

**Politechnika Wrocławska**  
**Wydział Chemiczny**  
**Katedra Chemii Bioorganicznej**

Rozprawa doktorska

Wojciech Tabor

**Inhibicja aktywności ureaz  
o zróżnicowanym pochodzeniu  
mikrobiologicznym**

Promotor: prof. dr hab. inż. Artur Mucha

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Grabowiecka

Wrocław 2023



# SPIS TREŚCI

<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....</b>	<b>9</b>
<b>1. STUDIA LITERATUROWE.....</b>	<b>11</b>
1.1. OPORNOŚĆ ANTYBIOTYKOWA I CZYNNIKI WIRULENCJI MIKROORGANIZMÓW PATOGENNYCH .....	11
1.1.1. Ureaza jako czynnik wirulencji <i>H. pylori</i> .....	15
1.1.2. Ureaza jako czynnik wirulencji <i>P. mirabilis</i> .....	18
1.1.3. Znaczenie ureazy <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	21
1.1.4. Ureaza <i>Staphylococcus saprophyticus</i> .....	25
1.2. UREAZY – INFORMACJE OGÓLNE I STRUKTURA.....	27
1.3. GŁÓWNE MECHANIZMY FUNKCJONOWANIA INHIBITORÓW UREAZ .....	31
1.3.1. Antybiotyki chinolonowe .....	31
1.3.2. Analogi mocznika i tiomocznika .....	33
1.3.3. Flawonoidy .....	35
1.3.4. Związki heterocykliczne.....	37
1.3.5. Związki fosforoorganiczne.....	39
1.3.6. Jony metali.....	41
1.3.7. Kwasy hydroksamowe .....	43
1.3.8. Związki selenoorganiczne .....	44
1.3.9. Grupy inhibitorów ureazy - podsumowanie.....	48
<b>2. CEL PRACY .....</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>50</b>
3.1. ODCZYNNIKI .....	50
3.2. ZWIĄZKI BADANE JAKO INHIBITORY UREOLIZY.....	50
3.3. SZCZEPY MIKROORGANIZMÓW .....	51

3.4. APARATURA .....	51
3.5. METODY .....	53
3.5.1. Stosowane metody pomiarowe.....	53
3.5.1.1. Pomiar aktywności ureolitycznej metodą indofenolową.....	53
3.5.1.2. Pomiar aktywności ureolitycznej poprzez monitorowanie zmian pH z użyciem czerwieni krezolowej .....	53
3.5.1.3. Warunki prowadzenia badań aktywności ureolitycznej.....	54
3.5.1.4. Pomiar stężenia białka metodą Bradforda .....	54
3.5.1.5. Określenie żywotności komórek mikroorganizmów metodą MTT .....	55
3.5.1.6. Określanie właściwości przeciwutleniających badanych związków.....	55
3.5.2. Hodowla komórek bakterii ureolitycznych .....	56
3.5.2.1. Pozyskiwanie biomasy <i>S. pasteurii</i> do procedury oczyszczania enzymu.....	56
3.5.2.2. Hodowla całych komórek ureolitycznych <i>P. mirabilis</i> .....	57
3.5.3. Pozyskiwanie aktywnych ureolitycznie komórek szczepu <i>C. neoformans</i> IHEM 3969 .....	57
3.5.3.1. Dobór warunków indukcji ureolizy w komórkach <i>C. neoformans</i> IHEM 3969.....	57
3.5.3.2. Wpływ stężenia mocznika i glukozy na indukcję ureolizy w modyfikowanym podłożu Christensena.....	58
3.5.3.3. Określenie wpływu mocznika na szybkość wzrostu komórek <i>C. neoformans</i> IHEM 3969.....	59
3.5.3.4. Określenie wpływu stężenia jonów niklu na wzrost komórek <i>C. neoformans</i> IHEM 3969.....	59

3.5.3.5. Otrzymywanie ureolitycznych komórek <i>C. neoformans</i> IHEM 3969 .....	59
3.5.4. Otrzymywanie oczyszczonej ureazy pochodzenia mikrobiologicznego .....	60
3.5.4.1. Dezintegracja komórek ureolitycznych i wstępne oczyszczenie preparatu białkowego .....	60
3.5.4.2. Wieloetapowa procedura chromatograficznego oczyszczania ureazy pochodzenia mikrobiologicznego ..	60
3.5.5. Analiza właściwości oczyszczonej ureazy .....	62
3.5.5.1. Określenie parametrów kinetycznych oczyszczonego enzymu .....	62
3.5.5.2. Dobór optymalnej temperatury.....	62
3.5.6. Badania aktywności potencjalnych inhibitorów ureazy względem oczyszczonego enzymu .....	63
3.5.6.1. Screening aktywności badanych związków.....	63
3.5.6.2. Wyznaczanie wartości $IC_{50}$ dla badanych związków .....	63
3.5.6.3. Określenie odwracalności inhibicji metodą <i>jump</i> <i>dilution</i> .....	64
3.5.6.4. Wyznaczenie wartości $K_i$ dla inhibitorów szybkowiązujących .....	65
3.5.6.5. Wyznaczenie wartości $K_i$ dla inhibitorów wolnowiązujących.....	67
3.5.6.6. Określenie udziału wiązania grupy tiolowej w mechanizmie inhibicji .....	71
3.5.7. Badanie wpływu inhibitorów na aktywność całych komórek mikroorganizmów .....	73
3.5.7.1. Określenie wartości $IC_{50}$ inhibitorów w przypadku ureolizy prowadzonej przez całe komórki .....	73

3.5.7.2. Badanie fluorescencyjne stresu oksydacyjnego w komórkach <i>C. neoformans</i> IHEM 3969 .....	74
3.5.7.3. Badanie wpływu ebselenu na aktywność reduktazy tioredoksyny w ekstrakcie komórkowym .....	74
3.5.8. Określenie wpływu aktywności wybranych pochodnych ebselenu na wzrost i żywotność <i>H. pylori</i> w formie biofilmu.....	75
3.5.8.1. Wyznaczenie MIC dla formy planktonicznej.....	75
3.5.8.2. Badanie wpływu inhibitorów selenoorganicznych w stężeniu MIC wobec formy planktonicznej na wzrost biofilmu.....	76
3.5.9. Wyznaczenie wpływu związków flawonoidowych na wzrost biofilmu bakteryjnego oraz żywotność komórek ....	76
3.5.9.1. Przygotowanie hodowli.....	76
3.5.9.2. Pomiar grawimetryczny .....	77
<b>4. BADANIA WŁASNE .....</b>	<b>79</b>
4.1. POZYSKIWANIE I WŁAŚCIWOŚCI UREAZ POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO.....	79
4.1.1. Ustalenie warunków hodowli bakterii ureolitycznych .....	79
4.1.2. Warunki hodowlane do indukcji ureolizy w komórkach <i>C. neoformans</i> IHEM 3969 .....	80
4.1.2.1. Dobór warunków indukcji ureolizy.....	80
4.1.2.2. Wpływ stężenia mocznika i obecności glukozy na indukcję ureolizy w modyfikowanym podłożu Christensena.....	82
4.1.2.3. Wpływ mocznika na wzrost komórek.....	83
4.1.2.4. Wpływ stężenia jonów niklu na szybkość wzrostu komórek.....	85

4.1.3. Oczyszczanie ureazy pochodzenia mikrobiologicznego .....	86
4.1.4. Analiza właściwości oczyszczonej ureazy z komórek <i>C. neoformans</i> IHEM 3969 .....	86
4.1.4.1. Określenie parametrów kinetycznych enzymu... 86	
4.1.4.2. Określenie optymalnej temperatury aktywności enzymatycznej .....	87
4.2. PODATNOŚĆ UREAZ POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO NA HAMOWANIE PRZEZ NOWE INHIBITORY .....	88
4.2.1. Badania aktywności analogów substratu .....	88
4.2.1.1. Badania aktywności związków zawierających fragment strukturalny tiomocznika jako inhibitorów ureazy bakteryjnej oraz ureolizy prowadzonej przez całe komórki mikroorganizmów .....	88
4.2.2. Badania aktywności związków fosfinianowych i fosfonianowych .....	97
4.2.2.1. Aktywność związków fosfonianowych opartych na strukturze kwasu cynamonowego, jako inhibitorów ureazy bakteryjnej .....	97
4.2.2.2. Badania zdolności grupy fosfonowych i fosfinowych pochodnych katecholu do hamowania aktywności oczyszczonej ureazy bakteryjnej oraz ureolizy prowadzonej w całych komórkach bakteryjnych .....	99
4.2.3. Badania aktywności związków selenoorganicznych	113
4.2.3.1. Badania zdolności grupy związków selenoorganicznych o łańcuchach alifatycznych do hamowania aktywności SPU .....	113
4.2.3.2. Badania aktywności grupy chiralnych związków selenoorganicznych jako inhibitorów SPU .....	117

4.2.3.3. Aktywność inhibitorowa N-podstawionych benzisoselenazol-3(2 <i>H</i> )-onów z podstawnikiem alkilowym lub fenylowym .....	122
4.2.3.4. Aktywność N-alkilowych i N-fenylowych pochodnych benzisoselenazol-3(2 <i>H</i> )-owych jako induktorów stresu oksydacyjnego w komórkach <i>C. neoformans</i> .....	141
4.2.3.5. Badania inhibicji – związki selenoorganiczne, N-podstawione benzisoselenazol-3(2 <i>H</i> )-ony z podstawnikiem benzylowym .....	143
4.2.3.6. Badania aktywności grupy fosfonowych pochodnych N-podstawionych benzisoselenazoloniów jako inhibitorów oczyszczonej ureazy i ureolizy prowadzonej w całych komórkach bakteryjnych.....	148
4.2.4. Badania aktywności związków flawonoidowych .....	155
4.2.4.1. Aktywność naryngeniny, jej pochodnych oraz ich oksymów jako inhibitorów wzrostu biofilmu bakterii patogennych .....	155
4.2.4.2. Aktywność pochodnych chalkonów jako inhibitorów wzrostu biofilmu bakterii patogennych.....	159
<b>5. PODSUMOWANIE .....</b>	<b>161</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>163</b>
<b>7. DOROBEK NAUKOWY AUTORA .....</b>	<b>175</b>
<b>8. STRESZCZENIE PRACY .....</b>	<b>178</b>
<b>9. ABSTRACT .....</b>	<b>178</b>



## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ATP - adenzyno-5'-trifosforan

CNU – ureaza z komórek *C. neoformans*

DMF - *N,N*-dimetyloformamid

DMSO - dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DPPH - 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl

DTNB - kwas 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowy

DTT - ditiotreitrol

EDTA - sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego

EI – kompleks enzym-inhibitor

ESKAPE – grupa mikroorganizmów obejmująca *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz rodzaj *Enterobacter*

GTP - guanozyno-5'-trifosforan

HPU – ureaza z komórek *H. pylori*

$IC_{50}$  - stężenie inhibitora hamujące 50% aktywności enzymatycznej

$IC_{90}$  - stężenie inhibitora hamujące 90% aktywności enzymatycznej

$K_d$  – stała dysocjacji

$K_i$  - stała dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor

$K_M$  – stała Michaelisa-Menten

LEV - lewofloksacyna

MIC – minimalne stężenie hamujące

MTT - bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-2*H*-tetrazoliowy

NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynoadeninowego

OD – gęstość optyczna hodowli lub zawiesiny mikroorganizmów

PES - polieterosulfon

PBS – buforowana sól fizjologiczna

SPU – ureaza z komórek *S. pasteurii*

Tris – tris(hydroksymetylo)aminometan

Trx - tioredoksyna

TrxR – reduktaza tioredoksyny

$v_{\max}$  – maksymalna szybkość reakcji katalizowanej przez enzym

# 1. STUDIA LITERATUROWE

## 1.1. OPORNOŚĆ ANTYBIOTYKOWA I CZYNNIKI WIRULENCJI MIKROORGANIZMÓW PATOGENNYCH

Antybiotyki to grupa substancji o udokumentowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej produkowanych naturalnie przez inne gatunki mikroorganizmów (najczęściej grzyby pleśniowe i promieniowce).<sup>1</sup> Są to metabolity wtórne, syntezowane w środowisku w stężeniach znacznie niższych niż stosowane w medycynie. Historyczne źródła literaturowe potwierdzają, że ludzkość stosowała antybiotyki do celów leczniczych już od czasów najwcześniejszych cywilizacji antycznych. Za przykład może posłużyć powszechne wykorzystywanie pleśni do zwalczania infekcji bakteryjnych przez starożytnych Egipcjan, Greków czy Chińczyków. Odkrycie przez Aleksandra Fleminga penicyliny w roku 1928 jest zwyczajowo uznawane za początek okresu zwanego w nauce nowoczesną erą świadomego używania antybiotyków. Ich mechanizm działania i zastosowania terapeutyczne są dobrze poznane w wyniku długoletnich badań i prób.<sup>2</sup>

Już w latach 50. XX wieku, a więc stosunkowo niedługo po odkryciu penicyliny izolowano liczne szczepy mikroorganizmów niewrażliwe lub znacznie bardziej odporne na jej zastosowanie. Po raz pierwszy udokumentowano zjawisko oporności antybiotykowej, które od tego czasu stanowi wciąż narastający problem. Jest tak, ponieważ w przypadku większości najbardziej zagrażających zdrowiu i życiu infekcji bakteryjnych wciąż nie udało się znaleźć odpowiedniej alternatywy dla zastosowania antybiotyków.<sup>3</sup> Szacuje się, że jeśli kwestia ta nie zostanie rozwiązana, do 2050 roku globalna liczba zgonów spowodowanych przez tego rodzaju patogeny wzrośnie ponad 10-krotnie, do nawet 10 milionów rocznie.<sup>4</sup> Problem wynikający ze zjawiska narastającej oporności antybiotykowej jest kluczowy w krajach rozwijających się, gdzie wciąż powszechnie stosuje się terapie niewłaściwym rodzajem lub nieodpowiednio dostosowanym stężeniem antybiotyku.<sup>5</sup> Z powodu niewystarczających informacji napływających z tych miejsc, ranga zjawiska do tej pory nie jest całkowicie zbadana. Jednym

z najpoważniejszych problemów w przypadku zwalczania zjawiska narastającej oporności jest niewystarczająca świadomość społeczna

i niekontrolowany dostęp do antybiotyków, szczególnie w krajach rozwijających się. <sup>6</sup> Wyniki ogólnosiwiatowego opracowania statystycznego opublikowanego w 2019 roku wykazały, że wśród infekcji wywołanych przez odporne szczepy bakteryjne najczęściej doprowadzających do śmierci pacjenta znalazły się zakażenia układu moczowego, zajmujące w tej statystyce miejsce wyższe niż gruźlica. Wśród patogenów odpowiedzialnych za ten rodzaj infekcji jest między innymi ureolityczny gatunek *Proteus mirabilis*. Warto zauważyć, że wspomniane studium wykazało, że w przypadku tego mikroorganizmu stosunkowo często odnotowywano oporność na kilka klas antybiotyków jednocześnie.

Dodatkowym problemem jest stosunkowo niewielkie zainteresowanie wprowadzaniem nowych struktur chemicznych o potwierdzonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej w fazie badań preklinicznych i klinicznych. <sup>7</sup> Wymagają one nakładów finansowych znacznie przekraczających inwestycje wystarczające do prowadzenia badań akademickich. Według raportu udostępnionego w drugiej połowie roku 2021 w fazie testów klinicznych było zaledwie około 30 nowych związków przeznaczonych do zastosowania w leczeniu infekcji. To ponad 100-krotnie mniejsza liczba niż miało to miejsce w przypadku nowych leków przeciwnowotworowych. Co więcej, tylko 25% z nich nie było pochodnymi już istniejących struktur i żaden z nich nie wykazywał zadowalającej aktywności przeciw Gram-ujemnym patogenom należącym do grupy ESKAPE. Obejmuje ona następujące mikroorganizmy: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz rodzaj *Enterobacter*. Ostatnia całkowicie nowatorska klasa antybiotyków została wprowadzona w latach 80. ubiegłego stulecia. W przypadku tych leków przeciwdrobnoustrojowych preferowano podejście oparte na eliminowaniu tzw. „*essential targets*”, tzn. celów kluczowych dla przetrwania bakterii w środowisku. Przykładem może być genom mikroorganizmu lub osłony komórkowe.

W ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem badawczym cieszą się inhibitory celów określanych jako „*non-essential targets*”. Są to struktury komórkowe, których funkcjonowanie nie jest niezbędne do wzrostu mikroorganizmu w warunkach laboratoryjnych.

Są jednak kluczowe w procesach takich jak kolonizacja organizmu oraz postęp infekcji. Przykładem takich struktur mogą być czynniki wirulencji mikroorganizmów, jak również systemy chroniące przed odpowiedzią układu immunologicznego gospodarza. Zakażenie wywołane przez szczepy odporne na powszechnie stosowane antybiotyki często prowadzi do długotrwałej infekcji organizmu pacjenta, którą niezwykle trudno usunąć.<sup>8</sup> Aby przetrwać w wymagającym środowisku ludzkiego organizmu patogeny są zmuszone do ewolucyjnego wykształcenia wyspecjalizowanych mechanizmów molekularnych. Zaburzenie ich aktywności poprzez zastosowanie odpowiednich substancji, między innymi inhibitorów ważnych enzymów, może w przyszłości doprowadzić do powstania nowych leków zwalczających tego rodzaju zakażenia. Tego rodzaju terapeutyki mogą wykazywać bardzo obiecujące działanie synergistyczne z antybiotykami w warunkach *in vivo*, co mogłoby umożliwić znaczące obniżenie niezbędnego do zastosowania stężenia tych ostatnich, ograniczając problem oporności antybiotykowej. Bardzo ułatwiłoby to również naturalną odpowiedź immunologiczną gospodarza, która szybciej i efektywniej eliminuje patogeny charakteryzujące się obniżoną wirulencją. Ponadto uważa się, że znikomy wpływ tego rodzaju inhibitorów na rozmnażanie patogenów może zaowocować zmniejszeniem ewolucyjnej presji zmuszającej mikroorganizmy do poszukiwania nowych mechanizmów oporności na terapeutyki.

Jeden z przykładów "*non-essential targets*" stanowi ureaza – enzym odpowiadający za katalizę hydrolizy mocznika.<sup>9</sup> Pełni ona funkcję czynnika wirulencji u licznych szczepów patogennych mikroorganizmów, zarówno bakterii jak i grzybów. Inhibitory ureazy mogą być stosowane w terapii infekcji bakteryjnych i grzybiczych wywołanych przez mikroorganizmy, u których ten enzym stanowi istotny czynnik wirulencji. Konieczność poszukiwania alternatywnych leków na tego rodzaju choroby wynika przede wszystkim z bardzo dynamicznie narastającego zjawiska oporności patogennych bakterii na zwyczajowo stosowane antybiotyki. Ważnym elementem procesu selekcji inhibitorów ureazy do potencjalnego zastosowania w medycynie powinno być zbadanie ich aktywności w warunkach *in vitro* wobec enzymu produkowanego przez docelowy organizm (oczyszczonego lub z wykorzystaniem całych komórek jako

biokatalizatora).<sup>10</sup> Badania prowadzone na wzorcowej ureazie z *Canavalia ensiformis* mogą być użyteczne wyłącznie jako etap wstępny. Potwierdzono, że stopień homologii między ureazami izolowanymi z różnych gatunków roślin i mikroorganizmów, choć wysoki, jest niewystarczający, żeby zagwarantować podobną aktywność inhibitorów. Problem dotyczy w szczególności związków wiążących się do centrum allosterycznego, którego struktura jest znacznie mniej zachowana w obrębie różnych gatunków niż centrum katalitycznego. Jednakże, również inhibitory kompetycyjne, celowane w centrum aktywne, wykazują zróżnicowany stopień hamowania względem różnego rodzaju organizmów ureolitycznych. W przypadku badań na całych komórkach dodatkowym problemem jest konieczność przeniknięcia związków przez osłony komórkowe, które charakteryzują się znacznymi różnicami w budowie między gatunkami.

Najbardziej znanym w medycynie i najpowszechniej występującym patogenem ureolitycznym bardzo trudnym w leczeniu jest *Helicobacter pylori*.<sup>11</sup> Znane obecnie procedury skutecznej eradykacji tej bakterii z żołądka obejmują połączenie dwóch antybiotyków oraz inhibitora pomp protonowych, podawane przez co najmniej 7 dni. Ponadto, konieczność podania leków do żołądka oznacza, że farmaceutyki łatwo ulegające degradacji w kwasie żołądkowym (takie jak amoksycylina) muszą być podane w odpowiednio wyższym stężeniu. To oznacza zwiększone ryzyko wystąpienia niepożądanych efektów ubocznych kuracji. Potwierdzono, że zastosowanie kwasu acetohydroksamowego – jedyne dopuszczonego do użytku medycznego inhibitora ureolizy – w połączeniu z antybiotykami znacznie zwiększa skuteczność terapii.

Podczas rozważania inhibitorów ureolizy jako potencjalnych farmaceutyków należy brać pod uwagę również trwałość ich struktury po podaniu do ludzkiego organizmu.<sup>12</sup> Ten warunek dyskwalifikuje wiele związków, dla których stwierdzono bardzo obiecującą zdolność do hamowania ureaz pochodzenia mikrobiologicznego. Przykładem takich struktur mogą być amidy kwasu fosforowego. Dla najskuteczniejszych pochodnych należących do tej grupy wartość  $IC_{50}$  (stężenie inhibitora hamujące 50% aktywności enzymatycznej) wobec całych komórek *P. mirabilis* wynosiła nawet 200-400 nM. Niestety, ich niska odporność

na hydrolizę bardzo ogranicza ich przydatność jako farmaceutyków. W środowisku wodnym o pH = 2 biologiczny okres półtrwania fluorofamidu wynosi zaledwie około 5 minut.

#### 1.1.1. Ureaza jako czynnik wirulencji *H. pylori*

*H. pylori* (uprzednio określana w nomenklaturze jako *Campylobacter pylori*) jest spiralną Gram-ujemną bakterią mikroaerofilną.<sup>13</sup> Po raz pierwszy wyizolowano ją z ludzkiego żołądka. Kolonizacja przewodu pokarmowego przez ten mikroorganizm może prowadzić do chronicznego nieżytu żołądka oraz w konsekwencji nawet do powstania wrzodów lub zmian nowotworowych. Statystycznie u 90% pacjentów cierpiących na nieżyt żołądka oraz 70-80% cierpiących na chorobę wrzodową stwierdzono obecność *H. pylori* w przewodzie pokarmowym. Optymalna wartość pH do rozwoju tej bakterii mieści się w przedziale 6,9 – 8,0. Aktywność ureolityczna umożliwia tym mikroorganizmom długotrwałe przetrwanie w niskim pH żołądka, co odgrywa istotną rolę przy powstawaniu wrzodów indukowanych przez zakażenie. Ponadto, produkcja amoniaku może prowadzić do uszkodzenia komórek nabłonka żołądka i powstania stanu zapalnego.

Oprócz lokalnego podwyższania pH, co umożliwia bakterii kolonizację żołądka, proponowano również inne mechanizmy działania ureazy *H. pylori* jako istotnego czynnika wirulencji. Postępująca ureoliza może doprowadzać do podwyższenia pH samej błony śluzowej żołądka, zaburzając naturalny przepływ jonów wodorowych. Innym proponowanym mechanizmem jest bezpośrednia toksyczność amoniaku produkowanego podczas reakcji katalizowanej przez ureazę. Długotrwała ekspozycja może prowadzić między innymi do zaburzeń ciągłości błony śluzowej, skutkując powstaniem stanów zapalnych, wrzodów lub nawet zmian nowotworowych. Co więcej, podejrzewa się, że neutralizacja niskiego pH żołądka wywołana obecnością ureolitycznych komórek *H. pylori* wydatnie ułatwia przetrwanie innych patogennych drobnoustrojów.<sup>14</sup> To może doprowadzić do niebezpiecznych koinfekcji w przewodzie pokarmowym nosiciela tej bakterii, nawet jeśli nie jest bezpośrednio dotknięty chorobą wrzodową i innymi objawami zakażenia.

Ureaza stanowi około 10% puli białkowej *H. pylori* wszystkich naturalnie występujących szczepów.<sup>15</sup> Liczne wcześniejsze badania wykazały, że genetycznie modyfikowane szczepy pozbawione aktywności ureolitycznej nie były zdolne do kolonizacji przewodu pokarmowego zwierząt doświadczalnych. Potwierdzono, że oczyszczona ureaza z *H. pylori* w warunkach *in vitro* stymuluje aktywność makrofagów, promuje wytwarzanie cytokin i reaktywnych form tlenu, co prowadzi do wywołania stanu zapalnego. Dodatkowo, podobnie jak enzym pochodzący ze *Sporosarcina pasteurii*, promuje ona aktywację płytek krwi oraz szlaku lipooksygenazy, niezależnie od tego, czy jest aktywna katalitycznie.

Ureaza stanowi część mechanizmu obronnego wykorzystywanego przez *H. pylori* w przypadku występowania stresu oksydacyjnego.<sup>16</sup> Obecność bakterii w środowisku zwiększa ekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS). Produkcja stymulowana jest przez frakcję lipopolisacharydową obecną w ścianie komórkowej bakterii. iNOS katalizuje generowanie tlenu azotu(II) w reakcji, której substratem jest L-arginina. Reakcja ta prowadzona jest głównie przez makrofagi i neutrofile. L-arginina obecna w komórkach stanowi również substrat dla produkowanej przez *H. pylori* arginazy, katalizującej hydrolizę tego aminokwasu. Głównym jej produktem jest mocznik, będący z kolei substratem ureolizy, kluczowej do przetrwania w żołądku. Tlenek azotu(II) powstały w wyniku reakcji katalizowanej przez iNOS jest wysoce reaktywny i odgrywa istotną rolę w procesie generowania stanu zapalnego.<sup>17</sup> Jego nieenzymatyczna reakcja z anionorodnikami ponadtlenkowymi prowadzi do powstania nadtlenoazotynów (ONOO<sup>-</sup>). Toksyczność tego ostatniego (bezpośrednie oraz pośrednie utlenianie lipidów, protein i kwasów nukleinowych) w normalnych warunkach prowadzi do wyeliminowania patogenów poprzez nadmierny stres oksydacyjny. W przypadku infekcji *H. pylori* dwutlenek węgla będący ostatecznym produktem reakcji, której pierwszy etap katalizowany jest przez ureazę wiąże się z nadtlenoazotynami, tworząc nietoksyczny ONOCO<sup>2-</sup>. Konsekwencją tego mechanizmu obronnego bakterii jest generowanie w skolonizowanym przez nią przewodzie pokarmowym chronicznego stanu zapalnego, którego rzeczywisty wpływ na żywotność patogenu jest znikomy. Badania w warunkach *in vitro* potwierdziły, że komórki



należące do szczepu referencyjnego *H. pylori* potrafią znosić nawet ekstremalnie wysokie stężenia nadtlenoazotynów w mieszaninie reakcyjnej.<sup>18</sup> Jednym z kluczowych warunków był jednak dodatek mocznika w stężeniu fizjologicznym. Może to stanowić dowód, iż ureaza syntezowana przez tę bakterię stanowi kluczowy element systemu chroniącego ją przed ONOO<sup>-</sup> produkowanymi przez ludzkie fagocyty. Zwiększona produkcja amoniaku w wyniku aktywności ureazy prowadzi również do powstawania nadmiernej ilości cytotoksycznych dla komórek gospodarza pochodnych takich jak chloroamina.

W testach prowadzonych na zwierzętach wykazano, że niezdolność szczepów *H. pylori* nieprodukujących ureazy do kolonizacji żołądka obserwuje się niezależnie od pH środowiska.<sup>19</sup> Pozbawione tego enzymu mutanty były niezdolne do infekcji również w przypadku zwierząt achlorhydrycznych oraz inokulacji mieszaniną zawierającą inne bakterie ureolityczne. To dowodzi, iż rola ureazy w samym procesie kolonizacji przewodu pokarmowego nie ogranicza się wyłącznie do lokalnej neutralizacji kwasu żołądkowego. Potwierdzono, że obecność wici jest kluczowym czynnikiem znacznie zwiększającym ryzyko kolonizacji organizmu gospodarza przez *H. pylori*.<sup>20</sup> Bakteria ta obecna jest przede wszystkim w wysoce mobilnej warstwie błony śluzowej żołądka, więc do trwałej kolonizacji niezbędna jest zdolność poruszania się w kierunku przeciwnym do przemieszczania się śluzu. Prawdopodobnie odpowiadają za to przede wszystkim chemotaksje bakterii, zaś jednym z atraktantów dla *H. pylori* jest właśnie mocznik. Mutanty genetyczne pozbawione zdolności do syntezowania ureazy wykazywały znacznie słabsze tendencje do przemieszczania się na przystosowanym do tego podłożu hodowlanym. Zmiany strukturalne raczej nie stanowią przyczyny zaobserwowanego zjawiska, ponieważ obserwacje mikroskopowe wykazały obecność w ich komórkach wici wyglądających na całkowicie funkcjonalne. W badaniach eksperymentalnych stwierdzono także znaczne zmiany w mobilności mikroorganizmów w podłożu zawierającym znane inhibitory ureolizy. Badano wpływ kwasu aceto hydroksamowego oraz fluorofamidu. Dodatek tego pierwszego do podłoża powodował (oprócz inhibicji ureolizy) całkowite zahamowanie chemotaksji w odpowiedzi na wodorowęglan sodu. W przypadku fluorofamidu ten efekt był znacznie mniej znaczący. Przyczynę mogą stanowić różnice strukturalne między

zastosowanymi w tym badaniu inhibitorami. Kwas aceto hydroksamowy jest cząsteczką stosunkowo niewielką i jest w stanie przenikać nie uszkodzone osłony komórkowe *H. pylori*. Znacznie bardziej rozbudowana struktura drugiego związku oznacza, że jego zdolność do inhibicji prawdopodobnie ogranicza się wyłącznie do ureazy zewnątrzkomórkowej. To prowadzi do prawdopodobnego wniosku, że ureaza wewnątrzkomórkowa odgrywa znacznie ważniejszą rolę podczas chemotaksji, niż enzym eksponowany przez bakterię na zewnętrznych osłonach komórkowych.

Obserwację interakcji bakterii z fagocytami prowadzono metodą cytometrii przepływowej w krwi pozbawionej cytrynianów, aby zwiększyć szybkość fagocytozy poprzez usunięcie antykoagulantów.<sup>21</sup> W przypadku mutantów *H. pylori* pozbawionych aktywności ureolitycznej stwierdzono znacznie bardziej efektywną fagocytozę przez ludzkie granulocyty niż w przypadku szczepu wyjściowego. Badano pod tym kątem zarówno mutanty całkowicie pozbawione zdolności do syntezy ureazy (poddające białko degradacji lub tworzące niestabilny transkrypt), jak również szczep produkujący to białko, lecz nieaktywne katalitycznie. Co ciekawe, w tym drugim przypadku stwierdzono znacznie wyższą odporność na fagocytozę niż w badaniu szczepu pozbawionego ureazy, choć nie dorównującą zdolnościom natywnego szczepu. To pokazuje, że produkcja jonów amonowych jest ważnym, lecz nie jedynym elementem mechanizmu obrony komórek bakteryjnych przed szaczym układem odpornościowym. Potwierdza to również fakt pozytywnego wpływu dodatku mocznika do mieszaniny reakcyjnej na przeżywalność bakterii szczepu referencyjnego w kontakcie z ludzkimi fagocytami.

### 1.1.2. Ureaza jako czynnik wirulencji *P. mirabilis*

Powstawanie w drogach moczowych złogów pochodzenia chemicznego, zwanych potocznie kamieniami moczowymi, jest częstym następstwem infekcji spowodowanej przez ureolityczne mikroorganizmy patogenne.<sup>21</sup> Do najbardziej powszechnie występujących gatunków indukujących powstanie takich złogów należą bakterie z rodzaju *Proteus* oraz gatunek *S. aureus*. Inne patogeny dróg moczowych, takie jak rodzaj *Klebsiella* oraz *Pseudomonas* rzadziej

odpowiadają za tworzenie się złogów, choć niektóre ich gatunki również są zdolne do produkcji ureazy. Bakterie z rodzaju *Proteus* mogą odpowiadać w ludzkim organizmie za infekcje ran, oczu, przewodu pokarmowego, jednak najbardziej powszechne są wywołane przez ten mikroorganizm infekcje układu moczowego u pacjentów wymagających cewnikowania.<sup>23</sup> Stwierdzono, że tego rodzaju infekcja zwiększa ryzyko niebezpiecznych powikłań w przypadku uszkodzeń rdzenia kręgowego.

*P. mirabilis* jest również jednym z gatunków najczęściej uczestniczących w wielogatunkowych infekcjach układu moczowego.<sup>24</sup> W przypadku pacjentów zacewnikowanych dodatkowe ryzyko jest spowodowane pominięciem w takiej infekcji wielu naturalnych barier ochronnych ludzkiego organizmu. Ponadto nabłonek dróg moczowych jest stosunkowo cienki (3-4 warstw komórek) i może łatwo zostać uszkodzony poprzez niewłaściwie przeprowadzone zacewnikowanie. Takie przerwanie ciągłości tkanek bardzo ułatwia mikroorganizmom patogennym osadzenie się w drogach moczowych, szczególnie jeśli są zdolne do intensywnej produkcji biofilmu, tak jak m. in. *P. mirabilis*, w którym struktura ta stanowi również istotny czynnik wirulencji. Powszechnie znaną właściwością tej specyficznej struktury jest znacznie zwiększona odporność na wymywanie bakterii poprzez przepływ moczu, co bardzo ułatwia proces kolonizacji dróg moczowych.<sup>25</sup> Formowanie biofilmu wielokrotnie podwyższa również odporność mikroorganizmów na kurację antybiotykową. Badania wykazały, że biofilm ma ponadto bezpośredni wpływ na formowanie kamieni moczowych podczas infekcji wywołanej przez *P. mirabilis*. Potwierdzono, iż krystalizacja struwitów i fosforanów zachodzi znacznie łatwiej wewnątrz struktury biofilmu niż w otaczającym go syntetycznym moczu. Wykazano, że kryształy struwitów uwiecznione wewnątrz biofilmu *P. mirabilis* nie ulegają rozpuszczeniu ani zniszczeniu nawet przy przepływie syntetycznego moczu z intensywnością 200 mL/h.<sup>26</sup> Z kolei kamienie moczowe nie związane z biofilmem bakteryjnym uległy zniszczeniu już przy szybkości przepływu rzędu 4 mL/h. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest tworzenie wewnątrz struktury biofilmu wysyczonego jonami magnezu mikrośrodowiska, w którym występuje pH znacznie wyższe niż w ludzkim moczu. Ten mechanizm umożliwia kamieniom moczowym wzrost nawet w niskim pH wywołanym przez łagodną terapię mającą na celu zakwaszenie

moczu pacjentów, u których zdiagnozowano infekcję bakteryjną dróg moczowych. Dodatkowe komplikacje podczas infekcji dróg moczowych generuje zablokowanie przepływu moczu w cewniku spowodowane obecnością wykrystalizowanych struwitów i apatytów otaczających biofilm bakteryjny.<sup>27</sup> Takie mieszane struktury często pozostają w drogach moczowych nawet po usunięciu cewnika, co zwiększa dyskomfort odczuwany przez pacjenta podczas wymiany urządzenia, jak również ułatwia dynamiczną kolonizację nowego cewnika po wykonaniu wymiany. Zablokowanie drogi przepływu przez „przerośnięty” kryształami biofilm może doprowadzić do powrotu moczu do nerek, stwarzając poważne ryzyko rozwinięcia się sepsy.

Ureaza produkowana przez inne mikroorganizmy będące patogenami dróg moczowych (między innymi *S. aureus*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*) nie jest tak aktywna, jak ta syntezowana przez *P. mirabilis*.<sup>28</sup> W związku z tym znacznie rzadziej odpowiada za powstanie kamieni moczowych w rozmiarach niebezpiecznych dla zdrowia pacjenta. Pomimo tego wykazano, że obecność w środowisku ureazy pochodzącej z *P. stuartii* przyspiesza krystalizację struwitów katalizowaną przez *P. mirabilis*. Do takiej sytuacji może dojść podczas infekcji dróg moczowych wywołanych przez kilka różnych szczepów uropatogennych. Tego rodzaju koinfekcja prowadzi również zwykle do większych uszkodzeń kolonizowanych przez mikroorganizmy tkanek. Co ciekawe, wykorzystanie w badaniach *in vivo* nieureolitycznego szczepu *P. stuartii* do koinfekcji z ureolitycznym szczepem *P. mirabilis* prowadziło do efektów porównywalnych z koinfekcją dwóch szczepów ureolitycznych. To oznacza, że obecność *P. stuartii* w środowisku intensyfikuje objawy zakażenia w oparciu o inny mechanizm niż przyspieszenie hydrolizy mocznika poprzez aktywność ureazy produkowanej przez te bakterie. Możliwe, że główną funkcją *P. stuartii* podczas koinfekcji z *P. mirabilis* jest zwiększenie aktywności neutrofilii podczas generowania stanu zapalnego lub udział w tworzeniu struktury biofilmu, kluczowej dla trwałego pozostania patogenów w drogach moczowych. *P. stuartii*BE2467 syntezuje dwie, strukturalnie identyczne, ureazy – jedną kodowaną plazmidowo i jeden enzym chromosomalny.<sup>29</sup> Obydwa te enzymy, podobnie jak ureaza produkowana przez *P. mirabilis*, są enzymami, których ekspresja musi być indukowana przez obecność mocznika w zajmowanym przez te bakterie środowisku.

Podczas koinfekcji prowadzonej na zwierzętach doświadczalnych stwierdzono, iż obydwie szczepy osiągają takie same równowagowe stężenie komórek w drogach moczowych, co w przypadku infekcji pojedynczym szczepem. To świadczy o znikomym wpływie zjawiska konkurencji między tymi patogennymi gatunkami. Co za tym idzie, zajmują one prawdopodobnie zupełnie odrębne nisze ekologiczne w przewodzie moczowym zainfekowanego zwierzęcia. Możliwe, że intensyfikacja objawów zakażenia w przypadku koinfekcji jest spowodowana interakcją między szczepami, której mechanizm nie został jeszcze poznany, lub zwiększoną skalą odpowiedzi systemu odpornościowego organizmu na infekcję mieszaną. Dodatkowym problemem jest w tym przypadku fakt szeroko zakrojonej oporności obydwu tych gatunków na prowadzoną kurację antybiotykową. Może to dodatkowo przyczyniać się do statystycznego wzrostu śmiertelności zacewnikowanych pacjentów zakażonych jednocześnie przez *P. mirabilis* i *P. stuartii* w porównaniu z infekcjami pojedynczym szczepem.

### 1.1.3. Znaczenie ureazy *Cryptococcus neoformans*

*Cryptococcus neoformans* jest gatunkiem grzyba, znanym przede wszystkim jako oportunistyczny patogen wywołujący grzybicę mogącą doprowadzić do śmierci.<sup>30</sup> Infekcja rozpoczyna się poprzez wniknięcie zarodników do dróg oddechowych. Jest szczególnie niebezpieczna w przypadku pacjentów z obniżoną odpornością organizmu, na przykład w wyniku zainfekowania wirusem HIV. Przeprowadzone w ostatnich latach badania zakrojone na szeroką skalę doprowadziły do szacunkowego powiązania 15% zgonów pacjentów chorych na AIDS z infekcją spowodowaną przez *C. neoformans*. Ta statystyka wskazuje, że gruźlica stanowi jedyne schorzenie statystycznie bardziej zabójcze dla tej grupy badawczej. Gatunek ten jest wszechobecny w przyrodzie (między innymi w ptasich odchodach oraz w korze drzew), co zwiększa ryzyko zakażenia. W przypadku zdrowych ludzi infekcja układu oddechowego przez *C. neoformans* jest stosunkowo łatwo kontrolowana, głównie poprzez aktywność makrofagów.<sup>31</sup> Wkrótce po fagocytozie wewnątrz makrofaga ulega zakwaszeniu i fuzji z lizosomem. Badania potwierdziły jednak, iż ten gatunek jest zdolny do przetrwania i rozmnażania nawet we wnętrzu

dojrzałego fagolizosomu, co prowadzi do utrzymania się infekcji utajonej. Podejrzewa się, że w warunkach obniżonej odporności nosiciela komórki drożdżowe zawarte w fagolizosomach mogą doprowadzić do rozwoju choroby nie tylko układu oddechowego, ale również centralnego układu nerwowego.

Czynniki wirulencji *C. neoformans* stanowią: formowanie i powiększanie kapsuły polisacharydowej, produkcja melaniny oraz ekstracelularna ekspresja enzymów, między innymi ureazy.<sup>32</sup> Kapsuła polisacharydowa uczestniczy w interakcji z makrofagiem, prawdopodobnie maskując jego miejsca wiązania receptorów, zaś polisacharydy stanowią immunosupresanty. W połączeniu z melanimą chroni również grzyby przed reaktywnymi formami tlenu. Mechanizm funkcjonowania ureazy jako czynnika wirulencji *C. neoformans* nie jest tak dokładnie poznany i większość zaproponowanych rozwiązań jest hipotetyczna. Najprostszym wyjaśnieniem jest wykorzystanie ureazy do celów odżywczych, jako że mocznik stanowi wszechobecne w ludzkim organizmie źródło przyswajalnego i niezbędnego dla mikroorganizmów azotu. Inna z hipotez głosi, że amoniak generowany przez ureazę jest toksyczny dla śródbłonna naczyń krwionośnych, umożliwiając komórkom grzyba przekroczenie bariery krew-mózg. Wcześniej zakładano, iż jony amonowe mogą także neutralizować niskie pH panujące w fagolizosomie, ułatwiając przetrwanie patogenu. Jednakże badania wykazały, że w przeciwieństwie do większości patogenów, wzrost *C. neoformans* jest szybszy w zakwaszonym środowisku a neutralizowanie niskiego pH fagolizosomów poprzez dodatek odpowiednich substancji chemicznych prowadziło do inhibicji wzrostu drożdży wewnątrz komórek gospodarza. Podwyższenie pH fagolizosomu nie jest zatem elementem mechanizmu wirulencji, chyba że poprzez opóźnienie wzrostu grzyba prowadzi do szybszego utajenia infekcji.

Ureaza nie jest wymagana do wzrostu *C. neoformans* w płucach zainfekowanych zwierząt.<sup>33</sup> Prawdopodobnie jest jednak niezbędna do długotrwałego przetrwania drożdży w organizmie gospodarza. Jest to z kolei kluczowe w dalszej infekcji centralnego układu nerwowego, prowadząc do najgroźniejszych objawów zakażenia spowodowanego przez ten patogen. Usunięcie grzybów z płuc i zapobieganie

rozproszeniu jego komórek do innych organów pacjenta jest możliwe głównie dzięki adaptacyjnej odpowiedzi T1 układu immunologicznego. Odpowiedź immunologiczna według mechanizmu T2 nie doprowadza do eradykacji *C. neoformans* w skolonizowanych płucach. Potwierdzono, że ingerencja w równowagę między mechanizmami odpornościowymi T1 i T2 na korzyść tego drugiego znacznie utrudnia przezwycięzenie infekcji przez zwierzęta doświadczalne. Komórki dendrytyczne znajdujące się w płucach są istotnym czynnikiem warunkującym rodzaj odpowiedzi immunologicznej na szereg antygenów, w tym również *C. neoformans*.

Zdolność do produkcji ureazy jest czynnikiem wyróżniającym *C. neoformans* spośród drożdży istotnych z klinicznego punktu widzenia.<sup>34</sup> Sekwencja genowa, która jest odpowiedzialna za produkcję ureazy przez ten grzyb jest podobna do analogicznych fragmentów genomu innych organizmów ureolitycznych. Są to sekwencje: NIC1 (koduje transporter jonów niklu) oraz geny URE4, URE6 i URE7, kodujące polipeptydy opiekuńcze, będące odpowiednikami bakteryjnych UreD, UreF, UreG. W genomie *C. neoformans* nie znaleziono jednak żadnej sekwencji kodującej homolog bakteryjnego UreE – białka czaperonowego dla niklu. Ta zmiana sugeruje istnienie alternatywnego mechanizmu dostarczania kationów tego metalu do miejsca aktywnego ureazy pochodzenia grzybowego. Badania wykazały, że szczepy *C. neoformans* pozbawione genu URE7 (homologu genu kodującego bakteryjne białko UreG) nie są aktywne ureolitycznie z powodu braku inkorporacji katalitycznego niklu do miejsca aktywnego apoenzymu. W warunkach *in vitro* białko Ure7 okazało się zdolne do wiązania dwóch jonów niklu. Białko UreG ze szczepu *Klebsiella aerogenes* również tworzy takie wiązanie, ale tylko z jednym kationem metalu na cząsteczkę, przy czym wartość  $K_d$  jest kilkanaście razy wyższa (16  $\mu\text{M}$ , w porównaniu z wartością poniżej 1  $\mu\text{M}$  dla grzybowego Ure7). Jest bardzo prawdopodobne, że zdolność wiązania dodatkowego jonu przez Ure7 ma na celu zrekompensowanie braku analogu białka czaperonowego UreE.

Mechanizmy umożliwiające *C. neoformans* tak efektywne zakażenie centralnego układu nerwowego nie są dokładnie poznane.<sup>35</sup> Potwierdzono, że lakaza – enzym katalizujący reakcję powstawiania

melaniny – jest niezbędna do przetrwania komórek drożdżowych w zwierzęcym mózgu. Prawdopodobnie kluczowy w tym przypadku jest współistniejący zestaw czynników wirulencji, do których należy właśnie biosynteza melaniny przez ten gatunek. Badania wpływu mutacji usuwającej możliwość produkcji ureazy przez *C. neoformans* sugerują, że brak aktywności tego enzymu nie ma negatywnego wpływu na samą zdolność do przetrwania grzybów w układzie nerwowym. Nie wyklucza to jednak uczestnictwa ureazy w mechanizmie umożliwiającym transfer komórek patogennych z płuc do układu nerwowego, w którym bariera krew-mózg nie wydaje się spełniać swojej ochronnej funkcji. Testy *in vivo* potwierdziły, iż delecja genu kodującego ureazę prowadzi do znacznego zmniejszenia zdolności do kolonizacji centralnego układu nerwowego. Podczas 8-tygodniowego badania zaobserwowano śmierć 30% populacji myszy zainfekowanych zmutowanym szczepem, podczas gdy żadne zwierzę zainfekowane ureolitycznym *C. neoformans* nie przeżyło 6 tygodni od inokulacji szczepem patogennym. Wśród wciąż żywych myszy zainfekowanych zmutowanym szczepem tylko u 1/3 populacji znaleziono w mózgu statystycznie istotną ilość żywotnych form grzyba.

Zdolność do syntezy ureazy ułatwia *C. neoformans* przetrwanie poza zainfekowanym organizmem.<sup>36</sup> To właśnie zdolność do wykorzystania mocznika jako jedyne źródła przyswajalnego azotu w środowisku umożliwia temu grzybowi przetrwanie i wzrost w ptasich odchodach. Są one znane jako jedno z kluczowych źródeł infekcji spowodowanej przez ten patogen, nie tylko dla człowieka, ale i innych ssaków. W przypadku ptaków większość nadmiaru azotu jest usuwana z organizmu w postaci kwasu moczowego, nie mocznika, jak w przypadku ssaków lądowych. *C. neoformans* posiada jednak złożony mechanizm enzymatyczny, który umożliwia degradację kwasu moczowego do alantoiny, która dalej jest przekształcana do mocznika. Ten może być wykorzystany jako źródło azotu dzięki aktywności ureolitycznej. Ponadto, badania wykazały, że zdolność *C. neoformans* do produkcji ureazy ma też istotny wpływ na produkcję melaniny. Ten pigment stanowi zaś kluczowy element systemu ochrony przed stresem oksydacyjnym. Mechanizm opisanego powiązania metabolicznego nie został jeszcze wyjaśniony. Według jednej z hipotez, może mieć związek



z poważnym obniżeniem zdolności do syntezy poliamin u mutantów pozbawionych zdolności do ureolizy.

#### 1.1.4. Ureaza *Staphylococcus saprophyticus*

*Staphylococcus saprophyticus* jest bakteryjnym patogenem często odpowiadającym za zakażenia dróg moczowych, szczególnie u młodszych kobiet.<sup>37</sup> Wykazano jednak, że u starszych pacjentów bakterie te mogą stosunkowo łatwo przedostać się do krwi. Gatunek ten jest zdolny do produkcji aktywnej ureazy. W badaniach na zwierzętach doświadczalnych potwierdzono, że infekcja zmutowanym szczepem pozbawionym aktywności ureolitycznej prowadzi do znacząco niższej ilości zarówno bakterii, jak również leukocytów w moczu. Przy infekcji szczepem ureolitycznym dochodzi również do poważnych zmian w budowie pęcherza moczowego, których nie odnotowano podczas infekcji wywołanej przez mikroorganizmy poddane mutacji. W tym drugim przypadku nie znaleziono również śladów wytrącania się kamieni moczowych. We wcześniejszych badaniach wykazano, że inny uropatogeny gatunek – *P. mirabilis* – jest zdolny do tworzenia zmian patologicznych w obrębie nerek. Potwierdzono, że ureaza jest czynnikiem warunkującym zdolność tego gatunku do uszkodzania tego narządu w zainfekowanym organizmie. W przypadku *S. saprophyticus* nie zanotowano żadnych różnic w budowie nerek między infekcją wywołaną przez szczep ureolityczny i pozbawiony tej aktywności. Doprowadziło to badaczy do wysunięcia tezy, że w zakażeniu wywołanym przez ten gatunek, inne czynniki wirulencji odpowiadają za uszkodzenia nerek.

Wśród młodych kobiet *Staphylococcus saprophyticus* jest jednym z patogenów najczęściej odpowiadających za infekcję dróg moczowych (częściej spotyka się tylko zakażenie *Escherichia coli*).<sup>38</sup> Obecnie gatunek ten charakteryzuje relatywnie niska odporność na działanie antybiotyków rutynowo wykorzystywanych do zwalczania tego rodzaju zakażeń. Mimo tego, w ostatnich latach coraz częściej dochodzi do izolacji szczepów opornych na metycylinę. Tego rodzaju tendencja motywuje środowisko naukowe do poszukiwania alternatywnych metod kuracji infekcji wywołanej przez te patogenne szczepy. Analiza genomu patogennych bakterii z rodzaju *Staphylococcus*

doprowadziła badaczy do zaobserwowania znaczących różnic w obrębie czynników wirulencji. <sup>39</sup> W przypadku gatunku *S. saprophyticus* stwierdzono brak wielu czynników istotnych w infekcji wywołanej przez inne patogenne szczepy należące do tego rodzaju. Przykładem może być nieobecność większości typowych dla *Staphylococcus* sp. białek adhezyjnych, szczególnie istotnych w przypadku kolonizacji dróg moczowych, gdzie konieczne jest przeciwdziałanie usunięciu patogenów przez przepływający mocz. Potwierdzono jednak również obecność licznych czynników ułatwiających kolonizację ludzkiego organizmu przez ten mikroorganizm. Przykładem może być wyjątkowo szybkie nabywanie oporności antybiotykowej połączone z wysoce rozwiniętą zdolnością do koniugacji rozpowszechniającej niewrażliwość w okolicznej populacji bakteryjnej. Dzięki aktywności jednej z zachowanych u *S. saprophyticus* adhezyn wiele szczepów należących do tego gatunku (szacunkowo 70% wszystkich występujących w środowisku) zachowuje zdolność do tworzenia biofilmu. Oprócz znaczącego ułatwienia przetrwania mikroorganizmów w drogach moczowych potwierdzono, że struktura ta znacząco przyspiesza wymianę informacji genetycznej, również tej dotyczącej oporności na stosowane w leczeniu antybiotyki.

Dodatkową komplikację w zwalczaniu zakażenia wywołanego przez tę bakterię stanowi fakt niezwykle wysokiej różnorodności genetycznej między szczepami należącymi do tego samego gatunku. Potwierdzono, że różnice są wystarczająco wysokie, aby między szczepami obserwowano różne mechanizmy ułatwiające infekcję. W przypadku jednej spośród badanych linii komórkowych stwierdzono większą zdolność do tworzenia struktury biofilmu bakteryjnego. Inne szczepy z kolei charakteryzowały się większą aktywnością enzymatyczną, w szczególności ureazy oraz białek należących do systemu reduktazy tioredoksyny, chroniącego bakterie przed stresem oksydacyjnym. Te obserwacje prowadzą do wniosku, że badania genomu nie dają wystarczających informacji, aby skutecznie określić obiecujący cel dla nowych leków projektowanych do zwalczania infekcji *S. saprophyticus*. Przyczyną jest wysoka różnorodność fenotypowa obserwowana u szczepów należących do tego gatunku. Potwierdzono, że niektóre linie komórkowe nie wykorzystują wszystkich typowych dla gatunku czynników wirulencji w takim samym stopniu. Lek celowany w

jeden z tych czynników może zatem nie być równie użyteczny wobec wszystkich znanych szczepów.

Ureazę produkowaną przez *S. saprophyticus* (podobnie jak w przypadku gatunku *Staphylococcus xylosus*) charakteryzuje cecha strukturalna, niezwykle istotna z punktu widzenia projektantów potencjalnych inhibitorów.<sup>40</sup> Ważna katalitycznie reszta cysteiny (Cys322 w sekwencji ureazy *S. pasteurii*) jest u tego gatunku zastąpiona przez treoninę. Reszta wysoce konserwatywnej domeny wchodzącej w skład miejsca aktywnego ureazy jest całkowicie zachowana. Podejrzewa się, że hydroliza mocznika prowadzona przez te szczepy zachodzi zgodnie z innym mechanizmem, analogicznym do rozcięcia wiązania peptydowego katalizowanego przez chymotrypsynę. W praktyce oznacza to, że inhibitory ureaz, których aktywność opiera się na interakcji ze wspomnianą resztą cysteiny, nie są skuteczne w usuwaniu infekcji wywołanej przez *Staphylococcus saprophyticus*. Za przykład mogą posłużyć pochodne ebselenu, określone niedawno jako jedne z najskuteczniejszych inhibitorów ureaz bakteryjnych znanych w literaturze naukowej.

## 1.2. UREAZY – INFORMACJE OGÓLNE I STRUKTURA

Ureazy stanowią grupę enzymów rozpowszechnionych w przyrodzie, produkowanych przez rośliny, bakterie, grzyby, glony oraz bezkręgowce.<sup>41</sup> Pomimo wyraźnych różnic w budowie wszystkie enzymy z tej grupy funkcjonują jako biokatalizatory reakcji hydrolizy mocznika, której końcowe produkty stanowią amoniak oraz kwas węglowy. Uważa się, iż produkcja tego enzymu przez stosunkowo zróżnicowane taksonomicznie organizmy stanowi swego rodzaju odpowiedź natury na wszechobecność mocznika. Aktywność katalityczna ureazy jest zdecydowanie dominującym w przyrodzie sposobem metabolizmu mocznika, zazwyczaj jako źródła przyswajalnego azotu dla roślin i mikroorganizmów.<sup>42</sup> Organizmy nieprodukujące ureazy, lecz zdolne do wykorzystywania mocznika jako źródła azotu (głównie drożdże i jednokomórkowe zielone algi) są stosunkowo nieliczne. W ich przypadku zaobserwowano alternatywną ścieżkę metaboliczną, w której kluczowa jest aktywność systemu amidolizy ATP:mocznik.

Ureazy stanowią struktury multimeryczne, których skład podjednostkowy różni się znacząco w zależności od pochodzenia danego biokatalizatora. <sup>43</sup> Enzymy pochodzenia roślinnego i grzybowego stanowią homomery złożone z od dwóch do sześciu identycznych podjednostek. Organizmy roślinne zwykle wytwarzają ureazy przyjmujące strukturę dimeru trimerów  $\alpha_3$ . W przypadku ureaz pochodzenia bakteryjnego obserwuje się znacznie większe zróżnicowanie struktur, które są w większości heteromerami. Jedną z największych poznanych struktur stanowi ureaza izolowana z *H. pylori*, stanowiąca tetramer trimerów heterodimerów  $\alpha\beta$ . Jej masa molowa wynosi 1,06 MDa. Sekwencje aminokwasowe mniejszych podjednostek ureaz organizmów prokariotycznych zwykle są zbliżone do odpowiadającego im regionu w enzymach pochodzenia grzybowego lub roślinnego. Polipeptydy budujące strukturę apoenzymu, w której funkcjonują wszystkie bakteryjne ureazy, są kodowane przez odpowiednie geny. <sup>44</sup> Do aktywacji enzymu niezbędne są białka dodatkowe UreD, UreE, UreF, UreG, UreH, zaangażowane w transport niklu do komórki i umieszczenie go w centrum aktywnym ureazy. Niekiedy niezbędna jest do tego obecność substratu reakcji – mocznika – w środowisku, w którym znajdują się komórki bakteryjne. Przykładem takiego mikroorganizmu może być *P. mirabilis*. U tego gatunku dodatkowe białko regulatorowe, kodowane przez gen ureR i indukowane obecnością mocznika, odpowiada za kontrolę ekspresji pozostałych genów. Białko regulatorowe UreE, zdolne do wiązania jonów  $Ni^{2+}$  jest bezpośrednio zaangażowane w proces dostarczenia tego kluczowego dla aktywności ureazy metalu do odpowiedniego miejsca w strukturze centrum katalitycznego. <sup>45</sup> Pozostałe białka - UreD, UreF i UreG – tworzą kompleksy z apoenzymem ureazy, co prowadzi do jej aktywacji. Kompleks zawierający białko UreG jest prawdopodobnie najistotniejszym elementem tego mechanizmu. W strukturze UreG wykryto sekwencję znaną jako motyw pętli P, która może być zdolna do wiązania nukleotydów. Zaobserwowano alternatywną ścieżkę aktywacji ureazy, która wymaga energii dostarczonej przez hydrolizę guanozyny-5'-trifosforanu (GTP). Ten mechanizm jest wykorzystywany w przypadku, gdy w środowisku zajmowanym przez dany organizm nie występuje odpowiednie stężenie jonów wodorowęglanowych, niezbędnych do bezpośredniej aktywacji apoenzymu ureazy.

Miejsce aktywne ureazy zawiera dwa jony  $Ni^{2+}$  połączone przez atomy tlenu należące do karbamoilowanej reszty lizyny. <sup>46</sup> Każdy z tych kationów oddziałuje z resztą histydynową, a jeden z nich dodatkowo z tlenem grupy karboksylowej w łańcuchu bocznym reszty kwasu asparaginowego. Jony niklu pełnią kluczową rolę podczas aktywności ureolitycznej. W połączeniu ze stosunkowo niewielkim zasobem tego metalu w środowisku naturalnym doprowadziło to większość organizmów ureolitycznych do ewolucyjnego przystosowania. Zazwyczaj jest to wykształcenie mechanizmów wiążących ekspresję genów kodujących ureazę z obecnością niklu w komórce. Za przykład może posłużyć gatunek *H. pylori*. Funkcję regulatora operonu ureazowego w tym mikroorganizmie pełni białko NikR. Jest to czynnik transkrypcyjny złożony z dwóch domen wiążących DNA (DBD – *DNA-binding domain*) oraz jednej domeny wiążącej metal (MBD – *metal-binding domain*). Elastyczność linkera łączącego te domeny umożliwia przyjmowanie różnych konformacji, przystosowując je do wiązania DNA operonu ureazowego. Ponadto, w przypadku tego białka obserwuje się zjawisko plejotropowości. <sup>47</sup> Oprócz regulacji ekspresji ureazy NikR kontroluje również ekspresję innych fragmentów genomu, odpowiadając między innymi za chemotaksję, pozyskiwanie energii, odpowiedź na czynniki stresowe.

Analogi NikR funkcjonują również u innych gatunków bakterii (przykładem może być *E. coli*), lecz w przypadku *H. pylori* białko to funkcjonuje w oparciu o wyjątkowy mechanizm. <sup>48</sup> Zależnie od docelowego fragmentu genomu może ono pełnić funkcję aktywatora lub represora odpowiedzi na obecność jonów niklu. Ta unikatowa właściwość odpowiada prawdopodobnie za kontrolowanie stężenia tego metalu w komórce, jako że w nadmiarze stanowi on dla mikroorganizmów czynnik toksyczny. Badania wykazały, że zmutowane szczepy *H. pylori* pozbawione możliwości syntezy białka NikR wykazywały niższą odporność na toksyczne działanie jonów niklu w otoczeniu. Ich patogenność w testach prowadzonych *in vivo* również ulegała znaczącemu obniżeniu. Prawdopodobnie miało to związek z zaobserwowanym w przypadku tych szczepów ograniczeniem indukcji aktywności ureolitycznej. W obecności NikR i nadmiaru jonów niklu w środowisku obserwowano nadekspresję nie tylko genów strukturalnych ureazy ale również genu kodującego białko Hpn. Odpowiada ono za

gromadzenie i transport niklu, co oprócz funkcji dostarczania katalitycznych jonów do centrum aktywnego enzymów może również mieć udział w ochronie komórek przed toksycznym działaniem tego metalu. To oznacza, że u *H. pylori* funkcjonuje wyjątkowy system przechowywania jonów metali wewnątrz komórki, umożliwiający magazynowanie ich nadmiaru w sposób całkowicie dla niej bezpieczny. U większości bakterii obserwuje się raczej chelatowanie i transport jonów niklu ze środowiska zewnętrznego do cytoplazmy w miarę pojawiania się w komórce zapotrzebowania na ten metal.

W przyrodzie występują przykłady organizmów ureolitycznych nieposiadających standardowej sekwencji genów odpowiedzialnych za wytwarzanie ureazy oraz odpowiednią regulację jej aktywności.<sup>49</sup> Jednym z przykładów jest powszechnie występujący *Bacillus subtilis*. Gatunek ten posiada typowe geny strukturalne ureazy, lecz brak w jego genomie sekwencji kodujących białka regulatorowe odpowiedzialne za inkorporację niklu do miejsca aktywnego enzymu. Pomimo tego mikroorganizm zdolny jest do produkcji ureazy, która umożliwia jej przetrwanie w warunkach braku źródeł przyswajalnego azotu innych niż mocznik. Aktywność ureolityczna jest jednak stosunkowo niska, blisko 20-krotnie niższa niż w przypadku *Klebsiella pneumoniae*. Stwierdzono, że dodatek niklu nie miał wpływu na zdolności komórek do ureolizy, co sugeruje, że śladowe ilości w zastosowanym podłożu mineralnym były wystarczające lub enzym nie wymaga obecności jonów tego metalu w miejscu aktywnym.

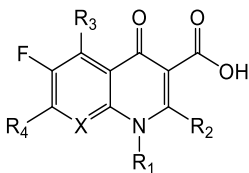
Miejsca aktywne ureazy zawierają również strukturę „kłapki” (*mobile flap*) złożoną z 33 reszt aminokwasowych, która odpowiada za regulację dostępu do centrum katalitycznego.<sup>50</sup> Stwierdzono, że struktura ta może przyjmować trzy konformacje, znane w literaturze jako „zamknięta”, „otwarta” oraz „szeroko otwarta”. W pierwszej konformacji struktura kłapki blokuje dostęp substratu reakcji do wnęki zawierającej katalityczne jony niklu. W konformacji „otwartej” dochodzi do utworzenia bardzo wąskiego przejścia, którego geometria uniemożliwia jednak dostęp cząsteczki mocznika do miejsca aktywnego. Przeszkodę stanowi przede wszystkim reszta histydyny, która zostaje przesunięta dopiero podczas przyjmowania konformacji „szeroko otwartej” kłapki.

### 1.3. GŁÓWNE MECHANIZMY FUNKCJONOWANIA INHIBITORÓW UREAZ

Badania krystalograficzne miejsca aktywnego ureazy wykazały, że inhibitory ureaz często charakteryzuje obecność fragmentu kompleksującego katalityczne jony niklu w połączeniu ze zdolnością do utworzenia odpowiedniej sieci interakcji, między innymi wiązań wodorowych, podobnie do substratów lub stanu przejściowego reakcji.<sup>51,52</sup> W przypadku związków stanowiących analogi substratu elastyczność funkcjonowania ureazy umożliwia skuteczne wiązanie nawet stosunkowo dużych struktur np. podstawionych tiomoczników. Przykładem fragmentu strukturalnego zdolnego do utworzenia podobnych interakcji jest reszta fosfonianu, uważana za analog stanu przejściowego hydrolizy wiązania amidowego. Równie często spotyka się zdolność do kowalencyjnego wiązania reszty cysteiny w strukturze klapki miejsca aktywnego (Cys322 w przypadku ureazy *S. pasteurii*). Do tego typu związków należą akceptory typu Michaela, katechole oraz związki selenoorganiczne.

#### 1.3.1. Antybiotyki chinolonowe

Chinolony i fluorochinolony są grupą wysoce aktywnych antybiotyków o szerokim spektrum działania, powszechnie wykorzystywanych w leczeniu szeregu infekcji bakteryjnych.<sup>53</sup> Związki te są aktywne również względem dużej liczby gatunków patogennych mikroorganizmów Gram-ujemnych. Obecnie w medycynie stosuje się przede wszystkim fluorochinolony (Rys. 1.), charakteryzujące się zwiększoną skutecznością i szerszą aktywnością, niż struktury pozbawione atomu fluoru. Ich podstawowym mechanizmem funkcjonowania jest inhibicja gyraz (główny cel inhibicji w przypadku bakterii Gram-ujemnych) lub topoizomeras bakteryjnych. Następstwem są zaburzenia w replikacji DNA, które przy wyższych stężeniach antybiotyku prowadzą do śmierci komórki. Wypracowane przez bakterie mechanizmy narastającej oporności antybiotykowej obejmują mutacje miejsca docelowego wiązanego przez inhibitor lub modyfikacje osłon komórkowych w celu usunięcia fluorochinolonów z komórki.



Rys. 1. – Struktura antybiotyków fluorochinolonowych <sup>54</sup>

Badania wykazały, że pochodne chinonów mogą funkcjonować jako inhibitory ureazy. <sup>55</sup> Potwierdzono również funkcjonowanie różnych mechanizmów inhibicji w zależności od struktury badanego związku. 1,4-benzochinon oraz jego pochodne charakteryzowała inhibicja, w której stan równowagi między kompleksem EI i wolnymi cząsteczkami enzymu i inhibitora został osiągnięty bardzo szybko, nie dłużej niż po 10 minutach od rozpoczęcia reakcji w systemie niewykorzystującym preinkubacji enzymu z inhibitorem. Z kolei w przypadku związku o strukturze naftochinonowej zaobserwowano funkcjonowanie inhibicji zgodnej z modelem wolnowiążącym. Osiągnięcie fazy plateau zajmowało nawet 100 minut od rozpoczęcia reakcji. Naftochinon jest zdolny do arylowania tioli w resztach cysteiny, podobnie jak benzochinony. W związku z tym sformułowano hipotezę zakładającą istnienie w przypadku tej struktury dodatkowego, zależnego od czasu, mechanizmu inhibicji.

Otrzymano również nanocząstki metali szlachetnych o przyłączonej strukturze chinolonowej, aby połączyć aktywność przeciwdrobnoustrojową metali z funkcjonalnością antybiotyków. <sup>56</sup> Wykazano, że utworzone w taki sposób nanocząstki srebra wykazują nawet 250-krotnie wyższą aktywność jako inhibitory oczyszczonej ureazy niż sam antybiotyk wykorzystany do badań – moksyflokscyna. Co ciekawe, zastosowanie w tym samym celu nanocząstek złota doprowadziło do znaczącej utraty zdolności wyjściowego związku do hamowania aktywności ureolitycznej. Utworzone koniugaty antybiotyku i nanocząstek metalu (zarówno srebra, jak i złota) wykazywały również wysoką aktywność bakteriobójczą, niezależnie od struktury ściany komórkowej.

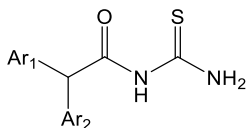
Fluorochinolony łączą standardową aktywność jako antybiotyki oddziałujące na genom bakteryjny oraz zdolność do inhibicji ureolizy. <sup>57</sup>



To sprawia, że są obiecującymi lekami w przypadku infekcji spowodowanych przez bakterie ureolityczne, takie jak *P. mirabilis* i *H. pylori*. Ponadto, połączenie ich z innymi inhibitorami ureolizy prawdopodobnie może doprowadzić do działania synergistycznego. Umożliwiłoby to obniżenie stosowanego stężenia antybiotyku, co z kolei mogłoby doprowadzić do spowolnienia narastającego zjawiska oporności antybiotykowej.

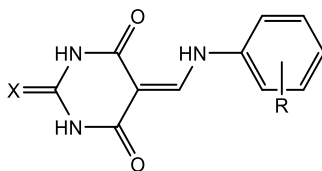
### 1.3.2. Analogi mocznika i tiomocznika

Wiele związków będących strukturalnymi analogami substratu reakcji ureolizy może skutecznie hamować aktywność katalizujących ten proces enzymów.<sup>58</sup> Zwykle funkcjonują jako odwracalne inhibitory kompetycyjne, co może generować trudności przy zastosowaniu w środowisku, w którym występuje obfitość mocznika, którego cząsteczki skutecznie konkurują z inhibitorem o miejsce w centrum katalitycznym ureazy. W przypadku tych związków szczególnie często obserwuje się dużą rozbieżność w skuteczności względem oczyszczonej ureazy a całych komórek ureolitycznych mikroorganizmów. Uważa się, że przyczyną tego stanu rzeczy są duże trudności w transporcie opisywanych struktur przez bakteryjne osłony komórkowe. Innym popularnym wyjaśnieniem jest szybkie metabolizowanie inhibitorów przez aparat enzymatyczny mikroorganizmów. Kieszeń wiążąca substrat reakcji w strukturze ureaz jest stosunkowo wąska, co wyklucza zastosowanie zbyt rozbudowanych związków opartych o strukturę mocznika.<sup>59</sup> Ten problem został rozwiązany poprzez wykorzystanie analogów siarkowych, na przykład bazujących na strukturze *N*-aryloacetotiomocznika (Rys. 2.), które wykazują znacznie większe powinowactwo do jonów niklu. Co ważne, związki te wykazywały obiecującą aktywność (znacznie wyższą niż w przypadku zastosowania kwasu aceto hydroksamowego) również względem całych komórek bakterii Gram-ujemnych *H. pylori*.



Rys. 2. – Struktura *N*-diaryloacetotiomocznika<sup>59</sup>

Udowodniono, że wykorzystanie struktur barbituranów lub tiobarbituranów również owocuje uzyskaniem aktywnych inhibitorów ureolizy funkcjonujących jako analogi substratu reakcji (Rys. 3).<sup>60</sup> Tiobarbiturany w większości przypadków charakteryzują się wyższą aktywnością, niż ich niezawierające atomu siarki analogi. Prawdopodobnym wyjaśnieniem jest zwiększenie powinowactwa do katalitycznych jonów niklu, podobnie jak w przypadku pochodnych mocznika i tiomocznika. W przypadku inhibicji ureaz przez tiobarbiturany wiązania wodorowe tworzone przez grupy hydroksylowe prowadzą do koordynacji katalitycznych jonów niklu w centrum aktywnym biokatalizatora. Przyłączenie do struktury wiodącej reszt aniliny zawierających rozmaite podstawniki umożliwiło osiągnięcie wysoce aktywnych inhibitorów.



Rys. 3. – Barbituranowe pochodne mocznika lub tiomocznika<sup>60</sup>

Najsukuteczniejszy z otrzymanych w opisanym badaniu związków charakteryzowała wartość  $IC_{50} = 8,53 \mu M$  wobec oczyszczonego enzymu pochodzenia roślinnego. Przeprowadzone modelowanie molekularne potwierdziło, że struktura mocznika lub tiomocznika w reszcie barbituranowej odpowiada głównie za koordynowanie katalitycznych jonów metalu w centrum aktywnym enzymu. W przypadku struktury tiomocznika wiązanie okazało się znacznie trwalsze, prowadząc do wyższej aktywności pochodnych tiobarbituranowych, niezależnie od modyfikacji wprowadzonych do reszty anilinowej. Ta ostatnia brała udział w tworzeniu oddziaływań z kluczowymi dla aktywności ureolitycznej resztami aminokwasowymi, co było szczególnie widoczne w przypadku pochodnych określonych jako najsukuteczniejsze inhibitory. Podsumowując, odpowiednia modyfikacja struktury barbituranów i tiobarbituranów może doprowadzić do uzyskania związków będących znacznie skuteczniejszymi inhibitorami ureolizy niż stosunkowo mało aktywne pod tym względem struktury wyjściowe.

Struktura mocznika lub tiomocznika jest używana jako fragment budowy różnorodnych związków chemicznych o określonej aktywności.<sup>61</sup> Z tego powodu występuje ona jako element leków bifunkcyjnych, w których hamowanie ureolizy przez analogię do substratu będzie dodatkiem do tradycyjnej funkcjonalności danej cząsteczki. Jedną z tego rodzaju prób podjęto z wykorzystaniem szkieletu ibuprofenowego. Jak wspomniano wcześniej, niektóre mikroorganizmy ureolityczne są zdolne do generowania chronicznego stanu zapalnego w organizmie pacjenta. Należy do nich między innymi *H. pylori*. Połączenie inhibicji ureolizy z aktywnością przeciwzapalną ibuprofenu może doprowadzić do uzyskania grupy obiecujących leków do zwalczania infekcji wywołanych przez tego rodzaju szczepy mikroorganizmów patogennych. Badania wstępne prowadzone z wykorzystaniem ureazy pochodzenia roślinnego potwierdziły, że te struktury funkcjonują jako umiarkowanie aktywne inhibitory ureolizy. Najskuteczniejszą spośród badanych struktur charakteryzowała wartość  $IC_{50} = 14,6 \mu\text{M}$ . Choć aktywność może zostać uznana za stosunkowo niską w porównaniu z częścią znanych inhibitorów ureazy, należy zaznaczyć, że testy *in vitro* nie uwzględniają innej aktywności badanych związków.

### 1.3.3. Flawonoidy

Pochodne flawonoidów są często uznawane za bardzo obiecujące inhibitory ureolizy do zastosowania w medycynie.<sup>62</sup> Uważa się, że umożliwią one osiągnięcie bardzo trudnego do uzyskania połączenia wysokiej aktywności antyureolitycznej oraz stosunkowo niskiej toksyczności dla organizmu pacjenta w stężeniach wymaganych do neutralizacji danego zakażenia. Zastosowanie w medycynie biologicznie aktywnych produktów naturalnych prawdopodobnie pozwoli ograniczyć ilość niepożądanych efektów ubocznych, często problematycznych w przypadku leków syntetycznych. Dodatkową zaletą tej grupy związków chemicznych jest ich bardzo dobrze poznana aktywność przeciwbakteryjna, antyoksydacyjna i przeciwzapalna. W przeprowadzonych niedawno badaniach dokonano próby uzyskania wysoce aktywnych inhibitorów ureolizy poprzez połączenie struktury flawonoidu z mocznikiem. Celem było uzyskanie grupy związków funkcjonujących jako analogi substratu reakcji katalizowanej przez ureazę, przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych właściwości

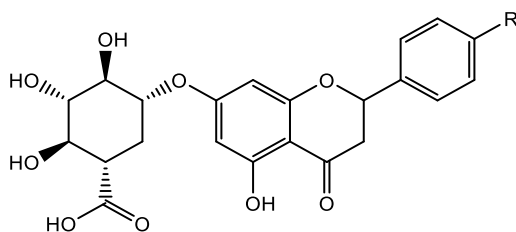
flawonoidów i ich pochodnych. Połączenie tych struktur umożliwiło osiągnięcie inhibitorów 10-krotnie skuteczniejszych niż zastosowany w próbie wzorcowy inhibitor, którym był tiomocznik. Wykazano jednak, że przy projektowaniu tego rodzaju inhibitorów bardzo ważnym czynnikiem jest wielkość zastosowanych podstawników, która umożliwia związkowi odpowiednie umiejscowienie się w centrum katalitycznym enzymu.

Ekstrakty roślinne często są wykorzystywane do zwalczania problemów żołądkowych lub infekcji dróg moczowych w medycynie tradycyjnej.<sup>63</sup> Za przykłady może posłużyć żurawina lub zielona herbata, wykorzystywana w medycynie chińskiej. Obecnie uważa się, że aktywność zawartych w nich flawonoidów jako inhibitorów ureaz bakteryjnych jest kluczowym czynnikiem odpowiadającym za efektywność tego rodzaju leków. Potwierdzono, że aktywność ureolityczna patogenu dróg moczowych *Staphylococcus saprophyticus* jest hamowana przy zastosowaniu odpowiedniego stężenia ekstraktu z dostępnej komercyjnie zielonej herbaty. Wykazano również, że dodatek soku z żurawiny prowadzi do znaczących zmian parametrów ludzkiego moczu, które prowadzą do ograniczenia formowania się złogów znanych potocznie jako kamienie moczowe.

Obecnie w literaturze naukowej znaleźć można wyniki badań potwierdzających wysoką aktywność w inhibicji ureolizy niemal wszystkich grup struktur flawonoidowych.<sup>64</sup> Badaniom poddano chalkony, flawanole, flawony, flawanony, antocyjaniny, izoflawonoidy oraz ich glikozydy. Zależnie od struktury testowanych związków inhibicja ureaz przebiegała zgodnie z innymi mechanizmami. Przykładowo, w przypadku chalkonów i flawanonów w większości przypadków stwierdzono niekompetycyjny model inhibicji, zaś dla flawonów i katechin hamowanie ureolizy odbywało się według mechanizmu kompetycyjnego. Potwierdzono, że ramnoglukozyd hesperetyny (bioflawonoidu należącego do grupy flawanonów) wykazuje zdolność do inhibicji ureolizy w połączeniu z obiecującą aktywnością antybakteryjną nawet wobec mikroorganizmów Gram-ujemnych, takich jak *H. pylori*.<sup>65</sup> Barwienie fluorescencyjne komórek tego gatunku izotiocyanianem fluoresceiny (wiążącym się do frakcji lipopolisacharydowej ściany komórkowej bakterii) doprowadziło

badaczy do wniosku, że aktywność ta ma związek z wzrostem przepuszczalności osłon komórkowych.

Jednym z najciekawszych przykładów związków flawonoidowych potwierdzonych w ostatnich latach jako inhibitory ureazy są bajkalina oraz skutellaryna (Rys. 4).<sup>66</sup> Obydwie te struktury są charakterystyczne dla roślin z rodzaju tarczyc (*Scutellaria*), przede wszystkim tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis*). Są one powszechnie wykorzystywane w chińskiej medycynie do leczenia schorzeń przewodu pokarmowego, między innymi objawów typowych dla chronicznego stanu zapalnego wywołanego przez *H. pylori*.



Rys. 4. – Bajkalina (R = H) i skutellaryna (R = OH)<sup>66</sup>

Modelowanie molekularne wykazało, że te związki funkcjonują jako inhibitory ureazy w oparciu o inny mechanizm niż większość podobnych struktur. W tym przypadku najważniejszym elementem wydaje się być wiązanie kluczowej reszty cysteiny w strukturze klapki przysłaniającej miejsce aktywne ureazy. Reakcja z tą resztą prowadzi do zmiany konformacyjnej innych istotnych katalitycznych reszt aminokwasów w centrum aktywnym biokatalizatora, co skutkuje zahamowaniem jego aktywności.

#### 1.3.4. Związki heterocykliczne

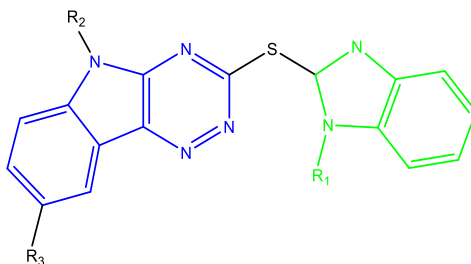
Związki heterocykliczne stanowią obiekt zainteresowania badawczego jako inhibitory ureolizy już od ponad 40 lat.<sup>67</sup> W początkowym etapie prac struktury tego rodzaju były badane głównie pod kątem zastosowania w rolnictwie. Uważano, że ich zdolność do tworzenia kompleksów z jonami metali może przyczyniać się do zwiększonej aktywności względem ureaz. Późniejsze badania wykazały jednak, że zastosowanie większości testowanych struktur nie przyczynia

się do znaczącego zahamowania ureolizy. W przypadku niektórych związków zaobserwowano wręcz odwrotny efekt. Aktywność innych badanych pochodnych ograniczała się wyłącznie do testów *in vitro* na oczyszczonej ureazie pochodzenia roślinnego. Podczas prób przeprowadzonych w glebie nie udało się powtórzyć obiecujących wyników uzyskanych w poprzednim etapie. Mogło to świadczyć o braku stabilności chemicznej, wciąż stanowiącej poważny problem w przypadku kilku znanych grup związków, opisanych jako inhibitory ureolizy. W przypadku żadnego ze związków nie udało się uzyskać wpływu na aktywność ureolityczną w glebie wyższego niż w przypadku katecholu, który stanowił jeden z referencyjnych inhibitorów ureazy.

Pochodne imin były szeroko rozpatrywane jako związki będące potencjalnymi inhibitorami ureolizy.<sup>68</sup> W ostatnich latach prowadzono prace nad wykorzystaniem do tego celu pochodnych triazolowych zawierających reszty tiolowe i hydroksylowe. Kompleksy tych ligandów utworzone z jonami metali funkcjonowały jako inhibitory ureolizy. W przypadku najskuteczniejszych badanych związków wykazano zdolność do hamowania ureaz 20-krotnie wyższą niż w przypadku tiomocznika – wartość  $IC_{50}$  najskuteczniejszego z nich wyniosła 0,94  $\mu\text{M}$ . Wybór metalu użytego do utworzenia kompleksu z zasadą Schiffa zawierającą fragment triazolowy okazał się w tym przypadku kluczowy dla aktywności inhibitorów. Najlepsze wyniki przyniosło wykorzystanie miedzi, niklu lub palladu. Obserwowana inhibicja ureazy roślinnej zachodziła zgodnie z mechanizmem niekompetycyjnym lub, w przypadku jednego ze związków, mieszanym. Uważa się ponadto, że związki te będą charakteryzować się obniżoną toksycznością dla człowieka. Toksyczność jest często najpoważniejszym problemem podczas badania struktur heterocyklicznych jako inhibitorów ureazy, szczególnie przewidzianych do zastosowania medycznego.

W ostatnich latach tricykliczny szkielet triazynoindolowy uznano za kolejne obiecujące rusztowanie do syntezy związków potencjalnie funkcjonujących jako heterocykliczne inhibitory ureolizy.<sup>69</sup> Poprzednie prace badawcze z wykorzystaniem tych związków udowodniły szereg innych aktywności, między innymi przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybicze. Z kolei struktura benzimidazolowa wykazuje aktywność antyoksydacyjną oraz

przeciwnowotworową. Podejrzewa się, że poprzez umiejętne zaprojektowanie optymalnych struktur, możliwe będzie połączenie tych dobroczynnych aktywności ze skuteczną inhibicją ureaz, stanowiących czynniki wirulencji patogennych szczepów. Dokonano więc próby syntezy hybrydowych inhibitorów zawierających w strukturze resztę triazinoindolową, jak również benzimidazolową (Rys. 5.). Dla najskuteczniejszych inhibitorów ureaz wśród grupy badanych struktur wyznaczono wartość  $IC_{50} = 200$  nM.



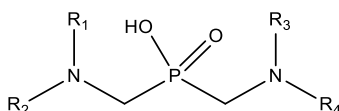
Rys. 5. – Połączenie struktury triazinoindolowej (niebieska) z resztą benzimidazolową (zielona) <sup>69</sup>

### 1.3.5. Związki fosforoorganiczne

Pochodne kwasu fosfinowego są od dawna znane jako obiecujące pod kątem zastosowania w projektowaniu nowych związków bioaktywnych. <sup>70</sup> Przyczynia się do tego zdolność do tworzenia optymalnych interakcji elektrostatycznych, wiązań wodorowych oraz koordynacyjnych z różnorodnymi jonami metali. Ich charakterystyczna struktura sprawia również, że często mogą występować jako analogi stanu przejściowego reakcji enzymatycznych, w szczególności procesów hydrolizy. Potwierdzono, że odpowiednio zaprojektowane struktury bazujące na szkielecie kwasu fosfinowego wykazują wysoką aktywność jako leki przeciwzapalne. Struktura fosfinowa znana jako Lesogaberan, wprowadzona przez AstraZeneca, została zaprojektowana do zwalczania refluksu żołądkowo-przełykowego. Podejrzewa się, że rozwój tej przypadłości może być związany z infekcją ureolitycznym szczepem bakteryjnym *H. pylori*.

Jedną z grup związków fosforoorganicznych najwcześniej określonych jako bardzo skuteczne inhibitory ureolizy są amidy kwasów

fosforowych. <sup>71</sup> Przykładem może być fluorofamid. Niestety, ich przydatność w leczeniu infekcji wywołanych przez ureolityczne mikroorganizmy patogenne jest poważnie ograniczona przez niską stabilność wiązania P-N w środowisku wodnym. Z tego względu szczególny nacisk w ostatnich latach kładzie się na wykorzystanie w projektowaniu potencjalnych inhibitorów zawierających motyw strukturalny N-C-P. Takie związki fosforoorganiczne charakteryzują się znacznie wyższą trwałością. Kwas bis(aminometylo)fosfinowy (Rys. 6.) wydaje się być szczególnie obiecującą strukturą wiodącą do projektowania inhibitorów ureolizy. Obecność dwóch grup aminowych umożliwia tworzenie większej ilości pochodnych strukturalnych.



Rys.6. - Struktura inhibitorów ureazy opartych na kwasie bis(aminometylo)fosfinowym <sup>71</sup>

Potwierdzono, że pochodne tego związku są aktywnymi inhibitorami ureaz bakteryjnych, zarówno bakterii Gram-dodatnich *S. pasteurii*, jak i Gram-ujemnego patogenu *P. mirabilis*. Najskuteczniejszy spośród badanych związków charakteryzowały wartości  $K_i$  (stała dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor) wynoszące odpowiednio 108 nM (*S. pasteurii*) i 202 nM (*P. mirabilis*).

W kolejnym podejściu dokonano próby włączenia grupy fosforowej jako podstawnika w szkielet kwasu cytrynianowego. <sup>72</sup> Struktury te zostały wyselekcjonowane jako potencjalnie zdolne do działania analogicznego do dikarboksylowej struktury cytrynianu. Ten ostatni został już wcześniej potwierdzony jako inhibitor ureazy pochodzącej ze *S. pasteurii*. Molekularny mechanizm działania stanowi połączenie kompleksowania katalitycznych jonów niklu, interakcji z atomem azotu kluczowej reszty histydynowej oraz wiązań wodorowych tworzonych z atomami tlenu i azotu innych reszt istotnych dla aktywności enzymu aminokwasów w centrum aktywnym. Zastosowanie grupy fosforowej powinno dodatkowo podwyższyć powinowactwo takich związków do jonów niklu. Wykazano, że w tym przypadku dokładne zaprojektowanie i optymalizacja struktury jest



wyjatkowo istotnym etapem. Estryfikacja grupy karboksylowej kwasu cynamonowego lub przekształcenie grupy fosfonowej w fosfinową prowadziły do ponad czterdziestokrotnego spadku aktywności badanych inhibitorów względem ureazy bakteryjnej. Sztywność struktury zapewniana przez nienasycone wiązanie w kwasie cynamonowym również okazała się kluczowa w aktywności związków. Redukcja wspomnianego wiązania 150-krotnie podwyższyła wartość stałej dysocjacji kompleksu enzymu z inhibitorem.

### 1.3.6. Jony metali

Kationy metali zostały stosunkowo wcześniej opisane jako inhibitory aktywności ureolitycznej.<sup>73</sup> Badania mające na celu ustalenie ich zdolności do hamowania ureaz niosą ze sobą jednak liczne trudności. W pierwszej fazie badań w warunkach *in vitro* konieczne jest znalezienie buforu reakcyjnego niewchodzącego w interakcje z biokatalizatorem ani z jonami badanego metalu. Ponadto należy brać pod uwagę możliwość zmiany wartościowości obecnych w mieszaninie reakcyjnej kationów w czasie obserwowanej reakcji. Jest to szczególnie problematyczne przy badaniu inhibicji przez jony  $Fe^{2+}$ , które stosunkowo łatwo ulegają utlenieniu do formy  $Fe^{3+}$ . Uważa się, że w większości przypadków do inhibicji dochodzi na skutek interakcji kationów z grupami tiolowymi w strukturze ureazy. Jest to efektywny mechanizm, prowadzący jednak do kolejnych komplikacji wynikających ze stosunkowo wysokiej toksyczności, wynikającej najczęściej z powstawania nierozpuszczalnych siarczków metali. Z tego względu metale tworzące nierozpuszczalne w środowisku wodnym siarczki zostały uznane za najmniej odpowiednie do zastosowania jako inhibitory ureolizy. Wszystkie badane kationy charakteryzowała inhibicja ureazy zgodnie z mechanizmem niekompetycyjnym. W oparciu o te wyniki uznano wstępnie, że grupy tiolowe ureazy wiązane przez jony metali prawdopodobnie odpowiadają za nadanie trwałości struktury trzeciorzędowej enzymu poprzez tworzenie mostków disiarczkowych.

Dokładna analiza porównawcza wyników pierwszych badań dotyczących aktywności jonów metali jako inhibitorów ureaz doprowadziła do licznych niejasności.<sup>74</sup> Szczególnie wyraźnym przykładem są próby określenia mechanizmu inhibicji. Różne grupy

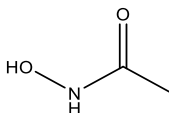
badawcze proponowały hamowanie biokatalizatora zgodne z różnymi modelami kompetycyjności. To z kolei prowadzi do niespójności w ocenie skuteczności inhibicji, jako że od obranego mechanizmu zależy metoda wyznaczania wartości  $K_i$ . Jest prawdopodobne, że różnice w wynikach pomiarów mają swoje źródło między innymi w zastosowaniu przez autorów prac różnych buforów reakcyjnych, które mogły wchodzić w reakcje chemiczne z badanymi metalami. W późniejszych badaniach uwzględniono także pomiary hamowania ureolizy w dwóch systemach różniących się czasem preinkubacji enzymu z inhibitorem. Wykazano, że większość jonów funkcjonuje jako wolnowiążące inhibitory ureaz. Jest to dość zaskakujący wynik biorąc pod uwagę, że w większości przypadków wolnowiążący mechanizm hamowania aktywności obserwuje się głównie w przypadku inhibitorów stanowiących analogi stanu przejściowego reakcji enzymatycznej. Hamowanie aktywności ureaz przez jony metali odbywało się zgodnie z mechanizmem określonym w dalszej części tej pracy jako mechanizm B. Inhibicja przebiegała więc od samego początku reakcji w systemie bez preinkubacji, lecz jej efektywność ulegała znaczącemu zwiększeniu w miarę upływu czasu trwania reakcji enzymatycznej.

Niemal wszystkie badania prowadzone w tym kierunku potwierdzają, że jony rtęci, srebra i miedzi są najskuteczniejszymi ze wszystkich metali inhibitorami ureolizy.<sup>75</sup> Wykazano, że ich zdolność do hamowania aktywności enzymu jest zbliżona, a stężenia przy których obserwuje się 50-procentową inhibicję mieszczą się w przedziale 2-3  $\mu\text{M}$ . To czyni wymienione jony inhibitorami ureolizy o sile porównywalnej z wiodącymi strukturami benzochinonowymi. Eksperyment mający na celu określenie stężenia wolnych grup tiolowych doprowadził jednak do zaobserwowania interesującej różnicy między mechanizmem funkcjonowania badanych kationów. W przypadku jonów rtęci przy całkowitym zablokowaniu aktywności ureolitycznej obserwowano interakcję metalu ze wszystkimi dostępnymi resztami tiolowymi cystein wchodzących w skład biokatalizatora. Dla jonów srebra i miedzi w analogicznej sytuacji stwierdzono związanie tylko części grup tiolowych, odpowiednio 53% ( $\text{Ag}^+$ ) i 60% ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Jednym z wyjaśnień tej obserwacji jest hipoteza zakładająca dodatkowy mechanizm hamowania ureolizy w przypadku jonów srebra i miedzi. Może to być kompleksowanie z atomami azotu

w kluczowych resztach histydyny lub generowanie stresu oksydacyjnego i utlenienie reszt w enzymie. Ponadto, kation srebra o stosunkowo niewielkim promieniu atomowym może łatwiej wnikać do centrum aktywnego enzymu i wiązać kluczową resztę cysteiny w strukturze kłapki. Konsekwencją jest całkowite zablokowanie aktywności ureazy jeszcze przed związaniem wszystkich dostępnych grup tiolowych biokatalizatora. Badania trwałości inhibicji prowadzone metodą nagłego rozcieńczenia (*jump dilution*) wykazały, że najsilniejszym wiązaniem z grupami tiolowymi charakteryzują się kationy rtęci. Przy ich zastosowaniu zaobserwowano odzyskanie tylko 6% aktywności ureolitycznej po szybkim rozcieńczeniu mieszaniny reakcyjnej. Najsłabsze wiązanie występowało w przypadku miedzi, dla której stwierdzono odzyskanie 80% aktywności enzymu.

### 1.3.7. Kwasy hydroksamowe

Najbardziej znanym inhibitorem ureolizy należącym do grupy kwasów hydroksamowych jest kwas aceto hydroksamowy (Rys. 7.).<sup>76</sup> Hamowanie aktywności ureazy przez ten związek odbywa się zgodnie z mechanizmem odwracalnym kompetycyjnym, zaś kinetyka hamowanej reakcji jest zbliżona do tej obserwowanej podczas inhibicji z użyciem fosforamidów.



Rys. 7. – Kwas aceto hydroksamowy<sup>76</sup>

Kwas aceto hydroksamowy badano pod kątem potencjalnego stosowania w leczeniu wrzodów żołądka wywołanych przez zakażenie *H. pylori*.<sup>77</sup> Sugerowano również stosowanie go w przypadku innych infekcji spowodowanych przez patogeny ureolityczne. Głównym mechanizmem inhibicji w przypadku kwasów hydroksamowych jest wysoka zdolność do chelatowania jonów metali. Związki te mogą dzięki opisanej właściwości funkcjonować jako skuteczne inhibitory nie tylko ureazy, ale również innych metaloprotein.

Kwas aceto hydroksamowy, jako skuteczny inhibitor ureaz stanowiących czynnik wirulencji patogennych szczepów, został zatwierdzony jako potencjalny lek do zastosowania w przypadkach takich jak zakażenie dróg moczowych wywołany przez bakterie ureolityczne.<sup>78</sup> Struktura ta została wstępnie uznana za najbardziej efektywne połączenie wysokiej aktywności biologicznej oraz stosunkowo niskiej toksyczności dla człowieka. Dalsze badania wykazały, że zastosowanie kwasu aceto hydroksamowego w połączeniu z kuracją antybiotykową może skutkować efektem działania synergistycznego, efektywniej eliminując lub hamując wzrost mikroorganizmów patogennych.<sup>79</sup> Poza zdolnością do inhibicji ureolizy potwierdzono, że kwas aceto hydroksamowy funkcjonuje jako bakteriostatyk wobec wielu patogennych szczepów bakteryjnych, wliczając w to liczne gatunki Gram-ujemne. Uważa się, że jedną z przyczyn synergistycznego funkcjonowania tego inhibitora z niektórymi antybiotykami jest zwiększona permeabilizacja osłon komórkowych mikroorganizmów.

### 1.3.8. Związki selenoorganiczne

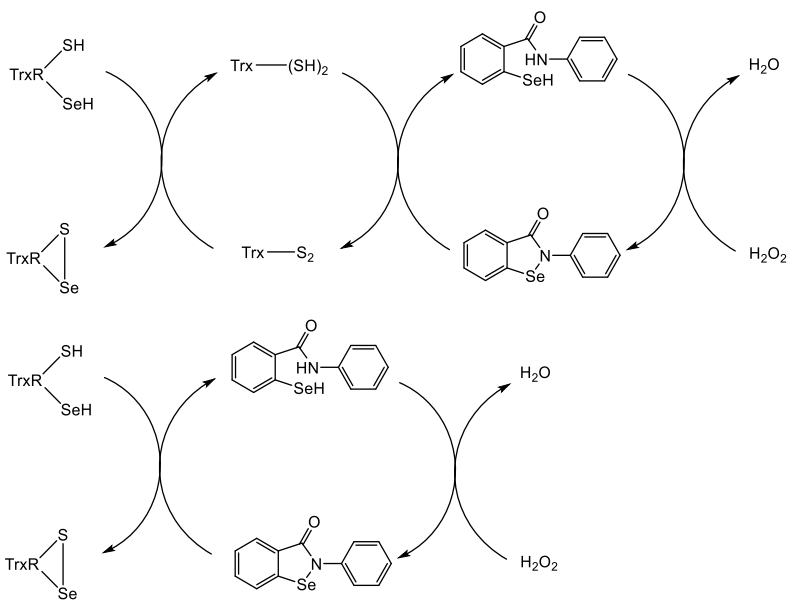
Ebselen należy do związków selenoorganicznych zawierających pierścień izoselenazolonu. Charakteryzuje go powszechnie znana i szczegółowo udowodniona aktywność jako substancji przeciwzapalnej posiadającej dodatkowo aktywność przeciwutleniającą. Pierwszą zaobserwowaną aktywnością przeciwzapalną ebselenu było przeciwdziałanie obrzękowi kończyn powstającego u zwierząt doświadczalnych po wstrzyknięciu CVF – jednego z głównych składników jadu kobry. Oprócz aktywności przeciwzapalnej i przeciwutleniającej ebselen wykazuje również obiecujące właściwości jako środek przeciwbakteryjny. Połączenie tych funkcjonalności czyni go związkiem interesującym z medycznego punktu widzenia. Badania prowadzone na zwierzętach doświadczalnych dowiodły, że podanie tej substancji umożliwia znaczące ograniczenie powstawania wrzodów żołądka.<sup>80,81</sup>

Mechanizm enzymatyczny, znany powszechnie jako system tioredoksyny jest powszechnie występującą u żywych organizmach metodą ograniczenia stresu oksydacyjnego.<sup>82</sup> Jest to ważne, ponieważ

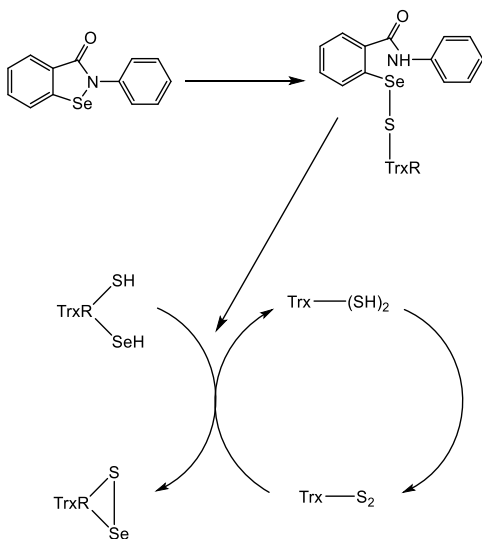
brak kontroli stężenia reaktywnych form tlenu może doprowadzić do poważnych zaburzeń funkcjonowania organelli komórkowych. System ten składa się z tioredoksyny, reduktazy tioredoksyny oraz fosforanu dinukleotydu nikotynoadeninowego (NADPH), służącego jako donor elektronów. Dwie reszty cysteiny umożliwiają tioredoksynie redukcję reaktywnych form tlenu, w wyniku w jej strukturze tworzy się mostek disiarczkowy. Ten następnie jest redukowany poprzez aktywność reduktazy tioredoksyny z wykorzystaniem elektronów dostarczanych przez strukturę NADPH. W ten sposób dochodzi do regeneracji tioredoksyny poprzez powrót do funkcjonalnej formy z cysteiną w postaci zredukowanej, co z kolei umożliwia dalszą kontrolę stresu oksydacyjnego. Analogiczną rolę pełni także system reduktazy glutationu. Zaobserwowano jednak, że wiele patogennych mikroorganizmów, w tym również ureolitycznych, wykorzystuje system TrxR jako jedyny mechanizm kontroli stresu oksydacyjnego. System reduktazy glutationu w ich przypadku nie funkcjonuje. Za przykład mogą posłużyć gatunki *S. aureus*, *H. pylori* oraz *C. neoformans*.

O ile sama tioredoksyna jest białkiem o budowie ściśle zachowanej ewolucyjnie, to reduktaza tioredoksyny przyjmuje w przyrodzie dwie różniące się od siebie izoformy. U organizmów prokariotycznych i niższych eukariontów takich jak drożdże i rośliny obserwuje się tzw. izoformę o niskiej masie molekularnej (masa podjednostki 35 kDa). U ssaków występuje forma o wysokiej masie molekularnej (masa podjednostki 55 kDa). Ten wariant enzymu różni się od poprzedniego m.in. podstawieniem selenocysteiny w miejsce jednej z ważnych katalitycznych reszt cysteiny. Dzięki temu w komórkach ssaczy ebselen może funkcjonować jako antyoksydant, co wielokrotnie potwierdzano w doniesieniach literaturowych. Zarówno tioredoksyna jak i reduktaza tioredoksyny mogą wchodzić z ebselenem w reakcję redoks, prowadzącą do redukcji atomów azotu i selenu w strukturze tego ostatniego. W takiej postaci ebselen może służyć jako reduktor reaktywnych form tlenu. Po utlenieniu związek selenoorganiczny może być ponownie zredukowany przez jeden z elementów systemu TrxR. Potwierdzono, że ebselen służy jako substrat dla ssaczej TrxR właśnie dzięki obecności selenocysteiny w miejscu aktywnym (Rys. 8.). W przypadku mikrobiologicznej TrxR ebselen nie tylko nie pełni roli substratu, ale przeciwnie, działa jako

inhibitor blokujący jej aktywność (Rys. 9.). W dalszym ciągu może on być regenerowany jako przeciwutleniacz przez samą tioredoksynę, zachowaną ewolucyjnie w bardzo zbliżonej strukturze, jak wspomniano wcześniej. Jednakże, bez aktywności TrxR, pula aktywnej, zredukowanej tioredoksyny ulegnie wreszcie wyczerpaniu, poważnie ograniczając możliwości radzenia sobie ze stresem oksydacyjnym. Podsumowując, dzięki różnicom w budowie izoform TrxR, ebselen może funkcjonować jako induktor stresu oksydacyjnego w komórkach mikroorganizmów (włącznie z eukariotycznymi). Nie traci przy tym korzystnych właściwości przeciwutleniacza w komórkach ssaczy.



Rys. 8. – System TrxR-Trx w komórkach ssaków, w których ebselen występuje jako substrat <sup>82</sup>



Rys. 9. – System TrxR-Trx w komórkach mikroorganizmów, w których ebselen występuje jako inhibitor <sup>82</sup>

Opisana wcześniej zdolność do tworzenia wiązań z grupami tiolowymi sprawia, że ebselen jest również bardzo obiecującym potencjalnym inhibitorem ureaz pochodzenia mikrobiologicznego. <sup>83</sup> W przypadku większości enzymów należących do tej grupy kluczowa dla ich aktywności katalitycznej jest reszta cysteiny znajdująca się w miejscu aktywnym biokatalizatora (Cys322 w przypadku jednej z najlepiej poznanych strukturalnie ureaz, ekspresjonowanej przez bakterie z gatunku *S. pasteurii*). We wcześniejszych badaniach wykazano, że ebselen oraz jego pochodne rzeczywiście funkcjonują jako wolnowiążące inhibitory ureazy. Kompleks enzymu z inhibitorem jest w większości przypadków tworzony szybko, lecz etapem limitującym szybkość hamowania są jego dalsze powolne zmiany konformacyjne. Wykazano, że ebselen charakteryzuje się niezwykle niską wartością stałej dysocjacji kompleksu z ureazą SPU, wynoszącą 2,11 nM. To czyni ten związek jednym z najskuteczniejszych znanych dotychczas inhibitorów ureaz pochodzenia bakteryjnego. W badaniach prowadzonych na oczyszczonej ureazie z *H. pylori* niezbędne było zastosowanie ponad 100-krotnie wyższego stężenia ebselenu aby osiągnąć zbliżoną skuteczność. Podobną zależność obserwuje się jednak

również dla innych inhibitorów ureazy. Za przykład może posłużyć kwas acetohydroksamowy ( $K_i = 3300$  nM dla ureazy *S. pasteurii* - SPU,  $K_i = 96000$  nM dla ureazy *H. pylori* - HPU)

### 1.3.9. Grupy inhibitorów ureazy - podsumowanie

W ostatnich latach dokonano próby zebrania i podsumowania efektów pracy zespołów badawczych poszukujących struktur będących obiecującymi inhibitorami ureaz pochodzenia mikrobiologicznego.<sup>84</sup> Na podstawie tej analizy sformułowano wniosek o znikomym wpływie właściwości fizykochemicznych struktur na ich zdolność do hamowania ureolizy. Analiza danych literaturowych potwierdziła, że w większości przypadków liczba pierścieni aromatycznych, donorów i akceptorów wiązań wodorowych oraz masa cząsteczkowa związku były zbliżone w przypadku związków aktywnych i nieaktywnych, wchodzących w skład tej samej grupy strukturalnej. Kluczowa okazała się natomiast indywidualna struktura molekularna inhibitora. Wiele spośród związków potwierdzonych jako najbardziej aktywne inhibitory wykraczało poza normy określone przez regułę pięciu Lipińskiego. Podejrzewa się, że we wcześniejszych latach wiele obiecujących struktur tego rodzaju mogło zostać niesłusznie odrzuconych w pierwszym etapie badań z uwagi na nie spełnianie tych norm, powszechnie uważanych za podstawowe. Potwierdzono również, że wysoce konserwatywna struktura miejsca aktywnego ureazy niekiedy nie oznacza, że ten sam inhibitor będzie charakteryzował aktywnością wobec wszystkich ureolitycznych mikroorganizmów. Problem ten dotyczył 20,1% badanych związków, wśród których znajdowały się głównie kwasy hydroksamowe i pochodne kwasu diaminofosfinowego.



## 2. CEL PRACY

Głównym celem niniejszej pracy było poszukiwanie nowych struktur chemicznych o potwierdzonej aktywności jako inhibitory ureaz pochodzenia mikrobiologicznego. Zainteresowania badawcze obejmowały w szczególności następujące zagadnienia i wyzwania:

1. Pozyskanie wysoce oczyszczonych preparatów ureazy z mikroorganizmów *S. pasteurii* oraz *C. neoformans*. W przypadku tego drugiego gatunku konieczne było opracowanie skutecznego protokołu obejmującego hodowlę wzrostową oraz indukcję aktywności ureolitycznej w żywych komórkach grzybowych.
2. Zbadanie kilkunastu grup związków pod kątem potencjalnej aktywności jako inhibitory ureolizy. Badania prowadzono zarówno na oczyszczonych preparatach enzymatycznych, jak również na całych komórkach mikroorganizmów, ze szczególnym uwzględnieniem gatunków patogennych wykorzystujących ureazę jako czynnik wirulencji. Wśród badanych grup znalazły się między innymi selenoorganiczne pochodne oparte na strukturze ebselenu, fosforoorganiczne pochodne katecholu oraz kwasu cynamonowego, związki zawierające fragment strukturalny tiomocznika.
3. Badanie zdolności pochodnych ebselenu do inhibicji systemu reduktazy tioredoksyny i pośredniego generowania stresu oksydacyjnego w komórkach mikroorganizmów.
4. Określenie zdolności wybranych związków potwierdzonych jako inhibitory ureazy pochodzenia mikrobiologicznego do zahamowania wzrostu biofilmu bakteryjnego. Badaniom poddano wybrane pochodne ebselenu oraz grupę związków flawonoidowych.

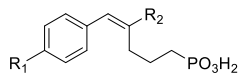
## 3. MATERIAŁY I METODY

### 3.1. ODCZYNNIKI

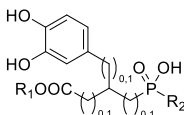
Wykorzystywane odczynniki chemiczne posiadały czystość analityczną i zostały zakupione z następujących źródeł: Carl Roth, Sigma Aldrich, Merck, Eurochem, Chempur, POCH. Podłoża mikrobiologiczne zostały zakupione z firm: Biocorp, Merck oraz Graso Biotech.

### 3.2. ZWIĄZKI BADANE JAKO INHIBITORY UREOLIZY

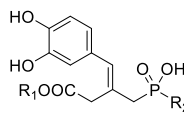
#### Związki fosforoorganiczne



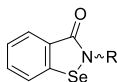
Pochodne kwasu cynamonowego [a]



Wielofunkcyjne pochodne katecholowe [a][b]

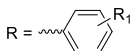


#### Związki selenoorganiczne

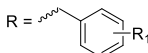


R = alkil, alkiloarył

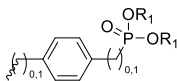
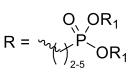
Alkile oraz alkiloarylowe pochodne benzoselenazolonu [c]



Mono i dipodstawione pochodne ebselenu [d]

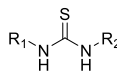


Halogenowane pochodne *N*-benzylobenzoselenazolonu [b]

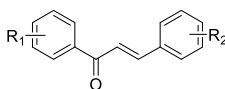


Fosfonowe pochodne benzoselenazolonu [b]

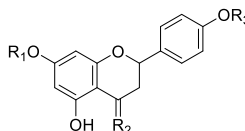
#### Pozostałe związki



Pochodne tiomocimolony [a]



Pochodne chalkonów [e]



Pochodne naryngeniny i ich oksymy [e]

#### Źródła grup związków

[a] - Dr Stamatia Vassiliou, Laboratorium Chemii Organicznej Uniwersytetu Ateńskiego

[b] - Mgr inż. Marta Maślanka, Katedra Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej

[c] - Prof. Jacek Ścianowski, Katedra Chemii Organicznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

[d] - Dr inż. Mirosław Giurg, Katedra Chemii Organicznej i Medycznej Politechniki Wrocławskiej

[e] - Dr inż. Joanna Kozłowska, Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Rys. 10. – Struktury i pochodzenie grup badanych związków

### 3.3. SZCZEPY MIKROORGANIZMÓW

- *S. pasteurii* CCM 2056, pozyskany komercyjnie z Czeskiej Kolekcji Mikroorganizmów
- *P. mirabilis* PCM 543, pozyskany komercyjnie z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów
- *C. neoformans* IHEM 3969, udostępniony przez dr hab. n. med. Urszulę Nawrot z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
- *H. pylori* Tx30a (ATCC 51932), hodowany i udostępniony przez dr. Pawła Krzyżeka z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.
- *P. aeruginosa* PCM 499, pozyskany komercyjnie z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów
- *S. aureus* PCM 2054, pozyskany komercyjnie z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów

### 3.4. APARATURA

#### Badanie czystości otrzymanych związków

Analityczną chromatografię prowadzono z użyciem UFLC Shimadzu, wykorzystując kolumnę Reprosil Saphir 100 C18, 5µm, 150 x 4,6 mm.

#### Hodowla mikroorganizmów

Podłoża mikrobiologiczne sterylizowano w autoklawie CertoClav EL 12.

Do pracy w warunkach sterylnych używano komory laminarnej Bioair Safeflow 1.2.

Obserwacje mikroskopowe prowadzono za pomocą mikroskopu optycznego z oprogramowaniem Motic BA-310.

Do inkubacji hodowli mikrobiologicznych na podłożu płynnym oraz zestalonym w odpowiednich dla nich warunkach wykorzystywano inkubator z wytrząsaniem Lab Companion IST-4075R.

Do inkubacji hodowli w płytkach 24-dołkowych lub 96-dołkowych używano inkubatora ELMI Skyline DTS-4.

Do pomiarów wartości pH używano pH-metru SI Analytics TitroLine 7000.

#### Pozyskiwanie oczyszczonego enzymu pochodzenia mikrobiologicznego

Dezintegrację komórek mikroorganizmów w pierwszym etapie uzyskiwania oczyszczonego enzymu prowadzono używając dezintegratora Sonics Vibracell VC-505.

Wieloetapową chromatografię preparatywną w celu uzyskania oczyszczonego enzymu z komórek mikroorganizmów prowadzono w systemach ÄKTAPrime Plus oraz ÄKTA Pure.

Wszystkie kolumny chromatograficzne zostały zakupione z firmy Cytiva Life Sciences: HiPrep Q FF 16/10, HiPrep Phenyl FF 16/10, Sephacryl S-300 26/60, Mono Q 5/50 GL, Superose 12 HR 10/30.

#### Badania aktywności enzymatycznej i wpływu na stres oksydacyjny

Do dejonizacji wody przeznaczonej do badań enzymatycznych wykorzystywano zestaw do oczyszczania wody Direct-Q 3 UV.

Do badań spektrometrycznych aktywności enzymatycznej ureazy i wpływu inhibitorów używano czytnika mikroplótek TECAN Sunrise.

Pomiary fluorescencyjne prowadzono z wykorzystaniem aparatury BMG Labtech Clariostar Plus.

#### Badania na biofilmie bakteryjnym

Pomiary w czasie rzeczywistym ilości i żywotności biofilmu z wykorzystaniem systemu BioFlux 1000 zostały wykonane przez dr. Pawła Krzyżeka z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Pomiary grawimetryczne ilości tworzonego biofilmu zostały wykonane z użyciem aparatury wykonanej i udostępnionej przez dr hab. inż. Tomasza Piaseckiego z Katedry Nanometrologii Wydziału Elektroniki, Fotoniki i Mikrosystemów Politechniki Wrocławskiej.

### 3.5. METODY

#### 3.5.1. Stosowane metody pomiarowe

##### 3.5.1.1. Pomiar aktywności ureolitycznej metodą indofenolową <sup>85</sup>

W tym badaniu wykorzystywana jest reakcja jonów amonowych (produktu ureolizy) z podchlorynem sodu, której produktem jest chloramina. Reaguje ona następnie z fenolem w środowisku silnie zasadowym, prowadząc do powstania niebieskiego produktu, którego stężenie jest wprost proporcjonalne do aktywności ureolitycznej w mieszaninie reakcyjnej. Reakcja jest katalizowana przez nitroprusydek sodu. Badanie stężenia jonów amonowych w mieszaninie przeprowadza się poprzez dodanie kolejno 100 µL odczynników I i II do 50 µL roztworu zawierającego jony amonowe. Alternatywnie stosowano proporcje 200 µL badanej mieszaniny i po 500 µL odczynników I i II.

Odczynnik I do próby indofenolowej		Odczynnik II do próby indofenolowej	
<b>Nitroprusydek sodu</b>	0,025 g (0,955 µM)	NaOH	2,5 g (0,625 M)
<b>Fenol</b>	5 g (0,53 M)	NaClO	2,3 mL (47,1 mM)

Po dodaniu odczynników i 30 minutach inkubacji w temperaturze 30°C wykonywano pomiar  $A_{650}$  i określano stężenie jonów amonowych w mieszaninie reakcyjnej posługując się krzywą standardową dla reakcji indofenolowej.

##### 3.5.1.2. Pomiar aktywności ureolitycznej poprzez monitorowanie zmian pH z użyciem czerwieni krezolowej

Indykator zmian pH w reakcji ureolizy			
Do badań na enzymie		Do badań na całych komórkach	
Składnik	Masa/L [g]	Składnik	Masa/L [g]
6 mM bufor fosforanowy (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	-	20 mM PBS	-
Czerwień krezolowa	0,2	Czerwień krezolowa	0,2

Mieszanina reakcyjna zawierała indykator zmian pH, mocznik, źródło enzymu oraz opcjonalnie – badane inhibitory. Po rozpoczęciu reakcji przez dodatek biokatalizatora lub substratu reakcji w dwuminutowych odstępach wykonywano pomiary  $A_{570}$  w czytniku mikropłytek TECAN Sunrise. Stężenie powstających jonów amonowych określano poprzez korelację rezultatów z wynikami próby indofenolowej prowadzonej w identycznych warunkach.

### 3.5.1.3. Warunki prowadzenia badań aktywności ureolitycznej

Badania aktywności ureolitycznej wykorzystujące próbę indofenolową prowadzono w 3 mM buforze fosforanowym (w przypadku oczyszczonego enzymu) lub 10 mM buforowanym roztworze soli fizjologicznej PBS (w przypadku badania aktywności całych komórek mikroorganizmów). W przypadku badania z użyciem czerwieni krezolowej środowisko reakcji uzyskiwano poprzez dwukrotne rozcieńczenie odpowiedniego roztworu indykatora. Mocznik (substrat dla reakcji ureolizy) stosowano w stężeniu wynoszącym 2-krotność wartości stałej Michaelisa-Menten ( $K_M$ ) dla danego biokatalizatora. Wśród składników znajdował się również wybrany preparat enzymatyczny lub zawiesina komórek ureolitycznych oraz badane potencjalne inhibitory ureaz. Przy każdym badaniu dobierano stężenie źródła ureolizy umożliwiające osiągnięcie zmiany absorbancji w zakresie 0,5 – 1,5 podczas 1,5-godzinnej reakcji. Reakcję rozpoczynano poprzez dodatek źródła biokatalizatora (enzym lub zawiesina komórkowa) lub mocznika, w przypadku badania związków określonych jako inhibitory wolnowiązące, gdy konieczna była wcześniejsza preinkubacja enzymu z inhibitorem. Podczas badania aktywności inhibitorów przygotowywano również kontrolę aktywności enzymu niehamowanego oraz badającą wpływ rozpuszczalnika użytego do rozpuszczenia związków będących potencjalnymi inhibitorami ureazy.

### 3.5.1.4. Pomiar stężenia białka metodą Bradforda

Do 1 mL świeżo przefiltrowanego odczynnika Bradforda dodawano 2-20  $\mu$ L badanego preparatu. Po 10 minutach zmierzono  $A_{595}$  i odczytywano masę białka w dodanej objętości próbki posługując się

krzywą standardową wykonaną dla komercyjnie dostępnych roztworów albuminy bydlęcej o znanym stężeniu.

#### 3.5.1.5. Określenie żywotności komórek mikroorganizmów metodą MTT <sup>86</sup>

Kolorymetryczne sprawdzenie żywotności komórek osiągnano poprzez obserwację redukcji żółtej soli tetrazolowej – bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-2*H*-tetrazoliowego – do fioletowych kryształów formazanu. Reakcja katalizowana jest przez zależne od NAD(P)H enzymy z klasy oksydoreduktaz, aktywne wyłącznie w pozostałych przy życiu komórkach. Badaną zawiesinę komórkową dodawano do roztworu substratu MTT (w stężeniu końcowym 0,5 mg/mL) w 10 mM PBS, tak że końcowa objętość wynosiła 100  $\mu$ L. Po 30 minutach inkubacji z wytrząsaniem w temperaturze 30°C obserwowano wytrącanie się fioletowych kryształów produktu.

---

#### **Zakwaszony izopropanol do rozpuszczenia kryształów w metodzie z wykorzystaniem soli tetrazolowej (test MTT)**

---

<b>Składnik</b>	<b>Objętość [mL]</b>
<b>Etanol</b>	50
<b>HCl</b>	0,75

---

W celu ich rozpuszczenia do każdego dołka mikropłytki dodawano po 100  $\mu$ L zakwaszonego izopropanolu. Po rozpuszczeniu kryształów wykonywano pomiar  $A_{550}$ .

#### 3.5.1.6. Określanie właściwości przeciwtleniających badanych związków <sup>87</sup>

Zdolność do przechwytywania wolnych rodników badano z wykorzystaniem 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH). Fioletowy roztwór DPPH w etanolu traci swe intensywne zabarwienie w kontakcie z czynnikami redukującymi reaktywne formy tlenu – przeciwtleniaczami. Jeden z atomów azotu w strukturze DPPH posiadający niesparowany elektron może służyć jako akceptor atomu wodoru, którego donor stanowi badany związek o właściwościach przeciwtleniających. W rezultacie obserwuje się zmianę zabarwienia

roztworu z fioletowej na żółtą. Mieszaninę reakcyjną przygotowano w etanolu – 0,1 mM DPPH oraz badane związki w zakresie stężeń 20-1000 µg/mL. Przed dodaniem DPPH oraz w określonych odstępach czasu po rozpoczęciu reakcji wykonywano pomiar  $A_{518}$ . Przygotowano również kontrolę bez dodatku inhibitorów. Pomiar spadku absorbancji mieszaniny reakcyjnej przy długości fali 518 nm umożliwił określenie zdolności badanych związków do wychwytywania reaktywnych form tlenu. Jako substancję wzorcową wykorzystaną do porównania własności przeciwutleniających związków selenoorganicznych wykorzystano kwas cynamonowy. W literaturze źródłowej można znaleźć opisy zafałszowania obserwowanych wyników, które wynika z zastosowania nieodpowiednich rozpuszczalników w teście DPPH. Aby tego uniknąć, przeprowadzono również kontrolę wpływu *N,N*-dimetyloformamidu (DMF) w stężeniu odpowiadającym jego zawartości w roztworach badanych inhibitorów ureolizy. Następnie wyliczono stężenie związku, dla którego zaobserwowano 50% zahamowanie przyrostu absorbancji. Była to wartość  $RSC_{50}$  (*RSC* – *radical scavenging capacity*)

### 3.5.2. Hodowla komórek bakterii ureolitycznych

#### 3.5.2.1. Pozyskiwanie biomasy *S. pasteurii* do procedury oczyszczania enzymu

Zaszczepiano porcję 100 mL podłoża hodowlanego dla bakterii ureolitycznych mikroorganizmami *S. pasteurii* z hodowli na podłożu zestalonym.

Podłoże hodowlane dla bakterii ureolitycznych	
Składnik	Masa/L [g]
Ekstrakt drożdżowy	20
NiCl <sub>2</sub>	0,1296 [1 mM] – <i>S. pasteurii</i> 0,0389 [0,3 mM] – <i>P. mirabilis</i>

Po 2 dniach wzrostu w odpowiednich warunkach hodowlanych (wyrząsanie 120 rpm, 30°C) powstałą prehodowlę wykorzystywano do zaszczepienia dużej butli zawierającej 5 L podłoża hodowlanego o tym samym składzie lub 20 kolbek stożkowych po 100 mL świeżego podłoża o tym samym składzie. Hodowlę w kolbkach poddawano wyrząsaniu



w inkubatorze, natomiast hodowla w 5 L butli była sterylnie napowietrzana. Po 2 dobach wzrostu w podanych wcześniej warunkach dodawano sterylnie mocznik (końcowe stężenie w podłożu 1% w/v). Po 1 dobie inkubacji w podłożu z mocznikiem mikroorganizmy zwirowywano (6000 rpm, 1 h) i zamrażano w temperaturze -20°C.

### 3.5.2.2. Hodowla całych komórek ureolitycznych *P. mirabilis*

Mikroorganizmami *P. mirabilis* zaszczepiano 100 mL podłoża hodowlanego dla bakterii ureolitycznych. Po 2 dniach hodowli (wytrząsanie 120 rpm, 30°C) dodawano sterylnie mocznik do końcowego stężenia 1% w/v. Po kolejnej dobie hodowli mikroorganizmy ureolityczne były gotowe do odwirowania i zawieszenia w porcji 10 mM PBS. Tak przygotowana zawiesina była następnie wykorzystywana do badań w przeciągu maksymalnie 2-3 następných dni. Każdego dnia przed rozpoczęciem badań sprawdzano żywotność (test MTT) oraz aktywność ureolityczną bakterii.

### 3.5.3. Pozyskiwanie aktywnych ureolitycznie komórek szczepu *C. neoformans* IHEM 3969

#### 3.5.3.1. Dobór warunków indukcji ureolizy w komórkach *C. neoformans* IHEM 3969

100 mL płynnego podłoża Sabouraud, przygotowanego zgodnie z instrukcjami producenta, zaszczepiono komórkami *C. neoformans*. Po 1 dniu inkubacji (wytrząsanie 100 rpm, 30°C) odwirowano porcję 10 mL hodowli (5000 rpm, 15 min), zawieszono w tej samej objętości płynu fizjologicznego i dodawano po 100 µL do probówek eppendorfa zawierających po 900 µL następujących podłoży z, lub bez dodatku 2% mocznika: podłoże Sabouraud, 10 mM PBS, płyn fizjologiczny, podłoże indukujące ureolizę (z lub bez dodatku 1g/L peptonu, 0,1% glukozy lub obydwu tych dodatków).

<b>Podłoże indukujące ureolizę w komórkach <i>C. neoformans</i></b>	
<b>Składnik</b>	<b>Masa/L [g]</b>
<b>Ekstrakt drożdżowy</b>	0,2
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	2,72 (20 mM)
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	2,84 (20 mM)

Probówki inkubowano w temperaturze 30°C i pobierano próbki po 15, 30, 45, 60, 90 minutach oraz 24 godzinach od rozpoczęcia inkubacji w nowych podłożach i wykonano pomiar stężenia jonów amonowych metodą indofenolową. Po zakończeniu inkubacji pobrano kroplę z każdej testowanej zawiesiny i wykonano rozmaz na czystym szkiełku podstawowym. Zabarwiono preparat przyżyciowo roztworem błękitu metylenowego (rozcieńczenie 1:10000), przykryto szkiełkiem nakrywkowym i prowadzono obserwację mikroskopową, by określić wpływ doboru podłoża hodowlanego na żywotność komórek drożdżowych. Błękit metylenowy penetruje osłony komórkowe wyłącznie martwych komórek drożdżowych. Dzięki temu podczas obserwacji komórki martwe będą zabarwione na niebiesko i łatwe do identyfikacji na tle bezbarwnych komórek żywych.

### 3.5.3.2. Wpływ stężenia mocznika i glukozy na indukcję ureolizy w modyfikowanym podłożu Christensena

Dwudniową hodowlę płynną *C. neoformans* odwirowano i zawieszono w takiej samej objętości płynu fizjologicznego. Powstałą zawiesiną zaszczepiono (poprzez dziesięciokrotne rozcieńczenie wyjściowej zawiesiny komórek w podłożu) sterylnie probówki z podłożem indukującym ureolizę, z lub bez dodatku 0,1% glukozy oraz zawierającym mocznik w przedziale stężeń 0 – 2%. Po jednym dniu inkubacji probówek w temperaturze 30°C zmierzono stężenie jonów amonowych metodą indofenolową. Następnie zawartość probówek odwirowano (5000 rpm, 5 min) i zawieszono osad komórkowy w 10 mM roztworze PBS. Zbadano aktywność ureolityczną otrzymanych zawiesin metodą indofenolową, pobierając próbki po 15 i 45 minutach od rozpoczęcia reakcji poprzez dodatek zawiesiny komórek do mieszaniny reakcyjnej.

### 3.5.3.3. Określenie wpływu mocznika na szybkość wzrostu komórek *C. neoformans* IHEM 3969

W sterylnych 15 mL probówkach typu falkon przygotowywano hodowle *C. neoformans* IHEM 3969 w bulionie Sabouraud z dodatkiem różnych stężeń mocznika w przedziale 0-4% w/v. Po 1, 2 oraz 5 dniach inkubacji w warunkach wzrostowych (wytrząsanie 120 rpm, 30°C) pobierano próbki hodowli i wykonywano pomiar gęstości optycznej hodowli OD<sub>550</sub>.

### 3.5.3.4. Określenie wpływu stężenia jonów niklu na wzrost komórek *C. neoformans* IHEM 3969

W celu określenia stężenia jonów niklu optymalnego do prób indukcji ureolizy w komórkach grzybowych przygotowywano hodowle wzrostowe *C. neoformans* IHEM 3969 w bulionie Sabouraud w sterylnych 15 mL falkonach. Dodano chlorek niklu w odpowiednich stężeniach (stężenie jonów niklu w przedziale 0-1,5 mM). Prowadzono hodowlę przez 3 dni, codziennie pobierając próbki i wykonując pomiary gęstości optycznej OD<sub>550</sub>.

### 3.5.3.5. Otrzymywanie ureolitycznych komórek *C. neoformans* IHEM 3969

Zaszczepiano 100 mL podłoża Sabouraud porcją mikroorganizmów *C. neoformans*. Po 3-4-dniowej hodowli (30°C, 100 rpm) uzyskaną prehodowlę wykorzystywano do zaszczepienia 2 L tego samego podłoża w kolbkach 250 mL by osiągnąć odpowiednią ilość biomasy. Po kolejnych 2 dniach hodowle odwirowywano (5000 rpm, 45 min) i zawieszano w takiej samej objętości podłoża indukującego ureolizę, zawierającego 1% mocznik oraz 0,1 mM NiCl<sub>2</sub>. Zawiesiny inkubowano w temperaturze pokojowej bez wytrząsania przez 2 dni, po czym sprawdzano ich aktywność ureolityczną, pobierając próbki i wykonując test kolorymetryczny określający stężenie jonów amonowych. Po potwierdzeniu aktywności komórki odwirowywano (5000 rpm, 45 min) i przechowywano w temperaturze -20°C.

### 3.5.4. Otrzymywanie oczyszczonej ureazy pochodzenia mikrobiologicznego

#### 3.5.4.1. Dezintegracja komórek ureolitycznych i wstępne oczyszczenie preparatu białkowego

Biomasę komórek bakteryjnych lub grzybowych rozmrażano na lodzie i zawieszano w buforze A suplementowanym 1 mM  $\beta$ -merkaptotetanolem (w proporcji 1 mL buforu na 1 g mokrej masy ważonej świeżo po zwirowaniu).

<b>Bufor A, pH 7,4</b>	
<b>Składnik</b>	<b>Masa/L [g]</b>
<b>50 mM bufor fosforanowy (<math>\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4</math>)</b>	-
<b><math>\text{Na}_2\text{SO}_3</math></b>	6,302 (50 mM)
<b>EDTA</b>	0,372 (1 mM)

Powstałą zawiesinę komórek poddawano dezintegracji ultradźwiękowej do momentu, gdy badanie stężenia białka metodą Bradforda w kolejnych pobranych próbkach nie dawało znaczących zmian między kolejnymi cyklami. Przeprowadzano 30-sekundowe cykle dezintegracji, między którymi próbki przechowywano w łaźni lodowej przez co najmniej 2 minuty. Powstały ekstrakt komórkowy poddawano dwukrotnemu wirowaniu ( $4^\circ\text{C}$ , 10000 rpm, 2 x 30 min), supernatant przefiltrowywano z użyciem filtrów strzykawkowych PES,  $0,45 \mu\text{m}$  i poddano dializie wobec buforu A w trzech etapach (2 x 3 h + 1 x 12 h). Między kolejnymi etapami wymieniano bufor, dializa odbywała się w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  z użyciem worków dializacyjnych Spectra/Por 1, MWCO: 6-8 kDa wcześniej zanurzonych na 30 minut w buforze A.

#### 3.5.4.2. Wieloetapowa procedura chromatograficznego oczyszczania ureazy pochodzenia mikrobiologicznego

Po zakończeniu dializy preparat enzymatyczny ponownie przefiltrowywano przez filtr PES,  $0,45 \mu\text{m}$  i наносzono na kolumnę chromatograficzną HiPrep Q FF 16/10 zrównoważoną buforem A. Następnie prowadzono chromatografię jonowymienną poprzez naniesienie na kolumnę liniowego gradientu 0-1 M NaCl w buforze A

(szybkość przepływu max. 5 mL/min, w przypadku wszystkich zastosowanych kolumn szybkość była na bieżąco dostosowywana do obserwowanych zmian ciśnienia systemu aby uniknąć uszkodzenia mechanicznego). Łączna długość gradientu liniowego wynosiła 15 CV (objętości kolumny) buforu. Wszystkie pobierane frakcje badano jakościowo pod kątem aktywności ureolitycznej z wykorzystaniem odczynnika z czerwienią krezolową i dodatkiem mocznika. Frakcje z ureazą łączono i w razie konieczności zagęszczano do objętości około 10 mL z wykorzystaniem koncentratorów wirówkowych Amicon Ultra Milipore, 10 kDa.

Następnie doprowadzano siłę jonową w preparacie enzymatycznym do 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i ponownie przefiltrowano przez filtr strzykawkowy PES, 0,45  $\mu\text{m}$ . Nanoszono roztwór na kolumnę HiPrep Phenyl FF 16/10 zrównoważoną buforem A suplementowanym 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i rozpoczynano etap chromatografii oddziaływań hydrofobowych poprzez gradient liniowy 1-0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  w buforze A (szybkość przepływu max. 5 mL/min). Długość gradientu liniowego wyniosła 15 CV. Wyselekcjonowane frakcje z aktywną ureazą łączono i zagęszczano do objętości około 0,5 mL.

Preparat nanoszono następnie na kolumnę z sitami molekularnymi Sephacryl S-300 26/60 uprzednio zrównoważoną buforem A suplementowanym 0,15 M NaCl. Oczyszczanie frakcji na tej kolumnie trwało do momentu zidentyfikowania metodą z użyciem czerwieni krezolowej frakcji zawierających ureazę (jednak nie mniej niż 160 mL – pół objętości kolumny, szybkość przepływu max. 1,3 mL/min). Do wstępnych badań aktywności enzymatycznej tak oczyszczony preparat wykazywał się wystarczającą czystością. W takim przypadku bufor A wymieniano na 50 mM bufor fosforanowy poprzez dializę lub zagęszczanie z użyciem koncentratorów wirówkowych i zawieszanie w nowym buforze. Jeśli konieczne było dodatkowe oczyszczenie w warunkach wysokiego ciśnienia, z preparatu enzymatycznego usuwano tylko dodatek NaCl poprzez dializę lub zagęszczenie i zawieszenie w czystym buforze A. Następnie frakcje zagęszczano do objętości około 1 mL.

Tak otrzymany preparat nanoszono następnie na kolumnę Mono Q 5/50 GL zrównoważoną buforem A, by przeprowadzić

chromatografię jonowymienną w warunkach podwyższonego ciśnienia. Po nałożeniu próbki rozpoczęto oczyszczanie metodą gradientu liniowego 0-1 M NaCl w buforze A, trwającego co najmniej 20 CV (szybkość przepływu max. 1,5 mL/min). Próbkę zidentyfikowaną jako aktywną ureolitycznie połączono i zagęszczono do objętości 0,5 mL.

Ostatni etap oczyszczania stanowiło nałożenie roztworu na sita molekularne Superose 12 HR 10/30 zrównoważone buforem A suplementowanym 0,15 NaCl. Oczyszczanie prowadzono do momentu pobrania frakcji aktywnych ureolitycznie (szybkość przepływu max 0,5 mL/min).

### 3.5.5. Analiza właściwości oczyszczonej ureazy

#### 3.5.5.1. Określenie parametrów kinetycznych oczyszczonego enzymu

Aby wyliczyć wartości  $K_M$  oraz  $v_{max}$  otrzymanego po oczyszczeniu chromatograficznym preparatu wykorzystano badanie stężenia jonów amonowych metodą kolorymetryczną. W osobnych probówkach eppendorf przygotowano roztwory enzymu w 3 mM buforze fosforanowym i rozpoczynano reakcję ureolizy dodatkiem różnych stężeń mocznika (w zakresie 1-200 mM, przynajmniej 10 różnych stężeń), tak że końcowa objętość mieszaniny w próbkach była równa i wynosiła 200  $\mu$ L. Po 30 minutach inkubacji odczytano  $A_{650}$  w próbie indofenolowej i wykonano wykres zależności szybkości reakcji (wyliczona za pomocą stężenia produktu odczytanego z krzywej standardowej na podstawie zmierzonej absorbancji) od stężenia mocznika w mieszaninie. Punkt przecięcia asymptoty tak powstałej hiperboli z osią y stanowił wartość  $v_{max}$  danego enzymu. Stężenie substratu, dla którego uzyskano szybkość reakcji dwukrotnie niższą od  $v_{max}$  stanowiło wartość  $K_M$  badanego enzymu, na podstawie której ustalano stężenie substratu stosowane do kolejnych badań z wykorzystaniem danego preparatu.

#### 3.5.5.2. Dobór optymalnej temperatury

W 12 probówkach eppendorf przygotowano po 200  $\mu$ L mieszaniny reakcyjnej: 3 mM bufor fosforanowy, badany enzym w odpowiednim stężeniu (umożliwiającym osiągnięcie wartości absorbancji w próbie indofenolowej  $\approx 1,8$  po 1,5 h prowadzonej

niehamowanej reakcji ureolitycznej). Każdą z probówek umieszczono w łaźni wodnej nastawionej na konkretną temperaturę (przedział 25-75°C, w pięciostopniowych odstępach) i inkubowano przez 10 minut, aby mieszanina reakcyjna została doprowadzona do odpowiedniej temperatury. Następnie rozpoczęto reakcję poprzez dodatek mocznika, tak by jego końcowe stężenie w mieszaninach wyniosło dwukrotność wartości  $K_M$  dla badanego enzymu. Po 45 minutach prowadzonej reakcji wykonano pomiar  $A_{650}$  w próbie indofenolowej, odczytano stężenie produktu z krzywej standardowej i wyselekcjonowano temperaturę, w której ureaza osiągnęła maksymalną aktywność.

### 3.5.6. Badania aktywności potencjalnych inhibitorów ureazy względem oczyszczonego enzymu

#### 3.5.6.1. Screening aktywności badanych związków

W celu wstępnego określenia aktywności badanych związków przy minimalnym ich zużyciu wykonano serię eksperymentów z wykorzystaniem indykatora pH – czerwieni krezolowej. Mieszanina reakcyjna zawierała dwukrotnie rozcieńczony indykator zmian pH na bazie czerwieni krezolowej, stężenie mocznika odpowiadające dwukrotności  $K_M$  wyznaczonej dla danego enzymu oraz wybrane stężenie inhibitora. Reakcję rozpoczynano dodatkiem odpowiedniego stężenia enzymu i w 2-minutowych odstępach mierzono  $A_{570}$ . W kolejnych eksperymentach inhibitor dodawano w stężeniach: 100 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M. Coraz wyższe stężenia były stosowane aż do momentu zaobserwowania efektu inhibicji. W przypadku braku inhibicji powtórzono próby stosując 1,5-godzinną preinkubację enzymu z inhibitorem w temperaturze pokojowej, po czym reakcję rozpoczynano dodatkiem substratu. W każdym eksperymencie przygotowywano kontrolę aktywności niehamowanego enzymu oraz wpływu rozpuszczalnika wykorzystanego do przygotowania roztworu inhibitora. W przypadku preinkubacji te kontrole również były przechowywane przez określony czas przed rozpoczęciem reakcji.

#### 3.5.6.2. Wyznaczanie wartości $IC_{50}$ dla badanych związków

Posługując się danymi uzyskanymi z wstępnego screeningu aktywności inhibitorów dobrano 7 stężeń z zakresu aktywności hamującej danych związków. Badania prowadzono w 10 mM PBS lub w

syntetycznym moczu. Przygotowano mieszaninę reakcyjną złożoną z dwukrotnie rozcieńczonego indykatora zmian pH z czerwienią krezolową, odpowiedniego stężenia enzymu i substratu oraz badanych związków. Reakcję rozpoczynano dodatkiem enzymu w przypadku związków wstępnie określonych jako niewymagające preinkubacji lub dodatkiem mocznika w przypadku zaistnienia takiej konieczności. Ewentualna preinkubacja enzymu z inhibitorem odbywała się w temperaturze pokojowej i trwała 30-120 minut, zależnie od rodzaju badanych związków. Pomiar  $A_{570}$  prowadzono w 2-minutowych odstępach po rozpoczęciu reakcji. W celu wyznaczenia wartości  $IC_{50}$  wyznaczano wykres zależności zachowanej procentowej aktywności enzymu w reakcji hamowanej (w porównaniu z aktywnością niehamowanej kontroli) od logarytmu dziesiętnego stężenia inhibitora. Wartość  $IC_{50}$  stanowiło stężenie inhibitora, dla którego zaobserwowano zachowanie 50% wyjściowej aktywności ureazy. W przypadku każdej grupy badanych związków wykonywano kontrolnie przynajmniej jeden pomiar aktywności inhibitorów metodą kolorymetryczną określającą stężenie jonów amonowych w próbie indofenolowej. Eksperymenty wykonywano w trzykrotnych powtórzeniach.

### 3.5.6.3. Określenie odwracalności inhibicji metodą *jump dilution*

Aby określić, czy badane związki charakteryzują się odwracalną inhibicją ureazy wykorzystano metodą szybkiego rozcieńczenia, tzw. *jump dilution*. W tym celu przygotowano mieszaninę zawierającą badany enzym w stężeniu 100-krotnie wyższym od wcześniej określonego jako wystarczające do śledzenia postępów reakcji ureolizy. Dodano badany związek tak, aby jego stężenie w powstałej mieszaninie wyniosło 20-krotność określonej wcześniej wartości  $IC_{50}$  względem danego enzymu. Po 60 minutach preinkubacji, powstałą mieszaninę rozcieńczono 100-krotnie w mieszaninie reakcyjnej (bufor do próby indofenolowej lub odczynnik z czerwienią krezolową, zależnie od stosowanej metody pomiarowej) zawierającej ustalone wcześniej stężenie mocznika. W równych odstępach czasu prowadzono obserwację postępów reakcji ureolizy. Obserwacja odzyskania aktywności enzymatycznej po szybkim rozcieńczeniu mieszaniny prowadziła do wniosku, iż badany inhibitor jest odwracalny. W otrzymanej krzywej wyznaczono stabilność kompleksu enzymu



z odwracalnym inhibitorem poprzez obliczenie  $\tau$  – średniego czasu wiązania kompleksu. Wartość tę uzyskano poprzez dopasowanie krzywej postępu reakcji do następującego równania:

$$P = v_s t + (v_0 - v_s) \frac{(1 - e^{k_{off} t})}{k_{off}}$$

$$\tau = \frac{1}{k_{off}}$$

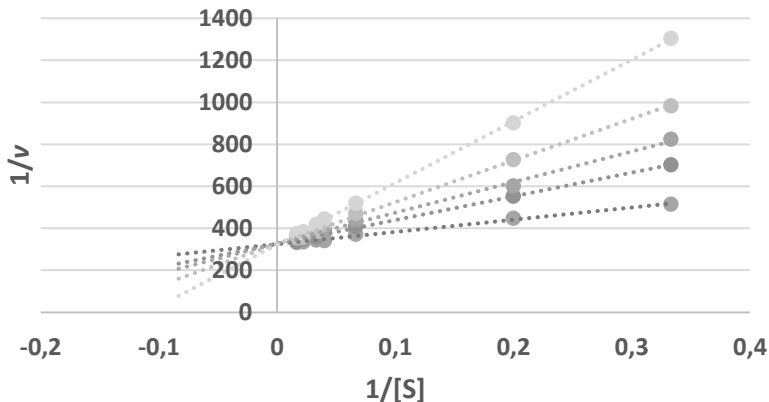
#### 3.5.6.4. Wyznaczenie wartości $K_i$ dla inhibitorów szybkowiązących <sup>88</sup>

Jeżeli podczas wyznaczania wartości  $IC_{50}$  krzywe postępu reakcji hamowanej miały przebieg liniowy w systemie bez preinkubacji, inhibitor uznawano za szybkowiązący. W takim przypadku wybierano przynajmniej 5 różnych stężeń inhibitora dających zahamowanie aktywności enzymu w przedziale 30 – 75% oraz 7 różnych stężeń mocznika z przedziału  $0,1K_M$  -  $5K_M$ . Posługując się tymi wartościami wykonano pomiar zależności aktywności inhibitora w danych stężeniach od stężenia mocznika. Badanie wykonano w dwukrotnie rozcieńczonym odczynniku z czerwienią krezolową, reakcję rozpoczynano dodatkiem enzymu (system bez preinkubacji), pomiary wykonywano w 2-minutowych odstępach. Posługując się otrzymanymi danymi wykonano wykresy zależności odwrotności szybkości reakcji enzymatycznej od odwrotności stężenia substratu dla wszystkich zastosowanych stężeń inhibitora – krzywe Lineweavera-Burka. Z ich przebiegu odczytano typ obserwowanej inhibicji. Jeśli proste wyznaczone dla wszystkich stężeń inhibitora miały wspólny punkt przecięcia osi y, analizowany związek charakteryzował się inhibicją kompetycyjną (Rys. 11.). Jeśli obserwowano wspólny punkt przecięcia krzywych z osią x, związek był inhibitorem niekompetycyjnym (Rys. 12.).

- Inhibicja kompetycyjna, inhibitor szybkowiązący

Do określenia wartości  $K_i$  szybkowiążącego inhibitora kompetycyjnego wykorzystano wykresy Dixona (zależność odwrotności szybkości reakcji od stężenia inhibitora) dla wszystkich zastosowanych

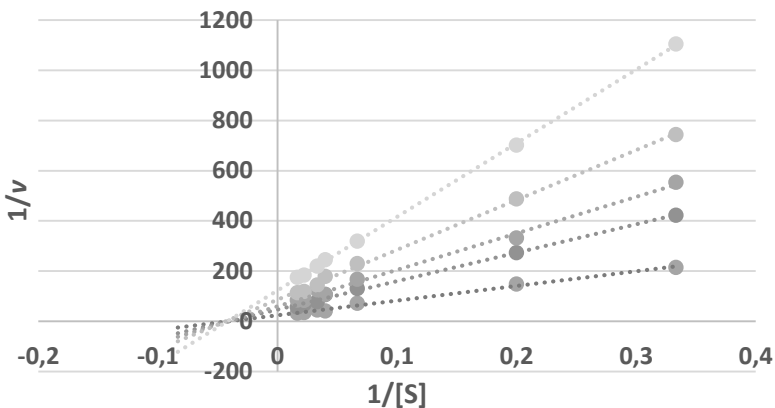
w eksperymencie stężeń substratu. Następnie odnaleziono punkt przecięcia otrzymanych prostych i odczytano jego wartość na osi x układu współrzędnych. Podana wartość była równa  $-K_i$  danego inhibitora.



Rys. 11. – Przykładowe krzywe Lineweavera-Burka dla inhibicji kompetycyjnej szybkowiążącej (każda krzywa wyznaczona dla innego stężenia inhibitora)

- Inhibicja niekompetycyjna, inhibitor szybkowiązący

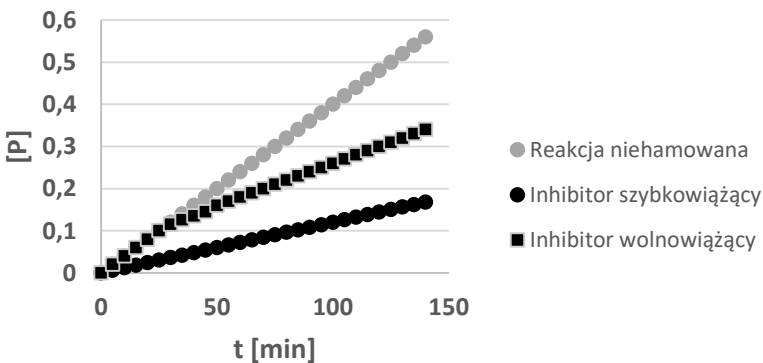
Inhibicję niekompetycyjną charakteryzują dwie wartości:  $K_i$  (stała dysocjacji kompleksu enzymu z inhibitorem) oraz  $\alpha K_i$  (stała dysocjacji kompleksu enzymu z substratem oraz inhibitorem). Aby wyznaczyć  $\alpha K_i$  wykorzystano wykres Dixona – zależność odwrotności szybkości reakcji od stężenia inhibitora - wykonany dla eksperymentu, w którym wykorzystano wysycające stężenie substratu. Punkt przecięcia otrzymanej prostej z osią x był równy wartości  $-\alpha K_i$ . Następnie wykonano wykres zależności nachylenia krzywych Lineweavera-Burka od stężenia inhibitora. Punkt przecięcia takiej prostej z osią x wynosił  $-K_i$ .



Rys. 12. – Przykładowe krzywe Lineweavera-Burka dla inhibicji niekompetycyjnej szybkowiążącej (każda krzywa wyznaczona dla innego stężenia inhibitora)

### 3.5.6.5. Wyznaczenie wartości $K_i$ dla inhibitorów wolnowiążących <sup>89</sup>

Jeśli do wyznaczenia wartości  $IC_{50}$  niezbędny był eksperyment z preinkubacją enzymu z inhibitorem lub jeżeli postępu reakcji hamowanej miały przebieg hiperboliczny (Rys. 13.), a aktywność enzymu malała w miarę postępu reakcji inhibitor określano jako wolnowiążący.



Rys. 13. – Przykładowy przebieg krzywych postępu reakcji enzymatycznej w systemie bez preinkubacji enzymu z inhibitorem

Hiperboliczne krzywe postępu uzyskane w przypadku eksperymentu bez preinkubacji enzymu z inhibitorem dopasowywano do następującego równania z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 5:

$$P = v_s t + \frac{v_0 - v_s}{k_{app}} * (1 - e^{-k_{app}t})$$

P – stężenie produktu

t – czas reakcji

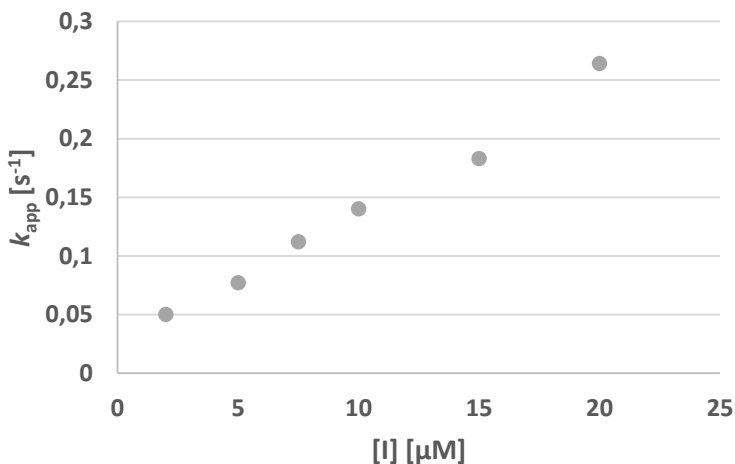
$v_0$  – szybkość reakcji w fazie początkowej

$v_s$  – szybkość reakcji w fazie stacjonarnej

$k_{app}$  – obserwowana stała szybkości reakcji

Następnie na podstawie wykresów zależności otrzymanych wartości  $k_{app}$  od stężenia inhibitora określono mechanizm inhibicji wolnowiążącej.

- Mechanizm A



Rys. 14. – Przykładowa zależność obserwowanej stałej szybkości reakcji od stężenia inhibitora wolnowiążącego działającego zgodnie z mechanizmem A

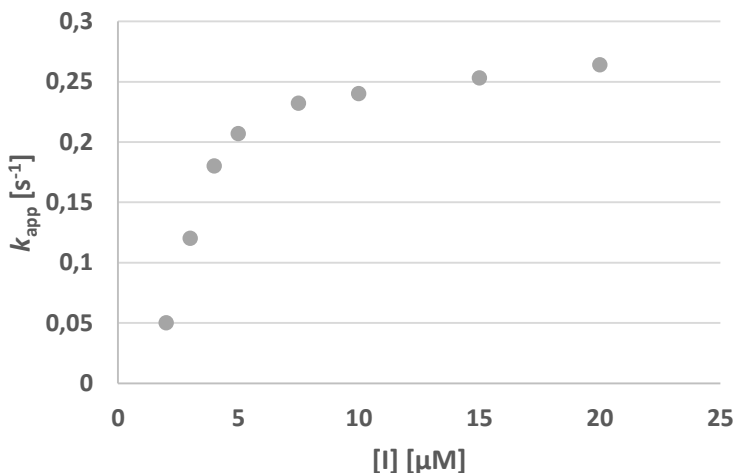
Jeżeli zależność  $k_{app} = f([I])$  była liniowo rosnąca (Rys. 14.), szybkość początkowa była niezależna od stężenia inhibitora, a szybkość w fazie stacjonarnej malała hiperbolicznie wraz ze stężeniem inhibitora, inhibicję określono jako zgodną z mechanizmem A. Tworzenie kompleksu enzymu z inhibitorem jest w tym przypadku jednym, powolnym krokiem określanym przez stałe szybkości  $k_3$  i  $k_{-3}$ . Te stałe wyliczano z równania prostej  $k_{app} = f([I])$ :

$$k_{app} = k_{-3} + \frac{k_3}{1 + \frac{[S]}{K_M}} * [I]$$

Otrzymane wartości stałych posłużyły do określenia wartości  $K_i$  dla danego inhibitora:

$$K_i = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

- Mechanizm B



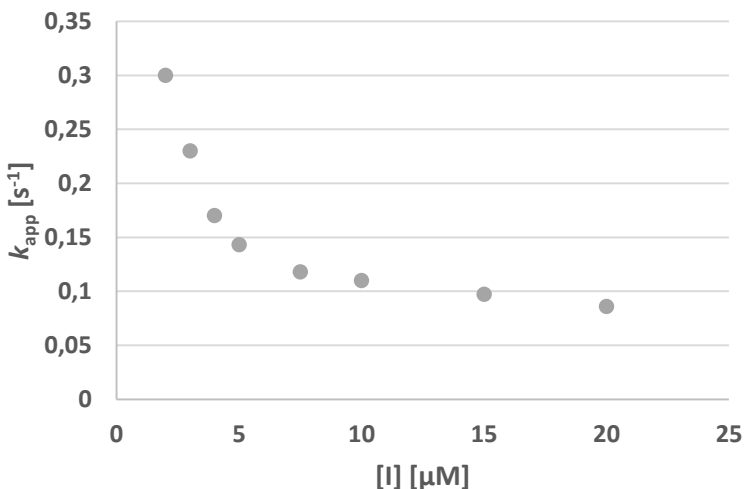
Rys. 15. – Przykładowa zależność obserwowanej stałej szybkości reakcji od stężenia inhibitora wolnowiążącego działającego zgodnie z mechanizmem B

Ten mechanizm charakteryzował się hiperboliczną, rosnącą zależnością  $k_{app} = f([I])$  (Rys. 15.) oraz hiperbolicznymi zależnościami szybkości początkowej oraz szybkości w stanie ustalonym od stężenia inhibitora. W tym przypadku kompleks enzymu z inhibitorem powstaje relatywnie szybko, po czym następują powolne zmiany konformacyjne, w wyniku których powstaje zizomeryzowany kompleks o znacznie silniejszym wiązaniu. Wartości  $K_i$  (charakteryzującej tworzenie kompleksu z inhibitorem) oraz  $K_i^*$  (określającej dalsze zmiany konformacji) otrzymano z następujących transformacji hiperbolicznych zależności szybkości reakcji od stężenia inhibitora do postaci liniowej:

$$\frac{v_{max}}{v_0} - 1 = \frac{K_M}{[S] * K_i} * [I] + \frac{K_M}{[S]}$$

$$\frac{v_{max}}{v_s} - 1 = \frac{K_M}{[S] * K_i^*} * [I] + \frac{K_M}{[S]}$$

## - Mechanizm C



Rys. 16. – Przykładowa zależność obserwowanej stałej szybkości reakcji od stężenia inhibitora wolnowiążącego działającego zgodnie z mechanizmem C

Inhibicja przebiega zgodnie z tym mechanizmem, jeśli zależność  $k_{app} = f([I])$  jest hiperbolicznie malejąca (Rys. 16.), zaś szybkość początkowa reakcji jest niezależna od stężenia inhibitora. Obserwuje się wtedy powolne zmiany konformacyjne enzymu (określane przez wartość  $K_i^*$ ), który dopiero w zizomeryzowanej formie tworzy kompleks z inhibitorem (charakteryzowane wartością  $K_i$ ). Niezbędne wartości wyznacza się, korzystając z następującej transformacji hiperbolicznej zależności szybkości w stanie ustalonym od stężenia inhibitora.

$$\frac{v_{max}}{v_s} - 1 = \frac{K_M * K_i^*}{[S] * K_i} [I] + \frac{K_M}{[S]} * (1 + K_i^*)$$

### 3.5.6.6. Określenie udziału wiązania grupy tiolowej w mechanizmie inhibicji

W celu wstępnego określenia, czy wiązanie grupy tiolowej reszty cysteiny w miejscu aktywnym enzymu stanowi istotną część mechanizmu inhibicji, przeprowadzono próbę z wykorzystaniem

ditiotreitolu (DTT). Cząsteczki ditiotreitolu wiążą się z grupami tiolowymi reszty cysteiny, blokując dostęp cząsteczce inhibitora i jednocześnie nie hamując aktywności ureazy pochodzenia mikrobiologicznego. Na płytce 96-dołkowej przeprowadzono badanie wpływu protekcji i reaktywacji DTT w mieszaninie reakcyjnej złożonej z dwukrotnie rozcieńczonego odczynnika z czerwieni krezolową. Do prób dodawano mocznik w stężeniu  $2 K_M$ , badany enzym w odpowiednim stężeniu oraz inhibitory w stężeniu wcześniej potwierdzonym jako hamujące aktywność ureazy. Do wszystkich eksperymentów dołączano kontrole niehamowanej reakcji oraz niehamowanej reakcji z dodatkiem DTT w stosowanym stężeniu.

#### - Protekcja DTT

Przed rozpoczęciem reakcji przez 30 minut preinkubowano enzym z ditiotreiolem (w stężeniu wynoszącym 1,5-krotność stężenia inhibitora), następnie dodawano inhibitor i natychmiast rozpoczynano reakcję poprzez dodatek substratu. Mierzono  $A_{570}$  w 2-minutowych odstępach. Przeprowadzono również kontrolę reakcji hamowanej bez wcześniejszego dodatku inhibitora (uwzględniając preinkubację enzymu przed rozpoczęciem reakcji).

#### - Reaktywacja DTT

Do mieszaniny reakcyjnej dodano mocznik oraz inhibitor, po czym rozpoczynano reakcję dodatkiem enzymu i wykonywano pomiary  $A_{570}$  w 2-minutowych odstępach. Po zaobserwowaniu hamującego wpływu inhibitora do mieszaniny reakcyjnej dodano DTT w możliwie najmniejszej objętości, tak aby jego końcowe stężenie wyniosło 1,5-krotność stężenia inhibitora. Następnie kontynuowano pomiar zmian absorbancji. Przygotowano również kontrolę wpływu rozcieńczenia na aktywność enzymu (na tym samym etapie dodawano objętość wody destylowanej równą dodatkowi DTT).



### 3.5.7. Badanie wpływu inhibitorów na aktywność całych komórek mikroorganizmów

#### 3.5.7.1. Określenie wartości $IC_{50}$ inhibitorów w przypadku ureolizy prowadzonej przez całe komórki

Aby określić aktywność badanych związków jako inhibitorów ureolizy w całych komórkach przeprowadzono badanie z wykorzystaniem czerwieni krezolowej, jako indykatora zmian pH zachodzących w wyniku aktywności ureazy. Porcja komórek ureolitycznych uprzednio określona jako dająca zmiany  $A_{570}$  w przedziale 0,4 – 1,0 w ciągu 1,5 godziny reakcji została zawieszona w dwukrotnie rozcieńczonym odczynniku z czerwienią krezolową, do którego wcześniej dodano mocznik (w stężeniu  $2K_M$ ) oraz badane związki. W przypadku związków wymagających preinkubacji z enzymem, reakcję rozpoczynano dodatkiem mocznika. Przeprowadzono pomiary absorbancji w 2-minutowych odstępach i wyznaczono wartość  $IC_{50}$  – stężenie inhibitora, przy którym zaobserwowano zahamowanie przyrostu absorbancji o 50% względem niehamowanej kontroli aktywności enzymu. Przeprowadzono również kontrolę wpływu samego rozpuszczalnika w stężeniu odpowiadającym objętości dodanego roztworu inhibitora. W badaniach określających wpływ dodanych inhibitorów na stabilność syntetycznego moczu, reakcje prowadzono w tym podłożu zamiast 10 mM PBS. <sup>86</sup>

#### Syntetyczny mocz <sup>90</sup>

(pH podłoża doprowadzono do wartości z przedziału 5,5-6,0 i sterylizowano przez filtrację z użyciem filtrów membranowych o średnicy porów 0,22  $\mu$ m)

Składnik	Masa/L [g]	Składnik	Masa/L [g]
Pepton	1	NaCl	5,2
Ekstrakt drożdżowy	0,005	FeSO <sub>4</sub>	6,56×10 <sup>-4</sup>
Kwas mlekowy	0,1	MgSO <sub>4</sub>	0,239
Kwas moczowy	0,07	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,41
Kreatynina	0,8	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,95
NaHCO <sub>3</sub>	2,1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2
CaCl <sub>2</sub>	0,288	NH <sub>4</sub> Cl	1,3

Dla każdej grupy inhibitorów wykonano kontrolnie eksperyment z użyciem odczynnika indofenolowego, by potwierdzić, że obserwowane zmiany pH są spowodowane tworzeniem jonów amonowych w wyniku ureolizy. W przypadku badań na *H. pylori* hodowlę komórkową pobierano z systemu do inkubacji anaerobowej, odwirowywano i zawieszano w 10 mM PBS bezpośrednio przed rozpoczęciem reakcji w celu ograniczenia negatywnego wpływu tlenu na żywotność badanych bakterii.

#### 3.5.7.2. Badanie fluorescencyjne stresu oksydacyjnego w komórkach *C. neoformans* IHEM 3969<sup>91</sup>

Wpływ badanych związków na generowanie stresu oksydacyjnego badano z wykorzystaniem dihydrorodaminy 123. Cząsteczka ta wnika do komórek w ramach transportu biernego i zostaje utleniona przez reaktywne formy tlenu do rodaminy 123 – zielony barwnik fluorescencyjny akumulowany w mitochondriach. Na mikropłytkę do badań fluorescencyjnych przygotowano mieszaninę reakcyjną w 10 mM PBS – zawiesinę komórek grzybowych, badany związek w stężeniu, w którym był aktywny jako inhibitor ureazy z *C. neoformans*. Po 1 godzinie preinkubacji komórek z inhibitorami badanie rozpoczynano poprzez dodatek dihydrorodaminy (ze stężonego roztworu wyjściowego przygotowanego w etanolu) do końcowego stężenia 5  $\mu$ M. Płytkę przechowywano w ciemności i w 15-minutowych odstępach czasu wykonywano pomiary fluorescencji (wzbudzenie – 488 nm, emisja – 515 nm).

#### 3.5.7.3. Badanie wpływu ebselenu na aktywność reduktazy tioredoksyny w ekstrakcie komórkowym<sup>92</sup>

Przygotowano hodowlę *S. aureus* (wzorcowy mikroorganizm nieposiadający systemu reduktazy glutationu, uzupełniającego aktywność reduktazy tioredoksyny) w bulionie Mueller-Hinton. Po 2 dniach hodowli w optymalnych warunkach wzrostowych hodowlę odwirowano (6000 rpm, 45 min) i zawieszono w 50 mM buforze Tris-HCl suplementowanym 1 mM EDTA, zagęszczając zawiesinę 10-krotnie. Poddano dezintegracji ultradźwiękowej, prowadząc 30-sekundowe cykle dezintegracji przerywane 2-minutową inkubacją mieszaniny na lodzie. Dezintegrację prowadzono do momentu ustalenia się barwy

odczynnika Bradforda podczas badania stężenia białka w zawieszynie (zwykle 6-8 cykli). Powstały tak ekstrakt komórkowy wykorzystano do badania aktywności reduktazy tioredoksyny z użyciem kwasu 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowego (DTNB). Aktywna reduktaza tioredoksyny katalizuje redukcję DTNB do kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego, dającego żółte zabarwienie. Reakcja przebiega w 50 mM buforze Tris-HCl, suplementowanym 0,25 mM NADPH oraz 0,5 mM DTNB, z dodatkiem określonego stężenia związku będącego inhibitorem reduktazy tioredoksyny. Reakcję rozpoczynano przez dodatek DTNB i wykonywano pomiary  $A_{412}$  w 30-sekundowych odstępach. Przygotowano również kontrolę tła (bez dodatku DTNB), próbę niezawierającą ekstraktu komórkowego oraz kontrolę pozytywną, bez dodatku inhibitora.

### 3.5.8. Określenie wpływu aktywności wybranych pochodnych ebselenu na wzrost i żywotność *H. pylori* w formie biofilmu

#### 3.5.8.1. Wyznaczenie MIC dla formy planktonicznej

Ebselen oraz dwie ze struktur selenoorganicznych, wcześniej określonych jako najbardziej aktywne inhibitory ureolizy, zostały wyselekcjonowane do badań wpływu na wzrost i żywotność biofilmu *H. pylori*. Podczas selekcji kierowano się także wcześniej uzyskanymi danymi dotyczącymi hamowania aktywności ureazy produkowanej przez inne mikroorganizmy patogenne. Brano pod uwagę zarówno wyniki badań z wykorzystaniem oczyszczonego enzymu, jak również ureolizy prowadzonej przez całe komórki. Pierwszym etapem było wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost formy planktonicznej mikroorganizmów. Pomiar prowadzono metodą szeregu dwukrotnych rozcieńczeń inhibitorów na płytkach 24-dołkowych. Do hodowli wykorzystano komercyjnie dostępne podłoże BHI (*brain-heart infusion*) przygotowane zgodnie z zaleceniami producenta. Przygotowano również kontrolę wpływu DMF (rozpuszczalnika wykorzystanego w przygotowaniu roztworów inhibitora) oraz lewofloksacyny, będącej wzorcową substancją mającą potwierdzony wpływ na żywotność komórek *H. pylori* oraz aktywność ureolityczną. Hodowlę prowadzono w warunkach mikroaerofilnych. Po zakończeniu hodowli odczytano najniższe stężenie inhibitorów, przy którym

zaobserwowano brak zmętnienia wywołanego wzrostem mikroorganizmów.

### 3.5.8.2. Badanie wpływu inhibitorów selenoorganicznych w stężeniu MIC wobec formy planktonicznej na wzrost biofilmu

Do badań wpływu na parametry życiowe biofilmu związki selenoorganiczne dodawano w stężeniu odpowiadającym ich wartościom MIC wyznaczonym wcześniej dla bakterii w formie planktonicznej (6,25  $\mu\text{M}$  dla ebselenu, 12,5  $\mu\text{M}$  w przypadku obydwu jego pochodnych). Aktywność inhibitorów porównywano z wpływem lewofloksacyny (również w wyznaczonym dla niej stężeniu MIC) – antybiotyku z grupy fluorochinolonów, powszechnie stosowanego podczas terapii, której celem jest eradykacja *H. pylori* ze skolonizowanego przez nią przewodu pokarmowego. Skontrolowano również ewentualny wpływ DMF – rozpuszczalnika organicznego wykorzystanego do przygotowania roztworów słabo rozpuszczalnych w wodzie pochodnych ebselenu. Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem systemu BioFlux 1000 oraz zautomatyzowanego mikroskopu wykonującego zdjęcia przepływu zawiesiny komórek przez kapilary między dołkami płytki 24-dołkowej specjalnie przeznaczonej do tego typu obserwacji. Przepływ zawiesiny był na tyle powolny, by uniemożliwić wzrost biofilmu w obserwowanej kapilarze. Aby zaobserwować wpływ na żywotność mikroorganizmów oraz zawartość białek, zastosowano odpowiednie techniki barwień fluorescencyjnych.

### 3.5.9. Wyznaczenie wpływu związków flawonoidowych na wzrost biofilmu bakteryjnego oraz żywotność komórek

#### 3.5.9.1. Przygotowanie hodowli

Pomiar przeprowadzono na płytce 96-dołkowej z wykorzystaniem pomiaru grawimetrycznego rezonatorami kwarcowymi. Badano wpływ na wzrost następujących gatunków bakteryjnych: *P. mirabilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Przygotowano hodowlę z dodatkiem określonego stężenia związków flawonoidowych. Końcowa objętość hodowli w każdym dołku mieściła się w przedziale 80-100  $\mu\text{L}$ . Przygotowano kontrolę niehamowanego wzrostu mikroorganizmów, wpływu rozpuszczalnika w roztworach

flawonoidów (DMSO) oraz kontrolę sterylności podłoża. Dla każdego związku przygotowano pomiar w przynajmniej czterech powtórzeniach.

### 3.5.9.2. Pomiar grawimetryczny <sup>93</sup>

Ostrożnie usunięto zewnętrzną osłonkę z rezonatorów kwarcowych poprzez pocieranie między dwoma pilnikami warsztatowymi. Bardzo ostrożnie, z wykorzystaniem pincety, osadzono rezonatory na odpowiednich stanowiskach pasków przeznaczonych do ich obsadzania. Jeden po drugim podłączono paski do aparatury mierzącej częstotliwość drgań i konduktację rezonatorów, podłączonej gniazdem USB do komputera wyposażonego w autorski program QTF, opracowany przez dr hab. inż. Tomasza Piaseckiego. Sprawdzone, czy wszystkie osadzone urządzenia wykazują konduktancję w przedziale 6-12  $\mu\text{S}$ . Jeżeli któryś wykraczał poza ten zakres, uznawano go za uszkodzony mechanicznie i wymieniano. Pasek umieszczono nad kufelką z etanolem tak, aby widelce były w nim zanurzone celem ich sterylizacji. Po 15 minutach wyjęto je i osuszono, wykorzystując ciąg powietrza w komorze laminarnej. Wykonano pomiar częstotliwości ich drgań, jednocześnie upewniając się, że żaden z nich nie został uszkodzony podczas sterylizacji. Następnie osadzono paski na statywie tak, że każdy z rezonatorów był zanurzony w jednym z dołków płytki z hodowlą. Inkubację prowadzono przez dwa dni, umieszczając statyw w uprzednio zdezynfekowanym plastikowym pojemniku, z którym obchodzono się ostrożnie, by nie przechylić statywu z badaną mikropłytką. Po zakończeniu hodowli paski wyciągnięto ze statywu, rezonatory osuszono i zmierzono częstotliwość drgań. Spadek częstotliwości drgań rezonatorów w stosunku do częstotliwości przed eksperymentem jest wprost proporcjonalny do masy obciążającego go biofilmu bakteryjnego. Przyjmowano, że 1 ng dodatkowego obciążenia rezonatorów przekłada się na spadek częstotliwości drgań o 18,617 mHz. Wcześniejsze badania wzrostu biofilmu z użyciem wspomnianej aparatury doprowadziły do wniosku, że objętość hodowli w płytce 96-dołkowej podczas tego rodzaju pomiaru nie powinna przekraczać 100  $\mu\text{L}$ . W badaniach opisanych w tej pracy starano się trzymać tej zasady. Wcześniej wykazano, iż takie ograniczenie objętości hodowli minimalizuje ryzyko osadzania się na powierzchni rezonatorów dużych kryształów soli wytrąconych z podłoża hodowlanego. Badania zdolności

po pochodnych naryngeniny i ich oksymów do hamowania wzrostu formy planktonicznej prowadzono poprzez klasyczny pomiar gęstości optycznej hodowli bakteryjnej oraz określenie żywotności komórek z wykorzystaniem testu MTT.

## 4. BADANIA WŁASNE

### 4.1. POZYSKIWANIE I WŁAŚCIWOŚCI UREAZ POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO

#### 4.1.1. Ustalenie warunków hodowli bakterii ureolitycznych

Aby móc uzyskiwać oczyszczone preparaty ureaz pochodzenia mikrobiologicznego niezbędne było opracowanie optymalnych warunków hodowlanych umożliwiających pozyskanie dużej ilości komórek aktywnych ureolitycznie. Ureolizę indukowano w komórkach szczepów bakteryjnych *S. pasteurii* CCM 2056 oraz *P. mirabilis* PCM 543. Hodowla w porcjach 100 mL umożliwiła pozyskanie średnio 5 g mokrej biomasy na litr podłoża hodowlanego. Zastosowanie takiej samej objętości podczas hodowli w pojedynczym naczyniu szklanym prowadziło do uzyskania około 1,5-2 g mokrej biomasy. Na podstawie tych wyników zdecydowano się na stosowanie dużej ilości kolb płaskodennych o pojemności 250 mL pomimo uciążliwości prowadzenia tego rodzaju hodowli. W jednym procesie oczyszczania szczepiono łącznie 2 L podłoża hodowlanego. W przypadku badanych szczepów bakteryjnych wzrost aktywności ureazy jest indukowany obecnością mocznika, niezbędnego niezależnie od rodzaju i stężenia innych źródeł azotu w podłożu hodowlanym<sup>94</sup>. Podczas wzrostu mikroorganizmów zaobserwowano znaczący wpływ momentu dodania składników indukujących ureolizę (mocznik i jony niklu w stężeniu odpowiednio dobranym dla danego szczepu bakteryjnego) na wzrost i żywotność otrzymanych komórek. Jeżeli wspomniane substancje dodawano do podłoża hodowlanego na początku inkubacji, razem z inokulum bakteryjnym, skutkowało to spadkiem tempa wzrostu mikroorganizmów. Codzienne pomiary kontrolne wartości pH płynu pohodowlanego potwierdziły, że dodatek mocznika prowadził do dynamicznego wzrostu zasadowości w środowisku, aż do wartości w przedziale 10-11. Są to warunki znacznie odbiegające od optymalnych do wzrostu badanych gatunków. Było to szczególnie istotne podczas przygotowywania materiału do eksperymentów określających ureolizę prowadzoną przez całe komórki. Próby zapobieżenia temu zjawisku poprzez buforowanie podłoża hodowlanego wykazały, że dodatek składników buforów może również mieć negatywny wpływ na parametry otrzymanych komórek. Na drodze eksperymentalnej za

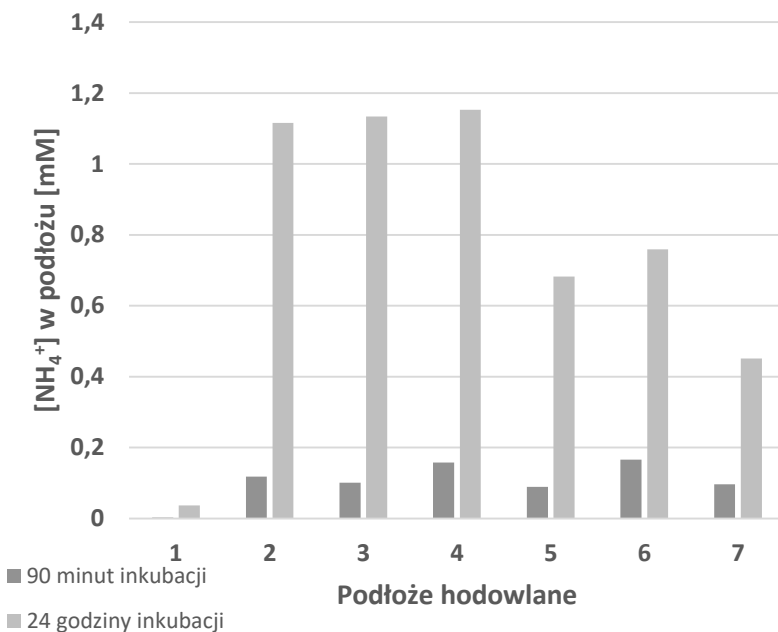
lepsze rozwiązanie uznano opóźnienie dodania mocznika i niklu do momentu uzyskania wysokiej gęstości optycznej hodowli wzrostowej ( $OD_{650}$  w przedziale 0,8 – 1,0). Ostatecznie stosowano procedurę zakładającą trzy dni hodowli w dużej skali i dodatek induktorów ureolizy jeden dzień przed jej zakończeniem.

#### 4.1.2. Warunki hodowlane do indukcji ureolizy w komórkach *C. neoformans* IHEM 3969

##### 4.1.2.1. Dobór warunków indukcji ureolizy

W źródłach literaturowych można znaleźć stosunkowo niewiele informacji dotyczących mechanizmów funkcjonowania ureazy w komórkach *C. neoformans* oraz systemów kontroli jej aktywności. Co więcej, podane informacje w niektórych przypadkach wzajemnie się wykluczają. Z tego względu zdecydowano się na samodzielną optymalizację warunków hodowli. Przydatność roztworów takich jak 10 mM PBS czy płyn fizjologiczny sprawdzano w celu stwierdzenia, czy całkowity brak innego źródła przyswajalnego azotu oprócz mocznika ma wpływ na produkcję ureazy. Testowane popularne podłoże grzybowe Sabouraud oraz podłoże minimalne Christensena (typowe dla testowania aktywności ureolitycznej mikroorganizmów) różnią się między sobą zasobnością w związki będące źródłem azotu, niezależnie od obecności mocznika. Ewentualny wpływ glukozy w modyfikowanym podłożu Christensena sprawdzano, ponieważ dane literaturowe wskazują, że obecność łatwo przyswajalnego źródła węgla w środowisku może mieć wpływ na produkcję ureazy u grzybów<sup>36</sup>. Hodowle niezawierające dodatku mocznika stanowiły próbę kontrolną, mającą potwierdzić znikomy wpływ jonów amonowych obecnych w podłożu oraz zmagazynowanych w komórkach drożdży na wynik badania kolorymetrycznego. Niezależnie od zastosowanego podłoża stężenie jonów amonowych w próbach bez dodatku mocznika było pomijalnie niskie (wyników tych nie przedstawiono w formie graficznej).





Rys. 17. - Wpływ doboru podłoża hodowlanego na intensywność ureolizy (1 - bulion Sabouraud, 2 - 10 mM PBS, 3 - płyn fizjologiczny, 4 - modyfikowane podłoże Christensena, 5 - 4 + 1 g/L peptonu, 6 - 4 + 0,1% glukozy, 7 - 4 + 1 g/L peptonu + 0,1% glukozy)

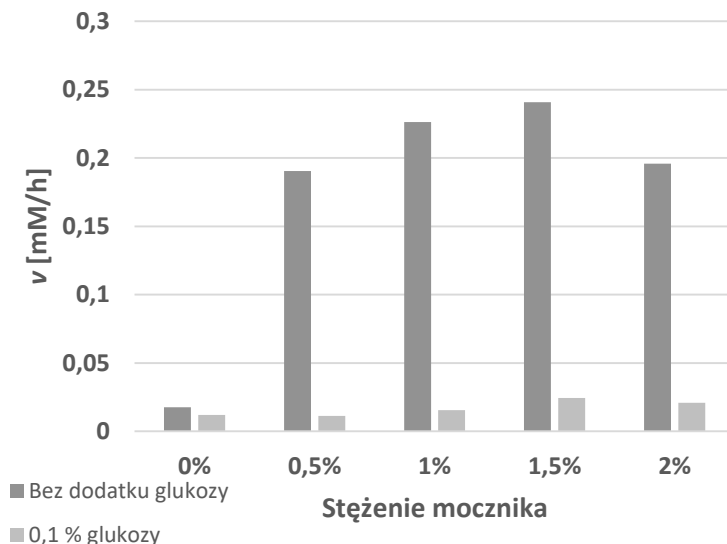
Obecność mocznika w hodowli prowadzonej w podłożu Sabouraud nie była powiązana ze wzrostem stężenia jonów amonowych. Był to jedyny taki przypadek spośród wszystkich badanych podłoży (Rys. 17.). W podłożu Christensena wzbogaconym dodatkiem peptonu stężenie uwolnionych jonów amonowych było o 40% niższe niż w podłożu minimalnym pozbawionym dodatkowego źródła azotu. Te obserwacje prowadziły do ustalenia, że w celu optymalizacji syntezy ureazy w komórkach grzybowych należy zastosować podłoże, w którym mocznik stanowi jedyne źródło łatwo przyswajalnego azotu. Jest to bardzo istotna różnica w odniesieniu do ureolitycznych szczepów bakteryjnych. Ekstrakt drożdżowy stosowany jako baza podłoża stosowanego do ich hodowli sam w sobie stanowił źródło azotu wystarczające do szybkiego wzrostu tych mikroorganizmów, a po dodatku mocznika był także odpowiednim podłożem do indukcji ureolizy. Analogicznej zależności nie obserwowano w przypadku

*C. neoformans*. Dodatek glukozy do podłoża Christensena wydawał się nie mieć negatywnego wpływu na aktywność ureolityczną w pierwszych godzinach od rozpoczęcia hodowli, jednak po 24 godzinach inkubacji stężenie jonów amonowych w hodowli z dodatkiem glukozy było niższe o 34% względem hodowli bez dodatku glukozy. Porównanie modyfikowanego podłoża Christensena bez dodatkowych źródeł węgla i azotu z płynem fizjologicznym i 10 mM PBS potwierdziło, że stanowi on najbardziej obiecujące podłoże do uzyskania aktywności ureolitycznej. Jest prawdopodobne, że jednym z kluczowych aspektów jest tu śladowy dodatek niklu zawarty w niewielkiej ilości ekstraktu drożdżowego stanowiącego jeden ze składników tego podłoża. W celu wstępnego określenia wpływu podłoża i obecności mocznika na żywotność komórek drożdżowych przeprowadzono obserwację mikroskopową wszystkich hodowli po uprzednim wybarwieniu rozcieńczonym błękitem metylenowym. Obserwując mikroorganizmy rosnące w modyfikowanym podłożu Christensena bez dodatku mocznika w obrazie mikroskopowym nie zauważono komórek wybarwionych na kolor niebieski (co wskazuje na ich śmierć) z wyjątkiem tworów stosunkowo niewielkich, prawdopodobnie niedojrzałych. Wyniki obserwacji były zbliżone do wyników obserwacji komórek hodowanych w podłożu optymalnym dla wzrostu (bulion Sabouraud). Prowadzi to do wniosku, iż zmodyfikowane podłoże Christensena, mimo że jest podłożem minimalnym, nie ma negatywnego wpływu na żywotność komórek drożdżowych. Z kolei wykazano, że dodatek mocznika znacząco zmniejsza procent żywych komórek w hodowli (nawet o 40-45%). Tylko w mieszaninach zawierających dodatek 2% mocznika zaobserwowano wybarwione na niebiesko (martwe) drożdże w rozmiarach wskazujących, że były to w pełni dojrzałe mikroorganizmy. Ta obserwacja stworzyła konieczność ustalenia optymalnego stężenia mocznika do indukcji ureolizy w zmodyfikowanym podłożu Christensena, co było kolejnym etapem prowadzonych badań.

#### 4.1.2.2. Wpływ stężenia mocznika i obecności glukozy na indukcję ureolizy w modyfikowanym podłożu Christensena

Następnym etapem badań nad indukcją ureolizy w komórkach grzybowych inkubowanych w modyfikowanym podłożu Christensena

było sprawdzenie rzeczywistej aktywności ureolitycznej hodowanych mikroorganizmów.



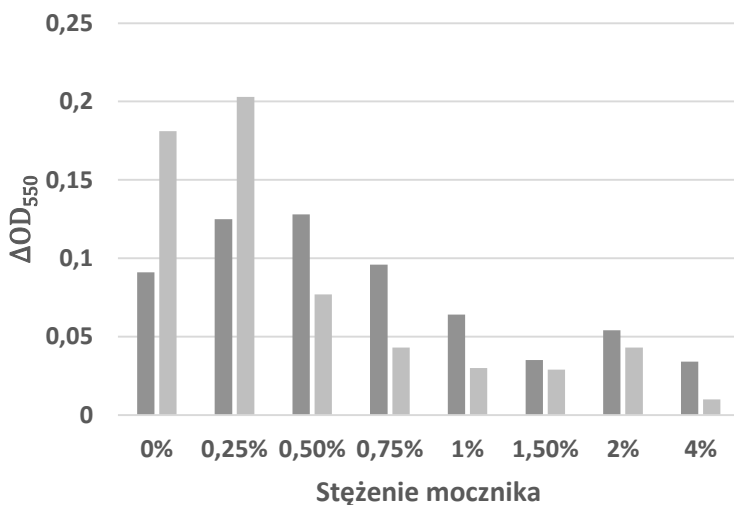
Rys. 18. - Wpływ stężenia mocznika i obecności glukozy w podłożu hodowlanym na aktywność ureolityczną komórek *C. neoformans* IHEM 3969

Wyniki potwierdziły, że podczas dłuższej ( $t \geq 24h$ ) inkubacji komórek dodatek glukozy praktycznie eliminuje aktywność ureolityczną komórek grzybowych (Rys. 18.), mimo że podczas pierwszej godziny inkubacji nie obserwowano żadnego negatywnego wpływu na wzrost stężenia produktu reakcji w hodowli. Stężenie mocznika wynoszące 1% w/v wstępnie uznano za optymalne do dalszego stosowania w podłożu do indukcji ureolizy. Zastosowanie wyższego stężenia (1,5%) zaowocowało stosunkowo niewielkim przyrostem aktywności ureolitycznej komórek, zaś przeprowadzona wcześniej obserwacja mikroskopowa komórek wybarwionych błękitem metylenowym sugerowała toksyczne działanie mocznika w wyższych stężeniach.

#### 4.1.2.3. Wpływ mocznika na wzrost komórek

Ewentualny toksyczny wpływ stężenia induktorów ureolizy badano w bulionie Sabouraud. Zastosowano bogate podłoże wzrostowe,

aby mieć pewność, że zahamowanie wzrostu będzie miało związek z toksycznością dodanych substancji. Ponadto, wcześniejsze stwierdzenie braku indukcji ureolizy w podłożu Sabouraud eliminowało ryzyko wpływu zmian pH podłoża hodowlanego na wynik doświadczeń. Analiza gęstości optycznej hodowli wykazała, że w przypadku dwudniowej inkubacji komórek w podłożu Sabouraud stężenie mocznika nieprzekraczające 0,75% nie miało negatywnego wpływu na rozwój hodowli (Rys. 19.).



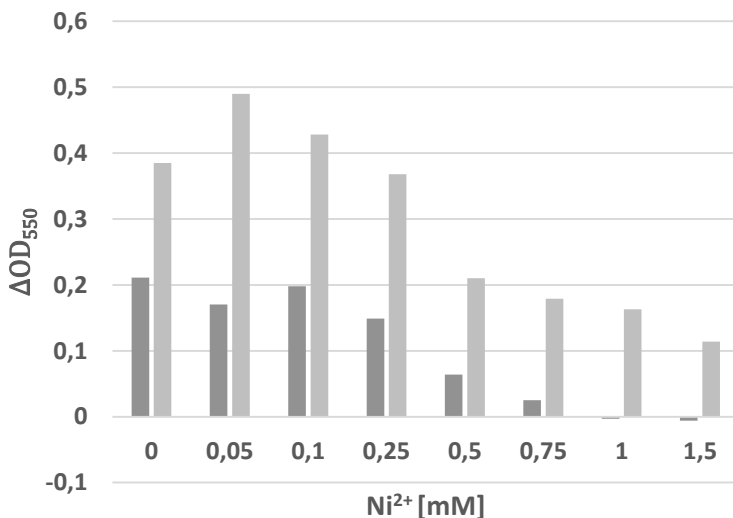
Rys. 19. – Wpływ stężenia mocznika w podłożu hodowlanym na szybkość wzrostu komórek *C. neoformans* IHEM 3969 (ciemne słupki – po 2 dniach hodowli, jasne słupki – po 5 dniach hodowli)

Otrzymane wyniki nie doprowadziły do korekty stężenia mocznika wcześniej uznanego za optymalne (1%) pomimo jego negatywnego wpływu na szybkość wzrostu komórek. Przyczyną takiej decyzji było przyjęcie dwuetapowej procedury hodowli drożdży ureolitycznych w dalszym etapie pracy badawczej. Pierwszy etap hodowli w przyjętym systemie służył jako etap szybkiego namnażania biomasy, zaś w drugim etapie główny cel stanowiła indukcja ureolizy w komórkach (dopiero wtedy dodawano mocznik i jony niklu). W związku z tym, obecność substancji hamujących wzrost hodowli

w drugim etapie uznano za kwestię drugorzędną. Uwzględniono również fakt, iż etap ten trwał stosunkowo krótko (maksymalnie dwie doby), a w jego trakcie możliwe było stałe monitorowanie pH podłoża, co było istotne podczas przygotowywań materiału do badań na całych komórkach.

#### 4.1.2.4. Wpływ stężenia jonów niklu na szybkość wzrostu komórek

Kolejnym etapem optymalizacji procesu indukcji aktywności ureazy w komórkach *C. neoformans* było badanie optymalnego stężenia jonów niklu, których wiązanie koordynacyjne z centrum aktywnym enzymu jest bardzo istotne dla aktywności biokatalizatora.



Rys. 20. – Wpływ stężenia niklu w podłożu hodowlanym na szybkość wzrostu komórek *C. neoformans* IHEM 3969 (ciemne słupki – po 2 dniach hodowli, jasne słupki – po 5 dniach hodowli)

Najwyższe stężenie jonów niklu, dla którego nie zaobserwowano znaczącego zahamowania wzrostu mikroorganizmów wynosiło 0,1 mM (Rys. 20.). Właśnie to stężenie uznano za optymalne do podłoża indukującego ureolizę.

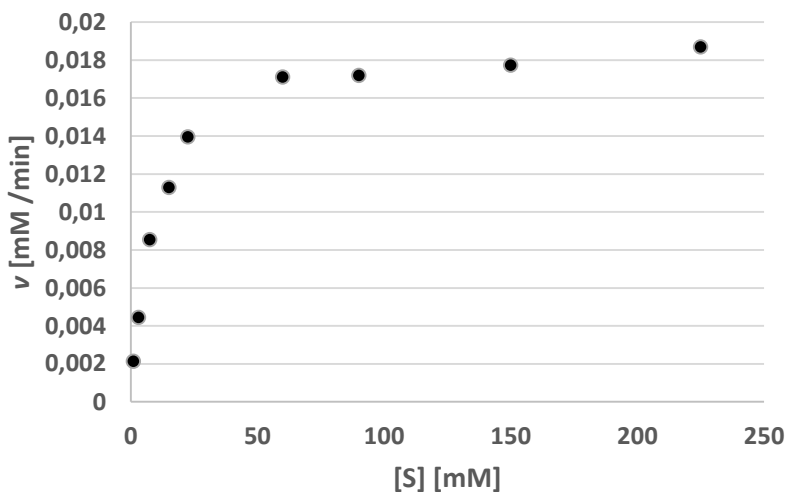
#### 4.1.3. Oczyszczanie ureazy pochodzenia mikrobiologicznego

Pierwszym etapem pozyskiwania oczyszczonego enzymu była dezintegracja komórek, w których na etapie hodowli doprowadzono do indukcji ureolizy. Zastosowanie stosunkowo długich przerw między cyklami dezintegracji umożliwiło zmniejszenie ryzyka utraty aktywności enzymatycznej w warunkach podwyższonej temperatury. Było to szczególnie istotne w przypadku sonikacji komórek grzybowych, która okazała się być znacznie bardziej czasochłonna. W przypadku komórek bakteryjnych zwykle wystarczyło przeprowadzenie 6-8 30-sekundowych cykli dezintegracji. Przy sonikacji grzybów przygotowanie ekstraktu komórkowego wymagało nawet trzykrotnie dłuższego procesu. Niezbędna więc była dokładna kontrola temperatury mieszaniny, aby uniknąć zmian strukturalnych enzymu. Podejmowane próby zastosowania detergentu Tween 80 nie doprowadziły do przyspieszenia procesu dezintegracji komórek. Podczas oczyszczania ureazy na kolumnie do chromatografii jonowymiennej ze złożem Q-Sepharose zaobserwowano elucję enzymu przy stężeniu NaCl w przedziale 0,35 – 0,4 M. W przypadku kolumny Phenyl Sepharose elucja frakcji rozpoczynała się przy stężeniu 0,4 M siarczanu(VI) amonu. Z kolumny Mono-Q frakcje ureolityczne zostały usunięte przy stężeniu NaCl wynoszącym około 0,25-0,3 M. Wszystkie profile elucji pozostały niezmiennione niezależnie od pochodzenia izolowanej ureazy.

#### 4.1.4. Analiza właściwości oczyszczonej ureazy z komórek *C. neoformans* IHEM 3969

##### 4.1.4.1. Określenie parametrów kinetycznych enzymu

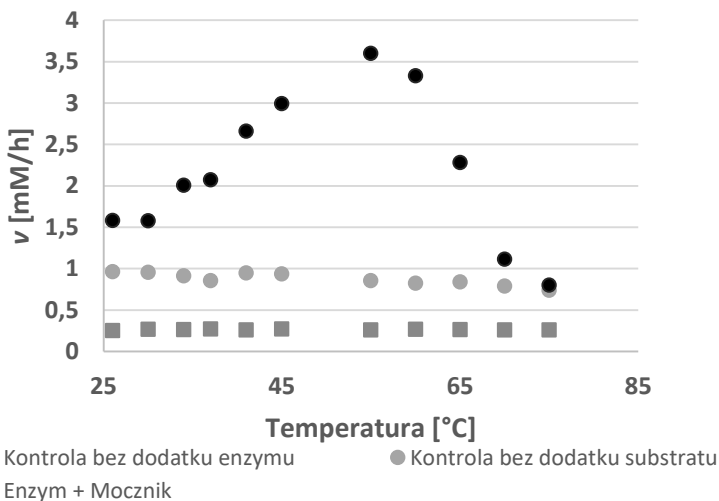
Wyznaczona wartość  $v_{\max}$  wynosiła 0,0193 mM/min, zaś stała Michaelisa dla oczyszczonego enzymu wynosiła 9,57 mM (Rys. 21.). Z uzyskanych wartości wynika, iż ureaza z komórek *C. neoformans* charakteryzuje się wyższą specyficnością wobec substratu reakcji ureolizy niż w przypadku enzymu pozyskanego z bakterii *S. pasteurii*. Dla tego ostatniego zwykle stwierdzano wartości stałej Michaelisa w przedziale 16-18 mM.



Rys. 21. - Krzywa Michaelisa-Menten wyznaczona dla oczyszczonego enzymu z komórek *C. neoformans* IHEM 3969

#### 4.1.4.2. Określenie optymalnej temperatury aktywności enzymatycznej

Ustalono, że ureaza z komórek *C. neoformans* wykazuje maksymalną aktywność w temperaturze wynoszącej 55°C (Rys. 22.). Studia literaturowe wykazały, że podobna temperatura jest optymalna również dla innych ureaz, nie tylko pochodzenia mikrobiologicznego, ale także roślinnego. Tak wysoka temperatura mogłaby jednak doprowadzić do szybkiego odparowania mieszaniny reakcyjnej, szczególnie podczas długich eksperymentów prowadzonych przy zastosowaniu wolnowiążących inhibitorów ureaz. W związku z tym, maksymalna temperatura w której prowadzono testy enzymatyczne wynosiła 30°C, zaś intensywność reakcji była wedle potrzeby modyfikowana poprzez zmianę stężenia enzymu lub komórek ureolitycznych.



Rys. 22. – Określenie optymalnej temperatury dla aktywności enzymu oczyszczonego z komórek *C. neoformans* IHEM 3969

## 4.2. PODATNOŚĆ UREAZ POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO NA HAMOWANIE PRZEZ NOWE INHIBITORY

### 4.2.1. Badania aktywności analogów substratu

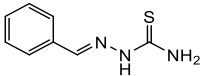
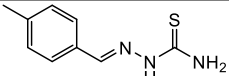
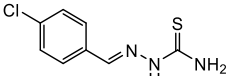
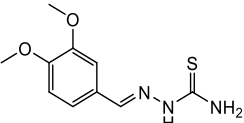
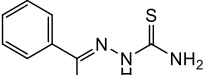
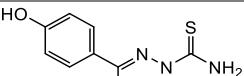
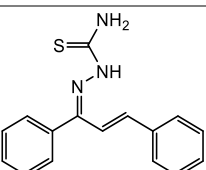
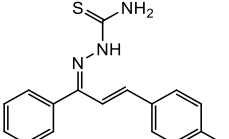
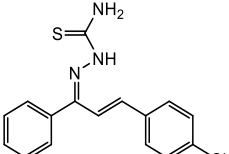
#### 4.2.1.1. Badania aktywności związków zawierających fragment strukturalny tiomocznika jako inhibitorów ureazy bakteryjnej oraz ureolizy prowadzonej przez całe komórki mikroorganizmów

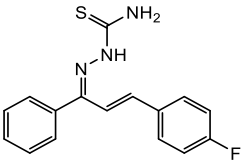
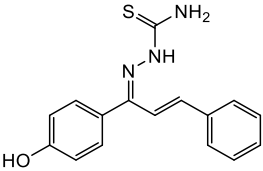
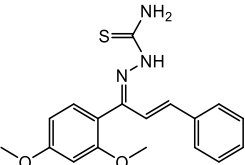
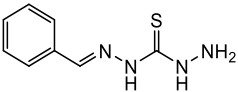
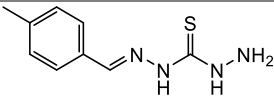
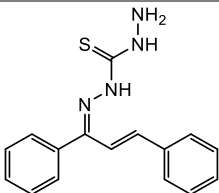
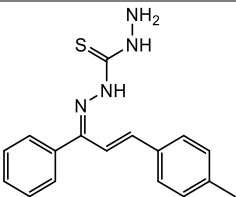
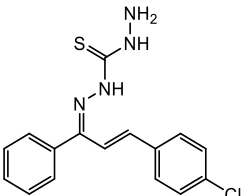
Wśród struktur badanych pod kątem zdolności do inhibicji ureaz bakteryjnych znalazła się grupa kilkudziesięciu pochodnych zawierających fragment strukturalny tiomocznika. Założono, że związki o podobnej strukturze mogą hamować aktywność ureolityczną jako analogi substratu reakcji katalizowanej przez enzym. Wstępne badania aktywności przeprowadzono na oczyszczonej ureazie z komórek *S. pasteurii*. Badane inhibitory podzielono wstępnie na cztery podgrupy: tiosemikarbazyony, tiokarbohydrazony, tiazolilowe pochodne tiomocznika oraz pochodne dipirydynowe. Wykazano, że ponad 30 związków charakteryzuje się zdolnością do skutecznej inhibicji ureazy pochodzenia bakteryjnego (Tabela 1.). Dla wszystkich struktur z tej grupy wartość  $K_i$  nie przekraczała 100  $\mu\text{M}$ . Badania kinetyki enzymatycznej potwierdziły, że związki stanowią inhibitory

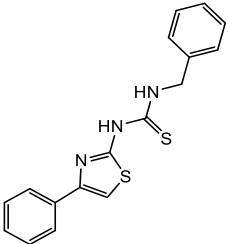
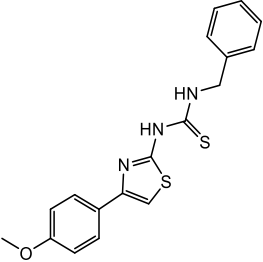
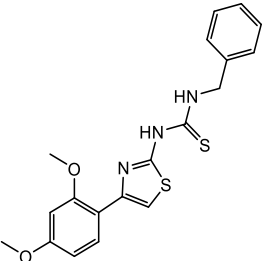
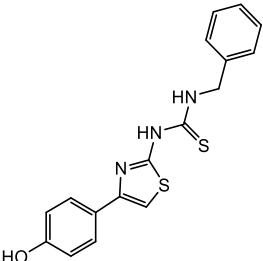


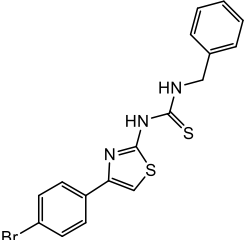
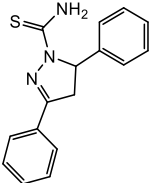
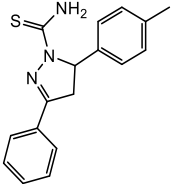
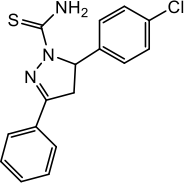
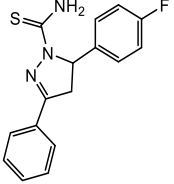
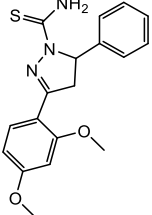
szybkowiązące, jako że krzywe postępu reakcji hamowanej w systemie niepreinkubowanym miały przebieg liniowy. Większość z nich charakteryzowała się inhibicją zgodną z modelem mieszanym (przykład na Rys. 23.). Struktury będące pochodnymi benzylidenotiosemikarbazonu okazały się najskuteczniejszymi inhibitorami. W przypadku żadnej z nich nie zaobserwowano przekroczenia wartości  $K_i$  wynoszącej  $40 \mu\text{M}$ , zaś w przypadku większości z nich (8 spośród 12 badanych struktur tego rodzaju) stała ta była niższa niż  $10 \mu\text{M}$ . W tej grupie znalazły się również dwa najskuteczniejsze inhibitory wśród struktur zawierających fragment tiomocznika. Obydwa te związki stanowiły pochodne metylowe (w pozycji *para* pierścienia fenyłowego lub w pozycji benzylidenu), bez żadnych dodatkowych modyfikacji związanych z wprowadzeniem grup zawierających heteroatomy. Wartości  $K_i$  wyniosły odpowiednio  $0,391 \mu\text{M}$  dla struktury TA5 oraz  $0,998 \mu\text{M}$  dla związku TA2. Modelowanie wiązania inhibitorów (wykonane przez Prof. Łukasza Berlickiego z Katedry Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej) wykazało, że atom siarki w strukturze tiomocznikowej może tworzyć wiązanie koordynacyjne z katalitycznymi jonami niklu w centrum aktywnym biokatalizatora. Grupa amidowa tworzy wiązania wodorowe z grupą karboksylową reszty Asp363 oraz grupą karbonylową Ala366. Pierścień aromatyczny zaś umiejscawia się w hydrofobowej wnęce, w której tworzeniu bierze udział kluczowa dla aktywności enzymu reszta Cys322. Zbliżone strukturalnie pochodne tiokarbohydrazonowe również okazały się być stosunkowo aktywne jako inhibitory ureazy pochodzenia bakteryjnego. Najskuteczniejszym związkiem w tej grupie była rozgałęziona dwupierścieniowa struktura TB3. Modelowanie miejsca aktywnego ureazy wykazało, że jej stosunkowo duży dodatkowy fragment może wpasowywać się między reszty Arg339 oraz His323, tworząc oddziaływania z łańcuchami bocznymi tych aminokwasów. Większość pozostałych związków nie charakteryzowała się wysoką aktywnością. Pośród tiazolilowych pochodnych tiomocznika zawierających dodatkowy pierścień aromatyczny tylko dla jednego inhibitora – TC4 - wykazano wartość stałej dysocjacji jego kompleksu z ureazą SPU niższą niż  $10 \mu\text{M}$ .

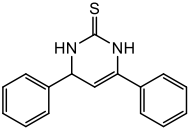
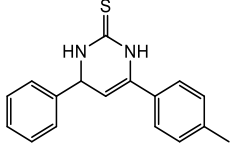
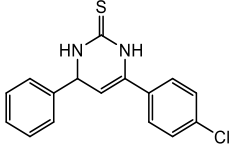
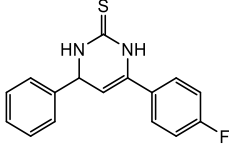
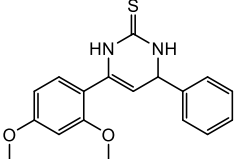
Tabela 1. – Aktywność związków zawierających fragment strukturalny tiomocznika jako inhibitorów ureolizy (*S. pasteurii* CCM 2056, *P. mirabilis* PCM 543)

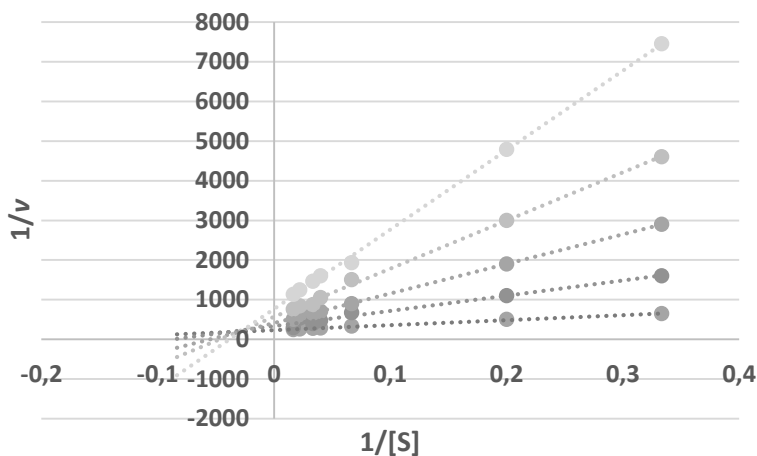
Nr	Struktura	<i>S. pasteurii</i>		<i>P. mirabilis</i>
		K <sub>i</sub> SPU [μM]	IC <sub>50</sub> dla całych komórek [μM]	IC <sub>50</sub> dla całych komórek [μM]
TA1		3,572 ± 0,182	3,831 ± 0,282	346,6 ± 23,1
TA2		0,998 ± 0,041	9,920 ± 1,307	281,8 ± 32,4
TA3		8,151 ± 0,908	16,43 ± 0,94	454,4 ± 26,3
TA4		37,45 ± 4,79	8,460 ± 0,733	431,1 ± 19,9
TA5		0,391 ± 0,013	194,0 ± 12,5	568,2 ± 47,7
TA6		33,44 ± 2,61	87,56 ± 9,07	512,6 ± 33,9
TA7		6,134 ± 0,714	102,5 ± 8,4	519,4 ± 27,6
TA8		5,185 ± 0,691	764,3 ± 50,3	1114 ± 126
TA9		14,94 ± 2,01	58,37 ± 3,21	429,5 ± 26,9

<b>TA10</b>		24,22 ± 1,52	36,22 ± 2,84	509,5 ± 17,8
<b>TA11</b>		5,402 ± 0,327	149,2 ± 8,7	763,1 ± 41,1
<b>TA12</b>		3,016 ± 0,230	134,5 ± 11,4	NA
<b>TB1</b>		8,308 ± 0,438	11,64 ± 0,65	543,5 ± 17,9
<b>TB2</b>		13,52 ± 3,16	118,3 ± 7,7	663,7 ± 35,2
<b>TB3</b>		2,237 ± 0,192	NA	NA
<b>TB4</b>		59,50 ± 4,40	552,7 ± 27,8	NA
<b>TB5</b>		12,78 ± 1,54	132,2 ± 6,9	NA

<b>TC1</b>		46,05 ± 3,71	476,2 ± 26,1	554,5 ± 18,8
<b>TC2</b>		41,40 ± 3,73	NA	NA
<b>TC3</b>		22,17 ± 2,66	326,4 ± 18,7	508,8 ± 31,6
<b>TC4</b>		2,759 ± 0,127	76,31 ± 4,5	304,4 ± 13,9

<b>TC5</b>		10,71 ± 0,79	415,8 ± 32,4	637,6 ± 48,2
<b>TC6</b>		71,66 ± 8,26		
<b>TC7</b>		87,12 ± 9,29		
<b>TC8</b>		30,47 ± 2,84		
<b>TC9</b>		46,54 ± 6,30		
<b>TC10</b>		57,66 ± 4,42		

<b>TD1</b>		36,16 ± 5,20
<b>TD2</b>		27,35 ± 3,47
<b>TD3</b>		30,16 ± 4,23
<b>TD4</b>		5,551 ± 0,873
<b>TD5</b>		47,68 ± 6,31



Rys. 23. – Krzywe Lineweavera-Burka dla inhibitora mieszanego TC5 – przedział stężeń inhibitora 0-250  $\mu\text{M}$

W celu oceny zdolności do przenikania osłon komórkowych oraz hamowania aktywności ureolitycznej szczepów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wykonano również porównawcze badania wpływu związków na ureolizę prowadzoną w całych komórkach *S. pasteurii* oraz *P. mirabilis*. Podobnie jak w przypadku kinetyki prowadzonej na oczyszczonym enzymie bakteryjnym zaobserwowano liniowy przebieg krzywych postępu reakcji ureolizy w systemie bez preinkubacji komórek ureolitycznych z inhibitorami. Stwierdzono ponadto, że wpływ różnorodnych podstawników na efektywność inhibicji był znacznie wyraźniejszy niż w przypadku testów na enzymie. Może to oznaczać, że ich pozytywny lub negatywny udział w aktywności nie ogranicza się do uczestnictwa w wiązaniu do cząsteczek biokatalizatora. Dodatkowo mogą odgrywać istotną rolę w procesie przedostawania się związków przez osłony komórkowe bakterii, co jest szczególnie istotne w eliminowaniu patogennych mikroorganizmów o Gram-ujemnej budowie ściany komórkowej. Dla przykładu, wprowadzenie grupy metoksyłowej prowadziło do znaczącego obniżenia aktywności związków jako inhibitorów ureolizy prowadzonej w całych komórkach. Zaobserwowano to zarówno w grupie najbardziej aktywnych tiosemikarbazonów jak również pośród pochodnych tiazolilowych zawierających fragment tiomocznika. Z kolei hydroksylowanie

pierścienia aromatycznego zazwyczaj umożliwiało zwiększenie zdolności do hamowania aktywności ureolitycznej. Ten efekt obserwowano niezależnie od budowy ściany komórkowej bakterii, lecz w przypadku mikroorganizmów Gram-dodatnich obserwowany spadek wartości  $IC_{50}$  był zwykle bardziej znaczący. Było to szczególnie widocznie w przypadku struktur tiazolilowych TC1 i TC4, gdzie obecność grupy hydroksylowej doprowadziło do około 6-krotnego spadku  $IC_{50}$  w porównaniu ze związkiem pozbawionym tej modyfikacji. Był to również najskuteczniejszy przeciw całym komórkom (obydwu badanych szczepów) inhibitor w tej podgrupie strukturalnej. Jedynym wyjątkiem był inhibitor charakteryzujący się najbardziej rozgałęzioną strukturą. Być może jego złożona budowa sprawia, że zwiększenie hydrofilowości pierścienia aromatycznego nie jest wystarczające, aby umożliwić mu równie efektywne pokonywanie osłon komórkowych jak ma to miejsce w przypadku mniej rozbudowanych inhibitorów. Podobnie jak w przypadku testów na oczyszczonym enzymie ze *S. pasteurii*, tak również w badaniach na całych komórkach ureolitycznych tego mikroorganizmu pochodne tiosemikarbazonów okazały się najskuteczniejszymi inhibitorami spośród wszystkich badanych podgrup. Najskuteczniejsza okazała się struktura wyjściowa pozbawiona dodatkowych modyfikacji i rozgałęzień (TA1) – wartość  $IC_{50}$  wyniosła 3,83  $\mu\text{M}$ . Kolejnym najbardziej aktywnym inhibitorem była pochodna *para*-metylofenylowa TA2, dla której stwierdzono  $IC_{50} = 9,92 \mu\text{M}$ . Porównywalną aktywność wykazywała pochodna dimetoksylova TA4, choć jak wspomniano wcześniej, była ona ponad dwukrotnie niższa niż w przypadku najskuteczniejszej, niemodyfikowanej struktury -  $IC_{50} = 8,46 \mu\text{M}$ . Również wśród pochodnych tiokarbohydrazonów znaleziono pojedynczy wysoce aktywny inhibitor ureolizy prowadzonej w całych komórkach Gram-dodatnich. Była to również struktura pozbawiona dodatkowych modyfikacji – TB1. W tym przypadku wprowadzanie dodatkowych grup powodowało bardzo znaczne obniżenie skuteczności inhibicji, prowadząc do ponad 10-krotnego wzrostu stężenia niezbędego do 50-procentowego zahamowania ureolizy. Badania prowadzone na komórkach *P. mirabilis* potwierdziły, że pokonanie przez inhibitory ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych stanowi kluczowy problem do rozwiązania podczas projektowania inhibitorów. Wszystkie badane



na tym etapie związki charakteryzowały się słabszą aktywnością względem tego szczepu bakteryjnego niż podczas testów na całych komórkach *S. pasteurii*. W skrajnych przypadkach obserwowano nawet ponad 100-krotne podwyższenie wartości  $IC_{50}$ . Najskuteczniejszymi inhibitorami była tiosemikarbazonowa pochodna metylowa TA2 ( $IC_{50} = 281,8 \mu M$ ) oraz hydroksylowa pochodna tiazolilowa TC4 ( $IC_{50} = 304,4 \mu M$ ). Szczególnie ten ostatni inhibitor wydaje się interesujący jako zdecydowanie najskuteczniejszy spośród związków tiazolilowych zarówno w odniesieniu do oczyszczonego enzymu SPU jak również całych komórek obydwu badanych szczepów bakteryjnych. Warto zaznaczyć, że badane związki charakteryzują się stosunkowo wysoką polarnością, sztywnością i strukturą planarną. Są to właściwości, które promują przechodzenie inhibitorów przez osłony komórkowe bakterii Gram-ujemnych z wykorzystaniem poryn i skuteczniejszą akumulację w cytoplazmie.<sup>95</sup>

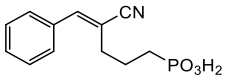
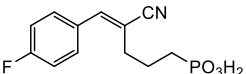
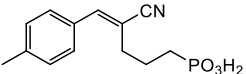
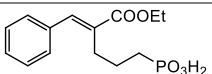
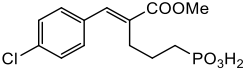
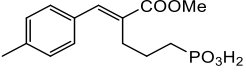
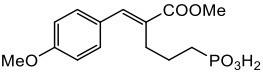
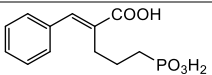
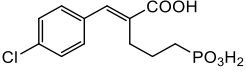
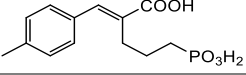
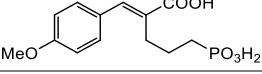
#### 4.2.2. Badania aktywności związków fosfinowych i fosfonowych

##### 4.2.2.1. Aktywność związków fosfonowych opartych na strukturze kwasu cynamonowego, jako inhibitorów ureazy bakteryjnej

Kwas cytrynowy jest słabym inhibitorem ureazy, ale badania krystalograficzne wykazały, że tworzy kompleksową sieć wiązań w centrum aktywnym tego enzymu.<sup>51</sup> Na podstawie tych danych zaproponowano fosforowe pochodne kwasu cynamonowego, jako łączące motywy strukturalne cytrynianu z funkcjonalnością koordynowania jonów niklu w centrum aktywnym. Badania aktywności związków doprowadziły do identyfikacji kilkunastu struktur o umiarkowanej aktywności (Tabela 2.). Wartości  $K_i$  aktywnych inhibitorów należących do tej grupy strukturalnej wobec enzymu SPU mieściły się w przedziale 1-100  $\mu M$ . Za najbardziej interesujące wyniki pracy nad ich aktywnością uznano odnalezione zależności między strukturą związków i zmianami obserwowanymi w ich aktywności. Podobnie jak w przypadku grupy związków zawierających w swej strukturze fragment oparty na tiomoczniku wykazano, że obecność grupy metoksylowej wydaje się ograniczać zdolności do hamowania ureolizy. Jest to interesująca obserwacja, jako że dla niektórych związków stwierdzono niekompetycyjny model inhibicji, podobnie jak dla części struktur bazujących na tiomoczniku. Niespodziewanie, bardzo

wysoką aktywność zanotowano dla pochodnej nitrylowej C1, a zatem takiej, która zawierała zamaskowaną funkcję kwasową. Natomiast związkiem o najwyższym powinowactwie był kwas cynamonowy podstawiony grupą metylową w pozycji *para* (C10,  $K_i = 1,258 \mu\text{M}$ ).

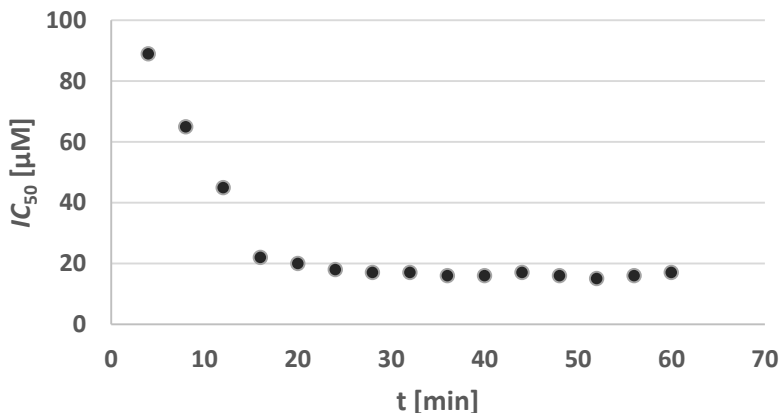
Tabela 2. – Aktywność związków fosfonowych bazujących na szkieletie kwasu cynamonowego jako inhibitorów ureazy oczyszczonej z komórek *S. pasteurii* CCM 2056

Nr	Struktura	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ], SPU	Model inhibicji
C1		$3,071 \pm 0,017$	Kompetycyjny
C2		$19,34 \pm 1,78$	Kompetycyjny
C3		$22,79 \pm 2,30$	Kompetycyjny
C4		$37,99 \pm 2,84$	Kompetycyjny
C5		$61,27 \pm 4,31$	Kompetycyjny
C6		$147,2 \pm 8,5$	Kompetycyjny
C7		$> 1 \text{ mM}$	-
C8		$> 1 \text{ mM}$	-
C9		$64,89 \pm 5,62$	Niekompetycyjny
C10		$1,258 \pm 0,011$	Niekompetycyjny
C11		$7,423 \pm 0,021$	Kompetycyjny

#### 4.2.2.2. Badania zdolności grupy fosfonowych i fosfinowych pochodnych katecholu do hamowania aktywności oczyszczonej ureazy bakteryjnej oraz ureolizy prowadzonej w całych komórkach bakteryjnych

Większość testów prowadzonych z zastosowaniem fosfonowych i fosfinowych inhibitorów ureolizy wykonano z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej pozwalającej śledzić zmiany pH mieszaniny reakcyjnej dzięki zawartości indykatora pH – czerwieni krezolowej. Użyteczność punktowego kolorymetrycznego pomiaru stężenia jonów amonowych metodą indofenolową była znacząco ograniczona przez zaobserwowany fakt interakcji inhibitorów z odczynnikami wykorzystywanymi w tej metodzie pomiarowej, objawiającej się powstawaniem brunatnego zabarwienia po ich dodaniu. Jest prawdopodobne, iż było to spowodowane obecnością w strukturze inhibitora grupy katecholowej, która wchodziła w reakcję podobnie do cząsteczki fenolu. Porównanie krzywych postępu uzyskanych dla różnych stężeń testowanych związków przy stałym stężeniu mocznika doprowadziły do wyznaczenia wartości  $IC_{50}$ . Zaobserwowano, iż wartość ta nie jest stała i szybko maleje wraz z upływem czasu od rozpoczęcia reakcji ureolizy (Rys. 24.). To doprowadziło do wstępnej klasyfikacji tej grupy struktur jako wolnowiązających inhibitorów ureaz. Kolejnym dowodem potwierdzającym ten typ inhibicji był charakterystyczny hiperboliczny kształt krzywych postępu reakcji prowadzonej bez preinkubacji enzymu z inhibitorem. W najbardziej skrajnych przypadkach krzywa postępu reakcji prowadzonej z dodatkiem inhibitora pozostawała równoległa do kontroli pozytywnej (bez dodatku inhibitora) nawet przez 1,5 h od rozpoczęcia eksperymentu rozpoczętego dodatkiem enzymu (bez preinkubacji). Tak długi czas tworzenia kompleksu enzym-inhibitor (EI) okazał się problematyczny, ponieważ wykraczał poza czas, w którym krzywa postępu reakcji niehamowanej zachowuje liniowość. Spowolnienie reakcji nie było spowodowane niedoborem jej substratu w mieszaninie, ponieważ zwiększenie stężenia mocznika nie rozwiązywało problemu. Z tego powodu zastosowano system uwzględniający preinkubację enzymu z inhibitorem przed dodaniem substratu. To umożliwiło zaobserwowanie inhibicji ureazy przez badane struktury

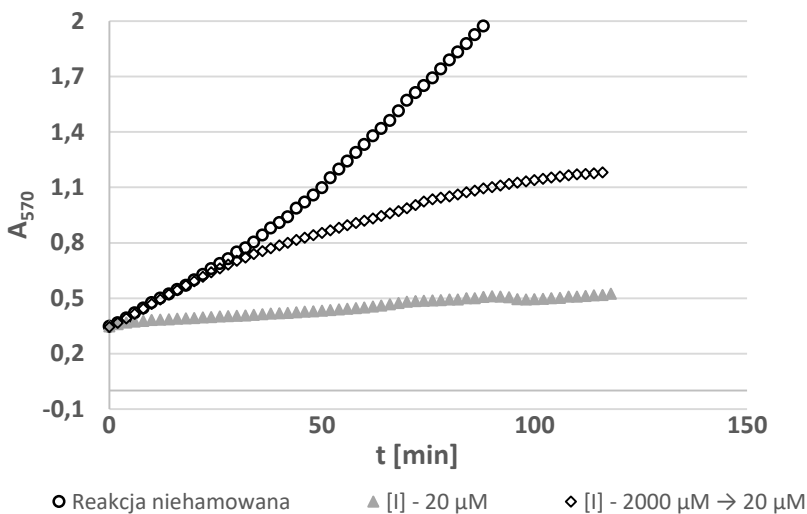
i w konsekwencji wyznaczenie wstępnych wartości  $IC_{50}$  w stanie równowagi.



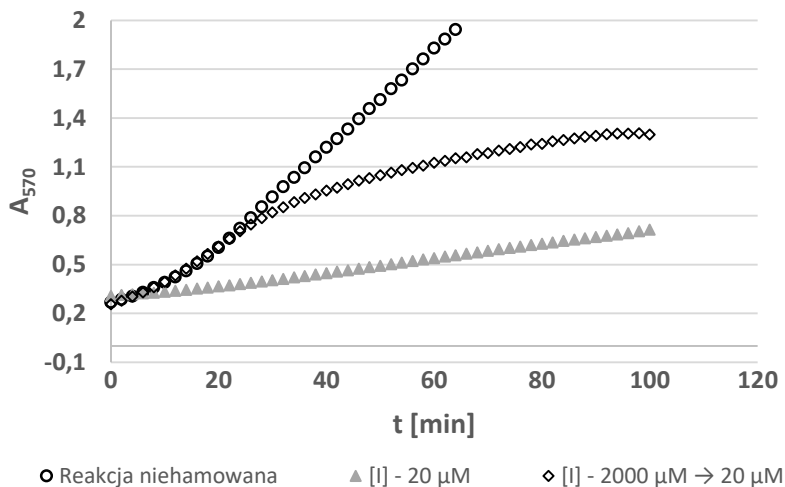
Rys. 24. – Zmiana wartości  $IC_{50}$  w czasie przy zastosowaniu struktury KA1 jako inhibitora ureazy *S. pasteurii* CCM 2056<sup>96</sup>

Krzywe postępu reakcji prowadzonej bez preinkubacji enzymu z inhibitorami miały kształt charakterystyczny dla inhibicji wolnowiążącej. Wyznaczona następnie zależność  $k_{app}$  od stężenia inhibitora również okazała się hiperboliczna, zgodnie z dwuetapowym mechanizmem inhibicji wolnowiążącej. Dla niektórych związków punkt przecięcia tej krzywej z osią Y był bliski punktu zerowego, co sugerowało nieodwracalność inhibicji. Aby potwierdzić te obserwacje przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem nagłego 100-krotnego rozcieńczenia wytworzonego kompleksu enzym-inhibitor (*jump dilution*) by określić szybkość jego degradacji w takich warunkach.

A.

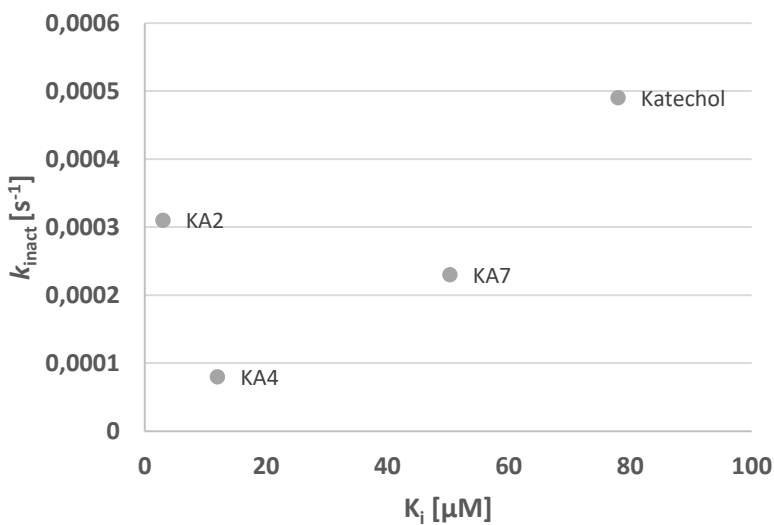
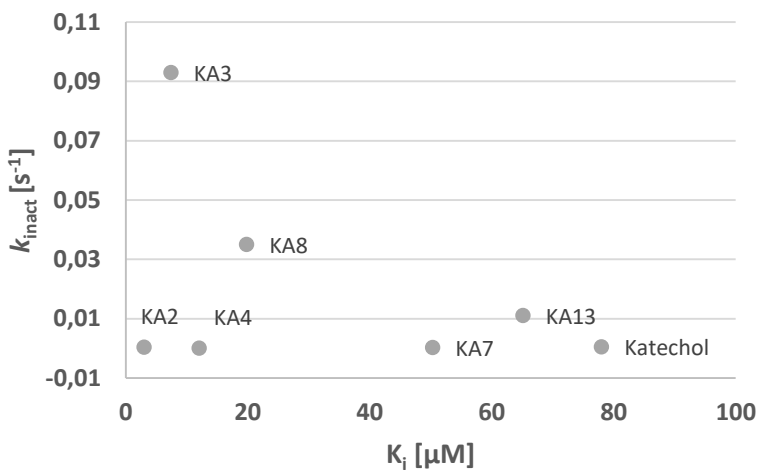


B.



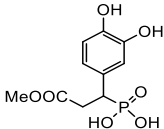
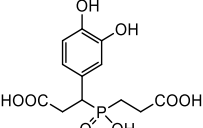
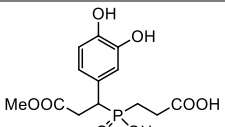
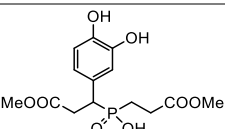
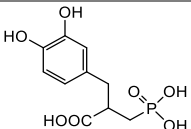
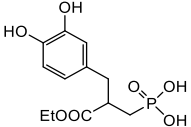
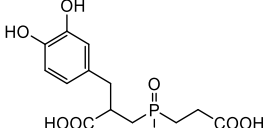
Rys. 25. – Odzyskanie aktywności ureazy *S. pasteurii* CCM 2056 po 100-krotnym rozcieńczeniu kompleksu enzym-inhibitor. Krzywe postępu dla przykładowego inhibitora **A.** nieodwracalnego KA2, **B.** odwracalnego KA6 <sup>96</sup>

Dla związków, w przypadku których krzywa  $k_{app} = f([I])$  przecinała oś Y w punkcie 0 zaobserwowano brak odzyskania aktywności enzymatycznej po rozcieńczeniu. Stanowiło to dodatkowe potwierdzenie nieodwracalności inhibicji (Rys. 25A.). W przypadku inhibitorów odwracalnych obserwowano szybkie odzyskanie aktywności i równoległy przebieg krzywych reakcji hamowanej, niezależnie od tego, czy procedura *jump dilution* była zastosowana (Rys. 25B.). Dodatkowo, eksperymenty polegające na gwałtownym rozcieńczaniu kompleksu enzym-inhibitor pozwoliły określić stabilność wiązania enzymu przez cząsteczkę inhibitora odwracalnego poprzez wyliczenie z otrzymanej krzywej postępu wartości *residence time*. Jest to średni czas trwania wiązania kompleksu enzym-inhibitor. Dla struktur określonych jako inhibitory odwracalne wartość ta mieściła się przeważnie w przedziale 60-500 minut, co świadczy o stosunkowo dużej stabilności wiązania pochodnych katecholowych z cząsteczką ureazy. Aktywność inhibicyjną tych związków opisano przez podanie wartości  $K_i$  (stała dysocjacji kompleksu EI powstałego w pierwszym etapie inhibicji wolnowiążącej) oraz  $K_i^*$  (określająca dalsze zmiany konformacyjne kompleksu enzym-inhibitor). Wartości stałych dysocjacji wielu badanych fosforoorganicznych pochodnych katecholu mieściły się w niskich zakresach mikromolarnych (Tabela 3.). Do określenia aktywności inhibicyjnej struktur nieodwracalnie wiążących ureazę posłużono się wartością  $k_{inact}/K_i$ .  $k_{inact}$  to zaobserwowana stała szybkości inaktywacji enzymu przez badany związek (określająca aktywność inhibitora), zaś  $K_i$  to wartość stałej dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor, która daje informacje o specyficzności wiązania. Wykorzystanie stosunku tych dwóch wartości umożliwiło wskazanie inhibitorów najbardziej aktywnych i zarazem charakteryzujących się specyficznością wobec ureazy (Rys. 26.). Jest to kluczowe w przypadku inhibitorów nieodwracalnych badanych pod kątem użyteczności farmaceutycznej i szczególnie istotne w odniesieniu do pochodnych katecholu, uważanego za związek wysoce reaktywny, a przy tym niespecyficzny. Większość badanych inhibitorów charakteryzowała się znacznie wyższą wartością stosunku  $k_{inact}/K_i$  niż katechol. Dla inhibitora KA3 wykazano  $k_{inact}/K_i$  wynoszące  $10420 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ , co czyni z tego związku niezwykle skuteczny inhibitor ureazy o strukturze opartej na katecholu.

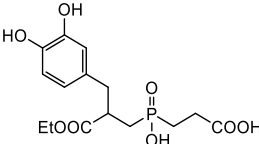
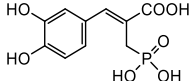
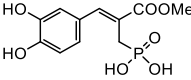
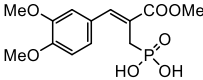
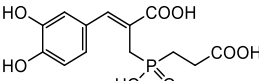
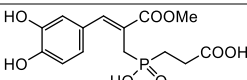



Rys. 26. – Aktywność (określana przez  $k_{\text{inact}}$ ) i specyficzność (określana przez  $K_i$ ) inhibitorów nieodwracalnych. Dolny wykres stanowi rozwinięcie zakresu 0-0,0006 w celu wyraźniejszego przedstawienia związków charakteryzujących się podobną wartością  $k_{\text{inact}}$ <sup>96</sup>

Tabela 3. – Aktywność fosforoorganicznych pochodnych katecholu jako inhibitorów ureazy bakteryjnej *S. pasteurii* CCM 2056 i ureolizy prowadzonej w całych komórkach *P. mirabilis* PCM 543<sup>96</sup>

Nr	Struktura	Oczyszczony enzym SPU		Całe komórki <i>P. mirabilis</i>	
				$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	
		Inh. odwr.	Inh. nieodwr.		
		$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_i^*$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_{inact}/K_i$ [ $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ]	
KA1		0,323	0,126		116,7
		$\pm$	$\pm$		$\pm 9,7$
		0,069	0,012		
KA2				77,03	273,7
				$\pm 14,63$	$\pm$
					15,9
KA3				10420	12,82
				$\pm 920$	$\pm 5,14$
KA4				12,23	97,56
				$\pm$	$\pm 3,90$
				1,32	
KA5		22,52	6,752		40,52
		$\pm$	$\pm$		$\pm 2,76$
		1,87	0,449		
KA6		4,235	0,359		185,7
		$\pm$	$\pm$		$\pm$
		0,513	0,012		7,9
KA7				5,117	260,2
				$\pm$	$\pm$
				0,730	17,3



<b>KA8</b>		1570 ± 120	203,3 ± 14,0	
<b>KA9</b>		2,153 ± 0,080	1,037 ± 0,072	67,24 ± 4,30
<b>KA10</b>		2,145 ± 0,101	0,920 ± 0,083	80,50 ± 5,13
<b>KA11</b>		1,720 ± 0,142	0,586 ± 0,082	70,81 ± 1,87
<b>KA12</b>		2,941 ± 0,340	1,488 ± 0,182	431,2 ± 24,4
<b>KA13</b>			146,7 ± 10,3	374,0 ± 18,7
<b>kat</b>		4,021 ± 0,302	860,1 ± 53,7	

Na podstawie udostępnionych w internetowych bazach danych struktur miejsca aktywnego ureazy pochodzącej ze *S. pasteurii* związanego z cząsteczką katecholu<sup>97</sup>, uznano, że ten fragment strukturalny w badanych związkach odpowiada za nieodwracalną inhibicję aktywności enzymu poprzez kowalencyjne wiązanie kluczowej reszty cysteiny. Ponadto, grupa fosforoorganiczna może koordynacyjnie wiązać katalityczne jony niklu w miejscu aktywnym. Zależnie od struktury liganda jeden z mechanizmów może być dominujący, ewentualnie mieszany tzn. po wstępnej koordynacji do jonów metalu następuje wiązanie kowalencyjne, co rzutuje na złożoność obserwowanej kinetyki. W celu potwierdzenia znaczenia wiązania grupy tiolowej cysteiny przez strukturę katecholu, wykonano badania kinetyki enzymatycznej z dodatkiem czynnika protekcyjnego – ditiotreitolu (DTT). W próbach, w których enzym był preinkubowany z ditiotreiolem przed dodatkiem inhibitora, zaobserwowano znaczny spadek inhibicji dla wszystkich badanych związków (Tabela 4.) oprócz struktury,

w której obydwie grupy hydroksylowe reszty katecholowej pozostały metylowane (inhibitor KA11). W tym przypadku obserwowany efekt inhibicji ureolizy prawdopodobnie pochodzi niemal wyłącznie z właściwości grupy fosforoorganicznej, stąd niewielki ochronny wpływ dodatku ditioneitolu. Przeprowadzono również badania mające na celu stwierdzenie, czy ditioneitol jest zdolny do dysocjacji już utworzonego w wyniku preinkubacji kompleksu ureazy związanej kowalencyjnie z inhibitorami poprzez strukturę katecholową. W tym celu prowadzono reakcję ureolizy po poprzedniej preinkubacji enzymu z inhibitorem, wystarczająco dłużej by utworzył się kompleks. Zaobserwowano, iż w takich warunkach dodatek DTT doprowadził tylko do częściowego odzyskania aktywności enzymatycznej ureazy, maksymalnie do 55%, względem niehamowanej kontroli. Ponownie nie stwierdzono wysokiego wpływu DTT na aktywność związku zawierającego grupy metoksyłowe.

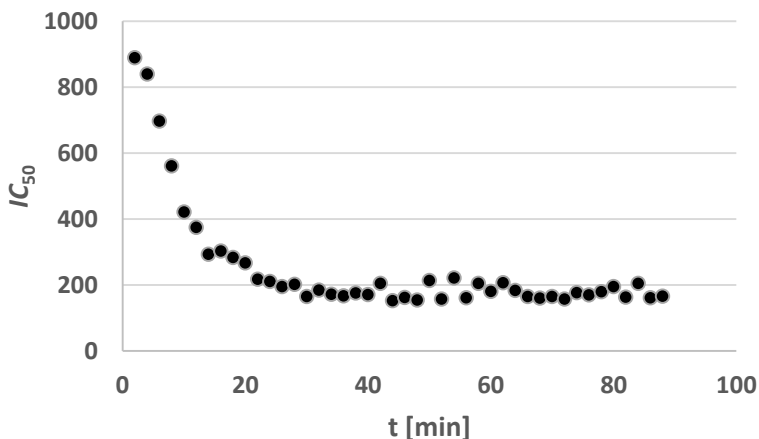
Aby dodatkowo zweryfikować skuteczność badanych związków jako inhibitorów ureolizy w komórkach mikroorganizmów patogennych w warunkach *in vitro*, wykorzystano ureolityczne komórki *P. mirabilis*. Badane związki okazały się aktywne również wobec całych komórek bakteryjnych wykazując mikromolarne wartości  $IC_{50}$ . Struktura KA3, wcześniej zidentyfikowana jako najbardziej efektywny inhibitor nieodwracalny (wartość  $k_{inact}/K_i = 10420 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) była również najskuteczniejsza w hamowaniu ureolizy prowadzonej przez całe komórki *P. mirabilis*. W tym przypadku wartość  $IC_{50}$  wynosiła 12,8  $\mu\text{M}$ . Pozostałe inhibitory nieodwracalne również były aktywne wobec całych komórek ureolitycznych, wykazując  $IC_{50}$  w przedziale 100 – 300  $\mu\text{M}$ . Konieczność zastosowania wyższych stężeń w badaniach z wykorzystaniem całych komórek mogła wynikać z trudności w przeniknięciu osłon komórkowych bakterii przez złożone struktury inhibitorów. Warto zaznaczyć, że badano wpływ związków na ureolizę bakterii Gram-ujemnych, których ściana komórkowa jest powszechnie uznawana za trudniejszą do penetracji przez większość farmaceutyków.

Tabela 4. – Wpływ DTT na aktywność fosforoorganicznych pochodnych katecholu (protekcja – inhibitor preinkubowany z DTT, reaktywacja – dodatek DTT po 30 minutach od rozpoczęcia hamowanej reakcji enzymatycznej) <sup>96</sup>

Nr	Zachowana aktywność enzymu podczas protekcji DTT [%]	Odzyskana aktywność enzymu po reaktywacji DTT [%]
KA1	85 ± 4	36 ± 4
KA2	100 ± 2	42 ± 2
KA3	100 ± 4	37 ± 3
KA4	97 ± 6	43 ± 7
KA5	95 ± 6	34 ± 2
KA6	90 ± 3	20 ± 2
KA7	100 ± 3	51 ± 6
KA8	93 ± 4	55 ± 3
KA9	100 ± 6	17 ± 3
KA10	100 ± 4	26 ± 5
KA11	38 ± 2	16 ± 1
KA12	94 ± 5	38 ± 2
KA13	100 ± 4	47 ± 4
kat	100 ± 3	55 ± 6

Do badań włączono kolejne fosfonowe i fosfinowe pochodne katecholi, będące izomerami strukturalnymi związków KA1-4. Zamierzano ocenić zależność aktywności regioizomerów różniących się rozmieszczeniem grup funkcyjnych. Aby to osiągnąć, zostały zaprojektowane związki bardzo zbliżone do siebie budową, aby ułatwić odnalezienie przyczyn ewentualnych różnic w aktywności związków. W pierwszej kolejności badano aktywność związków względem ureazy oczyszczonej z komórek *S. pasteurii*. Właściwością niektórych inhibitorów z tej grupy, którą należało uwzględnić przy prowadzeniu testów, była ograniczona stabilność. Problem dotyczył głównie estrów metylowych. Związki te charakteryzowała pełna stabilność przez 2-3 dni w roztworach metanolowych, natomiast jakikolwiek dodatek wody powodował częściową hydrolizę. W związku z tym roztwory wyjściowe sporządzono jako wysoce stężone (> 50 mM) w metanolu. Rozcieńczenia tych inhibitorów w buforze do testów kinetycznych przygotowywano na bieżąco i wykorzystywano tego samego dnia. Badania aktywności wszystkich związków prowadzono zarówno w systemie niepreinkubowanym, jak również z uwzględnieniem godzinnej preinkubacji enzymu z danym inhibitorem. Wyliczona wartość  $K_i$  była niższa przy przeprowadzeniu preinkubacji dla większości badanych związków katecholowych (Tabela 5.). Było to

powiązane również ze spadkiem wartości  $IC_{50}$  w miarę trwania reakcji hamowanej (Rys. 27.).

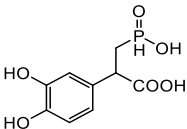
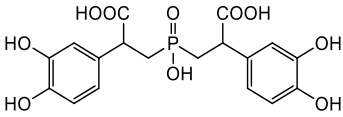
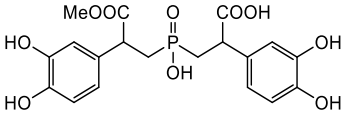
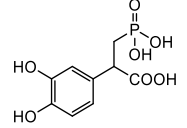


Rys. 27. – Zmiana wartości  $IC_{50}$  w czasie reakcji enzymatycznej w systemie bez preinkubacji z zastosowaniem inhibitora KB4

Najsukuteczniejszym spośród testowanych inhibitorów okazała się pochodna KB4, z wolną grupą fosfonianową oraz grupą karboksylową w rozgałęzieniu dwuwęglowego łańcucha alifatycznego między wspomnianą grupą a strukturą katecholu. Wartość  $K_i$  po preinkubacji enzymu z tym inhibitorem wyniosła  $2,36 \mu\text{M}$ . Był to zarazem związek, dla którego zaobserwowano najbardziej znaczące, ponad 100-krotne, obniżenie tej wartości w porównaniu z systemem bez preinkubacji. Przyłączenie struktury karboksyetylowej obniżyło nieznacznie zdolność takiego fosfinianu do hamowania enzymu (inhibitor KB7,  $K_i = 6,13 \mu\text{M}$ ). Podobną aktywność ( $K_i = 6,80 \mu\text{M}$ ) zarejestrowano w przypadku zastosowania symetrycznie podstawionej struktury fosfinowej KB2, bazującej na najbardziej aktywnym związku. Obecność grupy H-fosfinowej prowadziła do wzrostu stałej dysocjacji do wartości  $58,80 \mu\text{M}$  (struktura KB1). Metylowanie grupy karboksylowej również osłabiło zdolność do inhibicji zarówno związku KB6 ( $K_i = 78,03 \mu\text{M}$ ) jak i związku KB8 ( $K_i = 228,2 \mu\text{M}$ ). Dla tego ostatniego osiągnięto najwyższą w tej grupie wartość w systemie preinkubowanym. Co ciekawe, wartość stałej dysocjacji dla tej struktury bez preinkubacji

z enzymem była porównywalna z innymi związkami w grupie. Może to sugerować nietrwałe wiązanie się inhibitora do miejsca aktywnego ureazy bakteryjnej, co w konsekwencji prowadzi do stosunkowo łatwego zerwania oddziaływań prowadzących do utworzenia kompleksu biokatalizatora z badanym związkiem. Metylowanie grupy karboksylowej wydaje się zatem mieć negatywny wpływ na funkcjonowanie mechanizmu, który wymaga wydłużonego czasu kontaktu ureazy z inhibitorem. Uzyskana jako produkt uboczny pochodna bromowa wykazała przeciętną wartość stałej dysocjacji, równą 34,82  $\mu\text{M}$  (inhibitor KB5). Całkowite usunięcie grupy karboksylowej umożliwiło uzyskanie stosunkowo wysokiej aktywności (KB9,  $K_i = 9,112 \mu\text{M}$ ), choć w dalszym ciągu nie tak obiecującej, jak dla pochodnej KB4.

Tabela 5. – Aktywność grupy fosfonowych i fosfinowych pochodnych katecholu jako inhibitorów ureazy otrzymanej z komórek *S. pasteurii* CCM 2056 oraz ureolizy prowadzonej w całych komórkach *H. pylori* Tx30a

Nr	Struktura	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ], SPU		$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
		Bez preink	Z preink	H. p.
KB1		79,28 $\pm 4,90$	58,80 $\pm 5,2$	10,52 $\pm 0,54$
KB2		16,01 $\pm 0,47$	6,800 $\pm 0,869$	13,12 $\pm 0,53$
KB3		223,0 $\pm 26,3$	7,547 $\pm 0,670$	105,5 $\pm 6,5$
KB4		400,2 $\pm 38,0$	2,361 $\pm 0,202$	0,754 $\pm 0,020$

<b>KB5</b>		41,87 ± 4,52	34,82 ± 3,61	50,27 ± 1,12
<b>KB6</b>		107,0 ± 11,4	78,03 ± 5,51	31,40 ± 1,76
<b>KB7</b>		297,9 ± 26,2	6,130 ± 0,333	9,281 ± 0,973
<b>KB8</b>		295,0 ± 13,4	228,2 ± 24,0	441,6 ± 65,0
<b>KB9</b>		17,71 ± 2,78	9,112 ± 1,807	26,61 ± 0,56

Przeprowadzono również badania z dodatkiem DTT w celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących mechanizmu wiązania ureazy przez testowane związki. Dodatek tego czynnika protekcyjnego już przed rozpoczęciem reakcji w większości przypadków pozwalał na osiągnięcie stuprocentowej aktywności enzymu, co oznacza całkowitą nieskuteczność inhibitora (Tabela 6.). Stanowi to potwierdzenie wolnowiążącego mechanizmu funkcjonowania tych związków. Godnym odnotowania wyjątkiem była bromopochodna KB5. Przy zastosowaniu tego inhibitora ureolizy dodatek ditiotretitolu w eksperymencie protekcyjnym (DTT dodane przed rozpoczęciem reakcji) umożliwił odzyskanie zaledwie 16,3% aktywności enzymatycznej. Ewidentną przyczyną jest zaburzenie reaktywności katecholu w wyniku bromowania. Znacznie słabsze efekty dla wielu związków przyniosło zastosowanie DTT jako reaktywatora enzymu, po upływie 1 godziny od rozpoczęcia reakcji hamowanej. Bromopochodna i estry metylowe nie straciły zdolności do inhibicji po dodaniu tego odczynnika. Wyjątkiem była struktura KB3, dla której stwierdzono całkowite

odzyskanie aktywności enzymu po dodaniu ditiotreitolu. Podobnie nietrwałe okazało się wiązanie miejsca aktywnego SPU przez jedną badaną pochodną H-fosfinową KB1. Dla najskuteczniejszego spośród badanych inhibitorów (KB4) stwierdzono przeciętny wpływ dodatku DTT do mieszaniny reakcyjnej. Odczynnik dodany po upływie godziny od startu reakcji hamowanej umożliwił odzyskanie 42,9% aktywności ureolitycznej.

Tabela 6. – Wpływ czynnika protekcyjnego grup tiolowych na aktywność fosfonowych i fosfinowych pochodnych katecholu (protekcja – inhibitor preinkubowany z DTT, reaktywacja – dodatek DTT po 60 minutach od rozpoczęcia hamowanej reakcji enzymatycznej)

Związek	Zachowana aktywność enzymu przy protekcji DTT [%]	Odzyskana aktywność enzymu przy reaktywacji DTT [%]
KB1	100	100
KB2	100	54,9 ± 2,2
KB3	100	100
KB4	100	42,9 ± 4,0
KB5	16,3 ± 0,4	0
KB6	96,2 ± 5,2	0
KB7	100	83,6 ± 3,8
KB8	96,8 ± 6,1	0
KB9	49,3 ± 5,4	0

Dla czterech fosfonowych inhibitorów ureazy uznanych za najciekawsze przeprowadzone zostało modelowanie molekularne wiązania z ureazą pochodzącą ze szczepu *S. pasteurii* (wykonane przez prof. dr. hab. inż. Łukasza Berlickiego z Katedry Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej). Założono, że we wszystkich przypadkach obserwuje się kowalencyjne wiązanie grupy tiolowej kluczowej reszty Cys322 przez strukturalny fragment katecholowy badanych inhibitorów. Potwierdzono, że zastosowanie najskuteczniejszego w tej grupie inhibitora ureolizy KB4 ( $K_i = 2,36 \mu\text{M}$ ) prowadzi do utworzenia największej liczby oddziaływań z resztami aminokwasowymi, co prowadzi do optymalnego umiejscowienia związku w centrum aktywnym biokatalizatora. Oprócz spodziewanego koordynowania katalitycznych kationów  $\text{Ni}^{2+}$  atomy tlenu grupy fosfonowej brały również udział w tworzeniu wiązania wodorowego z resztą His222.

Atomy tlenu grupy karboksylowej oddziaływały z resztami Arg339 oraz His323. Jedna z grup hydroksylowych fragmentu katecholowego tworzyła specyficzne wiązanie wodorowe z grupą karbonylową reszty Lys169. Wszystkie pozostałe inhibitory, dla których przeprowadzono podobne modelowanie cechowała utrata możliwości utworzenia części opisanych oddziaływań i trwalszego kompleksu z cząsteczką ureazy. W przypadku analogu H-fosfinowego (KB1) stwierdzono brak wiązań wodorowych tworzonych przez fosforylowy atom tlenu z His222. To prowadziło do zmiany położenia cząsteczki i utraty lub osłabienia wiązań tworzonych przez atomy grupy karboksylowej. Co oczywiste, usunięcie grupy karboksylowej (KB9) doprowadziło do utraty wszystkich specyficznych dla niej oddziaływań przy zachowaniu konformacji charakterystycznej dla optymalnego wiązania. Rozbudowa fragmentem karboksyetylowym (KB7) doprowadziła do zaniku większości wiązań wodorowych z resztami histydyn. Obie grupy karboksylowe silnie jednak oddziaływały z Arg339. Wiązania koordynacyjne z jonami niklu również zostały zachowane. To jest prawdopodobne wyjaśnienie stosunkowo niewielkiego spadku aktywności w odniesieniu do struktury określonej jako optymalna.

Na koniec dla opisanych związków wyznaczono wartości  $IC_{50}$  hamowania ureolizy prowadzonej przez całe komórki *H. pylori*. Badania prowadzono z wykorzystaniem szczepu Tx30a – mutanta charakteryzującego się brakiem możliwości syntezy toksyny wakuolizującej, co umożliwia znaczne obniżenie patogenności bakterii i minimalizację ryzyka związanego z badaniami prowadzonymi na żywych komórkach. Szczep został wyselekcjonowany na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych przez zespół prof. Grażyny Gościński z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Wykazały one, iż zmiany wprowadzone w genomie bakterii, oprócz zwiększenia bezpieczeństwa pracy badawczej, znacznie zwiększają również żywotność szczepu po wprowadzeniu ich do atmosfery tlenowej.<sup>98</sup> Znacznie ułatwiło to sprawdzanie aktywności inhibitorów, ponieważ wyposażenie laboratorium, w którym prowadzono badania nie umożliwiało spektrofotometrycznego monitorowania kinetyki rozkładu mocznika w warunkach mikroaerofilnych. Wolnowiązący mechanizm działania inhibitorów był w tych badaniach podstawowym problemem. Mimo że



modyfikacje genetyczne szczepu Tx30a bardzo przedłużyły żywotność komórek w atmosferze tlenowej, przeprowadzenie reakcji w tradycyjnym systemie zakładającym 1-godziną preinkubację biokatalizatora z inhibitorem uznano za niemożliwe do przeprowadzenia. Ograniczono się zatem do przetestowania związków korzystając z systemu nieuwzględniającego preinkubacji. Wzajemne relacje aktywności większości badanych związków okazały się bardzo zbliżone do wyników uzyskanych na oczyszczonym enzymie SPU. Te same związki były trzema najskuteczniejszymi inhibitorami ureolizy (KB4, KB7 oraz KB2 z wartościami  $IC_{50}$  wynoszącymi odpowiednio: 0,75  $\mu\text{M}$ , 9,28  $\mu\text{M}$  oraz 13,12  $\mu\text{M}$ ). Korelację potwierdzono w przypadku dwóch najsłabszych inhibitorów w grupie. Były to pochodne metylowe KB3 i KB8 z wartościami  $IC_{50}$  wynoszącymi 105,5  $\mu\text{M}$  oraz 441,6  $\mu\text{M}$ . Pochodna KB1, zawierająca grupę fosfinową okazała się stosunkowo skuteczna wobec całych komórek, osiągając  $IC_{50} = 10,52 \mu\text{M}$ . Należy podkreślić, że stężenia związków wymagane do osiągnięcia wysokiej skutecznej inhibicji ureolizy w całych komórkach *H. pylori* były znacznie niższe niż do inhibicji oczyszczonego enzymu SPU. Przy zastosowaniu stężeń wyższych niż 500  $\mu\text{M}$  zauważono znaczny wzrost pH prowadzący nawet do przekroczenia wartości osiągniętej przy niehamowanej kontroli aktywności ureolitycznej. Był to prawdopodobnie symptom uszkodzenia osłon komórkowych przez nadmiernie wysokie stężenie inhibitorów. To z kolei prowadziło do niekontrolowanego wypłynięcia ich cytoplazmy do mieszaniny reakcyjnej, co może mieć wpływ na jej wartość pH.

#### 4.2.3. Badania aktywności związków selenoorganicznych

##### 4.2.3.1. Badania zdolności grupy związków selenoorganicznych o łańcuchach alifatycznych do hamowania aktywności SPU

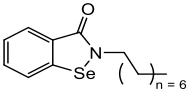
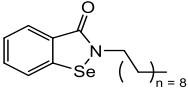
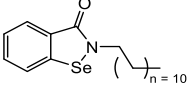
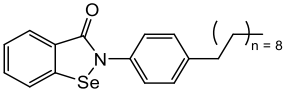
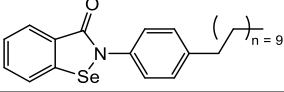
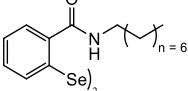
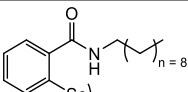
Badania przesiewowe grupy związków selenoorganicznych na wzorcowej ureazie z komórek *S. pasteurii* przeprowadziła dr inż. Katarzyna Macegoniuk z Katedry Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej.<sup>83</sup> Autorka wykazała, że związki funkcjonowały zgodnie z mechanizmem inhibicji wolnowiążącej. W tym przypadku czas niezbędny do utworzenia kompleksu enzymu z inhibitorami był jednak znacznie krótszy niż w przypadku fosforoorganicznych pochodnych katecholu badanych w niniejszej pracy i wynosił zwykle najwyżej 30

minut. Dzięki temu możliwe było uzyskanie pełnych hiperbolicznych krzywych postępu reakcji hamowanej przez badane związki w ramach pojedynczego pomiaru kinetyki enzymatycznej. Wykazano, iż badane związki należą do najskuteczniejszych znanych w literaturze inhibitorów ureazy, aktywnych nawet w stężeniach pikomolarnych. W porównaniu z niemodyfikowanym ebselenem stanowiącym strukturę wiodącą, niemal wszystkie pochodne N-alkilowe wykazywały 20-30 krotnie niższą aktywność hamującą wobec oczyszczonej ureazy bakteryjnej. Najskuteczniejszą wśród nich okazała się struktura zawierająca podstawnik N-heksylowy, dla której wyznaczono  $K_i$  wynoszące około 15 nM. Obecność atomu siarki w miejscu tlenu w strukturze benzisoselenazonu spowodowało znaczące (o 1-2 rzędy wielkości) obniżenie aktywności hamującej w przypadku tak modyfikowanego ebselenu oraz wszystkich jego pochodnych N-alkilowych. Wśród tych związków również najbardziej aktywna okazała się struktura zawierająca resztę *n*-heksylową, choć wyznaczona dla niej wartość  $K_i$  także była ponad 20-krotnie wyższa niż w przypadku analogu zawierającego atom tlenu zamiast siarki.

Pomimo umiarkowanej aktywności benzisoselenazonów N-podstawionych krótkimi homologami alkilowymi, w ramach niniejszej pracy zdecydowano się zbadać aktywność 10 związków zawierających długie nierozgałęzione łańcuchy alifatyczne (powyżej 6 atomów węgla). Struktury zaprojektowano z myślą o zwiększeniu możliwości przenikania przez hydrofobowe osłony komórkowe patogennych mikroorganizmów ureolitycznych. Dodatkowo, osiągnięta w ten sposób permeabilizacja może doprowadzić do bardzo korzystnego działania synergistycznego z antybiotykami. To z kolei umożliwiłoby znaczne zmniejszenie dawki leku niezbędnej do całkowitego zwalczania infekcji. Wstępną fazą badań było sprawdzenie aktywności związków jako inhibitorów oczyszczonego wzorcowego enzymu bakteryjnego SPU (Tabela 7.). Wydłużenie łańcucha alifatycznego miało zdecydowanie negatywny wpływ na zdolność do hamowania ureolizy. Najlepszym inhibitorem okazała się struktura SD1 zawierająca łańcuch *n*-oktylowy. Wartość  $K_i$  wynosiła 127,5 nM. Wydłużenie łańcucha alifatycznego o 2 atomy węgla prowadziło do  $K_i = 302,0$  nM (SD2). Dodanie dalszych dwóch atomów podwyższyło tę wartość niemal dwukrotnie (572,45 nM, związek SD3). W przypadku analogicznych struktur diselenidowych

związek SD6, o łańcuchu *n*-oktylowym charakteryzowała wartość  $K_i = 572,47$  nM. Podstawienie łańcuchem o długości 10 atomów węgla (SD7) podwyższało stałą dysocjacji do 1197,50 nM. Pochodna diselenidowa SD8 o łańcuchu *n*-dodecyłowym wymagała zastosowania stężenia powyżej 5  $\mu$ M. Pochodne ebselenu, w których łańcuch alifatyczny przyłączony był do pierścienia N-fenyłowego w pozycji *para*, okazały się mniej aktywnymi inhibitorami ureolizy. Niezależnie od długości łańcucha węglowodorowego wymagały one stężeń powyżej 5  $\mu$ M (także analogi diselenidowe), aby doprowadzić do znaczącego zahamowania aktywności enzymu.

Tabela 7. - Aktywność grupy związków selenoorganicznych zawierających długie łańcuchy alkilowe jako inhibitorów ureazy z komórek *S. pasteurii* CCM 2056

Nr	Struktura	$K_i$ [ $\mu$ M], SPU
SD1		$127,5 \pm 12,4$
SD2		$302,0 \pm 28,7$
SD3		$572,5 \pm 66,2$
SD4		Nieaktywne poniżej 5000 nM
SD5		Nieaktywne poniżej 5000 nM
SD6		$572,5 \pm 36,9$
SD7		$1198 \pm 53$

<b>SD8</b>		Nieaktywne poniżej 5000 nM
<b>SD9</b>		Nieaktywne poniżej 5000 nM
<b>SD10</b>		Nieaktywne poniżej 5000 nM

Badania związków o długich łańcuchach węglowodorowych pozwoliły zaobserwować wyraźne zależności między ich budową a aktywnością hamującą. Pogarszała się ona ze wzrostem długości N-podstawnika, niezależnie od tego czy był on alkilowy czy aryloalkilowy. Podobnie negatywny efekt miało rozbudowanie związków poprzez utworzenie struktur diselenidowych. Te obserwacje prowadziły do sformułowania hipotezy zakładającej, że mniejsze struktury selenoorganiczne wykazują większą komplementarność strukturalną do centrum katalicznego enzymu, co ułatwia reakcję z grupą tiolową reszt cysteiny. Aby to potwierdzić, przeprowadzono badania wpływu protekcji i reaktywacji SPU przez dodatek ditiotreitolu (czynnik utrzymujący grupy tiolowe w stanie zredukowanym) do mieszaniny reakcyjnej. Prowadzono je na 6 związkach N-alkilowych dodanych do mieszaniny w stężeniu pozwalającym na całkowite zahamowanie aktywności enzymu. We wszystkich strukturach benzisoselenazolonych zaobserwowano odzyskanie 75-80% aktywności enzymu w porównaniu z kontrolą inhibicji bez dodatku DTT (Tabela 8.). W związkach diselenidowych dodatek czynnika protekcyjnego dla grup tiolowych prowadził do całkowitego odzyskania zdolności do katalizowania hydrolizy mocznika. Osiągnięcie trwalszego wiązania enzymu z inhibitorem w eksperymencie reaktywacyjnym zaowocowało znacznie słabszym wpływem czynnika reaktywacyjnego. Dla najskuteczniejszego związku (SD1) obserwowano odzyskanie jedynie 28,8% aktywności enzymatycznej po dodaniu DTT po utworzeniu kompleksu enzym-inhibitor. W przypadku związków

zawierających dłuższy łańcuch alkilowy wprowadzenie DTT po ustabilizowaniu inhibicji umożliwiło odzyskanie 65-70% aktywności. Podobny trend zaobserwowano w strukturach diselenidowych – odzyskanie odpowiednio 24,7%, 34,0% i 66,4% dla związków SD6, 7 i 8. Stanowi to dodatkowe potwierdzenie wolnowiążącego mechanizmu funkcjonowania pochodnych selenoorganicznych jako inhibitorów ureazy. Ponadto dowiedziono, że ograniczenie rozbudowy strukturalnej liganda pozwala na utworzenie znacznie trwalszego kompleksu enzym-inhibitor.

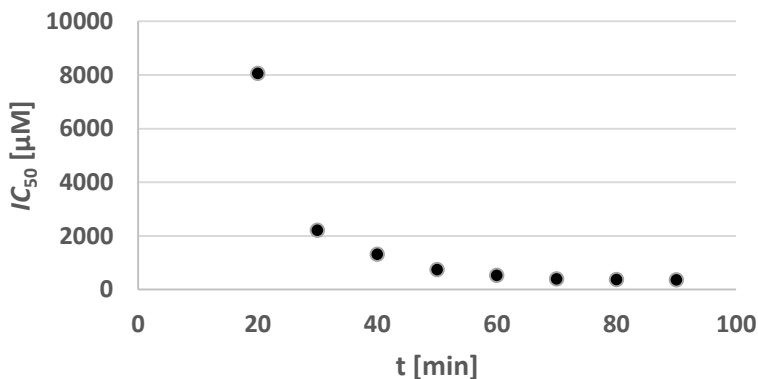
Tabela 8. – Wpływ czynnika protekcyjnego grup tiolowych na aktywność długołańcuchowych pochodnych benzisoselenazonów (protekcja – inhibitor preinkubowany z DTT, reaktywacja – dodatek DTT po 30 minutach od rozpoczęcia hamowanej reakcji enzymatycznej)

Związek	Zachowana aktywność enzymu przy protekcji DTT [%]	Odzyskana aktywność enzymu przy reaktywacji DTT [%]
SD1	80,7 ± 2,8	28,8 ± 1,3
SD2	74,9 ± 3,8	65,7 ± 5,1
SD3	76,2 ± 6,0	71,8 ± 3,4
SD6	100	24,7 ± 0,4
SD7	100	34,0 ± 2,0
SD8	100	66,4 ± 3,7

#### 4.2.3.2. Badania aktywności grupy chiralnych związków selenoorganicznych jako inhibitorów SPU

Kolejna grupa 28 związków selenoorganicznych przetestowanych wobec ureazy oczyszczonej z komórek *S. pasteurii* zawierała zarówno pochodne benzisoselenazonu, jak i odpowiadające im struktury diselenidowe. N-Podstawnikami były stereomerycznie zdefiniowane fragmenty alkilowe, cykloalkilowe, aryloalkilowe itp, charakteryzujące się obecnością przynajmniej jednego stereogenicznego atomu węgla. Oceniono w ten sposób wpływ konfiguracji oraz rozgałęzienia/rozbudowy struktury na oddziaływania z docelowym enzymem. Tak jak w przypadku pochodnych katecholu, zaobserwowano mechanizm funkcjonowania sugerujący inhibicję wolnowiązącą. W badaniach na oczyszczonym enzymie obliczona wartość  $IC_{50}$  zwykle

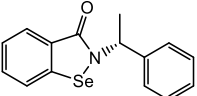
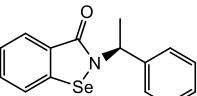
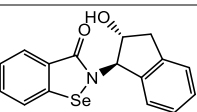
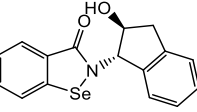
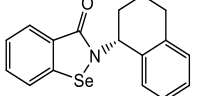
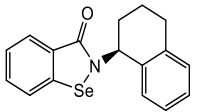
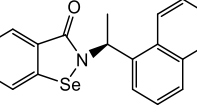
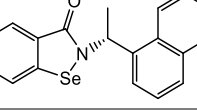
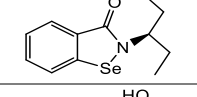
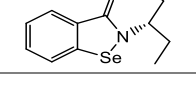
ulegała stabilizacji po upłygnięciu 1-1,5 godziny w systemie niepreinkubowanym (Rys. 28).

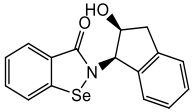
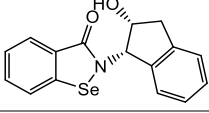
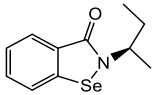
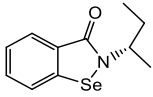
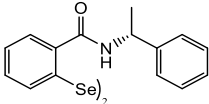
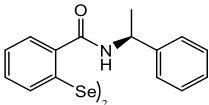
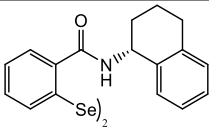
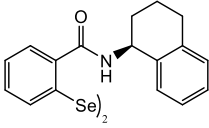
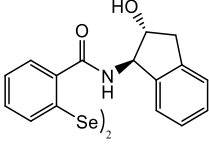
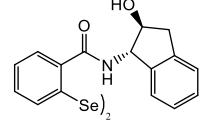


Rys. 28. – Zmiana wartości  $IC_{50}$  w czasie dla inhibitora SC3 w systemie bez preinkubacji enzymu SPU z inhibitorem

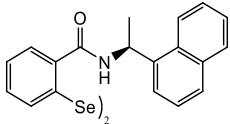
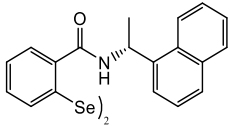
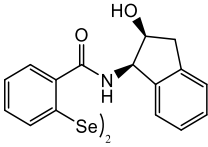
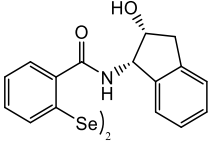
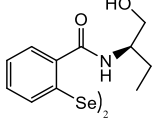
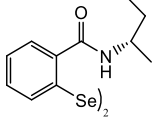
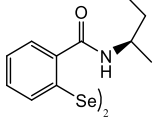
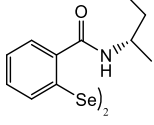
Najbardziej aktywną spośród badanych pochodnych była struktura SC8 zawierająca podstawnik (*R*)-1-naftyloetylowy (Tabela 9.). Wartość  $K_i$  dla tego związku wyniosła 8,59 nM. Nieznacznie słabszym inhibitorem był jego monopierścieniowy analog o przeciwnej konfiguracji: (*S*)-1-fenyletylowy (SC2,  $K_i = 10,10$  nM). W przypadku obu tych najlepszych związków ich enancjomery (SC7, SC1) były 3-4-krotnie słabsze. Analogiczne struktury diselenidowe nie podzieliły wysokiej aktywności – niezależnie od konfiguracji absolutnej, żadna z nich nie działała w stężeniach niższych niż 5 µM. Kilkakrotnie mniej aktywne były pochodne zawierające resztę hydroksyindanu. Te struktury zawierały dwa centra stereogeniczne, lecz nie miały one znaczącego wpływu na wartość  $K_i$  względem SPU, która mieściła się w przedziale 40-50 nM. Diselenidowe analogi tych związków również okazały się znacznie mniej aktywne, lecz w tym przypadku konfiguracja absolutna stereogenicznych atomów węgla odgrywała istotniejszą rolę. Diselenid o konfiguracji *R,R* (SC19) był wyraźnie skuteczniejszym inhibitorem ureolizy ( $K_i = 250,65$  nM) niż jego enancjomer (SC20,  $K_i = 376,97$  nM). Natomiast stała dysocjacji kompleksu EI dla diastereoizomerów *R,Si*, *S,R* wynosiła ponad 1 µM.

Tabela 9. – Aktywność grupy chiralnych związków selenoorganicznych jako inhibitorów ureazy z komórek *S. pasteurii* CCM 2056

Nr	Struktura	K <sub>i</sub> [μM], SPU
SC1		31.33 ± 0.06
SC2		10.10 ± 0.85
SC3		38.33 ± 3.43
SC4		41.77 ± 3.00
SC5		208.1 ± 3.5
SC6		186.5 ± 15.2
SC7		43.72 ± 4.10
SC8		8.59 ± 1.22
SC9		99.58 ± 11.66
SC10		79,55 ± 4,32

<b>SC11</b>		50,28 ± 1,33
<b>SC12</b>		47,43 ± 4,03
<b>SC13</b>		84,11 ± 7,17
<b>SC14</b>		47,51 ± 2,76
<b>SC15</b>		Nieaktywne poniżej 5000 nM
<b>SC16</b>		Nieaktywne poniżej 5000 nM
<b>SC17</b>		211,6 ± 15,6
<b>SC18</b>		114,5 ± 1,8
<b>SC19</b>		250,7 ± 7,9
<b>SC20</b>		377,0 ± 23,7



<b>SC21</b>		Nieaktywne poniżej 5000 nM
<b>SC22</b>		Nieaktywne poniżej 5000 nM
<b>SC23</b>		1182 ± 165
<b>SC24</b>		2099 ± 211
<b>SC25</b>		322,3 ± 23,8
<b>SC26</b>		198,6 ± 15,8
<b>SC27</b>		91,00 ± 1,22
<b>SC28</b>		338,3 ± 32,0

#### 4.2.3.3. Aktywność inhibitorowa N-podstawionych benzisoselenazol-3(2*H*)-onów

W ramach projektu koordynowanego przez dr Macegoniuk przetestowano kilkadziesiąt dalszych związków będących głównie N-arylowymi i N-aryloalkilowymi pochodnymi benzisoselenazonu oraz analogicznego diselenidu (otwarta struktura dimeryczna). Związki te charakteryzowały się znacznie wyższą skutecznością niż analogi N-alkilowe lub N-cykloalkilowe (Tabela 10.). Pojedyncza modyfikacja pierścienia aromatycznego w pozycji *orto* lub *meta* nie zaowocowała jednak znaczącym zwiększeniem aktywności inhibicyjnej w porównaniu z niemodyfikowanym ebselenem. W przypadku najlepszej z tych struktur (SF8) uzyskano dwukrotne obniżenie stałej dysocjacji. Podstawienie atomem fluoru w obu tych pozycjach lub grupą metoksyłową w pozycji *meta* doprowadziły do uzyskania struktur o aktywności wyższej niż w przypadku ebselenu. Podstawienie grupą trifluorometylową w pozycji *para* zaowocowało osiągnięciem  $K_i = 36,3$  pM, co czyni strukturę SF21 najskuteczniejszym inhibitorem spośród monopodstawionych pochodnych ebselenu. Inne podstawniki w tej samej pozycji prowadziły do znacznego obniżenia aktywności względem enzymu. Kolejną badaną podgrupę stanowiły pochodne ebselenu zawierające dwa podstawniki w pierścieniu N-fenyłowym. Były to inhibitory ureolizy o aktywności porównywalnej z ebselenem. Pochodne ebselenu podwójnie podstawione atomami halogenów w pierścieniu N-fenyłowym przyniosły szczególnie obiecujące wyniki. Związki SF29, SF33 i SF38 wykazały się wyjątkowo rzadko spotykanym powinowactwem osiągając  $K_i$  wynoszące poniżej 10 pM.

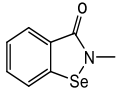
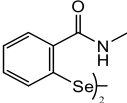
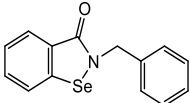
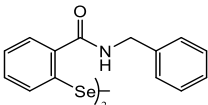
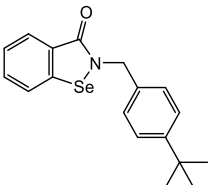
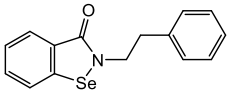
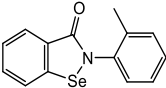
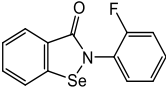
Pierwszym etapem badań powyższych związków zrealizowanym przez autora w ramach niniejszej pracy było określenie wpływu inhibitorów na ureolizę prowadzoną przez całe komórki *P. mirabilis*. Wszystkie badane benzisoselenazol-3(2*H*)-ony okazały się skutecznymi inhibitorami ureolizy, zdolnymi do wnikięcia do wnętrza żywych komórek bakterii Gram-ujemnych. Obliczone wartości  $IC_{50}$  dla najbardziej aktywnych inhibitorów mieściły się w zakresie 4-51 nM, co oznacza, że najskuteczniejsze spośród nich były około 10-krotnie bardziej aktywne niż ebselen (dla którego wyznaczono  $IC_{50} = 29,2$  nM). Były to głównie pochodne N-fenyłowe z pojedynczym podstawnikiem

fluorowym lub metoksylowym w pierścieniu aromatycznym w pozycji *orto* lub *meta*. Równie aktywne okazały się niektóre spośród pochodnych N-aryloalkilowych. W przypadku pochodnych ebselenu zawierających dwa podstawniki w pierścieniu N-fenylowym nie zaobserwowano równie obiecujących rezultatów, co w przypadku badań na oczyszczonym enzymie. Grupę tę charakteryzowały wartości  $IC_{50}$  około 5-krotnie wyższe niż dla struktur najsukuteczniejszych wobec całych komórek ureolitycznych. Kolejne badania wpływu związków na aktywność ureolityczną w komórkach bakteryjnych prowadzono w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, z wykorzystaniem podłoża mineralnego symulującego naturalny moczu, w którym mocznik stanowił jedyne źródło przyswajalnego azotu dla komórek. Wyznaczono wartość  $IC_{90}$  – stężenie w którym osiągnięto niemal całkowitą inhibicję ureolizy. W przypadku najbardziej aktywnej pochodnej *orto*-metoksylowej SF14 wartość ta wyniosła 18,8 nM. Porównywalną aktywnością charakteryzowała się diselenidowa pochodna SF48 ( $IC_{90} = 18,92$  nM). Ogółem dla 13 spośród 49 badanych związków wyznaczono  $IC_{90}$  poniżej 100 nM, zaś dla najmniej aktywnej pochodnej monoselenowej SF11 – 543 nM. W przeciwieństwie do wcześniejszych badań w buforowanej soli fizjologicznej, podczas testów w syntetycznym moczu wykazano wyższą aktywność pochodnych podstawionych w pozycji *orto* w porównaniu z izomerami *meta*. Kontrolowano również zmiany pH zachodzące w zawieszynie *P. mirabilis* w syntetycznym moczu zawierającym inhibitory w stężeniu określonym jako  $IC_{90}$ . W przypadku wszystkich związków zmiany pH w wyniku rozkładu mocznika nie przekroczyły 0,5, podczas gdy w kontroli bez dodatku inhibitora zaobserwowano wzrost pH z 6,5 do 8,7 w przeciągu 3 godzin inkubacji w warunkach optymalnych. To potwierdza, iż badane związki są w stanie utrzymywać pH podłoża na stałym poziomie pomimo obecności bakterii aktywnych ureolitycznie. Aby potwierdzić, że obserwowany efekt był wywołany inhibicją a nie śmiercią komórek przeprowadzono test MTT w obecności inhibitorów w stężeniu  $IC_{90}$ . Nie wykazano znaczących różnic w żywotności komórek w próbach zawierających związki selenoorganiczne w porównaniu z kontrolą pozytywną. Wzrost pH moczu obserwowany podczas infekcji spowodowanej przez ten uropatogenny gatunek często prowadzi do wytrącania się kryształów struwitów i apatytów jako nierozpuszczalnych złogów w drogach

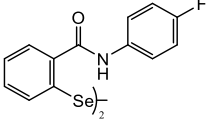
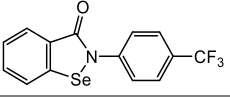
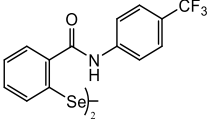
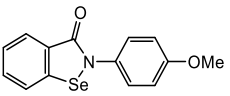
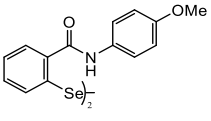
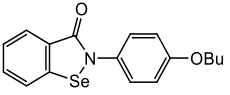
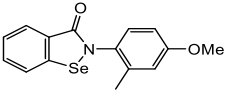
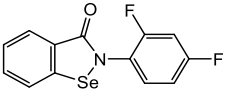
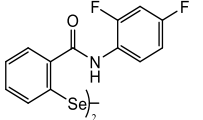
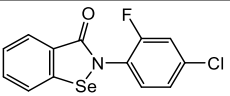
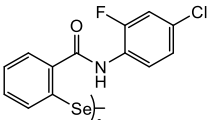
moczowych. Zahamowanie wzrostu zasadowości podłoża przez badane związki mogłoby zatem potencjalnie chronić pacjentów przed powstawaniem kamieni moczowych.

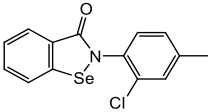
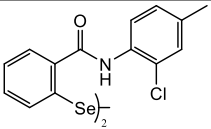
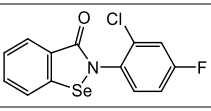
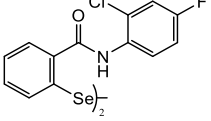
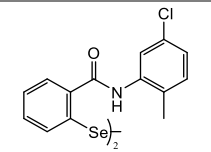
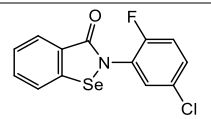
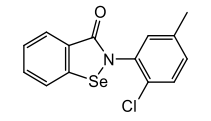
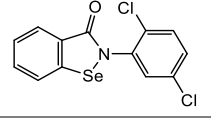
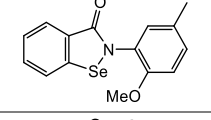
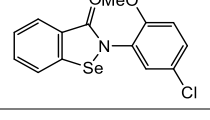
Testując tę grupę związków selenoorganicznych stwierdzono, że ich aktywność wobec całych komórek *H. pylori* jest znacznie niższa, niż w przypadku innego patogennego szczepu bakteryjnego *P. mirabilis*. Ponad połowa testowanych związków wykazywała wartość  $IC_{50} > 1 \mu\text{M}$ . Najskuteczniejszym inhibitorem ureazy tego gatunku okazała się pozbawiona podstawników pochodna N-benzylowa SF3 ( $IC_{50} = 151,4 \text{ nM}$ ). Zastąpienie pierścienia N-fenyloвого podstawnikiem N-benzylowym przyniosło wysoką aktywność również w przypadku struktury diselenidowej -  $IC_{50} = 686,5 \text{ nM}$  (pochodna SF4). Najlepszymi inhibitorami N-fenyłowymi okazały się pochodne z następującymi podstawnikami: *o*-hydroksy (SF12,  $IC_{50} = 336,9 \text{ nM}$ ), 4-chloro-2-fluoro (SF29,  $IC_{50} = 336,6 \text{ nM}$ ). Większość pochodnych dihalogenowych nie wykazywała tak wysokiej aktywności, jak wobec innych badanych w ramach pracy mikroorganizmów ureolitycznych. Najskuteczniejszy spośród nich - pochodna difluorowa SF27 - wykazywał wartość  $IC_{50} = 988,3 \text{ nM}$ . Ograniczenie liczby atomów fluoru do jednego prowadziło do znacznego spadku aktywności ( $IC_{50}$  w przedziale 1,5-2,5  $\mu\text{M}$ ). Diselenidowa pochodna SF48 stanowiła bardzo skuteczny inhibitor ureolizy ( $IC_{50} = 239,2 \text{ nM}$ ), podobnie jak w przypadku komórek *P. mirabilis*. Możliwe jednak, że ogólne obniżenie aktywności inhibitorów wobec całych komórek *H. pylori* (w porównaniu z *P. mirabilis*) jest spowodowane znaczącymi różnicami w budowie i funkcjonowaniu enzymu. Budowa ściany komórkowej raczej nie stanowi istotnego czynnika różnicującego między tym gatunkiem, a wcześniej badanym *P. mirabilis*, jako że obydwa te szczepy należą do bakterii Gram-ujemnych.

Tabela 10. – Aktywność N-podstawionych benzisoselenazol-3(2H)-onów oraz ich otwartych analogów diselenidowych w modelu komórkowym (*P. mirabilis* PCM 543, *H.pylori* Tx30a) oraz badania na izolowanym enzymie SPU (*S. pasteurii* CCM 2056) wykonane przez dr inż. Katarzynę Macegoniuk <sup>99</sup>

Nr	Struktura	K <sub>i</sub> SPU [nM]	Całe komórki ureolityczne		
			IC <sub>50</sub> <i>P. m.</i> [nM]	IC <sub>50</sub> <i>P. m.</i> [nM]	IC <sub>50</sub> <i>H. p.</i> [nM]
SF1		40,43 ± 3,51	5,301 ± 0,423	33,54 ± 1,83	1712 ± 142
SF2			5,521 ± 0,293	94,68 ± 7,72	
SF3		2,576 ± 0,183	285,0 ± 12,4		151,4 ± 5,7
SF4			7,293 ± 1,034	167,8 ± 12,2	686,5 ± 43,1
SF5			24,69 ± 1,72	85,77 ± 8,31	
SF6		16,32 ± 1,17	6,313 ± 0,602	52,41 ± 3,27	1545 ± 75
SF7		3,560 ± 0,321	25,03 ± 2,00	120,6 ± 13,2	1372 ± 58
SF8		0,974 ± 0,089	7,481 ± 0,672	34,70 ± 2,73	2591 ± 93

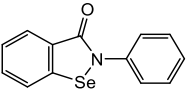
<b>SF9</b>		62,83 ± 4,71	365,7 ± 26,1	
<b>SF10</b>		13,72 ± 0,957	13,610 ± 1,531	87,70 ± 8,38 1292 ± 47
<b>SF11</b>		6,791 ± 0,530	26,88 ± 2,83	543,2 ± 26,0 935,2 ± 50,8
<b>SF12</b>		1,420 ± 0,149	16,83 ± 1,43	148,1 ± 6,3 336,9 ± 20,7
<b>SF13</b>			27,93 ± 2,47	250,1 ± 17,7
<b>SF14</b>		5,362 ± 0,433	4,194 ± 0,450	18,82 ± 2,43 1291 ± 117
<b>SF15</b>			18,31 ± 2,05	216,7 ± 16,2 3607 ± 172
<b>SF16</b>		1,892 ± 0,161	8,857 ± 0,813	222,6 ± 17,1 1599 ± 150
<b>SF17</b>			13,48 ± 1,16	256,0 ± 17,3
<b>SF18</b>		1,073 ± 0,080	11,51 ± 1,32	53,77 ± 3,73 1112 ± 81
<b>SF19</b>		24,11 ± 2,62	12,10 ± 1,43	145,0 ± 17,1 1561 ± 139

<b>SF20</b>		10,97 ± 1,31	96,41 ± 10,03	
<b>SF21</b>		0,0363 ± 3,9×10	16,01 ± 1,32	100,1 ± 13,9 ± 94
<b>SF22</b>			70,77 ± 7,23	342,0 ± 26,4
<b>SF23</b>		44,03 ± 4,22	15,92 ± 1,10	180,0 ± 10,3 ± 76
<b>SF24</b>			23,61 ± 1,73	181,3 ± 8,0
<b>SF25</b>		1,780 ± 0,184	32,22 ± 3,81	224,2 ± 14,9 562,5 ± 41,0
<b>SF26</b>		7,304 ± 0,562	25,11 ± 2,02	147,5 ± 10,0 774,2 ± 37,6
<b>SF27</b>		0,0167 ± 1,7×10 <sup>-3</sup>	17,02 ± 1,87	130,2 ± 16,9 988,3 ± 39,0
<b>SF28</b>			13,31 ± 0,70	120,1 ± 7,4
<b>SF29</b>		5,26×10 <sup>-3</sup> ± 4,1×10 <sup>-4</sup>	24,60 ± 2,82	360,7 ± 20,9 336,6 ± 23,7
<b>SF30</b>			13,21 ± 1,40	280,2 ± 17,4

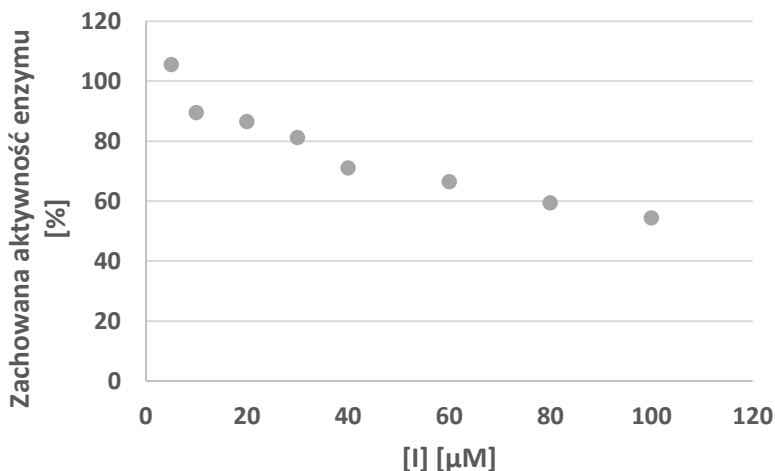
<b>SF31</b>		3,261 ± 0,230	20,04 ± 1,67	175,7 ± 12,0	501,2 ± 37,1
<b>SF32</b>			91,4 ± 8,1	539,1 ± 21,8	
<b>SF33</b>		5,80×10 <sup>-3</sup> ± 4,0×10 <sup>-4</sup>	22,67 ± 2,53	125,9 ± 8,1	1708 ± 107
<b>SF34</b>			20,91 ± 1,47	122,0 ± 13,3	
<b>SF35</b>			178,8 ± 1,4	1658 ± 86	
<b>SF36</b>		0,0135 ± 1,4×10 <sup>-4</sup>	11,81 ± 1,00	150,5 ± 20,3	1856 ± 162
<b>SF37</b>		1,633 ± 0,126	54,01 ± 2,68	243,0 ± 17,2	756,6 ± 36,2
<b>SF38</b>		8,85×10 <sup>-3</sup> ± 6,7×10 <sup>-4</sup>	21,16 ± 1,53	254,3 ± 14,6	1191 ± 129
<b>SF39</b>		7,113 ± 0,561	11,84 ± 1,60	96,57 ± 8,12	1705 ± 134
<b>SF40</b>		1,631 ± 0,118	21,92 ± 1,69	82,17 ± 11,30	1063 ± 123



<b>SF41</b>		260,0 ± 15,2	2163 ± 42	1734 ± 167	
<b>SF42</b>		2,451 ± 0,163	23,84 ± 1,97	124,0 ± 13,7	1472 ± 74
<b>SF43</b>		98,25 ± 6,90	885,9 ± 47,2		
<b>SF44</b>		13,84 ± 1,23	200,2 ± 17,0	580,7 ± 25,3	
<b>SF45</b>		31,92 ± 2,03	297,2 ± 12,0		
<b>SF46</b>		22,50 ± 0,87	165,2 ± 12,0		
<b>SF47</b>		47,23 ± 3,54	214,5 ± 20,0	624,9 ± 53,3	
<b>SF48</b>		5,251 ± 0,377	18,92 ± 1,20	239,2 ± 18,7	
<b>SF49</b>		10,62 ± 0,60	44,01 ± 3,40		
<b>SF50</b>		34,24 ± 2,53	257,4 ± 22,8	666,7 ± 48,0	

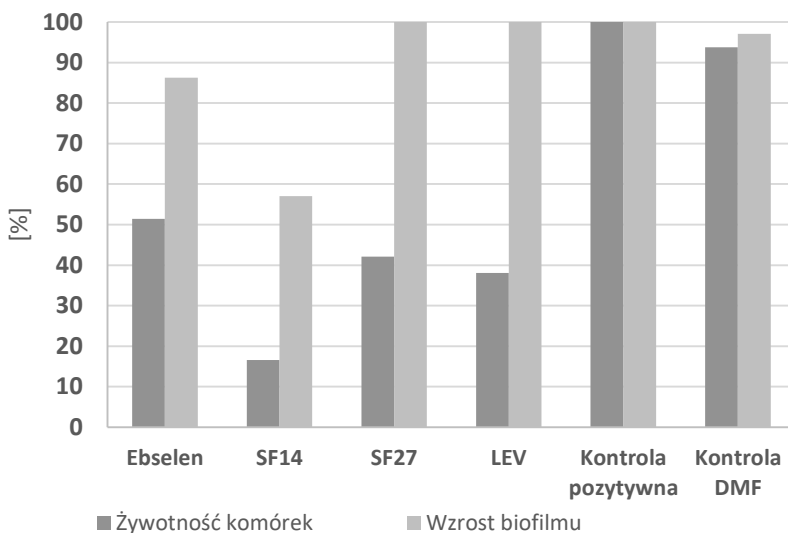
<b>Ebs.</b>		$2,11 \pm 0,18$	$29,18 \pm 3,10$	$112,2 \pm 11,9$	$742,0 \pm 41,4$
-------------	---	-----------------	------------------	------------------	------------------

Ebselen oraz dwie jego pochodne SF14 i SF27 zostały wybrane do badań nad wpływem na żywotność komórek *H. pylori*Tx30a zarówno w formie planktonicznej, jak również po utworzeniu struktury biofilmu bakteryjnego. Wyselekcjonowano struktury reprezentujące dwie grupy, które najbardziej konsekwentnie funkcjonują jako skuteczne inhibitory, niezależnie od źródła enzymu. Była to pochodna z pierścieniem N-fenylowym zawierającym dwa podstawniki fluorowe, oraz pochodna monometoksylova. Aktywność ebselenu i jego pochodnych porównywano z zahamowaniem wzrostu bakterii obserwowanym przy zastosowaniu lewofloksacyny. Jest to antybiotyk fluorochinolonowy wykorzystywany w eradykacji *H. pylori* z układu pokarmowego. Wykazano (wykorzystując udostępniony przez Katedrę Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej preparat ureazy z *H. pylori*) że lewofloksacyna stanowi ponadto inhibitor tego enzymu (Rys. 29.).

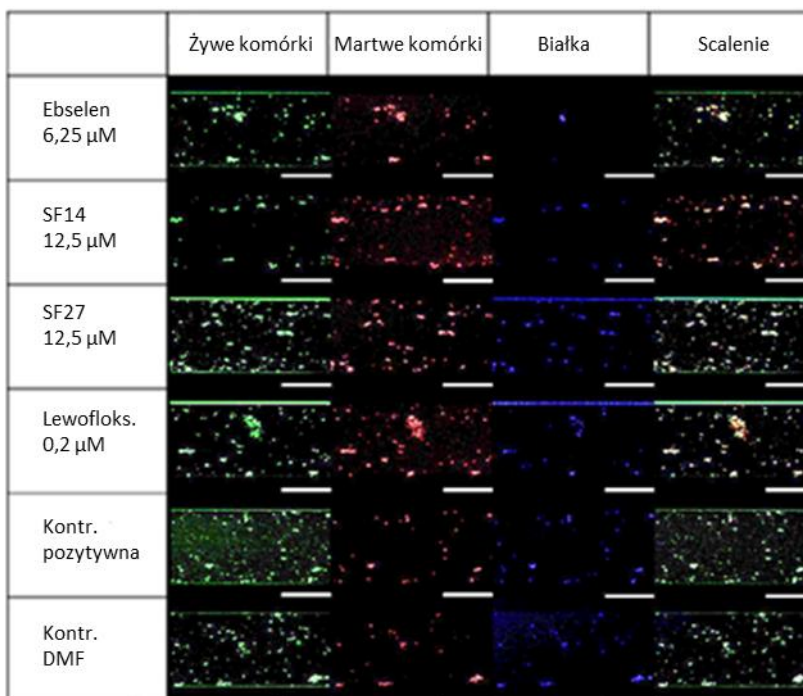


Rys. 29. – Aktywność lewofloksacyny jako inhibitora HPU

Wszystkie testy wpływu związków na żywotność formy planktonicznej i biofilmu *H. pylori* opisane w tym etapie wykonał dr Paweł Krzyżek z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Badania wpływu na żywotność rozpoczęto od pomiaru wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost mikroorganizmu (MIC) wykazywanego przez testowane struktury. Dla związku referencyjnego, ebselenu, minimalne stężenie hamujące wzrost komórek bakteryjnych mieściło się w przedziale 6,25-12,5  $\mu\text{M}$ . W przypadku obydwu testowanych pochodnych tego związku przedział, w którym znajdowała się wartość MIC, to 12,5-25  $\mu\text{M}$ .



Rys. 30. - Wyniki fluorescencyjnego badania intensywności wzrostu oraz żywotności biofilmu *H. pylori* Tx30a z użyciem systemu BioFlux 1000 w obecności wybranych związków w stężeniu MIC (wyznaczonym dla planktonu)



Rys. 31. – Wyniki barwień fluorescencyjnych komórek biofilmu *H. pylori* Tx30a w obecności badanych inhibitorów

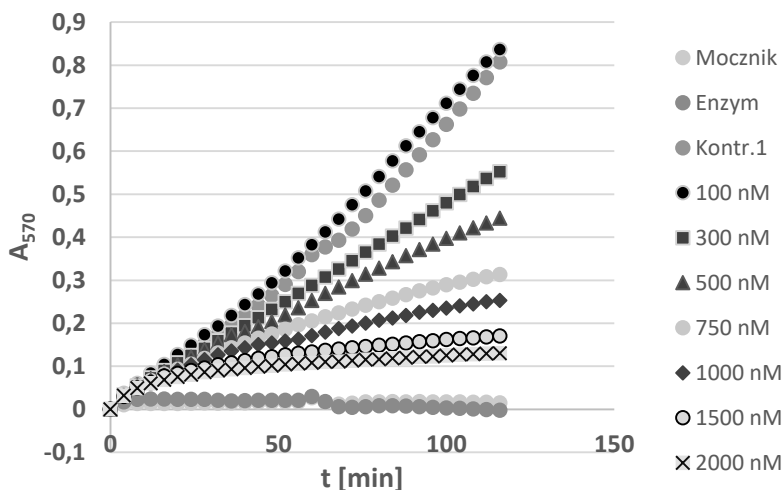
Kolejnym etapem badań było określenie wpływu tych trzech związków na wzrost, żywotność i skład biofilmu *H. pylori* z wykorzystaniem systemu optycznego BioFlux 1000 oraz barwień fluorescencyjnych (Rys. 30, 31.). Lewofloksacyna w minimalnym stężeniu hamującym rozmnażanie bakterii w formie planktonicznej okazała się niewystarczająca do zatrzymania wzrostu biofilmu – wyniki były porównywalne z kontrolą pozytywną (Tabela 11.). Podobne wyniki zaobserwowano przy zastosowaniu difluorowej pochodnej ebselenu. Zastosowanie struktury wiodącej przyniosło spadek ilości powstałego biofilmu o około 15%, zaś pochodna metoksyłowa SF14 doprowadziła do zahamowania tempa wzrostu o ponad 40%. Wszystkie badane związki wykazały jednak znaczący negatywny wpływ na żywotność komórek biofilmu. Najniższy był w tym przypadku wpływ ebselenu, który doprowadził do śmierci 50% populacji bakteryjnej. Ten stan równowagi między komórkami żywymi i martwymi jest

odzwierciedlony poprzez biel na panelu ukazującym scalenie wyników obserwacji wszystkich barwień fluorescencyjnych. Pochodna difluorowa SF27 oraz lewofloksacyna obniżyły żywotność do około 40%. Struktura metoksylowa ponownie okazała się najskuteczniejszą – jej dodatek zaowocował śmiercią ponad 80% komórek tworzących biofilm, co symbolizuje dominacja czerwonego zabarwienia w panelu skalającym wyniki barwień fluorescencyjnych. Wpływ na ekspresję białek w komórkach bakteryjnych również był najwyższy w przypadku struktury metoksylowej. Zaobserwowano obniżenie syntezy białek o ponad 50% względem kontroli pozytywnej (ebselen – spadek o 40%, pochodna difluorowa i lewofloksacyna – porównywalny spadek ilości białek o około 20%).

Tabela 11. – Zdolność ebselenu i wybranych pochodnych do hamowania wzrostu i ograniczania żywotności planktonu i biofilmu *H. pylori* Tx30a (Wartości procentowe podane względem kontroli pozytywnej = 100%)

Związek	Plankton		Biofilm	
	MIC [μM]	Komórki żywe [%]	Białko/komórki [%]	Intensywność wzrostu biofilmu
<b>DMF</b>	-	93,8	100	97,1
<b>Lewofloksacyna</b>	0,2	38,0	85,6	100
<b>Ebselen</b>	6,25	51,5	55,2	86,3
<b>SF14</b>	12,5	16,5	46,4	57,0
<b>SF27</b>	12,5	42,1	80,3	100

W przypadku badań prowadzonych na enzymie pozyskanym z komórek *C. neoformans* IHEM 3969 potwierdzono, że struktury selenoorganiczne wykazują tendencję do inhibicji wolnowiążącej (Rys. 32.). Do uzyskania maksymalnej efektywności inhibitorów wymagany był nieco dłuższy czas, nawet do 1 godziny w przypadku niektórych struktur. W ciągu 1,5 godzinnej reakcji ureolizy z dodatkiem tych inhibitorów zaobserwowano nawet dziesięciokrotne obniżenie wartości  $IC_{50}$ .

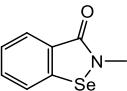
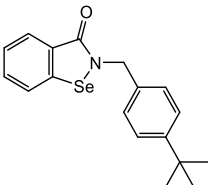
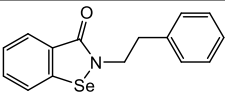
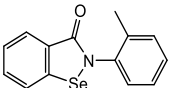
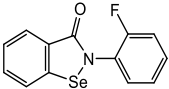
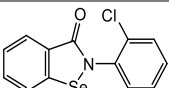
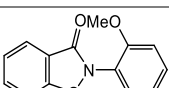
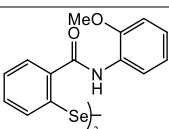


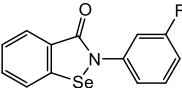
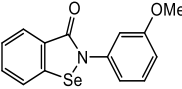
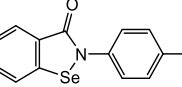
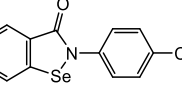
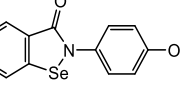
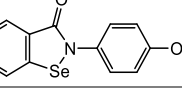
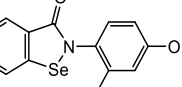
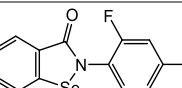
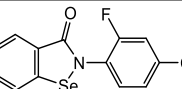
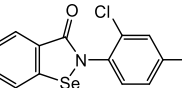
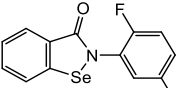
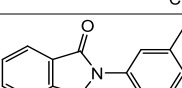
Rys. 32. – Pełne krzywe postępu dla reakcji katalizowanej przez ureazę *C. neoformans* (CNU) z dodatkiem różnych stężeń ebselenu

Podczas badań inhibicji aktywności enzymu grzybowego przez pochodne selenoorganiczne stwierdzono, że niezbędne są znacznie wyższe stężenia związków niż w przypadku SPU. Najskuteczniejszym inhibitorem w tym przypadku okazała się pochodna ebselenu SF14, z pierścieniem *N*-*o*-metoksyfenylowym (Tabela 12.). Wartość  $K_i$  dla tej struktury wynosiła 8,211 nM (trzy rzędy wielkości wyższa, niż inhibitorów najskuteczniejszych względem SPU). Inne pochodne metoksyłowe również okazały się bardzo obiecujące w reakcji z CNU –  $K_i$  wynosiła odpowiednio 12,87 nM w przypadku pochodnej *m*-metoksyłowej SF18 oraz 14,90 nM dla pochodnej *p*-metoksyłowej SF23. Kolejnym związkiem z grupy najbardziej aktywnych wobec ureazy pochodzenia grzybowego była pochodna *p*-butoksyłowa SF25, dla której stała dysocjacji kompleksu EI wyniosła 11,07 nM. Wysoką aktywność wykazywały również związki mono- lub dihalogenowe. Przykłady tego rodzaju struktur to pochodna *o*-chloro (SF10,  $K_i = 20,78$  nM), *m*-fluoro (SF16,  $K_i = 26,39$  nM), *p*-fluoro (SF19,  $K_i = 23,80$  nM), oraz 2,4-difluoro (SF27,  $K_i = 21,92$  nM). Mieszane pochodne chlorofluorowe okazały się znacznie mniej aktywne, ich wartość stałej dysocjacji mieściła się w przedziale 130-200 nM. Połączenie metoksyłacji i halogenowania

również nie przyniosło poprawy aktywności inhibitorów ureolizy katalizowanej przez CNU.

Tabela 12. – Aktywność N-podstawionych benzisoselenazol-3(2*H*)-onów oraz ich otwartych analogów diselenidowych jako inhibitorów ureazy grzybów patogennych *C. neoformans* IHEM 3969

Nr	Struktura	K <sub>i</sub> CNU [nM]	Całe komórki ureolityczne <i>C. neoformans</i>	
			IC <sub>50</sub> [nM]	Stres oksydacyjny względem ebselenu [%]
SF1		196,3 ± 12,7	600,9 ± 30,6	
SF5		NA	NA	
SF6		208,7 ± 13,8	154,1 ± 12,0	
SF7		22,42 ± 1,93	156,1 ± 7,7	
SF8		71,25 ± 5,33	394,4 ± 20,8	186,8 ± 4,2
SF10		20,78 ± 2,47	188,7 ± 15,7	
SF14		8,211 ± 0,463	197,2 ± 10,8	46,92 ± 2,78
SF15		NA	NA	

<b>SF16</b>		26,39 ± 4,07	1015 ± 94	106,3 ± 6,6
<b>SF18</b>		12,87 ± 1,33	148,0 ± 15,4	
<b>SF19</b>		23,80 ± 1,48	167,6 ± 18,3	
<b>SF21</b>		19,15 ± 2,03	3773 ± 120	12,61 ± 0,37
<b>SF23</b>		14,90 ± 0,49	451,5 ± 22,9	
<b>SF25</b>		11,07 ± 0,59	349,0 ± 21,8	55,91 ± 4,67
<b>SF26</b>		116,8 ± 10,6	232,4 ± 14,4	
<b>SF27</b>		21,92 ± 1,40	263,0 ± 12,9	157,6 ± 5,6
<b>SF29</b>		165,8 ± 9,3	1797 ± 102	33,16 ± 3,03
<b>SF33</b>		178,0 ± 16,3	369,7 ± 21,9	
<b>SF36</b>		133,1 ± 10,3	1832 ± 209	
<b>SF37</b>		20,48 ± 0,93	116,8 ± 2,9	66,79 ± 4,10

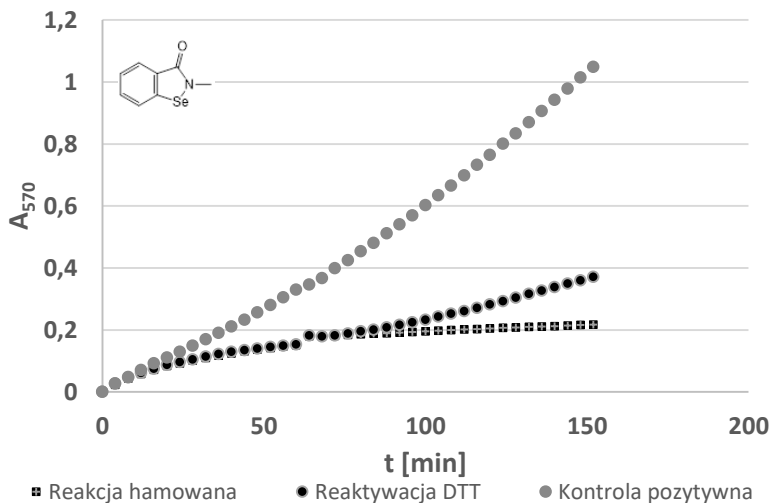


<b>SF38</b>		30,27 ± 2,41	745,2 ± 43,4	
<b>SF39</b>		98,30 ± 12,14	355,8 ± 28,9	0,0
<b>SF40</b>		51,06 ± 5,20	193,1 ± 21,3	26,01 ± 3,23
<b>SF41</b>		288,9 ± 16,6	457,0 ± 41,9	
<b>SF44</b>		49,60 ± 3,27	672,7 ± 38,6	30,11 ± 1,40
<b>SF47</b>		49,99 ± 2,32	856,0 ± 63,8	
<b>SF48</b>		93,66 ± 6,99	76,42 ± 4,52	
<b>SF50</b>		80,80 ± 4,96	458,8 ± 35,0	0,0
<b>Ebs.</b>		73,22 ± 8,06	427,6 ± 26,3	100,0 ± 2,1

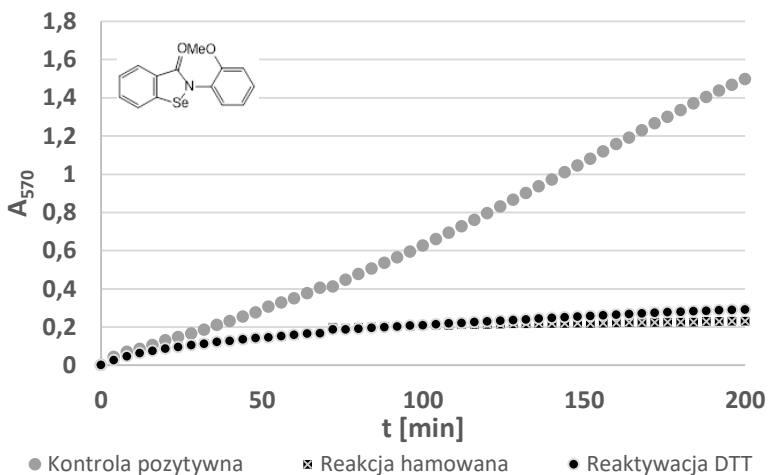
Przeprowadzono również badania z wykorzystaniem ditiotreitolu, by określić związek reaktywności grupy tiolowej reszty cysteiny w miejscu aktywnym enzymu z aktywnością pochodnych ebselenu jako inhibitorów ureazy (Tabela 13.). W przypadku większości związków zarówno obecność DTT od początku reakcji jak również jego dodatek po upływie 60 minut od rozpoczęcia reakcji skutkowało wyraźnym odzyskaniem aktywności enzymatycznej (Rys. 33A.).

Wyjątek stanowiły przede wszystkim metoksyłowe pochodne ebselenu, których oddziaływanie z ureazą wydawało się być niezależne od obecności czynnika protekcyjnego grup tiolowych (Rys. 33B.). Co ciekawe, zależnie od struktury zastosowanych pochodnych ebselenu zmianie ulegał kształt krzywych postępu reakcji ureolizy. W przypadku większości badanych struktur w początkowym etapie obserwowano aktywność enzymatyczną porównywalną z reakcją niehamowaną. Ten etap trwał od 10 do nawet 40 minut, przy czym nie stwierdzono zależności między jego długością i wartością  $K_i$  danego inhibitora. Zastosowanie niektórych struktur prowadziło jednak do zmniejszenia szybkości reakcji względem kontroli bez inhibitora już w początkowej fazie reakcji. W dalszym etapie szybkość reakcji hamowanej ulegała obniżeniu, co oznacza, że te inhibitory również funkcjonowały zgodnie z mechanizmem wolnowiążącym. Zaobserwowano, że większość struktur dających opisany efekt, to również metoksyłowe pochodne ebselenu. Większość najbardziej aktywnych pochodnych halogenowych (struktury *o*-chloro, *p*-fluoro, dichloro podstawione) również bardzo szybko zaczynały działać jako inhibitory ureolizy – faza równoległości krzywych postępu reakcji trwała w tym przypadku najwyżej 5 minut.

A.



B.



Rys. 33. – Wpływ reaktywacji ditiotreitolem (dodany w 60 minucie reakcji) na odzyskanie aktywności enzymu z dodatkiem związku **A**. SF1  
**B**. SF14

Tabela 13. – Wpływ czynnika protekcyjnego grup tiolowych na aktywność wybranych pochodnych ebselenowych jako inhibitorów ureazy (protekcja – inhibitor preinkubowany z DTT, reaktywacja – dodatek DTT po 30 minutach od rozpoczęcia hamowanej reakcji enzymatycznej)

Związek	Zachowana aktywność enzymu przy protekcji DTT [%]	Odzyskana aktywność enzymu przy reaktywacji DTT [%]
SF1	7,9 ± 0,2	26,3 ± 0,7
SF5	0	29,8 ± 2,4
SF6	80,7 ± 6,3	80,0 ± 2,9
SF7	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1
SF8	17,3 ± 0,8	7,4 ± 0,5
SF10	3,3 ± 0,1	13,1 ± 1,2
SF14	8,5 ± 1,2	5,1 ± 0,3
SF16	33,3 ± 2,0	36,2 ± 2,9
SF18	1,3 ± 0,0	0
SF19	3,3 ± 0,4	6,5 ± 0,4
SF21	75,5 ± 3,8	50,3 ± 3,2
SF23	16,5 ± 0,5	9,3 ± 0,8

SF25	6,6 ± 1,0	21,3 ± 0,4
SF26	1,3 ± 0,0	0
SF27	16,3 ± 0,5	7,6 ± 1,0
SF29	31,0 ± 0,9	19,7 ± 2,1
SF33	34,2 ± 2,3	20,5 ± 2,3
SF36	51,1 ± 3,2	62,2 ± 3,2
SF38	82,9 ± 4,7	32,9 ± 0,9
SF39	8,9 ± 1,1	0
SF47	14,3 ± 1,6	0
SF48	17,6 ± 0,6	23,5 ± 0,5
SF50	8,1 ± 1,1	29,0 ± 3,7
Ebselen	27,9 ± 3,0	26,5 ± 0,9

Następnie rozpoczęto badania wpływu pochodnych ebselenu na aktywność ureolityczną całych komórek grzybowych tego samego szczepu. W wyniku tych testów stwierdzono stosunkowo wysoką aktywność ( $IC_{50} < 200$  nM) dużej grupy związków selenoorganicznych. Podobnie jak w przypadku bakterii ureolitycznych, niektóre związki najbardziej obiecujące w badaniach na oczyszczonym enzymie nie były równie skutecznymi inhibitorami przy zastosowaniu całych komórek *C. neoformans*. Wyjątek stanowiły metoksyłowe pochodne ebselenu, które okazały się jednymi z najbardziej aktywnych inhibitorów. W przypadku związku SF14 stwierdzono wartość  $IC_{50} = 197,2$  nM, zaś jego regioizomer *meta* SF18 dał  $IC_{50} = 148,0$  nM. Izomer *para* charakteryzowała trzykrotnie niższa aktywność. Stanowiło to różnicę w odniesieniu do badań na oczyszczonym enzymie, gdzie zmiana położenia podstawnika metoksyłowego nie prowadziła do tak znacznych zmian aktywności. Warto zauważyć, że tego rodzaju pochodne ebselenu należały również do najbardziej obiecujących inhibitorów ureolizy prowadzonej przez całe komórki patogennych bakterii ze szczepu *P. mirabilis*. Struktura SF19, zawierająca podstawnik fluorowy w pozycji *para* także osiągnęła niską wartość  $IC_{50} = 167,6$  nM. Pozostałe pochodne monofluorowe nie wykazywały już tak wysokiej aktywności inhibicyjnej. Inne podstawniki w pozycji *orto* pozwoliły na osiągnięcie bardzo dobrych wyników, przede wszystkim pochodna metylowa (SF7,  $IC_{50} = 156,1$  nM) oraz chlorowa (SF10, 188,7 nM). Połączenie tych dwóch fragmentów strukturalnych doprowadziło do uzyskania struktury benzisoselenazolonu najskuteczniej hamującej ureolizę całych komórek *C. neoformans* (SF37,  $IC_{50} = 116,8$  nM). Innymi

efektywnymi pochodnymi ebselenu z dwoma podstawnikami były struktury metoksyłowe zawierające dodatkowo podstawnik chlorowy (SF40,  $IC_{50} = 193,1$  nM) lub metylowy (SF26,  $IC_{50} = 232,4$  nM).

#### 4.2.3.4. Aktywność N-alkilowych i N-fenylowych pochodnych benzizoselenazol-3(2*H*)-owych jako induktorów stresu oksydacyjnego w komórkach *C. neoformans*

Celem kolejnego etapu badań było określenie, czy zdolność do generowania stresu oksydacyjnego w komórkach mikroorganizmów patogennych przez ebselen<sup>82</sup> wykazywana jest również przez pochodne tego związku. Związki uznane za najbardziej obiecujące inhibitory drożdżowej ureazy, zbadano pod kątem ich wpływu na poziom stresu oksydacyjnego w komórkach *C. neoformans*. Zamierzano w ten sposób sprawdzić, czy wiązanie grup tiolowych przez związki może mieć wpływ na aktywność mikrobiologicznej reduktazy tioredoksyny. Potwierdzono, że dodatek wielu spośród wyselekcjonowanych związków w stężeniu 2  $\mu$ M powoduje znaczące podwyższenie stężenia reaktywnych form tlenu. Dwie spośród pochodnych okazały się skuteczniejszymi induktorami powstawania stresu oksydacyjnego niż struktura wiodąca – ebselen. Dla pochodnej *o*-fluorowej stwierdzono podwyższenie szybkości generowania stresu w komórkach o 86,8% (SF8). Z kolei regioizomer *meta* (SF16) osiągnął wynik porównywalny ze strukturą wiodącą tej grupy inhibitorów. Podstawienie dwoma atomami fluoru zaowocowało podwyższeniem stresu oksydacyjnego o 57,6% (SF27) w porównaniu z ebselenem. Pozostałe testowane związki okazały się znacznie mniej aktywne. Podstawienie pojedynczą grupą metoksyłową lub butoksyłową prowadziło do dwukrotnego spadku aktywności związków jako induktorów stresu oksydacyjnego. Podwójne halogenowanie lub halogenowanie połączone z metoksyłacją pierścienia N-fenylowego zaowocowało jeszcze niższą szybkością generowania reaktywnych form tlenu.

W celu sprawdzenia, czy obserwowany przyrost stresu oksydacyjnego nie wynika z ewentualnego wpływu utleniającego samych związków, przeprowadzono test DPPH. Jego celem było potwierdzenie, że badane struktury same w sobie działają jako przeciwutleniacze. To stanowiłoby dowód na poparcie hipotezy, że wywołany ich dodatkiem przyrost stresu oksydacyjnego w komórkach

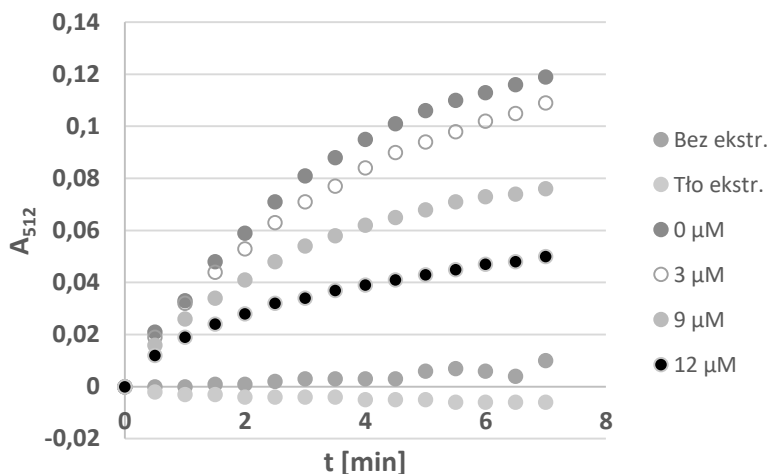
grzybowych jest spowodowany ich oddziaływaniami z aparatem enzymatycznym *C. neoformans*.

Tabela 14. – Aktywność wybranych pochodnych selenoorganicznych jako przeciwutleniaczy (w porównaniu z kwasem cynamonowym)

Związek	RSC <sub>50</sub> [μM]
Ebselen	77,56 ± 4,23
SF8	105,1 ± 8,4
SF14	112,1 ± 7,3
SF18	109,9 ± 10,2
SF25	86,24 ± 9,03
SF27	83,62 ± 4,39
SF33	103,6 ± 12,0
SF38	117,0 ± 9,1
SF39	149,5 ± 5,2
SF47	124,6 ± 10,7
Kwas cynamonowy	84,31 ± 3,49

Potwierdzono, że wszystkie przetestowane pochodne ebselenu wykazują aktywność przeciwutleniającą (Tabela 14.). Najskuteczniejsze w tym przypadku były następujące związki: struktura wiodąca, pochodna difluorowa SF27 oraz pochodna zawierająca podstawnik butoksyłowy SF25. Zastosowanie tych trzech związków umożliwiło osiągnięcie rezultatów porównywalnych z użyciem zbliżonego stężenia kwasu cynamonowego. Pozostałe badane związki również wykazały zdolność do wychwytywania wolnych rodników w mieszaninie reakcyjnej, choć nie tak wysoką. Należały do nich pochodne monohalogenowe, dihalogenowe oraz metoksyłowe. Podsumowując, potwierdzono aktywność antyoksydacyjną dla wszystkich typów modyfikacji, dla których wcześniej uzyskano najbardziej obiecujące wyniki w generowaniu stresu oksydacyjnego w żywych komórkach *C. neoformans*. To stanowi dowód, że obserwowane gromadzenie się reaktywnych form tlenu w komórce prawdopodobnie wywołane było zaburzeniem funkcjonowania systemu reduktazy tioredoksyny. Potwierdzono również, że sam dodatek wykorzystanego do przygotowania roztworów rozpuszczalnika nie wywiera znaczącego wpływu na przebieg obserwowanej reakcji.

Aby wykazać hamujący wpływ ebselenu na aktywność reduktazy tioredoksyny wykorzystano ekstrakt komórkowy *S. aureus* PCM 2054. Badania wpływu różnych jego stężeń na wynik testu DTNB potwierdziły, że wzrastające stężenie tego inhibitora ureolizy prowadzi zarazem do zahamowania redukcji mostków disiarczkowych już przy zastosowaniu go w niskich stężeniach mikromolarnych (Rys. 34.). Obecność ebselenu w mieszaninie reakcyjnej prowadzi zatem do obniżenia aktywności reduktaz znajdujących się w ekstrakcie komórkowym.



Rys. 34. – Wpływ ebselenu na szybkość redukowania mostków disiarczkowych w ekstrakcie komórkowym *S. aureus* (bez ekstr. – próba bez dodatku ekstraktu komórkowego, tło ekstr. – próba bez dodatku substratu testu)

#### 4.2.3.5. Badania inhibicji – związki selenoorganiczne, N-podstawione benzisoselenazol-3(2*H*)-ony z podstawnikiem benzylowym

W poprzednim etapie badań wykazano, że zastosowanie podstawników fluorowych w związkach selenoorganicznych owocuje uzyskaniem inhibitorów ureazy aktywnych w bardzo niskich stężeniach. Celem badania nowej generacji benzisoselenazol-3(2*H*)-onów była próba połączenia obecności tych podstawników z nieco bardziej

elastyczną strukturą opartą na benzylu, która wykazywała lepsze działanie antyureolityczne wobec całych komórek mikroorganizmów. W tym celu prowadzono pomiary kinetyki z wykorzystaniem enzymu wzorcowego, pozyskanego z ureolitycznych komórek *S. pasteurii*. Testom poddano grupę 19 N-benzylowych pochodnych selenoorganicznych, w większości halogenowych (Tabela 15.). Nie wykazano równie obiecującej aktywności na poziomie stężeń pikomolarnych jak w przypadku analogicznych związków N-fenylowych. Najskuteczniejszym inhibitorem ureazy była w tym przypadku struktura SB1 zawierająca podstawnik 2,4-dichlorobenzylowy. Wartość  $K_i$  dla tego związku wynosiła 594 pM, będąc wyższą o dwa rzędy wielkości niż stwierdzona dla najbardziej obiecujących pochodnych ebselenu. Podstawienie dwóch atomów chloru w innych pozycjach (SB2, SB3) prowadziło do znacznego zmniejszenia zdolności do hamowania reakcji ureolizy (do  $K_i$  rzędu 10-15 nM). Obecność podstawnika difluorobenzylowego (SB7-SB10) również skutkowała niskimi wartościami  $K_i$ . Nie udało się osiągnąć w tym przypadku aktywności dorównującej najlepszej strukturze z dwoma atomami chloru – SB1. Jednakże, przy dipodstawieniu fluorem zaobserwowano zachowanie wysokiej zdolności do inhibicji niezależnie od położenia podstawników. W przypadku wszystkich związków tego typu obserwowano w badaniach kinetycznych  $K_i$  niższe niż 3 nM, zaś dla najskuteczniejszego z tych inhibitorów (pochodna SB8; 2,6-difluoro) wartość ta wyniosła 1,155 nM. Pojedyncze podstawienie atomem fluoru w pozycji *orto* (SB4) umożliwiło osiągnięcie wartości  $K_i = 3,614$  nM. Zmiana miejsca podstawienia prowadziła do znaczącego spadku zdolności hamowania ureolizy. Usunięcie wszystkich podstawników z pierścienia N-benzylowego (SF3) umożliwiało osiągnięcie  $K_i = 2,576$  nM. Podstawienie trzema atomami fluoru, lub dowolną liczbą grup trifluorometylowych owocowało stosunkowo wysokimi wartościami stałej dysocjacji kompleksu EI (od 50 nM do nawet 2  $\mu$ M).

Do badań mających na celu określenie zdolności do inhibicji ureazy w żywych komórkach patogenego szczepu bakteryjnego *P. mirabilis* PCM 543 wyselekcjonowano grupę 8 związków z puli pochodnych N-benzylowych, aby zapewnić możliwie największą różnorodność testowanych struktur. Testy kinetyki enzymatycznej prowadzono z użyciem metody wykorzystującej indykator pH –

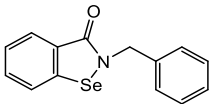
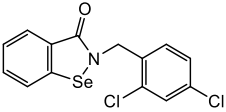
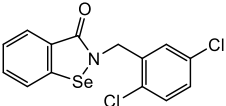


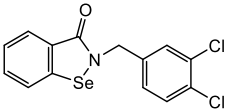
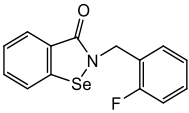
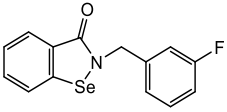
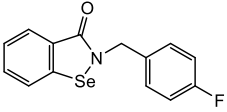
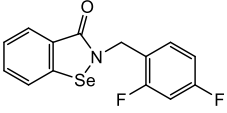
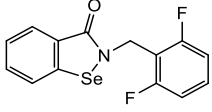
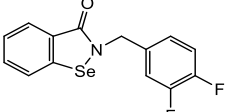
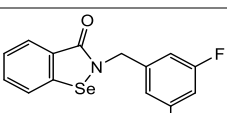
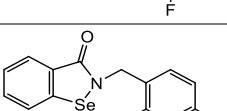
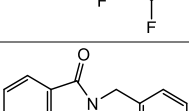
czerwień krezolową. Pochodne monofluorowe (SB4-6) okazały się najskuteczniejszymi spośród analizowanych struktur. Co ciekawe, w przypadku badań na całych komórkach miejsce podstawienia atomu fluoru okazało się nie być tak kluczowym czynnikiem, jak w przypadku testów prowadzonych na oczyszczonym enzymie. Niezależnie od położenia podstawnika, obserwowano wartości  $IC_{50}$  mieszczące się w przedziale 180-210 nM. Struktura N-benzylowa SF3, pozbawiona wszelkich podstawników przy pierścieniu hamowała aktywność ureolityczną o 50% przy zastosowaniu stężenia 285 nM. To różnica w odniesieniu do izolowanego enzymu z gatunku *S. pasteurii*, dla którego obserwowano wyższą aktywność tej struktury niż wszystkich związków monofluorowych. Pochodna difluorowa SB10 nie okazała się skuteczniejsza od struktur zawierających pojedynczy atom fluoru. Określona dla niej wartość  $IC_{50}$  wynosiła 369,9 nM. Analogi zawierające grupy trifluorometylowe nie wykazywały znaczącej aktywności w porównywalnych stężeniach. Aby uzyskać 50-procentowy spadek aktywności ureolitycznej całych komórek bakteryjnych, konieczne było zastosowanie stężeń przekraczających 5  $\mu$ M. Podobny wynik zaobserwowano w przypadku pochodnej 2-chloro-5-fluorobenzylowej SB15. Warto odnotować, że znaczny spadek aktywności w przypadku struktur zawierających podstawnik(i) trifluorometylowy(e) jest zbliżony do obserwacji prowadzonych na izolowanym enzymie ze *S. pasteurii*.

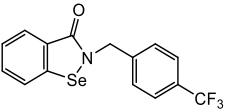
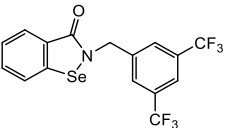
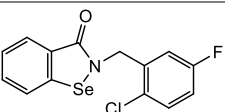
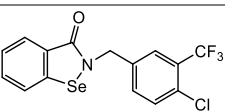
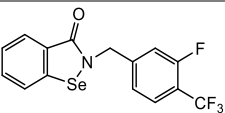
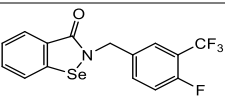
Zdolność do inhibicji ureolizy prowadzonej przez całe komórki patogennego mikroorganizmu *H. pylori* została określona dla wszystkich związków z tej grupy strukturalnej poprzez wyznaczenie wartości  $IC_{50}$ . Mimo podobieństw budowy ściany komórkowej do *P. mirabilis*, wyniki dla obu mikroorganizmów znacząco się od siebie różniły. Wykazano, że w wielu przypadkach związki okazały się aktywne w znacznie niższych stężeniach. Przyczyną może być fakt występowania u *H. pylori* ureazy zewnątrzkomórkowej co oznacza, że ograniczenie skuteczności inhibitorów wynikające z transportu przez błony może nie być w przypadku tego gatunku równie kluczowym czynnikiem. Omawiając zależność struktura-aktywność nie stwierdzono tak wyraźnej zależności zdolności do hamowania hydrolizy mocznika od pozycji podstawników halogenowych. Między najskuteczniejszym a najslabszym spośród badanych związków zaobserwowano około

trzykrotną różnicę stężenia, które należało zastosować, by uzyskać porównywalną aktywność. W przypadku badań na oczyszczonym enzymie *S. pasteurii* różnica ta była ponad dwa rzędy większa. Podobną relację zaobserwowano także podczas wcześniejszych badań porównawczych prowadzonych z użyciem inhibitorów stanowiących *N*-fenylobenzisoselenazolony. Należy jednak podkreślić, że stężenia, w których te ostatnie związki wykazywały aktywność względem całych komórek *H. pylori* były znacznie wyższe niż w przypadku podobnych testów na innych gatunkach bakterii. Związek niepodstawiony SF3 stanowił jeden ze skuteczniejszych inhibitorów ureolizy prowadzonej w całych komórkach *H. pylori* ( $IC_{50} = 151,4$  nM). Wśród związków bardziej aktywnych od tej struktury wiodącej znalazły się między innymi pochodne difluorowe (SB7-10), oraz trifluorometylowe (SB12 oraz SB13). Najskuteczniejszymi inhibitorami były jednak związki SB15 oraz SB17, które zawierały zarówno podstawnik fluorowy jak i chlorowy lub trifluorometylowy. Ta kombinacja umożliwiła osiągnięcie wartości  $IC_{50} < 100$  nM.

Tabela 15. – Aktywność *N*-benzylowych pochodnych benzisoselenazol-3(2*H*)-onu jako inhibitorów ureazy otrzymanej z komórek *S. pasteurii* CCM 2056 oraz ureolizy prowadzonej w całych komórkach *H. pylori* Tx30a oraz *P. mirabilis* PCM 543

Nr	Struktura	$K_i$ [nM], SPU	$IC_{50}$ [nM] Całe komórki <i>H.</i> <i>pylori</i>	$IC_{50}$ [nM] Całe komórki <i>P.</i> <i>mirabilis</i>
SF3		2,576 $\pm 0,183$	151,4 $\pm$ 5,7	285,0 $\pm$ 12,4
SB1		0,594 $\pm 0,032$	345,1 $\pm$ 15,9	
SB2		9,038 $\pm 0,220$	341,4 $\pm$ 23,2	

<b>SB3</b>		15,89 ± 0,65	314,6 ± 4,7	
<b>SB4</b>		3,614 ± 0,275	171,1 ± 5,4	212,8 ± 16,3
<b>SB5</b>		12,16 ± 0,40	154,1 ± 8,4	192,7 ± 9,1
<b>SB6</b>		25,40 ± 2,82	193,2 ± 8,1	180,9 ± 12,0
<b>SB7</b>		2,522 ± 0,193	287,0 ± 17,6	
<b>SB8</b>		1,155 ± 0,137	217,9 ± 14,2	
<b>SB9</b>		3,354 ± 0,653	109,6 ± 4,5	
<b>SB10</b>		1,305 ± 0,027	121,9 ± 4,1	369,9 ± 20,4
<b>SB11</b>		294,1 ± 26,0	178,6 ± 3,3	
<b>SB12</b>		250,0 ± 23,7	111,6 ± 2,4	> 5 μM

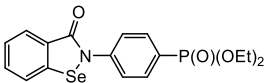
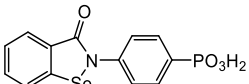
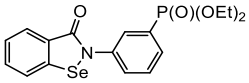
<b>SB13</b>		209,7 ± 19,0	169,7 ± 1,6	
<b>SB14</b>		331,7 ± 29,4	208,3 ± 4,5	> 5 μM
<b>SB15</b>		54,28 ± 1,53	96,36 ± 1,71	> 5 μM
<b>SB16</b>		1856 ± 37	153,4 ± 5,4	
<b>SB17</b>		1590 ± 190	93,46 ± 5,3	
<b>SB18</b>		299,3 ± 8,8	106,8 ± 1,9	

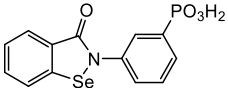
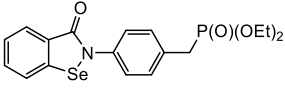
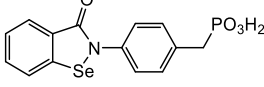
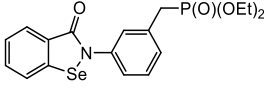
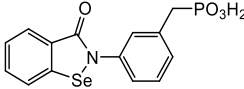
#### 4.2.3.6. Badania aktywności grupy fosfonowych pochodnych N-podstawionych benzizoselenazoloniów jako inhibitorów oczyszczonej ureazy i ureolizy prowadzonej w całych komórkach bakteryjnych

Zbadano także aktywność związków benzizoselenazoloniowych zawierających grupę fosfonianową jako fragment alkilowego, aryłowego lub alkiloaryłowego N-podstawnika (Tabela 16.). Celem było sprawdzenie zdolności do hybrydowego mechanizmu inhibicji, uwzględniającego zarówno wiązanie grupy tiolowej cysteiny w wyniku otwarcia benzizoselenazolonu, jak również koordynowanie katalitycznych jonów niklu przez grupę fosfonową. Dla porównania sprawdzono także właściwości analogicznych estrów fosfonowych. Zdolność do inhibicji wstępnie określono wobec oczyszczonego enzymu SPU. Obliczenia stałej dysocjacji prowadzono dla mechanizmu wolnowiążącego, sugerowanego przez hiperboliczny kształt otrzymanych krzywych postępu reakcji hamowanej przez dodatek

badanych związków. Związki arylowe i benzytowe z wolną grupą fosfonianową (SP2, SP4, SP6 oraz SP8) wykazywały zbliżone do siebie właściwości jako inhibitory oczyszczonej ureazy, niezależnie od umiejscowienia podstawnika. Wszystkie charakteryzowały się wartościami stałej dysocjacji kompleksu EI w przedziale 410-440 nM. To wartości znacznie wyższe niż w przypadku większości innych pochodnych ebselenu. To oznacza, że ewentualne wiązanie jonów niklu przez wolną grupę fosfonową nie równoważy pogorszonego dopasowania do wnęki wiążącej i/lub zmniejszonej reaktywności. Zaskakująco, estryfikacja grupy fosfonianowej doprowadziła do zwiększenia aktywności badanych struktur, szczególnie dla podstawnika zawierającego dodatkowy atom węgla. Najbardziej aktywna z tych pochodnych (związek SP7) osiągnęła wartość  $K_i = 7,82$  nM, znacznie bliższą wynikom uzyskanym we wcześniejszych pracach nad związkami bazującymi na ebselenie. Podstawienie *para* prowadziło do podwyższenia stałej dysocjacji do wartości 104,8 nM (związek SP5). Podstawienie estryfikowanej grupy fosfonianowej bezpośrednio do pierścienia jeszcze bardziej obniżyło aktywność inhibitorów, do poziomu porównywalnego ze strukturami o nieestryfikowanych grupach fosforoorganicznych.

Tabela 16. – Aktywność fosfonowych pochodnych benzisozelenazolonu zawierających podstawnik N-fenylowy lub N-benzytowy jako inhibitorów ureazy otrzymanej z komórek *S. pasteurii* CCM 2056 oraz ureolizy prowadzonej w całych komórkach *H. pylori* Tx30a

Nr	Struktura	$K_i$ [nM] SPU	$IC_{50}$ [nM] Całe komórki <i>H. pylori</i>
SP1		452,6 ± 15,1	29,53 ± 0,34
SP2		424,1 ± 8,4	358,2 ± 20,7
SP3		286,1 ± 34,0	40,41 ± 0,57

<b>SP4</b>		413,5 ± 29,8	313,6 ± 17,4
<b>SP5</b>		104,8 ± 8,5	58,89 ± 0,26
<b>SP6</b>		414,5 ± 3,9	187,2 ± 12,3
<b>SP7</b>		7,818 ± 2,823	54,31 ± 0,10
<b>SP8</b>		435,6 ± 40,8	541,9 ± 12,0

Aby określić wpływ zmian strukturalnych fosfonianowych pochodnych ebselenu na trwałość powstałego kompleksu enzym-inhibitor przeprowadzono badania reaktywacji hamowanego enzymu przez dodatek czynnika protekcyjnego dla grup tiolowych – DTT. Wyniki pomiarów wskazują, że najbardziej trwałe kompleks powstaje w przypadku związku SP3 N-podstawionego grupą *meta*-dietylofosfonofenyłową (Tabela 17.). Dodatek ditiotreitolu do mieszaniny reakcyjnej pozwalał na odzyskanie zaledwie 27,3% utraconej aktywności ureolitycznej. Zastosowanie struktur rozbudowanych o dodatkowy atom węgla umożliwiło odzyskanie około 50% aktywności po dodaniu DTT. W tym przypadku regioizomeria miała bardzo nieznaczny wpływ. Podczas inhibicji prowadzonej przez kwasy fosfonowe w większości przypadków reaktywacja prowadziła do pełniejszego odzyskania aktywności niż dla estrów. Może to stanowić kolejny dowód na to, że wiązanie koordynacyjne jonów niklu w centrum katalitycznym ureazy nie wspomaga reaktywności z resztą cysteiny. W przeciwnym wypadku reaktywacja aktywności przez dodatek DTT powinna być pełniejsza dla estrów. Przeprowadzono również podobny eksperyment uwzględniający reaktywację aktywności enzymu poprzez dodanie DTT po rozpoczęciu reakcji w systemie preinkubowanym. W tym doświadczeniu enzym preinkubowano z inhibitorami przez 2 godziny przed rozpoczęciem reakcji poprzez dodatek substratu.

Ditiotreitol z kolei dodany został 30 minut później. Wykazano, że dla wszystkich badanych w tej grupie związków dwugodzinna preinkubacja z enzymem doprowadziła do silniejszego wiązania z jego miejscem aktywnym. W rezultacie po dodaniu czynnika protekcyjnego grup tiolowych obserwowano odzyskanie aktywności ureolitycznej w znacznie mniejszym stopniu (w wielu przypadkach nie obserwowano go w ogóle).

Tabela 17. – Wpływ czynnika protekcyjnego grup tiolowych na aktywność fosfonowych pochodnych benzisoselenazolonu zawierających podstawnik N-fenyłowy lub N-benzylowy (reaktywacja – dodatek DTT po 30 minutach od rozpoczęcia hamowanej reakcji enzymatycznej, preinkubacja enzymu z inhibitorem odbyła się przed dodaniem substratu)

Związek	Odzyskana aktywność enzymu przy reaktywacji DTT bez preinkubacji enzymu z inhibitorem [%]	Odzyskana aktywność enzymu przy reaktywacji DTT po dwugodzinnej preinkubacji enzymu z inhibitorem [%]
SP1	100	36,5 ± 1,5
SP2	76,3 ± 3,5	59,6 ± 3,9
SP3	27,3 ± 0,7	0
SP4	31,9 ± 3,0	0
SP5	51,8 ± 4,1	0
SP6	53,5 ± 1,9	13,5 ± 0,6
SP7	53,8 ± 0,4	0
SP8	67,6 ± 7,2	0

Kontynuując określono wartości  $IC_{50}$  hamowania aktywności ureolitycznej całych komórek *H. pylori*. Konsekwentnie, estry fosfonowe okazały się znacznie lepszymi inhibitorami niż analogiczne kwasy. Estry charakteryzują się znacznie większą hydrofobowością, co zaobserwowano już podczas przygotowywania roztworów inhibitorów o określonym stężeniu. Kwasy rozpuszczały się w wodzie dejonizowanej, stanowiąc jedyne badane w tej pracy pochodne selenoorganiczne niewymagające zastosowania rozpuszczalników organicznych. Do rozpuszczenia estrów niezbędny był DMF, a związki te charakteryzowały się nawet dziesięciokrotnie niższą wartością  $IC_{50}$  niż ich wolne analogi. Najskuteczniejszym z nich okazała się struktura SP1 z podstawnikiem *para*-fosfonofenyłowym ( $IC_{50} = 29,53$  nM).

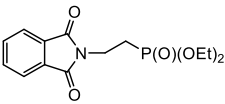
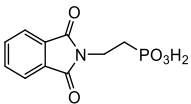
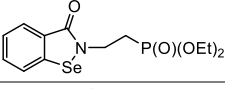
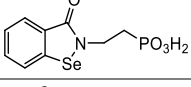
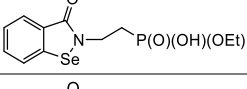
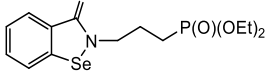
Podstawienie *meta* podniosło  $IC_{50}$  do wartości 40,41 nM (struktura SP3). N-benzylowe izomery strukturalne charakteryzowały się wartościami  $IC_{50}$  wynoszącymi około 55 nM. Zaskakująca była obserwacja, iż inhibicja ureazy w całych komórkach *H. pylori* została osiągnięta dla wielokrotnie niższych stężeń testowanych związków, niż w przypadku oczyszczonego enzymu SPU. To odmienny wynik w porównaniu do podobnych struktur pozbawionych fragmentu fosforoorganicznego. Należy podkreślić, że wszystkie estry fosfonowe stanowiły najbardziej efektywne inhibitory ureazy prowadzonej w komórkach *H. pylori* opisywane w niniejszej pracy, osiągając w niektórych przypadkach aktywność trzykrotnie wyższą od najskuteczniejszego związku z pozostałych grup strukturalnych.

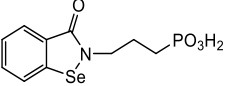
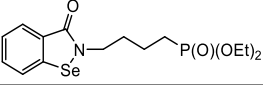
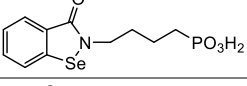
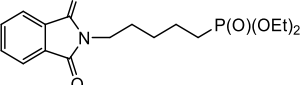
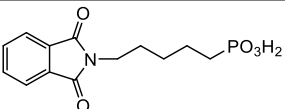
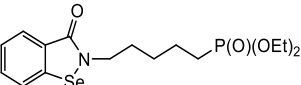
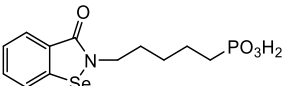
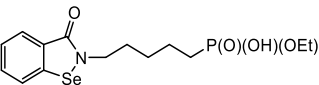
Dla uzyskania pełniejszego obrazu udziału struktur fosforoorganicznych w mechanizmie hamowania aktywności ureaz bakteryjnych przez związki będące inhibitorami bifunkcjonalnymi zbadano aktywność alifatycznych pochodnych benzisoselenazolonu zawierających grupę fosfonianową (Tabela 18.). Grupa funkcyjna występowała w formie kwasu, monoestru oraz diestru etylowego jako terminalna w N-podstawniku alkilowym. Sprawdzono również aktywność podobnych strukturalnie związków ftalimidowych, ale pozbawionych reaktywności benzisoselenazolonu. Udało się zidentyfikować inhibitory ureazy aktywne w niskich stężeniach nanomolarnych wobec oczyszczonego enzymu z komórek *S. pasteurii*. Najskuteczniejszą pochodną była struktura SR12 zawierająca łańcuch pięciowęglowy zakończony grupą dietylofosfonianową. Wartość stałej dysocjacji kompleksu enzymu z tym inhibitorem wynosiła  $K_i = 12,8$  nM. Skrócenie łańcucha do 4 oraz 2 atomów węgla (struktury SR8 i SR3) przyniosło wartości  $K_i$  równe odpowiednio 35,8 oraz 25,7 nM. Całkowita hydroliza estru prowadziła do około dziesięciokrotnego podwyższenia wartości  $K_i$ . Należy brać pod uwagę, że związki estryfikowane, charakteryzujące się wyższą hydrofobowością, są zdolne do bardziej zróżnicowanych oddziaływań z białkiem, zarówno polarnych, związanych z obecnością trzech fosforylowych atomów tlenu, jak i lipofilowych. To może stanowić wyjaśnienie znacznie wyższej aktywności estrów, szczególnie jeśli wiązanie koordynacyjne jonów niklu z grupą fosfonową nie następuje lub jest mniej istotne niż kowalencyjne wiązanie katalitycznej cysteiny Cys322 przez fragment



selenoorganiczny. W tym kontekście mniej zaskakującym wynikiem było znaczne osłabienie zdolności do hamowania ureolizy w przypadku monoestrów. Wartości  $K_i$  tych struktur mieściły się w przedziale stężeń mikromolarnych, co czyni je gorszymi inhibitorami niż analogiczne diestry oraz kwasy. Możliwe, że monoestry nie mają ani możliwości koordynacji jonów metali, ani nie są komplementarne z odpowiednim regionem białka. Co ciekawe, jest to obserwacja odwrotna do podobnej zmiany wprowadzonej w strukturze opisywanych we wcześniejszych rozdziałach związków opartych na strukturze kwasu cynamonowego. Całkowity brak aktywności struktur ftalimidowych zastosowanych w podobnych stężeniach, niezależnie od stopnia estryfikacji grupy fosfonowej, warunkuje reaktywność cysteiny jako kluczowy czynnik inhibicji.

Tabela 18. – Aktywność N-fosfonoalkilowych pochodnych benzizoselenazol-3(2*H*)-onu jako inhibitorów ureazy otrzymanej z komórek *S. pasteurii* CCM 2056 oraz ureolizy prowadzonej przez całe komórki *H. pylori* Tx30a

Nr	Struktura	$K_i$ [nM], SPU	$IC_{50}$ [nM] Całe komórki <i>H. pylori</i>
SR1		Nieakt. < 50 $\mu$ M	Nieakt. < 50 $\mu$ M
SR2		Nieakt. < 50 $\mu$ M	Nieakt. < 50 $\mu$ M
SR3		25,67 $\pm$ 0,20	130,4 $\pm$ 3,9
SR4		415,3 $\pm$ 20,8	1603 $\pm$ 18,4
SR5		2408 $\pm$ 41	4329 $\pm$ 192
SR6		71,61 $\pm$ 4,02	188,8 $\pm$ 3,8

<b>SR7</b>		288,3 ± 7,0	874,4 ± 9,6
<b>SR8</b>		35,84 ± 0,41	264,6 ± 7,1
<b>SR9</b>		425,9 ± 7,9	2106 ± 45
<b>SR10</b>		Nieakt. < 50 μM	Nieakt. < 50 μM
<b>SR11</b>		Nieakt. < 50 μM	Nieakt. < 50 μM
<b>SR12</b>		12,83 ± 0,10	299,4 ± 8,8
<b>SR13</b>		107,9 ± 2,2	866,9 ± 11,7
<b>SR14</b>		671,2 ± 12,5	4329 ± 150

Badanie zdolności tych związków do inhibicji ureolizy prowadzonej w całych komórkach *H. pylori* potwierdziło najwyższą aktywność diestrów. Ponadto, aktywność inhibitorów okazała się odwrotnie proporcjonalna do długości łańcucha alkilowego N-podstawnika. Dla łańcucha o długości 2, 3, 4 i 5 atomów węgla (struktury SR3, SR6, SR8 oraz SR12) stwierdzono wartości  $IC_{50}$  wynoszące odpowiednio: 130,4 nM, 188,8 nM, 264,6 nM oraz 299,4 nM. Monoestry były najsłabszymi inhibitorami, a związki pozbawione atomu selenu ponownie okazały się być całkowicie nieaktywne.

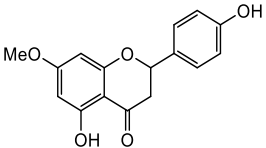
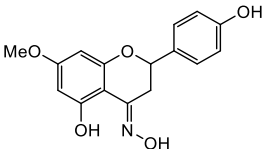
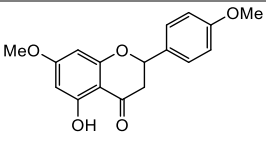
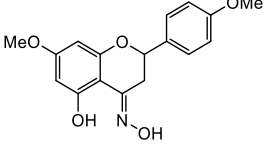
#### 4.2.4. Badania aktywności związków flawonoidowych

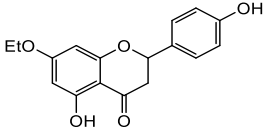
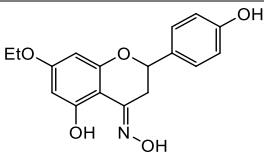
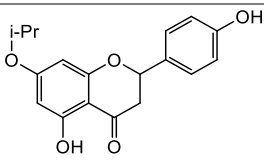
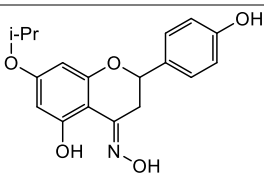
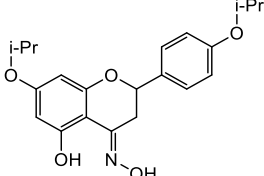
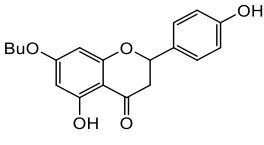
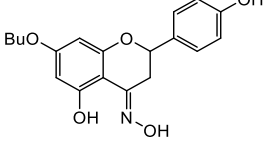
##### 4.2.4.1. Aktywność naryngeniny, jej pochodnych oraz ich oksymów jako inhibitorów wzrostu biofilmu bakterii patogennych

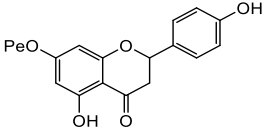
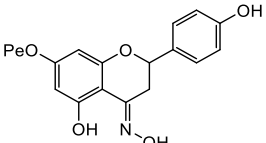
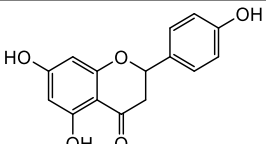
Dawniejsza współpraca prowadzona pomiędzy Katedrą Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej a Katedrą Chemii Żywności i Biokatalizy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu doprowadziła do opublikowania w 2021 roku grupy patentów polskich, dotyczących zastosowania wybranych flawonoidów jako skutecznych inhibitorów ureazy produkowanej przez *P. mirabilis*. Patenty te zostały ogłoszone pod numerami PL 238124, PL 238125, PL 238127, PL 238128, PL 238126 oraz PL 238123. Uzupełnieniem tamtego cyklu badań są przedstawione w niniejszym rozdziale testy zdolności pochodnych flawonoidowych do hamowania wzrostu mikroorganizmów, prowadzone na trzech gatunkach bakterii: *P. mirabilis*, *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*. Zastosowano pojedyncze stężenie związków wynoszące 100 µg/mL. W większości przypadków stwierdzono znacznie wyższy negatywny wpływ inhibitorów zarówno na wzrost jak i żywotność komórek *S. aureus* niż w przypadku dwóch pozostałych szczepów bakteryjnych (Tabela 19.). Jest to zgodne z tym, że wnikanie szkodliwych substancji do komórek mikroorganizmów Gram-ujemnych jest znacznie trudniejsze. W większości przypadków zaobserwowano ponad dwukrotnie silniejsze zahamowanie wzrostu bakterii Gram-dodatnich przy zastosowaniu takiego samego stężenia pochodnych naryngeniny. Jedynymi wyjątkami od tej reguły była struktura 7,4'-di-*O*-metylonaryngeniny (N3), jak również jej oksymu (N4), których wpływ na wzrost komórek bakteryjnych był znikomy w przypadku wszystkich badanych szczepów. Kolejną zależnością, którą odnotowano w przypadku niemal wszystkich związków była znacznie wyższa aktywność przeciwbakteryjna oksymów danych pochodnych naryngeniny. Najskuteczniejsze zahamowanie wzrostu formy planktonicznej komórek *P. mirabilis* wykazywały oksymy 7-*O*-pentylonaryngeniny (N13; 36,9% zahamowanie) oraz 7-*O*-butylonaryngeniny (N11; 27,4%). Co ciekawe, nie przełożyło się to na równie wysoki wpływ na żywotność komórek mikroorganizmów. Stosunkowo wysokie zahamowanie (19,1%) obserwowano też w przypadku oksymu 7-*O*-izopropylonaryngeniny (N8), dla którego stwierdzono również najwyższy wpływ na żywotność komórek tego

gatunku, która po jego zastosowaniu spadła o 44,7%. Wspomniane oksymy były znacznie skuteczniejsze po zastosowaniu ich na komórkach Gram-dodatnich. Użycie tego samego stężenia prowadziło do zahamowania wzrostu komórek *S. aureus* o 70% oraz do ponad 50% spadku ich żywotności.

Tabela 19. – Zdolność pochodnych naryngeniny oraz ich oksymów do hamowania wzrostu planktonu i biofilmu mikroorganizmów patogennych *P. mirabilis* PCM 543 (PM), *P. aeruginosa* PCM 499 (PA) oraz *S. aureus* PCM 2054 (SA)

Nr	Struktura		Wzrost plankt. wzgl. kontroli pozyt. (KP) [%]	Żywotn. plankt. wzgl. KP [%]	Wzrost biofilmu wzgl. KP [%]
<b>N1</b>		P. m.	100	79,1 ± 7,0	86,1 ± 7,7
		P. a.	81,5 ± 7,8	100	94,1 ± 5,2
		S. a.	71,8 ± 9,3	80,4 ± 4,3	100
<b>N2</b>		P. m.	99,1 ± 2,4	56,3 ± 1,5	99,0 ± 3,1
		P. a.	56,8 ± 2,7	79,7 ± 3,4	77,8 ± 3,7
		S. a.	25,4 ± 0,8	21,7 ± 2,8	63,7 ± 5,2
<b>N3</b>		P. m.	100	74,2 ± 3,3	80,5 ± 4,7
		P. a.	88,4 ± 4,3	97,4 ± 8,1	100
		S. a.	100	100	100
<b>N4</b>		P. m.	100	81,0 ± 4,8	60,9 ± 4,5
		P. a.	92,9 ± 7,7	99,4 ± 8,3	100
		S. a.	100	78,6 ± 8,2	100

<b>N5</b> 	P. m.	100	72,7 ± 4,0	95,2 ± 7,2
	P. a.	84,0 ± 5,3	100	100
	S. a.	65,8 ± 2,0	63,4 ± 0,7	100
<b>N6</b> 	P. m.	97,3 ± 4,0	74,5 ± 3,1	83,7 ± 4,0
	P. a.	69,8 ± 7,3	98,2 ± 2,0	70,4 ± 6,0
	S. a.	31,8 ± 1,5	36,7 ± 1,8	100
<b>N7</b> 	P. m.	93,1 ± 2,6	86,3 ± 6,0	62,5 ± 1,5
	P. a.	98,6 ± 5,1	87,2 ± 4,9	93,4 ± 4,7
	S. a.	44,3 ± 4,0	34,1 ± 1,7	54,2 ± 5,2
<b>N8</b> 	P. m.	80,9 ± 3,9	55,3 ± 6,2	73,6 ± 7,2
	P. a.	62,3 ± 4,3	81,6 ± 5,1	96,2 ± 6,8
	S. a.	31,0 ± 0,4	23,2 ± 2,5	40,2 ± 4,1
<b>N9</b> 	P. m.	100	62,6 ± 2,8	85,9 ± 4,0
	P. a.	89,8 ± 7,2	87,0 ± 4,4	100
	S. a.	85,2 ± 4,2	54,6 ± 1,3	100
<b>N10</b> 	P. m.	100	75,5 ± 6,1	100
	P. a.	72,5 ± 0,9	100	100
	S. a.	34,5 ± 2,1	32,1 ± 0,4	100
<b>N11</b> 	P. m.	72,6 ± 8,1	88,6 ± 5,5	69,5 ± 1,2
	P. a.	72,4 ± 5,2	96,2 ± 4,2	75,9 ± 4,6
	S. a.	29,3 ± 0,4	45,2 ± 3,7	100

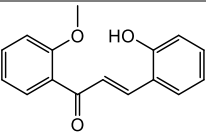
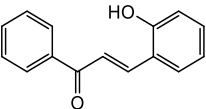
<b>N12</b> 	P. m.	100	67,6 ± 4,4	87,3 ± 9,3
	P. a.	76,5 ± 6,2	100	72,5 ± 6,6
	S. a.	46,8 ± 3,3	34,3 ± 0,3	100
<b>N13</b> 	P. m.	63,1 ± 2,4	80,4 ± 6,3	70,9 ± 7,0
	P. a.	71,8 ± 3,7	91,4 ± 4,0	93,1 ± 4,3
	S. a.	27,3 ± 1,7	34,6 ± 0,8	100
<b>Nar</b> 	P. m.	98,7 ± 4,8	60,8 ± 1,8	100
	P. a.	70,7 ± 1,7	91,2 ± 6,9	64,5 ± 5,1
	S. a.	72,1 ± 5,2	91,0 ± 3,8	89,4 ± 9,3

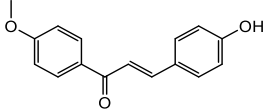
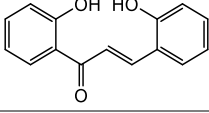
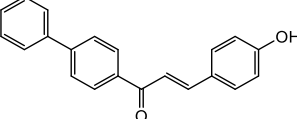
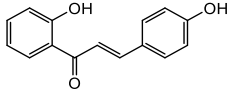
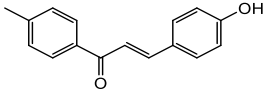
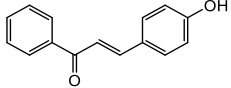
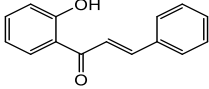
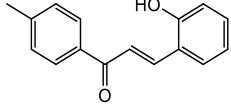
W kolejnym etapie badań dokonano próby wyznaczenia wpływu pojedynczego stężenia pochodnych naryngeniny na szybkość wzrostu biofilmu trzech szczepów bakteryjnych. Zgodnie z wstępnymi przypuszczeniami mikroorganizmy w formie biofilmu okazały się być znacznie bardziej odporne na szkodliwe działanie badanych flawonoidów (zastosowanych w takim samym stężeniu) niż te same gatunki bakterii w formie planktonicznej. Zaobserwowano ponadto, iż biofilm Gram-dodatniego szczepu *S. aureus* w wielu przypadkach charakteryzuje się wyższą odpornością na aktywność pochodnych naryngeniny niż miało to miejsce w przypadku biofilmu gatunków Gram-ujemnych. 7-*O*-Izopropylonaryngenina (N7) oraz jej oksym (N8) były jedynymi związkami w badanej grupie, dla których potwierdzono zahamowanie wzrostu biofilmu bakteryjnego wszystkich trzech zastosowanych mikroorganizmów. Oksymy 7-*O*-*n*-butylo- (N11) oraz 7-*O*-*n*-pentylonaryngeniny (N13), które były najbardziej aktywnymi inhibitorami wzrostu formy planktonicznej bakterii okazały się aktywne tylko wobec biofilmu obydwu badanych szczepów Gram-ujemnych.

#### 4.2.4.2. Aktywność pochodnych chalconów jako inhibitorów wzrostu biofilmu bakterii patogennych

Kolejną grupą flawonoidów zbadaną pod kątem potencjalnej zdolności do hamowania wzrostu biofilmu bakteryjnego stanowiły pochodne oparte na szkielecie chalconowym (Tabela 20.). Podobnie, jak w przypadku innych związków flawonoidowych, tak i te struktury badano z wykorzystaniem techniki grawimetrycznego pomiaru obciążenia biofilmem rezonatorów kwarcowych. Do badań wykorzystano szczep uropatogenny *P. mirabilis*. Pomiar wpływu stężenia 100 µg/mL pochodnych chalconowych nie przyniósł znaczącego zahamowania wzrostu biofilmu bakteryjnego przez żaden ze związków. Podwyższenie stężenia do 250 µg/mL umożliwiło z kolei obserwację zmniejszenia masy obciążającej rezonatory w przypadku kilku związków. Najskuteczniejszym inhibitorem wzrostu biofilmu okazał się być 4'-fenylo-4-hydroksychalcon (F5), dla którego stwierdzono spadek masy bakterii o 65,7%. 2,2'-Dihydroksychalcon (F4) obniżył tempo wzrostu biofilmu o 41,8%, zaś 2',4-dihydroksychalcon (F6) – o 43,1%.

Tabela 20. – Zdolność pochodnych chalconu do hamowania wzrostu planktonu i biofilmu mikroorganizmów patogennych *P. mirabilis* PCM 543

Nr	Struktura	Wzrost plankt. wzgl. kontroli pozyt. (KP) [%]	Żywotn. plankt. wzgl. KP [%]	Wzrost biofilmu wzgl. KP [%]
F1		100	92,9 ± 5,0	100
F2		66,8 ± 5,5	96,4 ± 7,8	100

<b>F3</b>		88,3 ± 7,6	97,8 ± 4,5	100
<b>F4</b>		63,0 ± 6,5	89,9 ± 7,0	58,2 ± 1,5
<b>F5</b>		71,7 ± 4,7	52,9 ± 4,9	34,3 ± 3,9
<b>F6</b>		51,4 ± 2,9	89,3 ± 5,5	56,9 ± 0,6
<b>F7</b>		28,2 ± 1,9	42,0 ± 3,1	100
<b>F8</b>		54,6 ± 5,0	61,7 ± 7,2	83,4 ± 5,1
<b>F9</b>		100	84,8 ± 7,1	78,9 ± 4,3
<b>F10</b>		88,1 ± 2,8	83,0 ± 4,2	100



## 5. PODSUMOWANIE

Celem opisanej pracy badawczej była identyfikacja nowych grup związków aktywnych jako inhibitory ureaz pochodzenia mikrobiologicznego. W szczególności badano zdolność inhibitorów do hamowania enzymów wykorzystywanych jako czynniki wirulencji przez mikroorganizmy patogenne, zarówno bakterie jak i grzyby. Ta druga grupa była reprezentowana przez gatunek patogeny *Cryptococcus neoformans*. Były to pierwsze prace wykorzystujące drożdże jako źródło ureazy prowadzone w Katedrze Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej.

1. Optymalizacja warunków hodowli i indukcji ureolizy w komórkach *C. neoformans* IHEM 3969 zakończyła się powodzeniem. Udało się sformułować dwuetapowy protokół hodowli wzrostowej i indukcji ureolizy w komórkach grzybowych i dokonać optymalizacji składu podłoża. Wieloetapowa procedura chromatograficzna z użyciem systemu ÄKTA Pure doprowadziła do uzyskania wysoce oczyszczonego preparatu ureazy z komórek tego patogenicznego mikroorganizmu, co w dalszym etapie umożliwiło wyznaczenie parametrów kinetycznych enzymu.

2. Badanie ponad 200 struktur pod kątem ich aktywności jako inhibitorów ureolizy zaowocowało odnalezieniem wielu związków aktywnych nawet w niskich stężeniach nanomolarnych względem zarówno oczyszczonej ureazy jak również całych komórek patogennych mikroorganizmów. W większości przypadków najbardziej aktywnymi związkami okazały się pochodne ebselenu. Dla najsilniejszego inhibitora ureolizy prowadzonej przez komórki uropatogenicznego gatunku *P. mirabilis* obliczono wartość  $IC_{50} = 4,194$ . Była to  $\sigma$ -metoksylowa pochodna ebselenu SF14, wybrana później do badań na biofilmie *H. pylori* Tx30a. Najbardziej aktywnym związkiem hamującym ureolizę prowadzoną przez ten gatunek była z kolei *para*-dietylofosfonowa pochodna ebselenu – struktura SP1. Wartość  $IC_{50}$  wyniosła w tym przypadku 29,53 nM.

3. Dowiedziono, że wybrane pochodne ebselenu (w komórkach ssaczych funkcjonujące jako antyoksydanty) mogą prowadzić do nadmiernego generowania stresu oksydacyjnego w komórkach mikroorganizmów.

Prawdopodobną przyczyną tej pozornej sprzeczności jest ich zdolność do inhibicji reduktazy tioredoksyny produkowanej przez mikroorganizmy przy jednoczesnym ich funkcjonowaniu jako substrat dla formy tego enzymu wykorzystywanej przez ssaki. To czyni je obiecującymi cząsteczkami bifunkcjonalnymi do zastosowania w terapii zwalczającej mikroorganizmy ureolityczne wykorzystujące system reduktazy tioredoksyny jako główny mechanizm kontrolujący stres oksydacyjny w ich komórkach.

4. Wykazano, że wybrane związki selenoorganiczne będące potwierdzonymi inhibitorami ureolizy bakteryjnej są zarazem zdolne do zahamowania wzrostu i ograniczenia żywotności oraz syntezy białek biofilmu bakteryjnego *H. pylori* Tx30a. Nie stwierdzono przy tym konieczności zastosowania stężenia wyższego niż minimalne stężenie hamujące wzrost tych bakterii w formie planktonicznej.

## 6. LITERATURA

- [1] - Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol.* 2013;4:47. doi:10.3389/fmicb.2013.00047
- [2] - Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015;40(4):277-283.
- [3] - Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis.* 2014;59 Suppl 2(Suppl 2):S71-S75. doi:10.1093/cid/ciu392
- [4] - O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. London: HM Government and Wellcome Trust; 2016. Review on Antimicrobial Resistance, chaired by Jim O'Neill
- [5] - Majumder MMI, Mahadi AR, Ahmed T, Ahmed M, Uddin MN, Alam MZ. Antibiotic resistance pattern of microorganisms causing urinary tract infection: a 10-year comparative analysis in a tertiary care hospital of Bangladesh. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2022;11(1):156. doi:10.1186/s13756-022-01197-6
- [6] - Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022;399(10325):629-655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
- [7] - Miethke M, Pieroni M, Weber T, et al. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat Rev Chem.* 2021;5(10):726-749. doi:10.1038/s41570-021-00313-1
- [8] - Annunziato G. Strategies to overcome antimicrobial resistance (AMR) making use of non-essential target inhibitors: A review. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23):5844. doi:10.3390/ijms20235844
- [9] - Mobley HL, Hausinger RP. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev.* 1989;53(1):85-108. doi:10.1128/mr.53.1.85-108.1989

- [10] - Rego YF, Queiroz MP, Brito TO, et al. A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. *J Adv Res*. 2018;13:69-100. doi:10.1016/j.jare.2018.05.003
- [11] - Hassan ST, Šudomová M. The development of urease inhibitors: What opportunities exist for better treatment of *Helicobacter pylori* infection in children?. *Children (Basel)*. 2017;4(1):2. doi:10.3390/children4010002
- [12] - Kosikowska P, Berlicki Ł. Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2011;21(6):945-957. doi:10.1517/13543776.2011.574615
- [13] - Hu LT, Mobley HL. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1990;58(4):992-998. doi:10.1128/iai.58.4.992-998.1990
- [14] - Brown JW. Gut check: can other microbes or communities phenocopy *H. pylori*'s early gastric pathology?. *Gut*. 2022;71(7):1241-1242. doi:10.1136/gutjnl-2021-325749
- [15] - Uberti AF, Olivera-Severo D, Wassermann GE, et al. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. *Toxicon*. 2013;69:240-249. doi:10.1016/j.toxicon.2013.02.009
- [16] - Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. *Helicobacter pylori*: a ROS-inducing bacterial species in the stomach. *Inflamm Res*. 2010;59(12):997-1003. doi:10.1007/s00011-010-0245-x
- [17] - Bryk R, Griffin P, Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*. 2000;407(6801):211-215. doi:10.1038/35025109
- [18] - Kuwahara H, Miyamoto Y, Akaike T, et al. *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Infect Immun*. 2000;68(8):4378-4383. doi:10.1128/IAI.68.8.4378-4383.2000

- [19] - Eaton KA, Krakowka S. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1994;62(9):3604-3607. doi:10.1128/iai.62.9.3604-3607.1994
- [20] - Nakamura H, Yoshiyama H, Takeuchi H, Mizote T, Okita K, Nakazawa T. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun*. 1998;66(10):4832-4837. doi:10.1128/IAI.66.10.4832-4837.1998
- [21] - Makristathis A, Rokita E, Labigne A, Willinger B, Rotter ML, Hirschl AM. Highly significant role of *Helicobacter pylori* urease in phagocytosis and production of oxygen metabolites by human granulocytes. *J Infect Dis*. 1998;177(3):803-806. doi:10.1086/517814
- [22] - Hedelin H. Uropathogens and urinary tract concretion formation and catheter encrustations. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;19(6):484-487. doi:10.1016/s0924-8579(02)00095-x
- [23] - Hung EW, Darouiche RO, Trautner BW. *Proteus* bacteriuria is associated with significant morbidity in spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2007;45(9):616-620. doi:10.1038/sj.sc.3102004
- [24] - Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal Plus*. 2018;8(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017
- [25] - Clapham L, McLean RJC, Nickel JC, et al. The influence of bacteria on struvite crystal habit and its importance in urinary stone formation. *J Cryst Growth*. 1990;104(2):475-484. doi:10.1016/0022-0248(90)90150-J
- [26] - McLean RJ, Lawrence JR, Korber DR, Caldwell DE. *Proteus mirabilis* biofilm protection against struvite crystal dissolution and its implications in struvite urolithiasis. *J Urol*. 1991;146(4):1138-1142. doi:10.1016/s0022-5347(17)38026-6
- [27] - Milo S, Heylen RA, Glancy J, et al. A small-molecular inhibitor against *Proteus mirabilis* urease to treat catheter-associated urinary tract infections. *Sci Rep*. 2021;11(1):3726. doi:10.1038/s41598-021-83257-2

- [28] - Armbruster CE, Smith SN, Johnson AO, et al. The pathogenic potential of *Proteus mirabilis* is enhanced by other uropathogens during polymicrobial urinary tract infection. *Infect Immun.* 2017;85(2):e00808-16. doi:10.1128/IAI.00808-16
- [29] - Armbruster CE, Smith SN, Yep A, Mobley HL. Increased incidence of urolithiasis and bacteremia during *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* coinfection due to synergistic induction of urease activity. *J Infect Dis.* 2014;209(10):1524-1532. doi:10.1093/infdis/jit663
- [30] - Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(8):873-881. doi:10.1016/S1473-3099(17)30243-8
- [31] - Alvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol.* 2006;16(21):2161-2165. doi:10.1016/j.cub.2006.09.061
- [32] - Fu MS, Coelho C, De Leon-Rodriguez CM, et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. *PLoS Pathog.* 2018;14(6):e1007144. doi:10.1371/journal.ppat.1007144
- [33] - Osterholzer JJ, Surana R, Milam JE, et al. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *Am J Pathol.* 2009;174(3):932-943. doi:10.2353/ajpath.2009.080673
- [34] - Singh A, Panting RJ, Varma A, et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *mBio.* 2013;4(3):e00220-13. doi:10.1128/mBio.00220-13
- [35] - Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol.* 2004;164(5):1761-1771. doi:10.1016/S0002-9440(10)63734-0
- [36] - Toplis B, Bosch C, Schwartz IS, et al. The virulence factor urease and its unexplored role in the metabolism of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 2020;20(4):foaa031. doi:10.1093/femsyr/foaa031

- [37] - Gatermann S, John J, Marre R. *Staphylococcus saprophyticus* urease: characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary tract infection of rats. *Infect Immun*. 1989;57(1):110-116. doi:10.1128/iai.57.1.110-116.1989
- [38] - Kinoshita T, Sahara S, Mihara Y, et al. A case of acute focal bacterial nephritis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in a 13-year-old adolescent girl treated with daptomycin. *IDCases*. 2022;29:e01594. doi:10.1016/j.idcr.2022.e01594
- [39] - Silva KCS, Silva LOS, Silva GAA, et al. *Staphylococcus saprophyticus* Proteomic Analyses Elucidate Differences in the Protein Repertoires among Clinical Strains Related to Virulence and Persistence. *Pathogens*. 2020;9(1):69. doi:10.3390/pathogens9010069
- [40] - Jose J, Schäfer UK, Kaltwasser H. Threonine is present instead of cysteine at the active site of urease from *Staphylococcus xylosus*. *Arch Microbiol*. 1994;161(5):384-392. doi:10.1007/BF00288947
- [41] - Krajewska B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. *J Mol Catal B Enzym*. 2009;59(1-3):9-21. doi:10.1016/j.molcatb.2009.01.003
- [42] - Roon RJ, Levenberg B. An adenosine triphosphate-dependent, avidin-sensitive enzymatic cleavage of urea in yeast and green algae. *J Biol Chem*. 1968;243(19):5213-5215.
- [43] - Kappaun K, Piovesan AR, Carlini CR, Ligabue-Braun R. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties - A review. *J Adv Res*. 2018;13:3-17. doi:10.1016/j.jare.2018.05.010
- [44] - Konieczna I, Zarnowiec P, Kwinkowski M, et al. Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 2012;13(8):789-806. doi:10.2174/138920312804871094
- [45] - Soriano A, Hausinger RP. GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(20):11140-11144. doi:10.1073/pnas.96.20.11140

- [46] - Zambelli B, Musiani F, Benini S, Ciurli S. Chemistry of Ni<sup>2+</sup> in urease: sensing, trafficking, and catalysis. *Acc Chem Res.* 2011;44(7):520-530. doi:10.1021/ar200041k
- [47] - Muller C, Bahlawane C, Aubert S, et al. Hierarchical regulation of the NikR-mediated nickel response in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(17):7564-7575. doi:10.1093/nar/gkr460
- [48] - Contreras M, Thiberge JM, Mandrand-Berthelot MA, Labigne A. Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 2003;49(4):947-963. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03621.x
- [49] - Kim JK, Mulrooney SB, Hausinger RP. Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins. *J Bacteriol.* 2005;187(20):7150-7154. doi:10.1128/JB.187.20.7150-7154.2005
- [50] - Roberts BP, Miller BR 3rd, Roitberg AE, Merz KM Jr. Wide-open flaps are key to urease activity. *J Am Chem Soc.* 2012;134(24):9934-9937. doi:10.1021/ja3043239
- [51] - Benini S, Kosikowska P, Cianci M, et al. The crystal structure of *Sporosarcina pasteurii* urease in a complex with citrate provides new hints for inhibitor design. *J Biol Inorg Chem.* 2013;18(3):391-399. doi:10.1007/s00775-013-0983-7
- [52] - Kafarski P, Talma M. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *J Adv Res.* 2018;13:101-112. doi:10.1016/j.jare.2018.01.007
- [53] - Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 2014;22(8):438-445. doi:10.1016/j.tim.2014.04.007
- [54] - Swallow S. Chapter two - fluorine in medicinal chemistry. *Prog Med Chem.* 2015;54:65-133. doi: 10.1016/bs.pmch.2014.11.001
- [55] - Zaborska W, Krajewska B, Kot M, Karcz W. Quinone-induced inhibition of urease: elucidation of its mechanisms by probing thiol



groups of the enzyme. *Bioorg Chem.* 2007;35(3):233-242. doi:10.1016/j.bioorg.2006.11.001

[56] - Nisar M, Khan SA, Shah MR, et al. Moxifloxacin-capped noble metal nanoparticles as potential urease inhibitors. *New J Chem.* 2015;39(10):8080-8086. doi:10.1039/C5NJ01571E

[57] - Abdullah MA, Abuo-Rahma GE, Abdelhafez EM, Hassan HA, Abd El-Baky RM. Design, synthesis, molecular docking, anti-*Proteus mirabilis* and urease inhibition of new fluoroquinolone carboxylic acid derivatives. *Bioorg Chem.* 2017;70:1-11. doi:10.1016/j.bioorg.2016.11.002

[58] - Svane S, Sigurdarson JJ, Finkenwirth F, Eitinger T, Karring H. Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Sci Rep.* 2020;10(1):8503. doi:10.1038/s41598-020-65107-9

[59] - Li WY, Ni WW, Ye YX, et al. *N*-monoarylaceto thioureas as potent urease inhibitors: synthesis, SAR, and biological evaluation. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020;35(1):404-413. doi:10.1080/14756366.2019.1706503

[60] - Rauf A, Shahzad S, Bajda M, et al. Design and synthesis of new barbituric- and thiobarbituric acid derivatives as potent urease inhibitors: Structure activity relationship and molecular modeling studies. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(17):6049-6058. doi:10.1016/j.bmc.2015.05.038

[61] - Mumtaz A, Arshad J, Saeed A, et al. Synthesis, characterization and urease inhibition studies of transition metal complexes of thioureas bearing ibuprofen moiety. *J Chil Chem Soc.* 2018;63(2):3934-3940. doi:10.4067/s0717-97072018000203934

[62] - Liu H, Wang Y, Lv M, et al. Flavonoid analogues as urease inhibitors: Synthesis, biological evaluation, molecular docking studies and in-silico ADME evaluation. *Bioorg Chem.* 2020;105:104370. doi:10.1016/j.bioorg.2020.104370

[63] - Loes AN, Ruyle L, Arvizu M, Gresko KE, Wilson AL, Deutch CE. Inhibition of urease activity in the urinary tract pathogen *Staphylococcus*

*saprophyticus*. *Lett Appl Microbiol*. 2014;58(1):31-41.  
doi:10.1111/lam.12153

[64] - Al-Rooqi MM, Mughal EU, Raja QA, et al. Flavonoids and related privileged scaffolds as potential urease inhibitors: a review. *RSC Adv*. 2023;13(5):3210-3233. doi:10.1039/d2ra08284

[65] - Sharaf M, Arif M, Hamouda HI, et al. Preparation, urease inhibition mechanisms, and anti-*Helicobacter pylori* activities of hesperetin-7-rhamnoglucoside. *Curr Res Microb Sci*. 2021;3:100103. doi:10.1016/j.crmicr.2021.100103

[66] - Yu XD, Zheng RB, Xie JH, et al. Biological evaluation and molecular docking of baicalin and scutellarin as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *J Ethnopharmacol*. 2015;162:69-78. doi:10.1016/j.jep.2014.12.041

[67] - Gould WD, Cook FD, Bulat JA. Inhibition of urease by heterocyclic sulfur compounds. 1978;42(1):66-72. doi:10.2136/sssaj1978.03615995004200010015x

[68] - Hanif M, Kanwal F, Rafiq M, et al. Symmetrical heterocyclic cage skeleton: Synthesis, urease inhibition activity, kinetic mechanistic insight, and molecular docking analyses. *Molecules*. 2019;24(2):312. doi:10.3390/molecules24020312

[69] - Mumtaz S, Iqbal S, Shah M, et al. New triazinoindole bearing benzimidazole/benzoxazole hybrids analogs as potent inhibitors of urease: synthesis, *in vitro* analysis and molecular docking studies. *Molecules*. 2022;27(19):6580. doi:10.3390/molecules27196580

[70] - Abdou MM, O'Neill PM, Amigues E, Matziari M. Phosphinic acids: current status and potential for drug discovery. *Drug Discov Today*. 2019;24(3):916-929. doi:10.1016/j.drudis.2018.11.016

[71] - Macegoniuk K, Dziełak A, Mucha A, Berlicki Ł. Bis(aminomethyl)phosphinic acid, a highly promising scaffold for the development of bacterial urease inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2014;6(2):146-150. doi:10.1021/ml500380f

- [72] - Ntatsopoulos V, Vassiliou S, Macegoniuk K, Berlicki Ł, Mucha A. Novel organophosphorus scaffolds of urease inhibitors obtained by substitution of Morita-Baylis-Hillman adducts with phosphorus nucleophiles. *Eur J Med Chem.* 2017;133:107-120. doi:10.1016/j.ejmech.2017.03.070
- [73] - Hughes RB, Katz SA, Stubbins SE. Inhibition of urease by metal ions. *Enzymologia.* 1969;36(6):332-334.
- [74] - Zaborska W, Krajewska B, Olech Z. Heavy metal ions inhibition of jack bean urease: potential for rapid contaminant probing. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004;19(1):65-69. doi:10.1080/14756360310001650237
- [75] - Krajewska B. Mono- (Ag, Hg) and di- (Cu, Hg) valent metal ions effects on the activity of jack bean urease. Probing the modes of metal binding to the enzyme. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2008;23(4):535-542. doi:10.1080/14756360701743051
- [76] - Dixon NE, Gazzola C, Watters JJ, Blakely RL, Zerner B. Inhibition of Jack Bean urease (EC 3.5.1.5) by acetohydroxamic acid and by phosphoramidate. An equivalent weight for urease. *J Am Chem Soc.* 1975;97(14):4130-4131. doi:10.1021/ja00847a044
- [77] - Kumar S, Kayastha AM. Acetohydroxamic acid - a competitive inhibitor of urease from soybean "Glycine max". *Med Chem Res.* 2010;19(1):113-114. <https://www.semanticscholar.org/paper/Acetohydroxamic-Acid-A-Competitive-Inhibitor-of-Kumar-Kayastha/f27a080c6e6b59dc6d10e09100e0ddb54372deb1>
- [78] - Putcha L, Griffith DP, Feldman S. Pharmacokinetics of acetohydroxamic acid in patients with staghorn renal calculi. *Eur J Clin Pharmacol.* 1985;28(4):439-445. doi:10.1007/BF00544364
- [79] - Musher DM, Saenz C, Griffith DP. Interaction between acetohydroxamic acid and 12 antibiotics against 14 gram-negative pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974;5(2):106-110. doi:10.1128/AAC.5.2.106

- [80] - Tabuchi Y, Kurebayashi Y. Antisecretory and antiulcer effects of ebselen, a seleno-organic compound, in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1993;61(3):255-257. doi:10.1254/jjp.61.255
- [81] - Parnham MJ. Biological activities and clinical potential of ebselen. *Adv Exp Med Biol.* 1990;264:193-197. doi:10.1007/978-1-4684-5730-8\_31
- [82] - Ren X, Zou L, Lu J, Holmgren A. Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic. *Free Radic Biol Med.* 2018;127:238-247. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.081
- [83] - Macegoniuk K, Grela E, Palus J, et al. 1,2-Benziselenazol-3(2H)-one derivatives as a new class of bacterial urease inhibitors. *J Med Chem.* 2016;59(17):8125-8133. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00986
- [84] - Aniceto N, Bonifácio VDB, Guedes RC, Martinho N. Exploring the chemical space of urease inhibitors to extract meaningful trends and drivers of activity. *J Chem Inf Model.* 2022;62(15):3535-3550. doi:10.1021/acs.jcim.2c00150
- [85] - Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem.* 1967;39(8):971-974. doi:10.1021/ac60252a045
- [86] - Grela E, Dziełak A, Szydłowska K, Mucha A, Kafarski P, Grabowiecka AM. Whole-cell *Proteus mirabilis* urease inhibition by aminophosphinates for the control of struvite formation. *J Med Microbiol.* 2016;65(10):1123-1129. doi:10.1099/jmm.0.000342
- [87] - Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011;48(4):412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1
- [88] - Copeland RA. Enzymes – a practical introduction to structure, mechanism and data analysis. Nowy Jork, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2000.
- [89] - Pawełczak M, Hurek J. Inhibicja enzymatyczna wolnowiążąca. *Chemik.* 2014;68(4):377-384. [https://miesiecznikchemik.pl/wp-content/uploads/2015/01/chemik\\_2014\\_04-15.pdf](https://miesiecznikchemik.pl/wp-content/uploads/2015/01/chemik_2014_04-15.pdf)

- [90] - Brooks T, Keevil CW. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 1997;24(3):203-206. doi:10.1046/j.1472-765x.1997.00378.x
- [91] - Balaiya S, Chalam KV. An *in vitro* assay to quantify nitrosative component of oxidative stress. *J Mol Genet Med.* 2014;8(3):120. doi:10.4172/1747-0862.1000120
- [92] - Arnér ES, Holmgren A. Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Curr Protoc Toxicol.* 2001;Chapter 7.: doi:10.1002/0471140856.tx0704s05
- [93] - Piasecki T, Guła G, Waszczuk K, Drulis-Kawa Z, Gotszalk T. Quartz tuning fork as *in-situ* sensor of bacterial biofilm. *Procedia Eng.* 2014;87:369-372. doi:10.1016/j.proeng.2014.11.740
- [94] - Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* 1995;59(3):451-480. doi:10.1128/mr.59.3.451-480.1995
- [95] - Richter MF, Drown BS, Riley AP, et al. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic. *Nature.* 2017;545(7654):299-304. doi:10.1038/nature22308
- [96] - Pagoni A, Grabowiecka A, Tabor W, Mucha A, Vassiliou S, Berlicki Ł. Covalent inhibition of bacterial urease by bifunctional catechol-based phosphonates and phosphinates. *J Med Chem.* 2021;64(1):404-416. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01143
- [97] - Mazzei L, Cianci M, Musiani F, Lente G, Palombo M, Ciurli S. Inactivation of urease by catechol: Kinetics and structure. *J Inorg Biochem.* 2017;166:182-189. doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.11.016
- [98] - Krzyżek P, Migdał P, Paluch E, Karwańska M, Wieliczko A, Gościński G. Myricetin as an antivirulence compound interfering with a morphological transformation into coccoid forms and potentiating activity of antibiotics against *Helicobacter pylori*. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2695. doi:10.3390/ijms22052695
- [99] - Macegoniuk K, Tabor W, Mazzei L, et al. Optimized ebselen-based inhibitors of bacterial ureases with nontypical mode of action. *J Med Chem.* 2023;66(3):2054-2063. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01799



## 7. DOROBEK NAUKOWY AUTORA

### Publikacje

- Pagoni A, Grabowiecka A, Tabor W, Mucha A, Vassiliou S, Berlicki Ł. Covalent inhibition of bacterial urease by bifunctional catechol-based phosphonates and phosphinates. *J Med Chem.* 2021;64(1):404-416. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01143

- Vassiliou S, Pagoni A, Węglarz-Tomczak E, Talma M, Tabor W, Grabowiecka A, Berlicki Ł, Mucha A. Phosphinic acid-based enzyme inhibitors. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* 2022;197(5-6):451-456. doi: 10.1080/10426507.2021.2011882

- Macegoniuk K, Tabor W, Mazzei L, Cianci M, Giurg M, Olech K, Burda-Grabowska M, Kaleta R, Grabowiecka A, Mucha A, Ciurli S, Berlicki Ł. Optimized ebselen-based inhibitors of bacterial ureases with nontypical mode of action. *J Med Chem.* 2023;66(3):2054-2063. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01799

- Maślanka M, Tabor W, Krzyżek P, Grabowiecka A, Berlicki Ł, Mucha A. Inhibitory activity of catecholic phosphonic and phosphinic acids against *Helicobacter pylori* ureolysis. *Eur J Med Chem.* Zaakceptowano 25.05.2023

### Prezentacje konferencyjne

- Tabor W, Ntatsopoulos V, Vassiliou S, Mucha A, Berlicki Ł, Grabowiecka A; Novel cysteine-targeting inhibitors of bacterial urease; EFMC-ACSMEDI MedChem Frontiers, 10-13.06.2019, Kraków, Polska – poster, autor prezentujący

- Tabor W, Pagoni A, Grabowiecka A, Mucha A, Vassiliou S, Berlicki Ł; Covalent inhibition of bacterial urease by bifunctional catechol-based phosphonates and phosphinates; EFMC-ISMC & EFMC-YMSC Virtual Poster Session, 09.09.2020, Online – poster, autor prezentujący

- Loharch S, Tabor W, Berlicki Ł; Organoselenium based compounds as potent inhibitors of bacterial urease; EFMC-ISMIC XXVI EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, 29.08-02.09.2021, Online – poster, współautor

- Tabor W, Krzyżek P, Nawrot U, Mucha A, Berlicki Ł, Grabowiecka A; Ebselen based inhibitors of urease affect the viability of *Cryptococcus neoformans* and *Helicobacter pylori*; ACCORD Interdisciplinary Conference on Drug Sciences, 26-28.05.2022, Warszawa, Polska – poster + krótka prezentacja ustna, autor prezentujący

- Maślanka M, Tabor W, Grabowiecka A, Mucha A; Synteza i aktywność biologiczna nowych pochodnych benzisoselenazol-3(2*H*)-onu wobec ureazy bakteryjnej; „Na pograniczu chemii i biologii” - XVIII Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów, 12-15.06.2022, Smardzewice, Polska – poster + prezentacja ustna, współautor

- Maślanka M, Tabor W, Grabowiecka A, Mucha A; Nowe fosforoorganiczne inhibitory ureazy – synteza, stabilność i aktywność biologiczna; XV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 20-22.06.2022, Toruń, Polska – poster, współautor

- Maślanka M, Tabor W, Grabowiecka A, Mucha A; Fosforoorganiczne pochodne benzisoselenazolu-3(2*H*)-onu i katecholu jako inhibitory ureazy o hybrydowym mechanizmie działania; 64. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 11-16.09.2022, Lublin, Polska - poster, współautor

- Tabor W, Macegoniuk K, Grabowiecka A, Ciurli S, Mazzei L, Mucha A; Ebselen derivatives as picomolar inhibitors of bacterial ureases; ESCMID/ASM Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance, 04-07.10.2022, Dublin, Irlandia - poster, autor prezentujący

- Grabowiecka A, Tabor W, Krzyżek P, Nawrot U, Mucha A, Berlicki Ł; Organoselenium inhibitors reduce ureolysis and viability of *C. neoformans* and *H. pylori*; ESCMID/ASM Conference on Drug



Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance, 04-07.10.2022, Dublin, Irlandia - poster, współautor

### **Grant**

Stypendium finansowane z projektu OPUS 16 Narodowe Centrum Nauki *Inhibitory ureazy o podwójnym mechanizmie działania i ich aktywność przeciwwirulentna względem Helicobacter pylori i Cryptococcus neoformans*, 2018/31/B/NZ6/02017, kierownik – prof. dr hab. inż. Artur Mucha

Składam podziękowanie za finansowanie badań w ramach wyżej wymienionego projektu grantowego.

## 8. STRESZCZENIE PRACY

Narastające zjawisko oporności antybiotykowej mikroorganizmów patogennych stanowi istotny problem w obliczu braku alternatywnych metod zwalczania wywoływanych przez nie infekcji. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania metodami ograniczania rozprzestrzeniania mikroorganizmów patogennych poprzez zaburzenie aktywności ich czynników wirulencji – mechanizmów umożliwiających efektywne zakażenie organizmu gospodarza. U niektórych gatunków zakaźnych rolę taką pełni ureaza – enzym z klasy hydrolaz, katalizujący hydrolizę mocznika. Mikrobiologiczne mechanizmy wspierania wirulencji poprzez wytwarzanie i aktywność ureazy są różnorodne, od wykorzystywania mocznika jako źródła azotu dla wzrostu czy modulowania pH otoczenia komórki, po skomplikowane procesy zapalne będące konsekwencją reakcji organizmu gospodarza na obecność białka ureazowego niezależnie od enzymatycznej aktywności.

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono badania możliwości kontroli aktywności ureolitycznej w szczepach reprezentujących bakteryjne i drożdżowe gatunki patogenne, w których ureaza pełni zróżnicowane funkcje, a jej aktywność prowadzi do odmiennych konsekwencji zdrowotnych. W przypadku gatunku grzybowego *C. neoformans* rola ureazy w mechanizmie patogenezы nie jest dokładnie zbadana, podobnie jak systemy regulujące jej aktywność. Praca zawiera opracowanie protokołu indukcji ureolizy w komórkach *C. neoformans* oraz przedstawia właściwości wyizolowanego enzymu drożdżowego.

Główną część rozprawy stanowi opracowanie wyników badań inhibicji ureaz pochodzenia mikrobiologicznego przez grupę ponad 200 różnorodnych strukturalnie związków chemicznych. Wśród badanych struktur znalazły się między innymi analogi katecholu, ebselenu, związki fosfonianowe, związki zawierające fragment tiomocznika (analog substratu reakcji) oraz pochodne hybrydowe stanowiące połączenie wybranych funkcjonalności. Najbardziej obiecujące inhibitory zostały dodatkowo zbadane pod kątem potencjalnej zdolności do hamowania aktywności innych kluczowych enzymów, takich jak reduktaza

tioredoksyny stanowiąca element systemu ograniczającego stres oksydacyjny w komórkach mikroorganizmów. Badano również ich wpływ na wzrost i żywotność biofilmu bakteryjnego – struktury zwykle charakteryzującej się znacznie podwyższoną odpornością na powszechnie stosowane antybiotyki. Dla wielu efektywnych inhibitorów potwierdzono ich skuteczność w hamowaniu rozkładu mocznika przez żywe komórki mikroorganizmów.

## 9. ABSTRACT

The growing phenomenon of antimicrobial resistance in pathogenic microorganisms presents an emerging issue given the lack of methods alternative to antibiotic treatment to combat infections. In recent years there has been growing interest in developing techniques of limiting the spread of pathogenic microorganisms by disrupting the activity of their virulence factors – mechanisms enabling them to effectively infect the host organism. In several infectious strains such is the role of urease – an enzyme of the hydrolase class that catalyzes the hydrolysis of urea. Mechanisms of virulence that involve expression and activity of urease in microorganisms are numerous and include but are not necessarily limited to: utilizing urea as a nitrogen source for growth, changing the pH of the cell environment for survival, or complex inflammatory processes as a host reaction to the very presence of urease protein, catalytically active or not, that facilitate tissue colonization.

This thesis presents the results of research on the possibilities to control ureolytic activity of bacterial and fungal pathogenic strains in which urease constitutes diverse virulence factors leading to various consequences to the host's health. The studies included *C. neoformans* for which the role of urease and control mechanisms of its activity has not been fully characterized so far. Within this study, a protocol of ureolysis induction in the *C. neoformans* cells as well as the properties of the isolated yeast enzyme were described.

The main part of the thesis consists of the analysis of microbial urease inhibition studies conducted for over 200 structurally various chemicals. Among the studied compounds were e.g. analogues of catechol, ebselen derivatives, phosphonic structures, thiourea derivatives (reaction substrate analogue) and hybrid, multifunctional compounds. The most active structures were additionally studied for their potential inhibitory activity towards other pivotal enzymes such as thioredoxin reductase that is a part of a mechanism controlling oxidative stress in microbial cells. Their influence on the growth and viability of bacterial biofilm, a structure known for its enhanced resistance to commonly used antibiotics, was also studied. For numerous effective

inhibitors their ability to impair ureolysis in the whole cells of microorganisms was also confirmed.