

**AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI  
BOTANİKA İNSTİTUTU**

---

---

*Əlyazması hüququnda*

**XƏYALƏ RƏCƏB QIZI MƏMMƏDOVA**

**$\beta$ -QLÜKURONİDAZA İNHİBİTORLARININ SKRİNİNQİ VƏ  
İNHİBİRLƏŞMƏNİN MOLEKULAR DOKİNQ METODU İLƏ  
TƏDQIQI**

2406.01 – Biofizika

Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi  
dərəcəsi almaq üçün təqdim edilən dissertasiyanın

**AVTOREFERATI**

**Bakı – 2015**

Dissertasiya işi Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası Botanika İnstitutunun “Biofizika” laboratoriyasında yerinə yetirilmişdir.

**Elmi rəhbər:** Biologiya elmləri doktoru, professor  
**R.Ə.Həsənov**

**Rəsmi opponentlər:** Biologiya üzrə elmlər doktoru  
**Y.M.Feyziyev**

Fizika-riyaziyyat elmləri doktoru,  
professor **N.A.Əhmədov**

**Aparıcı təşkilat:** Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası A.İ.Qarayev adına Fiziologiya İnstitutunun “Hüceyrə metabolizminin biofizikası” laboratoriyası

Dissertasiya işinin müdafiəsi “25” sentyabr 2015-ci il tarixində saat 13:00-da AMEA Botanika İnstitutunun nəzdində fəaliyyət göstərən D.01.061 Dissertasiya Şurasının iclasında keçiriləcəkdir.

Ünvan: AZ1004, Bakı şəhəri, Badamdar yolu, 40

Dissertasiya işi ilə AMEA Botanika İnstitutunun kitabxanasında tanış olmaq olar.

Dissertasiya işinin avtoreferatı “23” iyun \_\_\_\_\_ 2015-ci il tarixində göndərilmişdir.

**D 01.061 Dissertasiya  
Şurasının elmi katibi,  
Biologiya elmləri doktoru, professor**

**S.C. İbadullayeva**

## İŞİN ÜMUMİ XÜSUSİYYƏTLƏRİ

**Mövzunun aktuallığı.**  $\beta$ -qlükuronidaza  $\beta$ -qlükuronidlərin hidrolizində əsas rol oynayır. Qlükuronidlər orqanizmdə ksenobiotiklərin detoksifikasiyası zamanı əmələ gəlirlər. Toksik maddələrin əksəriyyəti orqanizmdən qlükuronidlər şəklində eliminasiya olunurlar.  $\beta$ -qlükuronidaza hidrolaza kimi bu konyuqantları hidroliz etdiyindən bu fermentin inhibirləşməsi orqanizmi orijinal ksenobiotiklərin toplanmasından qoruya bilər [Smith, 1966].

Müəyyən olunmuşdur ki,  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin miqdarının artması və ya azalması orqanizmdə bir çox xəstəliklərin yaranmasında rol oynayır. Fermentin çatışmazlığı VII tip mukopolisaxaridoz kimi tanınan mukopolisaxaridli xəstəlik ilə nəticələnir (MPS VII və ya Sly sindromu). Müəyyən olunmuşdur ki,  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin inhibirləşməsinin xərçəngin induksiya olunmasının müxtəlif mərhələlərinə nəzarət olunmasında mühüm rolu vardır. Fermentin artmış fəallığı, xüsusilə döş, prostat və yoğun bağırsağ kimi hormondan asılı xərçəng törəmələrinin əmələ gəlməsi üçün risk faktoruna çevrilir [Walaszek et al., 1997; Yoshimi et al., 2000]. İnhibitor kimi çox geniş istifadə olunan D-qlükar turşusunun və onun duzlarının antikanserogen xassəsi yoğun bağırsağ, prostat, ağciyər, qaraciyər, dəri və döş kimi müxtəlif orqanların xərçənginə malik heyvan modellərində öyrənilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, göstərilən hər bir orqan üçün xərçəngin inhibirləşdirilməsi mexanizmi çox oxşardır. Anaerob *E. coli*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* və *Clostridia* orqanizmində olan  $\beta$ -qlükuronidaza (EC 3.2.1.31) induksiya olunmuş fermenti ətraflı öyrənilmişdir. Tədqiqatlar əvvəlcə *E. coli* və *Enterobacteriaceae* bakteriyalarından alınan bakterial  $\beta$ -qlükuronidaza ilə aparılmışdır. Bu fermentin artmış fəallığı toksinlərin, hormonların, dərman və karsinogenlərin enterohepatik resirkulyasiyanı artırır.

Hal-hazırkı tədqiqatlar göstərir ki, həzm kanalında olan Gram-pozitiv bakteriya da həmçinin müəyyən qədər  $\beta$ -qlükuronidaza fəallığında iştirak edir. Güman olunur ki, xüsusilə yoğun bağırsağ xərçənginin inisiyası  $\beta$ -qlükuronidaza ilə assosiasiya olunur. Belə ki, bağırsaqlarda onun artmış səviyyəsi yoğun bağırsağ xərçəngi riskinin artması ilə əlaqəlidir. Bu məlumatlar fermentin yeni və spesifik inhibitorlarının inkişafı üçün farmakoloji əhəmiyyət daşıyır [Khan et al., 2011].  $\beta$  – qlükuronidaza fermentinin fəallığını azaldan və xüsusilə minimal yan təsirlərə malik olan yeni təbii, kimyəvi maddələrin axtarışı və öyrənilməsi müasir tibbi biokimya, biofizika və farmakologiyanın aktual istiqamətlərindən biridir.

**Tədqiqatın məqsədi və vəzifələri.** Təqdim olunmuş dissertasiya işinin məqsədi: *E.coli* β-qlükuronidaza fermentini inhibirləşdirərək bir sıra xəstəliklərin müalicəsində istifadə olunacaq, minimal yan təsirlərə malik yeni dərman preparatlarının yaradılmasının əsasını təşkil edən təbii və sintetik maddələrin axtarışı; *E.coli* β-qlükuronidaza fermentini inhibirləşdirən təbii, sintetik maddələrin biofiziki və kimyəvi xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi; *E.coli* β-qlükuronidaza fermentini inhibirləşdirən təbii və sintetik maddələrin ümumi farmakofor modelinin qurulması; ferment-substrat-inhibitor üçlüyünün fəza modelində quruluşu və qarşılıqlı münasibətlərinin mexanizminin öyrənilməsi olmuşdur.

Bu məqsədə nail olmaq üçün aşağıdakı məsələlərin həlli qarşıya qoyulmuşdur:

- ilkin skrining aparmaqla β-qlükuronidaza fermentinin fəallığına təsir edən bir çox sintetik və təbii maddələrin inhibirləşdirici təsirlərinin öyrənilməsi,
- β-qlükuronidaza fermentinin katalitik fəallığını 50%-dən çox aşağı salan kimyəvi maddələrin  $IC_{50}$  qiymətinin təyin olunması və həmin maddələrin seçilməsi,
- β-qlükuronidaza fermenti ilə müxtəlif inhibitorların molekulyar dokinqinin aparılması,
- ilk dəfə olaraq *E.coli* β-qlükuronidazanın fəal mərkəzinin ətraflı olaraq 2D və 3D modelininin qurulması,
- inhibitorların xüsusilə də yoğun bağırsağ xərçənginin müalicəsi üçün əhəmiyyətli olan inhibitorların yaratdığı inhibirləşmənin molekulyar mexanizminin izahı.

**İşin elmi yeniliyi.** Sintetik asilhidrazilərin törəmələri, qeyri-simmetrik əvəz olunmuş sidik cövhəri törəmələri, aromatik sulfonolhidrazilər, Şiff əsaslı fenil-aminotiazolidlər və *Ficus mucoso* bitkisinin meyvələrindən 19 təbii flavonoid alınaraq onların *E.coli* β-qlükuronidaza fermentini inhibirləşdirməsi testi aparılmışdır. Alınmış flavonoidlərdən 14-nün *E.coli* β-qlükuronidaza fermentinin effektiv inhibitorları olması aşkar olunmuşdur. Bu flavonoidlərdən 3-ü elmə ilk dəfə gətirilmiş və həmin flavonoidlərdən biri olan mukusizoflavon A (N-1 inhibitoru,  $IC_{50}=0,68\pm 0,01\mu M$ ) maddəsinin *E.coli* β-qlükuronidaza fermentinin indiyə qədər məlum olan inhibitorlarının ən effektiv inhibitorlar dördlüyünə daxil olması məlum olmuşdur. Digər sintetik maddələrin β-qlükuronidaza fəallığı testinin köməkliyi ilə *in vitro* skriningi aparılmışdır. 150-dən çox maddənin skriningi nəticəsində *E.coli* β-qlükuronidaza fermentinin 64 sintetik inhibitorları aşkar olunmuşdur. *E.coli* β-

qlükuronidaza fermentinin fəallığını 50% azaldan fəal maddələr seçilərək onların  $IC_{50}$  qiyməti müəyyən olunmuşdur.

*E.coli*  $\beta$  – qlükuronidazanın spesifik inhibitorlarının yeni sinfi olan fenil-aminotiazolidlər sinfi (IV sinif) müəyyən olunmuşdur, belə ki, 29 tədqiq olunan fenil-aminotiazolidlərin törəmələrindən hamısı *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazaya münasibətdə müəyyən inhibirləşdirici effekt göstərmişlər.

Molekulyar dokinq metodu ilə *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın fəal mərkəzinin ətraflı olaraq 2D və 3D modeli yaradılmışdır. Göstərilmiş model müxtəlif sintetik və təbii inhibitorların *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza ilə qarşılıqlı təsirinin mexanizminin aydınlaşdırılması üçün istifadə olunur.

İnsan  $\beta$ -qlükuronidazasının strukturunda olmayan, lakin *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın strukturunda iki tunnelin mövcudluğu müəyyən olunmuşdur. Belə güman olunur ki, *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın strukturunda iki tunnelin mövcudluğu insan fermentinə deyil, bakterial fermentə münasibətdə bəzi inhibitorların spesifikliyini müəyyən edir və bəzi inhibitorların xüsusilə də yoğun bağırsağ xərçənginin müalicəsi üçün əhəmiyyətli olan inhibitorların yaratdığı inhibirləşmənin rəqabətsiz tipinin konkret molekulyar mexanizmini izah etməyə imkan verir.

**İşin praktiki əhəmiyyəti.** Dissertasiya tədqiqatlarında alınmış eksperimental məlumatların yekunu bakterial qlükuronidazanın yeni effektiv inhibitorlarının *in silico* dizaynı üçün əsas ola bilər. Dissertasiya tədqiqatlarında ilk dəfə olaraq *Ficus mucuso* bitkisindən alınan və bakterial qlükuronidazanın inhibirləşməsinə yüksək effektiv təsir göstərən izoflavonoidlər bəzi neoplastik dəyişikliklərin müalicəsinə və ya bəzi kimyəvi terapevtik vasitələrin yan təsirlərinin kənar edilməsinə yönələn yanaşmalardan biridir, bu istiqamətdəki tədqiqatlar son nəticədə yeni, effektiv dərman preparatlarının yaradılmasına gətirib çıxarır.

**Dissertasiyanın müzakirəsi.** Dissertasiyanın əsas elmi nəticələri Azərbaycan Dövlət Aqrar Universitetinin 80 illik yubileyinə həsr olunmuş Aqrar təhsil sistemində innovasiya texnologiyalarının tətbiqi və beynəlxalq əməkdaşlıq formaları beynəlxalq elmi-praktik konfransda (Gəncə, 2010), Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası aspirantlarının elmi konfransında (Bakı, 2010), Müasir Biologiyanın İnnovasiya Problemləri üzrə III Beynəlxalq Elmi Konfransda (Bakı, 2013), Gənc Tədqiqatçıların II Beynəlxalq Elmi Konfransında (Bakı, 2014), 1-ci Beynəlxalq Tibb Konqresində (Bakı, 2014) müzakirə olunmuşdur.

**Nəşr işləri.** Dissertasiya işinin mövzusu üzrə 13 elmi əsər, o cümlədən 8 elmi məqalə (onlardan ikisi yüksək impakt faktorlu (3,6 və 2,8 İF jurnallarda) və 5 tezis çap olunmuşdur.

**Dissertasiyanın quruluşu və həcmi.** Dissertasiya işi girişdən, ədəbiyyat icmalı, material və metodlar, alınmış nəticələrin müzakirəsi fəsilələrindən, xülasə, nəticələr, ədəbiyyat siyahısı və dissertasiyaya əlavələrdən ibarətdir. İşin ümumi həcmi 15 şəkil, 6 cədvəl və 217 adda istinad olunan ədəbiyyat mənbəyindən ibarət (o cümlədən 2 rus və 215 digər xarici mənbə) olmaqla 147 çap səhifədən ibarətdir.

## ƏDƏBİYYAT İCMALI

Bu fəsil  $\beta$ -qlükuronidaza haqqında müasir məlumatları əhatə edir. Bu fəsildə qlükozidlərin təsnifatı,  $\beta$ -qlükuronidazanın 2-ci qlükozidlər ailəsində yeri, insan, heyvan, bitki və bakteriyalarda  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin mövcudluğu haqqında məlumat verilmişdir. Ədəbiyyat icmalında qlükuronidləşmə və deqlükuronidləşmə, onun bioloji rolu,  $\beta$ -qlükuronidazanın strukturu,  $\beta$ -qlükuronidazanın kliniki əhəmiyyəti, qlükuronidaza səviyyəsinin dəyişməsi ilə əlaqədar yaranan xəstəliklər,  $\beta$ -qlükuronidazanın sintetik və təbii inhibitorları, inhibitorların bəzi xəstəliklərdə istifadəsi,  $\beta$ -qlükuronidazanın spesifik inhibitoru olan kalsium-D-qlükarat haqqında geniş məlumat verilmişdir. Bu fəsildə həmçinin molekulyar dokinq və onun üstünlükləri də ətraflı nəzərdən keçirilmişdir.

## TƏDQIQATIN MATERIAL VƏ METODLARI

*E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazası, standart inhibitor, p-nitrofenil  $\beta$ -D qlükuronid və başqa reagentlər yüksək keyfiyyəti qorunmaqla „Siqma – Aldrich“ kompaniyasından əldə edilmiş və sonrakı təmizlənməyə məruz qalmamışdır. Bufer məhlulların və digər reagentlərin hazırlanması üçün istifadə olunan su „Simplicity Water Purification System (Millipore)“ tərəfindən deionlaşdırılmışdır (elektrik müqaviməti 18 M $\Omega$ /cm-dən yüksəkdir). Bütün fermentativ reaksiyalar 37 °C-də aparılmışdır.

**$\beta$ -qlükuronidazanın tədqiqi. Skrininq və  $IC_{50}$  qiymətinin tapılması üçün ümumi protokol.**  $\beta$ -qlükuronidaza fəallığı kiçik modifikasiyalar etməklə Kolinsin [Collins, 1997] spektrofotometrik metoduna müvafiq olaraq 405 nm-də spektral uduculuq qabiliyyətini ölçməklə müəyyən olunmuşdur. Reaksiya 96 dairəli polistirol plənşetlərdə aparılmışdır („Dymatech“ firması (İngiltərə).

Inhibirləşdirici fəallıq aşağıdakı düsturla müəyyən olunmuşdur.

$$\text{İnhibirləşmə \%} = [(E-S)/E] \times 100$$

E - fermentin sınaq maddəsiz fəallığı, S - fermentin sınaq maddəsi ilə birlikdə fəallığıdır.

Sonradan fəal maddələr seçilmiş və onların  $\text{IC}_{50}$  qiyməti müəyyən olunmuşdur.  $\text{IC}_{50}$  qiymətinin müəyyən olunması fəal olan maddələrin konsentrasiyasını (12 konsentrasiyada) artırmaqla aparılmışdır.  $\text{IC}_{50}$  qiyməti “Ez-Fit Enzyme Kinetic Program” (Perrella Scientific Inc. Amherst, U.S.A) proqramından istifadə etməklə hesablanmışdır.

Bütün analizlər ən azı 3 dəfə aparılmışdır.

### **Fermentlərin və liqandların 3-ölçülü strukturu**

$\beta$ -qlükuronidazanın 3 D strukturları pdb məlumat bankından əldə edilmişdir (<http://www.rcsb.org>). Aşağıdakı pdb kodlar işlədilmişdir: 3K46 - 2,50 Å-də tam uzunluqlu *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın rentgen kristal strukturu; 3LPG - 2.42 Å-də *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın yeni, potent inhibitorla birləşməsinin rentgen kristal strukturu; 1BHG - 2,53 Å ayırdetmə qabiliyyətli insan  $\beta$  - qlükuronidazanın rentgen kristal strukturu.

**Molekulyar dokinq prosedurası. Zülalın və liqandın molekulyar dokinq üçün hazırlanması.** Əvvəlcə su molekulaları, fermentə birləşmiş istənilən liqandlar, o cümlədən B zənciri PyMol proqramından (TM, © 2006, DeLano Scientific, LLC) istifadə etməklə orijinal .pdb fayldan çıxarıldı. Sonra PyMol və Autodock Tools v. 4.2 proqramından istifadə etməklə (© 1999-2011 Molekulyar Qrafika Laboratoriyası, Scripps Elmi-tədqiqat İnstitutu) əldə edilən liqandsız monomer (A zənciri)  $\beta$ -qlükuronidaza strukturlarının çatışmayan atomları, rabitələri və kontaktları yoxlanıldı.

Tədqiqat üçün maraqlı olan liqandlar orijinal zülal liqand komplekslərindən çıxarıdılarq ayrıca ligand.pdb faylları kimi saxlanıldı. Bu cür əldə edilən liqandlardan bəziləri müxtəlif insan və *E.coli* fermentləri ilə yenidən dokinq üçün istifadə edildi. .pdb (Protein Data Bank - Zülal Məlumat Bankı) formatında yeni inhibitorların molekulyar strukturları Windows üçün Avogadro v.1.1.0 proqramından istifadə etməklə yaradıldı. Molekulun həndəsəsi Ghemical güc sahəsindən istifadə etməklə optimallaşdırıldı və optimallaşdırmağa birləşmiş qradiyent alqoritmi (addımların sayı 500) ilə nail olundu. Minimallaşdırmanın sonlanma şəraiti (vəziyyəti) konvergensiya meyarına, *vacuo*-da 0,0001 kcal/Å<sup>3</sup> mol orta kvadrat qradiyentinə ayarlandı.

Zülal strukturu faylları Gastaiger yüklərini, qeyri-polyar hidrogenləri əlavə etməklə dokinq prosedurası üçün hazırlandı və Autodock Tools proqramından istifadə etməklə .pdbqt faylları kimi saxlanıldı. Eyni

prosedura liqand.pdbqt faylları yaratmaq üçün tətbiq olundu. Liqand hazırlanması prosedurasına həmçinin liqandın fırlanan rabitələrinin müəyyən olunması daxildir.

## NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

$\beta$ -qlükuronidaza fermentini inhibirləşdirmək məqsədilə 150-dən çox maddə Pakistan İslam Respublikasının Karaçi Universitetinin ICCBS (İnternational Center for Chemical and Biological Sciences) maddələr bankından götürülmüşdür. *In vitro* skrining üçün maddələrin seçilmə kriteriyası həmin maddələrin və ya maddələrin daxil olduğu sinifin bioloji fəallığı haqqında ədəbiyyatda verilən məlumatlar əsasında olmuşdur.

Tədqiqatlarda bizim tərəfimizdən *Ficus mucoso* meyvələrindən ilk dəfə olaraq alınan təbii flavonoidlərdən istifadə olunmuş və bu flavonoidlərin *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin effektiv inhibitorları olması aşkar olunmuşdur. Həmin flavonoidlərdən biri olan mukusizoflavon A *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin indiyə qədər məlum olan inhibitorlarının ən effektiv inhibitorlar dördlüyünə daxildir.

**1. *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza inhibitorlarının aşkar olunması.** Sintetik asilhidrazidlərin törəmələri, qeyri-simmetrik əvəz olunmuş sidik cövhəri törəmələri, aromatik sulfonhidrazidlər, Şiff əsaslı fenil-aminotiazolidlər və təbii izoflavonoidlərin bəzilərinin  $\beta$ -qlükuronidaza fəallığı testinin köməkliyi ilə *in vitro* skriningi aparılmışdır.

**1.1. Flavonoidlər sinfinə daxil olan təbii inhibitorlar.** Flavonoidlər – çoxsaylıdır və bitkilərin müxtəlif orqanlarında rast gəlinən təbii bioloji-fəal maddələrin kifayət qədər yaxşı öyrənilmiş qrupudur.

*Ficus mucoso* bitkisindən alınan ekstraktların tədqiqi nəticəsində bizim tərəfimizdən flavonoidlər qrupuna daxil olan 19 maddə alınmışdır. Bunlardan mukusizoflavon A  $\beta$ -qlükuronidazanı inhibirləşdirən ən güclü inhibitorlar dördlüyünə daxildir.

**1.2. İkiqat əvəz olunmuş asilhidrazidlər sinfinə aid olan inhibitorlar (I sinif).** Tədqiqatlarımızda bu sinifə daxil olan maddələr arasında əsasən ikiqat əvəz olunmuş asilhidrazidlər üstünlük təşkil etmişlər, bu əvəzedicilərdən biri Şiff əsaslı indollar olmuşdur. Tədqiqatlarımızda biz bu maddələr arasında *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın 7 potensial inhibitorunu aşkar etmişik. Aşkar olunan bu 7 inhibitordan 6-sı standart inhibitor olan D-qlükaro-1,4-laktonla ( $IC_{50} = 48,2 \mu M$ ) müqayisədə daha effektiv olmuşdur. Bu qrupda daha effektiv inhibitor 4-bromo-N'-[2-metil-1H-indol-3-il]metiliden] benzohidrazid olmuşdur. Tədqiq olunan I sinif maddələrin struktur və funksiyasının qarşılıqlı təsiri nöqtəyi nəzərindən



qeyd etmək olar ki, halogen törəməli maddələrin inhibirləşdirici effekti  $F < Cl < Br$  istiqamətində artır (I-4, I-6, I-3 inhibitorları).

### **1.3. Qeyri-simmetrik əvəz olunmuş sidik cövhəri törəmələri sinfinə daxil olan inhibitorlar (II sinif)**

Bu sinifə daxil olan 12 tədqiq olunan kimyəvi maddələr arasında  $\beta$ -qlükuronidazanın inhibirləşdirilməsi üçün cəmi 4 maddə effektiv olmuşdur. Bundan başqa bu sintetik maddələr arasında qlükuronidazanın bizim tərəfimizdən tədqiq olunan bütün sintetik maddələri arasında daha güclü inhibitoru aşkar olunmuşdur. Bu maddə N-(3-xlorofenil)-N<sup>7</sup>-(8-xinolinil) sidik cövhəridir (II-4,  $IC_{50}=2,30 \pm 0,18 \mu M$ ).

### **1.4. Benzosulfano-hidrazonlar sinfinə daxil olan inhibitorlar (III sinif)**

Benzosulfano-hidrazonlar az toksikiliyə malik olan terapevtik vasitələrə aid sintetik maddələrin digər siniflərilə müqayisədə demək olar ki, yeni sinfidir. Bu qrupa daxil olan inhibitorlar üçün  $IC_{50}$  qiyməti 4,98 – 155,84  $\mu M$  həddlərində dəyişir. Bu qrupun daha effektiv inhibitoru N<sup>7</sup>-[(E)-(2-xloro-5-nitrofenil) metiliden]-4-metilbenzo-sulfonohidraziddir (III-24-cü inhibitor), onun  $IC_{50}$  qiyməti  $4,98 \pm 0,16 \mu M$ -a bərabərdir. Bu inhibitor effektivliyinə görə bizim tərəfimizdən tədqiq olunan bütün digər sintetik maddələr içərisində ikinci yeri tutur, inhibirləşdirici effektivinə görə yalnız II-4 inhibitorundan geridə qalır.

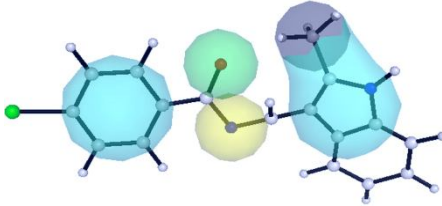
### **1.5. Fenil-aminotiazolidlər sinfinə daxil olan inhibitorlar (IV sinif)**

Praktiki olaraq tədqiq olunan bütün 29 fenil-aminotiazolid törəmələrindən hamısı *E. coli*  $\beta$ -qlükuronidazaya münasibətdə müəyyən inhibirləşdirici effekt göstərdilər.  $\beta$ -qlükuronidazanın inhibirləşməsində bu seriyaya daxil olan maddələrdən daha effektiv olanı IV-17 ( $IC_{50}=4,88 \pm 0,12 \mu M$ ) maddəsidir. IV-2, IV-11 və IV-16 maddələri də əhəmiyyətli dərəcədə inhibirləşdirici effektə malikdirlər. Digər maddələr isə  $IC_{50}$  qiymətləri 9,77 - 48,1  $\mu M$  həddlərində dəyişən orta inhibirləşdirici effektivlik göstərdilər. Beləliklə, *in vitro* skrining nəticəsində bizim tərəfimizdən *E. coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın yeni sinif inhibitorları – fenil-aminotiazolidlər aşkar olundu və bu sinifə daxil olan maddələr tədqiqatlarımızda *E. coli*  $\beta$ -qlükuronidazaya münasibətdə yaxşı inhibirləşdirici effekt göstərdilər.

### **1.6. $\beta$ – qlükuronidaza inhibitorlarının ümumiləşdirilmiş farmakofor modeli.**

Bioloji makromolekullarla – reseptorlarla optimal qarşılıqlı təsir üçün lazım olan liqandın sterik və elektron xassələrinin cəmi - farmakoforların aşkar olunması- liqand-biohədəf sistemində struktur və fəallıq arasındakı (QSAR-quality structure activity relationship) miqdarı qarşılıqlı əlaqə

məsələsinin həllində ilkin yanaşmadır. Bunun üçün I-3, II-4 və III-24 inhibitorlarının kimyəvi strukturları (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>) veb-serverində olan PharmaGist proqramının köməkliyi ilə düzəldilmişdir. Nəticədə alınan farmakofor modeli 1-ci şəkildə verilmişdir. Şəkildən görünür ki, model dörd farmakofor mərkəzdən: donor-akseptor hidrogen rabitələrlə təmin edən mərkəzi farmakoforla ayrılan iki lipofil (aromatik + hidrofob) mərkəzdən ibarətdir.



**Şək. 1.** *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza inhibitorlarının farmakofor modeli I-3 inhibitorunun modeli təsvir edilmişdir. Farmakoforların rəngi: sarı – hidrogen rabitələrinin donoru, yaşıl – hidrogen rabitələrinin akseptoru, boz – hidrofob qarşılıqlı təsirlər, mavi – aromatik qarşılıqlı təsirlər.

## 2. *E.coli* $\beta$ -qlükuronidazanın fəal mərkəzinin 2 D və 3 D modelinin qurulması.

Fəal mərkəzin, xüsusilə də fermentin substrat-birləşdirici mərkəzinin iki- və üçölçülü modelinin qurulması üçün bizim tərəfimizdən molekulyar dokinq metodundan istifadə olunmuşdur. 2,42 Å ayırtdəmə qabiliyyətli rentgenostruktur analiz metodu ilə alınmış [Wallace et al. 2010] liqand kimi *para*-nitrofenil- $\beta$ -D-qlükuronid subtrat molekulu, reseptor kimi *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın molekulyar strukturu istifadə olunmuşdur (pdb 3LPG identifikatoru;

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3LPG>).

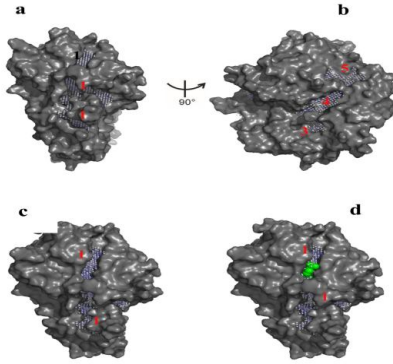
Qlükuronidazanın substrat-birləşdirici mərkəzinin ikiölçülü modeli LigPlot<sup>+</sup> proqramının köməyi ilə qurulmuşdur.

### 2.1. *E.coli* $\beta$ -qlükuronidazanın fəal mərkəzinin üçölçülü modeli

2-ci şəkildə *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın 5 əsas liqand-birləşdirici „ciblərlə“ və substratla (1-ci cib) birləşmiş səthinin strukturu verilmişdir.

Təxminən mərkəzdə bu „cib“ təxminən 21 Å uzunluqlu „tunnel“ əmələ gətirir ki, bu da fermentin səthinin altından keçir (Şək. 2 c və 2 d). Biz güman edirik ki, göstərilən tunnel görüldüyü kimi, substrat-birləşdirici „cib“də substratın giriş yeridir və ya qlükuronidaza reaksiyası məhsullarının çıxış yeridir. Bu fikirin dolaylı sübutu  $\beta$ -qlükuronidazanın

müxtəlif inhibitorlarının molekulyar dokininin köməyi ilə əldə edilmişdir (sonrakı bölmələrdə baxılır).

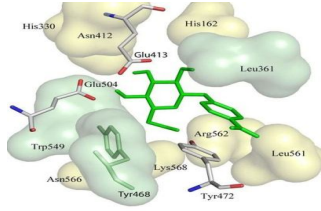


**Şək.2.** *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza səthinin relyefi. Liqand-birləşdirici „ciblərin“ nömrələri 1-dən 5-ə qədər qırmızı rəqəmlərlə işarələnmişdir. a, b – 1, 3, 4 və 5 cibləri; c- 1-ci substrat-birləşdirici cib; d – substratla birləşmiş ferment.

Sonrakı şəkillərdə substrat molekulu ilə birləşmiş fermentin ümumi üçölçülü strukturu (Şək. 3) və substrat-birləşdirici cibin substratla (*para*-nitrofenil  $\beta$ -D-qlükuronid) fermentin aminturşu qalıqlarının qarşılıqlı təsirini göstərən ətraflı 3 D strukturu verilmişdir (Şək. 4).



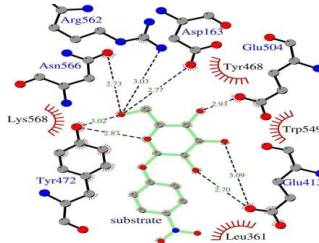
**Şək. 3.** *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın A-zəncirinin 3D strukturunun ümumi görünüşü. Substrat-birləşdirici cib yaşıl rənglə göstərilmişdir.



**Şək. 4.** *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın A-zəncirinin substrat mərkəzinin quruluşunun ətraflı üçölçülü modeli. Substrat molekulu yaşıl rənglə göstərilmişdir. Katalizdə iştirak edən Glu 413 və Glu 504 aminurşu qalıqları ox modeli şəklinə göstərilmişdir və C-boz, N-göy, O-qırmızı rənglə rənglənmişdir..

## 2.2. *E.coli* $\beta$ -qlükuronidazanın fəal mərkəzinin ikiölçülü modeli

Fermentin substrat-birləşdirici mərkəzinin təsvir edilmiş üçölçülü modeli *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın fəal mərkəzinin aminurşu qalıqlarının yerləşmə xüsusiyyəti haqqında düzgün təəvvür verir. Lakin, ikiölçülü model funksional qruplar arasında məsafəni daha dəqiq müəyyən etməyə və hidrogen rabitələrlə hidrofob qarşılıqlı təsirlərin mövcudluğunu göstərməyə imkan verir. Buna görə də biz həmçinin  $\beta$ -qlükuronidazanın substrat-birləşdirici mərkəzinin ikiölçülü modelini təqdim edirik (Şək. 5). 5-ci şəkildən görüldüyü kimi, *para*-nitrofenil  $\beta$ -D-qlükuronid substratının funksional qrupları Asp 163, Glu 413, Tyr 472, Glu 504, Arg 562 və Asn 566 kimi fəal mərkəzin müxtəlif aminurşu qalıqları ilə hidrogen rabitələri əmələ gətirir. Beləliklə, bizim tərəfimizdən bakterial  $\beta$ -qlükuronidazanın fəal mərkəzinin quruluşunun daha təkmil modeli yaradılmışdır. Bu model bizim tərəfimizdən müxtəlif sintetik və təbii inhibitorların *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza ilə qarşılıqlı təsirinin mexanizmini aydınlaşdırmaq üçün istifadə olunur.



**Şək. 5.** *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın fəal mərkəzinin diaqramı. Substrat molekulunda kovalent rabitələr yaşıl rənglə, aminurşu qalıqlarının kovalent rabitələri-qara rənglə, hidrogen rabitələri- punktirlə, hidrofob qarşılıqlı təsirlər-qırmızı yarım aypara ilə göstərilmişdir. Hidrogen rabitələrinin uzunluğu anqstremlərlə verilmişdir.

### **3. *E.coli* β-qlükuronidaza inhibitorlarının molekulyar dokinqi.**

#### **3.1. Müxtəlif sinif inhibitorların molekulyar dokinq nəticələri. Onların təsirinin mümkün mexanizmləri**

*E.coli* β-qlükuronidazaya güclü təsir etmək qabiliyyətinə malik olan, lakin insan β-qlükuronidazasına təsir etməyən və ya çox zəif effekt göstərən bakterial fermentin (*E.coli*) spesifik inhibitorları böyük maraq doğurur. Bu maraq məsələn, onunla əlaqədardır ki, bakterial fermentin spesifik inhibitorları yoğun bağırsağın xərçənginin müalicəsi zamanı güclü müsbət təsir göstərir. Aldığımız bütün 56 sintetik inhibitorlar və təbii flavonoid N1 3.1. bölməsində göstərilmiş parametrlilə molekulyar dokinq prosedurasına məruz qalmışdır.

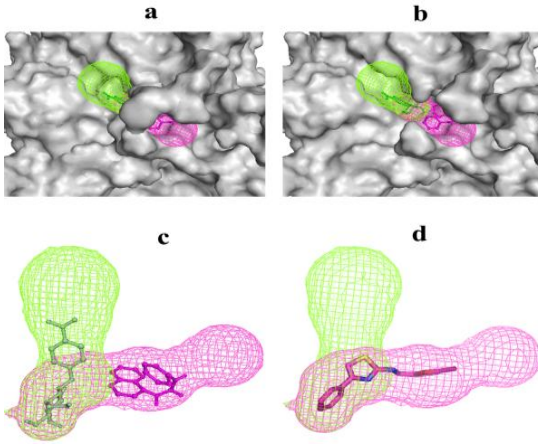
Inhibitorların birləşmə üsuluna görə bir-birindən fərqlənən 3 forması müşahidə olunur:

a) bs-1 saytında bilavasitə birləşmə. Belə birləşmə I sinif inhibitorlarda (I-3 inhibitoru istisnadır), II-6, GDL (qlükaro-D-laktam), ST (standart inhibitor, D-qlükaro-1,4-lakton), III-1, III-14, III-22, III-23, III-25, III-28 aromatik sulfanol hidrazidlərdə, təbii inhibitor olan N-1 izoflavonoidində, IV-3, IV-5, IV-7, IV-8, IV-13, IV-18, IV-19, IV-20, IV-22, IV-25 və IV-29 fenil-aminotiazolidlərdə müşahidə olunur.

b) bs-2 saytında birləşmə. İstisna olaraq bu sayt çərçivəsində yalnız iki inhibitor birləşir: II-3 və III-2 (Şək. 6c).

v) bs-1 və bs-2 arasında birləşmə. Birləşmənin üçüncü variantı – özündə eyni zamanda bs-1 və bs-2-ni saxlayan və ya bütövlükdə onlar arasında yerləşən sahədə birləşmədir (Şək. 6d). Bu zaman inhibitor molekulunun bir hissəsi bs-1-ə, digər hissəsi isə - bs-2-yə birləşir. Birləşmənin bu üsulu daha çox In-1, In-2, In-3, In-4, In-5, In-6, In-7 və In-8 spesifik inhibitorları da daxil olmaqla bizim tərəfimizdən tədqiq olunan inhibitorlar üçün xarakterikdir. Oxşar yolla a) və b) müddəalarında sadalanan inhibitorlardan başqa bütün inhibitorlar birləşir.

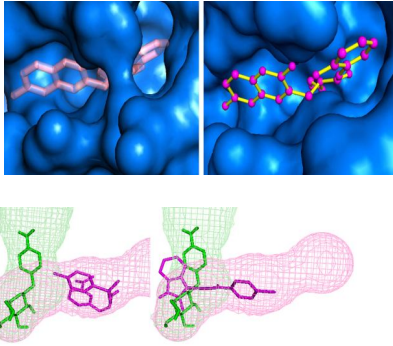
6a və 6b şəkillərində bs-1 (yaşıl rəng) və bs-2 (çəhrayı rəng) kanalları təsvir olunur, 6b şəkli onunla fərqlənir ki, onda fermentin strukturu fermentin səthinin altından keçən tunelin tavanını təşkil edən 362-365 və Leu 561 aminturşu qalıqlarsızdır. Bu ona görə düzəldildi ki, bs-1 və bs-2 kanallarının birləşmə yerində fəal mərkəzin daxili hissəsi imkan daxilində nəzərə çarpsın.



**Şək. 6.** Substrat və inhibitorların *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazaya birləşmə mərkəzi. a və b – bs-1 və bs-2-nin birləşmə mərkəzinin ümumi görünüşü c və d - bs-1 və bs-2-ni birləşdirən tunnelin sxemi. Yaşıl rənglə substrat, çəhrayı rənglə II-3(c) və IV-21(d)inhibitorları göstərilmişdir.

Aşkar olunmuş potensial birləşmə saytlarında inhibitorlarla fermentin qarşılıqlı təsirinin xarakterizə olunması və inhibitorların *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza ilə birləşməsinin mümkün mexanizmləri haqqında məlumatların alınması məqsədilə biz yuxarıda göstərilən müxtəlif siniflərdən olan daha effektiv inhibitorlar üzrə ətraflı tədqiqatlar aparılmışdır.

Beləliklə, inhibirləşmənin rəqabətsiz tipi tədqiq olunan inhibitorların əksəriyyəti üçün xarakterikdir, həmçinin bu inhibitorların bakterial fermentə münasibətdə spesifikliyi *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazada iki şaxədən ibarət tunnelin mövcudluğu ilə müəyyən olunur, hər bir şaxə substrat və inhibitorların birləşmə yeridir. Məməlilərin xüsusilə də insanın  $\beta$ -qlükuronidaza fermenti belə tunnelə malik deyil və nəticədə spesifik bakterial inhibitorlar insan  $\beta$  – qlükuronidaza fermentini rəqabətli və ya qeyri-rəqabətli yolla inhibirləşdirə bilər. Müəyyən olunmuşdur ki, *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin spesifik inhibitorları insan fermentinin inhibirləşdirilməsində qeyri-effektivdir və ya az effektivdir [Wallace et al. 2010].



**Şək. 7.** *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin inhibirləşməsinin molekulyar mexanizmi. a və b-substratın birləşməsi zamanı *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin molekulunda baş verən konformasion dəyişikliklər. a-substratın birləşməsinə qədər, tunnelə giriş bağlıdır, inhibitor tunnelə girə bimir. b-substratın birləşməsi tunnelin açılmasına səbəb olur, inhibitor tunnelin daxilində birləşir, c və d-fermentin fəal mərkəzindən reaksiya məhsulunun çıxmasının inhibitor molekulu ilə mühasirəyə alınması hesabına *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın inhibirləşməsinin mümkün mexanizmi, c-2-ci tunnelin mühasirəyə alınması ; d-1 və 2-ci tunnelin mühasirəyə alınması.

Bizim tədqiqatların nəticələrini nəzərə alaraq bakterial fermentin inhibirləşməsinin rəqabətsiz tipinin substratın fermentin fəal mərkəzinə daxil olmasının mühasirəsi hesabına deyil, ilk növbədə reaksiya məhsulunun-qlükuronidin 1-ci və 2-ci tunnəllər vasitəsilə çıxmasının mühasirəsi hesabına həyata keçirilməsi haqqında məntiqi fikir yürütmək olar. Belə inhibirləşmənin molekulyar mexanizmi 7 c və 7 d şəkilləri ilə aydınlaşdırılır. I-3, II-4, III-24, IV-17, In1-In8 kimi daha effektiv inhibitorlar belə birləşir, onların molekulunun bir hissəsi 1-ci tunnəldən çıxan reaksiya məhsulunu mühasirəyə alır, ikinci hissəsi isə 2-ci tunnəldə işıq yarığını tutaraq ikinci mümkün çıxımı mühasirəyə alır.

*E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın sintetik və təbii inhibitorlarının bizim tərəfimizdən alınan molekulyar dokiinq nəticələrini ümumiləşdirərək müəyyən inamlaqla təsdiq etmək olar ki, bu nəticələr yalnız öyrənilən fermentin inhibitorlarının və substratlarının birləşməsi üçün cavabdeh olan  $\beta$ -qlükuronidazanın molekulyar saytlarının strukturunu işıqlandırır, həm də  $\beta$ -qlükuronidazanın yeni effektiv inhibitorlarının yaradılmasına yönələn sonrakı *in silico* tədqiqatların əsasını təşkil edir. Belə inhibitorların sintezi farmakologiya və tibb üçün böyük əhəmiyyət kəsb edir. Bizim tədqiqatlar həmçinin effektiv və toksiki olmayan farmakoloji preparatların axtarışının istiqamətini göstərir.

## NƏTİCƏLƏR

1. *in vitro* skrining nəticəsində *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın kataliz etdiyi reaksiyanın inhibirləşməsinin qiymətləndirilməsi yolu ilə Pakistan İslam Respublikasının Karaçi Universitetinin İCCBS Beynəlxalq Mərkəzinin maddələr bankından götürülmüş müxtəlif siniflərdən olan 150-dən çox kimyəvi maddələr arasından *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın 64 sintetik və 14 təbii inhibitorları aşkar olunmuşdur.

2. *Ficus mucoso* bitkisinin meyvələrindən 19 təbii flavonoid alınaraq onların *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza fermentini inhibirləşdirməsi testi aparılmışdır. Alınmış flavonoidlərdən 14-nün *E.coli*  $\beta$  – qlükuronidaza fermentinin effektiv inhibitorları olması aşkar olunmuşdur. Bu flavonoidlərdən 3-ü elmə ilk dəfə gətirilmişdir və həmin flavonoidlərdən biri olan mukusizoflavon A (N-1 inhibitoru,  $IC_{50}=0,68\pm 0,01\mu M$ ) maddəsi *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin indiyə qədər məlum olan inhibitorlarının ən effektiv inhibitorlar dördlüyünə daxil olması məlum olmuşdur.

3. Daha çox effektiv inhibitorlar aşağıdakılardır:

- a) ikiqat əvəz olunmuş asilhidrazidlər sinfindən (I sinif)-4-bromo-N'-[2-metil -1H- indol-3-il] metiliden-benzohidrazid (I-3 maddəsi,  $IC_{50}=11,34\pm 0,62\mu M$ );
- b) qeyri-simmetrik əvəz olunmuş sidik cövhəri törəmələri sinfindən (II sinif) – N-(3-xlorofenil)-N'-(8-xinolinil) sidik cövhəri (II-4 inhibitoru,  $IC_{50}=2,30\pm 0,18\mu M$ );
- v) benzosulfano-hidrazonlar sinfindən olan (III sinif) – N'-[(E)-(2-xloro-5-nitrofenil) metiliden]-4-metilbenzo- sulfonohidrazid (III-24 inhibitoru,  $IC_{50}, = 4,98\pm 0,16\mu M$ );
- q) fenil-aminotiazolidlər sinfindən olan (IV sinif) – 3- {[4-fenil-1,3-tiazol-2-il]imino]metil}-1,2-benzodiol (IV-17 inhibitoru,  $IC_{50}=4,88\pm 0,12\mu M$ ).

4. Fenil-aminotiazolidlər sinfini (IV sinif) *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın spesifik inhibitorlarının yeni sinfi hesab etmək olar, belə ki, 29 tədqiq olunan fenil-aminotiazolidlərin törəmələrindən hamısı *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazaya münasibətdə müəyyən inhibirləşdirici effekt göstərdilər.

5. Substratların və qlükuronidazanın daha çox effektiv inhibitorlarının molekulyar dokinqi ilk dəfə olaraq *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın fəal mərkəzinin ətraflı olaraq 2D və 3D modelini yaratmağa imkan verdi. Fermentin fəal mərkəzinin ümumiləşdirilmiş modelinə substratın O-qlikozid rəbitəsinə nəzərən düzgün oriyentasiya olunmuş Glu 413, Glu 504 və Tyr 472 3 katalitik fəal aminturşu qalıqları,



həmçinin His 162, His 330, Leu 361, Asn 412, Tyr 468, Trp 549, Leu 561, Arg 562, Asn 566 və Lys 568 qalıqları ilə əmələ gələn hidrofob „cib“ daxildir. *Para*-nitrofenil  $\beta$ - D-qlükuronid substratının funksional qrupları fəal mərkəzin Asp 163, Glu 413, Tyr 472, Glu 504, Arg 562 və Asn 566 kimi müxtəlif aminturşu qalıqları ilə hidrogen rabitələri əmələ gətirir.

6. Göstərilmiş model müxtəlif sintetik və təbii inhibitorların *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidaza ilə qarşılıqlı təsirinin mexanizminin aydınlaşdırılması üçün istifadə olunur. Aydınlaşdırılmışdır ki, inhibitorun fermentlə qarşılıqlı təsirində əsas rol Phe 161, His 162, Asp 163, Val 355, Leu 361, Ile 363, Val 446, Phe 448, Tyr 468, Trp 469, Tyr 472, Gly 559, Leu 561, Arg 562, Lys 568 kimi aminturşu qalıqlarının da daxil olduğu hidrofob qarşılıqlı təsirlər oynayır. Leu 361, Leu 561, Tyr 468 və Tyr 472 – dörd aminturşu qalığı bütün inhibitorlar üçün ümumi olan hidrofob „cibin“ strukturunu əmələ gətirir.

7. Substratın qlükon (saxarid) hissəsinin birləşmə yerinə apanan iki tunnelin mövcudluğu müəyyən olunmuşdur. 11,5 Å -dən daha uzun olan 1-ci tunnel fermentin zülal qlobulasının səthinə perpendikulyar yönəlmişdir. 21Å-dən daha uzun olan 2-ci tunnel demək olar ki, fermentin səthinə paralel keçir və birinci tunnellə 75° bucaq təşkil edir. Belə tunneller insan  $\beta$ -qlükuronidazanın strukturunda olmur. Belə güman olunur ki, *E.coli*  $\beta$ -qlükuronidazanın strukturunda iki tunnelin mövcudluğu insan fermentinə deyil, bakterial fermentə münasibətdə bəzi inhibitorların spesifikliyinə müəyyən edir və bəzi inhibitorların xüsusilə də yoğun bağırsağ xərçənginin müalicəsi üçün maraqlı olan inhibitorların yaratdığı inhibirləşmənin rəqabətsiz tipinin konkret molekulyar mexanizmini izah etməyə imkan verir.

8. Bizim tərəfimizdən alınan eksperimental məlumatların yekunu bakterial qlükuronidazanın yeni effektiv inhibitorlarının *in silico* dizaynı üçün əsas ola bilər. Bakterial qlükuronidazanın inhibirləşməsi bəzi neoplastik dəyişikliklərin müalicəsinə və ya bəzi kimyəvi terapevtik vasitələrin yan təsirlərinin kənar edilməsinə yönələn yanaşmalardan biridir, bu istiqamətdəki tədqiqatlar son nəticədə yeni, effektiv dərman preparatlarının yaradılmasına gətirib çıxarır.

## Dissertasiya mövzusu üzrə çap olunmuş elmi əsərlərin siyahısı

1. Rüstəmov X.R. Şiff Əsaslı İndol Asilhidrazidləri və Sulfonlar Sinfindən Olan Maddələrin  $\beta$ -qlükuronidaza Fermentinə təsiri (*in vitro* Tədqiqat) // AMEA-nın xəbərləri (biologiya elmləri), 2009, 64(5-6), s. 14-19.

2. Rüstəmov X.R. Şiff əsaslı indol asilhidrazidləri sinfindən ksenobiotiklərin hüceyrədən normal xaricinə kömək edən maddələrin seçilməsi /Aqrar təhsil sistemində innovasiya texnologiyalarının tətbiqi və beynəlxalq əməkdaşlıq formaları Beynəlxalq Elmi-Praktik Konfransın Tezisləri, Gəncə, 2010, 21-22 may, s.146.

3. Rüstəmov X.R. Sulfonohidrozon sinfindən olan maddələr arasından  $\beta$ -qlükuronidaza fermentinin inhibitorlarının (*in vitro*) axtarışı //Azərbaycan Botaniklər Cəmiyyətinin elmi əsərləri, 2010, cild 1, s. 342-348.

4. Rüstəmov X.R.  $\beta$ -qlükuronidaza fermentini ingibirləşdirən sulfonohidrozon sinfindən olan maddələrin identifikasiyası /Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası aspirantlarının elmi konfransının materialları, Bakı, 2010, 26-27 may, s.207-209.

5. Jean J. K.Bankeu, Rustamova Khayala., Bruno N. Lenta, Diderot T. Nougoue, Silvere A. Ngouela, Sufyan A. Mustafa, Khalid Asaad, Mohammed I. Choudhary, Sean T. Prigge, Ralphreed 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, V.74, p. 1370–1378. (İF=3,6)

6. Rustamova Kh.R. Screening of  $\beta$ -D-glucuronidase unsymmetric urea inhibitors *in vitro* / The Materials of the III International Scientific Conference on Innovation Problems of Modern Biology, Baku, 2013, 7-8 may, s. 44-46.

7. Mammadova Kh., Safarov N., Romy Massfeller R.,Jabbarova Sh., Gasanov R. Molecular Docking Studies of Schiff Bases of Thiazole, A Novel Class of  $\beta$ -Glucuronidase Inhibitors //Journal of Qafqaz University – Chemistry and Biology, 2013, V. 1, №1, p. 89-93.

8. Rustamova Kh.R., Hasanov R.A. Searching of inhibitors of  $\beta$ -glucuronidase enzyme among of compounds belonging to the unsymmetrically urea classes (in vitro research) // Transaction of the

Institute of Microbiology of Azerbaijan National Academy of Sciences, 2013, Baku, V. 11, №1, p. 236-240.

9. Rüstəmovə X.R., Əfəndiyev A.M., Həsənov R.Ə.  $\beta$  – Qlükuronidaza fermentini inhibisiya edən Şiff əsaslı tiazol birləşmələrinin skriningi və  $IC_{50}$ -sinin öyrənilməsi //Azərbaycan Təbabətinin Müasir Nailiyyətləri, 2013, № 2, s. 115-119.

10. Khalid Mohammed Khan, Aneela Karim, Sumayya Saied, Nida Ambreen, Xayale Rustamova, Shagufta Naureen, Sajid Mansoor, Muhammad Ali, Shahnaz Perveen, M. Iqbal Choudhary, Guillermo Antonio Morales Evaluation of the thiazole Schiff bases as  $\beta$ -glucuronidase inhibitors and their *in silico* studies //Molecular Diversity, 2014, V. 18, № 2, p. 295-306 (İF=2,8).

11. Mammadova Kh., Jabbarova Sh., Massfeller R. New Insights into the Inhibition of Beta Glucuronidase / II International Scientific Conference of Young Researchers, 2014, 18-19 april, Baku, p. 160-161.

12. T Mammadova Kh., Jabbarova Sh., Massfeller R. Three - Center Pharmacophore Model of  $\beta$ - Glucuronidase Inhibitors /1.International Medical Congress for Student and Young Doctors, 2014, 2-3 may, Baku, p. 36.

13. Mammadova Kh., Safarov N., Jabbarova Sh., Gasanov R. Molecular Docking Studies of Disubstituted Acyl Hydrazides, Inhibitors of  $\beta$ -Glucuronidase //Journal of Qafqaz University – Chemistry and Biology, 2014, V. 2, №1, p. 3-9.

**СКРИНИНГ ИНГИБИТОРОВ  $\beta$ -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ И  
ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ С МЕТОДОМ  
МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА**

**РЕЗЮМЕ**

$\beta$ -глюкуро니다за обладает способностью расщеплять как эндогенные метаболиты, так и ксенобиотики. Именно  $\beta$ -глюкуро니다за служит для удаления глюкуро니다 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 YII, называемого иначе синдромом Слая [Hall et al., 1973; Sly et al., 1973].

Что касается бактериальных  $\beta$ -глюкуро니다з, в основном  $\beta$ -глюкуро니다зы *E.coli*, то этот фермент является обычным компонентом кишечника человека, экскретируемым симбиотической микрофлорой. Находясь в различных отделах кишечника человека,  $\beta$ -глюкуро니다за *E.coli* приводит к увеличению содержания канцерогенов, облегчая рециркуляцию токсинов, гормонов и различных лекарственных препаратов [Kuhn et al., 1998; Adlercreutz et al., 1977]. Кроме того, ингибирование  $\beta$ -глюкуро니다зы *E.coli* значительно облегчает ход химиотерапевтического лечения рака кишечника толстой кишки, как это показано в работе [Wallace et al., 2010].

В результате проведенных исследований, нами идентифицированы ряд новых, ранее неизвестных ингибиторов  $\beta$ -глюкуро니다зы *E.coli*. Скрининг *in vitro* среди синтетических соединений 4х химических групп: производных ацил-гидразидов, несимметрично замещенных производных мочевины, ароматических сульфонол-гидразидов и фенил-аминотиазолидов, а также природных изофлавоноидов выявил 78 потенциальных ингибиторов  $\beta$ -глюкуро니다зы *E.coli*. 43 из этих ингибиторов оказались эффективнее, чем стандартный ингибитор фермента - D-глюкаро-1,4-

лактон. Идентифицировано также 9 природных ингибиторов из группы изофлавоноидов, подавляющих активность бактериального фермента сильнее, чем стандартный ингибитор. Один из этих природных изофлавоноидов, мукусизофлавонон А (ингибитор N-1) имеет значение  $IC_{50}=0.68\pm 0.01 \mu\text{M}$  и входит в четверку наиболее мощных, известных на сегодняшний день, ингибиторов  $\beta$ -глюкуронидазы *E.coli*. Благодаря своему естественному происхождению природные ингибиторы должны рассматриваться как наиболее перспективные с точки зрения введения их в ассортимент фармакологической промышленности.

В результате проведенных таким образом исследований нам удалось создать 2 D и 3 D модели строения соответствующих сайтов. Впервые представленная нами двумерная модель активного центра, на которой показано взаиморасположение, взаимодействия (полярные и неполярные) и расстояния между функциональными группами, позволяет наглядно представить роль этих групп и механизм катализа, осуществляемый  $\beta$ -глюкуронидазой *E.coli*.

Полученная нами модель строения комплекса субстрата и активного центра фермента позволила также выявить детали взаимодействия различных ингибиторов в местах их связывания на ферменте.

Кроме того, наши исследования позволили установить наличие двух туннелей, ведущих к месту связывания гликоновой (сахаридной) части субстрата. Подобные туннели отсутствуют в структуре  $\beta$ -глюкуронидазы человека, и можно полагать, что наличие этих двух туннелей и определяет специфичность некоторых ингибиторов к бактериальному, но не к человеческому ферменту. Наличие двух туннелей в структуре  $\beta$ -глюкуронидазы *E.coli* также позволяет объяснить конкретный молекулярный механизм бесконкурентного типа ингибирования некоторых особо интересных для лечения рака толстой кишки ингибиторов. Таким образом, в результате проведенных в данной работе исследований идентифицированы новые эффективные ингибиторы  $\beta$ -глюкуронидазы *E.coli*, включая целый класс новых ингибиторов-фенил-аминотиазолидов. Впервые построены подробные двух- и трехмерные модели активного центра фермента. Изучено взаимодействие субстратов и ингибиторов с ферментом методом молекулярного докинга. Обнаружены структурные отличия человеческой и бактериальной глюкуронидаз, лежащие вероятно в

основе различной специфичности некоторых ингибиторов в отношении двух ферментов. Ингибирование бактериальной глюкуронидазы является одним из подходов к лечению некоторых неопластических изменений или устранению побочных эффектов некоторых химиотерапевтических средств. Сумма полученных нами экспериментальных данных может служить основой для дизайна новых эффективных ингибиторов *in silico*. Исследования в этом направлении приведут, в конечном итоге, к созданию новых эффективных лекарственных препаратов.

**KHAYALA RAJAB MAMMADOVA**

**SCREENING OF  $\beta$ -GLUCURONIDASE INHIBITORS AND  
STUDY OF INHIBITION THROUGH MOLECULAR DOCKING  
METHOD**

**SUMMARY**

$\beta$ -glucuronidase possesses ability to split both endogenous metabolites, and xenobiotics.  $\beta$ -glucuronidase serves for removal glucuronides that, finally, leads to full degradation of toxic metabolites and xenobiotics. Deficiency of this enzyme localized at mammals in lysosomes, leads to accumulation glucosaminoglycans such as heparinsulphate and chondrionsulphate in many tissues, bringing to mucopolisaccharidosis YII type called differently by a syndrome of Sly [Hall et al., 1973; Sly et al., 1973].

Generally *E.coli*  $\beta$ -glucuronidase is a usual component of intestines. Being in various departments of intestines, *E.coli*  $\beta$ -glucuronidase leads to increase in the content of carcinogens, facilitating recirculation of toxins, hormones and various medicines [Kuhn et al., 1998; Adlercreutz et al., 1977]. Besides, the inhibition of *E.coli*  $\beta$ -glucuronidase considerably facilitates a course of a chemotherapeutic cancer therapy of intestines of a colon cancer as it is shown in work [Wallace et al., 2010].

As a result of our researches, we identified new, earlier unknown inhibitors  $\beta$ -glucuronidase of *E.coli*. We have done *in vitro* screening among synthetic connections 4x chemical groups: the derivative asyl-hydrazides, asymmetrically replaced derivatives of urea, aromatic sulfonol-hydrazides and phenyl-aminotiazolides, and also natural isoflavonoids. We have revealed 78 potential inhibitors  $\beta$ -glucuronidase of *E.coli*. 43 from these inhibitors were more effective, than standard inhibitor of enzyme - D - glukaro-1,4 - lactone. 9 natural inhibitors from group of the isoflavonoids suppressing activity of bacterial enzyme are identified also is stronger, than standard inhibitor. One of these natural isoflavonoids, mucusisoflavone A (N-1 inhibitor) with  $IC_{50}=0.68\pm 0.01$  values enters to the four of the most powerful, known for today, inhibitors of *E.coli*  $\beta$ -glucuronidase. Thanks to the natural origin natural inhibitors

have to be considered as the most perspective from the point of view of their introduction in the range of the pharmacological industry.

As a result of the researches we create 2 D and 3 D models of a structure of the corresponding sites. For the first time the two-dimensional model of the active center presented by us on which is shown, interactions (polar and unpolar) and distances between functional groups, allows to present visually a role of these groups and the mechanism of a catalysis which is carried out *E.coli*  $\beta$ -glucuronidase.

The model of a structure of a complex (substrates or inhibitors with enzyme active site) allowed to reveal also details of interaction of various inhibitors in places of their binding on enzyme. Besides, our researches allowed to establish existence of two tunnels conducting to a place of binding of glucones part of a substrate. Similar tunnels are absent in structure human  $\beta$ -glucuronidase, and it is possible to believe that existence of these two tunnels and defines specificity of some inhibitors to bacterial, but not to human enzyme. Existence of two tunnels in structure of *E.coli*  $\beta$ -glucuronidase also allows to explain the concrete molecular mechanism of uncompetitive type of inhibition of some especially interesting to a cancer therapy of a colon cancer inhibitors. As a result of our researches we have identified new effective inhibitors of *E.coli*  $\beta$ -glucuronidase, including the whole class of new inhibitors - phenyl-aminotiazolides. We have shown the first time constructed detailed two - and three-dimensional models of the active center of enzyme. Interaction of substrate and inhibitors with enzyme through molecular docking method is studied. Structural differences human and bacterial glucuronidase are found. The inhibition bacterial glucuronidase is one of approaches to treatment of some neoplastic changes or elimination of side effects of some chemotherapeutic means. The sum of the experimental data obtained by us can form a basis for design of new effective in silico inhibitors. Researches in this direction will lead, finally, to creation of new effective medicines.



**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА  
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ**

---

*На правах рукописи*

**ХАЯЛА РАДЖАБ кызы МАМЕДОВА**

**СКРИНИНГ ИНГИБИТОРОВ  $\beta$ -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ И  
ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ С МЕТОДОМ  
МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА**

2406.01 – Биофизика

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание учёной степени  
доктора философии по биологии

**БАКУ-2015**