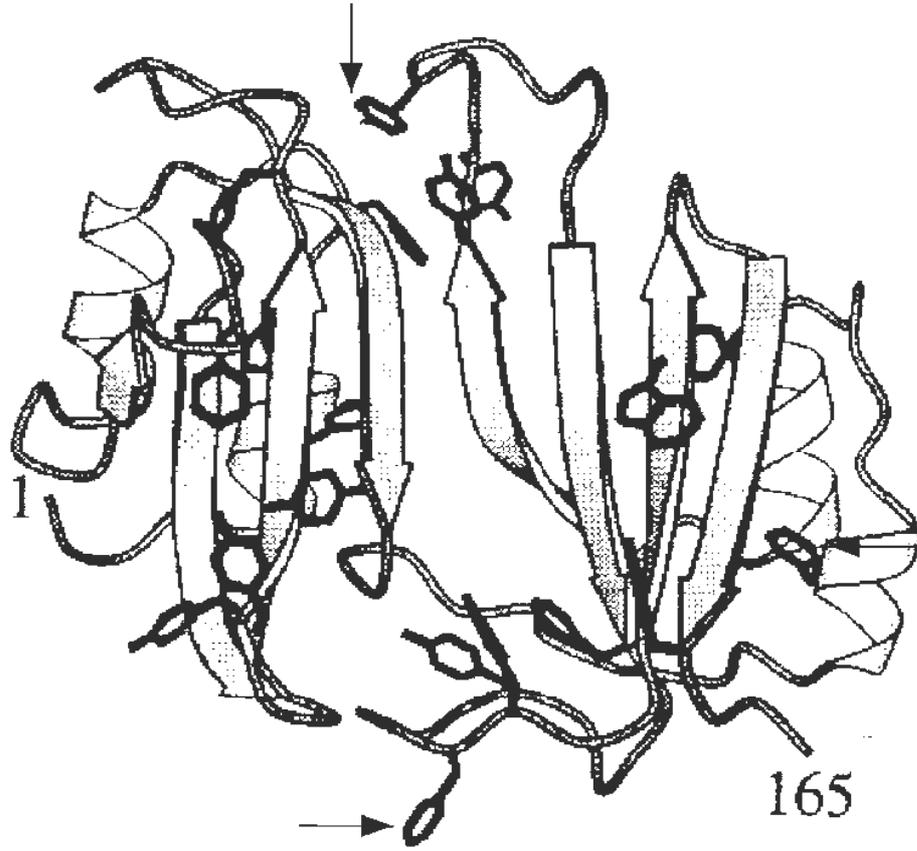
### الحمض salicylsalicylic :

يستعمل في العلاج ضد الحمى والالتهابات مورده في الأصل طبيعي إذ يمكن على سبيل المثال إستخلاصه بواسطة الميثانول من جذور نبتة *Fissistigma cavaleriei*. يبدي فعالية تجاه مميهات الحلقة  $\beta$ -lactams أقل من فعالية الحمض clavulanic و sulbactam و tazobactam، ويمكن تحسين فعاليته بتغيير في بنيته الكيميائية (Zaichang وآخرون، 2010).

### II-2- آلية وحركية التثبيط لمميهات الحلقة $\beta$ -lactam :

#### II-2-1- مميهات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بسرين:

يبدو أن التوزيع الواسع لهذا النوع من الإنزيمات في الأنواع البكتيرية شكّل الدافع الرئيسي للبحث عن جزيئات لها القدرة على تثبيطها. تم اكتشاف لحد الساعة العديد من المثبطات منها من تشبه بنيته المضادات الحيوية من نوع  $\beta$ -lactams ومنها من تختلف عنها كلية، ومنها أيضا من درست آليته الجزيئية للتثبيط ومنها



الشكل 06: البنية الجزيئية الثالثة للبروتين المثبط لميهات الحلقة  $\beta$ -lactam (Strynadka وآخرون، 1994).

←: السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية العطرية

أيضا من لم تدرس آليته. نذكر أن جل هذه الدراسات تمت على إنزيمات القسم A، لأن المعرفة الجيدة لبنيتها الجزيئية يسهل من فهم آلية التثبيط.

### الجزيئات أشباه المضادات الحيوية من نوع $\beta$ -lactam:

تتمثل الجزيئات التي درست آليتها الجزيئية للتثبيط في الحمض calvulanic (Chen و Herzberg، 1992) و tazobactam (Bush وآخرون، 1993؛ Yang وآخرون، 1999). تم لحد الآن إقتراح نموذجين لشرح هذه الآلية، يشتركان في طبيعة المركبات الطرفية الأول والثاني والثالث مركب ميخائيلي أول (1)، ناتج عن تأثير المثبط مع الإنزيم بروابط كهروساكنة. مركب ثان (2) ناتج عن المهاجمة النكليوفيلية لذرة كربون كربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam. مركب ثالث (3) ناتج عن إماهة الرابطة الأميدية لهذه الحلقة (تتم على غرار استقلاب المضادات الحيوية من نوع  $\beta$ -lactams إلى أسيل) يبقى على ارتباط وثيق بالإنزيم (Livermore، 1993). يختلف هذان النموذجان في مصير المركب الطرفي الثالث الذي يدخل في عدة مسالك (Bush وآخرون، 1993؛ Yang وآخرون، 2000).

### حالة الحمض calvulanic:

إرتكازا عل نتائج التحليل الطيفي والصور المشكلة من خارطة الكثافة الإلكترونية بعد تعريض بلورات من مختلف المركبات المتشكلة مع الإنزيم للأشعة السينية، يتحول المركب الطرفي الثالث إلى 3 مركبات طرفية: المركب إنزيم-imine (4) والمركب إنزيم-cis-enamine (5) ثم المركب إنزيم-trans-enamine (8). في الواقع بعد إماهة الرابطة الأميدية للحلقة  $\beta$ -lactam، تكتسب ذرة الأزوت (التي تصبح جزءا من الحلقة الخماسية) بروتونا (Imtiaz وآخرون، 1993)، مما يؤدي إلى انفتاح الحلقة الخماسية وتشكل المركب إنزيم-imine والمركب إنزيم-enamine بنوعيه cis و Trans (Coulson و Cartwright، 1979؛ Knowles، 1985؛ Chen و Herzberg، 1992). قد يتعرض المركب (4) إلى عملية نزع أسيلة معطيا المركب (6) وسامحا بإعادة تنشيط الإنزيم. لاحظ Charnas وآخرون (1978)، أن جزيء إنزيم واحد يمييه قبل تثبيطه 115 جزيء من المثبط، تتشابه آلية إعادة النشاط للإنزيم هذه مع تلك التي تحدث في حالة مادة تفاعل عادية، وتختلف عنها بتهديم لاحق لنتائج إماهة المثبط (7). قد يفقد المركب (4) بكيفية غير عكسية لجزء منه لإعطاء قاعدة شيف (11) مع الحمض الأميني ليسين 73 للإنزيم (Brenner و Knowles، 1984). وقد يفقد المركب (5) مجموعة كربوكسيل للتفاعل مع باقي الحمض الأميني ليسين 73 لإعطاء بصفة غير عكسية قاعدة شيف أخرى (12). كما يمكن أن يفقد المركبين (5) و (8) مجموعة كربوكسيل بشكل غير عكسي لإعطاء المركب (9) (Chen و Herzberg، 1992) (الملحق 3).

## حالة tazobactam:

إرتكازا على نتائج تقنيات عديدة (التحليل الطيفي، التحليل الطيفي الكتلي، كروماتوغراف الضغط العالي و الصور المشكلة من خارطة الكثافة الإلكترونية بعد تعريض بلورات مختلف المركبات المشكلة مع الإنزيم للأشعة السينية) وخلافا لما يحدث مع الحمض clavulanic يتأثر جزئ tazobactam مع الإنزيم مما يؤدي إلى انفتاح الحلقة  $\beta$ -lactam ثم الحلقة الخماسية (Imtiaz وآخرون، 1994). يؤدي هذا إلى تشكيل المركب إنزيم-imine (4) والمركب إنزيم-enamine بنوعيه cis و trans (6،5) (yang وآخرون، 1999). تدخل هذه المركبات الطرفية في عدة مسالك: قد تفقد المركبات imine و enamine جزءا منهما (7)، للتفاعل مع Ser130 للإنزيم لإعطاء المركب إنزيم-فنييل إيثر (8). كما يمكن لهذه المركبات أن تفقد نفس الجزء على إثر إماهة لإعطاء المركب إنزيم-ألدهيد (9). وقد تتعرض المركبات إنزيم-enamine (6،5) أيضا على إثر ذلك لعملية حذف لإعطاء المركب إنزيم-propionyl (12). أخيرا تسمح إماهة المركبات 9، 10، 11 و 12 للإنزيم باسترجاع نشاطه ثانية (Yang وآخرون، 2000) (الملحق 4).

## جزئيات أخرى:

تتمثل الجزئيات التي درست أليتها الجزئية للتنشيط ضمن هذا القسم في البروتين المثبط لمميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam (Strynadka وآخرون، 1994، 1996؛ Rudgers و Palzkill، 1999). شكلت إنزيمات القسم A خاصة النوع TEM-1 موضوع كل الدراسات التي كانت تهدف إلى فهم أو شرح آلية تثبيط هذا البروتين لمميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam.

بينت إختبارات التطهير الموجه والصور المشكلة من خارطة الكثافة الإلكترونية بعد تعريض بلورات المركب الوحيد الذي يشكله الإنزيم مع هذا البروتين للأشعة السينية أنواع الأحماض الأمينية المتأثرة فيما بينها والموجودة في مناطق التماس بين الإنزيم والبروتين المثبط.

- منطقة تماس أولى، يرتبط فيها البروتين المثبط لمميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam بمنطقة مشحونة سلبا مكونة من سلسلة من الأحماض الأمينية من 99 إلى 112 توجد بمحاذاة أو خارج الإنخماص الذي يأوي المركز النشط، يضمن هذا الارتباط بكيفية غير مباشرة طبقة كثيفة من جزئيات ماء محصورة في الفراغ البيني بمنطقة التماس وبكيفية مباشرة وجود حمض أميني عطري في الموقع 105 والبرولين في الموقع 107 لهذه المنطقة المشحونة سلبا (Strynadka وآخرون، 1996). يتم على إثر هذا التماس الأول سد للإنخماص الحاوي للموقع النشط.

- منطقة تماس ثانية، يرتبط فيها مجال أول للبروتين المثبط داخل الموقع النشط للإنزيم. تعمل قوى فاندرالس مع بواقي الأحماض الأمينية 235-238 وكذا الروابط الهيدروجينية الأربعة التي يشكلها الحمض أسبارتيك 49 للبروتين المثبط مع 4 بواقي الأحماض الأمينية الضرورية في التحفيز على استقرار الارتباط (Petersino وآخرون، 1999).

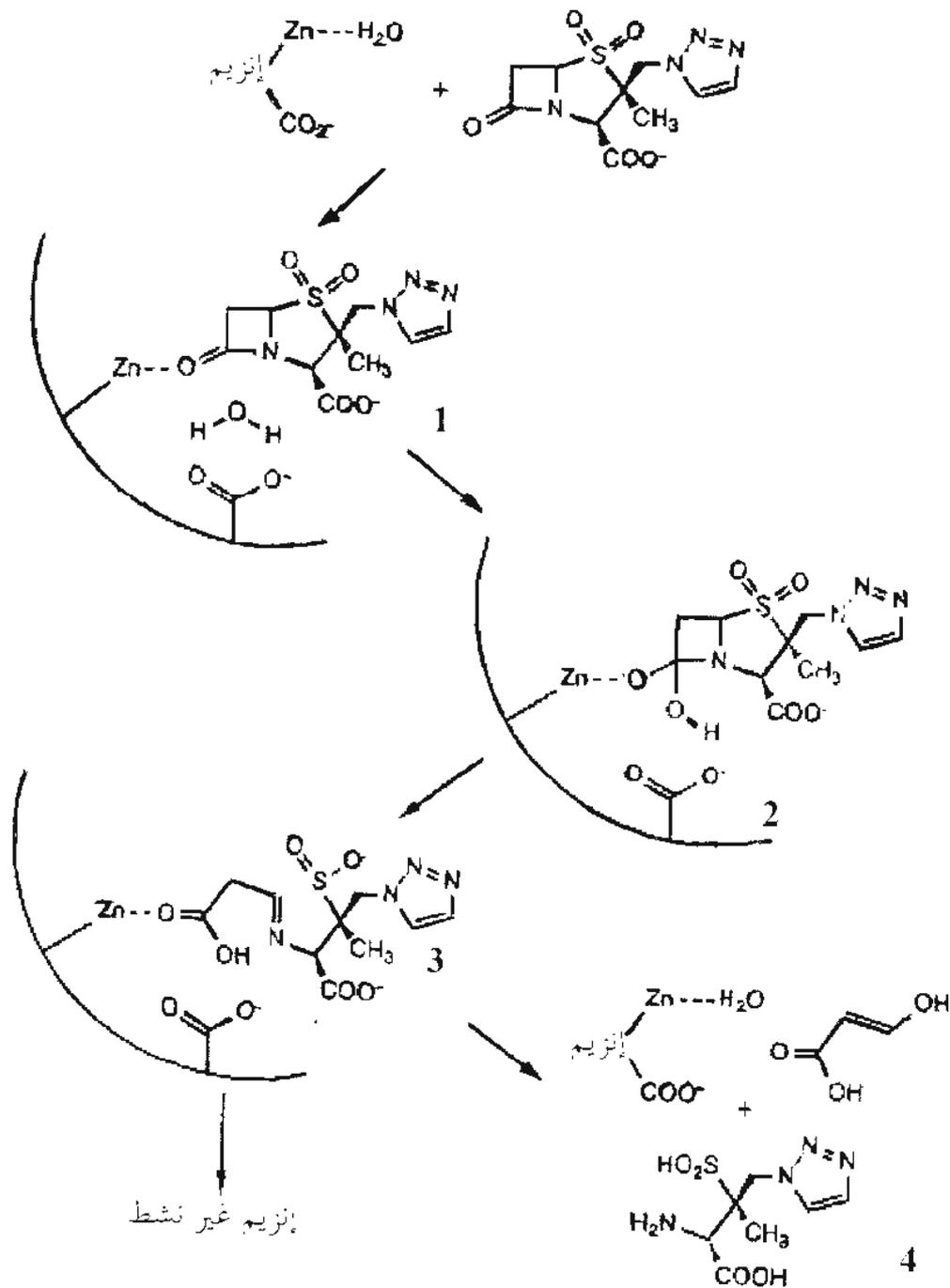
- منطقة تماس ثالثة، يرتبط فيها مجال ثاني للبروتين المثبط داخل الموقع النشط للإنزيم، يتم هذا الارتباط بالفينيل ألانين 142 لهذا المجال وبواقي الأحماض الأمينية للموقع النشط (Huang وآخرون، 2000).

يتم على إثر هذا التماس الثاني والثالث سد للموقع النشط.

بينت إختبارات التطهير الموجه دور الحمض أسبارتيك 49 والفينيل ألانين 142 في استقرار المركب إنزيم-بروتين مثبط. يؤدي في الواقع تغيير الحمض أسبارتيك 49 والفينيل ألانين 142 بالحمض الأميني ألانين إلى خفض قوة ربط الإنزيم-بروتين مثبط بـ 80 و 300 مرة على الترتيب (Petersino وآخرون، 1999).

## II-2-2- مميّهات الحلقة $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك:

يبدو أن المعلومات القليلة المتوفرة عن آلية تحفيز هذه المجموعة من الإنزيمات والجدل القائم حولها، صعب من العثور على جزيئات لها القدرة على تثبيطها. فيما عدا tazobactam و J110-441 (التي استعملت مخبريا لتثبيط إنزيمات القسم B)، فإن المواد المثبطة التي تم العثور عليها لحد الآن هي كلها مواد مخلبية تختلف بنيتها عن بنية المضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams ولحد الساعة لا يوجد مثبطا سريريا فعالا لهذا القسم من الإنزيمات. تم اقتراح نموذج واحد لشرح آلية التثبيط بـ tazobactam لمميّهات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بذرة زنك واحدة، إرتكازا على تقنية التحليل الطيفي. يتأثر جزيء tazobactam مع الإنزيم لإعطاء مركب ميخائليس (1)، يدخل في هذا التأثير أيون الزنك للموقع النشط. يتحول مركب ميخائليس إلى مركب ظرفي رباعي بعد دخول جزيئة ماء نشطة في هذا التفاعل مع كاربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam، مما يؤدي إلى انكسار الرابطة المزدوجة (2). يلي تشكيل هذا المركب الرباعي الظرفي انفتاح الحلقة  $\beta$ -lactam والحلقة الخماسية tazobactam مؤديا إلى ظهور شكل المركب إنزيم-imine (3) (يمتص الأشعة فوق بنفسجية في 270 نانومتر). يستطيع هذا المركب المحافظة على استقراره معطلا نشاط الإنزيم. كما يستطيع أيضا الجزء imine أن يتحرر من الإنزيم للتعرض لتهديم لاحق ليعطي نواتج (4) بإمكانها أن تتأثر ثانية مع جزيئات إنزيمية أخرى لتعطيل نشاطها (Bush وآخرون، 1993) (الشكل 07).



الشكل 07: آلية و حركية تثبيط مميئات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بفلز بواسطة tazobactam (Bush وآخرون، 1993).

### II-3- المقاومة البكتيرية لمتبذات ممبهات الحلقة $\beta$ -lactam :

تمتلك العديدين العزلات البكتيرية السريرية القدرة على بناء ممبهات الحلقة  $\beta$ -lactam مقاومة (أو غير حساسة) لتأثير المتبذات الكلاسيكية المعروفة (swaren و آخرون، 1999). يمكن أن تقسم هذه المقاومة إلى شكلين:

**مقاومة طبيعية:** يترجم هذا الشكل بوجود اختلافات طبيعية بين المبهات في الحساسية للمتبذات. يثبت مثلا الحمض clavulanic بقوة عناصر القسم A وبدرجة ضعيفة عناصر القسم C (Martinez-martinez وآخرون، 1990)، تتعكس هذه الوضعيعة مع Tazobactam (Bonfiglio و Livermore، 1994). ترجع هذه المقاومة إلى الاختلاف في البنية الأولية (الموقع النشط) للإنزيم أو في البنية الثانوية (أبعاد الإنخماص الذي يأوي الموقع النشط).

**مقاومة مكتسبة:** صودفت لحد الآن مع ممبهات الحلقة  $\beta$ -lactam من الأنواع SHV و TEM، تترجم بزيادة معدل بنائها الحيوي (Wu وآخرون، 1995) مرده: (i) إرتفاع عدد نسخ البلازميد الحاملة للجين المشفر لهذا البناء. (ii) إرتفاع عدد نسخ هذا الجين المحمولة على بلازميد واحد. (iii) حدوث طفرات في المخضض و/أو الرادع تؤدي إلى إرتفاع فعالية الأول وتخفيض فعالية الثاني (Xiang وآخرون، 1997؛ Nelson و Elisha، 1999). بالإضافة إلى آلية الزيادة في معدل البناء الحيوي، يمكن أن تكتسب هذه المقاومة على إثر حدوث طفرات تؤدي إلى تغيير طبيعة بعض الأحماض الأمينية لجزيء الإنزيم، تدخل بكيفية مباشرة أو غير مباشرة في التأثير مع المتبذ. تؤدي هذه التغييرات في الأحماض الأمينية إلى تغيير البنية الأولية للإنزيم فتخفض أو تفقده قدرة تأثيره مع المتبذ (Yang وآخرون، 1999).

ورد ذكر مثل هذا التغيير في الأحماض الأمينية لأول مرة سنة 1992، (Thomson و Amys، 1992؛ Vedel وآخرون، 1992) مع النوع الإنزيمي SHV و TEM. في الواقع تم لحد الآن ضبط 20 نوع TEM طافر (أنواع TEM مقاومة للمتبذات) (Canica وآخرون، 1998) ونوع واحد SHV طافر (Prinarakis وآخرون، 1997) عزلت جميعها من سلالات سريرية لأنواع بكتيرية مختلفة، *E. coli*، *Klebsiella*، *Proteus mirabilis*. تبدي كل هذه الإنزيمات الطافرة من TEM-1، حساسية ضعيفة لأحد أو لكل المتبذات المستعملة سريريا (الحمض clavulanic، sulbactam، tazobactam) (yang وآخرون، 1999).

تتمثل الأحماض الأمينية التي يمسه التغيير في: مثنونين 69، سيرين 130، أرجنين 244، 275 وأسبارجين 276. يؤدي استخلاف مثنونين 69 (Delaire وآخرون، 1992؛ Stapleton وآخرون، 1995) وأسبرجين 276 (Brun وآخرون، 1994؛ Bret وآخرون، 1997) وأرجنين 244 (Belaouaj وآخرون،

1994؛ Bret وآخرون، 1997) إلى ظهور مقاومة عالية للحمض clavulanic. أما استخلاف سيرين 130 أو أرجنين 275 فيؤدي إلى ظهور مقاومة لكل المثبطات المستعملة سريريا.

- يستخلف الحمض الأميني ميثونين 69 بالحمض الأميني لوسين أو فالين أو إيزولوسين، يتلخص انعكاس هذا الإستخلاف في الإخلال باستقرار المركب الظرفي الرباعي بين المثبط والإنزيم ويترجم بانخفاض في ثابت التثبيط وارتفاع التركيز المثبط لـ 50% من نشاط الإنزيم (Knox، 1995؛ Ferzaneh وآخرون، 1996؛ Chaibi وآخرون، 1998) (أنظر آلية التثبيط).

- يستخلف الحمض الأميني أرجنين 244 بالحمض الأميني سيرين أو سستين أو هستدين أو لوسين ويتلخص انعكاس هذا الإستخلاف في فقد القدرة على تنشيط جزيء الماء الضروري لهدرجة أزوت الحلقة الخماسية. نذكر أن هذه الأحماض الأمينية تتوفر على سلاسل جانبية قصيرة وتكون أيضا غير مشحونة خلافا للأرجنين 244 الذي يكون مشحون إيجابيا (Speldooren وآخرون، 1998).

- يستخلف الحمض الأميني أسبرجين 276 بالحمض الأميني أسبرتات أو سستين، يتلخص انعكاس هذا الإستخلاف في فقد القدرة على توجيه الأرجنين 244 وكذلك جزيء الماء الضروري لهدرجة أزوت الحلقة  $\beta$ -lactam (Imtiaz وآخرون، 1993؛ Bonomo وRice، 1999).

- يستخلف الحمض الأميني سيرين 130 بالحمض الأميني غليسين أو غلوتامات. يتلخص انعكاس هذا الإستخلاف في فقد قدرة الإنزيم على التأثر مع المثبط وكذلك عدم حدوث المهاجمة النكليوفيلية لكاربونيل الحلقة  $\beta$ -lactam (Bermudes وآخرون، 1999؛ Sirot وآخرون، 1998). ويترجم في انخفاض كل من ثابت التثبيط وارتفاع التركيز المثبط لـ 50% من نشاط الإنزيم للمثبطات الثلاث (Sirot وآخرون، 1998).

- يستخلف الحمض الأميني أرجنين 275 بالحمض الأميني لوسين أو غلوتامين (Fronzé وآخرون، 1995). يتلخص انعكاس هذا الإستخلاف في الإخلال بتكامل الموقع النشط (Delaire وآخرون، 1992).

### III- الفلافونويدات:

الفلافونويدات هي مركبات عديدة الفينول، تنتشر بشكل واسع في المملكة النباتية وتكون غالبا مرتبطة بسكريات غير متجانسة (Bruneton، 1993؛ Cermak وآخرون، 1998). تم التعرف حاليا على 4000 نوع من الفلافونويدات عند النباتات و تتواجد في الفواكه والخضر والأزهار والحبوب، ويعزى إليها لون هذه الأجزاء النباتية (Tim وLamb، 2005؛ Kitagawa، 2006).

### III-1- البنية الكيميائية والتصنيف:

باستثناء الشالكونات (chalcones) يحوي النوع الواحد من الفلافونويدات 15 ذرة كربون موزعة على 3 حلقات، حلقتين عطريتين A و B تربطهما حلقة غير متجانسة مؤكسجة في الكربون 4 (الحلقة C)، مما يكسبها صيغة كيميائية مشتركة من الشكل  $C_6-C_3-C_6$  (Mithofer و Martens، 2005). في الوسط الطبيعي تتواجد الفلافونويدات حرة، وتختلف في هذه الحالة عن بعضها البعض في درجة تشبع الحلقة غير المتجانسة وفي عدد مجاميع الهيدروكسيل للحلقتين A و B وموقع ارتباط الحلقة B بالحلقة غير المتجانسة وحالة تأكسد هذه الأخيرة. تصنف ارتكازا على هذا إلى: شالكون، أورون (aurone)، فلافانون (flavanone)، فلافانونول (flavanonol)، فلافون (flavone)، فلافونول (flavonol)، إيزوفلافونويد (Isoflavanon) وأنثوسينيدول (anthocynidol) (Hahlborch، 1981؛ Gamet-Payrastre وآخرون، 1999؛ Bhendrich، 2006؛ Kitagawa، 2006) (الملحق 5).

كما يمكن أن تتواجد مرتبطة بجزء سكري. ويمكن أن يكون هذا الجزء السكري سكر بسيط (غلوكوز، غلاكتوز، رامنوز، أرابينوز...) أو سكر قليل الوحدات (من السكريات البسيطة) ويرتبط إما بذرة أوكسجين لأحد مجاميع الهيدروكسيل مشكلا سكر غير متجانس من النوع O-Heteroside أو بذرة كربون للهيكل الكربوني للفلافونويد مشكلا سكر غير متجانس من النوع C-heteroside (Markham، 1982؛ Bruneton، 1993).

### III-2- الخصائص الفيزيائية - الكيميائية:

تشارك الفلافونويدات في بعض هذه الخصائص وهي الحساسية النسبية للضوء (Ignat) و آخرون، 2011) وتحمل درجات الحرارة العالية التي تصل إلى  $120^{\circ}C$  (Lavie، 1960؛ Williamson و Day، 1999) وفي الطبيعة الحمضية الضعيفة وبالتالي الذوبان في القواعد القوية مثل هيدروكسيد الصوديوم (Bruneton، 1999) وتنفرد في البعض الآخر: في اللون إذ يختلف من الأصفر إلى البني، و في الذوبان في المذيبات القطبية وغير القطبية إذ تذوب الفلافونويدات المرتبطة في المذيبات القطبية (الميثانول، الإيثانول، ثنائي مثيل سلفوأكسيد والأسيتون والماء). وتذوب الفلافونويدات الحرة في المذيبات العضوية الأقل قطبية (الكلوروفورم، الإيثر) (Markham، 1982؛ Glushoff-Faïsson، 1989) وأخيرا في إستخلاص أيونات العناصر الفلزية كالحديد، النحاس، الألمنيوم، الزنك (Verdan وآخرون، 2011).

### III-3-التأثيرات البيولوجية:

بينت الدراسات التي تمت على الفلافونويدات أن هذه المستقبلات الثانوية تملك تأثيرات علاجية وبيولوجية عديدة. من بين الأولى، نذكر التأثير المضاد للإلتهاب (Middleton و آخرون، 2000؛ Tim و Lamb، 2005؛ Hamalainen و آخرون، 2007) والتأثير المضاد للأورام (Kitagawa، 2006) والتأثير المضاد للحساسية (Kitagawa، 2006؛ Middleton و آخرون، 2000)، والتأثير المضاد للأوكسدة (Robert و آخرون، 2004؛ Middleton و آخرون، 2000؛ Hamalainen و آخرون، 2007؛ Verdan و آخرون، 2011). ومن بين الثانية، نذكر التأثير المضاد للبكتيريا (Tim و Lamb، 2005) وللفيروسات (Middleton و آخرون، 2000) والمثبط للإنزيمات (Tim و Lamb، 2005؛ Hamalainen و آخرون، 2007).

نظرا لطبيعة موضوع دراستنا سنركز في تحليلنا الآتي على تأثيرها التثبيطي للإنزيمات. تثبط الفلافونويدات أنشطة عدد لا بأس به من الأنزيمات (Meddelton، 2000). عند دراسة هذا الأثر يقتصر الباحثون مع بعض الإنزيمات على ذكر وجود الأثر المثبط على الإنزيم فقط ويحاولون مع إنزيمات أخرى تليل هذا الأثر المثبط بإعطاء أهمية للعلاقة بنية- نشاط (أو الأثر التثبيطي) لكن غالبا دون التطرق إلى كيفية التأثير بين الفلافونويد والبنية الجزيئية الأولية للإنزيم (الملحق 6).

### III-4- العلاقة بنية- نشاط (التثبيطي):

❖ في حالة الإنزيم بروتين كيناز C (PKC) وجد أن الفلافونويدات الأكثر قدرة على التثبيطي هي التي تتميز بإحتوائها على حلقة بنزين بمجموعة هيدروكسيل في المواضع 7 و3 و/أو 5 و3 (Feriola و آخرون، 1989؛ Robert و آخرون، 2004). يلغي سد هيدروكسل الكربون 3 نهائيا هذا التأثير التثبيطي (Alexandrakis و آخرون، 1999).

❖ في حالة إنزيم الفوسفوليباز  $A_2$  ( $PLA_2$ ) وجد أن تثبيطه بالفلافونويدات متعلق بوجود مجموعتي هيدروكسيل في الوضعيتين 5 و7 (Gil و آخرون، 1994).

❖ في حالة إنزيم  $K^+$ ,  $H^+$  ATPases تعتمد فعالية التثبيطي بالفلافونويدات على:

- 1- عدد مجاميع الهيدروكسيل المرتبطة بالفلافونويدات وتتنالزم وجود 4 على الأقل.
- 2- وجود على الأقل مجموعتي هيدروكسيل متجاورتين (النمط Catechol)، أو ثلاث مجاميع هيدروكسيل متجاورة (النمط Pyrogallol) أو وجود 3 مجاميع هيدروكسيل في الوضعيات 3 و5 و7 وينقص التأثير التثبيطي عندما تكون:

- مجاميع الهيدروكسيل مسدودة بجزء سكري أو بباقي مثيل.
- عندما تكون الرابطة بين  $C_2$  و  $C_3$  للحلقة غير المتجانسة مشبعة (Murakami و آخرون، 1999).

- ❖ في حالة إنزيم Lypooxygenase وجد أن الفلافونويدات الأكثر قدرة على التثبيط هي تلك الغنية بمجاميع الهيدروكسيل. نذكر لأن بيكليين (Baicalein) وأرتونين (Artonine) يثبطان نشاط هذا الإنزيم باستخلاف عنصر الحديد (Ferrandiz وآخرون، 1990).
- ❖ في حالة إنزيم cyclooxygenase وعلى عكس الإنزيم الأخير فإن الفلافونويدات الأكثر قدرة على تثبيط نشاطها هي تلك التي تفتقر لمجاميع الهيدروكسيل (أقل من 3) وبالأخص في الموضعين '3 و '4 للحلقة B (Landolfi وآخرون، 1984).
- ❖ في حالة إنزيم cyclic nucléotide phosphodiesterase يُعتقد أن التأثير التثبيطي يعود إلى التشابه بين البنية الحلقية للقاعدة أدنين لمادة تفاعل هذا الإنزيم (AMPC) والبنية الحلقية للفلافونويدات (Ferell وآخرون، 1979).
- ❖ في حالة إنزيم glutathione-S-transférase يتعلق التأثير التثبيطي لنشاط هذا الإنزيم بعدد مجاميع الهيدروكسيل و بوجود الرابطة المزدوجة بين ذرتي الكربون C<sub>2</sub> و C<sub>3</sub> للحلقة غير المتجانسة (Merlos وآخرون، 1991).

### III-5- بذور *Nigella sativa* L. والفلافونويدات:

تنتمي نبتة *Nigella sativa* L. إلى عائلة Ranunculaceae. وهي نبتة عشبية حولية. الشائع عنها أنها تنمو في الشرق الأوسط، شرق أوروبا، غرب ووسط آسيا و منطقة الحوض المتوسط (Khattak وآخرون، 2008). يتراوح ارتفاعها بين 30 و 60 سم. أوراقها فصيحة و رمحية الشكل، السفلية منها صغيرة و العلوية طويلة. تتكاثر تلقائياً، توجد أزهارها البيضاء في تويج الزهرة ووريقة كأس الزهرة في السداة بتلية. الثمرة كبسولة مغلقة تحتوي من 3 إلى 6 كربة (العضو الأنثوي للزهرة) متلاحمة مع بعضها. تحتوي كل كبسولة على الكثير من البذور طولها من 2 إلى 3.5 ملم مثلثية الشكل يميل لونها إلى البياض وتنتفح ليتحول لونها إلى الأسود (Ghedira، 2006؛ Bonnier، 1990).

تتميز بذور هذه النبتة بذوق الشيح الخفيف، وهي متعددة الإستعمالات: تستعمل كتابل، تضاف كعامل نكهة و عامل حماية للخبز، وتضاف عجينتها المحضرة في العسل إلى منتوجات المخابز والجبن... (Khattak وآخرون، 2008).

بينت الأبحاث التي تهتم بالقيمة الغذائية أن هذه البذور تُشكل موردا لا بأس به من الكثير من العناصر المعدنية: الفوسفور، البوتاسيوم، الصوديوم، الزنك، الكالسيوم و المغنيزيوم. (Khattak وآخرون، 2008).

طبيا، تُستعمل هذه البذرة في شكلها الخام وفي مناطق عديدة في علاج العديد من الأمراض منها على سبيل المثال: الربو، الإلتهاب، الأمراض الصدرية، الانفلونزا... في نفس الإتجاه، تُستعمل مستخلصاتها كأدوية علاج حالات مرضية عديدة: السرطان، الإلتهابات، الحمى، تسكين الألم والإصابة بالأحياء الدقيقة (Khattak وآخرون، 2008).

تتشكل هذه المستخلصات من مواد دسمة و مواد غير دسمة. وتتشكل هذه الأخيرة بدورها من: فيتامينات وأملاح معدنية، أشباه القواعد، بروتينات، عديدات الفينول و الفلافونويدات. بالنسبة لهذه الأخيرة، نشير إلى أن المعطيات المرجعية المتعلقة بها شحيحة جدا سواء تعلق الأمر بالبذور أو بالأجزاء الأخرى من النبتة. في القليل من المراجع التي بحوزتنا. تحتوي مستخلصات بذور هذه النبتة على عديدات فينول (hydroxybenzoic, syringic and p-cumaric acids) (Mariod و آخرون، 2009) وفلافونويدات مرتبطة بسكريات قليلة الوحدات:  $k\alpha mpf\acute{e}rol-3\ glycosyl(1\rightarrow2)\ galactosyl(1\rightarrow2)$  و  $glucoside$  و  $querc\acute{e}tine\ 3-glycosyl(1\rightarrow2)\ galactosyl(1\rightarrow2)\ glucoside$  (Meziti، 2009) أو حرة:  $rutine$ ،  $k\alpha mpf\acute{e}rol$  ... خلافا للبذور تحتوي الأجزاء الهوائية والجذور على فلافونويدات ( $Apigenin$ ،  $Quercetine$ ، ...) وأحماض فينولية ( $Gallic\ acid$ ،  $Vanillic\ acid$ ) لكن بكمية أقل (Bourgou و آخرون، 2008).

# أعمال شخصية

# الموسائل و الطرق

الوسائل و الطرق:

I- المادة البيولوجية:

I-1- بذور *Nigella sativa* L. :

بذور *Nigella sativa* L. (من عائلة Ranunculaceae) تم جنيها في شهر جوان 2010 من منطقة الحروش ولاية سكيكدة شرق الجزائر.

I-2- البكتيريا:

تحصلنا على العزلات البكتيرية التي شكلت موضوع إختباراتنا من مخبر الأحياء الدقيقة لمستشفى سطيف الجامعي. يتعلق الأمر بعزلة لـ *E-coli* وعزلة لـ *Klebsiella pneumoniae*، وعزلة لـ *Acinetobacter*. تم التأكد في المخبر نفسه من نقاوتها ونوعها باستعمال سلسلة من 20 مستحضر بيوكيميائي جاهز (Biomérieux, API 20E، فرنسا) و من إفرازها لإنزيمات مميهاة الحلقة  $\beta$ -lactam بالطرق الخاصة قبل حفظها في وسط حفظ.

II- الطرق:

II-1- تحضير المستخلصات الفينولية من بذور *Nigella sativa* L. :

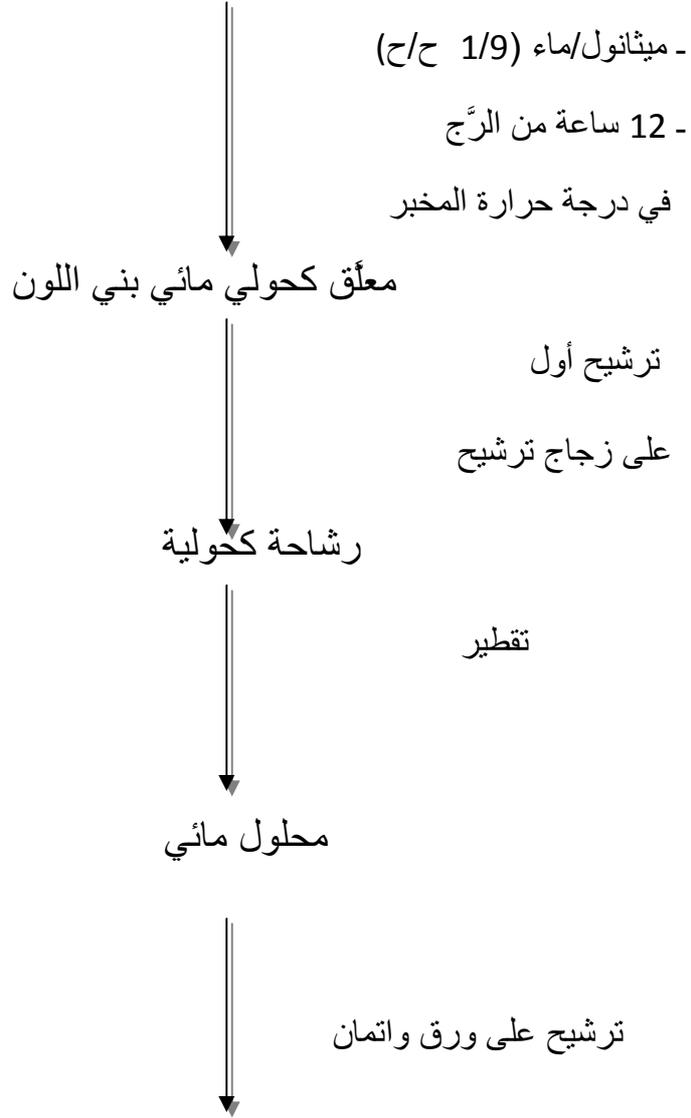
II-1-1- مستخلص فينولي غير منزوع الدسم:

لأجل إستخلاص عديدات الفينول إتبعنا طريقة Markham (1982) المعدلة من قبل (1993) Bruneton التي تركز على درجة ذوبان هذه المواد في المحاليل العضوية.

يُضاف إلى 25غ من مسحوق بذور *Nigella sativa* L. 250 مل من ميثانول/ماء (1/9). بعد ليلة كاملة من الرّج في درجة حرارة المخبر، تُقصى الشوائب الكبيرة بترشيح أول للمزيج على زجاج ترشيح. للتخلص من الكحول، تُمرّر الرُّشاحة في جهاز التقطير في درجة حرارة 40°م. أخيرا، يُرشح الجزء المائي المتبقي من عملية التقطير على ورق ترشيح واتمان رقم 03. تُشكّل الرُّشاحة المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم الذي يُحفظ في درجة حرارة 4°م خلال المدة التي تسبق إستعماله (الشكل 08).

25 غ من طحين

بذور *Nigella sativa* L.



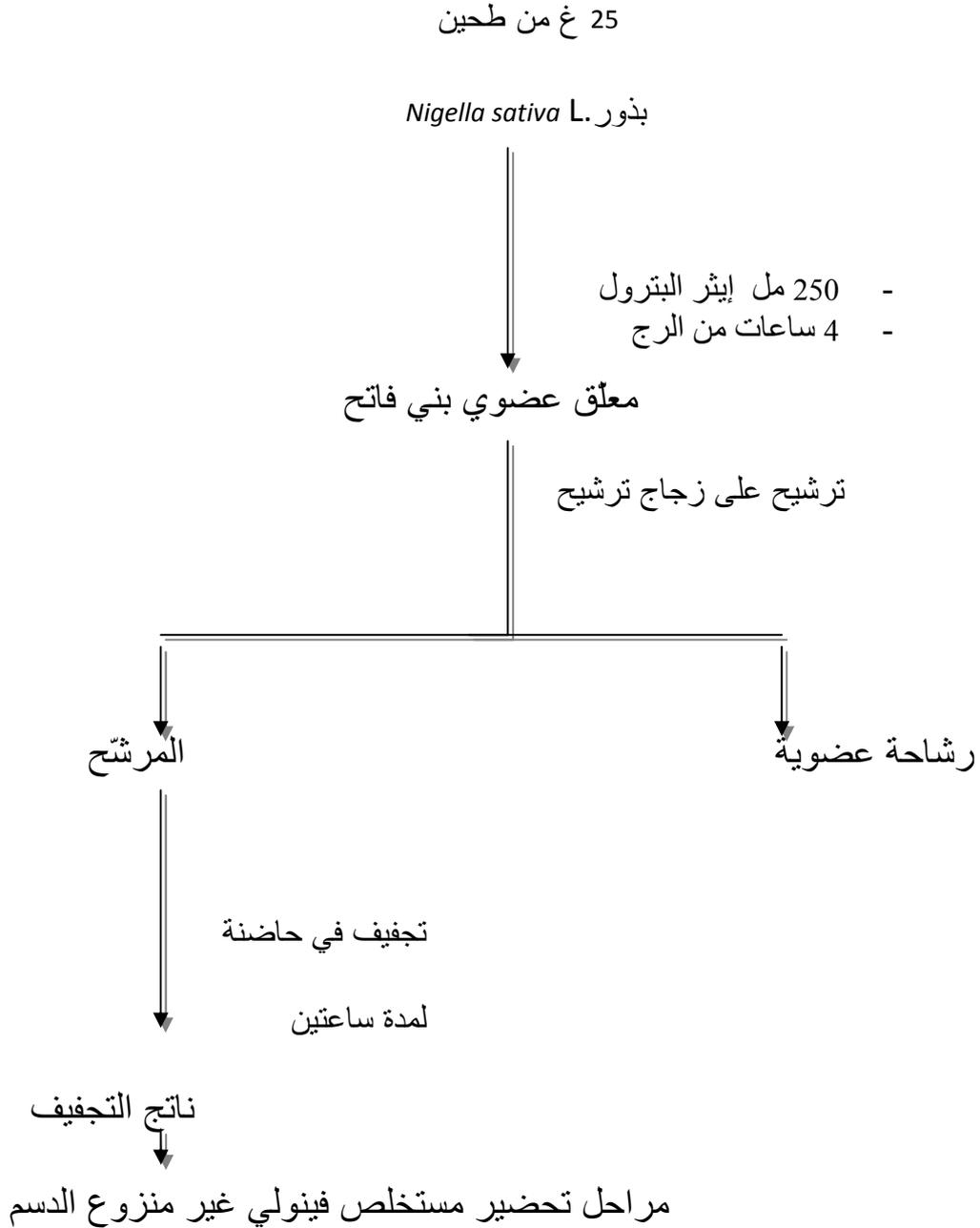
رشاحة مائية (مستخلص فينولي غير منزوع الدسم)

الشكل 08: مراحل تحضير مستخلص فينولي غير منزوع الدسم من مسحوق بذور *Nigella*

*sativa* L.

## II-1-2- مستخلص فينولي منزوع الدسم:

يُضاف إلى 25 غ من طحين بذور *Nigella sativa* L. 250 مل من إيثر البترول، بعد 4 ساعات من الرّج (Agitateur oscyle12) في درجة حرارة المخبر، يُرشح المزيج على زجاج ترشيح. يُسترجع المرشح ويجفّف في حاضنة لمدة ساعتين ثم يخضع ناتج التجفيف إلى نفس مراحل تحضير المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم (الشكل 09).



الشكل 09: مراحل تحضير مستخلص فينولي منزوع الدسم من مسحوق بذور *Nigella sativa* L.

## II-2- الدراسة الكمية للمستخلصات الفينولية لبذور *Nigella sativa* L :

### II-2-1- التقدير الكمي للعديدات الفينول:

لأجل التقدير الكمي لعديدات الفينول في المستخلصين منزوع وغير منزوع الدسم اتبعنا طريقة Vuorela (2005) المعدلة من قبل Li وآخرون (2007) التي يتلخص مبدؤها في التآثر الكيميائي بين حمض Phosphotungstique phosphomolybdique (كاشف Folin) و المجاميع القابلة للأكسدة للمركبات الفينولية. في وسط قاعدي، يمتص المركب الناتج عن هذا التآثر الأشعة بطول موجة 765 نانومتر.

عملياً، إلى سلسلة من سبعة أنابيب نضيف إلى الخمسة الأولى أحجاماً متفاوتة من محلول أم من حمض gallique (1 مغ/مل في الماء المقطر) و إلى الأنبوب السادس و السابع حجم 15.625 ميكرو لتر من المستخلص الفينولي منزوع و غير منزوع الدسم على التوالي. نضيف لكل أنبوب حجم كاف لـ 1 ميليلتر من الماء المقطر للوصول إلى تراكيز متفاوتة (7.81 - 125 ميكروغرام/ملل). نستقطع 200 ميكرو لتر من كل أنبوب ليُضاف لها 1 مل من كاشف Folin المخفف 10 مرات. بعد الرّج و الحضان لمدة 4 دقائق في درجة حرارة المخبر، نضيف لكل أنبوب 800 ميكرو لتر من محلول كربونات الصوديوم (75 غ/ل). وبعد الرّج ثانية و الحضان لمدة ساعتين في درجة حرارة المخبر يُقرأ الإمتصاص على طول موجة 765 نانومتر.

يعبّر عن النتائج النهائية بحساب عدد الميكروغرامات المكافئة لحمض gallique في 1 مل من المستخلص الفينولي إرتكازاً على معادلة منحى تطور الإمتصاص بدلالة تركيز الحمض gallique.

### II-2-2- التقدير الكمي للفلافونويدات:

لأجل التقدير الكمي للفلافونويدات في المستخلصين منزوع وغير منزوع الدسم اتبعنا طريقة trichlorure d'aluminium (Bahorun وآخرون، 1996) المحسنة من قبل Djeridane وآخرون (2006)؛ التي يتلخص مبدؤها في التآثر الكيميائي بين trichlorure d'aluminium و الفلافونويدات. يمتص المركب الناتج عن هذا التآثر الأشعة بطول موجة 430 نانومتر.

عملياً، إلى سلسلة من ثمانية أنابيب نضيف إلى الست الأولى أحجاماً متفاوتة من محلول أم من rutine (0.1 مغ/مل في الميثانول) وإلى الأنبوب السابع و الثامن 175 ميكرو لتر من المستخلص الفينولي منزوع و غير منزوع الدسم على التوالي. نضيف لكل أنبوب حجم كاف لـ 7 ميليلتر من الميثانول للوصول إلى تراكيز متفاوتة (0.310 - 10 ميكروغ/ملل). نستقطع من كل أنبوب 1 مل ليُضاف له 1 مل من محلول

AlCl<sub>3</sub> (0.2% في الميثانول). يُرج المزيج ويُحضر لمدة 10 دقائق في درجة حرارة المخبر و يُقرأ إمتصاصه على طول الموجة 430 نانومتر.

يُعبّر عن النتائج النهائية بحساب عدد الميكروغرامات المكافئة لـ rutine في 1 مل من المستخلص الفينولي لبذور *Nigella sativa* L. إرتكازاً على معادلة منحنى تطور الإمتصاص بدلالة تركيز rutine.

### 3-II- الدراسة النوعية بكمياتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمستخلصات الفينولية لبذور *Nigella*

*:sativa* L.

يتلخص مبدأ هذه الطريقة في تقاسم الطور الثابت (هلام من السيليس) والطور المتحرك (مزيج من محاليل عضوية) لمواد عديدة من مزيج واحد لتفاوت ذوبانها في الطورين.

عملياً، نحدّد على بعد 1 سم من حافة صفيحة الفصل ثماني مواقع متباعدة. نضع تدريجياً على الموقع الأول و الثاني 5 ميكرو لتر من مستخلص فينولي غير منزوع و منزوع الدسم لـ *Nigella sativa* L. على التوالي، وعلى المواقع من الثالث إلى الثامن 5 ميكرو لتر من محاليل أم للمواد الشاهدة: الحمض gallique، catéchine، kaempférol، quercétine، rutine (5 مغ/مل) و vanilline (10 مغ/مل). بعد تجفيف المواقع توضع صفيحة الفصل في وعاء الهجرة المشبعة مسبقاً ببخار الطور المتحرك لمدة معينة كافية لحدوث الفصل. نذكر أن الطور المتحرك هو مزيج من المذيبات العضوية التالية: Chloroforme، Acétate d'éthyl، Acide formique (10/40/50 ح/ح/ح) (Gottlieb و Riov، 2006). بعد انقضاء هذه المدة تُجفف الصفائح في حاضنة ثم تشاهد تحت مصدر للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 254 نانومتر ثم تعالج بكاشف Vanilline sulfurique (Wagner و آخرون، 1984؛ Macek، 1972) أو ببخار اليود الجزيئي.

يُعبّر عن النتائج بحساب نسبة مسافة هجرة كل مادة إلى مسافة هجرة الطور المتحرك بدءاً من مواقع العينات. تُحدّد نوعية المواد الموجودة في المستخلصين بمقارنة نسب هجرتها مع نسب هجرة المواد الشاهدة.

### 4-II- تحضير المستخلص الخام لميهة الحلقة *:β-lactam*

يُحضّر اللقاح بزرع مستعمرة بكتيرية نامية على وسط صلب من منقوع دماغ و قلب البقر في 10 مل من مرق نفس الوسط (37 غ/ل) (Sigma، ألمانيا). بعد ليلة من الحضانة مع الرج في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م، بعد إنقضاء فترة الحضانة يضاف المعلق البكتيري المتشكل إلى حوجة تحوي حجم من نفس المرق

المعقم كافية لنسبة نهائية 1:9 ، لقاح: مرق مغذي. بعد 18 ساعة من حضن ثان مع الرج في نفس الظروف التجريبية، يعرض المعلق البكتيري المتشكل إلى النبذ بسرعة 3000 دورة/د لمدة 30 د (نابذة من النوع LU-418H). نتخلص على إثر هذا من الجزء الطافي (الأول) و تُسترجع الثفالة (الراسب الخلوي) في 50 ملل ماء مقطر ثم تعامل بالموجات فوق الصوتية (مجانس فوق صوتي من النوع Vibracell، الولايات المتحدة الأمريكية) لأجل مجانستها و كسر جدر الخلايا البكتيرية خلال 12 معالجة (15 ثانية لكل معالجة) تتخللها فترات تبريد قدرها 15 ثانية بالحفاظ على الأنابيب مغمورة في حمام ثلجي. يعرض ناتج المجانسة إلى نبذ ثان بسرعة 20000 دورة/د لمدة نصف ساعة في 4م (نابذة من النوع SIGMA، 3K30C). يُسترجع الجزء الطافي (الثاني) الحاوي نظريا على الإنزيم و يوضع في أنبوب ميز ثم يغمر بـ Polyethylène glycol لنزع أكبر قدر ممكن من الماء (أي تركيزه). أخيراً، يعرض المركز إلى عملية الميز ضد الماء المقطر لمدة ليلة كاملة في 4م. يستقطع من ناتج الميز عينات لأجل تقدير محتواه البروتيني و إختبار وجود الإنزيم فيه، ليقسّم بعدها إلى عينات (200-500 ميكرو لتر) تحفظ مجمدة إلى حين إستعمالها (الشكل 10) (Vecoli وآخرون، 1983).

## II-5- تقدير كمية البروتينات:

تم تقدير كمية البروتينات في المستخلص الخام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam قبل حفظه بطريقة تثبيت صبغة كوماسي الزرقاء اللامعة (Bradford، 1976) المحسنة من قبل Marcart و Gerbaut (1982). يتلخص مبدأ هذه الطريقة في قدرة البروتينات في وسط حامضي على تشكيل مركب مع صبغة كوماسي الزرقاء الذي يمتص الأشعة المرئية بطول الموجة 590 نانومتر خلافا للكاشف الذي يمتص نفس الأشعة بطول موجة 465 نانومتر.

عملياً، تُحضّر سلسلة من ثمانية أنابيب ثم تُضيف للأنابيب الخمسة الأولى أحجام متفاوتة (0-150 ميكرو لتر) من محلول أم من ألبومين مصل البقر (50 مغ/مل) وإلى الأنبوب السادس و السابع والثامن نضيف على الترتيب 60 ميكرو لتر من المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة البكتيرية *E.coli* و العزلة البكتيرية *K.pneumoniae* و العزلة البكتيرية *Acinetobacter*. نضيف بعدها لكل أنبوب حجم من الماء المقطر كاف لـ 200 ميكرو لتر. بعد المجانسة، نضيف لكل أنبوب 4 مل من محلول Marcart، بعد المجانسة ثانية والحضن لمدة 5د في درجة حرارة المحيط، يُقرأ إمتصاص المزيج على طول الموجة 590 نانومتر.

يُعبّر عن النتائج النهائية بحساب عدد ميلليغرامات البروتين في 1 مل من المستخلص الإنزيمي الخام ارتكازاً على معادلة منحى تطور الإمتصاص بدلالة تركيز ألبومين مصل البقر.

مستعمرة نامية في وسط صلب + 10 ملل مرق من نفس الوسط

ليلة من الحضان و الرج

في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م

معلق بكتيري أول

- إضافة مرق مغذي

- حضان و رج لمدة 18 ساعة

معلق بكتيري ثان

نبد بسرعة 3000 د/د لمدة 30 د

ثفالة (راسب خلوي أول)

جزء طافي أول

- إسترجاع في قليل من الماء المقطر  
- معالجة بالموجات فوق الصوتية  
- نبد ثاني بسرعة 20000 دورة/دقيقة  
لمدة 20 د في 4°م

ثفالة

جزء طافي ثان

(راسب خلوي

- حضان مع PEG ليلة كاملة

ثاني)

مستخلص إنزيمي خام

- ميز ضد الماء المقطر

الشكل 10: مراحل تحضير مستخلص خام من مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بدءاً من عزلات سريرية لـ *E. coli* أو

*K. pneumoniae* أو *Acinetobacter* مقاومة للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams.

## II-6- تحديد الوسائط الحركية لمميهة الحلقة $\beta$ -lactam :

يرتكز على قدرة الإنزيم على إماهة nitrocefine إلى ناتج أحمر اللون يمتص الأشعة المرئية بطول موجة 486 - 490 نانومتر.

إلى سلسلة من ست أنابيب نضيف تراكيز نهائية متفاوتة من nitrocefine (3-25 ميكرومولار) ثم نضيف لكل أنبوب حجم من محلول منظم فوسفاتي (0.1 مولار. أس هيدروجيني 7.0، ألبومين مصل البقر 0.005 مغ/مل) كاف لـ 1 مل. بعد المجانسة اليدوية نضيف لكل أنبوب 15 ميكرو لتر من المستخلص الخام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam (540 ميكروغرام بروتين/ملييلتر تركيز نهائي) لكل عزلة سريرية. يُجانس المزيج برج يدوي و يُتابع تطور الإمتصاص لوسط التفاعل في طول موجة 486 نانومتر ضد نفس المحلول المنظم الفوسفاتي.

التعبير عن النتائج: تُسجل السرعات الإبتدائية للنشاط الإماهي بعد كل متابعة و تُجسد بعد ذلك بيانيا العلاقة بين مقلوب هذه السرعات الإبتدائية ومقلوب تراكيز مادة التفاعل. تُحدّد أهم الوسائط الحركية (ثابت ميخائيلس والسرعة القصوى) بدءاً من المنحنيات المتحصل عليها و معادلاتها.

## II-7- دراسة حساسية المستخلصات الخام لمميهة الحلقة $\beta$ -lactam لمنبطاتها الكلاسيكية:

### II-7-1- التثبيط بالحمض clavulanique :

إلى سلسلة من 6 أنابيب يحوي كل واحد منها 10 ميكرو لتر من المستخلص الخام للإنزيم (360 مغ بروتين/ملل تركيز نهائي) من كل عزلة سريرية و 10 ميكرو لتر من محلول أم من الحمض clavulanique (2 مغ/مل)، نضيف حجم كاف لـ 1 ملل محلول منظم فوسفاتي (0.1 مولار، أس هيدروجيني 7.0، ألبومين مصل البقر 0.005 مغ/ملل). بعد المُجانسة اليدوية، تُضاف تراكيز نهائية متفاوتة من nitrocefine (3-25 ميكرومولار). يُجانس المزيج مرة ثانية برج يدوي و يتابع تطور الإمتصاص لوسط التفاعل في طول موجة 486 نانومتر ضد نفس المحلول المنظم الفوسفاتي.

التعبير عن النتائج: تُسجل السرعات الإبتدائية للنشاط الإماهي لكل حالة و تجسد بعد ذلك بيانيا العلاقة بين مقلوب هذه السرعات الإبتدائية ومقلوب تراكيز مادة التفاعل. تحدد الوسائط الحركية (ثابت ميخائيلس والسرعة القصوى) بدءاً من المنحنيات المتحصل عليها و معادلاتها.

## II-7-2- التثبيط بـ sulbactam:

إلى سلسلة من 6 أنابيب يحوي كل واحد منها 10 ميكرو لتر من المستخلص الخام للإنزيم (360 مغ بروتين/ملل تركيز نهائي) من كل عذلة سريرية و 10 ميكرو لتر من محلول أم sulbactam (2 مغ/مل)، نُضيف حجم كاف لـ 1 ملل محلول منظم فوسفاتي (0.1 مولار، أس هيدروجيني 7.0، ألبومين مصل البقر 0.005 مغ/ملل). بعد المجانسة اليدوية، يُضاف تراكيز نهائية متفاوتة من nitrocefine (3-25 ميكرومولار). يُجانس المزيج برج يدوي و يتابع تطور الإمتصاص لوسط التفاعل في طول موجة 486 نانومتر ضد نفس المحلول المنظم الفوسفاتي.

التعبير عن النتائج: تسجّل السرعات الإبتدائية للنشاط الإماهي لكل حالة و تجسد بعد ذلك بيانيا العلاقة بين مقلوب هذه السرعات الإبتدائية ومقلوب تراكيز مادة التفاعل. تحدد الوسائط الحركية (ثابت ميخائيليس والسرعة القصوى) بدءاً من المنحنيات المتحصل عليها و معادلاتها.

## II-7-3- التثبيط بـ tazobactam:

إلى سلسلة من 6 أنابيب يحوي كل واحد منها 10 ميكرو لتر من المستخلص الخام للإنزيم (36 مغ بروتين/ملل تركيز نهائي) من كل عذلة سريرية و 10 ميكرو لتر من محلول أم tazobactam (2 مغ/مل) نضيف حجم كاف لـ 1 ملل محلول منظم فوسفاتي (0.1 مولار، أس هيدروجيني 7.0، ألبومين مصل البقر 0.005 مغ/ملل). بعد المجانسة اليدوية، يُضاف تراكيز نهائية متفاوتة من nitrocefine (3-25 ميكرومولار). يُجانس المزيج برج يدوي و يتابع تطور الإمتصاص لوسط التفاعل في طول موجة 486 نانومتر ضد نفس المحلول المنظم الفوسفاتي.

التعبير عن النتائج: تسجّل السرعات الإبتدائية للنشاط الإماهي لكل حالة و تجسد بعد ذلك بيانيا العلاقة بين مقلوب هذه السرعات الإبتدائية ومقلوب تراكيز مادة التفاعل. تحدد الوسائط الحركية (ثابت ميخائيليس والسرعة القصوى) بدءاً من المنحنيات المتحصل عليها و معادلاتها.

## II-8- دراسة حساسية المستخلصات الخام لمميهة الحلقة $\beta$ -lactam للحمض

### (EDTA) Ethelene diamine tetraacetic:

إلى سلسلة من 6 أنابيب نضيف تراكيز نهائية متفاوتة من nitrocefine (3-25 ميكرومولار) ثم حجم من محلول منظم فوسفاتي (0.1 مولار، أس هيدروجيني 7.0، ألبومين مصل البقر 0.005 مغ/ملل) كاف لواحد ميليلتر. بعد المجانسة اليدوية نضيف لكل أنبوب 15 ميكرو لتر من المستخلص الخام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam لكل عذلة سريرية (540 ميكرو غرام بروتين/ميليلتر تركيز نهائي). نذكر أن هذا الحجم

من المستخلص الإنزيمي مستقطع من ناتج حضنه المسبق مع EDTA بتركيز نهائي قدره 5 ميليومولار لمدة 15 دقيقة. يُجانس مزيج كل أنبوب برج يدوي و يتابع تطور الإمتصاص لوسط التفاعل في طول موجة 486 نانومتر ضد نفس المحلول المنظم الفوسفاتي.

التعبير عن النتائج: تسجل السرعات الابتدائية للنشاط الإماهي لكل حالة و تجسد بعد ذلك بيانيا العلاقة بين مقلوب هذه السرعات الابتدائية ومقلوب تراكيز مادة التفاعل. تحدد الوسائط الحركية (ثابت ميخائيليس والسرعة القصوى) بدءا من المنحنيات المتحصل عليها و معادلاتها.

## II-9- دراسة حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام للمستخلصات الفينولية لبذور

***Nigella sativa* L.**

حاولنا أن نكشف عن قدرة المستخلص الفينولي منزوع وغير منزوع الدسم لـ *Nigella sativa* L على التأثير على النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam للعزلات السريرية المقاومة للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams وتم هذا بتحديد التركيز المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي الإنزيمي في مرحلة أولى ثم بحساسية الوسائط الحركية (السرعة القصوى و ثابت ميخائيليس) لهذه المستخلصات في مرحلة ثانية.

- تحديد التركيز المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي الإنزيمي:

إلى سلسلة من 5 أنابيب يحوي كل واحد منها 20 ميكرومولار من nitrocefine و تراكيز نهائية متفاوتة من عديدات الفينول (0.09، 0.18، 0.225، 0.361، 0.451 ميليومولار مكافئ الحمض gallique) أو الفلافونيدات (0.589، 1.179، 1.474، 2.358، 2.948 ميكرومولار مكافئ rutine) للمستخلص الفينولي منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa* L، أو تراكيز متفاوتة من عديدات الفينول (0.104، 0.21، 0.261، 0.419، 0.523 ميليومولار مكافئ الحمض gallique) أو الفلافونيدات (0.601، 1.202، 1.502، 2.404، 3.00 ميكرومولار مكافئ rutine) للمستخلص الفينولي غير منزوع الدسم، يضاف لكل أنبوب حجم كاف لـ 1ملل من المحلول المنظم فوسفاتي (0.1 مولار، أس هيدروجيني 7.0، ألبومين مصل البقر 0.005 مغ/مل). بعد المجانسة يدويا، يضاف لكل أنبوب 15 ميكرو لتر من المستخلص الإنزيمي الخام لكل عزلة سريرية، بعد الرج الثانية يُتابع تطور إمتصاص وسط التفاعل للأشعة المرئية بطول موجة 486 نانومتر و في درجة حرارة المخبر.

يُعبّر عن النتائج بتجسيد العلاقة بين النسب المئوية للتثبيط و القيم اللوغاريتمية العشرية السالبة للتراكيز المولارية لعديدات الفينول أو الفلافونويدات في المستخلص الفينولي؛ وبالإسقاط يحدد التركيز المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي الإنزيمي. بحكم عدم خطية منحنى هذه العلاقة يمكن التعبير عن نفس النتيجة برسم منحنى العلاقة بين Logit-Log و القيم اللوغاريتمية العشرية السالبة لتراكيز عديدةات الفينول أو الفلافونويدات في المستخلص الفينولي؛ وبالإسقاط أو بالتعويض في معادلة المنحنى يحدد التركيز المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي الإنزيمي.

- حساسية الوسائط الحركية للمستخلصات الفينولية لبذور *Nigella sativa* L.:

أ- المستخلص الفينولي غيرمنزوع الدسم:

إلى سلسلة من 5 أنابيب يحوي كل واحد منها تركيز نهائي من عديدةات الفينول (229.33 أو 603.89 أو 105.8 ميكرومولار مكافئ الحمض gallic) أو تركيز نهائي من الفلافونويدات (3.47 أو 1.31 أو 0.61 ميكرومولار مكافئ rutin)، نضيف لكل أنبوب 15 ميكرو لتر من مستخلص إنزيمي خام (540 مغ بروتين/مل تركيز نهائي) من العزلات السريرية لـ *E.coli* أو *K.pneumoniae* أو *Acinetobacter* ، على الترتيب (ترتيب تراكيز عديدةات الفينول أو الفلافونويدات المختبرة إلى ترتيب العزلات البكتيرية)، و حجم كاف لـ 1 ملل من المحلول المنظم فوسفاتي (0.1 مولار، أس هيدروجيني 7.0، ألبومين مصل البقر 0.005 مغ/مل). بعد الرج و الحضان لفترة قصيرة (في حدود دقيقة واحدة) نضيف تراكيز متفاوتة نهائية من nitrocefine (3، 5، 10، 15، 20 ميكرومولار) و يُتابع تطوّر إمتصاص وسط التفاعل على طول موجة 486 نانومتر و في درجة حرارة المخبر.

تُسجّل سرعة النشاط الإماهي و تجسّد على إثر ذلك بيانياً العلاقة بين مقلوب هذه السرعات الإبتدائية و مقلوب تراكيز مادة التفاعل لتحديد نوع التثبيط و ثوابته.

ب- المستخلص الفينولي منزوع الدسم:

إلى سلسلة من 5 أنابيب يحوي كل واحد منها تركيز نهائي من عديدةات الفينول (201 أو 166.3 أو 503.8) ميكرومولار مكافئ الحمض gallic) أو تركيز نهائي من الفلافونويدات (3.28 أو 1.08 أو 1.31 ميكرومولار مكافئ rutin)، نضيف لكل أنبوب 15 ميكرو لتر من مستخلص إنزيمي خام (540 مغ بروتين/مل تركيز نهائي) من العزلات السريرية لـ *E.coli* أو *K.pneumoniae* أو *Acinetobacter* ، على الترتيب (ترتيب تراكيز عديدةات الفينول أو الفلافونويدات المختبرة إلى ترتيب العزلات البكتيرية)، و حجم كاف لـ 1 ملل من المحلول المنظم فوسفاتي (0.1 مولار، أس هيدروجيني 7.0، ألبومين مصل البقر 0.005 مغ/مل). بعد الرج و الحضان لفترة قصيرة (في حدود دقيقة واحدة) نضيف تراكيز متفاوتة نهائية من nitrocefine (3، 5، 10، 15، 20

ميكرومولار) و يتابع تطور إمتصاص وسط التفاعل على طول موجة 486 نانومتر و في درجة حرارة المخبر.

تُسجّل سرعة النشاط الإماهي و تُجسّد على إثر ذلك بيانيا العلاقة بين مقلوب هذه السرعات الإبتدائية و مقلوب تراكيز مادة التفاعل لتحديد نوع التثبيط و ثوابته.

# النتائج

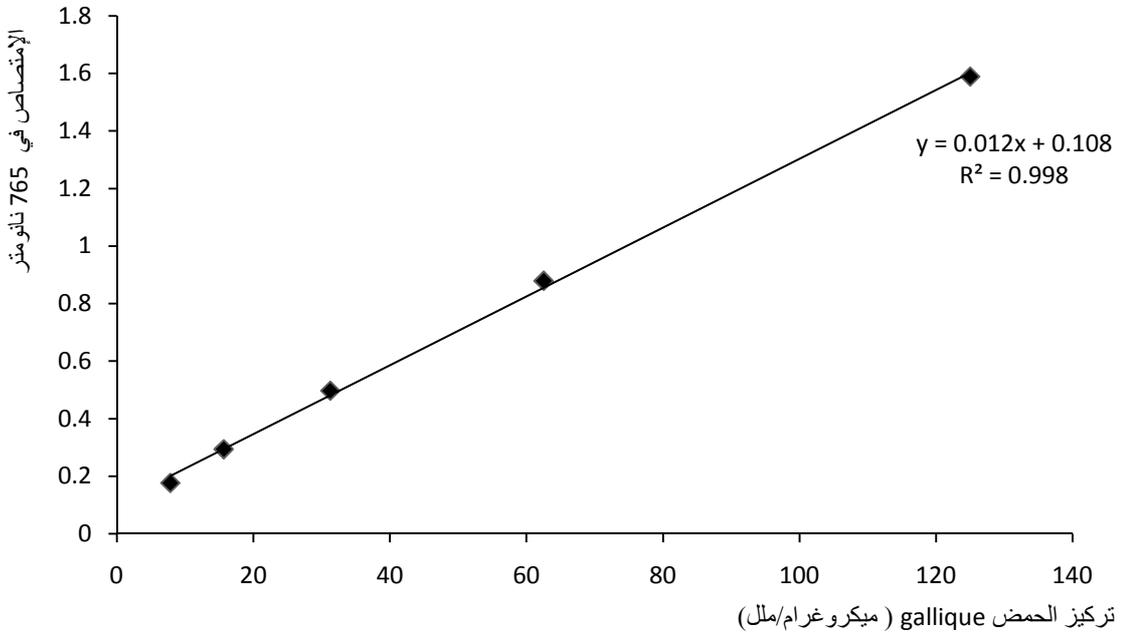
## I - الدراسة الكمية للمستخلصات الفينولية لبذور *Nigella sativa.l*:

### I-1- التقدير الكمي لعديدات الفينول:

بعد حضن تراكيز متفاوتة من الحمض gallique (7.81 - 125 ميكروغرام/مل) مع كاشف Folin ثم مع كربونات الصوديوم، كانت العلاقة بين إمتصاص وسط التفاعل للأشعة المرئية بطول موجة 765 نانومتر وتركيز الحمض gallique خطية كفاية ( $r^2 = 0.998$ ) لكن منحناها لا يمر بالمبدأ ( $b=0.108$ ) (الشكل 15).

بعد رج معلق من 25 غ من طحين بذور *Nigella sativa.l* مع خليط من الميثانول و الماء وبعد إقصاء الميثانول بالتقطير و الشوائب بالترشيح تحصلنا على مستحضر مائي بحجم قدره 25 مل تقريبا (مستخلص فينولي غير منزوع الدسم). وبعد تكرار نفس العملية لكن على نفس كمية الطحين سبقت معالجتها بإيثر البترول تحصلنا على مستحضر مائي بنفس الحجم تقريبا (مستخلص فينولي منزوع الدسم).

بعد حضن عينات من المستخلصين الفينوليين لبذور *Nigella sativa.l* مع نفس الكواشف وتعويض الإمتصاص في معادلة المنحنى ( $y = 0.012 x + 0.108$ ) كان تركيز عديدة الفينول في المستخلص الفينولي منزوع و غير منزوع الدسم للبذور في حدود 768 و 890.66 ميكروغرام مكافئ الحمض gallique/مل، على الترتيب؛ ومنه يكون مردود طريقة الإستخلاص المتبعة في حدود 0.768 مغ/غ و 0.89 مغ/غ ، على الترتيب.

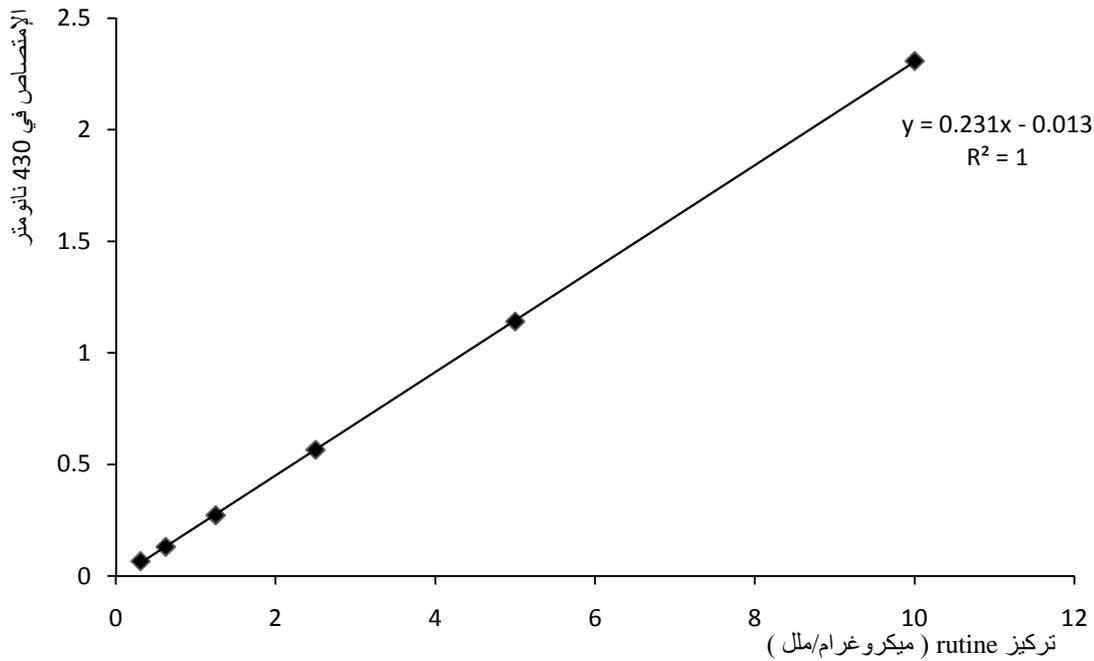


الشكل 15: منحنى تطور إمتصاص وسط التفاعل بدلالة تركيز الحمض gallique.

## I-2- التقدير الكمي للفلافونويدات للمستخلصات الفينولية لـ *Nigella sativa*:

بعد حضانة تراكيز متفاوتة من rutin (0.310- 10 ميكروغرام/مل) مع  $AlCl_3$ ، كانت العلاقة بين إمتصاص وسط التفاعل للأشعة المرئية بطول موجة 430 نانومتر وتركيز rutin عالية الخطية ( $r^2 = 1$ ) و منحناها يمر تقريبا بالمبدأ ( $b = 0.013$ ) (الشكل 16).

بعد حضانة عينات من المستخلصين الفينوليين لبذور *Nigella sativa* مع نفس الكاشف وتعويض الإمتصاص في معادلة المنحنى ( $y = 0.231x - 0.013$ ) كان تركيز الفلافونويدات في المستخلص الفينولي منزوع و غير منزوع الدسم للبذور في حدود 18.00 و 18.35 ميكروغرام مكافئ rutin/مل، على الترتيب؛ ومنه يكون مردود طريقة الإستخلاص المتبعة في حدود 0.018 مغ/غ و 0.01835 مغ/غ ، على الترتيب.



الشكل 16: منحنى تطور إمتصاص وسط التفاعل بدلالة تركيز rutin.

## II- الدراسة النوعية للمستخلصات الفينولية لبذور *Nigella sativa.l* بكروماتوغرافيا الطبقة

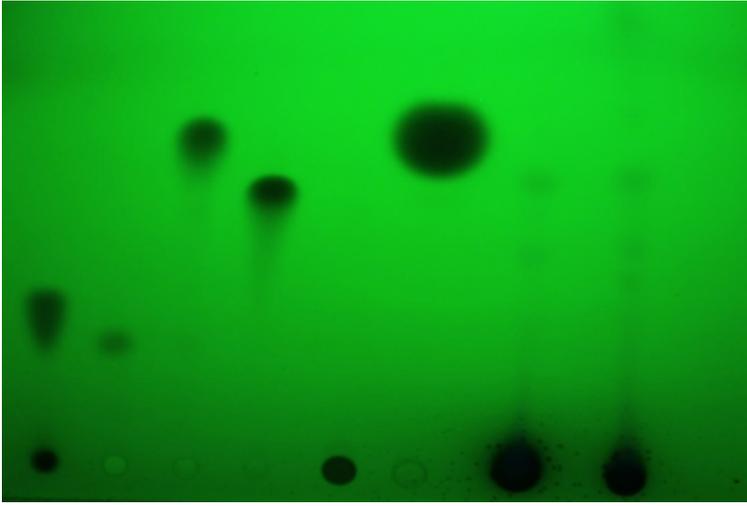
### الرقيقة:

على إثر تجزئة عينات من المستخلص الفينولي لبذور *Nigella sativa.l* منزوع و غير منزوع الدسم في وجود مواد شاهدة (الحمض gallique، catéchine، kaemphérol، quercétine، rutine و vanilline) على طبقة من هلام السيليس مستعملين مزيج من Chloroforme، Acétate d'éthyl، Acide formique (10/40/50 ح/ح/ح) كطور متحرك، ثم معاينة صفائح الفصل تحت الأشعة فوق البنفسجية بـ  $\lambda = 254$  نانومتر، لاحظنا أن عيّنتي المستخلص الفينولي منزوع و غير منزوع الدسم تتجزأ إلى 3 و 6 بقع، على التوالي (الشكل 17-أ). عند معالجة نفس الصفيحة ببخار اليود الجزيئي لاحظنا أن عدد البقع في المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم يصل إلى 6 بقع وفي حالة المستخلص الفينولي منزوع الدسم يصل إلى 4 بقع (الشكل 17-ب). عند معالجة نسخة من نفس الصفيحة بكاشف Vanilline sulfurique لاحظنا أن عدد البقع يرتفع إلى 8 بقع في المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم وإلى 5 بقع في المستخلص الفينولي منزوع الدسم (الشكل 18).

بعد حساب نسبة مسافة هجرة كل بقعة من المستخلصين و الشواهد المستعملة إلى مسافة هجرة الطور المتحرك على إثر المعالجات الثلاث (الجدول 4) و المقارنة فيما بينها، وجدنا أن المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم يحوي المركبات التالية: الحمض gallique، quercétine، rutine، kaemphérol و/أو vanilline ( $R_f = 0.60$ ). يحوي في حين المستخلص الفينولي منزوع الدسم المركبات التالية: الحمض gallique، quercétine و rutine. نشير إلى أنه لم نتمكن من تحديد طبيعة المواد المشكلة للبقع الأخرى بسبب قلة الشواهد المتوفرة.

جدول 4: لون و نسبة مسافة هجرة كل بقعة من المستخلصين و الشواهد المستعملة إلى مسافة هجرة الطور المتحرك (Rf) في وجود الكواشف الثلاث.

| الشواهد    |            |            |                |            |            | المستخلص الفينولي |  | الكاشف               |
|------------|------------|------------|----------------|------------|------------|-------------------|--|----------------------|
| vanilline  | kaemphérol | quercétine | الحمض gallique | catéchine  | rutine     | منزوع الدسم       | غير منزوع الدسم                            |                      |
|            |            |            |                |            |            | 0.45 ، 0.03       | 0.38 ، 0.03                                |                      |
| 0.60       | 0.60       | 0.51       | 0.27           | 0.24       | 0.03       | 0.51              | 0.51 ، 0.45<br>0.72 ، 0.60                 | 254 = λ              |
| أسود رمادي | أسود رمادي | أسود رمادي | أسود رمادي     | أسود رمادي | أسود رمادي | أسود رمادي        | أسود رمادي                                 | اللون                |
|            |            |            |                |            |            | 0.24 ، 0.03       | 0.05 ، 0.03                                | Vanilline sulfurique |
| 0.60       | 0.60       | 0.51       | 0.27           | 0.24       | 0.03       | 0.75 ، 0.27       | 0.27 ، 0.075<br>0.60 ، 0.51<br>0.75 ، 0.72 |                      |
| بني فاتح   | أصفر فاتح  | أصفر غامق  | أحمر فاتح      | أحمر غامق  | أصفر فاتح  | أزرق بنفسجي       | أزرق بنفسجي                                | اللون                |
|            |            |            |                |            |            | 0.05 ، 0.03       | 0.05 ، 0.03                                | يود جزيئي            |
| 0.60       | 0.60       | 0.51       | 0.27           | 0.24       | 0.03       | 0.72 ، 0.51       | 0.51 ، 0.075<br>0.75 ، 0.72                |                      |
| بني        | بني        | بني        | بني            | بني        | بني        | بني               | بني  | اللون                |



(أ)

8 7 6 5 4 3 2 1

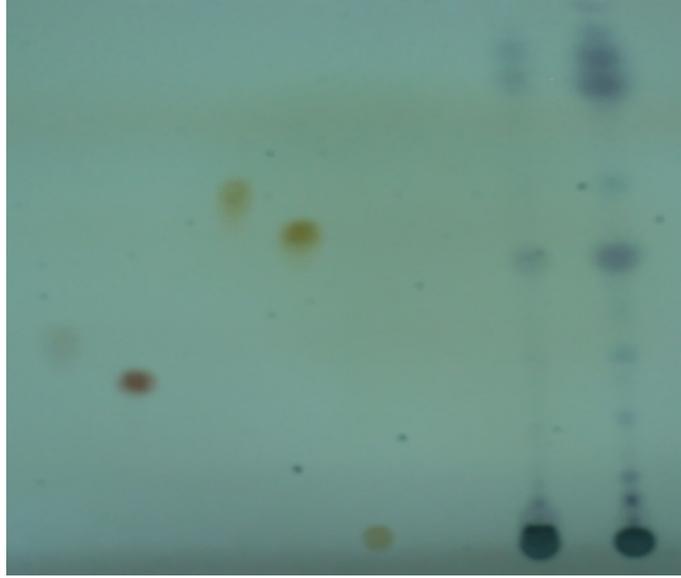


(ب)

8 7 6 5 4 3 2 1

1: مستخلص فينولي غير منزوع الدسم 2: مستخلص فينولي منزوع الدسم 3: vanilline 4: rutine  
5: quercétine 6: kaempférol 7: catéchine 8: الحمض gallique .

**الشكل 17:** التجزئة بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على هلام السيليس للمستخلص الفينولي منزوع وغير منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa.l* عند المشاهدة تحت مصدر للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 254 نانومتر (أ) وعند المعالجة ببخار اليود الجزئي (ب).



8 7 6 5 4 3 2 1

1: مستخلص فينولي غير منزوع الدسم 2: مستخلص فينولي منزوع الدسم 3: vanilline 4: rutine  
5: quercétine 6: kaempférol 7: catéchine 8: الحمض gallique .

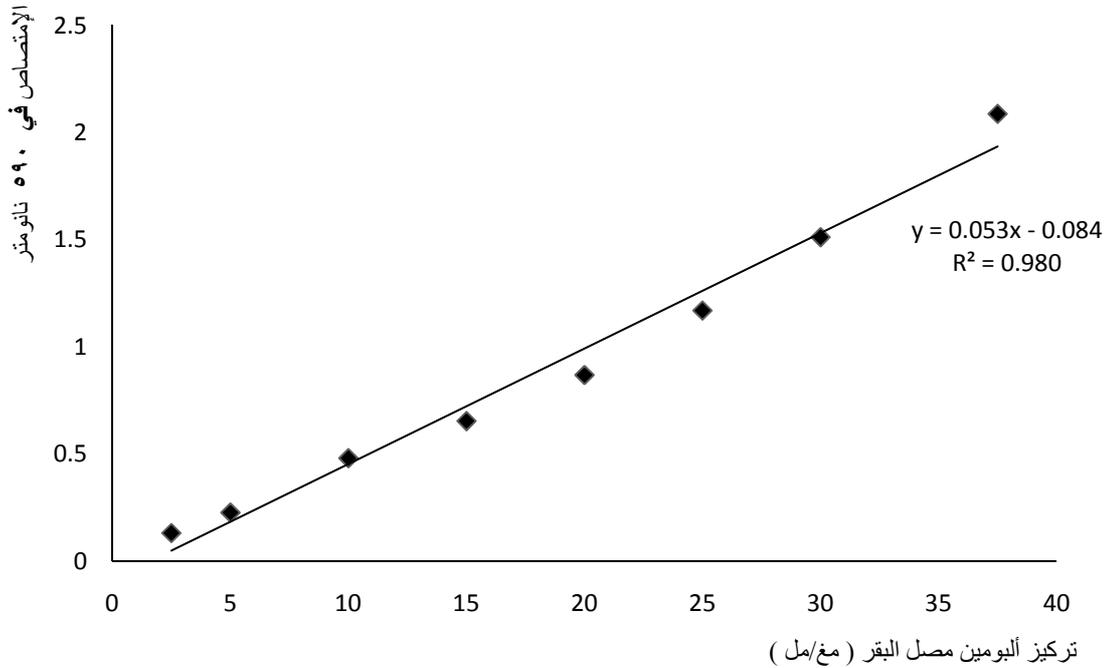
**الشكل 18:** التجزئة بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على هلام السيليس للمستخلص الفينولي منزوع  
وغير منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa*.l عند المعالجة بالكاشف الكيميائي Vanilline sulfurique .

### III- تحضير المستخلص الخام الإنزيمي لمميهة الحلقة $\beta$ -lactam و تقدير محتواه من البروتين:

تحصلنا على ثلاث مستخلصات إنزيمية خام من مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam، بدءاً من ثلاث عزلات سريرية لـ *E.coli* و *K.pneumoniae* و *Acinetobacter* المقاومة أصلاً للمضادات الحيوية من نوع  $\beta$ -lactam، على إثر 4 مراحل: (i) نبذ أول لمعلق بكتيري في وسط مغذي. (ii) مجانسة المعلق البكتيري بالموجات فوق الصوتية. (iii) نبذ ثاني لناتج المجانسة. (vi) تركيز ناتج النبذ الثاني بالحضن مع Polyethylène glycol ثم مَيزه.

تم بعد ذلك تقدير المحتوى البروتيني في كل مستخلص مستعملين طريقة تثبيت صبغة كوماسي الزرقاء. بعد حضن تراكيز متفاوتة من ألبومين مصل البقر (2.5 - 37.5 ميليغرام/مل) مع هذه الصبغة في وسط حامضي، كانت العلاقة بين إمتصاص وسط التفاعل للأشعة المرئية بطول موجة 590 نانومتر وتركيز ألبومين مصل البقر خطية كفاية ( $r^2 = 0.98$ ) لكن منحناها لا يمر بالمبدأ ( $b = -0.084$ ) (الشكل 19).

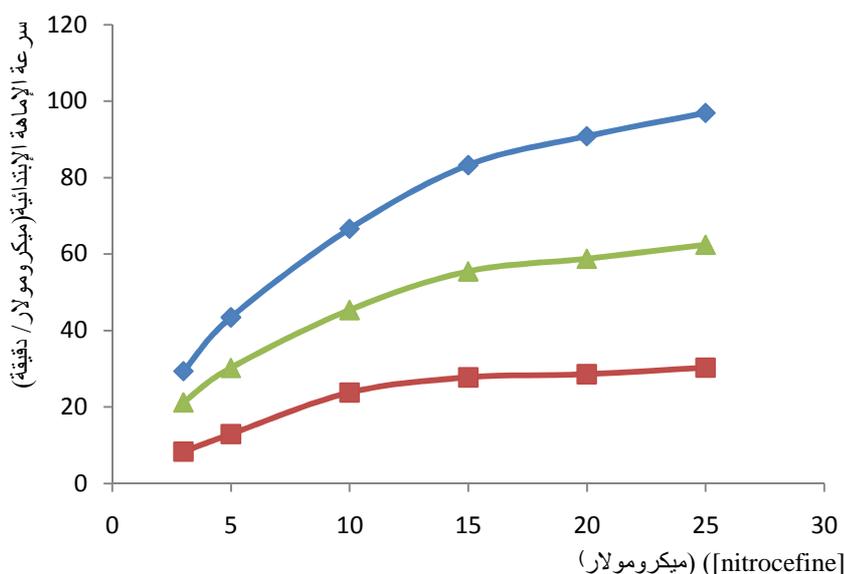
بعد حضن عيّنات من المستخلص الإنزيمي الخام لـ *E.coli* أو *K.pneumoniae* أو *Acinetobacter* في نفس الظروف وتعويض الإمتصاص في معادلة المنحنى ( $y = 0.053x - 0.084$ ) كان تركيز البروتينات في حدود 80.30 و 48.56 و 36.73 ميليغرام بروتين/ميليتر مستخلص إنزيمي خام، على الترتيب.



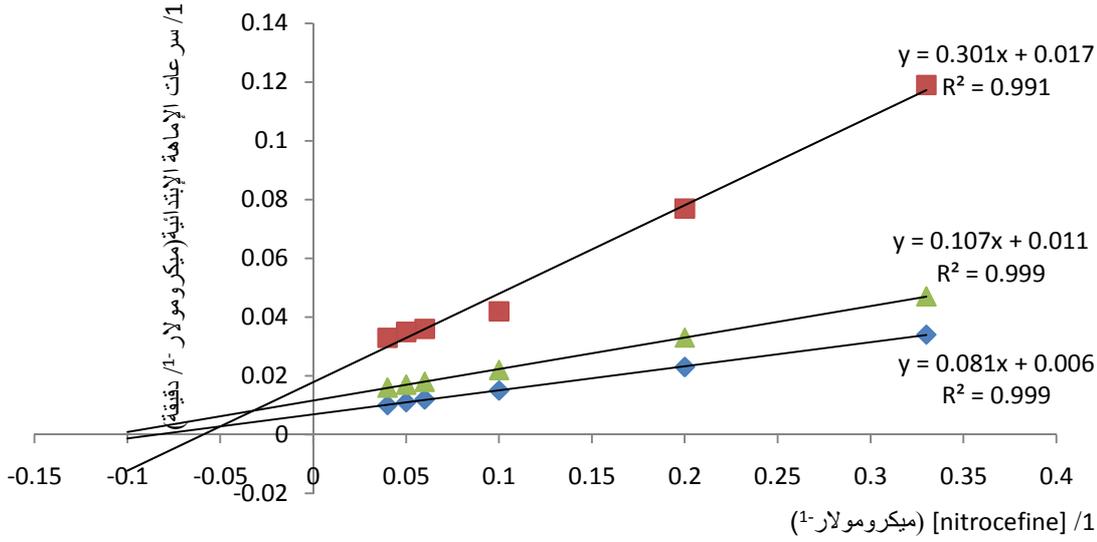
الشكل 19: منحنى تطور إمتصاص وسط التفاعل بدلالة تركيز ألبومين مصل البقر.

## VI - تحديد الوسائط الحركية للنشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام:

بعد متابعة تطور إمتصاص nitrocefine بتركيز نهائية متفاوتة (3-20 ميكرومولار) تحت تأثير 15 ميكرو لتر من كل مستخلص إنزيمي خام (540 مغ بروتين/مل تركيز نهائي) للأشعة المرئية بطول موجة 486 نانومتر (الشكل 20). اتضح على إثر التجسيد البياني للعلاقة مقلوب السرعة - مقلوب تركيز nitrocefine أن قيمة السرعة القصوى وقيمة ثابت ميخائيليس للنشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *E.coli* كانتا في حدود 308.64 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و13.51 ميكرومولار، على الترتيب؛ و في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *K.pneumonia* كانتا في حدود 108.93 ميكرومول/ مغ بروتين/دقيقة و 17.73 ميكرومولار، على الترتيب، وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *Acinetobacter* كانتا في حدود 168.35 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 9.42 ميكرومولار، على الترتيب (الشكل 21) (جدول 5).



**الشكل 20:** منحني العلاقة بين سرعات الإماهة الإبتدائية و تراكيز nitrocefine: (◆◆) المستخلص الخام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam للعزلة *E.coli*. (■■) المستخلص الخام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam للعزلة *K.pneumonia*. (▲▲) المستخلص الخام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam للعزلة *Acinetobacter*.



**الشكل 21:** منحنى العلاقة بين مقلوب سرعات الإماهة الابتدائية ومقلوب تراكيز nitrocefine: المستخلص الخام لمميهة  $\beta$ -lactam للحلقة للعزلة *E. coli* (■—■) المستخلص الخام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam للعزلة *K. pneumoniae* (▲—▲) المستخلص الخام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam لعزلة النوع *Acinetobacter* (◆—◆)

**جدول 5:** قيم السرعة القصوى (ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة) وثابت ميخائيليس (ميكرومولار) لكل مستخلص إنزيمي.

| الوسائط الحركية |               | مورد                 |
|-----------------|---------------|----------------------|
| ثابت ميخائيليس  | السرعة القصوى | المستخلص إنزيمي      |
| 9.42            | 168.35        | <i>Acinetobacter</i> |
| 13.51           | 308.64        | <i>E. coli</i>       |
| 17.73           | 108.93        | <i>K. pneumoniae</i> |

## V- حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام لمثبطاته الكلاسيكية (المستعملة في

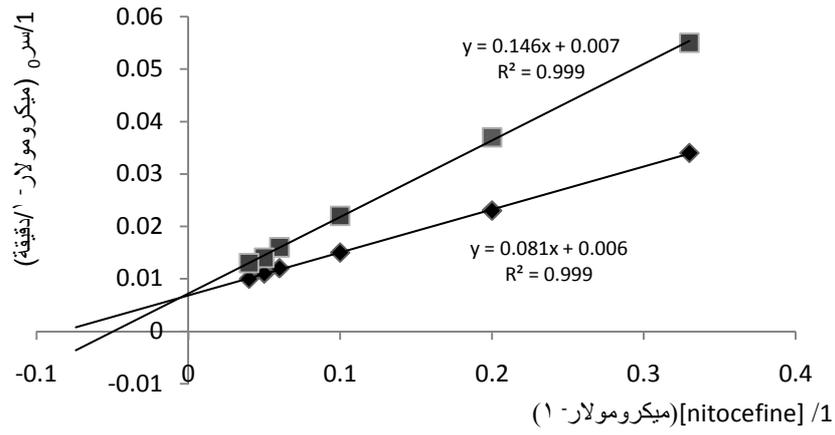
العلاج):

### • الحساسية لحمض clavulanic

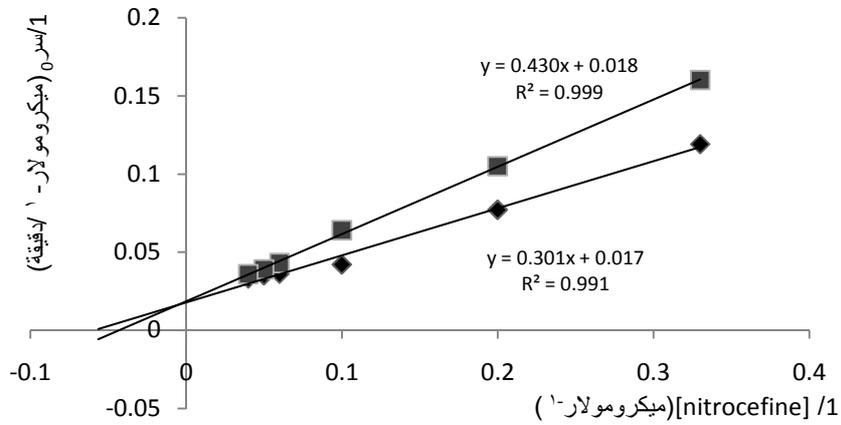
بعد إضافة تراكيز نهائية متفاوتة من nitrocefine (3-20 ميكرومولار) إلى ناتج حضان 10 ميكروولتر من كل مستخلص إنزيمي خام (360 مغ بروتين/مل تركيز نهائي) مع نفس الحجم من محلول أم من الحمض clavulanic (2 مغ/مل)، ومتابعة تطور إمتصاص المزيج (وسط التفاعل) للأشعة المرئية بطول موجة 486 نانومتر، اتضح أنّ قيمة السرعة القصوى وقيمة ثابت ميخائيليس للنشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *E.coli* كانتا في حدود 264.55 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 20.87 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *K.pneumonia* كانتا في حدود 102.88 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 23.92 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *Acinetobacter* كانتا في حدود 154.32 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 8.92 ميكرومولار، على الترتيب (الشكل 22) (الجدول 6).

### • الحساسية لـ sulbactam

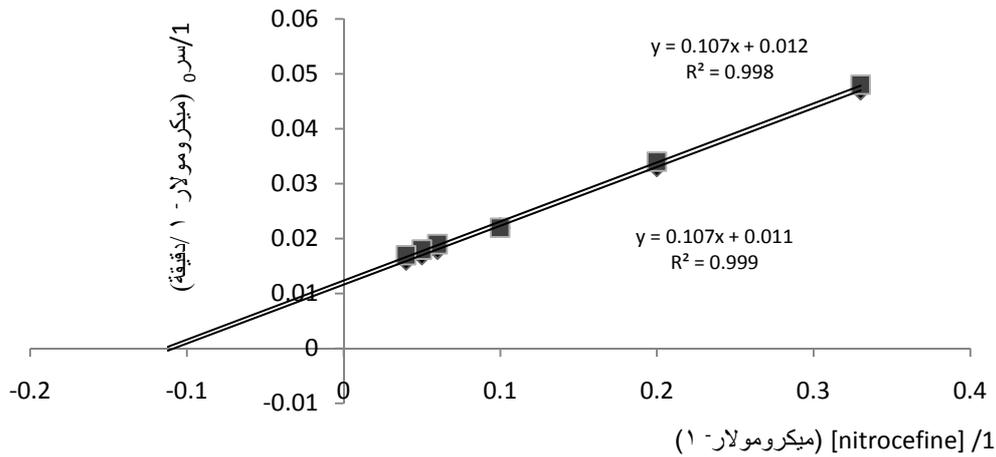
بعد إضافة تراكيز نهائية متفاوتة من nitrocefine (3-20 ميكرومولار) إلى ناتج حضان 10 ميكروولتر من كل مستخلص إنزيمي خام (360 مغ بروتين/مل تركيز نهائي) مع نفس الحجم من محلول أم من sulbactam (2 مغ/مل)، ومتابعة تطور إمتصاص وسط التفاعل للأشعة المرئية بطول موجة 486 نانومتر، اتضح أنّ قيمة السرعة القصوى وقيمة ثابت ميخائيليس للنشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *E.coli* كانتا في حدود 264.55 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 23.31 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *K.pneumonia* كانتا في حدود 102.88 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 27.17 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *Acinetobacter* كانتا في حدود 154.32 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 9.25 ميكرومولار، على الترتيب (الشكل 23) (أنظر الجدول 6).



(أ)



(ب)

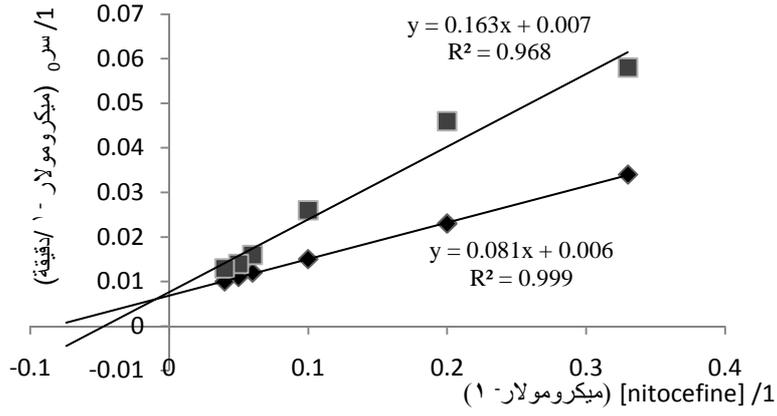


(ج)

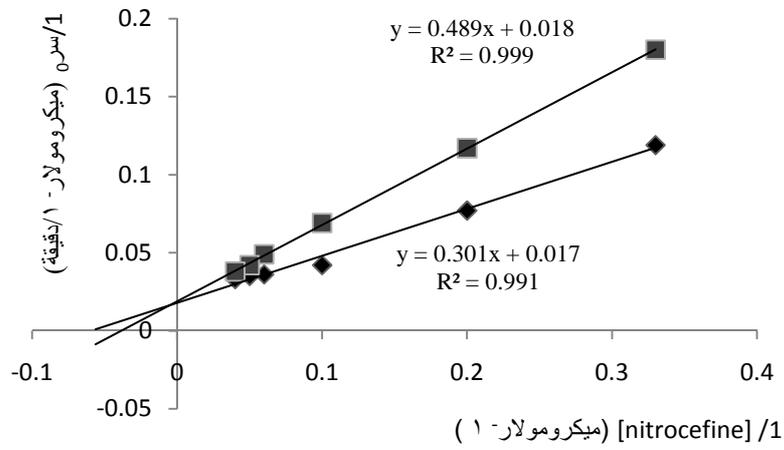
الشكل 22: منحنى العلاقة بين مقلوب سرعات الإماهة الابتدائية ومقلوب تراكيز nitrocefine في غياب (◆—◆) و وجود الحمض clavulanicque (■—■): (أ) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *E. coli*، (ب) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *K. pneumoniae*. (ج) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *Acinetobacter*.

**الجدول 6:** قيم السرعة القصوى (ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة) ، ثابت ميخائيليس (ميكرومولار) و ثابت التثبيط (مليمولار) للنشاط الإماهي لكل مستخلص إنزيمي في وجود وغياب المثبتات الكلاسيكية.

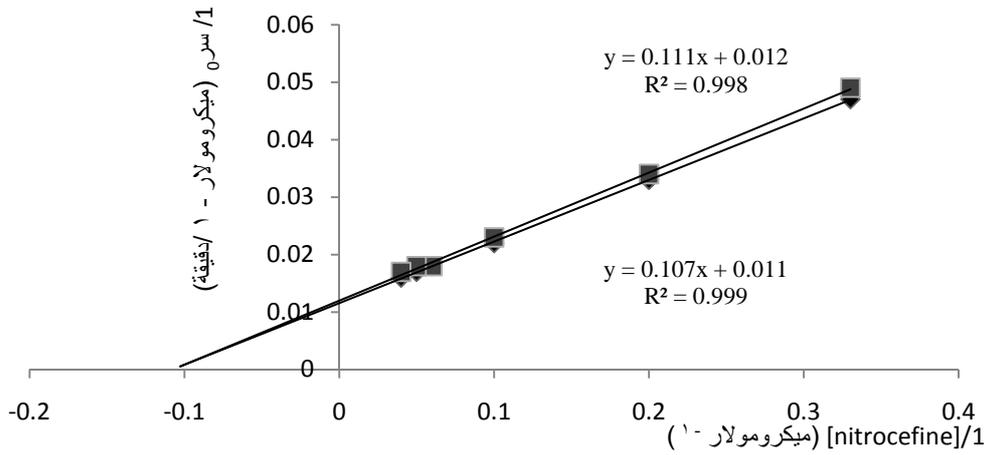
| في وجود:     |                |               |              |                |               |              |                |               | في غياب أي مثبط |               | مورد<br>المستخلص<br>الإنزيمي |
|--------------|----------------|---------------|--------------|----------------|---------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|---------------|------------------------------|
| Tazobactam   |                |               | Sulbactam    |                |               | Clavulanate  |                |               |                 |               |                              |
| ثابت التثبيط | ثابت ميخائيليس | السرعة القصوى | ثابت التثبيط | ثابت ميخائيليس | السرعة القصوى | ثابت التثبيط | ثابت ميخائيليس | السرعة القصوى | ثابت ميخائيليس  | السرعة القصوى |                              |
| 6.14         | 28.16          | 308.64        | 10.79        | 23.31          | 264.55        | 18.43        | 20.87          | 264.55        | 13.51           | 308.64        | <i>E.coli</i>                |
| 11.32        | 25             | 115.74        | 14.7         | 27.17          | 102.88        | 28.75        | 23.92          | 102.88        | 17.73           | 108.93        | <i>K.pneumonia</i>           |
| —            | 10.3           | 168.35        | —            | 9.25           | 154.32        | —            | 8.92           | 154.32        | 9.42            | 168.35        | <i>Acinetobacter</i>         |



(أ)



(ب)



(ج)

الشكل 23: منحني العلاقة بين مقلوب سرعات الإماهة الابتدائية ومقلوب تراكيز nitrocefine في غياب (◆◆) و وجود sulbactam (■—■): (أ) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E. coli*، (ب) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *K. pneumoniae*. (ج) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *Acinetobacter*.

## • الحساسية لـ tazobactam:

بعد إضافة تراكيز نهائية متفاوتة من nitrocefine (3-20 ميكرومولار) إلى ناتج حضانة 10 ميكروولتر من كل مستخلص إنزيمي خام (360 مغ بروتين/مل تركيز نهائي) مع نفس الحجم من محلول أم من tazobactam (2 مغ/مل)، ومتابعة تطور إمتصاص وسط التفاعل للأشعة المرئية بطول موجة 486 نانومتر، اتضح أنّ قيمة السرعة القصوى وقيمة ثابت ميخائيليس للنشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *E.coli* كانتا في حدود 308.64 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و28.10 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *K.pneumonia* كانتا في حدود 115.74 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و25 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *Acinetobacter* كانتا في حدود 168.35 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و10.37 ميكرومولار، على الترتيب (الشكل 24) (أنظر الجدول 6).

## • مقارنة نتائج تأثير المثبطات الكلاسيكية:

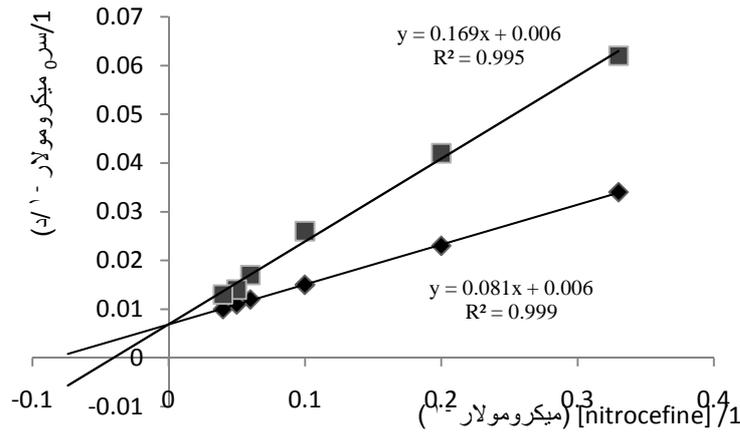
من خلال مقارنة هذه النتائج بمثيلاتها في غياب أي مثبط من هذه المثبطات الكلاسيكية (أنظر الجدول 6) يبدو أن قيم ثابت ميخائيليس للمستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *E.coli* و للعزلة *K.pneumonia* تتأثر أكثر من تأثر قيم سرعاتها القصوى التي تبقى متقاربة نوعا ما. في الحقيقة، تزداد قيمة ثابت ميخائيليس بالنسبة للعزلة *E.coli* في وجود الحمض clavulanic إذ تمر من 13.51 ميكرومولار إلى 20.87 ميكرومولار وهذا ما يدل على أن هذا المركب يثبط النشاط الإماهي لهذه العزلة تثبيطا تنافسيا بثابت تثبيط قدره 18.43 ميليمولار؛ وفي وجود sulbactam تمر قيمة هذا الثابت من 13.51 ميكرومولار إلى 23.31 ميكرومولار مما يدل على أن هذا المركب يثبط النشاط الإماهي لهذه العزلة تثبيطا تنافسيا بثابت تثبيط قدره 10.79 ميليمولار؛ وفي وجود tazobactam تمر قيمة هذا الثابت من 13.51 ميكرومولار إلى 28.16 ميكرومولار مما يدل على أن هذا المركب يثبط النشاط الإماهي لهذه العزلة تثبيطا تنافسيا بثابت تثبيط قدره 6.14 ميليمولار (أنظر الجدول 6). أما بالنسبة للعزلة *K.pneumonia* تزداد قيمة ثابت ميخائيليس في وجود الحمض clavulanic إذ تمر من 17.73 ميكرومولار إلى 23.92 ميكرومولار وهذا ما يدل على أن هذا المركب يثبط النشاط الإماهي لهذه العزلة تثبيطا تنافسيا بثابت تثبيط قدره 28.75 ميليمولار؛ وفي وجود sulbactam تمر قيمة هذا الثابت من 17.73 ميكرومولار إلى 27.17 ميكرومولار مما يدل على أن هذا المركب يثبط النشاط الإماهي لهذه العزلة تثبيطا تنافسيا بثابت تثبيط قدره 14.70 ميليمولار؛ وفي وجود tazobactam تمر قيمة هذا الثابت من 17.73 ميكرومولار إلى 28.16 ميكرومولار مما يدل على أن هذا المركب يثبط النشاط لهذه العزلة تثبيطا تنافسيا بثابت تثبيط قدره 11.32 ميليمولار (أنظر الجدول 6).

خلافًا للمستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E.coli* و للعدلة *K.pneumonia*، لا تتأثرا قيم السرعة القصوى وثابت ميخائيليس للمستخلص الإنزيمي للعدلة *Acinetobacter* تأثرا محسوسا بوجود هذه المثبطات الكلاسيكية الثلاث.

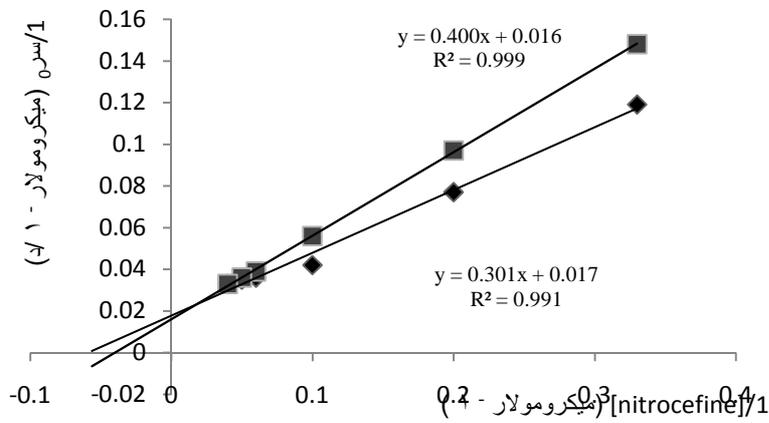
#### IV- حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام للـ EDTA:

بعد حضن 15 ميكرو لتر من مستخلص إنزيمي خام (540 مغ بروتين/مل تركيز نهائي) مع EDTA بتركيز نهائي 5 ميلي مولار لمدة 15 دقيقة وإضافته إلى تراكيز نهائية متفاوتة من nitrocefine (3-30 ميكرو مولار)، ومتابعة تطور إمتصاص وسط التفاعل للأشعة المرئية بطول موجة 486 نانومتر، اتضح أنّ قيمة السرعة القصوى وقيمة ثابت ميخائيليس للنشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E.coli* هي في حدود 308.64 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و14.18 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *K.pneumonia* فهي في حدود 97.46 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و16.52 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *Acinetobacter* فهي في حدود 185.18 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و21.27 ميكرومولار، على الترتيب (الشكل 25) (الجدول 7).

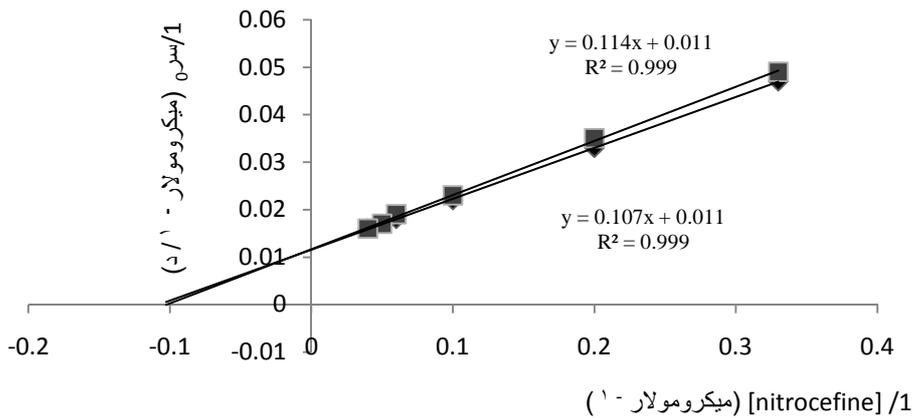
من خلال مقارنة هذه النتائج بمثيلاتها في غياب EDTA يبدو أن قيم السرعة القصوى وقيم ثابت ميخائيليس للمستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E.coli* و للعدلة *K.pneumonia* لا تتأثر كثيرا إذ تبقى متقاربة نوعا ما. خلافًا للمستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E.coli* و للعدلة *K.pneumonia*، تأثر قيمة ثابت ميخائيليس للمستخلص الإنزيمي للعدلة *Acinetobacter* تأثرا محسوسا أكثر من تأثر قيمة سرعته القصوى. في الحقيقة، تمر قيمة هذا الثابت من 9.42 ميكرومولار إلى 21.27 ميكرومولار وهذا ما يدل على أن هذا المركب يثبط النشاط الإماهي لهذه العزلة تثبيطا تنافسيا بثابت تثبيط قدره 3.97 ميلي مولار (أنظر الجدول 7).



(أ)

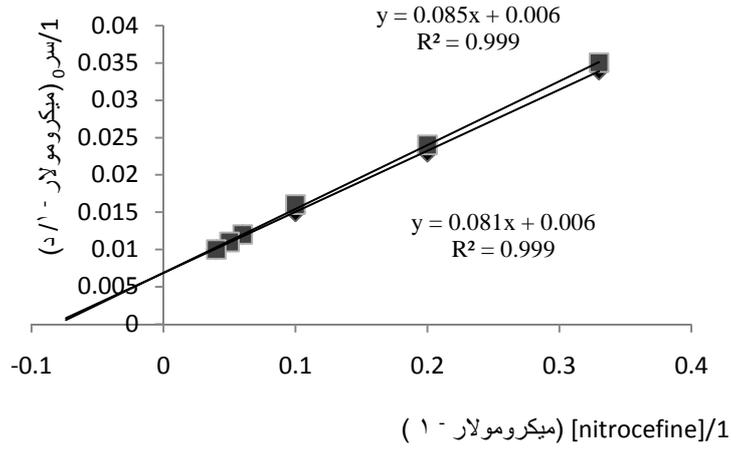


(ب)

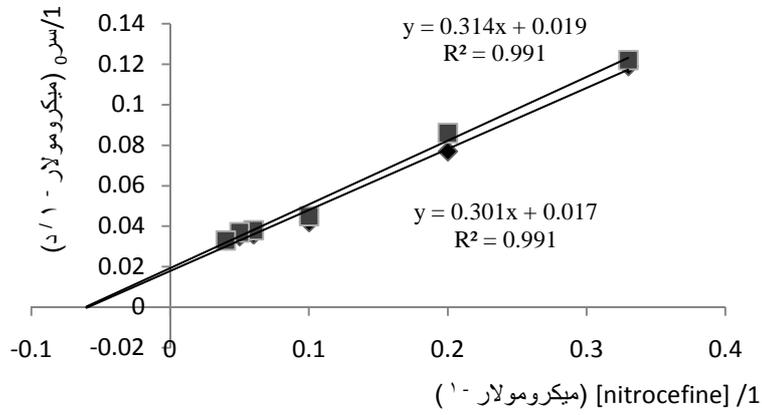


(ج)

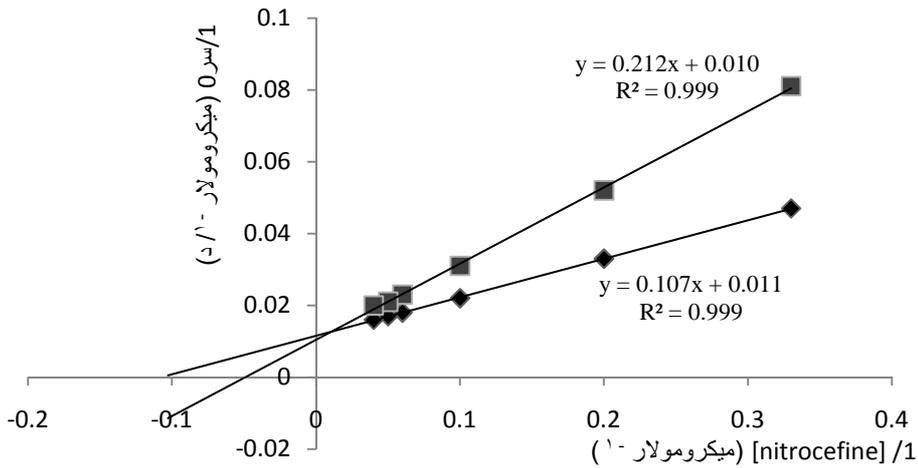
**الشكل 24:** منحنى العلاقة بين مقلوب سرعات الإماهة الابتدائية ومقلوب تراكيز nitrocefine في غياب (◆—◆) و وجود tazobactam (■—■): (أ) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *E. coli*، (ب) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *K. pneumoniae*. (ج) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *Acinetobacter*.



(أ)



(ب)



(ج)

**الشكل 25:** منحنى العلاقة بين مقلوب سرعات الإماهة الابتدائية ومقلوب تراكيز nitrocefine في غياب (◆◆) و وجود EDTA (■) بتركيز نهائي 5 ميليمولار: (أ) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E. coli*، (ب) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *K. pneumoniae*. (ج) في حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *Acinetobacter*.

**الجدول 7:** قيم السرعة القصوى (ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة) وثابت ميخائيليس (ميكرومولار) و ثابت التثبيط (مليمولار) لكل مستخلص إنزيمي في غياب و وجود EDTA .

| المستخلص الإنزيمي    | غياب EDTA     |                | وجود EDTA     |                | مورد |
|----------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|------|
|                      | السرعة القصوى | ثابت ميخائيليس | السرعة القصوى | ثابت ميخائيليس |      |
| <i>E.coli</i>        | 308.64        | 13.51          | 308.64        | 14.18          | —    |
| <i>K.pneumonia</i>   | 108.93        | 17.73          | 97.46         | 16.52          | —    |
| <i>Acinetobacter</i> | 168.35        | 9.42           | 185.18        | 21.27          | 3.97 |

#### IIV – حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام للمستخلصات الفينولية لبذور

##### *Nigella sativa.l*:

في محاولة للكشف عن قدرة المستخلص الفينولي منزوع وغير منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa.l* على التأثير على النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعزلات السريرية لـ *E.coli* و *K.pneumoniae* و *Acinetobacter* المقاومة للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactam، تم تحديد في مرحلة أولى تركيز عديدات الفينول أو الفلافونويدات المثبطة لـ 50% من النشاط الإماهي الإنزيمي و في مرحلة ثانية الكشف عن حساسية الوسائط الحركية (السرعة القصوى و ثابت ميخائيليس) لهذا النشاط الإماهي في وجود المستخلصات الفينولية.

##### - تحديد التركيز المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي الإنزيمي:

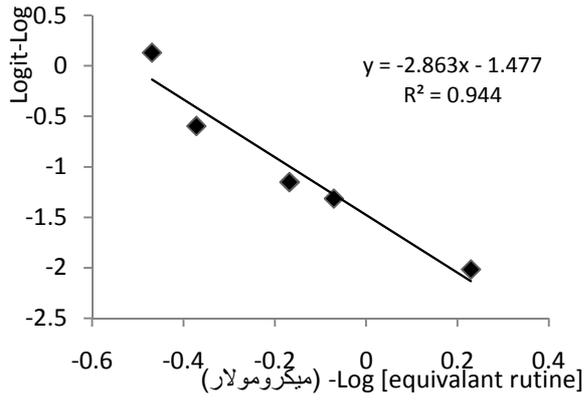
بعد إضافة تراكيز نهائية متفاوتة من عديدات الفينول أو الفلافونويدات للمستخلص الفينولي منزوع أو غير منزوع الدسم إلى 20 ميكرومولار من nitrocefine إلى 15 ميكرومولار من كل مستخلص إنزيمي خام (540 مغ بروتين/مل تركيز نهائي)، تابعنا تطور إمتصاص وسط التفاعل على نفس طول الموجة و في درجة حرارة المخبر.

#### أ- المستخلص الفينولي منزوع الدسم:

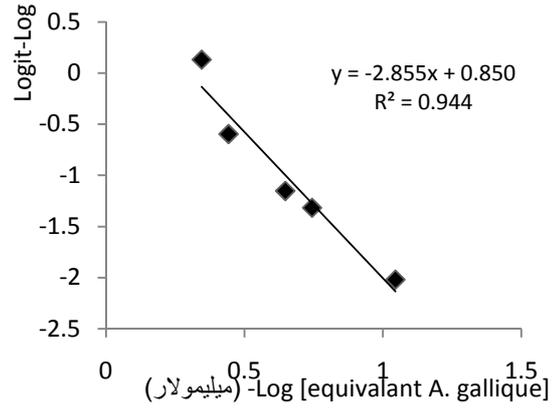
من منحنى العلاقة بين Logit-Log و القيم اللوغاريتمية العشرية السالبة للتراكيز المولارية لعديدات الفينول أو للفلافونويدات للمستخلص الفينولي ومن معادلته (الشكل 26)، اتضح أن قيمة تركيز عديدات الفينول وقيمة تركيز الفلافونويدات المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E.coli* كانتا في حدود 503.8 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique و 3.28 ميكرومولار مكافئ rutin، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *K.pneumonia* كانتا في حدود 166.3 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique و 1.08 ميكرومولار مكافئ rutin، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *Acinetobacter* كانتا في حدود 201 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique و 1.31 ميكرومولار مكافئ rutin، على الترتيب (الجدول 8).

#### ب- المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم:

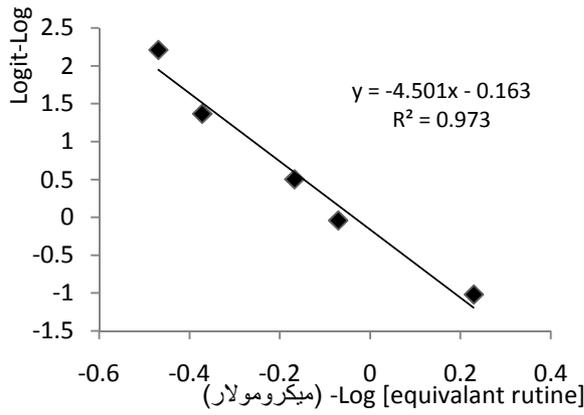
حسب نفس منحنى العلاقة المذكورة أعلاه ومعادلته (الشكل 27) اتضح أن قيمة تركيز عديدات الفينول وقيمة تركيز الفلافونويدات المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E.coli* كانتا في حدود 603.89 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique و 3.47 ميكرومولار مكافئ rutin، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *K.pneumonia* كانتا في حدود 229.33 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique و 1.31 ميكرومولار مكافئ rutin، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *Acinetobacter* كانتا في حدود 105.8 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique و 0.61 ميكرومولار مكافئ rutin، على الترتيب (أنظر الجدول 8).



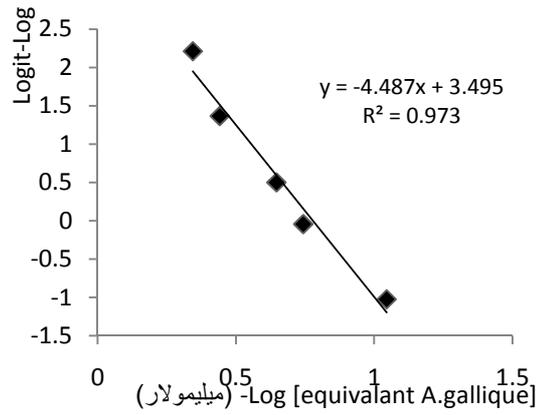
(2-أ)



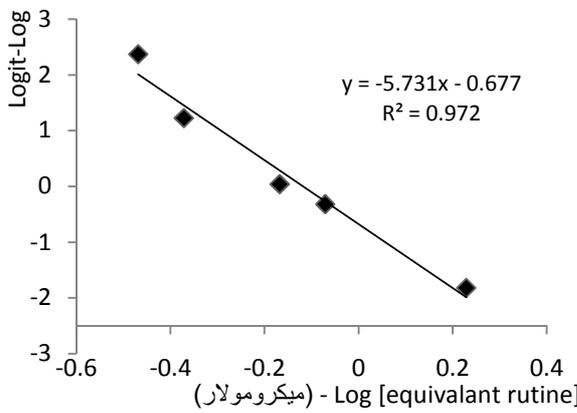
(1-أ)



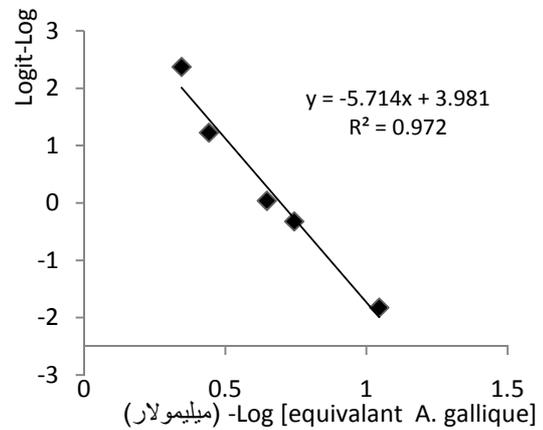
(2-ب)



(1-ب)



(2-ج)

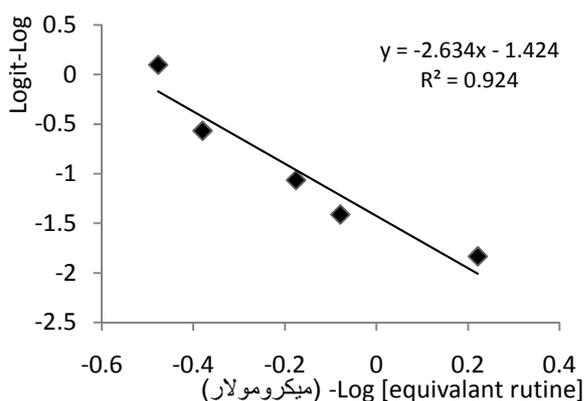


(1-ج)

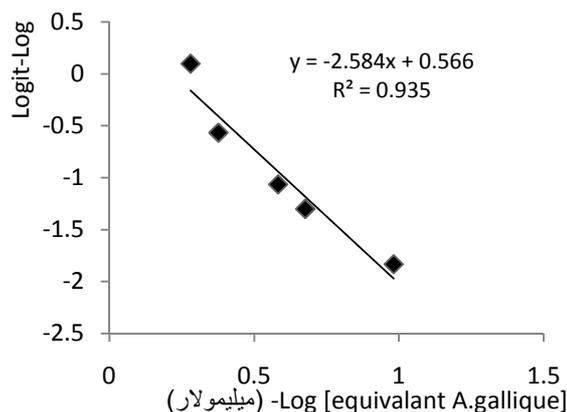
**الشكل 26:** منحني العلاقة بين Logit-Log (نسبة الوغاريتم الطبيعي للنسب المئوية للتنشيط إلى ناتج طرح هذه الأخيرة من 100) و القيم اللوغاريتمية العشرية السالبة للتركيز المولارية لعديدات الفينول (أ-1؛ ب-1؛ ج-1) أو الفلافونويدات (أ-2؛ ب-2؛ ج-2) المحتواة في المستخلص الفينولي منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa*. في إختبارات تحديد التركيز المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام: (أ) للعزلة *E. coli*، (ب) للعزلة *K. pneumonia*، (ج) للعزلة *Acinetobacter*.

**الجدول 8:** قيم تركيز عديدات الفينول (ميكرومولار مكافئ الحمض gallique) و الفلافونويدات (ميكرومولار مكافئ rutine) المحتواة في المستخلصات الفينولية لبذور *Nigella sativa.l* المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام:

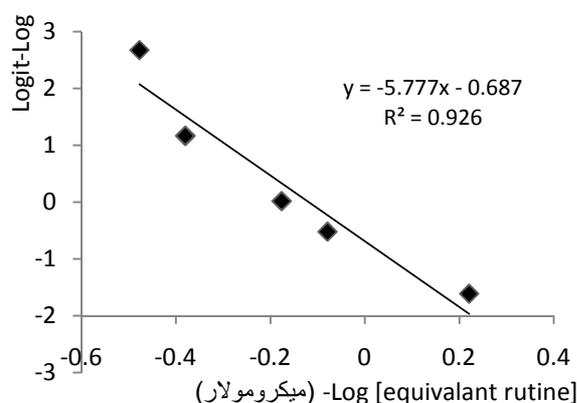
| المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم |                | المستخلص الفينولي منزوع الدسم |                | مورد                 |
|-----------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|----------------------|
|                                   |                |                               |                | المستخلص             |
| الفلافونويدات                     | عديدات الفينول | الفلافونويدات                 | عديدات الفينول | الإنزيمي             |
| 3.47                              | 603.89         | 3.28                          | 503.8          | <i>E.coli</i>        |
| 1.31                              | 299.33         | 1.08                          | 166.3          | <i>K.pneumonia</i>   |
| 0.61                              | 105.8          | 1.31                          | 201            | <i>Acinetobacter</i> |



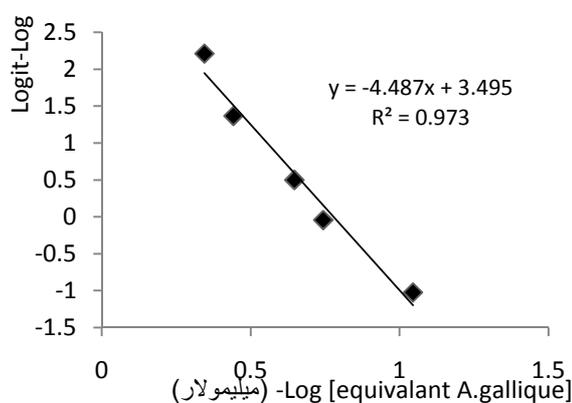
(2-أ)



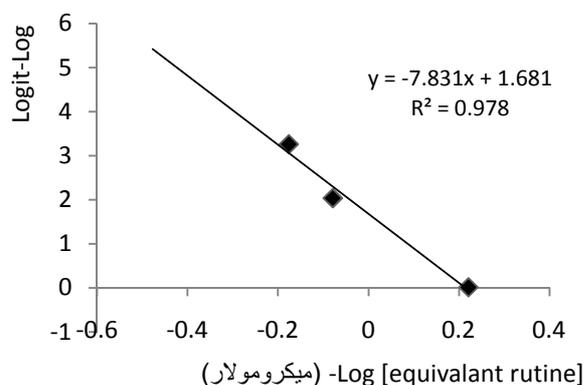
(1-أ)



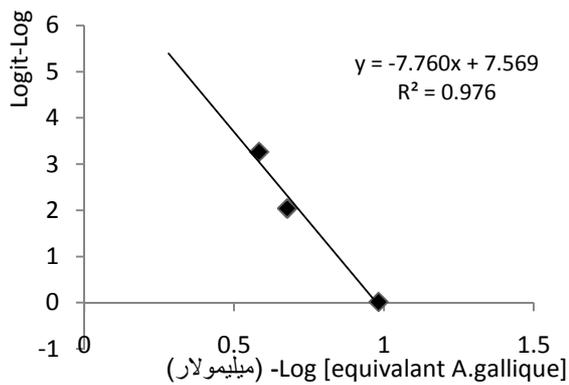
(2-ب)



(1-ب)



(2-ج)



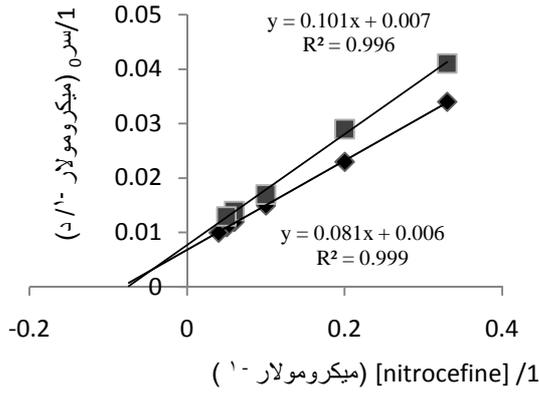
(1-ج)

**الشكل 27:** : منحنى العلاقة بين Logit-Log (نسبة الوغار يتم الطبيعي للنسب المئوية للتنشيط إلى ناتج طرح هذه الأخيرة من 100) و القيم اللوغاريتمية العشرية السالبة للتركيز المولارية لعديدات الفينول (أ-1؛ ب-1؛ ج-1) أو الفلافونويدات (أ-2؛ ب-2؛ ج-2) المحتواة في المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa* في إختبارات تحديد التركيز المثبط لـ 50% من النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام: (أ) للعزلة *E.coli*، (ب) للعزلة *K.pneumonia*، (ج) للعزلة *Acinetobacter*.

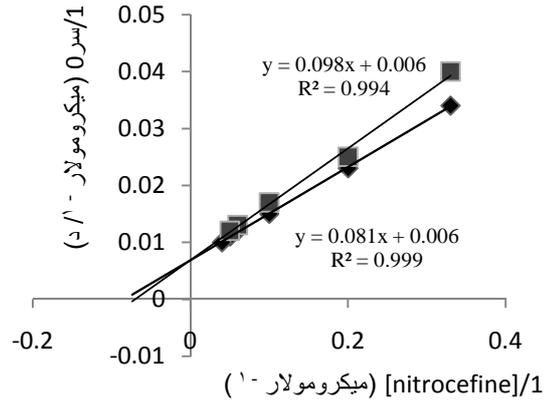
## - حساسية الوسائط الحركية للنشاط الإماهي الإنزيمي:

بعد حضن 15 ميكرو لتر من كل مستخلص إنزيمي خام مع تراكيز معينة من المستخلص الفينولي منزوع أو غير منزوع الدسم لـ *Nigella sativa*، و إضافة تراكيز متفاوتة نهائية من nitrocefine، ثم متابعة تطور إمتصاص وسط التفاعل للأشعة المرئية على نفس طول الموجة و في درجة حرارة المخبر، اتضح أنه في حالة المستخلص الفينولي منزوع الدسم، كانت قيمة السرعة القصوى وقيمة ثابت ميخائيليس للنشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E.coli* في حدود 264.55 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 14.43 ميكرومولار على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *K.pneumonia* كانتا في حدود 80.5 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 19.37 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *Acinetobacter* كانتا في حدود 168.35 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 26.10 ميكرومولار، على الترتيب. أما في حالة المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم، كانت قيمة السرعة القصوى وقيمة ثابت ميخائيليس للنشاط الإماهي للمستخلص لإنزيمي الخام للعدلة *E.coli* في حدود 308.64 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 16.33 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *K.pneumonia* كانتا في حدود 97.46 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 18.90 ميكرومولار، على الترتيب؛ وفي حالة المستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *Acinetobacter* كانتا في حدود 142.45 ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة و 24.57 ميكرومولار، على الترتيب (الشكل 28) (الجدول 9).

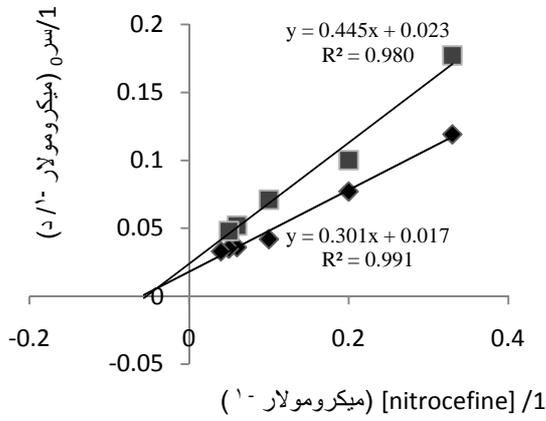
من خلال مقارنة هذه النتائج بمثيلاتها في غياب المستخلص الفينولي منزوع أو غير منزوع الدسم (أنظر الجدول 9)، يبدو أن قيمة السرعة القصوى و ثابت ميخائيليس للمستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *E.coli* و للعدلة *K.pneumonia* لا تتأثران كثيرا بوجود هذين المستخلصين. خلافا لهذا، تتأثر قيمة ثابت ميخائيليس تأثرا كبيرا للمستخلص الإنزيمي للعدلة *Acinetobacter* دون تأثر سرعته القصوى. في الواقع، تزداد قيمة هذا الثابت إذ تمر من القيمة 9.42 ميكرومولار إلى القيمة 24.5 ميكرومولار (مستخلص فينولي غير منزوع الدسم) وإلى 26.10 ميكرومولار (مستخلص فينولي منزوع الدسم). ولهذا يمكن القول بأن المستخلصين الفينوليين لا يثبطان النشاط الإماهي للمستخلصين الإنزيمين الخامين للعدلة *E.coli* و للعدلة *K.pneumonia*، في حين يثبطان النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعدلة *Acinetobacter*. وبحكم ارتفاع قيمة ثابت ميخائيليس فإن المستخلص الفينولي منزوع الدسم يبدي أثرا تثبيطيا من النوع التنافسي وبتأثير تثبيط قدره 113.51 ميكرومولار مكافئ الحمض *gallique* (تركيز عديدات الفينول) أو 0.74 ميكرومولار مكافئ *rutine* (تركيز الفلافونويدات)؛ أما المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم فإنه أيضا يبدي نفس الأثر التثبيطي لكن بتأثير تثبيط قدره 66.08 ميكرومولار مكافئ الحمض *gallique* (تركيز عديدات الفينول) أو 0.38 ميكرومولار مكافئ *rutine* (تركيز الفلافونويدات) (الجدول 10).



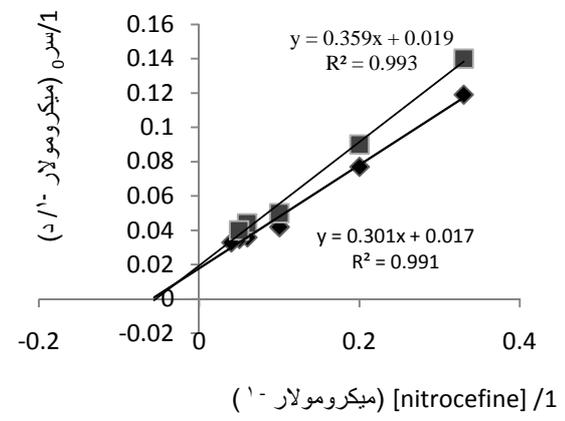
(2-أ)



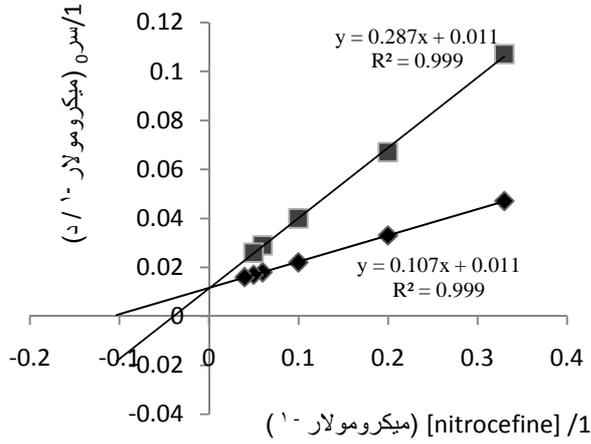
(1-أ)



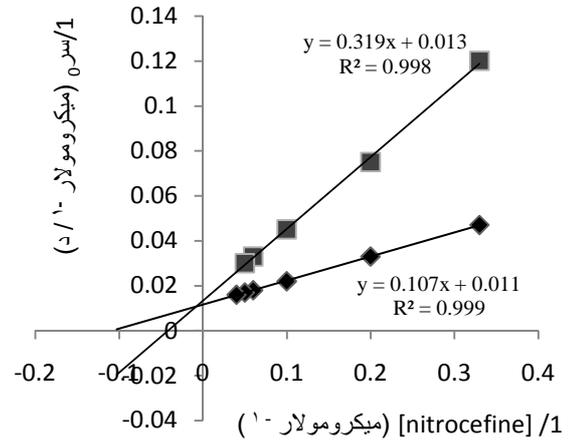
(2-ب)



(1-ب)



(2-ج)



(1-ج)

**الشكل 28:** منحنى العلاقة بين مقلوب سرعات الإماهة الابتدائية ومقلوب تراكيز nitrocefine في حالة المستخلص الإنزيمي الخام (أ) للعزلة *E.coli*، (ب) للعزلة *K.pneumonia*، (ج) للعزلة *Acinetobacter* في غياب (◆◆) أو في وجود (■■) المستخلص الفينولي منزوع الدسم (أ-1؛ ب-1؛ ج-1) أو في وجود (■■) المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم (أ-2؛ ب-2؛ ج-2) لبذور *Nigella sativa.l*.

**الجدول 9:** قيمة السرعة القصوى (ميكرومول/مغ بروتين/دقيقة) وقيمة ثابت ميخائيليس (ميكرومولار) لكل مستخلص إنزيمي في غياب و في وجود المستخلص الفينولي منزوع أو غير منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa.l*.

| في وجود:                    |               | في غياب أي مستخلص             |               |                |               | مورد<br>الدسم         |
|-----------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|----------------|---------------|-----------------------|
| المستخلص الفينولي غير منزوع |               | المستخلص الفينولي منزوع الدسم |               |                |               | المستخلص              |
| ثابت                        | السرعة القصوى | ثابت ميخائيليس                | السرعة القصوى | ثابت ميخائيليس | السرعة القصوى | الإنزيمي<br>ميخائيليس |
| 16.33                       | 308.64        | 14.43                         | 264.55        | 13.51          | 308.64        | <i>E.coli</i>         |
| 18.90                       | 97.46         | 19.37                         | 80.5          | 17.73          | 108.93        | <i>K.pneumonia</i>    |
| 24.5                        | 142.45        | 26.10                         | 168.35        | 9.42           | 168.35        | <i>Acinetobacter</i>  |

**الجدول 10:** قيمة ثابت التثبيط (ميكرومولار) للنشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *Acinetobacter*.

| المستخلص الفينولي |  | ثابت التثبيط         |
|-------------------|--|----------------------|
|                   |  | مكافئ rutine         |
|                   |  | مكافئ الحمض gallique |
| منزوع الدسم       |  | 0.74                 |
| غير منزوع الدسم   |  | 0.38                 |

# المناقشة

## I - الدراسة الكمية للمستخلصات الفينولية لبذور *Nigella sativa* L. :

عند إستخلاص عديدات الفينول من مادة بيولوجية نباتية ما بما فيها أجزاء *Nigella sativa* L. (الجزور و الأجزاء الهوائية)، تستعمل كحولات أو مذيبات عضوية أو الماء أو خليط من ماء و كحول أو ماء ومذيب عضوي أو كحول ومذيب عضوي. في غالب الحالات، يشكل الميثانول أكثر الكحولات إستعمالا (Bourgou و آخرون، 2008؛ Khattak و آخرون، 2008، Mariod و آخرون، 2009). في نفس الإتجاه، لا نجد مذيبا عضويا كثير الإستعمال و الأمر يختلف من مرجع إلى مرجع. على سبيل المثال، تستعمل Khattak (2008) الهكسان و الأستون، ويستعمل Mariod (2009) أستات الإيثيل و الهكسان. بعد الإستخلاص، تقدر كمية عديدات الفينول دائما بمعالجة عينات من المستخلصات و عينات من محلول عديد فينول مرجعي (غالبا الحمض gallique) بكاشف Folin-Ciocalteu ثم بكاربونات الصوديوم وتتابع قراءة الإمتصاص على طول موجة بين 750 و 765 نانومتر. وفي نفس الإتجاه، تقدر كمية الفلافونويدات بمعالجة عينات من المستخلصات و عينات من محلول فلافونويد مرجعي (غالبا rutine) بـ trichlorure d'aluminium و يتابع الإمتصاص على طول موجة بين 430 و 510 نانومتر.

في حالة *Nigella sativa* L. و بغض النظر عن جزء النبتة المستعمل، يختلف مردود الإستخلاص بإختلاف مكونات مزيج الإستخلاص. في العدد القليل من المراجع التي بحوزتنا، يسجل أعلى مردود مع الميثانول (Mariod و آخرون، 2009). وبغض النظر عن مكونات مزيج الإستخلاص، فإن مردود الإستخلاص يختلف بإختلاف أجزاء النبتة المستعملة وتتراوح قيمته بين 27.8 و 3.6 مغ/غ (Bourgou و آخرون، 2008؛ Khattak و آخرون، 2008، Mariod و آخرون، 2009).

بينت طريقة التحليل الكمي المطبقة على المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم أن هذا الأخير يحوي تركيزا من عديدات الفينول و من الفلافونويدات في حدود 890.66 ميكروغرام مكافئ الحمض gallique/مل و 18.35 ميكروغرام مكافئ rutine/مل، على الترتيب؛ بمردود إستخلاص قدره 0.89 مغ/غ و 0.01835 مغ/غ، على الترتيب. في حين يحوي المستخلص الفينولي منزوع الدسم تركيزا من عديدات الفينول و من الفلافونويدات في حدود 768 ميكروغرام مكافئ الحمض gallique/مل و 18.00 ميكروغرام مكافئ rutine/مل، على الترتيب؛ بمردود إستخلاص قدره 0.768 مغ/غ و 0.018 مغ/غ، على الترتيب. بالرغم من محاولتنا إستنساخ قدر الإمكان ظروف العمل المذكورة أعلاه، نجد من خلال المقارنة بين مردود الإستخلاص الذي تحصلنا عليه بما ورد أعلاه أن طريقة إستخلاصنا و تقديرنا تتميزنا بمردود ضعيف ويمكن أن يعزى هذا إلى عامل النبتة على الخصوص.

## II - الدراسة النوعية للمستخلصات الفينولية لبذور *Nigella sativa* L. :

عند دراسة طبيعة مكونات المستخلصات الفينولية المتحصل عليها باستعمال أمزجة الإستخلاص المذكورة أعلاه، يستعمل الباحثون غالبا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Shariffar و آخرون، 2009؛ Choudharya و آخرون، 2011) أو كروماتوغرافيا الحالة السائلة تحت الضغط المرتفع (أداء مرتفع) (Falleh و آخرون، 2012؛ Moulehi و آخرون، 2012). مع كلتا الطريقتين، يتم فصل المكونات بطور متحرك عضوي حامضي. في حالة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، تؤمن هذه الحموضة بإضافة قليل من الحمض فورميك و الحمض أستيك (Shariffar و آخرون، 2009؛ Choudharya و آخرون، 2011) إلى مذيب عضوي تختلف طبيعته من مرجع إلى آخر. وفي حالة كروماتوغرافيا الحالة السائلة تحت الضغط المرتفع تؤمن هذه الحموضة غالبا بإضافة قليلا من الحمض سيلفيريك (Moulehi و آخرون، 2012؛ Trabelsi و آخرون، 2010؛ Mhamdi و آخرون، 2010) و نادرا الحمض أستيك (Falleh و آخرون، 2012) أو الحمض أورثوفوسفوريك (Erkan و آخرون، 2008) لكن إلى نفس المذيب العضوي أستونيتريل. عند مقارنة أداء الطريقتين نلاحظ تباين كبير في النتائج ونجد أن الطريقة الثانية هي الأنجع في مثل هذه الدراسات لأن عدد مكونات المستخلصات الفينولية المحددة طبيعتها يكون مرتفعا مقارنة بالطريقة الأولى.

في عملنا، استنسنا تقريبا نفس ظروف الفصل بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة. بعد مقارنة كل بقعة من المستخلص مع الشواهد المستعملة وجدنا أن المستخلص الفينولي منزوع الدسم يحوي المركبات التالية: الحمض gallique، quercétine و rutine و أخرى غير معروفة بسبب قلة الشواهد المستعملة. وعند مقارنة كل بقعة من المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم مع نفس الشواهد وجدنا أنه يحوي المركبات التالية: الحمض gallique، quercétine، rutine، kaempférol و/أو vanilline ( $R_f = 0.60$ ) وأخرى غير معروفة بسبب قلة الشواهد المستعملة. يبدو من هذه النتائج أن التخلص من الدسم يؤدي إلى ضياع في بعض مكونات المستخلص الفينولي، و يفسر أيضا ضعف محتوى المستخلص منزوع الدسم من عديدات الفينول مقارنة بغير منزوع الدسم. إن مقارنة نتائجنا بما ورد في المراجع يؤكد التباين المشار إليه أعلاه والذي يبدو بالنسبة إلينا أنه راجع إلى عوامل متعددة: عامل النبتة، ظروف الإستخلاص و طريقة الفصل.

## III - تحضير المستخلصات الإنزيمية الخام وتقدير محتواها البروتيني:

لإستخلاص مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam ابتداءً من عزلات الأنواع البكتيرية سالبة غرام تنمى العزلات في أوساط غذائية مختلفة: وسط منقوع قلب و دماغ البقر (Frere و آخرون، 1988؛ Qinting و آخرون، 1997)، وسط تريبتون- صويا (Tzouvelekis و آخرون، 1996) أو وسط Luria-Bertani (Silva و آخرون، 2000) وفي شروط حضن تختلف باختلاف النوع البكتيري المراد دراسته. تعرض المعلقات البكتيرية الناتجة للنبد

بسرعات ولفترات مختلفة (Vecoli وآخرون، 1983؛ Seetulsingh وآخرون، 1991؛ Lenfant وآخرون، 1983). تسترجع بعدها الثقالة (الراسب الخلوي) وتعرض إما للموجات فوق الصوتية (Medeiros وآخرون، 1985؛ Nishida وآخرون، 1999) أو للصدمة الأوسموزية (Nordmann وآخرون، 1993) أو لتأثير الليزوزيم (Saves وآخرون، 1995) أو لتأثير الكلوروفورم (Arstila وآخرون، 1993) أو لتأثير polymyxins (Okabe وآخرون، 1986). ينبذ المعلق الناتج و يسترجع الجزء الطافي. تختلف خطوة الإستخلاص المولية إذ يستعمل بعض الباحثون الجزء الطافي الناتج مباشرةً (Papanicalaou وآخرون، 1990؛ Payne وآخرون، 1994؛ Tzouvelekis وآخرون، 1997<sub>a</sub>؛ Silva وآخرون، 2000) والبعض الآخر يواصل الإستخلاص للحصول على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam نقية. تتم هذه التنقية على مرحلة واحدة بإحدى أنواع الكروماتوغرافيا التحضيرية: التبادل الأيوني (Saves وآخرون، 1995) أو الترشيح (Lenfant وآخرون، 1983) أو الشراهة (Dubus وآخرون، 1993)، أو على مرحلتين بنوعين مختلفين من الكروماتوغرافيا: التبادل الأيوني ثم الشراهة (Matagne وآخرون، 1990؛ Page، 1993؛ Quinting وآخرون، 1997؛ Bouillene وآخرون، 2000).

أورد Arstila وآخرون (1993) في دراسة مقارنة للطرق الخمسة الأولى السابقة لهدم الجدار الخلوي لأنواع البكتيرية سالبة غرام، أن المعالجة بالموجات فوق الصوتية أو بالكلوروفورم تسمح بالحصول على مستحضر إنزيمي عال النشاط الإماهي خلافا للمعالجة بالصدمة الأوسموزية.

في حالتنا، حضرنا مستخلصات إنزيمية خام بدءاً من عزلات سريرية لأنواع البكتيرية التالية: *E.coli* و *K.pneumoniae* و *Acinetobacter*، المقاومة أصلاً للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams حسب طريقة Vecoli وآخرون (1983). تم تقدير البروتينات في كل مستخلص خام بطريقة تثبيت صبغة كوماسي الزرقاء لأنها الطريقة الأقل عرضة للتداخلات مقارنة بالطرق الأخرى (Bradford، 1976؛ Macart و Gerbaut، 1982). كان المحتوى البروتيني للمستخلص المحضر بدءاً من *E.coli* ومن *K.pneumoniae* ومن *Acinetobacter* في حدود 80.30 و 48.56 و 36.73 ميليغرام بروتين/ملييلتر مستخلص خام، على الترتيب. نشير إلى أننا لم نتمكن من حساب مردود الإستخلاص لإستحالة تجفيد المستخلصات الإنزيمية الخام في ظروف عملنا المتاحة مما صعب القيام بمقاربة نتائج بنتائج مخابر أخرى. كان من الممكن الرفع من مردود الإستخلاص لو تمكنا من إقصاء الأغشية الخلوية التي تلزم ترسيبها بسرعة نبذ عالية (110.000 g) لمدة 90 دقيقة (Page، 1993) وإقصاء الأحماض النووية بترسيبها بستربتومييسين (Tzouvelekis وآخرون، 1997<sub>b</sub>).

## VI - حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام لمثبطاته الكلاسيكية (المستعملة في

العلاج):

بينت الدراسات الحركية في غياب أي مثبط كلاسيكي للنشاط الإماهي لمستخلصاتنا الإنزيمية الخام أنها تتأثر مع نيتروسيفين بشراهة متفاوتة (يعكسه تفاوت قيم ثابت ميخائيليس: 13.51، 17.73، 9.42 ميكرومولار) وتستقلبه بفعالية متفاوتة (يعكسه تفاوت قيم السرعات القصوى: 308.64، 108.93، 168.35 ميكرومول/مغ/د) بالرغم من إبقائنا على كمية البروتين في وسط التفاعل ثابتة (360 ميكروغرام). إن هذا التفاوت في هاتين الميزتين الذي تعكسه تفاوت قيم الوسائط الحركية الموافقة هو تفاوت طبيعي ومعهود ليس فقط بين نوع بكتيري وآخر (Avlami و آخرون، 2010) بل حتى بين سلالات النوع البكتيري الواحد (Nordmann و آخرون، 1993؛ Prinarakis و آخرون، 1997؛ Lin و آخرون، 2005؛ Weile و آخرون، 2010). بالرغم من أن مستخلصاتنا الإنزيمية هي مستخلصات خام (خطورة التداخلات واردة جدا) فإن هذا التفاوت قد يُعزى أيضا إلى إختلاف الإنزيم كما و نوعا في ما بين المستخلصات (Livermore، 1995؛ Lin و آخرون، 2005؛ Weile و آخرون، 2010).

بين إستنساخ هذه الدراسات الحركية لكن في وجود مثبط من بين ثلاث مثبطات كلاسيكية (الحمض Clavulanique، Sulbactam، Tazobactam) لمميئات الحلقة  $\beta$ -lactam ( $\beta$ -lactamases) أن قيمة ثابت ميخائيليس للمستخلص الإنزيمي للعزلة *E.coli* و للعزلة *K.pneumonia* في وجود الحمض clavulanique أو tazobactam أو sulbactam ترتفع خلافا لقيم السرعة القصوى التي تبقى تقريبا ثابتة. وهذا ما يدل على أن هذه المركبات الثلاث تثبط النشاط الإماهي للعزلتين تشبيطا تنافسيا ومنه يمكن القول أن النشاط الإماهي لهذين المستخلصين سببه احتواءهما على مميئة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بحمض أميني سيرين (Serine- $\beta$ -lactamase). في حدود معلوماتنا المرجعية، تتميز غالبية مميئات الحلقة  $\beta$ -lactam التي تفرزها سلالات النوع *E.coli* بالحساسية للحمض clavulanique (Wu و آخرون، 1994). في نفس الإتجاه، تفرز بعض أنواع سلالات *K.pneumonia* نفس الإنزيم بنفس الميزة (Lin و آخرون، 2005).

خلافا للمستخلص الإنزيمي الخام للعزلة *E.coli* و للعزلة *K.pneumonia*، لا تتأثر قيم السرعة القصوى وقيم ثابت ميخائيليس للمستخلص الإنزيمي للعزلة *Acinetobacter* تأثرا محسوسا بوجود هذه المثبطات الكلاسيكية الثلاث. ومنه يمكن القول أن النشاط الإماهي لهذا المستخلص الإنزيمي يعود لإحتوائه على مميئة الحلقة  $\beta$ -lactam لا شراهة لها للمثبطات الثلاث، وبالتالي يمكن أن لا تكون نوعا آخر غير النوع الذي يملك موقعا نشطا بذرة زنك أو ذرتي زنك (Metallo- $\beta$ -lactamase) (Avlami و آخرون، 2010).

#### V - حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام للـ EDTA:

بيّن أيضا إستنساخ الدراسات الحركية السابقة (في غياب أي مثبت) أن قيمة ثابت ميخائيليس وقيمة السرعة القصوى للمستخلص الإنزيمي للعضلة *E.coli* و للعضلة *K.pneumonia* تبقى نسبيا ثابتة في وجود EDTA. إن هذه النتيجة تدعم أكثر إحتواء هذين المستخلصين على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بحمض أميني سيرين (Bush، 1998؛ Bou وآخرون، 2000).

خلافا للمستخلص الإنزيمي الخام للعضلة *E.coli* و للعضلة *K.pneumonia*، تتأثر قيمة ثابت ميخائيليس للمستخلص الإنزيمي للعضلة *Acinetobacter* تأثرا محسوسا في وجود EDTA دون التأثير الكبير لقيمة سرعته القصوى، وهي نتيجة تدعم أكثر إحتواء هذا المستخلص على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك (Derya Aybey وآخرون، 2011).

#### IV - حساسية النشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام للمستخلصات الفينولية لبذور *Nigella*

*:sativa*

بيّن إستنساخ الدراسات الحركية في غياب أي مثبت للمستخلص الإنزيمي للعضلة *E.coli* و للعضلة *K.pneumonia*، أن قيم السرعة القصوى وقيم ثابت ميخائيليس لهذين الأخيرين تبقى تقريبا ثابتة في وجود المستخلص الفينولي منزوع وغير منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa* L. هذا الأمر يدل على أن النشاط الإماهي لهذين المستخلصين الإنزيمين غير حساسين لتأثير الفلافونويدات أو عديدات الفينول المحتواة في المستخلصين الفينوليين (Kada و Mahdadi، 2011). إن هذه النتيجة تدعم أكثر إمكانية إحتواء المستخلصين على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بحمض أميني سيرين التي أشرنا إليها عند مناقشة نتائج حساسية نفس الوسائط الحركية لنفس المستخلصين الإنزيمين للمثبطات الكلاسيكية و لـ EDTA. خلافا للمستخلص الإنزيمي الخام للعضلة *E.coli* و للعضلة *K.pneumonia* و خلافا لسرعته القصوى فإن قيمة ثابت ميخائيليس للمستخلص الإنزيمي للعضلة *Acinetobacter* تتأثر تأثرا محسوسا بوجود هذه المستخلصات الفينولية. إن هذه النتيجة تدعم أكثر إمكانية إحتواء هذا المستخلص الإنزيمي على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك التي أشرنا إليها عند مناقشة نتائج حساسية نفس الوسائط الحركية لنفس المستخلص الإنزيمي لـ EDTA. إن تضاعف قيمة ثابت ميخائيليس لهذا المستخلص الإنزيمي ثلاث مرات تقريبا (تمر من 9.4 إلى 26.1 ميكرومولار) يعكس قدرة عديدات الفينول و/أو الفلافونويدات على الوصول إلى الموقع النشط للإنزيم المحجوب نوعا ما (Ullah وآخرون، 1998؛ Galleni وآخرون، 2001) والتأثر مع العناصر الأساسية المكونة له من بواقي أحماض أمينية (Carfi وآخرون، 1995) و ذرتي الزنك على الخصوص (Paul-soto وآخرون، 1998). إن التأثير مع عنصر

الزنك مرجح جدا بالنسبة إلينا نظرا للخاصية الفيزيائية الكيميائية لعديدات الفينول/فلافونويدات على إستخلاص العناصر الفلزية في شكلها الأيوني (الحديد، النحاس، الألمنيوم، الزنك..)، وهي ميزة يرد ذكرها كثيرا كإحدى آليات النشاط المضاد للأكسدة لهذه الجزيئات النباتية (Verdan وآخرون، 2011).

أخيرا عند المقاربة بين قيم تركيز عديدةات الفينول أو الفلافونويدات المحتواة في المستخلص الفينولي منزوع و غير منزوع الدسم المثبط لـ 50 % من النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي للعزلة *Acinetobacter* نجد أنها تنخفض إلى النصف عندما نمر من منزوع الدسم (201 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique أو 1,31 ميكرومولار مكافئ rutine، على الترتيب) إلى غير منزوع الدسم (105.8 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique أو 0.61 ميكرومولار مكافئ rutine، على الترتيب)، ومنه يبدو أن المستخلص الفينولي غير منزوع الدسم أكثر فعالية من منزوع الدسم. و يمكن أن يعزى هذا الإختلاف إلى ضياع جزيئات أخرى فينولية أو غير فينولية نشطة أثناء إقصاء الجزء الدسم من المستخلص الفينولي وهذا ما يبينه ناتج التحليل النوعي بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة. نذكر أن هذه الملاحظة تدعمها نفس المقاربة لكن بين قيم ثوابت التنشيط التي تنخفض إلى النصف عندما نمر من منزوع الدسم (من 113 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique أو 0.74 ميكرومولار مكافئ rutine، على الترتيب) إلى غير منزوع الدسم (من 66.08 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique أو 0.38 ميكرومولار مكافئ rutine، على الترتيب).

## نظرة مستقبلية

نقترح لمواصلة عملنا:

- العمل على مستخلص نقي لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك كجزيئ مستهدف وعمليات فينول أو فلافونويدات تجارية كربيطة.
- الكشف عن قدرة الدسم لبذور *Nigella sativa* L. على تثبيط النشاط الإماهي الإنزيمي لمميئات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك.
- إستتساخ إختبارات التثبيط على مزارع خلايا بكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams.

# قائمة المراجع

- Abraham, E. P., Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. [letter]. *Nature*. 146: 837.
- Adachi, H., Ohta, T., Matsuzawa, H. (1991). Site-directed mutants at position 166 of TEM-1  $\beta$ -lactamase That form a stable acyl-enzyme intermediate with penicillin. *J. Biol. Chem.*, 266: 3166-3191.
- Aldridge, K. E. (1993). A new potent  $\beta$ -lactamase inhibitor, BRL 42715, with inherent activity against *Bacteroides fragilis* group strains. *Clin. Infect. Dis.*, 16 (Suppl. 4): S335-S338.
- Alexandrakis, M., Singh, L., Boucher, W., Letourneau, R., Theoflopoulos, P., Theoharides, T. C. (1999). Differential effects of flavonoids on inhibition of secretion and on accumulation of secretory granules in rat basophilic leukemia cells. *Int. J. Immunol.*, 21: 379-390.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.*, 289: 321-331.
- Ambler, R. P., Coulson, A. F. W., Frère, J.-M., Ghose, J.-M., Joris, B., Forsman, M., Lévesque, R. C., Tibary, G., Waley, S. G. (1991). A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. *Biochem. J.*, 276: 269-272.
- Aronoff, S. C., Jacobs, M. R., Johanning, S., Yamabe, S. (1984). Comparative activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors YTR 830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26: 580-582.
- Arstila, T., Jacoby, G. A., Huovinen, P. (1993). Evaluation of five different methods to prepare bacterial extracts for the identification of  $\beta$ -lactamases by isoelectric focusing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 : 809-816.
- Avlami, A., Bekris, S., Ganteris, G., Kraniotaki, E., Malamou-Lada, E., Orfanidou, M., Paniara, O., Pantazatou, A., Papagiannitsis, C. C., Platsouka, E., Stefanou, I., Tzelepi, E., Vagiakou, H., Miriagou, V. (2010). Detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J. Microbiol. Methods* 83 : 185-187.
- Baggaley, K. H., Brown, A. G., Schofield, C. G. (1997). Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and clavams. *Natl. Prod. Rep.*, 140 : 309-333.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. 46: 1086-1089.
- Bandoh, K., Watanabe, K., Muto, Y., Tanaka, Y., Kato, N., Ueno, K. (1992). Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *J. Antibiot.* 45:542-547.
- Banerjee, S., Pieper, U., Kapadia, G., Pannell, L. K., Herzberg, O. (1998). Role of the S2-loop in the cavity, substrate specificity, and structure of class A  $\beta$ -lactamase. *Biochem. J.*, 37 : 3286-3296.
- Baumman, J., Von Bruchhausen, V. F., Wurm, G. (1980). Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins*. 20 :627-639.
- Belaouaj, A., Lapoumerouille, C., Caniça, M. M., Vedel, G., Nénot, P., Krishnamoorthy, R., Paul, G. (1994). Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like  $\beta$ -lactamase IRT-1 and IRT-2

(formally called IRT-1 and IRT-2). FEMS. Microbiol. Lett., 12: 75-80.

**Bermudes, H., Jude, F., Chaibi, E. B., Arpin, C., Bebear, C., Labia, R., Quentin, C. (1999).** Molecular characterization of TEM-59 (IRT), a novel inhibitor-resistant TEM- derived  $\beta$ -lactamase in a clinical isolates of *Klebsiella Pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother., 43(7): 1657-1661.

**Bhendrich, A., (2006).** Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. Acta Pharmacologica Sinica. 27 (1): 27-40.

**Bonfiglio, G., Livermore, D. M. (1994).**  $\beta$ -lactamase type amongst *Staphylococcus aureus* in relation to susceptibility to  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. J. Antimicrob. Chemother., 33:465-481.

**Bonnier, G. (1990)** La grande flore en couleur. Ed Belin, Paris. Tome 1. pp: 17.

**Bonomo, R. A., Rice, L. B. (1999).** Inhibitor resistant class A beta-lactamases. Frontiers in Bioscience., 4: e34-41.

**Borra1, P., Leiros, H., Rafi, A., Spencer, J., Leiros, I., Walsh, T., Sundsfjord, A., Samuelsen, Q. (2011).** Structural and Computational Investigations of VIM-7: Insights into the Substrate Specificity of VIM Metallo- $\beta$ -Lactamases. J. Mol. Biol. 411: 174–189.

**Bou, G., Oliver, A., Martinez-Beltran, J. (2000).** OXA-24, A novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob. Agents Chemother., 44 (6) :1556-1561.

**Bouillene, F., Matagne, A., Joris, B., Frère, J-M. (2000).** Technique for a rapid and efficient purification of the SHV-1 and PSE-2  $\beta$ -lactamases. J. Chromat. B., 737: 261-265.

**Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B. (2008).** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. C. R. Biol 331 : 48–55.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle Protein-Dye Binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.

**Brenner, D. G., Knowles, J. R. (1984).** Penicillanic acid sulfonamide nature of irreversible inactivation of RTEM  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli*. Biochem., 23: 5833-5939.

**Bret, L., Chaibi, E. B., Chanal-Claris, C., Sirot, D., Labia, R., Sirot, J. (1997).** Inhibitor-resistant TEM (IRT)  $\beta$ -lactamases with different substitutions at position 244. Antimicrob. Agents Chemother., 41: 2547-2549.

**Brown, A. G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J. D., Reading, C., Rolinson, G. N. (1976).** Naturally occurring  $\beta$ -lactamase inhibitors with antibacterial activity. J. Antibiot., 29: 668.

**Brun, T., Peduzzi, J., Canica, M. M., Paul, G., Novet, P., Barthelemy, M., Labia, R. (1994).** Characterisation and amino sequence of IRT-4, a novel TEM-type enzyme with decreased susceptibility to  $\beta$ -lactamase inhibitors. FEMS Microbiol Lett., 120: 111 -118.

**Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie: Plantes médicinales. 2ème ed., Techniques et documentation, Lavoisier, Paris, pp: 197-613.

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie: Plantes médicinales. 3ème ed., Techniques et

documentation, Lavoisier, Paris, pp:266-311.

Bush, K. (1998). Metallo- $\beta$ -lactamases : a class apart. Clin. Infect. Dis., 27(suppl 1) : S48-53.

Bush, K. (1999).  $\beta$ -lactamases of increasing clinical importance. Curr. Pharmaceutical Design, 5: 839-845.

Bush, K. (2001). New  $\beta$ -lactamases in Gram-Negative bacteria. Antimicrob. Res., 32: 1085-1089.

Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother., 39 : 1211-1233.

Bush, K., Macalintal, C., Rasmussen, B. A., Lee, V. J., Yang, Y. (1993). Kinetic interactions of tazobactam with  $\beta$ -lactamases from all major structural classes. Antimicrob. Agents Chemother., 37: 851-858.

Campos, M., Bacaz, G., Vasquez, O., Gonzalez, H., Caceres, J., Yanez, C. (1993). Inactivation of  $\beta$ -lactamase from *Shigella flexneri* UCSF-129 by BRL 42715, a potent inhibitor. Microbios, 74: 1722.

Carfi, A., Duce, E., Paul-Soto, R., Galleni, M., Frère, J. M., Dideberg, O. (1998a). X-ray structure of the zinc II  $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis* in an Orthorhombic crystal form. Acta Cryst. D54: 47-57.

Carfi, A., Duce, E., Galleni, M., Frère, J. M., Dideberg, O. (1998b). 1.85 Å resolution structure of the zinc II  $\beta$ -lactamase from *Bacillus cereus*. Acta Cryst. D54: 313-343.

Carfi, A., Parcs, S., Duce, E., Galleni, M., Ducez, C., Frère J. M., Dideberg, O. (1995). The 3D structure of a zinc metallo- $\beta$ -lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. EMBO. 14: 4914.

Cartwright, S. J., Coulson, F. W., (1979). A semi-synthetic penicillinase inactivator. Nature, (London), 278: 360-361.

Cermack, R., Follmer, U., Weiffram, S. (1998). Dietary flavonol quercetin induces cholestanol secretion in rat colon. Am. J. Physiol., 275: G1166-G1172.

Chaibi, E-B., Pée-izzi, J., Farzaneh, S., Barthélémy, M., Sirot, D., Labia, R. (1998). Clinical inhibitor-resistant mutants of the  $\beta$ -lactamase TEM-1 at amino-acid position 69 kinetic analysis and molecular modelling. Biochimica et Biophysica Acta. 13 82

Chang, W-B., Lee, Y.T., Lu, F.J., Chiang, H.C. (1993). Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. Anticancer. Res., 13: 2165-2170.

Charlier, P., Coyette, J., Dehareng, D., Dive, G., Ducez, C., Dusart, J., Fonze, E., Fraipont, C., Frère, J. M., Galleni, M., Goffin, C., Joris, B., Lamotte-Brasseur, J., Nguyen-Distèche, M. (1998). Med. Sci. Res., 14 (5): 544 - 555.

Charnas, R. L., Fisher, J., Knowles, J. R. (1978). Chemical studies on the inactivation of *Escherichia coli* TEM  $\beta$ -lactamase by clavulanic acid. Biochem., 17: 2185-2189.

- Chen, C. C. H., Herzberg, O. (1992). Inhibition of  $\beta$ -lactamase by clavulanate. Trapped intermediates in cryocrystallographic studies. *J. Mol. Biol.*, 224: 1103-1113.
- Chen, C. C. H., Herzberg, O. (1999). Relation of the catalytic carboxylate group in class A  $\beta$ -lactamase : the structure and function of the mutant enzyme Glu 166 $\rightarrow$ Gln : Asn 170 $\rightarrow$ Asp. *Protein Engineering*, 12: 573-579.
- Chen, C. C. H., Rahil, Pratt, R G., Herzberg, O. (1993). Structure of the phosphonate-inhibited  $\beta$ -lactamase: An analog of the tetrahedral transition state/ intermediate of  $\beta$ -lactam hydrolysis. *J. Mol. Biol.*, 234: 165-178.
- Choudharya, N., Reddy V., Bijjemb, K., Kalia, A. N. (2011). Antiepileptic potential of flavonoids fraction from the leaves of *Anisomeles malabarica*. *J of Ethnopharm* 135 :238–242.
- Ciofu, O., Beveridge, T. J., Kadurugamawa, J., Walther-Rasmussen, J., Hoiby, N. (2000). Chromosomal  $\beta$ -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45: 9-13.
- Cobo, J., Morosini, M., Pintadoa, V., Tatob, M., Samaranchc, N., Baquerob F. (2008). Use of tigecycline for the treatment of prolonged bacteremia due to a multiresistant VIM-1 and SHV-12  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60 : 319–322.
- Cockroft, S. (1982). Phosphatidylinositol metabolism in mast cell and neutrophil. *Antimicrob. Cell Calcium*, 3: 337-349.
- Coleman, K., Griffin, D. R. J., Page, J. W. J., Upshon, P. A. (1989). In vitro evaluation of BRL 42715, a novel  $\beta$ -lactamase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 1580-1587.
- Concha, N. O., Janson, C. A., Rowling, P., Pearson, S., Cheever, C. A., Clark, B. P., Lewis, C., Galleni, M., Frère, J-M., Payne, D. J., Bateson, J. H., Abdelmaguid, S. S. (2000). Crystal structures of the IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent broad spectrum inhibitor. *Biochem. J.*, 39: 4288-4298.
- Concha, N. O., Rasmussen, B. A., Bush, K., Herzberg, O. (1996). Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc  $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Structure*, 4 :823-835.
- Concha, N. O., Rasmussen, B. A., Bush, K., Herzberg, O. (1997). Crystal structures of the cadmium- and mercury-substituted metallo- $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Protein Science*, 6: 2671-2676.
- Day A. J., Williamson, G. (1999). Human metabolism of dietary quercetin glycosides. *Plant polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*, Edited by Gross et al. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- De la pena, A., Derendorf, H. (1999). Pharmacokinetic properties of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Int. J. Clin. Pharm. Ther.*, 37(2): 63-75.

- Delaire, M., Labia, R., Samarra, J.-P., Masson, J.-M. (1992). Site-directed mutagenesis at the active site of *Escherichia coli* TEM-1  $\beta$ -lactamase. Suicide inhibitor-resistant mutants reveal the role of arginine 244 and methionine 69 in catalysis. *J. Biol. Chem.*, 267: 20600-20606.
- Derya Aybey, A., Aksit, F., Oz, Y., Kiremitci, A., Durmaz, G. (2011). Evaluation of an automated system for the detection of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* and assessment of metallo- $\beta$ -lactamase production using two different phenotyping methods. *Journal of Microbiological Methods* 86 :121–123.
- Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97: 654-660.
- Dong, Z., Qi, X., Xie, K., Fidler, I. J. (1993). Protein Tyrosine kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-non responsive murine macrophages. *J. Immunol.*, 15: 2717-2724.
- Doran, J L., Leskiw, B K., Aippersbach, S., Jensen, S E. (1990). Isolation and characterization of a  $\beta$ -lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *J. Bacteriol.*, 172: 4909.
- Dubus, J., Monnaie, D., Jacobs, C., Normark, S., Frère, J.-M. (1993). A dramatic change in the rate-limiting step of  $\beta$ -lactam hydrolysis results from the substitution of the active-site serine residue by a cysteine in the class C  $\beta$ -lactamase of *Enterobacter cloacae* 908R. *Biochem. J.*, 292: 537-543.
- Dyke, K. G. H., Gregory, P. D. (1997). Resistance to beta lactam antibiotics. In: *The staphylococci in human disease*. Ed., Crossley, K., Archer, G. L. Churchill Livingstone Inc. New York., pp: 139-157.
- English, A. R., Retsema, J. A., Giraud, A. E., Lynch, J. E., Barth, W. E. (1978). A  $\beta$ -lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of  $\beta$ -lactams: initial bacteriological characterisations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14: 414-419.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem* 110 : 76–82.
- Falleh, H., Jalleli, I., Ksouri, R., Boulaaba, M., Guyot, S., Magné, Ch., Abdelly, Ch. (2012). Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances. *Plant Physio and Bioch* 52 : 1-8.
- Farzaneh, S., Chaibi, E B., Pedduzi, J., Barthélemy, M., Labia, R., Blazquez, J., Baquero, F. (1996). Implication of Ile-69 and Thr-182 residues in kinetic characteristics of IRT-3 (TEM-32)  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40: 2434-2436.
- Ferrell, J. E., Chang Sing, P. D. G., Loew, G., King, R., Mansour, J. M., Mansour, T. E. (1979). Structure/Activity studies of flavonoids as inhibitors of cyclic ANiP phosphodiesterase and relationship to quantum chemical indices. *Mol. Pharmacol.*, 16: 556-568.
- Ferrandiz, M, I., Ramachandran Nair, A. G., Alcaraz, M. J. (1990). Effect of flavonoids from spanish and indian medicinal herb on arachidonate metabolism in rat peritoneal leucocytes. *Pharmazie.*, 45: 444-

445.

Ferriola, C., Gody, V., Middleton, E. Jr. (1989). Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 1617-1624.

Fleming, A. (1929). On antibacterial action of cultures of a penicillin with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 10: 226-235.

Frère, J-M., Joris, B., Varetto, L., Crane, M. (1988). Structure-activity relationships in the P-lactam family: an impossible dream. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 125-132.

Fuchs, P C., Barry, A L., Pfaller, M A., Hardy, D J., Mc Lauglin, J C, Gerach, E H.,. (1993). *In vitro* activity of ampicillin, amoxicillin, ampicillin/sulbactam and ampicillin/clavulanic acid against consecutive clinical isolates of enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 17: 171-175.

Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G. M., Spencer, J., Dideberg, H., Frère, J.-M. (2001). Standard numbering for class  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 660-663.

Gamet-Payrastre, L., Mânenti, S., Gratacap, M. P., Tulliez, J., Chap, H., Payrastre, B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen. Pharmacol.* 32: 279-286.

Ghedira, K. (2006) La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 4: 1-7.

Gibson, R M., Christensen, H., Waley, S G. (1990). Site-directed mutagenesis of  $\beta$ -lactamase a single and double mutants of Glu 166 and Lys 73. *Biochem. J.*, 272: 613-619.

Gil, B., Sanz, M. J., Terencio, M., Ferrandiz, M. I., Bustos, G., Paya, M., Gunasegaran, R., Alcaraz, M. J. (1994). Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipase A2 and inflammatory responses in mice. *Life. Sci.*, 54: PL333-PL338.

Gluchoff-Fiasson, K., Jay, M., Viricel, M. F. (1989). Flavone O- and C-glycosides from *Setaria italica*. *Phytochem.*, 28(9): 2471-2475.

Golemi, D., Maveyraud, L., Vakullenko, B., Mendelson, J. (2000). The first structural and mechanistic insights for class D  $\beta$ -lactamases: Evidence for a novel catalytic process for turnover of  $\beta$ -lactam anti-infectives. *J. Am. Chem. Soc.*, 122: 6132-613.

Grisiola, S., Rubio, V., Feijoo, S., Tranier, S., Ishiwata, A., Kotra, L P., Samarra, J P., Mobashery, S. (1975). Inhibition of lactic dehydrogenase and of pyruvate kinase by low concentrations of quercetin. *Physiol. Chem. Phys.*, 7: 473-475.

Hahlbrock, K. (1981). Flavonoids. In *Biochemistry of plants*. Academic Press, Inc (London): 7. Chap 4. pp: 425-455.

Hamalainen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E. (2007). Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF- $\kappa$ B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. Volume 2007, Article ID 45673, 10 pages.

Herzberg, O., Moulton, J. (1987). Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. Crystal structure of  $\beta$ -

lactamase from *Staphylococcus aureus* PCI at 2.5 Å resolution. *Science*, 236: 694-701.

**Herzberg, O., Moulton, J. (1991).** Penicillin-Binding and degrading enzyme. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1:946-953.

**Huang, W., Petrosino, J., Palzkill, T. (1998).** Display of functional  $\beta$ -lactamase inhibitory protein surface of M13 bacteriophage. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42(11): 2893-2897.

**Huang, W., Zhang, Z., Palzkill, T. (2000).** Design of potent  $\beta$ -lactamase inhibitors by phage display of  $\beta$ -lactamase inhibitory protein. *J. Biologic. Chem.*, 275(20): 14964-14968.

**Imtiaz, U., Billings, E M., Knox, G R., Mobashery, S. (1994).** A structure-based analysis of the inhibition of class A  $\beta$ -lactamases by sulbactam. *Biochemistry.*, 33:5728-5738.

**Imtiaz, U., Billings, E M., Knox, G R., Manavathu, E K., Lerner, S A., Mobashery, S. (1993).** Inactivation of class A  $\beta$ -lactamases by clavulanic acid: the role of arginine-244 in nonconcerted sequence of events. *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 4435-4442.

**Ishiguro, M., Imajo, S. (1999).** The role of water molecules in the deacylation of acylated structures of class A  $\beta$ -lactamase. *Drug Design and Discovery.*, 16:131-143.

**Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J.-M., Samama, J-P. (1993).** Crystal structure of *Escherichia coli* TEM-1  $\beta$ -lactamase at 1.8Å resolution. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 16: 364-383.

**Kada, S., Mahdadi, R. (2011).** Inhibitory effect of flavonoids on *E. coli*  $\beta$ -lactamase activity. *Proceeding 22<sup>ème</sup> forum de l'association tunisienne des sciences biologique. Tunisie. P 269.*

**Keung, W. M. (1993).** Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *radix puerariae*. *Alcohol. Clin. Exp Res.*, 99: 452-453.

**Khattak, K, F., Simpson, T, J., Ihasnullah. (2008).** Effect of gamma irradiation on the extraction yield, total phenolic content and free radical-scavenging activity of *Nigella arvensis* seed. *F Chem* 110 :967-972.

**Kirby, W. M. M. (1944).** Extration of a highly potent penicillin inactivator from penicillin-resistant staphylococci. *Science*, 17: 1254-1260.

**Kitagawa, S.(2006).** Inhibitory Effects of Polyphenols on P-Glycoprotein-Mediated Transport. *Biol. Pharm. Bull.* 29 : 1-6.

**Knowles, J. R. (1985).** Penicillin resistance: The chemistry of  $\beta$ -lactamases inhibition. *Acc. Chem. Res.*, 18:97-104.

**Knox, J R. (1995).** Extended spectrum and inhibitor resistant TEM-type  $\beta$ -lactamases: mutations, specificity and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 2593-2601.

**Knox, J R., Moews, P C., Frere, J-M., (1996).** Molecular evolution of  $\beta$ -lactam resistance. *Chem. Biol.*, 3: 937.

**Kusaka, M., Sperilakis, N'. (1996).** Genestein inhibition of fast Na<sup>+</sup> current in uterine leiomyosarcoma cells in independent of tyrosine kinase inhibition. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1278: 1-4.

**Lachance, N. Gandreau, C., Lamotte, F., Turgeon, F. (1993).** Susceptibility of  $\beta$ -lactamases positive and negative strains of *Campylobacter coli* to  $\beta$ -lactam agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 37: 1174-1176.

- Lamotte-Brasseur, J., Dive, G., Dideberg, O., Charlier, P., Frère, J.-M. (1991). Mechanism of acyl transfer by the class A serine  $\beta$ -lactamase of *Streptomyces albus* G.. *Biochem. J.*, 279: 213-221.
- Lamotte-Brasseur, J., Jacob-Dubuisson, F., Dive, G., Frère, J.-M., Ghuysen, J.-M. (1992). *Streptomyces albus* G serine  $\beta$ -lactamase. Probing of the catalytic mechanism via molecular modeling of mutant enzymes. *Biochem. J.*, 282: 189-195.
- Landolfi, R., Nower, R. L., Steiner, M. (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure activity relationships. *Biochem. Pharmacol.*, 33: 1525-1530.
- Lavie, P. (1960). Les substances antibacteriennes dans les colonies d'abeilles (*Apis mellifica*) Ph. D. Thésis, Paris. France.
- Lenfant, F., Petit, A., Labia, R., Maveyrand, L., Samarra, J.-P., Masson, J.-M. (1993). Site directed mutagenesis of  $\beta$ -lactamase TEM-1: investigating the potential role of specific residues on the activity of *Pseudomonas*- specific enzymes. *J. Biol. Chem.*, 36: 17187-94.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*. 102: 771-776.
- Lin, R. D., Chin, Y. P., Lee, M. H. (2005). Antimicrobial Activity of Antibiotics in Combination with Natural Flavonoids against Clinical Extended-Spectrum  $\beta$  -Lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *phytotherapy research Phytother. Res.* 19 : 612-617.
- Livermore, D. M. (1993). Determinants of the activity of  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31 (Suppl. A): 9-21.
- Livermore, D. M. (1995).  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557-584.
- Marcart, M., Gerbaut, L. (1982). An improvement of the coomassie blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins application to cerebrospinal fluid. *Clin. Chem. Acta.*, 122 : 93-101.
- Macek, K. (1972). *Pharmaceutical application of Thin-Layer and Paper Chromatography*, New York.
- Maiti, S .N., Philips, O. A., Micetich, R. G., Livermore, D. M.(1998).  $\beta$ -lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance. *Curr. Med. Chem.*, 5: 441-456.
- Mariod , A.A., Mohamad Ibrahima, R., Maznah, I., Norsharina , I. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *F Chem* 116 :306-312.
- Markham, K. R. (1982). *Technics of flavonoids identification*. Edts. Academic press, London, pp: 1-131.
- Martens, S., Mithofer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochem* 66 : 2399–2407.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Conajo, M. C., Perea, E. J. (1990). Effect of clavulanic acid and beta-lactamase on phagocytoses of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Dis.*, 9: 783-784.
- Maser, E., Netter, K. J. (1991). Reductive metabolism of methyrapone by a quercetin-sensitive ketone reductase in mouse liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.*, 41: 1595-1599.

- Massova, I., Mobashery, S. (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and P-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1-17.
- Matagne, A., Dubus, A., Galleni, M., Frère, J.-M. (1999). The  $\beta$ -lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat. Prod. Rep.*, 16: 1-19.
- Matagne, A., Frère, J.-M. (1995). Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: the case of class A  $\beta$ -lactamases. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1245: 109-127.
- Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., Frère, J.-M. (1998). Catalytic properties of class A  $\beta$ -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.*, 330: 581-598.
- Matagne, A., Misselyn-Bauduin, A.-M., Joris, B., Erpicum, T., Grànier, B., Frère, J.-M. (1990). The diversity of the catalytic properties of class A  $\beta$ -lactamases. *Biochem. J.*, 265: 131-146.
- Medeiros, A. A. (1984). P-lactamases. *Brit. Med. Bulletin*, 40: 18-27.
- Medeiros, A. A., Cohenford, M., Jacoby, G.A. (1985). Five novel plasmid determined  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27: 715-719.
- Meloni, F., Ballabio, P., Gorrini, M., De amici, M., Marena, C., Malandreno, S., Luisseti, M (1995). Effects of 3'-hydroxyfarerol, a novel flavonoid agent, on phagocyte products. *Inflammation.*, 19: 689-699.
- Merlos, M., Sanchez, R. M., Camarasa, I., Adzet, T. (1991). Flavonoids as inhibitors of rat liver cytosolic glutathione S-transferase. *Experientia.*, 47: 616-619.
- Meziti, A. (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa L.* Étude in vitro et in vivo. Thèse de magistère. Département de biologie. Université Ferhat abbas. (Sétif) Algérie.
- Mhamdi, B., W. AidiWannes, J. Sriti, I. Jellali, R. Ksouri, B. Marzouk. (2010). Effect of harvesting time on phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Borago officinalis* seed extracts. *Industrial Crops and Products* 31 : 1-4.
- Micetich, R G., Maiti, S N., Spevak, P., Hall, T W., Yamabe, S., Ishida, N., Tanaka, M., Yamazaki, T., Nakai, A., Ogaw, K. (1987). Synthesis and  $\beta$ -lactamase inhibitory properties of 2 beta-[(1,2,3- triazol-1-yl) methyl] -2-alpha-methyl penam-3 alpha-carboxylic acid 1,1-dioxide and related triazolyl derivatives. *J. Med. Chem.*, 30: 1469-1474 .
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications of inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52(4): 673-751.
- Mitsuhashi, S., Inoue, M. (1981). Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams antibiotics. In S. Mitsuhashi (ed),  *$\beta$ -lactam antibiotics*. Springer-verlag, New york pp: 41-56.
- Mori, S., Nogushi, I. (1970). effects of flavonoids compounds on enzyme activities. I. Inhibitory action on bovine pancreatic ribonuclease 1. *Arch. Biochem. Biophys.*, 139: 444-446.
- Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., Saidani Tounsi, M. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium L.*) seeds extracts. *Industrial Crops and Products* 39 : 74- 80.

- Murakami, S., Muramatzu, M., Tomisawa, K. (1999). Inhibition of gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase by flavonoids: A structure-activity study. *J. Enzym. Inhib.*, 14: 151-166.
- Nagano, R., Adachi, Y., Imamura, H., Yamada, K., Hashizume, T., Morishima, H. (1999). Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various  $\beta$ -lactamases, including class B metallo- $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 2497-2503.
- Nelson, E. C., Elisha, B. G.(1999). Molecular basis of AmpC hyper-production in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 957-959.
- Nishida, K., Kunugita, C., Uji, T., Higashitani, F., Hyodo, A., Unemi, N., Maiti, S. N., Phillips, O. A., Spevak, P., Atchison, K. P., Salama, S. M., Atwal, H., Micetic, Z. G.(1999). In vitro and in vivo activities of Syn2190, a novel  $\beta$ -lactamase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 1895-1900.
- Nordmann, P., Mariotte, S., Naas, T., Labia, R., Nicolas, M.-H. (1993). Biochemical properties of a carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 939-946.
- Oefner, G., D'Arcy, A., Daly, J. J., Gubernator, K., Charrias, R. L., Heize, I., Hubschwerlen, C., Winkler, F. K. (1990). Refined crystal structure of  $\beta$ -lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for  $\beta$ -lactam hydrolysis. *Nature*, 343: 284-288.
- Oelschlaeger, P. (2008). Outsmarting metallo- $\beta$ -lactamases by mimicking their natural evolution. *J of Inorganic Biochem* 102 :2043-2051.
- Okabe, A., Matsushita, O., Katayama, S.-I., Hayashi, H. (1986). Lincomycin stimulates synthesis of TEM-2  $\beta$ -lactamases by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30: 82-87.
- Page, M. G. P. (1993). The kinetic of non-stoichiometric bursts of  $\beta$ -lactam hydrolysis catalysed by class C  $\beta$ -lactamases. *Biochem. J.*, 295: 295-304.
- Page, M. I. (1999). The reactivity of  $\beta$ -lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of  $\beta$ -lactamases. *Curr. Pharmaceutical design*, 5: 895-913.
- Papanicolaou, G. A., Medeiros, A. A., Jacoby, G. A. (1990). Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxymino- and a-methoxy  $\beta$ -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 2200-2109.
- Paul-Soto, R., Hernandez-Valladares, M., Galleni, M., Bauer, R., Zeppezauer, M., Frère, J.-M., Adolph, H.-W.(1998). Mono and Binuclear Zn -  $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*: catalytic and structural roles of the zinc ions. *FEBS Letters* , 438: 137-140.
- Payne, D. J., Cramp, R., Winstanley, D. J., Knowles, D. J. C. (1994). Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38: 767-772.
- Petersino, J., Rudgers, G., Gilbert, H., Palzkill, T. (1999). Contribution of aspartate 49 and phenylalanine 142 residues of a tight binding inhibitory protein of  $\beta$ -lactamases. *J. Biol. Chem.*,

274(4): 2394-2400.

**Philippon, A., Dusart, J., Joris, B., Frère, J-M.** (1998). The diversity, structure and régulation of  $\beta$ -lactamases. *CMLS. Cell. MoL. Life Sci.*, 54: 341-346.

**Prinarakis, E., Miiagou, V, Tzelepi, E., Gazouli, M., Tzouvelekis, L. S.** (1997). Emergence of an inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 838-840.

**Quinting, B., Galleni, M., Timm, J., Gicquet, B., Amicosante, G., Frère, J-M.** (1997). Purification and properties of the *Mycobacterium smegmatis* mc2155  $\beta$ -lactamase. *FEMS Microbiol. Letters*, 149: 11-15.

**Rahil, J., Pratt, R. F.** (1994). Characterization of covalently bound enzyme inhibitors as analogs by protein stability measurements : phosphonate monoester inhibitors of a  $\beta$ -lactamase . *Biochem.*, 33 : 116-125.

**Raquet, X., Lamotte-Brasseur, J., Bouillenne, F., Frère, J-M.** (1997). A disulfide bridge near the active site of carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamases might explain their unusual substrats profile. *Proteins : Structure, Function, and Genetics*, 27: 47-58.

**Reading, C., Farmer, T.** (1981).The inhibition of  $\beta$ -lactamases from Gram-negative bacteria by clavulanic acid. *Biochem. J.*, 199: 779.

**Richmond, M. H., Sykes, R. B.** (1973).The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role., *Adv. Microb. Physiol.*, 9: 31-88.

**Richter, H. G. F., Angehrn, P., Hubschwerler, C., Kania, M., Page, M. G. P., Specklin, J.-L., Winkler, F. K.** (1996). Design, synthesis and évolution of 2beta-alkenyl penam sulfoné acids as inhibitors of beta-lactamases. *J. Nied. Chem.*, 39: 3712-3722.

**Riov, J., Gottlieb, H.E.** (2006) Metabolism of auxin in pine tissues:Indole-3-acetic acid conjugation. *oPhysiologia Plantarum*. 50: 347-352.

**Robert J. Williams, Jeremy P. E. Spencer, and Catherine Rice-Evans.** (2004). Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules,*Free Radical Bio & Medicine*, Vol. 36, No. 7, pp. 838 -849.

**Rogers, J. C., Williams, D. L.** (1989). Kaempferol inhibits myosin light Chain kinase. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 164: 419-425.

**Rudgers, G. W., Palzkill, T.** (1999). Identification of residues in  $\beta$ -lactamase critical for binding  $\beta$ -lactamase inhibitory protein. *J. Biol. Chem.*, 274(11): 6963-6971.

**Sanders, C. C., Sanders, W. E. Jr.** (1992).  $\beta$ -lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.*, 15: 824-839.

**Saudagar, P, S., Survase, S, A., Singhal, R, S.** (2008). Clavulanic acid: A review. *Biotechnology Advances* 26 : 335-351.

**Saves, I., Bulet-Schiltz, O., Swrén, P., Lefèvre, F., Masson, J.-M., Promé, J.-C., Samarra, J.-P.**

- (1995). The asparagine to aspartic acid substitution at position 276 of TEM-35 and TEM-36 is evolved in the  $\beta$ -lactamase resistance to penicillins. *J. Biol. Chem.*, 270: 18240-18245.
- Sawai, T., Mitsushashi, S., Yamagishi, S. (1968). Drug resistance of enteric bacteria. Comparison of  $\beta$ -lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to  $\alpha$ -aminobenzyl penicillin. *J. Microbiol.*, 12:423-434.
- Seetulsingh, P. S., Hall, L. M. C., Livermore, D. M. (1991). Activity of clavulanate combinations against TEM-1  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolates obtained in 1982 and 1989. *J. Antimicrob. Chemother.*, 27: 749-759.
- Sevim, B., Fevzi Topal, Murat S., entürk, İlhami Gülçin, Claudiu T. Supuran. (2011). In vitro inhibition of a-carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds *Bioorg. Med. Chem. Lett.*
- Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M. (2009). *in vitro* flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *F Chem* 112 :885–888.
- Silva, J., Aguilar, C., Ayala, G., Estrada, M. A., Garza-Ramos, U., Lara-Lemus, R., Ledezma, L. (2000). TLA-1 : a new plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 997-1003.
- Sirot, D., Labia, R., Pouedras, P., Chanal-Claris, C., Cerceau, C., Sirot, J. (1998). Inhibitor-resistant OXY-2-derived  $\beta$ -lactamase produced by *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 2184-2187.
- Song, D. G., Lorenzo, B., Reidenberg, M. M. (1992). Inhibition of 11-p-hydroxysteroid dehydrogenase by gossypol and bioflavonoids. *J. Lab. Clin. Med.*, 120: 792-797.
- Spedding, G., Ratty, A., Middleton, E. (1989). Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. *Antiviral. Res.*, 12: 99-110.
- Speldooren, V., Heym, B., Labia, R., Chanal-Claris, C. (1998). Discriminatory detection of inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 879-884.
- Stapleton, P., Wu, P G., King, A., Shannon, K., Frenc, G., Phillips, L. (1995). Incidences and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 2478-2483.
- Struelens, M, J.Villalobos, H,R.(2006). Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation* 15 : 205-213.
- Strynadka, N. C., Adachi, H., Jensen, S E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K., James, M N. (1992). Molecular Structure of acyl-enzyme intermediate in  $\beta$ -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature*, 359: 700.
- Strynadka, N. C., Jensen, S E., Alzari, P M., James, M N J. (1996). A potent new mode of  $\beta$ -lactamase inhibition revealed by X-ray crystallographic structure of the TEM-1-BLIP complex.. *Nature. Struct. Biol.*, 3: 290.
- Strynadka, N. C., Jensen, S. E., Johns, K. (1994). Structural and kinetic characterization of a

$\beta$ -lactamase-inhibitor protein. *Nature*, 368: 657.

Suh, B., Shapiro, T., Jones, R., Satishchandran, V., Truant, A. L. (1995). In vitro activity of  $\beta$ -lactamase inhibitors against clinical isolates of *Acinetobacter* species. *Diagn. Microb. Infect. Dis.*, 21: 11-114.

Sutherland, R. (1995).  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: -Development, antibacterial activity and clinical applications. *Infection*, 23(4): 191-200.

Swaren, P., Goleni, D., Çabantous, S., Bolychev, A., Maveyraud, L., Mobashery, S., Samama, J P. (1999). X-ray structure of the NMC-A  $\beta$ -lactamase at 1.64 Å resolution, a class A carbapenemase with broad substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 273: 26714-26721.

Swaren, P., Maveyraud, L., Guillet, V., Masson, J M., Mouret, L., Samama, J P. (1995). Electrostatic analysis of TEM-1  $\beta$ -lactamase: effect of substrate binding, steep potential gradients and consequences of site-directed mutations. *Struct.*, 3: 603-613.

Sykes, R B., Matthew, M. (1976). The  $\beta$ -lactamases of gram negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2: 115-157.

Tan, G. T., Lee, S., Lee, I. S., Chen, J., Leitner, P., Besterman, J. M., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M (1996). Natural product inhibitors of human DNA ligase I. *Biochem. J.*, 314: 993-1000.

Thull, U., Testa, B. (1994). Screening of unsubstituted cyclic compounds as inhibitors of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 47 : 2307-2310.

Tim Cushnie, T.P. Lamb, Andrew J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26 : 343-356.

Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Bourgou, S., Hajlaoui, H., Chedly, A. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *WT - Food Science and Technology* 43 :632-639.

Tranier, S., Bouthors, A-T., Maveyraud, L., Guillet, V., Sougakoff, W., Samama, J-P. (2000). The high resolution crystal structure for class A  $\beta$ -lactamase PER-1 reveals the bases for its increase in breadth of activity. *J. Biol. Chem.* 275(36): 28075-28082.

Tzouvelekis, L. S., Gazouli, M., Prinarakis, E. E., Tzelepi, E., Legakis, N. J. (1997a). Comparative evaluation of the inhibitory activities of the novel penicillanic acid sulfone Ro 48-1220 against  $\beta$ -lactamases that belong to groups 1, 2b and 2be. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 475-477.

Tzouvelekis, L. S., Prinarakis, E. E., Gazouli, M., Miriagou, V., Tzelepi, E., Legakis, N. J. (1996). *In vitro* activity of cefetamet against enterobacteria expressing an SHV-5-type  $\beta$ -lactamase. *Chemotherapy*, 42(5): 324-328.

Tzouvelekis, L. S., Zissis, N. P., Gazouli, M., Tzelepi, E., Legakis, N. J. (1997b). *In vitro* comparative assessment of  $\beta$ -lactamase inhibitors and their penicillin combinations against selected enterobacteria. *Intern. J. Antimicrob. Agents*, 8: 193-197.

## المخلص:

تم تحضير مستخلصين فينولينين منزوع وغير منزوع الدسم من طحين بذور *Nigella sativa* L. ودراسة محتواهما الكمي من عديدات الفينول فكان في حدود 768 و 890.66 ميكروغرام مكافئ الحمض gallique/مل، على الترتيب؛ ومن الفلافونويدات فكان 18.00 و 18.35 ميكروغرام مكافئ rutin/مل، على الترتيب. كشفت دراستهما النوعية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عن تباين ضعيف فيما بينهما. كلاهما يحتوي على الحمض غاليك، كرسيتين، ريتين؛ زيادة على هذا يحتوي غير منزوع الدسم على كونفيرول و/أو فانلين.

تم تحضير ثلاث مستخلصات خام لمميهة الحلقة  $\beta$ -lactam ابتداء من عزلة سريرية لـ *E.coli* ولـ *K.pneumoniae* و *Acinetobacter* المقاومة للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -lactams و تقدير محتواها البروتيني فكان في حدود 80.30 و 48.56 و 36.73 مل/مغ مستخلص إنزيمي خام، على الترتيب. أظهرت الدراسة الحركية للنشاط الإماهي للمستخلصات الإنزيمية الخام للعزلة *E.coli* و *K.pneumoniae* و *Acinetobacter* أنها تميته النيتروسيدين بثابت ميخائيليس قدره 13.51 و 17.73 و 9.42 ميكرومولار، على الترتيب؛ وبسرعات قصوى قدرها 308.64 و 108.93 و 168.35 ميكرومول/مغ/د، على الترتيب؛ مبدية تفاوتاً في شراهة التثبيط وتفاوتاً في النشاط الإماهي. بين إستنساخ هذه الدراسة الحركية في وجود EDTA أو واحد من ثلاثة مثبطات كلاسيكية علاجية (الحمض clavulanic، sulbactam، tazobactam) أن النشاط الإماهي للأول و الثاني غير حساسان لـ EDTA وحساسان للحمض clavulanic (ثا. ميخائيليس = 20.87، 23.92 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 18.43، 28.75 ميليمولار، على الترتيب) ولـ sulbactam (ثا. ميخائيليس = 23.31، 27.17 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 10.79، 14.7 ميليمولار، على الترتيب) ولـ tazobactam (ثا. ميخائيليس = 28.16، 25 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 6.14، 11.32 ميليمولار، على الترتيب) إذ تثبط هذه الجزينات هذا النشاط الإماهي تثبيطاً تنافسياً. بينت أيضاً أن النشاط الإماهي للثالث حساس لـ EDTA (ثا. ميخائيليس = 21.27 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 3.97 ميكرومولار) إذ يثبطه تثبيطاً تنافسياً وغير حساس للمثبطات الكلاسيكية. يدعم هذا إمكانية إحتواء المستخلصين الإنزيميين الأول و الثاني على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بحمض أميني سيرين، و المستخلص الإنزيمي الثالث على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك. خلافاً للمستخلص الإنزيمي للعزلة *E.coli* و *K.pneumoniae*، بين إستنساخ نفس الدراسة الحركية في وجود المستخلص الفينولي منزوع وغير منزوع الدسم لبذور *Nigella sativa* L. أن النشاط الإماهي للمستخلص الإنزيمي للعزلة *Acinetobacter* حساس لهما وأكثر حساسية للثاني (ثا. ميخائيليس = 24.5 ميكرومولار؛ ثا. تثبيط = 66.08، 0.38 ميكرومولار مكافئ الحمض gallique، مكافئ rutin، على الترتيب) إذ يثبط هذا النشاط الإماهي تثبيطاً تنافسياً. يمكن إرجاع هذا التثبيط إلى خاصية الفلافونويدات على إستقلاب أيونات العناصر الفلزية و هذا بحكم أن النشاط الإماهي لهذا المستخلص الإنزيمي مرده إحتوائه على مميهة الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بأيون زنك.

الكلمات المفتاح: مميهات الحلقة  $\beta$ -lactam بموقع نشط بفلز، *Nigella sativa* L.، الفلافونويدات.

## Abstract:

### Metallo- $\beta$ -lactamase.

-Research of producing bacterial strain.

-Sensitivity of enzymatic activity to polyphenolic extracts from *Nigella sativa* seeds.

Two phenolic extracts lipidic and non lipidic from *Nigella sativa* L. seeds have been prepared. The quantitative analysis of polyphenols showed that the lipidic extract contained 890.66 ug gallic acid equivalent (GAE)/ml, while the non lipidic extract contained 768 ug GAE/ml. The flavonoids concentration in lipidic and non lipidic extracts was 18.35 and 18 rutin equivalent (RE) /ml, respectively. The qualitative analysis by a thin layer chromatography showed a slight difference between the two extracts. Both of them contained gallic acid, quercetin and rutin. In addition, the lipidic extract contains kaempferol and/or vanillin.

The crude extract of  $\beta$ -lactamase had been prepared from a clinical isolates of *E. coli*, *K.pneumoniae* and *Acinetobacter* all resistant to the antibiotic  $\beta$ -lactams. Total proteins have been quantified as : 80.30, 48.56 and 36.73 mg proteins/ml crude enzymatic extract, respectively. The study of the hydrolysis kinetics of crude enzymatic extracts from *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Acinetobacter* isolates showed that all of them hydrolyse the nitrocefin with  $K_m=13.51$ , 17.73 and 9.42 $\mu$ M successively and with  $V_{max}$  of 308.64, 108.93 and 168.35  $\mu$ mol/g/min, respectively. That exhibits a difference in their affinity and hydrolysis activity. When reproducing the same kinetic study in presence of EDTA and three classical therapeutic inhibitors (clavulanic acid, sulbactam, tazobactam), it was noted that both the first and the second enzymatic extract were not sensitive to EDTA but sensitive to the clavulanic acid ( $K_m=20.87$ , 23.92  $\mu$ M;  $K_i=18.43$ , 28.75 mM), to sulbactam ( $K_m=23.31$ , 27.17;  $K_i=10.79$ , 14.7mM) and to tazobactam ( $K_m=28.16$ , 25 $\mu$ M;  $K_i=6.14$ , 11.32 mM). These molecules inhibit competitively the hydrolysis activity. It was noted equally that the hydrolysis activity of the third extract was sensitive to EDTA which inhibits it competitively ( $K_m=21.27\mu$ M,  $K_i=3.97\mu$ M) and was not sensitive to the classical inhibitors. This means that the first and second enzymatic extracts probably contain a  $\beta$ -lactamase with an active site with serine, while the third could contain a  $\beta$ -lactamase with an active site with zinc ion.

Contrarily to enzymatic extracts from isolates of *E. coli* and of *K. pneumoniae*, the reproduction of the same kinetic study in the presence of lipidic and non-lipidic phenolic extracts from *Nigella sativa* L. seeds showed that the hydrolysis activity of the enzymatic extract from *Acinetobacter* isolate was sensitive to both extract with more sensitivity toward the second ( $K_m=24.5$   $\mu$ M,  $K_i=66.08$ , 0.38  $\mu$ M GAE and RE, respectively). Both inhibit the hydrolysis activity in competitive manner. This inhibition can be attributed to the property of flavonoids to chelate metal ions since the hydrolysis activity of this enzymatic extract is due to the  $\beta$ -lactamase with an active site with zinc ion.

**Key words:** Metallo- $\beta$ -lactamase, *Nigella sativa* L. , Flavonoids.