

β -MERCAPTOETHANOL NGĂN CHẶN KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA CÁC BENZIMIDAZON ĐỐI VỚI HOẠT TÍNH CỦA MỘT SỐ ENZIM ĐƯỜNG PHÂN CỦA CHỦNG VI KHUẨN *STREPTOCOCCUS MUTANS* UA159

NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG

Viện Công nghệ sinh học

ROBERT E. MARQUIS

Trường đại học Rochester, Hoa Kỳ

Các chất benzimidazon và các dẫn suất của chúng như omeprazon (OM) hay lansoprazon (LAN), được sử dụng rộng rãi để kiểm soát sự sinh axit quá mức thông qua sự ức chế enzym H^+/K^+ P-ATPaza của các tế bào tiết axit [6, 9]. Các chất này đang được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh viêm loét dạ dày. Benzimidazon có một số tính chất khá đặc biệt. Thứ nhất, các chất này rất phân cực; điều đó có nghĩa là nó có thể đi qua màng tế bào một cách dễ dàng. Thứ hai, chúng là những bazơ yếu ($pK_i = 4,0 - 5,0$), vì thế có thể tập trung ở những bộ phận tích lũy axit. Thứ ba, chúng rất không bền trong dung dịch axit; thời gian phân hủy của chúng chỉ khoảng 2 phút ở $pH = 1,0$ và khoảng 20 phút ở $pH = 7,4$. Do đó, benzimidazon là một tiền chất (prodrug), có thể tập trung tại bộ phận bị axit hóa của tế bào đích và ở đó, nó sẽ được chuyển thành dạng hoạt động (active form) [7, 9]. Cơ chế tác động của benzimidazon nói chung xảy ra bắt đầu bằng việc được proton hoá để tạo thành sunphenamit, một dạng hoạt động. Dạng hoạt hoá này tương tác cộng hóa trị với các nhóm sunphydryn của các gốc xystein ở vùng ngoại bào của enzym H^+/K^+ P-ATPaza, vì thế ức chế hoạt tính của enzym này [3]. Công trình nghiên cứu của Olbe và cs. [9] đã phát hiện thấy các tác nhân khử như dithiothreton (DTT) hay glutathion (GSH) có khả năng ngăn chặn sự tạo liên kết S-S giữa benzimidazon và các enzym đích, vì thế có thể làm mất tác dụng của chúng.

Sự axit hóa cũng là yếu tố chính của các bệnh đường miệng, mà trước tiên là bệnh sâu răng, dẫn đến làm sủi mòn chất khoáng của răng và gây sâu răng. Vi khuẩn liên quan trực tiếp đến bệnh sâu răng là các đột biến *streptococci* do có khả năng

chịu axit cao và có khả năng đường phân hóa mạnh. Các loại đường như glucoza, sacroza, fructoza... sau khi được tế bào vi khuẩn tiếp nhận thông qua hệ thống enzym vận chuyển đường photphottransferaza (PTS), sẽ được đồng hoá nhờ quá trình đường phân để sinh axit trong đó có axit lactic, là nguyên nhân trực tiếp gây ra sâu răng [1]. Kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi [8] đã phát hiện thấy benzimidazon có khả năng ức chế mạnh sự sinh axit của tế bào streptococci. Các chất này có tác dụng ức chế các enzym trên màng tham gia vào quá trình vận chuyển đường là PTS và F-ATPaza. Vậy các enzym của quá trình đường phân có phải là đích tác dụng của các chất benzimidazon hay không và các tác nhân khử như GSH hay β -mercaptoethanol (β -MCE) có khả năng ngăn chặn sự ức chế hoạt tính của enzym bởi các chất benzimidazon hay không là những vấn đề cần phải tiếp tục làm sáng tỏ. Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu về tác dụng của hai chất thuộc nhóm benzimidazon là LAN và OM lên các enzym của quá trình đường phân của *Streptococcus mutans* UA159 và tác dụng ngăn chặn sự ức chế hoạt tính của các enzym này nhờ tác nhân khử β -MCE.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* UA159 là quà tặng của giáo sư Robert E. Marquis, Trường đại học Rochester, Hoa Kỳ. Đây là chủng vi khuẩn có lý lịch rõ ràng và được rất nhiều phòng thí nghiệm nghiên cứu về sâu răng trên thế giới sử dụng.

OM hay LAN và các enzym, hóa chất dùng trong nghiên cứu này đều được mua từ hãng Sigma (Hoa Kỳ).

2. Phương pháp

a. Chuẩn bị tế bào thấm (permeabilized cells)

- Tế bào, sau khi được rửa hai lần bằng dung dịch muối KCl 50 mM có chứa MgCl₂ 1 mM, được hoà trong đệm tris-HCl 75 mM (pH = 7,0) có chứa MgSO₄ 10 mM. Sau khi thêm toluen (tỷ lệ 1:10), dịch tế bào được trộn đều và ủ ở 37°C trong 5 phút. Tế bào được nhanh chóng làm đông lạnh và ngay sau đó được làm tan ở 37°C. Chu kỳ này được lặp lại hai lần. Toluene được loại bỏ bằng cách ly tâm. Tế bào thấm được hòa trở lại trong đệm tris-HCl và được cất giữ ở -70°C đến khi dùng hoặc có thể được dùng trực tiếp cho các phân tích.

b. Xác định hoạt độ của các enzym

- Hoạt độ của enzym glyxêraldehyt-3-phốtphat dehydrogenaza (GAPDH) được xác định theo phương pháp của Scheek và Slater [10]. Hoạt độ của enzym được xác định thông qua việc theo dõi quá trình khử của NAD⁺ thành NADH của các tế bào thấm khi đáp ứng lại sự bổ sung glyxêraldehyt-3-phốtphat vào hỗn hợp phản ứng. Một đơn vị hoạt độ của enzym GAPDH là lượng enzym cần thiết để khử 1 μmole NAD⁺ thành NADH trong một phút ở điều kiện phản ứng.

- Hoạt độ của pyruvat kinaza (PK) được xác định theo phương pháp mô tả bởi Iwami & cs. [5]. Hoạt độ của enzym được xác định dựa trên lượng pyruvat được tạo thành. Pyruvat được định lượng nhờ enzym lactat dehydrogenaza với sự có mặt của NADH. Một đơn vị hoạt độ của enzym là lượng enzym cần thiết để biến đổi 1 μmole phốtpho enol pyruvat (PEP) thành pyruvat trong một phút ở điều kiện phản ứng.

- Hoạt độ của lactat dehydrogenaza (LDH) được xác định theo phương pháp của Iwami & cs. [5] dựa trên việc đo sự thay đổi độ hấp thụ ở A₃₄₀ tương ứng với sự oxi hoá NADH thành NAD⁺ và sự khử pyruvat thành lactat. Một đơn vị hoạt độ của LDH là lượng enzym cần thiết để làm chuyển hóa 1 μmole pyruvat thành lactat trong một phút ở điều kiện phản ứng.

- Hoạt độ của aldolaza được xác định bằng

phương pháp quang phổ dựa trên sự biến đổi của NADH thành NAD⁺ trong sự có mặt của GAPDH và trio phốtphat isomeraza [5]. Một đơn vị hoạt độ của aldolaza là lượng enzym cần thiết để làm chuyển hóa 1 μmole fructoza 1,6-bi-phốtphat thành fructoza 6-phốtphat trong một phút ở điều kiện phản ứng tương ứng với sự oxy hóa NADH thành NAD⁺.

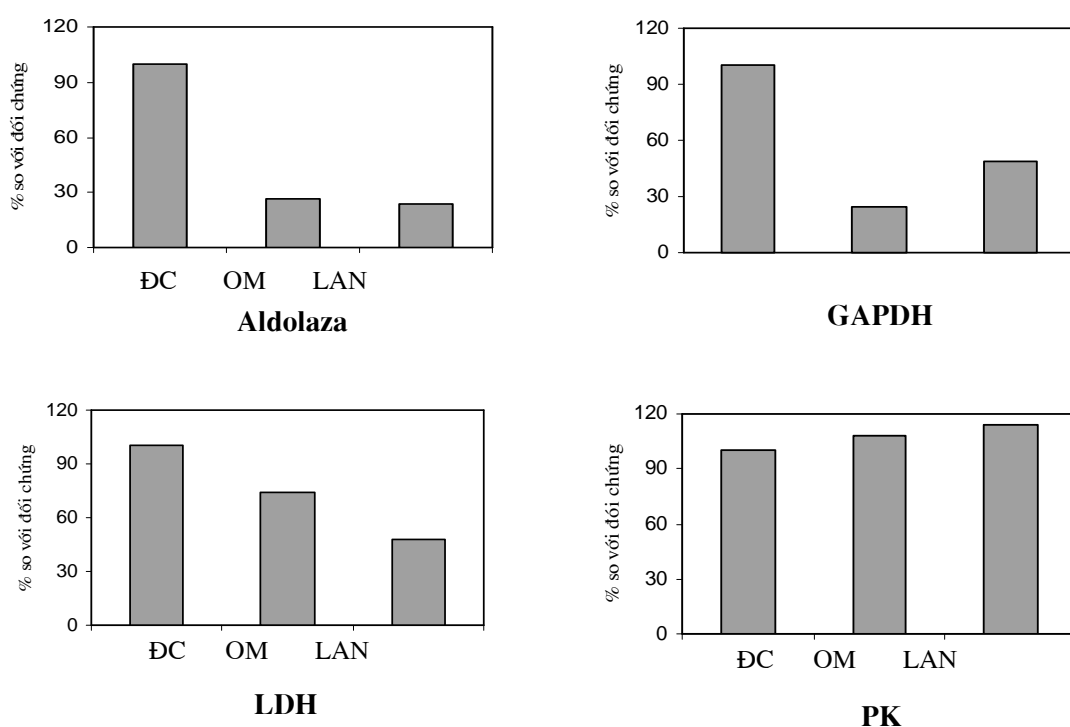
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Benzimidazon ức chế hoạt độ của một số enzym của quá trình đường phân của chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159

Đường phân là chức năng cơ bản của các vi khuẩn gây bệnh sâu răng như các đột biến streptococci [1]. Trong mảng bám răng (dental plaque) luôn tồn tại chu trình pH luân phiên giữa cao và thấp, tùy thuộc vào mức độ tiêu thụ đường của vật chủ. Sự sinh trưởng của vi khuẩn chỉ xảy ra ở các pha pH cao. Ngay cả các đột biến streptococci, tác nhân chính gây sâu răng, cũng không thể sinh trưởng ở các giá trị pH < 5,0 mặc dầu chúng vẫn có thể tiến hành các quá trình đường phân. Vì thế, đường phân là chìa khoá của tính gây bệnh ở các vi khuẩn chịu axit nằm trong mảng bám răng như *S. mutans*. Sự ức chế quá trình đường phân bởi LAN và OM mà chúng tôi phát hiện trước đây ở chủng *S. mutans* GS-5, dường như cũng có liên quan đến các enzym đường phân trong tế bào chất. Để kiểm tra giả thiết này, chúng tôi đã lựa chọn bốn enzym của quá trình đường phân của chủng *S. mutans* UA159 là aldolaza, GAPDH, PK và LDH để nghiên cứu. Kết quả ở hình 1 cho thấy không phải tất cả các enzym này đều chịu tác động của OM và LAN. Các enzym aldolaza, GAPDH và LDH tỏ ra nhạy cảm rõ rệt với benzimidazon, trong đó aldolaza là enzym nhạy cảm nhất. Hoạt độ của enzym này chỉ còn lại khoảng 30% so với đối chứng sau khi xử lý với OM và LAN 0,5 mM. GAPDH khá nhạy cảm với các tác nhân nghiên cứu và ít nhạy cảm nhất là LDH. Hoạt độ còn lại của GAPDH và LDH theo thứ tự là khoảng 50% và 60% ở nồng độ OM và LAN 0,5 mM. PK tỏ ra không bị ức chế bởi cả OM và LAN. Sự nhạy cảm của GAPDH, aldolaza và LDH có thể là do các enzym này có chứa nhóm thiol trong trung tâm hoạt động, vì thế dễ dàng tạo liên kết cộng hoá trị thông qua

câu S-S với OM và LAN ở dạng hoạt động, dẫn đến làm mất hoạt tính của các enzym. Các chất benzimidazon dường như đã đi qua màng tế bào và tương tác với các đích tác dụng bên trong tế bào. Sự thâm nhập này có lẽ thực hiện được là nhờ việc màng tế bào đã bị phá huỷ từ trước đó, trong quá trình bảo vệ tế bào khỏi bị tổn thương do môi trường bị axit hoá. Có thể thấy rằng benzimidazon dường như không chỉ là tác nhân kháng vi khuẩn đường miệng có triển vọng mà có thể còn có tác dụng lên các đối tượng vi khuẩn khác. Tuy nhiên, để tác nhân có tác dụng, pH của môi trường phải ≤ 5 vì pKa của OM và LAN nằm trong khoảng 4,0.

Như vậy, mảng bám răng là một ví dụ tốt để các tác nhân kháng khuẩn kiểu này phát huy tác dụng. Một điều thú vị là, tại các trung tâm nhiễm khuẩn, pH thường bị giảm và vì thế các chất kháng khuẩn kiểu benzimidazon sẽ có hiệu quả. Đối với các thể thực bào, pH bên trong các thực bào thường giảm xuống đủ thấp để có thể hoạt hóa các benzimidazon, nhờ đó giết chết tế bào đã bị bao vây. Tuy vậy, trong một số trường hợp, benzimidazon cũng có thể không có tác dụng, ví dụ như tại các vị trí bị viêm quanh răng, vì pH ở đây dường như lại có xu hướng tăng lên do có quá trình phân huỷ protein [8].



Hình 1. Tác dụng ức chế của OM và LAN lên hoạt độ của một số enzym của quá trình đường phân của chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159. OM (0,5 mM) và LAN (0,5 mM) được ủ với tế bào nguyên vẹn trong 30 phút ở pH 5,0, trước khi tiến hành tạo tế bào thấm để xác định hoạt độ của các enzym

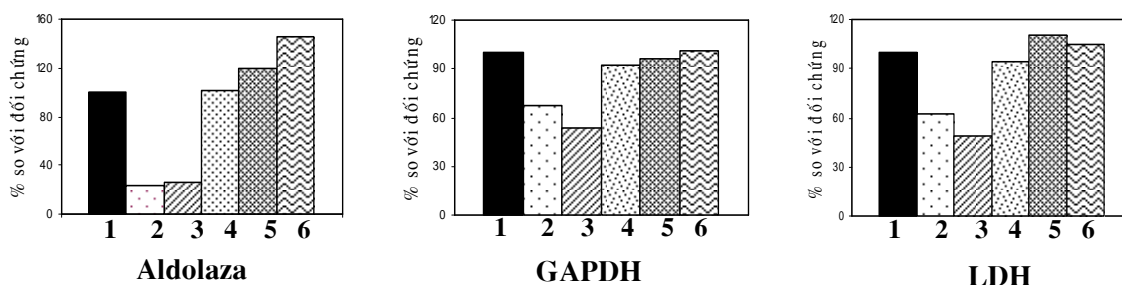
2. β -mercaptoethanol ngăn chặn sự ức chế hoạt độ của một số enzym của quá trình đường phân của chủng *S. mutans* UA159 gây ra bởi các chất benzimidazon

Các nghiên cứu trước đây [2, 4] đã cho thấy cơ chế để các chất benzimidazon ức chế quá trình đường phân dường như là giống với cơ chế tác dụng của các chất này lên P-ATPaza. Cơ chế này đặc trưng bằng việc hình thành cầu disulphit

giữa tác nhân kháng khuẩn và protein đích. Giá trị pH thích hợp cho sự liên kết này nằm trong khoảng pH < 5,0, là khoảng pH cho phép proton hoá benzimidazon thành dạng hoạt động. Các kết quả trình bày ở hình 2 cho thấy, khi có mặt OM và LAN 0,5 mM đã ức chế hoạt độ của các enzym aldolaza, GAPDH, LDH khoảng từ 40-70% so với đối chứng. β -MCE ở nồng độ 1 mM hầu như không có ảnh hưởng tới hoạt độ của các enzym này. Tuy nhiên, khi có mặt đồng thời cả

hai chất này thì hoạt độ của các enzym nghiên cứu không còn bị ức chế bởi LAN hay OM nữa. Phát hiện này cũng đã được tìm thấy trong một số công trình nghiên cứu trước đây với vi khuẩn *Helicobacter pylori* [9]. Sự ngăn chặn khả năng ức chế hoạt độ của enzym bởi benzimidazon nhờ β -MCE dường như đơn giản chỉ là do β -MCE đã phản ứng với benzimidazon để trung hoà chúng, nhờ đó ngăn cản sự hình thành cấu disunphit giữa benzimidazon và các enzym đích. Điều này cũng được chứng minh trong thí nghiệm của chúng tôi vì các tác nhân này phải

được cùng thêm vào hỗn hợp của phản ứng mới có tác dụng. Tuy nhiên, cơ chế chi tiết của phản ứng ngăn chặn sự ức chế này vẫn chưa được xác định. Tác dụng ngăn chặn sự ức chế hoạt độ của enzym đường phân bởi benzimidazon cũng được phát hiện thấy với tác nhân khử GSH (số liệu không trình bày ở đây), nhưng ở mức độ yếu hơn so với β -MCE. Như vậy, tác dụng của benzimidazon trên thực tế sẽ bị giảm đi đáng kể khi có mặt các tác nhân khử. Đây là điều cần lưu ý trong quá trình trị liệu sử dụng các chất kháng khuẩn kiểu này.



Hình 2. Tác dụng của β -MCE đến khả năng ức chế của OM và LAN đối với một số enzym của quá trình đường phân của chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159. (1). đối chứng; (2). LAN 0,5 mM; (3). OM 0,5 mM; (4). β -MCE 1mM; (5). LAN 0,5 mM + β -MCE 1 mM; (6). OM 0,5 mM + β -MCE 1 mM. Các tế bào nguyên vẹn (intact cells) được ủ cùng với LAN (0,5 mM) hay OM (0,5 mM) và β -MCE (1 mM) trong 15 phút ở pH 5,0 trước khi tiến hành tạo tế bào thấm để xác định hoạt độ của các enzym.

III. KẾT LUẬN

Ngoài khả năng ức chế enzym P-ATPaza hay các enzym sinh amonia là acginin deiminaza và ureaza như đã công bố trước đây, hai benzimidazon đã nghiên cứu là OM và LAN còn có khả năng ức chế hoạt độ của một số enzym của quá trình đường phân của chủng vi khuẩn *S. mutans* UA159 là aldolaza, GAPDH và LDH. Các tác nhân khử như β -MCE hay GSH có tác dụng ngăn chặn khả năng ức chế của OM và LAN đối với hoạt độ của các enzym này. Như vậy, các benzimidazon có thể là những tác nhân kháng vi khuẩn đường miệng cũng như các vi sinh vật khác, có hiệu quả thông qua nhiều cơ chế tác dụng khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hamilton I. R.** and **Buckley N. D.**, 1991: Oral Microbiol. Immunol., 6: 65-71.
2. **Howden C. I.**, 1991: Clin. Pharmacol., 20:

- 38-49.
3. **Im W. B. et al.**, 1985: J. Biol. Chem., 260: 4591-4597.
4. **Iwahi T. et al.**, 1991: Antimicrob. Agents. Chemother., 35: 490-496.
5. **Iwaimi Y. et al.**, 1992: Oral Microbiol. Immunol., 7: 304-308.
6. **Kazmierczuk Z. et al.**, 2002: Acta Biochim. Polon., 49: 185-195.
7. **Magalhaes P. P. et al.**, 2003: Arch Oral Biol., 48: 815-824.
8. **Nguyen P. T. M. et al.**, 2005: Oral Microbiol. & Immunol., 20: 93-100.
9. **Olbe L. et al.**, 2003: Nature Rev., 2: 132-139.
10. **Scheek R. M.** and **Slater E. C.**, 1982: In: Methods in enzymology (Colowick S.P. and Kaplan N. O., Eds.): 305-306. Academic Press, San Diego.

**β -MERCAPTOETHANOL CAN REVERSE THE INHIBITION OF SOME
GLYCOLYTIC ENZYME ACTIVITIES OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* UA159
BY BENZIMIDAZOLES**

NGUYEN THI MAI PHUONG, ROBERT E. MARQUIS

SUMMARY

Benzimidazoles, such as omeprazole (OM) or lansoprazole (LAN), are widely used as proton-pump inhibitors to control stomach hyperacidity and have been found also to have antimicrobial actions against *Helicobacter pylori* and oral streptococci. Our study indicated that OM and LAN affected the glycolysis of oral bacteria by inhibiting the activity of some glycolytic enzymes of *Streptococcus mutans* UA159 including aldolase, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. Remaining activity of these enzymes after had been treated with the agents were ca. 30%, 50% and 60%, respectively. However, pyruvate kinase was not inhibited by OM and LAN. Benzimidazoles are effective in the protonated form at acid pH values and cause inhibition of enzymes associated with the formation of drug-target disulphide bonds. We found that reducing agents including β -mercaptoethanol and glutathione reversed the inhibition of glycolytic enzyme activities by benzimidazoles. The reason for that possibly is the reducing agents neutralized benzimidazoles, avoiding the formation of S-S bonds between the protonated forms of drugs and target enzymes. Thus, glycolytic pathway is a potential target for the use of benzimidazoles against oral streptococci and their antimicrobial activity could be eliminated by the reducing agents.

Ngày nhận bài: 6-1-2006