

# ZAVIRALCI UREAZE UREASE INHIBITORS

AVTOR / AUTHOR:

Rok Frlan, mag. farm.

*Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

Email: rok.frlan@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Ureaza (urea amidohidrolaza, E.C. 3.5.1.5) je metaloencim, ki zaseda posebno mesto v zgodovini organske kemije in biokemije. Sečnina, ki je substrat ureaze, je bila namreč prva sintezna organska spojina, ki so jo uspeli pripraviti iz anorganskih spojin (Friedrich Wöhler, 1828). Ureaza je tudi prvi kristaliziran encim, ki je leta 1926 služil kot posreden dokaz, da so glavna sestavina encimov proteini (Nobelova nagrada, 1946). Poleg tega je to eden redkih encimov z nikljem kot kofaktorjem v aktivnem mestu (1).

V naravi se na leto proizvedejo ogromne količine sečnine, ki nastanejo kot posledica izločanja urina, razkrajanja mrtvih organizmov in uporabe umetnih gnojil. Ker je nekatalizirana spontana hidroliza sečnine dokaj počasen proces ( $\tau_{1/2} \approx 33$  let), bi se ob odsotnosti ureaz le-ta kopičila v naravi. Z ureazami katalizirana hidroliza je  $10^{17}$  krat hitrejša, kot glavna produkta pa nastaneta amoniak in karbamska kislina, ki nato ob prisotnosti vode spontano hidrolizira do ogljikove kisline in dodatne molekule amoniaka (slika 1) (1).

Encim je zaradi lahke dostopnosti substrata široko zastopan v rastlinah, bakterijah in glivah, ne najdemo pa ga pri živalih. Ureaze imajo zelo pomembno vlogo pri homeostazi dušika v naravi. Ureoliza je namreč zadnja stopnja metabolizma dušika pri nekaterih organizmih, medtem ko je pri

## POVZETEK

Ureaza je encim, ki katalizira hidrolizo sečnine do amoniaka in karbamske kisline. Ta encim je tudi eden glavnih vzrokov za razvoj mnogih bolezni, ki nastanejo zaradi okužb z urolitičnimi mikroorganizmi. Med temi sta najbolj poznani peptična razjeda, ki jo povzroča *Helicobacter pylori*, in sečni kamni, ki jih povzročajo *Proteus spp.* ter nekatere druge ureolitične bakterije. Izkoreninjenje bakterij in zdravljenje posledic okužbe je najučinkovitejši način terapije. Ta je zaenkrat relativno uspešna, vendar je ob naglem povečevanju rezistence na protibakterijske učinkovine načrtovanje in razvoj novih načinov zdravljenja pomemben ukrep za učinkovit nadzor nad omenjenimi okužbami. Ena od zelo perspektivnih tarč pri razvoju novih zaviralcev in cepiv so prav ureaze. Razvitih je bilo mnogo selektivnih zaviralcev ureaze, od katerih je najbolj poznana acetohidroksamska kislina, ki je tudi edina z dovoljenjem FDA za uporabo pri okužbah urinarnega trakta.

## KLJUČNE BESEDE:

*Ureaze, zaviralci, peptična razjeda, sečni kamni, Helicobacter pylori*

## ABSTRACT

Urease is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of urea to ammonia and carbamate. Ureolytic activity of human pathogens, such as *Helicobacter pylori*, *Proteus spp.* and others is thought to be a causative factor of many clinical conditions, such as peptic ulcer and urinary infection stones. The most efficient therapy which is quite successful at the moment is complete eradication of bacteria and treatment of disease symptoms. Because of the increasing resistance to antibacterial agents the design of new treatment routes is becoming a new focal point to control these diseases in the future. One of perspective targets in the design of novel inhibitors and vaccines is urease. Many inhibitors have been developed so far, however only one compound, acetohydroxamic acid, has been used clinically for the treatment of urinary tract infections.

## KEYWORDS:

*Ureases, inhibitors, peptic ulcer, urinary stones, Helicobacter pylori*

drugih organizmih amoniak tisti vir dušika, ki ga ti potrebujejo za rast in razvoj (2).

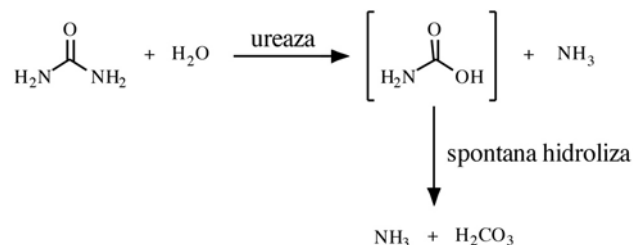
## 2 PATOFIZIOLOŠKA VLOGA UREAZ

Kljub nedvomno pomembni vlogi v homeostazi dušika imajo ureaze nekaterih gliv in bakterij pomembno vlogo pri razvoju nekaterih bolezenskih stanj, predvsem v prebavilih in sečilih, od katerih sta najbolj pogosti in poznani obolenji peptična razjeda in sečni kamni (2). Težave pri okužbah z urolitičnimi organizmi so predvsem posledica dveh vzrokov: a) lokalnega dviga pH v področjih, ki so v običajnih fizioloških razmerah nevtralna oziroma kislja, kar lahko, v odvisnosti od kolonizacijskega mesta, povzroči vrsto škodljivih posledic, b) sproščenega amoniaka, ki je toksičen za sesalske celice in lahko povzroča resne metabolne motnje v večini živalskih tkiv in organov (3).

Po drugi strani pa je delovanje ureaz iz mikroorganizmov v našem organizmu lahko tudi koristno, saj imajo le-te eno od ključnih vlog pri homeostazi ustne votline. Pretvorba sečnine do amoniaka s pomočjo ureaz namreč zavira glikolitično nakisanje in nastajanje zobnih oblog (4).

### 2.1 POMEN UREAZ PRI OKUŽBAH SEČIL

Sečni kamni so bolezen, ki prizadene približno 5% prebivalstva. Gre za pogosto in resno patološko stanje, ki lahko ob zakasnelem ali neustreznem zdravljenju privede do ledvične odpovedi ali smrti zaradi urosepse. Kamni ponavadi nastanejo zaradi spleta večih dejavnikov, vendar so glavni vzrok za nastanek kamnov predvsem metabolne motnje, dolgotrajne okužbe z urolitičnimi bakterijami (infekcijski led-



Slika 1: Z ureazo katalizirana hidroliza sečnine (1).  
Figure 1: Urease catalyzed urea hydrolysis (1).

vični kamni) in obstrukcija urinarnega trakta. Urolitična aktivnost ureaz bakterij rodov *Ureaplasma*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* in *Klebsiella* v urinu je pomemben dejavnik pri nastanku 15% vseh ledvičnih kamnov. Glavni spojini, ki ob tem sprožita nastajanje precipitativ v urinu sta amoniak in CO<sub>2</sub>, ki v višjih koncentracijah povzročata obarjanje polivalentnih kationov v obliki amonijevega urata, struvita (amonijev magnezijev fosfat) in/ali karbonatnega apatita (slika 2). Značilnost tovrstnih infekcij je zelo hitra rast kamnov, ki ponavadi nastanejo v 4-6 tednih (5)(6).

Zdravljenje bolnikov poteka najbolj učinkovito v več stopnjah (5):

a) odstranjevanje sečnih kamnov.

Če so kamni manjši od 5 mm se ponavadi izločijo sami v štirih tednih po nastopu simptomov, vendar je pri hujših infekcijah potrebna njihova kirurška odstranitev.

b) odstranjevanje urolitičnih bakterij z antibiotiki

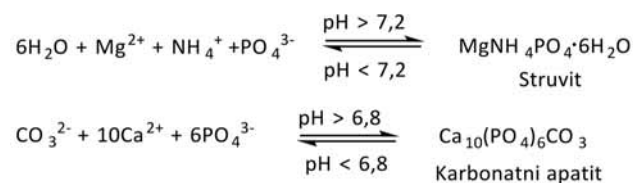
Cilj terapije z antibiotiki je uničenje vseh urolitičnih bakterij in posledično vzdrževanje topnostnega produkta struvita in apatita pod kritično koncentracijo obarjanja. Ob sočasni odstranitvi že prisotnih sečnih kamnov in antibiotično terapijo je možnost ponovnega pojava kristalizacijskih jeder 10%.

c) preventiva pred ponovitvijo okužbe.

Najpomembnejši ukrep za preprečevanje ponavljajočih okužb sečil in ponovnega nastajanja kamnov je zadošten vnos tekočine.

### 2.2 OKUŽBE PREBAVIL S *H. PYLORI*

*H. pylori* je Gram-negativna bakterija, s katero je okužena več kot polovica človeške populacije. Ureaza, ki predstavlja kar 5 - 10 % celotne mase proteinov *H. pylori*, je glavni vzrok za razvoj gastroduodenalnih bolezni, kot so atrofični gastritis, gastrični esofagealni refluks (GERD), dispepsija in peptična razjeda (*H. pylori* je prisotna pri več kot 70% primerov), ki lahko povzročijo MALT limfom ali rak želodca.



Slika 2: Mehanizem tvorbe infekcijskih sečnih kamnov iz amoniaka in ogljikovega dioksida, ki nastaneta pri hidrolizi sečnine (5).

Figure 2: Formation of infection-induced stones from ammonia and carbon dioxide formed during urea hydrolysis (5).



Bakterija se zna učinkovito prilagoditi na smrtonosni kisljeni medij želodca, pri čemer si pomaga z reakcijo ureolize sečnine do CO<sub>2</sub> in amoniaka. Slednji nevtralizira okolico bakterije in ji na ta način omogoča preživetje, hkrati pa povzroča poškodbe epitelijskega ter kronično vnetje želodčne sluznice, kar omogoči širjenje infekcije globlje v mukozo. Tudi sproščeni CO<sub>2</sub> ima pomembno vlogo pri zagotavljanju preživetja bakterije, saj nevtralizira za bakterijo toksični peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), ki ga proizvaja imunski sistem. Poleg tega ima tudi sam encim pomembno vlogo v imunskem odzivu med razvojem bolezni, saj stimulira proizvodnjo mutagenih reaktivnih kisikovih zvrsti (6).

Izkoreninjenje okužbe s *H. pylori* je najučinkovitejše zdravljenje razjed, hkrati pa se na ta način zmanjša verjetnost ponovitve bolezni. Standardno zdravljenje traja v Evropi in na Japonskem en teden in je sestavljeno iz zaviralca protonске črpalke ter dveh antibiotikov (klaritromicin, amoksisicilin/metronidazol). Število okuženih v zadnjih letih se v razvitih deželah in v Sloveniji zaradi boljših higienskih in bivalnih razmer ter zaradi uspešnega eradikacijskega zdravljenja zmanjšuje. Prevalenca okužbe v Sloveniji je 25,1%, kar je primerljivo z evropskim povprečjem (7).

## 3 ZAVIRALCI UREAZE

### 3.1 UVOD

Trenutno stanje na področju razvoja novih protibakterijskih učinkovin je resno, saj sta hitrost pojava in raznolikost rezistentnih organizmov v zadnjih desetletjih močno narasli. Za določene bakterijske okužbe tako nimamo več na voljo ustreznih zdravil, kar je predvsem posledica velike evolucijske pogojene sposobnosti prilagajanja bakterij na spremembe v okolju (8).

Podoben trend beležimo tudi pri zdravljenju okužb z urolitičnimi bakterijami. Kljub relativno uspešnemu zdravljenju okužb s *H. pylori*, je pojav rezistentnih sevov skrb vzbujajoč, saj se le-ta pričakovano naglo povečuje. Po podatkih iz leta 2009 je v Sloveniji rezistentnost na klaritromicin 17,5 %, na metronidazol pa 18,6 %. Zaradi naraščajoče rezistence se uspešnost prvega zdravljenja v večini držav, vključno s Slovenijo, naglo znižuje in je trenutno pod 80% (9). Zdravljenje okužb urinarnega trakta je manj skrb vzbujajoče, saj imamo zaenkrat še vedno na voljo dovolj velik

nabor zdravilnih učinkovin. Vendar je, glede na splošen trend naraščanja rezistence, verjetno samo vprašanje časa, kdaj se bodo tudi pri teh okužbah pojavili multirezistentni sevi (10).

Načrtovanje in razvoj novih načinov zdravljenja je zato pomemben ukrep za učinkovit nadzor nad tovrstnimi okužbami v bližnji prihodnosti. Ena od zelo perspektivnih tarč pri razvoju novih zaviralcev in cepiv so prav ureaze, ki so kot pomemben antigen in virulencijski faktor vpletene v mnoga bolezenska stanja. Velik raziskovalni napor je bil usmerjen predvsem v iskanje cepiv in zaviralcev ureaze *H. pylori*. Kljub vzpodbudnim imunološkim rezultatom na živalih zaenkrat še nimamo razvitega cepiva proti ureazi te bakterije. Največji napredek je tako dosežen pri razvoju nizkomolekularnih zaviralcev, katerih uporaba je še vedno omejena zaradi nekaterih resnih neželenih učinkov in/ali slabih farmakokinetičnih lastnosti. Razvoj na tem področju je trenutno usmerjen predvsem v iskanje varnejših učinkovin z dobrimi farmakokinetičnimi lastnostmi, kar predstavlja pomemben ukrep za nadzor nad to boleznijo v prihodnosti. Selektivni zaviralci ureaz tudi ponujajo možnost nadomeščanja drage triterne terapije s cenejšim in bolj selektivnim pristopom (2)(6)(11).

Zaviralce ureaze lahko glede na njihovo kemijsko strukturo razdelimo na derivate hidroksamskih kislin, fosfordiamidate in alkilfosfinat, komplekse kovin in njihove soli, organokovinske zaviralce, polifenole, tiole in sulfide ter imidazole. Nekaj strukturnih razredov izkazuje visoko zaviralno aktivnost, pri čemer še posebej izstopajo hidroksamske kisline in fosfordiamidati. Obširni *in vivo* poskusi so pokazali, da imajo zaviralci ureaz (predvsem acetohidroksamska kislina (AHK) in flurofamid) velik potencial za zdravljenje okužb gastrointestinalnega in urogenitalnega trakta. Biokemične in klinične lastnosti predstavnikov nekaterih pomembnejših strukturnih razredov so prikazane v preglednici 1 (12).

### 3.2 HIDROKSAMSKE KISLINE

Hidroksamske kisline (slika 3) predstavljajo eno od najbolj proučevanih skupin zaviralcev različnih encimov, med katerimi so tudi ureaze. Njihovo zaviralno delovanje je posledica keliranja enega od Ni v aktivnem mestu encima, s katerim tvorijo močno ion-dipol interakcijo (12).

Najbolj poznana zaviralca s hidroksamsko funkcionalno skupino sta hidroksisečnina (hidroksikarbamid) in acetohidroksamska kislina. Prva se uporablja kot antineoplastična

Preglednica 1: Biokemične in klinične lastnosti nekaterih pomembnejših zaviralcev ureaze (12).

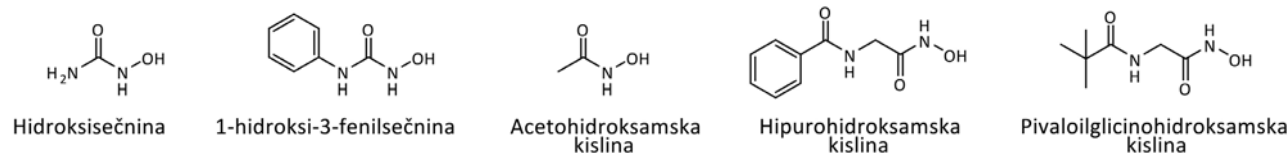
Table 1: Biochemical and clinical properties of some more important urease inhibitors (12).

Zaviralec ureaze	Biokemične lastnosti	Klinične lastnosti
Acetohidroksamska kislina (AHK)	Inhibira ureazo <i>H. pylori</i> in <i>P. mirabilis</i> ; deluje bakteriostatično in baktericidno na <i>H. pylori</i> , popolnoma zavre kemotaktično aktivnost <i>H. pylori</i>	Uporaba pri zdravljenju hiperamoniemije, zavre dvig pH urina pri okužbi urina s <i>P. mirabilis</i> ; zmanjša velikost kamnov pri okužbi s <i>Proteus spp.</i> ; neželeni učinki: teratogena, motnje delovanja živčevja in kože
3-metoksihipurohidroksamska kislina	Inhibira ureazo <i>H. pylori</i>	Visok očistek, prepreči nastajanje žolčnih kamnov
<i>N</i> -pivaloilglicinohidroksamska kislina	Inhibira ureazo <i>P. mirabilis</i>	Zavre dvigovanje pH urina in tvorbo kamnov, manj mutagena v primerjavi z AHK
Flurofamid	Zelo močan zaviralec ureaze, inhibira samo zunajcelično ureazo, deloma prepreči kemotaktično aktivnost <i>H. pylori</i>	Ne pozdravi okužbe s <i>H. pylori</i> ; prepreči nastajanje sečnih kamnov v katetrih
Omeprazol, rabeprazol, lansoprazol	Inhibira ureazi <i>H. pylori</i> in <i>P. mirabilis</i> <i>in vitro</i>	V kombinaciji z antibiotiki popolnoma pozdravi okužbo s <i>H. pylori</i> v večjih odmerkih (80 mg/dan)

učinkovina pri zdravljenju mieloproliferativnih obolenj, AIDS-a, luskavice in zdravljenju anemije srpastih celic, vendar se zaradi nekaterih resnih neželenih učinkov ne uporablja pri zdravljenju okužb z urolitičnimi bakterijami. V želji po pripravi zaviralcev z manj neželenimi učinki je bilo sintetiziranih nekaj derivatov hidroksisečnine s podobno jakostjo zaviranja ( $IC_{50} = 19,3 \mu M$ , ureaza *C. ensiformis*) (13). Druga, acetohidroksamska kislina, je najpogosteje preizkušana visoko selektivni zaviralec ureaz ( $IC_{50} = 20 \mu M$ , ureaza *H. pylori*). Zanj je značilno, da deluje baktericidno in bakteriostatično na *H. pylori*, kar vodi v zmanjšanje razjede želodca in hipergastrinemije ter popolno odpravo gastritisa. Učinkovita je tudi pri okužbah urina, saj pri dolgotrajni uporabi zavre s *P. mirabilis* povzročeno nastajanje sečnih kamnov za 46 - 60%. Kljub teratogenemu delovanju in povzročanju motenj v delovanju živčnega sistema in kože je že leta 1983 dobila

dovoljenje FDA za promet. Zaenkrat je to tudi edini klinično uporabljen zaviralec ureaze, ki se v ZDA in nekaterih evropskih državah uporablja za zdravljenje hiperamoniemije pri bolnikih s cirozo jeter in pri kroničnih okužbah urina (12)(14).

Zaradi uspeha acetohidroksamske kisline je bilo sintetizirano večje število derivatov glicinohidroksamske kisline, katerih namen je bil predvsem zmanjšanje neželenih učinkov ob enaki ali večji učinkovitosti. Med uspešnejšimi sta hipurohidroksamska in pivaloilglicinohidroksamska kislina, ki v kombinaciji z antibiotiki uspešno znižata previsok pH urina in zavreta tvorbo žolčnih kamnov zaradi okužbe s *P. mirabilis*. Omenjeni spojini sta tudi manj teratogeni od acetohidroksamske kisline (15).



Slika 3: Hidroksamske kisline.  
Figure 3: Hydroxamic acids.

### 3.3 FOSFORODIAMIDATI IN FOSFINATI

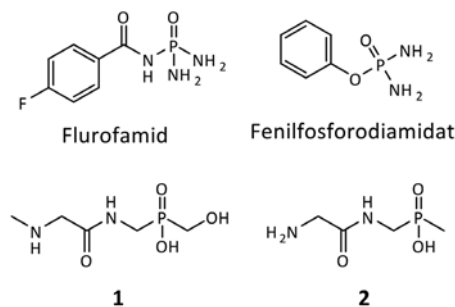
Amidi in estri fosforjeve(V) kisline (slika 4) predstavljajo prvo skupino zaviralcev ureaz z največjo zaviralno aktivnostjo. Omenjene spojine so predzdravila fosforodiamidinske kisline, ki se sprostijo po encimski hidrolizi prvotne strukture. Zaradi podobnosti fosforodiamidinske kisline s prehodnim stanjem encimsko katalizirane reakcije hidrolize sečnine imajo ti zaviralci visoko zaviralno aktivnost v srednjem nanomolarnem območju (16).

Kljub zelo dobrim zaviralnim učinkom pa je ena od glavnih težav fosforodiamidatov nizka stabilnost v kislem mediju želodca in slabo prehajanje preko bakterijske celične stene. Najmočnejši zaviralec ureaze flurofamid ( $K_d = 4$  nM,  $IC_{50} = 100$  nM) je zato neučinkovit pri okužbi želodca s *H. pylori*. Veliko bolj je stabilen v nevtralnem in rahlo bazičnem mediju, zato se je izkazal predvsem kot sredstvo proti mašenju katetrov zaradi infekcij s *P. mirabilis*, kjer tudi zmanjša previsok pH urina (17).

V drugo skupino spadajo metil- in hidroksimetilfosfinati z visoko hidrolitično stabilnostjo v kislem ter enako ali večjo zaviralno aktivnostjo v primerjavi s fosforodiamidati ( $IC_{50} = 0,96$   $\mu$ M,  $K_i = 0,36$   $\mu$ M, *B. pasteurii*, spojina **1**). Tudi te spojine posnemajo prehodno stanje encimsko katalizirane reakcije hidrolize sečnine, vendar za svoje delovanje ne potrebujejo predhodne hidrolitične aktivacije. Omenjeni zaviralci so bili razviti pred kratkim, zato še ni poročil o njihovi *in vivo* aktivnosti (18)(19).

### 3.4 IMIDAZOLI

Zaviralci protonske črpalke, kot so rabeprazol, omeprazol in lansoprazol, so zdravilne učinkovine, ki se upora-

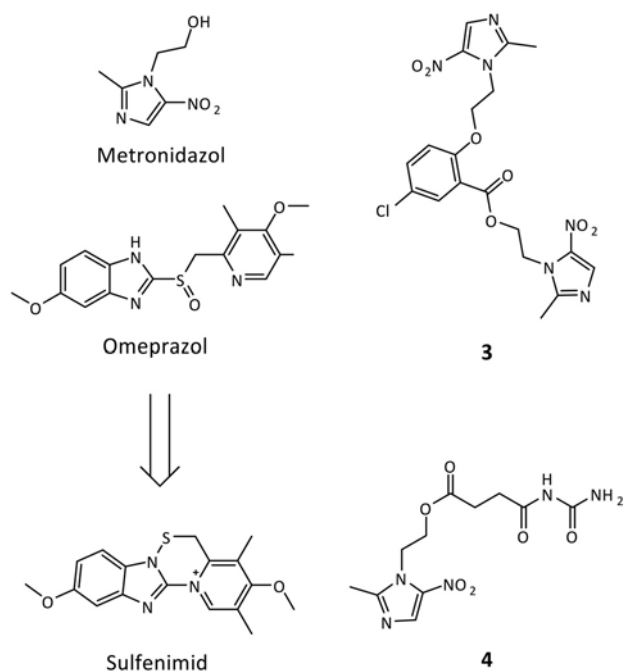


Slika 4: Fosforodiamidati (flurofamid, fenilfosforodiamidat) in fosfinati (1 in 2)

Figure 4: Phosphorodiamidates (flurofamidine, phenyl phosphorodiamidate) and phosphinates (1 and 2)

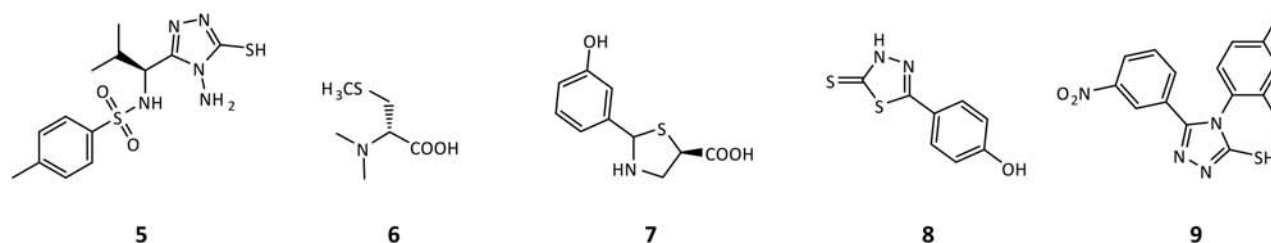
bljajo za zdravljenje razjed želodca v kombinaciji z ustreznimi antibiotiki. Tipični predstavnik te skupine zdravilnih učinkovin je omeprazol, ki je predzdravilo, iz katerega v kislem mediju po pretvorbi nastane sulfenamid, ki se kovalentno veže na cisteinski ostanek na  $H^+/K^+$  ATPazi parietalnih celic. Nastanek sulfenamida iz omeprazola ( $IC_{50} = 100$   $\mu$ M, nevtralen pH) in njegovih analogov naj bi bil tudi odgovoren za selektivno zaviranje ureaze *H. pylori*, kar pa ni vzrok njihovega protibakterijskega delovanja (slika 5) (20).

Ureazo *H. pylori* inhibirajo tudi derivati nitroimidazolnega antibiotika metronidazola, z aktivnostjo, ki je primerljiva acetohidroksamski kislini (spojina **3**,  $IC_{50} = 12$   $\mu$ M). V nekaterih primerih je metronidazol derivatiziran s fragmenti, ki posnemajo sečnino (npr. *N*-hidroksisečnina, *N,N*-dihidroksisečnina, *N*-hidroksigvanidin ipd.), kar izboljša prepoznavo spojine s strani encima, zato je protiureazna aktivnost proti *H. pylori* v teh primerih večja kot pri samem metronidazolu (spojina **4**, RA = 4 %, metronidazol, RA = 94 %, 30 nM) (21)(22).



Slika 5: Imidazolni zaviralci ureaze *H. pylori* in nastanek sulfenimida iz omeprazola v kislem mediju želodca.

Figure 5: Urease inhibitors with imidazole structure and the formation of sulfenimide from omeprazole in acidic stomach medium.



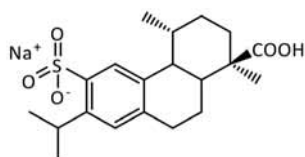
**Slika 6:** Tiolni in sulfidni zaviralci ureaze. **5:**  $IC_{50}$  (ureaza fižola) = 22  $\mu M$ , **6:**  $IC_{50}$  (ureaza *P. mirabilis*) = 31  $\mu M$ ,  $IC_{50}$  (ureaza *B. pasteurii*) = 20  $\mu M$ , **7:**  $IC_{50}$  (ureaza *B. pasteurii*) = 4,23  $\mu M$ , **8:**  $K_i$  (ureaza *B. pasteurii*) = 2  $\mu M$ , **9:**  $IC_{50}$  (ureaza *C. ensiformis*) = 45  $\mu M$  (23)(24)(25)(26)(27).  
**Figure 6:** Urease inhibitors with thiol and sulfide functional group. **5:**  $IC_{50}$  (jack bean urease) = 22  $\mu M$ , **6:**  $IC_{50}$  (*P. mirabilis* urease) = 31  $\mu M$ ,  $IC_{50}$  (*B. pasteurii* urease) = 20  $\mu M$ , **7:**  $IC_{50}$  (*B. pasteurii* urease) = 4,23  $\mu M$ , **8:**  $K_i$  (*B. pasteurii* urease) = 2  $\mu M$ , **9:**  $IC_{50}$  (jack bean urease) = 45  $\mu M$  (23)(24)(25)(26)(27).

### 3.5 TIOLI IN SULFIDI

Za zaviralce s sulfidno in/ali tiolno funkcionalno skupino je značilno, da je njihovo zaviralno delovanje posledica relativno močne interakcije med žveplom v zaviralcu in  $Ni^{2+}$  v aktivnem mestu encima. Znanih je kar nekaj omenjenih zaviralcev z dobrim *in vitro* zaviralnim delovanjem v mikromolarnem območju in z dokazano protibakterijsko aktivnostjo (slika 6) (23)(24)(25)(26)(27).

### 3.6 1-FENANTRENKARBOKSILNA KISLINA

Natrijev ekabetat (slika 7) je zdravilna učinkovina, ki se uporablja kot mukoprotektivno sredstvo pri zdravljenju razjed želodca in izsušene očesne sluznice. Njeno mukoprotektivno delovanje je posledica več dejavnikov, med katerimi so najbolj pomembne predvsem zaviranje ureaze *H. pylori* in njene mukoadhezije ter zaviranje pepsina. Spojina je aktivna samo v kislem mediju, zato predvidevajo, da je njen glavni učinek neselektivna denaturacija omenjenih encimov, ki sodelujejo v procesu nastanka razjede želodca (28)(29).



**Natrijev ekabetat**

**Slika 7:** Natrijev ekabetat (28).

**Figure 7:** Ecabet Sodium (28).

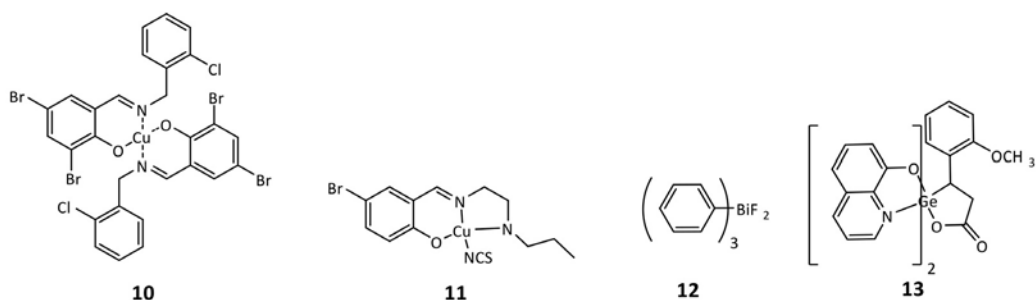
### 3.7 KOMPLEKSI KOVIN IN NJIHOVE SOLI

O zaviranju ureaze z različnimi kovinami so prvič poročali že leta 1949. Delovanje ureaze zavirajo različni kationi prehodnih kovin v naslednjem padajočem zaporedju  $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Bi^{3+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+} > Co^{2+} > Fe^{3+} > As^{3+}$ . Domnevajo, da omenjene kovine interagirajo z SH skupino Cys pri vходу v aktivno mesto encima, saj je jakost zaviranja sorazmerna stabilnosti kovinskih sulfidov. Najbolj poznani zaviralci iz te skupine so bizmutove soli, ki se že dolgo uporabljajo za zdravljenje razjed na želodcu in pri okužbah s *H. pylori*. Na žalost bizmutovi pripravki v Sloveniji niso registrirani, kljub temu, da se bizmutov subsalicilat, koloidni bizmutov subcitrat in ranitidin bizmutov citrat pogosto uporabljajo po svetu kot zdravilo druge izbire pri zdravljenju diareje, dispepsije in razjed želodca. Domnevajo, da ima zaviranje ureaze pomembno vlogo pri protibakterijski aktivnosti bizmutovih soli (32).

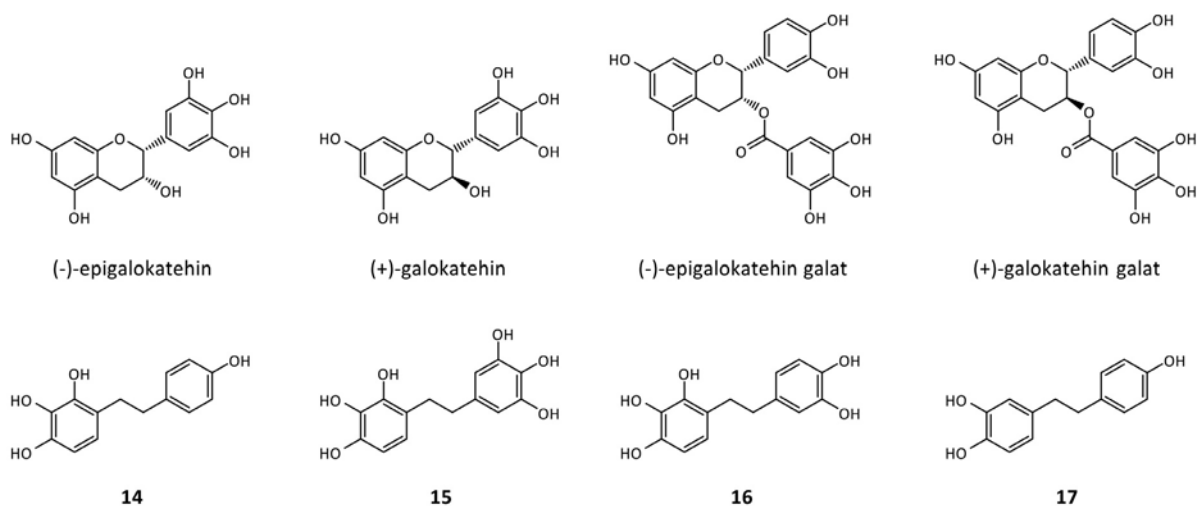
Zaviranje ureaze v nižjem mikromolarnem območju je značilna tudi za komplekse prehodnih kovin, od katerih so v literaturi največkrat opisani kompleksi salenskega tipa (slika 8). Kljub temu, da imajo zelo dobro protibakterijsko aktivnost, ni znano, ali je ta posledica zaviranja bakterijskih ureaz. Poleg tega v literaturi večinoma omenjajo zaviranje rastlinskih ureaz, ni pa poročil o zaviranju bakterijskih oblik encima (30) (31).

### 3.8 ORGANOKOVINSKI ZAVIRALCI

Podobno kot kompleksi prehodnih kovin tudi organokovinski zaviralci ureaze, pri katerih je prehodna kovina vezana preko kovalentne vezi neposredno na ogljik, delujejo



**Slika 8:** Kompleksi salenskega tipa (**10**, **11**) in organokovinski zaviralci (**12**, **13**). **10:**  $IC_{50}$  (ureaza fižola) = 0,52  $\mu$ M, **11:**  $IC_{50}$  (ureaza fižola) = 7,05  $\mu$ M, **12:**  $k = 158 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ , MIC (*H. pylori*) = 0,5 mg/L, **13:**  $IC_{50}$  (ureaza *P. mirabilis*) = 31  $\mu$ M, MIC (*P. mirabilis*) = 61  $\mu$ M (30)(31)(33)(34).  
**Figure 8:** Salen-type complexes and organometallic inhibitors. **10:**  $IC_{50}$  (jack bean urease) = 0,52  $\mu$ M, **11:**  $IC_{50}$  (jack bean urease) = 7,05  $\mu$ M, **12:**  $k = 158 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ , MIC (*H. pylori*) = 0,5 mg/L, **13:**  $IC_{50}$  (*P. mirabilis* urease) = 31  $\mu$ M, MIC (*P. mirabilis*) = 61  $\mu$ M (30)(31)(33)(34).



**Slika 9:** Flavonoidi, polihidroksibenzilni derivati **14-17** in protiureazna aktivnost (*H. pylori*). **14:**  $IC_{50} = 30 \mu$ M, **15:**  $IC_{50} = 0,2 \mu$ M, **16:**  $IC_{50} = 1,1 \mu$ M, **17:**  $IC_{50} = 1,5 \mu$ M,  $IC_{50} = 4,2 \mu$ M (ureaza v intaktnih bakterijskih celicah)(35)(38).  
**Figure 9:** Flavonoids, polyhydroxybenzyl derivatives **14-17** and corresponding antiurease activity. **14:**  $IC_{50} = 30 \mu$ M, **15:**  $IC_{50} = 0,2 \mu$ M, **16:**  $IC_{50} = 1,1 \mu$ M, **17:**  $IC_{50} = 1,5 \mu$ M,  $IC_{50} = 4,2 \mu$ M (urease in intact bacterial cells) (35)(38).

protibakterijsko. Med njimi so najbolj poznane organobizmutove in organogermanijeve spojine, ki inhibirajo *H. pylori* in *P. mirabilis* (slika 8) (32)(33)(34).

### 3.9 POLIFENOLI

Polifenoli predstavljajo eno najbolj razširjenih in strukturno različnih spojin v zdravilnih in prehrabnih rastlinah. Obširne epidemiološke študije in *in vitro* poskusi so potrdili, da imajo polifenoli mnoge ugodne biološke učinke. Nekateri med njimi tudi inhibirajo ureazo *H. pylori* v mikromolarnem območju in zavrejo rast omenjene bakterije. V uporabi je tako večje število rastlinskih pripravkov z visoko vsebnostjo polifenolov, ki naj bi imeli zdravilni učinek pri ga-

strointestinalnih in urogenitalnih obolenjih, ki so posledica okužb z urolitičnimi mikroorganizmi (35).

Med bolj poznanimi pripravki so ekstrakti korenine zlatice (*R. repens*), rožmarina, jabolčnih olupkov in zeleni čaj ( $IC_{50} = 13 \mu$ g/mL), ki vsebujejo večje količine katehinov, ki inhibirajo ureazo *H. pylori* (slika 9). Zaviralne vrednosti nekaterih katehinov, npr. epigallocatehina ( $IC_{50} = 19,6 \mu$ M), epigallocatehin galata ( $IC_{50} = 2,2 \mu$ M), galokatehina ( $IC_{50} = 8,7 \mu$ M) in galokatehin galata ( $IC_{50} = 9,8 \mu$ M), so celo večje kot pri acetohidroksamski kislini. V živalskih modelih je ekstraktom zelenega čaja tako uspelo značilno zmanjšati obseg gastritisa, povzročene s *H. pylori*. Tudi epidemiološke raziskave so pokazale, da pitje zelenega čaja značilno zmanjša

tveganje za kronični atrofični gastritis in raka na želodcu. Zeleni čaj je tako lahko relativno varen dodatek k standardnemu zdravljenju obolenj zaradi okužbe s *H. pylori* (36). Protiureazno aktivnost imajo tudi sintezni mimetiki flavonov in izoflavonov. Ugotovili so, da sta za protiureazno aktivnost predvsem pomembna obročna sistema s fenolnimi OH skupinami, ki sta povezana preko dveh atomov. Najbolj aktivni zaviralci, npr. **17**, so bili na bakterijskih celicah *H. pylori* celo 10 - 20x bolj aktivni kot acetohidroksamska kislina (37)(38).

## 4 SKLEP

Zaradi naraščajoče rezistence bakterij na protibakterijske učinkovine postaja načrtovanje novih načinov zdravljenja vse bolj pomembno. Ena od zelo obetavnih tarč novih protibakterijskih učinkovin so prav ureaze, ki ponujajo možnost nadzora tako nad *H. pylori* kot nad okužbami sečil. Pripravljenih je bilo mnogo raznovrstnih zaviralcev, med katerimi izstopa predvsem acetohidroksamska kislina, za katero so na žalost značilni tudi nekateri resni neželeni učinki kot so teratogenost, nevrološke motnje in motnje v delovanju kožnega sistema. Za večino razvitih zaviralcev tako velja, da je potrebno izboljšati varnost, farmakokinetične lastnosti in *in vivo* učinkovitost. Ureaze tako ostajajo pomembna tarča razvoja novih zdravih učinkovin za zdravljenje okužb z urolitičnimi bakterijami.

## 5 LITERATURA

1. Wang W-H, Kohler B, Cao F-Q, Liu LH. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Sci* 2008; 175 (4): 467-477.
2. Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995; 59 (3): 451-480.
3. Kleiner D, Traglauer A, Domm S. Does ammonia production by *Klebsiella* contribute to pathogenesis? *Bull Inst Pasteur* 1998; 96 (4): 257-265.
4. Wijeyeweera RL, Kleinberg I. Acid-base pH curves *in vitro* with mixtures of pure cultures of human oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 1989; 34 (1): 55-64.
5. Bichler K-H, Eipper E, Naber K, Braun V, Zimmermann R, Lahme S. Urinary infection stones. *Int J Antimicrob Ag* 2002; 19 (6): 488-498.
6. Burne RA, Chen YY. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes Infect* 2000; 2 (5): 533-542.
7. Tepeš B, Štabuc B. Slovenian society for gastroenterology and hepatology guidelines on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Zdrav Vestn* 2011; 80 (9): 647-656.
8. Overbye KM, Barrett JF. Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov Today* 2005; 10 (1): 45-52.
9. Jeverica S, Tepeš B, Ihan A, Skvarč M. Cumulative *Helicobacter pylori* eradication rates in Slovenia in the year 2008. *Zdrav Vestn* 2010; 79 (1): 25-30.
10. Karlowsky JA, Lagacé-Wiens PR, Simner P et al. Antimicrobial resistance in urinary tract pathogens in Canada from 2007 to 2009: CANWARD Surveillance Study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 (7): 3169-75.
11. Williamson JS. *Helicobacter pylori*: current chemotherapy and new targets for drug design. *Curr Pharm Des* 2001; 7 (5): 355-392.
12. Follmer C. Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *J Clin Pathol* 2010; 63 (5): 424-430.
13. Uesato S, Hashimoto Y, Nishino M, Nagaoka Y, Kuwajima H. N-Substituted hydroxyureas as urease inhibitors. *Chem Pharm Bull* 2002, 50(9), 1280-1282.
14. Morris NS, Stickler DJ. The effect of urease inhibitors on the encrustation of urethral catheters. *Urol Res* 1998; 26 (4): 275-279.
15. Satoh M, Munakata K, Takeuchi H et al. Evaluation of effects of novel urease inhibitor, N-(pivaloyl)glycinohydroxamic acid on the formation of an infection bladder stone using a newly designed urolithiasis model in rats. *Chem Pharm Bull* 1991; 39 (4): 894-196.
16. Dominguez MJ, Sanmartin C, Font M et al. Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. *J Agric Food Chem* 2008; 56 (10): 3721-3731.
17. Aristoteli LP, O'Rourke JL, Danon S et al. Urea, fluorofamide, and omeprazole treatments alter *Helicobacter* colonization in the mouse gastric mucosa. *Helicobacter* 2006; 11 (5): 460-468.
18. Vassiliou S, Grabowiecka A, Kosikowska P et al. Design, synthesis, and evaluation of novel organophosphorus inhibitors of bacterial ureases. *J Med Chem* 2008; 51 (18): 5736-5744.
19. Vassiliou S, Kosikowska P, Grabowiecka A et al. Computer-aided optimization of phosphinic inhibitors of bacterial ureases. *J Med Chem* 2010; 53 (15): 5597-5606.
20. Nagata K, Takagi E, Tsuda M et al. Inhibitory action of lansoprazole and its analogs against *Helicobacter pylori*: inhibition of growth is not related to inhibition of urease. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39 (2): 567-570.
21. Mao W, Lv P, Shi L, Li H, Zhu H. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of metronidazole derivatives as potent *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2009; 17 (21): 7531-7536.
22. Ems SA. Antibacterial and/or antiprotozoal nitroimidazole derivative compounds with urease inhibitor activity, process for preparing these compounds and use in pharmaceutical compositions and medicines. US072929 2007.
23. Amtul Z, Kausar N, Follmer C et al. Cysteine based novel noncompetitive inhibitors of urease(s) - Distinctive inhibition susceptibility of microbial and plant ureases. *Bioorg Med Chem* 2006; 14 (19): 6737-6744.
24. Akhtar T, Hameed S, Khan KM, Choudhary MI. Syntheses, urease inhibition, and antimicrobial studies of some chiral 3-substituted-4-amino-5-thioxo-1H,4H-1,2,4-triazoles. *Med Chem* 2008; 4 (6): 539-543.
25. Amtul Z, Rasheed M, Choudhary MI et al. Kinetics of novel competitive inhibitors of urease enzymes by a focused library of



- oxadiazoles/thiadiazoles and triazoles. *Biochem Bioph Res Co* 2004; 319 (3): 1053-1063.
26. Khan KM, Zia U, Lodhi MA et al. Successful computer guided planned synthesis of (4R)-thiazolidine carboxylic acid and its 2-substituted analogues as urease inhibitors. *Mol Divers* 2006; 10 (2): 223-231.
  27. Khan I, Ali S, Hameed S, Rama NH et al. Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some new 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives. *Eur J Med Chem* 2010; 45 (11): 5200-5207.
  28. Ito Y, Shibata K, Hongo A, Kinoshita M. Ecabet sodium, a locally acting antiulcer drug, inhibits urease activity of *Helicobacter pylori*. *Eur J Pharmacol* 1998; 345 (2): 193-198.
  29. Pearson JP, Roberts NB. Mucosal protective effects of ecabet sodium: pepsin inhibition and interaction with mucus. *Clin Sci* 2001; 100 (4): 411-417.
  30. Chen W, Li Y, Cui Y et al. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of Schiff base transition metal complexes as potential urease inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010; 45 (10): 4473-4478.
  31. You Z, Zhang L, Shi D et al. Synthesis, crystal structures and urease inhibitory activity of copper(II) complexes with Schiff bases. *Inorg Chem Commun* 2010; 13 (8): 996-998.
  32. Dittes U, Vogel E, Keppler BK. Overview on bismuth(III) and bismuth(V) complexes with activity against *Helicobacter pylori*. *Coord Chem Rev* 1997; 163: 345-364.
  33. Dahlgren A, Glogard C, Gammelsaether M et al. Organobismuth compounds: Activity against *Helicobacter pylori*. *Scan J Gastroentero* 1999; 34 (2): 135-137.
  34. Amtul Z, Follmer C, Mahboob S et al. Germa-gamma-lactones as novel inhibitors of bacterial urease activity. *Biochem Bioph Res Co* 2007; 356 (2): 457-463.
  35. Xiao Z, Shi D, Li H et al. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorg Med Chem* 2007; 15 (11): 3703-3710.
  36. Matsubara S, Shibata H, Ishikawa F, Yokokura T, Takahashi M, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310 (3): 715-719.
  37. Xiao Z, Ma T, Fu W, Peng X, Zhang A, Zhu H. The synthesis, structure and activity evaluation of pyrogallol and catechol derivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010; 45 (11): 5064-5070.
  38. Xiao Z, Shi D, Li H, Zhang L, Xu C, Zhu H. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorg Med Chem* 2007; 15 (11): 3703-3710.