

УДК 577.152.3

©Коллектив авторов

ЗАМЕЩЁННЫЕ 1,5,6,7-ТЕТРАГИДРО-4Н-БЕНЗИМИДАЗОЛ-4-ОНЫ – ИНГИБИТОРЫ УРЕАЗЫ

Е.И. Тарун, Т.А. Желдакова, Д.И. Метелица*

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск,
ул. акад. Купревича, 5/2; факс: (375)-(172)63-7274; эл. почта: ktarun@tut.by

Проведено сравнительное кинетическое исследование ингибирования уреазного гидролиза мочевины девятью замещёнными 1,5,6,7-тетрагидро-4Н-бензимидазол-4-онами (БИ I-IX). Ингибирование носит обратимый конкурентный характер; определены константы ингибирования K_i , меняющиеся в зависимости от структуры БИ I-IX от 29 до 754 мкМ, обсуждена связь эффективности ингибирования гидролиза мочевины со структурой замещённых БИ I-IX, три из которых с K_i от 29 до 82 мкМ могут быть использованы в практике в качестве потенциальных хемотерапевтических средств в гастроэнтерологии при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

Ключевые слова: уреазы соевых бобов, ингибирование, замещённые 1,5,6,7-тетрагидро-4Н-бензимидазол-4-оны, мочевина, константы ингибирования.

ВВЕДЕНИЕ. Уреаза из соевых бобов (КФ 3.5.1.5) - гомогексамерный фермент, содержащий 6 субъединиц с мол. массой 90770 Да и по 2 молекулы никеля в каждой субъединице, - с высокой активностью и специфичностью катализирует гидролиз мочевины водой с образованием катионов аммония и карбонат-анионов [1]. Несмотря на большую важность уреаз в медицине и биотехнологии и неослабевающий интерес к ним во многих лабораториях, детальный механизм гидролиза мочевины до сих пор не установлен, а структура металлоцентра, содержащего два атома никеля, точно неизвестна [1-3].

Важным инструментом изучения механизма действия уреаз является ингибирование и активация этих ферментов с использованием в качестве потенциальных ингибиторов химических соединений, имитирующих субстрат уреаз - мочевины или соединений, блокирующих атомы никеля в активном центре фермента, так как они ответственны за связывание субстрата и играют ключевую роль в механизме гидролиза мочевины [2, 3].

Принятые сокращения: БИ – замещённые 1,5,6,7-тетрагидро-4Н-бензимидазол-4-оны, ДМФ – диметилформамид, In – ингибиторы уреазного гидролиза мочевины.

* - адресат для переписки

В последние 15 лет проблема ингибирования уреаз приобрела важное практическое значение для медицины. Оказалось, что уреаз продуцируемая многими микроорганизмами, непосредственным образом связана с такими патологиями, как язва двенадцатиперстной кишки и желудка, а также с целым рядом заболеваний мочевых путей человека и животных [2-6]. Подавляющая часть белка таких микроорганизмов, как *Helicobacter pylori*, *Klebsiella aerogenes* и многих других, - уреазы, которые в кислых средах желудка гидролизуют мочевины пищи и создают "комфортную" среду для выживания и размножения патогенных микроорганизмов [2-6]. В настоящее время общепризнанно, что кампилобактерподобные микроорганизмы - одна из главных причин язвенных болезней желудка [7], а хеликобактериоз желудка - одно из актуальных направлений исследований в гастроэнтерологии [8]. Патогенность *H. pylori* при язвенной болезни и эффективность лечения данной формы патологии при эрадикации микроба *H. pylori* четко доказаны [7, 8]. В настоящее время во многих лабораториях мира проводятся широкие исследования средств ингибирования микробных уреаз и механизма их действия [2-8]. Эффективность ингибирования одними и теми же соединениями может различаться для уреаз из разных источников, однако корреляции между ингибирующими свойствами одних и тех же веществ для уреаз микробного и растительного происхождения вполне возможны [2, 3, 9]. По этой причине первичный отбор потенциальных ингибиторов уреаз проще и быстрее проводить при использовании уреазы соевых бобов [2, 3, 9].

В настоящее время все известные ингибиторы уреаз можно условно разделить на четыре большие группы: первую группу образуют тиоловые соединения, поскольку тиолат-анионы непосредственно реагируют с металлоцентрами уреаз [2, 3]; вторая многочисленная группа ингибиторов - гидроксамовая кислота и её производные [2, 6, 9]; третья группа наиболее эффективных ингибиторов включает замещенные фосфородиамидаты $RO-PO(NH_2)_2$ [2, 3, 9], для одного из которых - фенилфосфородиамидата - достигнута рекордная ингибирующая эффективность ($K_i = 9,4 \cdot 10^{-11}$ М) [9]; четвертую группу составляют лиганды - хелаторы никеля, среди которых выделяется анион F^- [10], а также некоторые пептиды, проявляющие умеренную ингибирующую эффективность, ($K_i = (3,0-4,7) \cdot 10^{-5}$ М [11].

С 2001 г. в нашей лаборатории проводится систематическое изучение потенциальных ингибиторов уреазы соевых бобов различного строения, имитирующих структуру субстрата - мочевины [12], или проявляющих хелаторные свойства по отношению к атомам никеля: исследованы тиофосфамиды [12], фторид-анион и циклические β -трикетоны [13], оксими β -трикетонов [14] и поликарбонильные соединения разной природы, среди которых полидисульфид оксалилдигидразида [15], барбитуровая кислота и её производные [16].

Как видим, предложены и интенсивно развиваются различные способы ингибирования уреаз, а некоторые производные гидроксамовой кислоты уже используются в клинической практике. Однако задача создания и изучения новых средств ингибирования уреаз остается чрезвычайно актуальной, но довольно сложной, так как эффективные ингибиторы уреаз должны быть нетоксичны, чтобы стать потенциальными хемотерапевтическими агентами - лекарствами XXI века [17].

Цель данной работы - сравнительное кинетическое исследование ингибирования уреазы соевых бобов органическими хелаторами никеля - девятью замещенными бензимидазонами, структурные формулы которых представлены на рисунке 1. Выбор соединений I-IX в качестве потенциальных ингибиторов уреазы обусловлен наличием в их молекулах соседних атомов карбонильного кислорода и азота имидазола в различном окружении.

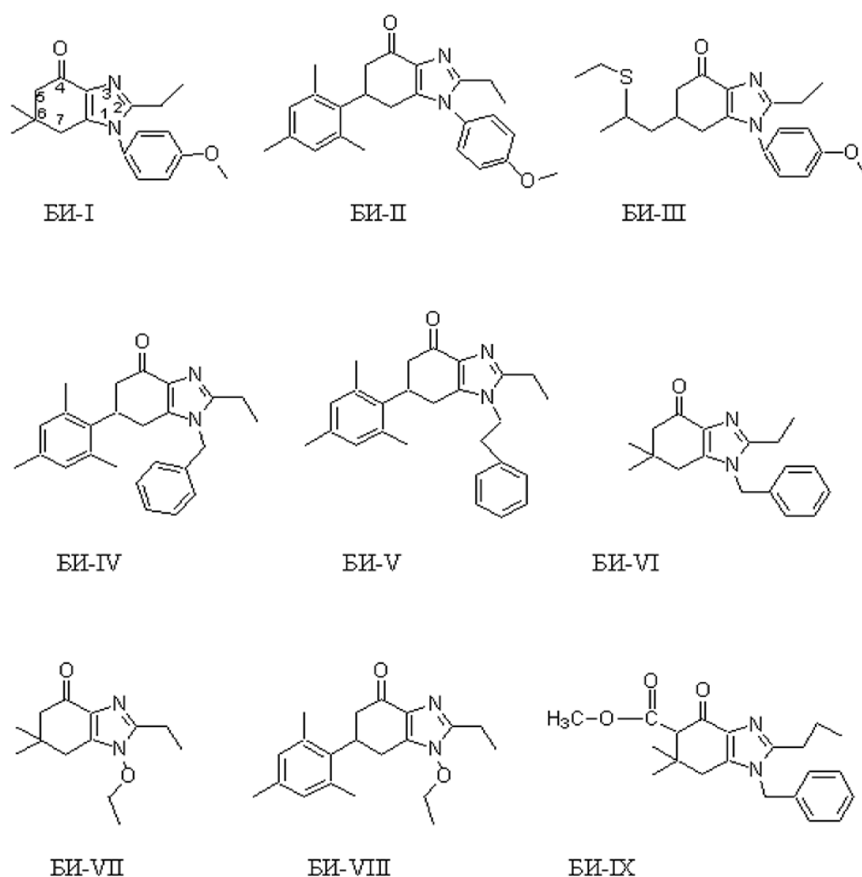


Рисунок 1.

Структурные формулы соединений БИ I-IX.

МЕТОДИКА.

Реагенты. В работе использовали уреазу соевых бобов (“Биолар”, Латвия) с исходной активностью 1032 единицы Самнера на 1 г и мочевины марки о.с.ч. в качестве субстрата, ЭДТА и диметилформамид (ДМФ) (“Реахим”, Россия). ДМФ перед употреблением перегоняли. Концентрацию уреазы рассчитывали по удельному коэффициенту поглощения фермента $A_{1\text{см}}^{1\%}$ при 280 нм, равному 6,2 [18]. В качестве рН-индикатора использовали бромкрезоловый зеленый (“Реахим”), а приготовление его растворов проводили, как описано в монографии [19].

Потенциальные ингибиторы уреазы. Производные ряда 1,5,6,7-тетрагидро-4H-бензимидазол-4-онов I-IX (см. рис. 1) были синтезированы и охарактеризованы по методикам, описанным ранее в работе [20].

Определение каталитической активности уреазы в присутствии ингибиторов и без них. Для решения поставленных в работе задач необходимо измерение начальных скоростей гидролиза мочевины с высокой точностью при низких концентрациях уреазы в условиях подавления ее активности ингибиторами, что может обеспечить только спектрофотометрический мониторинг активности уреазы с использованием рН-индикаторов [12-16].

Для приготовления субстратных смесей к 100 мл водного раствора мочевины (0,03 М) добавляли ЭДТА до конечной концентрации 0,05 мМ для связывания примесных ионов тяжелых металлов. Согласно [19], бромкрезоловый зеленый растворяли в смеси, содержащей 0,2 мл 0,05 М NaOH и 0,3 мл H₂O. Раствор красителя добавляли к раствору мочевины и доводили рН смеси до необходимого начального значения 3,85, используя HCl и 0,05 М NaOH.

Гидролиз мочевины в присутствии ингибиторов (In) и без них проводили при 36°C. Общий объем смеси составлял 0,8 мл. К 0,69 мл исходного раствора

ЗАМЕЩЕННЫЕ БЕНЗИМИДАЗОЛЫ - ИНГИБИТОРЫ УРЕАЗЫ

субстратной смеси добавляли 0,1 мл раствора уреазы в воде и 0,01 мл раствора ингибиторов в ДМФ. Конечные концентрации реагентов в реакционной смеси составляли: 10 нМ для уреазы и 0,026 М для мочевины. Конечные концентрации ингибиторов меняли в пределах, указанных в таблице.

Таблица. Характеристики ингибирования уреазного гидролиза мочевины соединениями БИ I-IX в водном растворе, pH 3,85 при 36°C: 10 нМ уреазы, 26 мМ мочевины, бромкрезоловый зеленый (25,2 мкМ) в качестве pH-индикатора.

БИ	Интервал концентраций БИ в мкМ	Величина $[In]^*$, мкМ	Величина K_i , мкМ
I	10-100	55	29,3
II	10-100	87	49,5
III	10-100	143	81,7
IV	10-200	185	106
V	10-100	296	169
VI	100-1000	630	358
VII	100-1000	780	446
VIII	100-1000	990	566
IX	100-1000	1320	754

В ходе гидролиза мочевины в присутствии ингибиторов и без них следили за изменением поглощения pH-индикатора при длине волны 620 нм и строили кинетические кривые в координатах “поглощение – время”. Все измерения проводили на спектрофотометре Specol-221 (“Carl Zeiss”, Германия) при 36°C. Первый отсчет проводили по поглощению света субстратной смесью без ингибиторов.

Начальную скорость реакции v_0 определяли по начальным линейным участкам кинетических кривых и выражали в условных единицах изменения поглощения в 1 с (отн. ед.), принимая ее за 100% в отсутствие ингибиторов.

Количественная характеристика эффективности ингибиторов уреазы. Для определения типа ингибирования уреазы производными бензимидазолонов (БИ) I-IX строили зависимости v_0 от начальной концентрации мочевины в двойных обратных координатах (метод Лайнуивера-Берка). Константы ингибирования K_i определяли по методу Диксона из зависимостей в координатах $1/v_0 - [In]_0$, где $[In]_0$ – возрастающая концентрация ингибитора при разных начальных концентрациях мочевины: такие зависимости строили для БИ-I, II и VI. Для остальных БИ линейные зависимости в координатах Диксона строили только при одной концентрации мочевины (0,026 М), графически определяли величину отрезка, отсекаемого на оси абсцисс $[In]^*$ и вычисляли K_i по уравнению (1), которое справедливо в случае обратимого конкурентного ингибирования [21]:

$$[In]^* = K_i ([S]_0 / K_m + 1) \quad (1),$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата, а K_m – константа Михаэлиса в отсутствие ингибитора. В таблице приведены графически определенные значения $[In]^*$ и вычисленные величины K_i при 36°C для всех БИ I-IX. Точность определённых величин K_i составляет ~ 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Нами многократно показано, что в отсутствие ингибиторов и в присутствии соединений БИ I-IX зависимости начальной скорости гидролиза мочевины уреазой от концентрации субстрата описываются уравнением Михаэлиса-Ментен, линеаризация которого в координатах Лайнуивера-Берка для БИ-I показана на рисунке 2а, четко доказывающем обратимый конкурентный тип ингибирования. Представление данных в координатах Диксона (рис. 2б) дало возможность графически определить для БИ-I величину $K_i = 29,3$ мкМ, свидетельствующую о довольно высокой ингибирующей активности этого соединения. Аналогичные зависимости Лайнуивера-Берка и Диксона получены для соединений БИ-II и БИ-VI (рис. 3 а, б) и определены величины K_i , равные соответственно 49,5 и 358 мкМ (табл.).

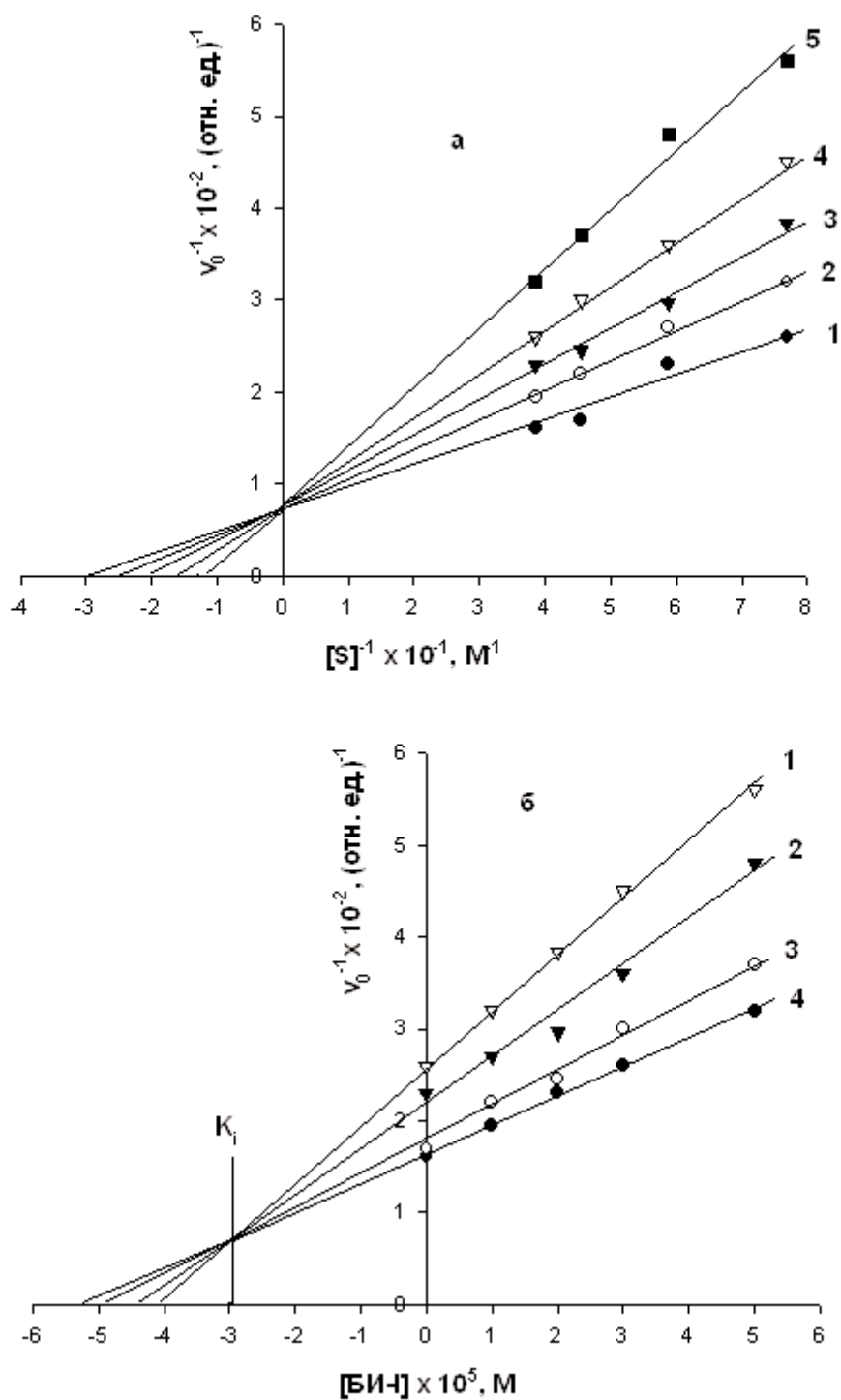


Рисунок 2.

Зависимости обратной начальной скорости уреазного гидролиза мочевины от обратной концентрации субстрата (а) и концентрации ингибитора БИ-I (б) при 36°C в водном растворе, pH 3,85:
 а - 1 - 0, 2 - 10, 3 - 20, 4 - 30 и 5 - 50 мкМ БИ-I;
 б - 1 - 13, 2 - 17, 3 - 22 и 4 - 26 мМ мочевины.

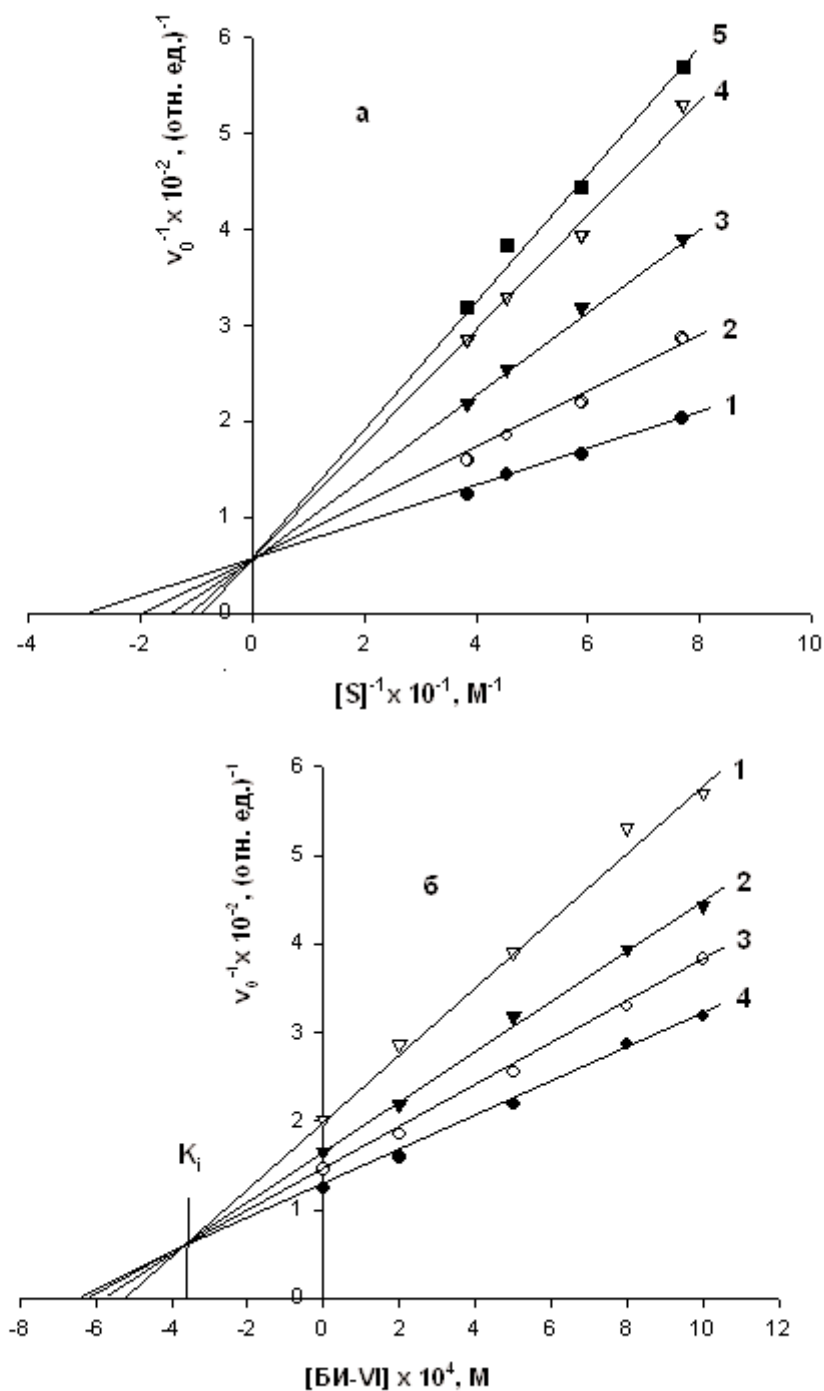


Рисунок 3.

Зависимости обратной начальной скорости уреазного гидролиза мочевины от обратной концентрации субстрата (а) и концентрации ингибитора БИ-VI (б) при 36°C в водном растворе, pH 3,85:

а - 1 - 0, 2 - 0,2, 3 - 0,5, 4 - 0,8 и 5 - 1,0 мМ БИ-VI;

б - 1 - 13, 2 - 17, 3 - 22 и 4 - 26 мМ мочевины.

Для остальных БИ зависимости Диксона получены только при одной концентрации субстрата (0,026 М) и для соединений IV, VII и VIII они представлены на рисунке 4. Используя графически определенные значения $[In]^*$ и уравнение (1), вычислены величины K_i , сопоставленные в таблице.

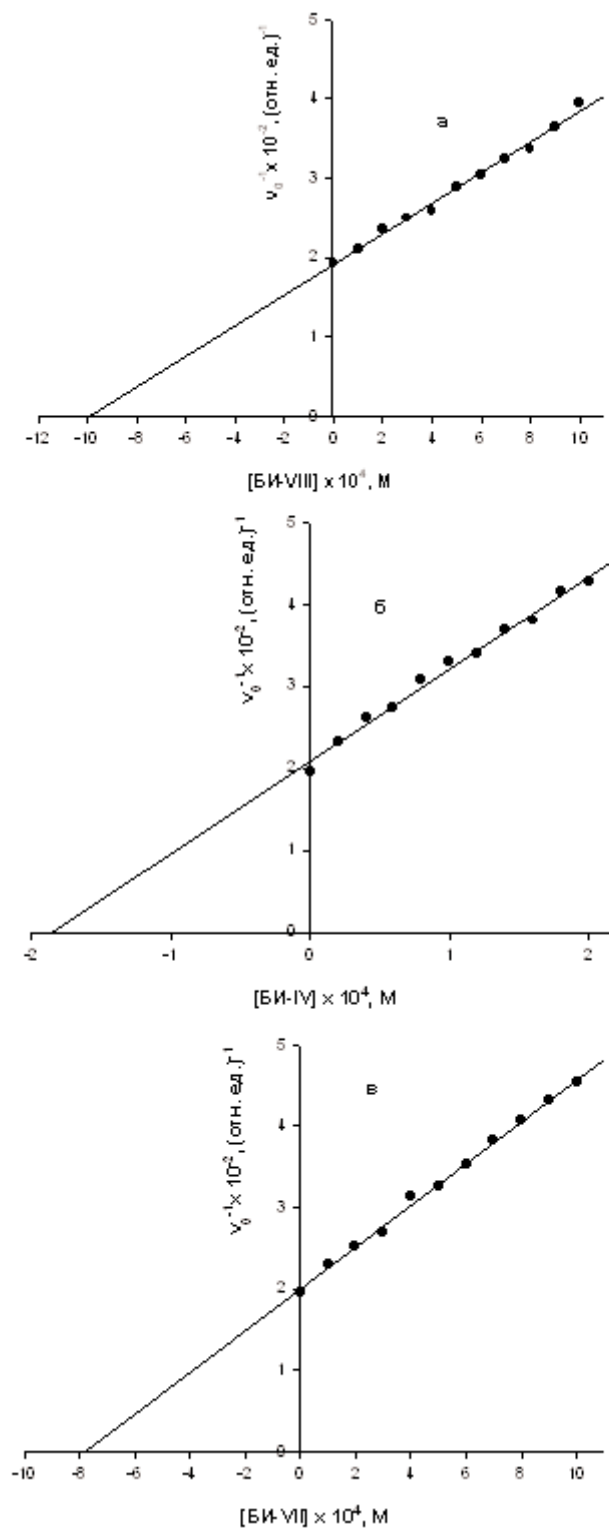


Рисунок 4.

Зависимости обратной начальной скорости уреазного гидролиза мочевины от концентрации ингибиторов БИ-VIII (а), БИ-IV (б) и БИ-VII (в) при 36°C в водном растворе, pH 3,85 при начальной концентрации мочевины 0,026 М.

Из полученных нами данных (рис. 2-4, табл.) следует, что все использованные БИ I-IX по обратимому конкурентному типу ингибируют уреазный гидролиз мочевины при 36°C и pH водного раствора 3,85 с разной эффективностью, которая отражается величинами K_i , изменяющимися в диапазоне 29,3–754 мкМ. Эффективность ингибирующего действия определяется наличием в соединениях I-IX (рис. 1) соседних атомов карбонильного кислорода и имидазольного азота и структурой других фрагментов их молекул. Кислород карбонильной группы и азот имидазола обладают высокой хелатирующей способностью по отношению к атомам никеля в активном центре шести субъединиц уреазы.

Отличительной чертой трех наиболее активных ингибиторов уреазы БИ I-III (табл.) является наличие в положении 1 их молекул *para*-метоксифенильного заместителя, который, вероятно, способствует благоприятной координации хелатирующих атомов кислорода в положении 4 и азота в положении 3 с атомами никеля в активном центре уреазы, что приводит к конкуренции БИ I-III с мочевиной за связывание в металлоцентрах фермента и объясняет обратимый конкурентный тип ингибирования.

Введение в положение 6 мезитильного заместителя в соединениях БИ-II, IV, V и VIII приводит к прогрессирующему росту величины K_i , так как создаёт стерические препятствия для проникновения в активный центр субъединиц уреазы и нарушает благоприятную для ингибирования координацию этих соединений в металлоцентрах фермента. Стерические препятствия возрастают также при замене N-бензильного заместителя в положении 1 (БИ-IV) на N-фенильный заместитель (БИ-V), что приводит к росту K_i от 106 до 169 мкМ (табл.). Введение оксиэтильного заместителя в положение 1 в соединениях БИ-VII и БИ-VIII приводит к резкому ухудшению ингибирующей способности этих соединений (K_i равны 446 и 566 мкМ соответственно). Наиболее слабым ингибитором оказалось соединение БИ-IX с метоксикарбонильной группой в положении 5 и алкильной цепью из трех звеньев в положении 2, что несомненно препятствует координации атомов кислорода (положение 4) и азота (положение 3) с никелем в активных центрах субъединиц уреазы: наличие этих заместителей в положениях 2 и 5 приводит к увеличению K_i в ~ 2 раза в сравнении с ее величиной для БИ-VI, у которого таких заместителей нет (K_i 358 мкМ).

Из сопоставления величин K_i для соединений БИ I-IX следует, что введение в их молекулы заместителей, создающих стерические препятствия для координации атомов карбонильного кислорода и имидазольного азота с атомами никеля в металлоцентрах уреазы, приводит к росту значений K_i , т.е. к снижению ингибирующей способности изученных соединений. С практической точки зрения несомненный интерес представляет соединение БИ-I, так как величина K_i 29,3 мкМ почти **на три порядка** ниже использованной концентрации мочевины (26 мМ) при проведении ингибированного гидролиза субстрата в кислой среде с pH 3,85.

Сравнение K_i для БИ-I (29,3 мкМ) в сопоставимых или близких условиях ингибирования уреазы с анионом F⁻ (K_i 36,5 мкМ) [13], цистеамином (K_i 5,0 мкМ) [3], тиофосаамидами (K_i 2,8 мкМ) [12], ацетогидроксамовой кислотой (K_i 2,6 мкМ) [3], циклическими β-трикетонами (K_i 58,4 мкМ) [13] показывает, что БИ-I как ингибитор эффективнее фторида, некоторых трикетонов, но уступает цистеамину и гидроксамовой кислоте. Соединения БИ-IV-IX практического значения не имеют, так как уровень их ингибирующих свойств не соответствует предъявляемым требованиям.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского Республиканского Фонда фундаментальных исследований по проекту X07-018.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dixon N.E., Riddles P.W., Gazzola C., Blakeley R.L., Zerner B. (1980) Can. J. Biochem., **58**, 1335-1344.
2. Rosenstein I.J.M., Hamilton-Muller J.M.T. (1984) CRC Crit. Rev. Microbiol., **11**, 1-12.
3. Mobley H.L.T., Island M.D., Hausinger R.P. (1995) Microbiol. Reviews, **59**, 452-480.
4. Odake S., Morikawa T., Tsuchiya M., Imamura L., Kobashi K. (1994) Biol. Pharm. Bull., **17**, 1329-1332.
5. Star R.A., Gillin A.D., Parikh V.J., Sands J.M. (1993) Am. J. Physiol., **265**, 385-390.
6. Odake S., Nakahashi K., Morikawa T., Takebe S., Kobashi K. (1992) Chem. Pharm. Bull., **40**, 2764-2768.
7. Циммерман Я.С. (1991) Сов. медицина, №7, 34-37.
8. Мараховский Ю.Х. (1998) Медицина. Журн. Белор. асс. врачей, №4, 9-10.
9. Todd M.J., Hausinger R.P. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 15835-15842.
10. Saboury A.A., Moosavi-Movahedi A.A. (1997) J. Enzyme Inhibition, **12**, 273-279.
11. Houimel M., Mach J.P., Cortesey-Theulaz I., Cortesey B. (1999) Eur. J. Biochem., **262**, 774-780.
12. Метелица Д.И., Тарун Е.И., Пучкаев А.В., Лосев Ю.П. (2001) Прикл. биохим. и микробиол., **37**, 190-196.
13. Тарун Е.И., Рубинов Д.Б., Метелица Д.И. (2004) Прикл. биохим. и микробиол., **40**, 398-406.
14. Тарун Е.И., Рубинов Д.Б., Метелица Д.И. (2004) Биохимия, **69**, 1649-1658.
15. Тарун Е.И., Рубинов Д.Б., Метелица Д.И. (2005) Прикл. биохим. и микробиол., **41**, 17-22.
16. Тарун Е.И., Рубинов Д.Б., Метелица Д.И. (2005) Весці НАН Беларусі, сер. хім. навук, №4, 52-56.
17. Машковский М.Д. (1998) Лекарства XX века, Новая волна, Москва, 319 с.
18. Takishima K., Suga T., Mamiya G. (1988) Eur. J. Biochem., **175**, 151-165.
19. Виноградова Е.Н. (1956) Методы определения концентрации водородных ионов, Изд-во МГУ, Москва, с. 45-52.
20. Рубинов Д.Б., Желдакова Т.А., Рубинова И.Л., Лахвич Ф.А. (2007) Ж. орг. химии, **44**, 1034-1040.
21. Келети Т. (1990) Основы ферментативной кинетики, Мир, Москва, с. 183-188.

Поступила: 28. 06. 2007.

SUBSTITUTED 1,5,6,7-TETRAHYDRO-4H-BENZIMIDAZOL-4-ONES AS INHIBITORS OF UREASE

E.I. Tarun, T.A. Zheldakova, D.I. Metelitsa

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Acad. Kuprevicha, 5/2,
Minsk, 220141 Belarus; fax: (375)-(172)63-7274; e-mail: ktarun@tut.by

A comparative kinetic study of the inhibition of urea hydrolysis by 9 substituted 1,5,6,7-tetrahydro-4H-benzimidazol-4-ones (BI I-IX) has been carried out. The inhibition had reversible competitive character; the inhibition constants K_i , varied from 29 up to 754 μM in dependence of the structure of BI I-IX. Three BI I-III, having the K_i values from 29 to 82 μM , may be used as the potential therapeutic agents for gastroenterology for treatment of stomach and duodenal ulcers.

Key words: soybean urease, urea, inhibition, substituted benzimidazols, inhibition constants.