

УДК 542.978+577.15.025

Л. Пенкова, інж., В. Павленко, канд. хім. наук,  
О. Присяжна, канд. хім. наук, І. Фрицький, д-р хім. наукІНГІБІЮВАННЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ  
БІНУКЛЕАТИВНИМИ ПІРАЗОЛВІСНИМИ ЛІГАНДАМИ

Досліджена ефективність інгібування каталітичної активності лужної фосфатази новими 3,5-заміщеними похідними 1H-піразолу. Виявлено, що серед чотирьох досліджуваних сполук є як обернені, так і не обернені інгібітори. Показано, що йони магнію не виявляють впливу на інгібіторний ефект.

*Inhibition efficiency of the catalytic activity of alkaline phosphatase by novel 3,5-substituted 1H-pyrazolate was examined. This indicates that among four tested compounds there are competitively and uncompetitively inhibitors. It was shown that magnesium ions do not influence on inhibitor effect.*

**Вступ.** Лужна фосфатаза (ЛФ) належить до сімейства цинквісних металоферментів. Міститься насамперед у печінці та кістках. Підвищення рівня ЛФ може бути єдиною аномалією при первинному біліарному цирозі та інших холестатичних захворюваннях. Підвищення рівня ЛФ при нормальних чи трохи підвищених рівнях інших показників може також вказувати на інфільтративний (пухлинний) процес [4].

Не дивлячись на те, що виявлення фосфатазної активності є одним з давно використовуваних ензиматичних лабораторних тестів, він не втрачає своєї значущості і тепер, особливо при захворюваннях гепатобіліарної системи. При цьому, невід'ємною складовою цих тестів є підбір інгібіторів активності ЛФ для створення нових терапевтичних агентів.

Лужна фосфатаза (рис. 1(a)) містить активний центр, в якому знаходяться два йони цинку, кожний з яких оточений донорними атомами кисню (що належать аспаргіновим залишкам) та нітрогенами імідазольних циклів (що належать боковим ланцюгам залишків гістидину). При цьому відстань метал-метал дорівнює 4,1 Å. Третій йон металу – магній – не координується до субстрату при каталітичному акті, виконуючи роль алостеричного елемента, і знаходиться на відстані ~5Å від активного центру. При фосфоестерному гідролізі два йони цинку містково зв'язані координованою молекулою фосфоестеру. Вказана міжметальна відстань та розмір "кишені" добре корелює зі стандартними значеннями міжметальних відстаней у типових біметальних піразолвісних комплексах, які містять замісники в третьому і п'ятому положеннях гетероциклу, при реалізації місткових способів координації (рис. 1(б)).

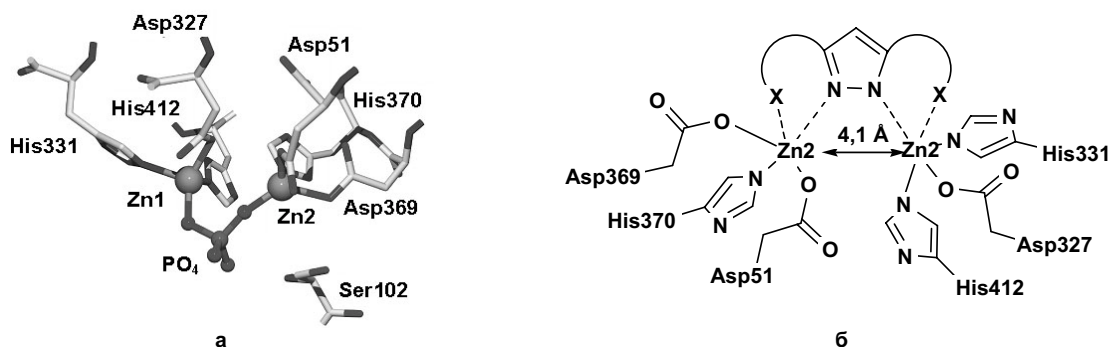


Рис. 1. (а) Будова активного центру лужної фосфатази з *E. coli* зі зв'язаним фосфатом (PDB-ID 1ED8) [10].  
(б) Можлива координація піразолвісних лігандів до активного центру лужної фосфатази.

Тому нами було вирішено дослідити можливу інгібіторну дію піразолвісних лігандів 3-[(1E)-N-гідроксипіразол-4-метил-1H-піразол-5-карбоної кислоти (L1), (E,E)-(4-метил-1H-піразол-3,5-диіл)біс(метилметанон) діоксиму (L2), 3,5-піразолдихлоридної кислоти

(L3) та (1E,1'E)-1,1'-(4-метил-1H-піразол-3,5-диіл)діетанон дигідрозону (L4) на функціональну активність цинквісного ензиму ЛФ, в якому присутній біядерний активний центр.

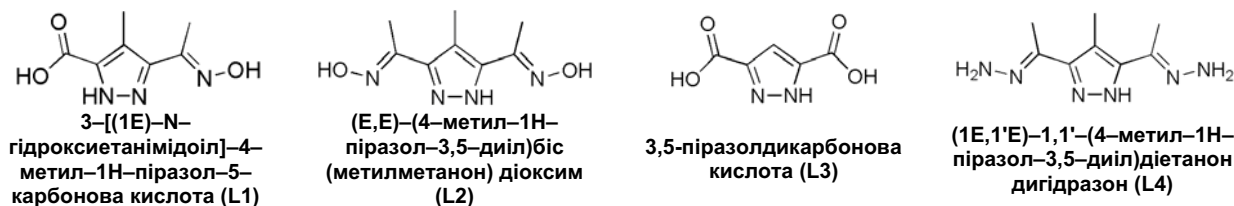


Схема 1

**Методи дослідження.** При синтезі заміщених 1H-піразолів використовували ацетилацетон, тозилхлорид, триізопропіламін фірми "Aldrich", азид натрію, гідрокарбонат натрію, гідроксид натрію, гідрохлорид гідроксиламіну, концентрований водний розчин аміаку, соляну та оцтову кислоти, кваліфікації "ч" або "чда". Для ви-

вчення інгібування лужної фосфатази з *Escherichia coli* піразолвісними бінуклеативними лігандами використовували зразок ензиму фірми "Sigma". Розчинники фірми "Fluka" використовували без додаткової очистки.

Елементний аналіз. Аналіз на вміст вуглецю, азоту та водню проводили з використанням аналізатору

Perkin-Elmer 2400 CHN шляхом спалювання наважки зразка в струмі чистого кисню при температурі 1080°C з наступним хроматографуванням отриманих газоподібних CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O і N<sub>2</sub> в струмені гелію. Синтезовані сполуки аналізували на вміст нікелю методом атомно-абсорбційної спектроскопії. Мас-спектрометрія. Мас-спектр електронного удару (EI) записували на приладі *Finnigan TSQ 700*. ЯМР-спектроскопія. Спектри ЯМР на ядрах <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C при їх природному вмісті реєстрували при 293 K на імпульсному радіоспектрометрі *Bruker AC-400* (<sup>1</sup>H: 400.13 МГц, <sup>13</sup>C: 75.43 МГц). Для запису спектрів використовували розчини сполук в ДМСО-d<sub>6</sub>, внутрішній стандарт – ТМС. Хімічні зсуви вимірювали в шкалі δ. ІЧ-спектроскопія. ІЧ-спектри одержаних сполук записували на спектрометрі Perkin-Elmer 180 (200–4000 см<sup>-1</sup>) у таблетках KBr. Віднесення коливальних частот виконувалось на основі загальноприйнятих довідників [1; 2; 3], а також порівнянням одержаних спектрів зі спектрами еталонних зразків або споріднених сполук [8].

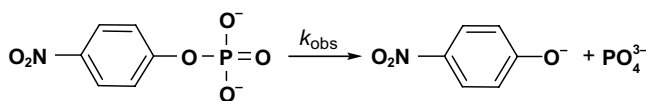
Кінетичні вимірювання. Кінетичні дослідження гідролізу субстрату проводились на спектрофотометрі *Spectord S 100* фірми *Analytik Jena* з термостатованою десятипозиційною кареткою у кварцових кюветках 1,0 см (*Suprasil QS Firma Hellma*). Швидкість гідролізу субстрату вимірювалась спектрофотометрично по збільшенню поглинання при 400 нм, обумовленого виділенням 4-нітрофенолят-іону (ε = 13990 моль<sup>-1</sup>·дм<sup>3</sup>·см<sup>-1</sup>), беручи до уваги дисоціацію останнього (рK<sub>a</sub> = 7,15 у воді).

**Результати та їх обговорення.** Синтез 3-[(1E)-N-гідроксиетанімідоіл]-4-метил-1H-піразол-5-карбонової кислоти (**L1**): 3-Ацетил-4-метил-1H-піразол-5-карбонової кислоти [9] (3 г, 0,018 моль), NH<sub>2</sub>OH·HCl (1,86 г, 0,027 моль), CH<sub>3</sub>COONa (2,80 г, 0,027 моль) розчиняли у воді (50 мл). Отриманий розчин перемішували протягом двох годин, а потім доводили до рН ≈ 4 соляною кислотою до початку випадання білого осаду. Отриманий продукт залишали на холододу на 10-12 годин. Після цього осад відфільтровували та сушили у вакуумі (схема 1). Вихід – 67 %. T<sub>топ.</sub> = 220 °C. Елементний аналіз: знайдено(%) С 45,23; Н 5,36; N 22,44; розраховано(%) С 45,90; Н 4,95; N 22,94. EI-MS: m/z (%): 182 [M-H]<sup>+</sup>, 75 %. ІЧ (см<sup>-1</sup>): δ<sub>CH<sub>3</sub>поzapл.</sub> 780, 970, 1000; δ<sub>CH<sub>2</sub>пл.</sub> 1100, 1180; ν<sub>N-O</sub> 1005; δ<sub>CH<sub>3</sub></sub> 1260; δ<sub>OH</sub> 1400; ν<sub>CN</sub> 1690; ν<sub>C=O</sub> 1590. <sup>1</sup>H ЯМР: δ = 2,13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,34 (s, 3H, CH<sub>3Pz</sub>), 11,08 (br, 1H, N-OH). <sup>13</sup>C ЯМР: δ = 29,9 (CH<sub>3Pz</sub>); 30,6 (CH<sub>3ket.</sub>); 121,1; 125,6; 129,2 (3C<sub>Pz</sub>).

Синтез (E,E)-(4-метил-1H-піразол-3,5-дііл)біс(метилметанон) діоксиму (**L2**): 4-Метил-3,5-діацетил-1H-піразол [9] (9,1 г, 0,055 моль), NH<sub>2</sub>OH·HCl (15,29 г, 0,22 моль), CH<sub>3</sub>COONa (22,88 г, 0,22 моль) розчиняли у воді (250 мл). Отриманий розчин перемішували протягом двох годин, а потім доводили до рН ≈ 4 соляною кислотою, після чого починали випадати білий осад. Отриманий продукт залишали на холододу на 10–12 годин. Осад відфільтровували та сушили у вакуумі. Вихід – 81,7 %. T<sub>топ.</sub> = 212+213°C. Елементний аналіз: знайдено(%) С 49,23; Н 5,96; N 28,44; розраховано(%) С 48,98; Н 6,12; N 28,57. EI-MS: m/z (%): 196,0 [M-H]<sup>+</sup>, 100 %. ІЧ (см<sup>-1</sup>): δ<sub>CH<sub>3</sub>поzapл.</sub> 780, 970, 1000; δ<sub>CH<sub>2</sub>пл.</sub> 1100, 1180; ν<sub>N-O</sub> 1010; δ<sub>CH<sub>3</sub></sub> 1260; δ<sub>OH</sub> 1400; ν<sub>C=N</sub> 1635. <sup>1</sup>H ЯМР: 2,17 (6H, CH<sub>3</sub>), 2,25 (3H, CH<sub>3Pz</sub>). <sup>13</sup>C ЯМР: 29,9 (CH<sub>3Pz</sub>); 30,6 (CH<sub>3ket.</sub>); 121,1; 125,6; 129,2 (3C<sub>Pz</sub>).

Синтез (1E,1'E)-1,1'-(4-метил-1H-піразол-3,5-дііл)діетанон дигідразону (**L4**): 4-Метил-3,5-діацетил-1H-піразол (1 г, 0,006 моль), N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (1,2 г, 0,024 моль), розчиняли у метанолі (20 мл). Як каталізатор додавали 1–2 краплі оцтової кислоти. Суміш перемішували протягом двох годин, після чого випадав білий осад. Отриманий продукт відфільтровували та сушили у вакуумі. Вихід – 81,7 %. T<sub>топ.</sub> = 275°C. Елементний аналіз: знайдено(%) С 47,57; Н 7,47; N 43,62; розраховано(%) С 49,47; Н 7,26; N 43,27. EI-MS: m/z (%): 194,0 [M], 100 %. ІЧ (см<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3271; ν<sub>C=N</sub> 1592. <sup>1</sup>H ЯМР: 2,00 (6H, CH<sub>3</sub>), 2,23 (3H, CH<sub>3Pz</sub>), 6,18 (4H, NH<sub>2</sub>), 12,35 (1H, N<sub>Pz</sub>-H).

Дослідження інгібування каталітичної активності ЛФ з *E. coli* сполуками **L1**, **L2**, **L3** та **L4** проводили при 25°C та рН 8,0. Ці умови були обрані як найбільш уживані в подібних дослідках [5; 6; 7; 11] Концентрація водного розчину ЛФ складала 60 юнітів/мл. Як субстрат використовували моно(4-нітрофеніл)фосфат (**MNPP**). L-фенілаланін використовували як стандартний референтний інгібітор. Для підвищення та стабілізації активності ЛФ у реакційну суміш додавали буферовий розчин хлориду магнію. Гідролітичне розщеплення **MNPP** у лужному середовищі можна зручно вивчати шляхом фотометричного контролю, спостерігаючи зростання смуги поглинання при 400 нм за рахунок утворення в результаті реакції 4-нітрофенолят-іону. У типовому експерименті 0,02 мл вихідного розчину лужної фосфатази змішували з 0,1 мл хлориду магнію та 0,2 мл вихідного розчину ліганду у термостатованій кюветі. Через хвилину додавали 0,06 мл субстрату та одразу ж починали вимірювання.



Гідролітичне розщеплення моно(4-нітрофеніл)фосфату (MNPP)

З метою визначення параметрів каталітичної та інгібіторної активності було досліджено швидкості реакцій в залежності від концентрації субстрату без інгібітора та у його присутності. За допомогою побудови графіків Лайнуївера-Берка (1) (що ілюструють залежність 1/V від 1/[MNPP]) були знайдені величини констант Міхаеліса K<sub>M</sub>, максимальної швидкості реакцій V<sub>max</sub> та типи інгібування (табл. 1, рис. 2).

$$V_0^{-1} = (K_{\text{cat}} \cdot [\text{каталізатор}])^{-1} + (K_M \cdot K_{\text{cat}} \cdot [\text{каталізатор}] \cdot [\text{субстрат}]_0)^{-1} \quad (1)$$

За графіками, зображеними на рис. 2(а) та 2(б), можна зробити висновок, що **L1** та **L2** неконкурентно інгібують ензим, оскільки неконкурентні інгібітори зменшують V<sub>max</sub>, але не змінюють K<sub>M</sub>. Таким чином, процеси, що спостерігалися, не можна охарактеризувати як чисто неконкурентне інгібування.

За графіками, зображеними на рис. 2(в) та 2(г), можна побачити, що **L3** та **L4** конкурентно та змішано не-

конкурентно інгібують каталітичну дію ЛФ у гідролізі MNPP. Конкурентні інгібітори часто структурно подібні до субстрату і зв'язуються у тому ж самому центрі ензиму. Це може бути додатковою підставою вважати, що **L3** та **L4** будуть ефективними у моделюванні активних центрів гідролітичних фосфатаз.

**Таблиця 1.** Кінетичні дані, розраховані для реакції гідролітичного розщеплення MNPP, промотованої ЛФ, у присутності інгібіторів PzDCA, PzOxCA, PzDHN та PzDOx

Інгібітор	K <sub>M</sub> · 10 <sup>5</sup> , моль · л <sup>-1</sup>	V <sub>max</sub> · 10 <sup>5</sup> , моль · л <sup>-1</sup> · хв <sup>-1</sup>
Реакція без інгібування	8,44	3,82
PzOxCA	6,50	2,92
PzDOx	7,27	3,01
PzDCA	6,04	3,23
PzDHN	9,94	3,35

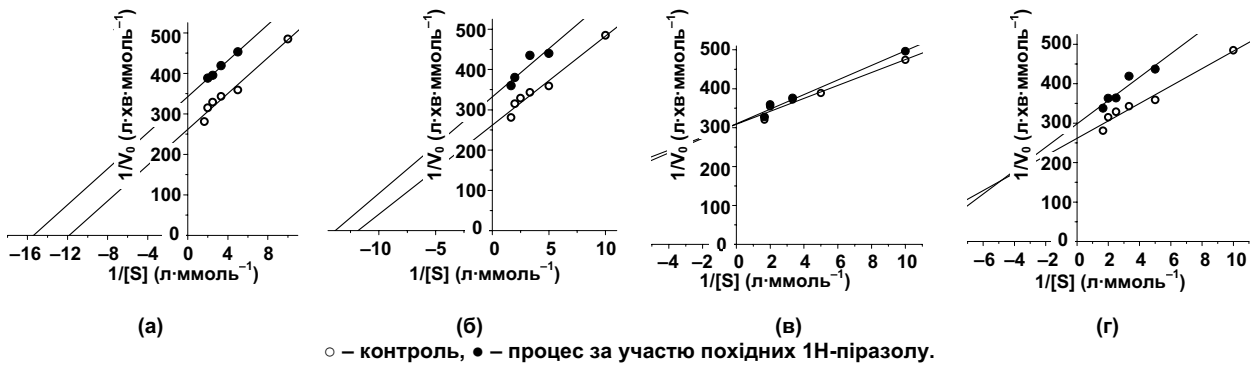


Рис. 2. Графіки Лайнуівера-Берка реакції протомованого гідролізу MNPP у присутності інгібіторів (а) – L1 (неконкурентне інгібування), (б) – L2 (неконкурентне інгібування), (в) – L3 (конкурентне інгібування), (г) – L4 (змішано неконкурентне інгібування)

**Висновок.** Досліджено інгібування каталітичної реакції гідролізу моно(4-нітрофеніл)фосфату (MNPP) у присутності L1, L2, L3 та L4 і показано, що: перебіг реакції підпорядковується моделі Міхаеліса-Ментен; визначені типи інгібування та розраховані кінетичні параметри  $K_M$  (константа Міхаеліса),  $V_{max}$  (максимальна швидкість реакції); L1 та L2 неконкурентно інгібують ензим, L3 конкурентно інгібує ЛФ, а L4 змішано неконкурентно інгібує каталітичну дію лужної фосфатази у гідролізі MNPP. Доведено, що піразолвмісні сполуки L1, L2, L3 та L4 є ефективними інгібіторами цинквмісного ензиму лужної фосфатази: їх введення суттєво уповільнює реакцію гідролізу MNPP у присутності лужної фосфатази, що може бути пов'язане з блокуванням біядерного фрагменту активного центру ферменту координацією атомів нітрогену піразолу та бокових замісників.

УДК 541.128, 543.272.2

1. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. – М., 1963.
2. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. – М., 1976.
3. Накамото К. Инфракрасные спектры неорганических и координационных соединений. – М., 1966.
4. Покровский В.И. Популярная медицинская энциклопедия. – М., 1991.
5. Chang T., Huang S., Huang T. Human Placental Alkaline Phosphatase an Improved Purification Procedure and Kinetic Studies // Eur. J. Biochem. – 1992. – Vol. 209. – P. 241–247.
6. Dean R. Kinetic Studies with Alkaline Phosphatase in the Presence and Absence of Inhibitors and Divalent Cations // BAMBED. – 2002. – Vol. 30, No. 6. – P. 401–407.
7. Hayakawa T., Okada F., Tsutsui M. et al. Effect of Phytate on the Hydrolysis of p-Nitrophenyl Phosphate with Phosphatase from Various Sources // Agric. Biol. Chem. 1991. – Vol. 55, No. 3. – P. 651–657.
8. Pouchert, Ch.J. The Aldrich Library of FT-IR Spectra. Edition 1 – 3. – Aldrich Chem. Comp. Inc. USA. 1985.
9. Sachse A., Penkova L., Noel G. et al., Efficient Syntheses of Some Versatile 3,5-Bifunctional Pyrazole Building Blocks. // Synthesis. – 2008, in press.
10. Stec B., Holtz K., Kantrowitz E., J. Mol. Biol. 2000, 299, 1323-1331.
11. Takai A., Mieskest G. Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases // Biochem. J. – 1991. – Vol. 275. – P. 233–239.

Надійшла до редколегії 12.02.08

О. Іщенко, д-р хім. наук, А. Яцимирський, канд. хім. наук,  
І. Матушко, асп., Н. Максимович, канд. хім. наук,  
О. Ріпка, інж., Н. Деркаченко, інж., Т. Чернявська, канд. хім. наук

## АДСОРБЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОМОВАНИХ 3D-МЕТАЛАМИ СЕНСОРНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ SnO<sub>2</sub>

Досліджено адсорбційні та каталітичні властивості промованих 3d-металами (Co, Fe, Ni, Cu) сенсорних матеріалів на основі SnO<sub>2</sub>. Для реакції окиснення H<sub>2</sub>, так і для реакції окиснення CO, температури максимальної десорпції продукту для всіх каталізаторів на декілька десятків градусів нижчі, ніж температури стовідсоткового перетворення реагентів. Це свідчить про те, що в умовах каталізу десорбційна стадія не є лімітуючою.

*Adsorption and catalytic properties of sensor materials based on SnO<sub>2</sub> promoted by 3-d metals (Co, Fe, Ni, Cu) are investigated. Maximal products desorption temperatures for all catalysts on a few tens of degrees are lower than total-100 conversion temperatures of reagents for H<sub>2</sub> and CO oxidation reaction. It is to be evidence that under catalysis desorption step is not limited.*

Адсорбційно-напівпровідникові сенсорні матеріали можна розглядати як гетерогенні каталізатори, на поверхні яких перебігають каталітичні окисно-відновні процеси за участю газу, що аналізується. Їхня чутливість багато в чому визначається цими процесами [4; 2-3].

Сенсорні матеріали готували співсадженням гідроксидів Стануму та Стибію з наступним висушуванням при 90 °С й спіканням осаду на повітрі при 700 °С. Отриманий порошок просочували розчинами хлоридів кобальту, заліза, нікелю та міді різних концентрацій, а саме: (1,6·10<sup>-2</sup>–6·10<sup>-2</sup> моль/л для Co і Fe; 0,025·10<sup>-2</sup>–0,4·10<sup>-2</sup> моль/л для Ni; 0,2·10<sup>-2</sup>–1,5·10<sup>-2</sup> моль/л для Cu) і спікали при 590 °С на повітрі.

З цього матеріалу були зроблені високочутливі сенсори водню та карбон монооксиду [3]. Для проведення каталітичного експерименту з окиснення водню та CO з отриманого порошкового матеріалу виготовляли ката-

лізатори, шляхом таблетування та подрібнення на гранули розміром 0,25–0,5 мм.

Каталіз проводився за атмосферного тиску при концентрації водню 0,004 % об., а монооксиду вуглецю 0,1 % об. у повітрі. Мірою каталітичної активності слугувала температура стовідсоткового перетворення реагенту ( $t_{100}$ ).

Стан частинок, хемосорбованих на поверхні каталізатора, вивчався методом програмованої термодесорпції з мас-спектрометричним аналізом частинок, що десорбуються. Термодесорбційні (ТД) спектри знімалися в інтервалі температур від 20 °С до 600 °С з лінійним нагрівом зразка 10 °С/хв. Отримані дані (температури максимуму термодесорбційного піку –  $T_{max}$ , °С та відповідні ним значення енергії десорпції –  $E_d$ ) наведені в табл. 1 та 2.