

УДК 577.151.042

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ  $\beta$  - ГЛЮКУРОНИДАЗЫ  
СИНТЕТИЧЕСКИМИ И ПРИРОДНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

**Х.МАМЕДОВА, Н.САФАРОВ, Р.ГАСАНОВ**  
*Бакинский Государственный Университет*  
*niyaz.sabir@gmail.com*

Методом скрининга *in vitro* на наличие ингибиторной активности в отношении  $\beta$  - глюкоуронидазы *E.coli* идентифицировано 78 потенциальных ингибиторов, оказавшихся значительно более эффективными, чем стандартный ингибитор фермента - D-глюкоаро-1,4- лактон. Наиболее эффективными из синтетических соединений были ингибитор **I-3** из класса двузамещенных ацилгидразидов ( $IC_{50} = 11,34 \pm 0,62$  мкМ), **II-4** из класса несимметрично замещенных производных мочевины ( $IC_{50} = 2,3 \pm 0,18$  мкМ) и **III-24** из класса ароматических сульфогидразидов ( $IC_{50} = 4,98 \pm 0,16$  мкМ). Наиболее эффективным ингибитором среди всех исследованных соединений ( $IC_{50} = 0,68 \pm 0,01$  мкМ) оказался природный флавоноид - муксизофлавоноид А из растения *Ficus mucuso*.

Предлагается фармакофорная модель ингибиторов глюкоуронидазы, включающая два липофильных (ароматические+гидрофобные) центра, разделенных центральным фармакофором, являющимся центром, обеспечивающим донорно-акцепторные водородные связи.

Молекулярный докинг наиболее эффективных ингибиторов показал, что аминокислотными остатками, находящимися в пределах 5 ангстрем от молекул связанных ингибиторов **I-3**, **III-24** и **N-1**, являются каталитические Glu-413 и Glu504, а также His330, Leu361, Tyr468, Tyr472, Leu561, Arg562. Ингибитор **II-4**, благодаря своим конформационным свойствам (U-образная форма молекулы), связывается несколько иным способом, находясь в окружении аминокислотных остатков Tyr160, Phe161, His162, Leu361, Lys370, Ser557, Leu561, Arg562. Полученные данные послужат основой для направленной разработки новых ингибиторов глюкоуронидазы *in silico*.

**Ключевые слова:** глюкоуронидаза, ингибиторы, *E.coli*, молекулярный докинг, фармакофоры

Основная роль  $\beta$  - глюкоуронидазы заключается в деградации глюкозаминогликанов путем отщепления концевого остатка  $\beta$ - глюкоуронида от олигосахаридов [1].  $\beta$  – глюкоуронидаза обладает способностью расщеплять как эндогенные метаболиты, так и ксенобиотики. Процесс глюкоуронидации в клетках животных и человека играет важную роль в обез-

вреживании остаточных продуктов метаболизма, стероидных гормонов, вторичных метаболитов, детоксикации и деградации лекарственных препаратов, ксенобиотиков и других нежелательных низкомолекулярных соединений. Многие лекарственные препараты метаболизируются в печени, вступая в реакцию с глюкуроновой кислотой. Кроме того, остаток глюкуроновой кислоты часто специально вводят в формулу лекарственного препарата для увеличения его растворимости. Именно  $\beta$  – глюкуронидаза служит для удаления глюкуронида, что, в конечном итоге, приводит к полной деградации токсических метаболитов и ксенобиотиков. Недостаточность этого фермента, локализованного у млекопитающих в лизосомах, приводит к накоплению гликозаминогликанов, таких, как гепаринсульфат и хондроитинсульфат во многих тканях, приводя к мукополисахаридозу типа  $\text{VI}$ , называемого иначе синдромом Слая [2,3].  $\beta$  – глюкуронидаза играет определенную роль в нормальной рециркуляции в печени таких соединений, как витамин D, тиреоидный гормон и эстроген [4,5], а также в синтезе аскорбиновой кислоты и в катаболизме олигосахаридов, образующихся из гиалуроновой кислоты и хондроитина [6]. С другой стороны, повышенная активность  $\beta$  – глюкуронидазы в тканях, жидкостях и полостях тела может приводить к еще более нежелательным последствиям. Таких примеров в литературе накопилось значительное количество. Так, например, выделение лизосомальных ферментов, включая глюкуронидазу, в синовиальную жидкость, приводит к образованию артритов [7]. Выделение  $\beta$  – глюкуронидазы клетками аденокарциномы приводит к метастазированию опухоли [8]. Патологические последствия повышенного уровня  $\beta$  – глюкуронидазы отмечены, при эпилепсии, инфекции ВИЧ, при некоторых гепатических заболеваниях, при различных неопластических образованиях [9]. Таким образом, ясно, что возможность регуляции активности  $\beta$  – глюкуронидазы путем ее активирования или, в большинстве случаев, ингибирования, может в значительной степени улучшить эффективность лечения некоторых заболеваний человека.

Что касается бактериальных  $\beta$  – глюкуронидаз, в основном  $\beta$  – глюкуронидазы *E.coli*, то этот фермент является обычным компонентом кишечника человека, экскретируемым симбиотической микрофлорой. Находясь в различных отделах кишечника человека,  $\beta$  – глюкуронидаза *E.coli* приводит к увеличению содержания канцерогенов, облегчая рециркуляцию токсинов, гормонов и различных лекарственных препаратов [10,11]. Повышенный уровень активности  $\beta$  – глюкуронидазы *E.coli* является основным фактором в этиологии рака толстого кишечника [12]. Установлено, что введение ингибитора бактериальной  $\beta$  – глюкуронидазы приводит к уменьшению новых опухолевых колоний [13]. Опыты на животных также показали, что введение ингибитора, D-глюкарата кальция, уменьшает риск образования грудных опухолей [14]. Сходные эксперименты показывают аналогичную картину для раков печени, легких и ко-

жи [15-17]. Кроме того, ингибирование  $\beta$  – глюкоуронидазы *E.coli* значительно облегчает ход химиотерапевтического лечения рака кишечника толстой кишки, как это показано в работе [18]. Авторы путем высокопроизводительного скрининга обнаружили и запатентовали специфические ингибиторы бактериальной  $\beta$  – глюкоуронидазы, применение которых снимает побочное действие антираковых препаратов.

Одной из целей настоящего исследования явилась идентификация ингибиторов  $\beta$  – глюкоуронидазы *E.coli* путем скрининга широкого ряда химических соединений. В процессе работы использовали скрининг множества соединений синтезированных и хранящихся в химическом банке Международного центра Университета г. Карачи, Пакистан (International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, Pakistan) [19-21].

В результате проведенных исследований, нами идентифицирован ряд новых, ранее неизвестных ингибиторов  $\beta$  – глюкоуронидазы *E.coli*.

### Материалы и методы

В работе использовали реактивы компании Sigma-Aldrich и деионизованную воду степени MilliQ (сопротивление выше 18 М $\Omega$  /см). Активность глюкоуронидазы *in vitro* определяли в микропланшетах для титрования спектрофотометрически по методу Коллинза [22] со следующими незначительными модификациями. Реакционную смесь (конечный объем 250 мкл) содержащую 190 мкл 0.1М ацетатного буфера, pH 7.0; 5 мкл фермента (30 единиц); 50 мкл 0.4 М пара-нитрофенил-  $\beta$ -D-глюкоуронида, инкубировали 30 мин при 37°C. Оптическую плотность растворов считывали ридером SpectraMax-340 при 405 nm. Ингибиторную активность определяли, как это описано выше за исключением того, что 5 мкл каждого тестируемого ингибитора, растворенного в диметилсульфоксиде, предварительно смешивали с ферментом и инкубировали в течение 30 мин при 37°C, а реакцию инициировали добавлением субстрата. Максимальная конечная концентрация тестируемых ингибиторов составляла 0.2 мМ.

**Статистическая обработка данных.** Все измерения проводили с трехкратным повторением. Значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с помощью программы EZ-Fit Enzyme Kinetic (Perrella Scientific Inc., Amherst, U.S.A.). Стандартную ошибку среднего (SEM) рассчитывали по формуле

$$SE_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}},$$

где S - стандартное отклонение случайной величины на основе несмещённой оценки её выборочной дисперсии, n – объем выборки.

Структурные pdb – файлы глюкоуронидазы загружали из базы данных белковых структур <http://www.rcsb.org> (pdb коды 3LPG и 1BHG). Использовали только полипептидные цепи A, полипептидные цепи B, свя-

занные лиганды и молекулы воды удаляли. Подготовку белков и лигандов осуществляли с помощью программы AutoDock Tools v. 4.2 (© 1999-2011 Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute). Молекулярную графику и анализ проводили с помощью программы PyMol (Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC). Молекулярные структуры ингибиторов в pdb – формате генерировали и минимизировали с помощью программы Avogadro v.1.1.0, используя силовое поле Gchemical.

Молекулярный докинг осуществляли с помощью программного обеспечения AutoDock - Vina [23]. Использовали «грид-бокс» размерами 20 x 20 x 20 Å с центром в координатах x = -28, y = 6, z = -5. Энергию связывания лигандов (аффинность) рассчитывали по формуле

$$K_i = K_d = \exp(\Delta G / RT),$$

где  $\Delta G$  – энергия связывания лиганда, R – газовая постоянная, равная 1.986 кал/моль, T – абсолютная температура (298 K).

Расчеты проводили на компьютере Intel Core2 Duo CPU 2.60 GHz с операционной системой Windows XP Professional, version 2002, service pack 3.

### Результаты и их обсуждение

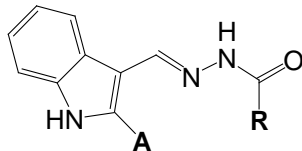
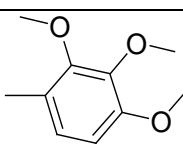
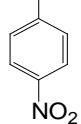
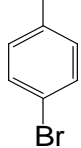
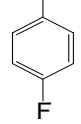
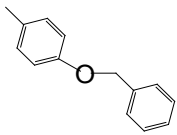
Для *in vitro* скрининга на предмет наличия ингибиторной активности в отношении  $\beta$  - глюкоксидазы было отобрано более 150 химических соединений из Международного центра химических и биологических наук Университета г. Карачи (Пакистан). Критерием отбора соединений для скрининга являлось упоминание в литературе о биологической активности данного соединения (или класса соединений). Все синтетические соединения были сгруппированы в три класса: I - двузамещенные ацилгидразиды, II - несимметрично замещенные производные мочевины, III- ароматические сульфогидразиды. Кроме того, в работе были использованы некоторые природные флавоноиды, выделенные из плодов *Ficus tucuso* [24]. В результате среди исследованных нами соединений было обнаружено 64 синтетических и 14 природных ингибиторов. 43 синтетических ингибитора и 9 природных оказались эффективнее в отношении  $\beta$  - глюкоксидазы *E.coli*, чем стандартный ингибитор фермента - D-глюкоаро-1,4- лактон. Один из природных изофлавоноидов, мукусизофлавоно А (ингибитор N-1) имеет значение  $IC_{50}=0.68\pm 0.01$  и входит в четверку наиболее мощных, известных на сегодняшний день, ингибиторов  $\beta$  - глюкоксидазы *E.coli*. Благодаря своему естественному происхождению природные ингибиторы должны рассматриваться как наиболее перспективные с точки зрения введения их в ассортимент фармакологической промышленности. Химические структуры, наименования и значения  $IC_{50}$  для каждого соединения, проявляющего ингибиторный эффект в отношении активности  $\beta$  - глюкоксидазы приведены в таблицах 1-3.

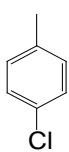
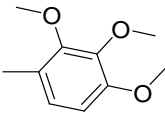
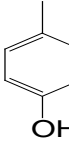
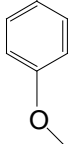
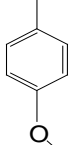
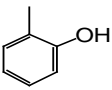

**Двузамещенные ацилгидразиды (класс I).** Среди исследованных нами соединений этого класса преобладали, в основном, двузамещенные ацилгидразиды, одним из заместителей которых служило Шиффово основа-

ние индола. Среди этих соединений нами выявлено 7 потенциальных ингибиторов  $\beta$  - глюкозидазы *E.coli* (Таблица 1). Шиффовы основания обладают широким спектром биологической активности, включая антипролиферативную, антимикробную, противовоспалительную, анальгетическую и др., являются компонентами многих лекарственных препаратов. Свойство замещенных ацилгидразидов и особенно цианоэтил-производных гидразидов ингибировать активность  $\beta$  - глюкозидазы было отмечено и ранее [25]. Наиболее эффективным ингибитором глюкозидазы из двузамещенных ацилгидразидов оказался 4-бром-N'-[2-метил-1H-индол-3-ил - метилиден] бензогидразид (ингибитор **I-3**,  $IC_{50} = 11.34 \pm 0.62$  мкМ).

Таблица 1

**Шиффовы основания ацилгидразидов (класс I)**

##	A	R	$IC_{50} \pm SEM$ ( $\mu M$ )
			исходная структура
I-1	H		NE
I-2	CH <sub>3</sub>		NE
I-3	CH <sub>3</sub>		11,34±0,62
I-4	CH <sub>3</sub>		35,4 ± 0,32
I-5	CH <sub>3</sub>		NE

I-6	CH <sub>3</sub>		16,24±0,35
I-7	CH <sub>3</sub>		NE
I-8	CH <sub>3</sub>		NE
I-9	CH <sub>3</sub>		21,3±0,62
I-10	H		20,85±0,19
I-11	CH <sub>3</sub>		31,44±0,91
I-12	CH <sub>3</sub>		112,1±1,13

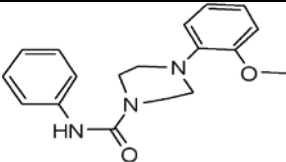
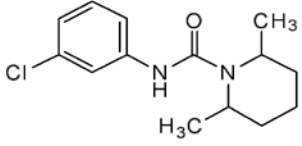
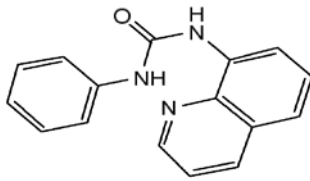
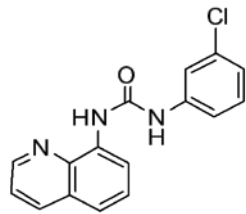
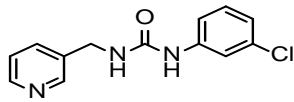
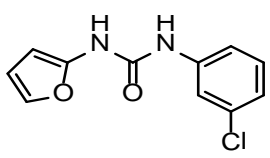
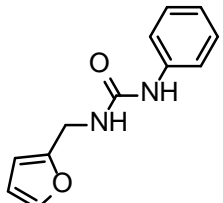
SEM – стандартная ошибка среднего, NE – не эффективен.

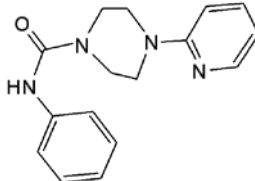
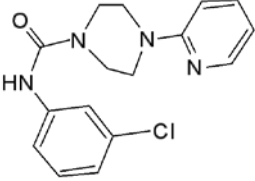
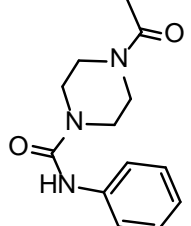
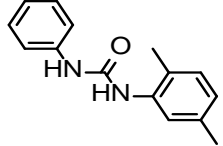
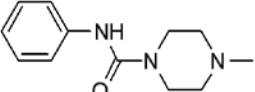
Несимметрично замещенные производные мочевины (класс **II**). Благодаря разработке эффективных методов синтеза различных замещенных производных мочевины, за последние десятилетия получено большое количество этих соединений, нашедших применение в химической, агрохимической и фармацевтической промышленности [26,27]. Двухзамещенные производные мочевины отмечены также как сильные ингибиторы уреазы и химотрипсина [28].

Из соединений этого класса в наших экспериментах ингибирующим эффектом выше, чем у стандартного ингибитора обладают только два ингибитора – **II-3** и **II-4**. Интересно, однако, что оба эти соединения, наряду с наиболее сильными селективными ингибиторами глюкозидазы *E.coli*

[29] содержат хинолиновый гетероцикл – хорошо известный фармакофор. Показано, что кроме широко известного

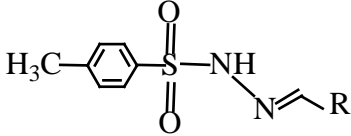
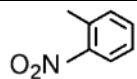
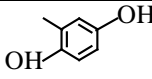
Таблица 2

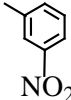
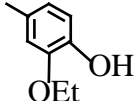
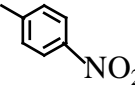
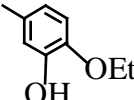

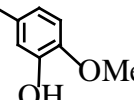

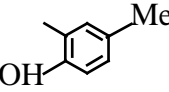

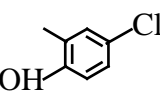
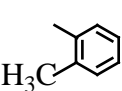
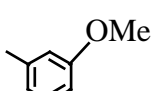
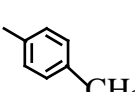
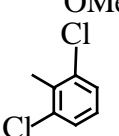
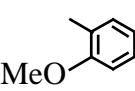
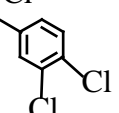
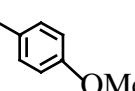
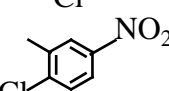
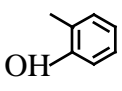
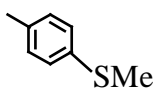
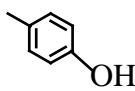
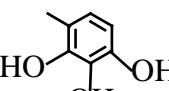
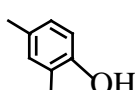
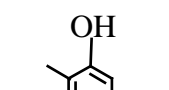
Замещенные производные мочевины (класс II)		
##	S	IC <sub>50</sub> ±SEM(μM)
II-1		NE
II-2		NE
II-3		15,38 ± 0,23
II-4		2,3 ± 0,18
II-5		NE
II-6		73,83 ± 3,63
II-7		NE

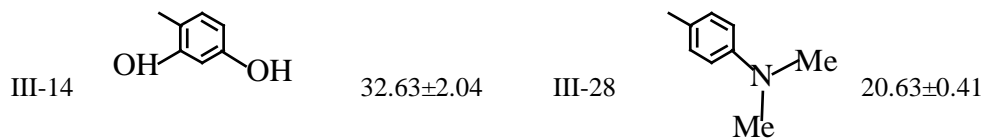
II-8		NE
II-9		132,58 ± 2,6
II-10		NE
II-11		NE
II-12		NE

антималарийного действия производные хинолина обладают широким спектром и другой биологической активности: антиопухолевой, антимикробной и др. [30]. Следует также отметить, что соединение N-(3-хлорофенил)-N'-(8-хинолинил) мочевины (ингибитор **II-4**) оказалось наиболее сильным ингибитором среди серии исследованных нами синтетических соединений.

Таблица 3

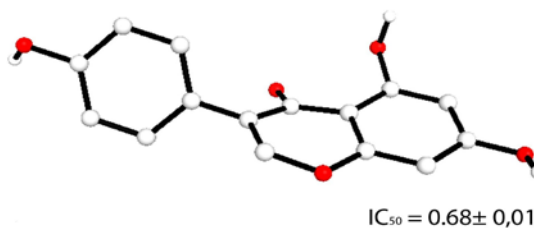
Ароматические сульфоугидразиды (класс III)					
			исходная структура		
#	R	IC <sub>50</sub> ±SEM (μM)	##	R	IC <sub>50</sub> ±SEM (μM)
III-1		92.02±0.67	III-15		NE

III-2		117.19±4.54	III-16		67.86±1.94
III-3		63.06±0.56	III-17		41.06±0.84
III-4		NE	III-18		NE
III-5		44.9±1.46	III-19		NE
III-6		20.87±0.54	III-20		NE
III-7		11.78±0.23	III-21		81.7±6.31
III-8		19.95±0.37	III-22		23.92±0.17
III-9		22.99±0.29	III-23		8.46±0.22
III-10		78.03±0.27	III-24		4.98±0.16
III-11		NE	III-25		71.06±4.83
III-12		37.72±0.73	III-26		155.84±2.39
III-13		58±0.38	III-27		95.46±0.88



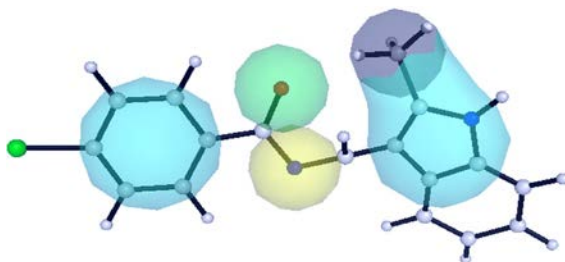
**Ароматические сульфоногидразиды.** Гетероциклические соединения, содержащие сульфоиламидный фармакофор, привлекли внимание исследователей благодаря своей биологической активности – антимикробной, антиопухоловой, противовоспалительной, анальгетической [31]. В настоящей работе этот класс соединений представлен различными 4-метилбензолсульфонамидами (таблица 3). Двенадцать из 28 соединений этой группы обладают ингибирующей активностью в пределах  $IC_{50}$  от 4.98 до 44.9 мкМ. Наиболее эффективным ингибитором глюкуронидазы в этой группе явился N'-[(E)-(2-хлоро-5-нитрофенил) метилиден]-4-метилбензил сульфоногидразид (ингибитор **III-24**), содержащий R группу с Cl и NO<sub>2</sub> в *para*-положении. Аналоги с F, OH или CH<sub>3</sub> в этих положениях были менее эффективны. Шесть соединений не оказывали никакого действия на активность глюкуронидазы.

**Природные ингибиторы класса флавоноидов.** Флавоноиды - многочисленная и довольно хорошо изученная группа природных биологически-активных соединений, встречающихся в самых различных органах растений. В настоящее время насчитывается более 8000 представителей класса флавоноидов [32]. В результате исследования экстрактов из растения *Ficus tucuso*, выделено 19 соединений, относящихся к группе флавоноидов [24]. Некоторые из этих флавоноидов оказывают *in vitro* ингибирующее действие на эноил- АСР-редуктазу возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*, другие же оказались эффективными ингибиторами β - глюкуронидазы *E.coli*. Наиболее эффективным ингибитором глюкуронидазы из группы флавоноидов оказался мукусизофлаван А (ингибитор **N-1**) с  $IC_{50} = 0,68 \pm 0,01$  мкМ (рис.1). Этот природный ингибитор по своей эффективности входит в четверку наиболее мощных, известных на сегодняшний день, ингибиторов глюкуронидазы.



**Рис. 1.** Мукусизофлаван А (ингибитор N-1).

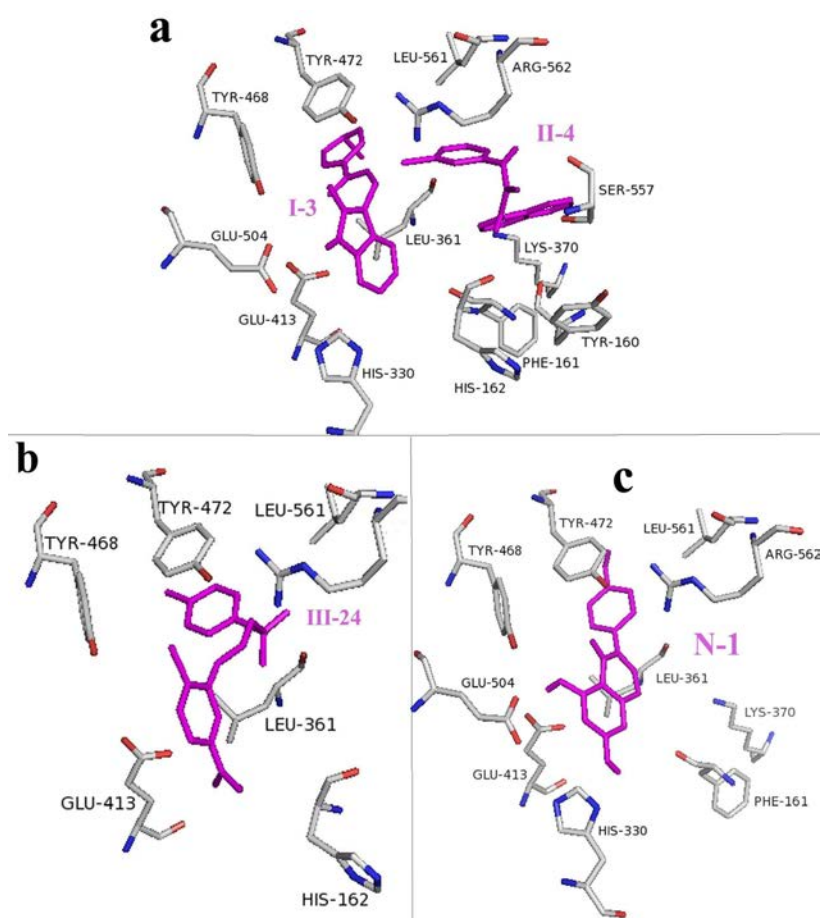
Выявление фармакофоров - совокупности стерических и электронных свойств лиганда, необходимых для его оптимального взаимодействия с биологическими макромолекулами –рецепторами, является первичным подходом к решению вопроса о количественных взаимосвязях структуры и активности (QSAR – quality structure activity relationship) в системе лиганд – биомишень. Несмотря на то, что исследованные нами ингибиторы  $\beta$  – глюкоксидазы, формально относятся к различным классам химических веществ, все они характеризуются некоторой общностью строения. Эта общность заключается в наличие в молекуле каждого из исследованных соединений двух циклических или гетероциклических групп, соединенных короткой цепочкой из двух – четырех атомов углерода и азота. Такое обстоятельство позволило нам создать обобщенную фармакофорную модель ингибиторов  $\beta$  – глюкоксидазы. Для этого химические структуры ингибиторов **I-3**, **II-4** и **III-24** попарно выравнивали с помощью программы PharmaGist [33] на веб-сервере (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>). Полученная в результате фармакофорная модель представлена на рис. 2. Из рисунка видно, что модель содержит четыре фармакофорных центра: два липофильных (ароматические +гидрофобные) центра, разделенных центральным фармакофором, являющимся центром, обеспечивающим донорно-акцепторные водородные связи.



**Рис. 2.** Обобщенная фармакофорная модель эффективных ингибиторов бактериальной глюкоксидазы. Показана шарико-стержневая модель ингибитора **I-3**. Цвета фармакофоров: желтый – донор водородной связи, зеленый – акцептор водородной связи, серый – гидрофобный, голубой - ароматичный

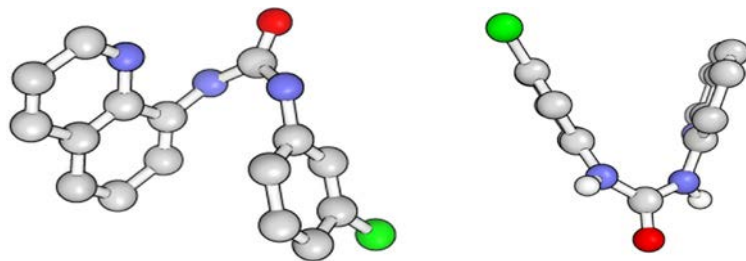
**Молекулярный докинг.** Для выяснения сайтов связывания ингибиторов и оценки энергии связывания был проведен молекулярный докинг ингибиторов к ферменту. Связывание ингибиторов характеризовалась энергией связывания в пределах от -8,5 до -7,5 ккал/моль.

Известно, что в активном центре  $\beta$  - глюкоксидазы *E.coli* находятся два каталитических аминокислотных остатка Glu-413 и Glu504. Важное значение имеют также остатки Tyr468, Tyr472, Leu361[18]. Из представленных на рис.3 результатов докинга ингибиторов видно, что



**Рис. 3.** Молекулярный докинг ингибиторов **I-3** и **II-4** (а), **III-24** (b) и **N-1** (с) к активному центру бактериальной глюкуронидазы.  
*Цветовая схема: ингибиторы – сиреневый; атомы аминокислотных остатков фермента: углерод – серый, кислород – красный, азот – синий.*

указанные аминокислоты и некоторые другие присутствуют в сайте связывания ингибиторов. Следовательно, все указанные ингибиторы связываются в активном центре фермента или рядом с ним. Из рисунка видно также, что ингибиторы **I-3**, **III-24** и природный ингибитор **N-1**



**Рис. 4.** Энергетически выгодный U-образный конформер ингибитора **II-4**.

связываются сходным образом, в то время как ингибитор **II-4** связывается с ферментом несколько иначе. Энергетически выгодный конформер **II-4** имеет U-образную форму, что мешает ему проникать глубоко к месту связывания субстрата. Исходя из этого можно предположить, что ингибитор **II-4** действует неконкурентно или бесконкурентно. Почти все остальные изученные ингибиторы имеют линейную форму и могут проникать на полную глубину субстратного «кармана». Очевидно, что для этих соединений ингибирование будет иметь конкурентный характер.

### Заключение

Таким образом, методом скрининга *in vitro* более 150 соединений 3-х классов синтетических соединений и класса натуральных флавоноидов выявлено 78 потенциальных ингибиторов, оказавшихся эффективнее в отношении ингибирования  $\beta$  - глюкозуридазы *E.coli*, чем стандартный ингибитор фермента - D-глюкоаро-1,4- лактон. На основании общности в строении молекул всех исследованных соединений предложена фармакофорная модель ингибиторов глюкозуридазы. Молекулярный докинг наиболее эффективных ингибиторов из каждого класса – ингибиторов **I-3**, **II-4**, **III-24** и **N-1** показал, что все ингибиторы с высоким сродством связываются в активном центре фермента, и энергия связывания составляет от – 7,5 до -8,5 ккал/моль. Аминокислотными остатками, находящимися в пределах 5 ангстрем от молекул связанных ингибиторов **I-3**, **III-24** и **N-1**, являются каталитические Glu-413 и Glu504, а также His330, Leu361, Tyr468, Tyr472, Leu561, Arg562. Ингибитор **II-4**, благодаря своим конформационным свойствам (U-образная форма молекулы), связывается несколько иным способом, находясь в окружении аминокислотных остатков Tyr160, Phe161, His162, Leu361, Lys370, Ser557, Leu561, Arg562. Полученные нами данные послужат основой для направленной разработки новых ингибиторов глюкозуридазы *in silico*.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Paigen K. Mammalian  $\beta$ -glucuronidase Genetics, Molecular Biology and Cell Biology // Prog.Nucl.Acids Res. Mol. Biol. , 1989, v.37, p. 155-205.
2. Sly W.S., Quinton B.A., McAlister W.H., Rimoin D.L. J. Beta Glucuronidase Deficiency: Report of Clinical, Radiologic and Biochemical Features of a New Mucopolysaccharidosis // Pediatr., 1973, 82, p.249-257
3. Hall, C. W. Cantz, M. Neufeld, E. F. A - Glucuronidase Deficiency Mucopolysaccharidosis: Studies in Cultured Fibroblasts // Arch. Biochem. Biophys. 1973, 155, p.32-38.
4. Kumar R. Nagubandi S. Mattox V.R. Londowski J.M. Enterohepatic Physiology of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 //J. Clin. Invest. 1980, 65, p. 277-84.
5. Hazenberg M.P. de Herder W.W. Visser T.J. // FEMS Microbiol. Rev. 1988, p.19-16.
6. Smith R.L., Williams T. Implication of the Conjugation of Drugs and other Exogeneous Compounds. Dutton G.J.(eds), In Glucuronic acid Conjugation and Combined, Academic Press, New York, p.457-491.

7. Sanjeev Jain<sup>1</sup>, William B. Drendel<sup>1</sup>, Zhi-wei Chen F. Scott Mathews, William S. Sly & Jeffrey H. Grubb. Structure of Human  $\beta$ -Beta-Glucuronidase Reveals Candidate Lysosomal Targeting and Active-site Motifs // *Nature Structural Biology*, 1996, 3, 375–381.
8. Boyer M.J., Tanhock I.F. Lysosomes, Lysosomal Enzymes and Cancer // *Adv.Cancer Res.*, vol. 60, p.269-281.
9. Khan Kh.M., Rahim F., Halim S.A., Taha M., Khan M. Perveen, Sh.Zaheer-ul-Haq Mesaik M.A., Choudhary M.I. Synthesis of Novel Inhibitors of  $\beta$ -Glucuronidase Based on Benzothiazole Skeleton and Study of their Binding Affinity by Molecular Docking // *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, p. 4286-4294
10. Adlercreutz H., Martin F., Pulkkinen M., Dencker H., Rimér U., Sjöberg N.O. Tikkanen M.J. Intestinal Metabolism of Estrogens // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1976, 43, p.497-505.
11. Kuhn J.G. Pharmacology of Irinotecan // *Oncology*, 1998, 12 (8 Suppl 6) , p. 39-42
12. Reddy B.S., Wynder E.L. Large-Bowel carcinogenesis: Fecal Constituents of Populations with Diverse Incidence Rates of Colon Cancer // *J. Natl. Cancer Inst.* 1973, 50, p.437-442.
13. Wakabayashi M. In: *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis* Fishman, W. H., Ed. Academic Press: New York, 1970 p. 519–602.
14. Walaszek Z., Hanausek-Walaszek M., Minton J.P., Webb T.E. Dietary Glucarate as Antipromoter of 7,12-Dimethylbenz[a]Anthracene-induced Mammary Tumorigenesis // *Carcinogenesis* 1986, 7, p. 1463-1466.
15. Oredipe O.A., Barth R.F., Hanausek-Walaszek M., Sautins I., Walaszek Z., Webb T.E. Effects of Calcium Glucarate on the Promotion of Diethylnitrosamine-initiated Altered Hepatic Foci in Rats // *Cancer Lett.* 1987, 38, p. 95-99.
16. Walaszek Z., Hanausek-Walaszek M., Webb T.E. Dietary Glucarate-mediated Reduction of Sensitivity of Murine Strains to Chemical Carcinogenesis // *Cancer Lett.* 1986, 33, p. 25-32.
17. Dwivedi C., Downie A.A., Webb T.E. Modulation of Chemically Initiated and Promoted Skin Tumorigenesis in CD-1 Mice by Dietary Glucarate // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 1989, 9, p. 253-259.
18. Wallace B.D., Wang H., Lane K.T., Scott J.E., Orans J., Koo J.S., Venkatesh M., Jobin C., Yeh L.A., Mani S., Redinbo M.R. Alleviating Cancer Drug Toxicity by Inhibiting a Bacterial Enzyme. // *Science* 2010, 330, p. 831-835.
19. Khan K.M., Saeed S., Ali M., Zahid G.J., Khan A., Perveen S., Choudhary M.I. Unsymmetrically Disubstituted Urea Derivatives: A Potent Class of Antiglycating Agents // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2009, 17, p. 2447-2451
20. Khan Kh.M.,Taha M., Rahim F., Imran M. Acylhydrazide Schiff Bases: Synthesis and Antiglycation Activity // *Journal- Chemical Society of Pakistan*, 2013, N6, p.10.
21. Zareef M., Iqbal R., Zaidi J.H., Zia-Ullah M., Arfan Z-U.M. A Convenient Synthesis of p-substituted 1-Arylsulfonyl-Pyrrolidin-2-ones // *Natural Product Research.*, 2003 Vol. 23 p. 485-488.
22. Collins R.A. Ng, T.B. Fong W.P., Wan C.C., Yeung H.W. Inhibition of Glycohydrolase Enzymes by Aqueous Extracts of Chinese Medicinal Herbs in a Microplate Format // *Biochem. Mol. Biol.Int.*, 1997, 42, p.1163-1169.
23. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading // *Journal of Comp. Chemistry*, 2010, 31, p. 455-461.
24. Jean J.K., Bankeu, Rustamova Khayala, Bruno N. Lenta, Diderot T. Nongoue, Silvere A. Ngouela, Sufyan A. Mustafa, Khalid Asaad, Mohammed I. Choudhary, Sean T. Prigge, Ralphreed A. Hasanov, Augustin E. Nkengfack, Etienne Tsamo, and Muhammad S. Ali. Isoflavone Dimers and Other Bioactive Constituents from the Figs of *Ficus mucoso* // *Journal of Natural Products*, 2011, 74(6):1370-1378

25. Shahida Sujaat. Biochemical Studies on New Inhibitors of  $\beta$ -Glucuronidase and Hepato-toxic Activity of some Chemical Constituents: Ph.D. thesis, University of Karachi, 2003, 108 p.
26. Groszek G.A. // Org Proc Res Dev., 2002, 6, p. 759-761.
27. Finar I.L. Organic Chemistry, Pearson Education Asia Ltd: Hong Kong, 2003.
28. Khan K.M, Naz F, Taha M, Khan A., Perveen S., Choudhary M.I, Voelter W. Synthesis and in vitro Urease Inhibitory Activity of N,N'-Disubstituted Thioureas // Eur J Med Chem. 2014, Mar 3; 74, 314-323.
29. Wallace, B.D., Wang, H., Lane, K.T., Scott, J.E., Orans, J., Koo, J.S, Venkatesh, M., Jobin, C., Yeh, L.A., Mani, S., Redinbo, M.R. Supplemental for: Alleviating Cancer Drug Toxicity by Inhibiting a Bacterial Enzyme // Science 2010, 330, p. 831-835.
30. Luo Z.G, Tan J.J, Zeng Y., Wang C.X, Hu L.M. Development of Integrase Inhibitors of Quinolone Acid Derivatives for Treatment of AIDS: an Overview // Mini Rev Med Chem., 2010,10, p.1046-1057
31. Al-Mohammed N.A., Alias Y., Abdullah Z., Shakir R.M., Ekhlass M., Taha E.M., Abdul Hamid A. Synthesis and Antibacterial Evaluation of some Novel Imidazole and Benzimidazole Sulfonamides // Molecules, 2013, 18, p. 1978- 1995
32. The Flavonoids. W. Barz [et al.], eds. J.B.Harborne, T.J.Mabry, H.Mabry. – New York: Acad. Press, 1975, 1204 p.
33. Dror O., Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J. Novel Approach for Efficient Pharmacophore-Based Virtual Screening: Method and Applications // J Chem. Inf. Model., 2009, 49, p. 2333-4335.

## **$\beta$ -QLUKURONİDAZA FERMENTİNİN SİNTETİK VƏ TƏBİİ MADDƏLƏR İLƏ İNHİBİRLƏNMƏSİNİN TƏDQIQATI**

**X.MƏMMƏDOVA, N.SƏFƏROV, R.HƏSƏNOV**

### **XÜLASƏ**

E.coli  $\beta$ -qlukuronidaza aktivliyinin inhibirləşməsində D-glucaro-1, 4 – lakton satndart inhibitorlardan yüksək olan 78 potensial inhibitor müəyyən olunmuşdur. Sintetik birləşmələr arasında ən effektivləri inhibitor **I-3** (biəvəz olunmuş atsil hidroزيد sinfi,  $IC_{50} = 11, 34 \pm 0, 62 \mu M$ ), inhibitor **II-4** (qeyri-simmetrik əvəz olunmuş sidik cövhəri törəmələri sinifi,  $IC_{50} = 2, 3 \pm 0, 18 \mu M$ ) və **III-24** (aromatik sulfonil hidrazidlər sinifi,  $IC_{50} = 4.98 \pm 0.16 \mu M$ ) müəyyən edilib. Tədqiq olunan bütün birləşmələr arasında ən effektiv inhibitor Ficus mucoso bitkisində alınmış təbii flavonoid - mukusioflavon A olmuşdur (ingibitor **N-1**,  $IC_{50} = 0, 68 \pm 0, 01 \mu M$ ). İnhibitor kimi qlukuronidazanın dörd mərkəzli quruluşa malik farmakofor modeli təklif olunub. Təklif olunan  $\beta$ -qlukuronidazanın inhibitorların farmakofor modeli donor/akseptor hirogen rabitələri təşkil edən mərkəzli farmakoforla bölünmüş iki lipofil mərkəzdən ibarətdir.

Effektiv inhibitorların molekulyar dokiinqi göstərdi ki, I-3, III-24, N-1 inhibitorların fermentlə qarşılıqlı əlaqəsi  $5 \text{ \AA}^0$ -dən çox olmayan iki katalitik Glu-413 və Glu504, həm də His330, Leu361, Tyr468, Tyr472, Leu561, Arg562 amin turşu qalıqları əhatəsində yaranır. II-4 inhibitoru öz konformasiyon xüsusiyyətlərinə görə ("U" şəkilli forma) bir qədər ayrı yolla fermentlə əlaqə yaradır. Bu əlaqələr Tyr160, Phe161, His162, Leu361, Lys370, Ser557, Leu561 və Arg562 amin turşu qalıqları ətrafında yaranır. Əldə olunan *in silico* məlumatlar yeni qlukuronidaza inhibitorlarının inkişafı üçün mənbə kimi xidmət edəcək.

**Açar sözlər:** qlukuronidasa, inhibitorlər, E.coli, molekulyar dokiinq, farmakofor

## STUDIES ON INHIBITION OF $\beta$ -GLUCURONIDASE BY SYNTHETIC AND NATURAL COMPOUNDS

Kh.MAMMADOVA, N.SAFAROV, R.HASANOV

### SUMMARY

78 potential inhibitors with the inhibitory activity significantly higher than that of standard inhibitor, D-glucaro-1, 4- lactone, have been identified by screening for *E.coli*  $\beta$ -glucuronidase activity inhibition. The most effective inhibitors among the synthetic compounds were inhibitor **I-3** (class of disubstituted acyl hydrazides,  $IC_{50} = 11, 34 \pm 0, 62 \mu M$ ), inhibitor **II-4** (class of unsymmetrically disubstituted ureas ( $IC_{50} = 2, 3 \pm 0, 18 \mu M$ ), and **III-24** (class of aromatic sulfonyl hydrazides,  $IC_{50} = 4.98 \pm 0.16 \mu M$ ). The most effective inhibitor among all compounds studied proved to be natural flavonoid, mucusisoflavon A from *Ficus mucuso*. (inhibitor **N-1**,  $IC_{50} = 0, 68 \pm 0, 01 \mu M$ ). A four-center pharmacophore model of glucuronidase inhibitors is proposed. The model includes two aromatic/hydrophobic centers linked by a pharmacophore providing hydrogen bond donor/acceptor. The molecular docking of most effective inhibitors showed that the amino acid residues within 5 angstrom of the bound **I-3**, **III-24** and **N-1** are the two catalytic Glu-413 and Glu504, as well as His330, Leu361, Tyr468, Tyr472, Leu561, Arg562. The inhibitor II-4, due to its conformation (U-shaped molecule), binds in some different mode and is surrounded by amino acid residues of Tyr160, Phe161, His162, Leu361, Lys370, Ser557, Leu561, and Arg562. The obtained data will serve as a basis for the development of new glucuronidase inhibitors *in silico*.

**Key words:** glucuronidase, inhibitors, E.coli, molecular docking, pharmacophore

*Поступила в редакцию: 04.02.2014 г.*

*Подписано к печати: 12.05.2014 г.*