

Evaluation of Inhibitory Effect and Docking Study of Triazolyl Chromanone Oxime Ether Derivatives on Aromatase Enzyme Effective in Breast Cancer

Roshanak Hariri¹
Maryam Baeri²
Negar Mohammadhosseini³
Saeed Emami⁴
Alireza Foroumadi⁵
Maliheh Barazandeh Tehrani⁶

¹ PhD Student of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ Professor, Department of Medicinal Chemistry and Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁶ Associate Professor Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received July 17, 2023 ; Accepted November 25, 2023)

Abstract

Background and purpose: The spread of cancer, coupled with the challenges posed by complex treatments, stands as one of the foremost medical issues in today's world. Researchers consistently strive to identify novel compounds with enhanced efficacy and reduced side effects. Aromatase, a pivotal enzyme in estrogen receptor-positive breast cancer, plays a significant role. Estrogens, crucial for human physiology, particularly in women, contribute to sexual development and reproduction. The adverse effects associated with specific aromatase inhibitors underscore the imperative to discover new inhibitors characterized by higher selectivity, lower toxicity, and improved potency.

Materials and methods: This research is a basic study in which the semi-prepared aromatase kit was used to investigate synthetic compounds, specifically triazolyl chromanone oxime ethers. The most promising compounds were selected and subjected to molecular docking studies based on the inhibition results obtained.

Results: Out of the 40 compounds examined, seven samples exhibiting the most pronounced inhibitory effects were chosen for further scrutiny and IC₅₀ determination. Notably, derivatives 6b and 20b demonstrated the most robust inhibitory effects, with IC₅₀ values of 0.37 and 0.69 μM, respectively. Examining the interactions between these compounds and the aromatase enzyme revealed a significant relationship with the enzyme's active site.

Conclusion: In conclusion, the evaluation of various derivatives containing the triazolyl chromanone oxime ether structure suggests their considerable potential as aromatase enzyme inhibitors. Further exploration involving the design of structures within this category holds the promise of yielding more effective derivatives for inhibiting this enzyme.

Keywords: aromatase inhibitor, chromanone oxime ether, triazole.

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (227): 13-23 (Persian).

Corresponding Author: Maliheh Barazandeh Tehrani - Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (E-mail: barazand@tums.ac.ir)

ارزیابی اثر مهارکنندگی و بررسی برهم کنش های بین مولکولی مشتقات تریازولیل کرومانون اکسیم اترها بر روی آنزیم آروماتاز موثر در سرطان پستان

روشنک حریری^۱مریم بعیری^۲نگار محمدحسینی^۳سعید امامی^۴علیرضا فرومدی^۵ملیحه برازنده تهرانی^۶

چکیده

سابقه و هدف: شیوع بیماری سرطان به همراه درمان های پرعارضه، یکی از مسائل مهم درمانی در دنیای امروز می باشد و تلاش محققین به منظور یافتن ترکیبات جدید با اثربخشی بهتر و عوارض کم تر در این راستا همواره مورد توجه است. آنزیم آروماتاز، نقش مهمی در ایجاد سرطان گیرنده استروژن مثبت پستان دارد. استروژن ها به دلیل نقشی که در رشد جنسی و تولید مثل دارند، در انسان و به طور عمده در زنان ضروری می باشند. اثرات نامطلوب موجود در برخی مهارکننده های آروماتاز، نیاز به کشف مهارکننده های جدید با توانایی گزینش پذیری بالاتر، سمیت کم تر و بهبود قدرت را روز به روز افزایش می دهند. لذا هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر مهارکنندگی و بررسی برهم کنش های بین مولکولی مشتقات تریازولیل کرومانون اکسیم اترها بر روی آنزیم آروماتاز موثر در سرطان پستان بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه که در دسته پژوهش بنیادی قرار دارد، با استفاده از کیت نیمه آماده آروماتاز ترکیبات سنتتیک تریازولیل کرومانون اکسیم اترها مورد بررسی قرار گرفتند و با توجه به نتایج مهار به دست آمده بهترین ترکیبات جهت مطالعات داکینگ مولکولی انتخاب و بررسی شدند.

یافته ها: از بین ۴۰ ترکیب بررسی شده، ۷ نمونه که بیش ترین اثرات مهارری را از خود نشان دادند جهت بررسی های پیش تر و تعیین IC₅₀ انتخاب شدند، که در میان آن ها مشتقات 6b و 20b به ترتیب با IC₅₀هایی معادل ۰/۳۷ و ۰/۶۹ میکرومولار بهترین اثرات مهارری را از خود نشان دادند. هم چنین بررسی برهمکنش های این ترکیبات با آنزیم آروماتاز ارتباط موثری را با جایگاه فعال آنزیم نشان داد.

استنتاج: در نهایت با بررسی مشتقات مختلف حاوی ساختار تریازولیل کرومانون اکسیم اترها به نظر می رسد این ترکیبات توانایی مناسبی جهت مهار آنزیم آروماتاز از خود نشان می دهند و می توان در آینده با طراحی ساختارهایی از این دسته به مشتقات موثرتری جهت مهار این آنزیم دست یافت.

واژه های کلیدی: مهارکننده آروماتاز، تریازول، کرومانون اکسیم اتر

E-mail: barazand@tums.ac.ir

مؤلف مسئول: ملیحه برازنده - تهران: خیابان شانزده آذر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی دکتری تخصصی شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. دانشیار، پژوهشکده علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۶. دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۸/۱۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۹/۴

مقدمه

سرطان یک اختلال سلولی است که در نتیجه تغییر مکانیسم‌های کنترل‌کننده رشد و تمایز سلول‌ها به وجود می‌آید. سلول‌های سرطانی بیش از حد تکثیر شده و بافت‌های مجاور را مورد تهاجم قرار می‌دهند. این سلول‌ها توانایی تکرار چرخه تکثیر و مهاجرت به نواحی دیگر بدن و درگیر نمودن اعضای گوناگون را در فرایندی موسوم به متاستاز دارا می‌باشند. به طور معمول چنین سلول‌هایی اختلالات ژنتیکی دارند که نشان دهنده عدم ثبات ژنتیکی آن‌هاست. عوامل متعددی نظیر سن، نژاد، وراثت، عوامل محیطی و رژیم غذایی بر بروز سرطان تاثیر می‌گذارد (۱). به دلیل دخالت عوامل ژنتیکی و پیشرفت بیماری و هم‌چنین میزان بالای مرگ و میر ناشی از عدم پاسخ دهی به درمان‌های متداول، مبحث سرطان از اهمیت بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر بیش‌ترین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان به ترتیب مربوط به سرطان‌های ریه، پستان، پروستات و روده بزرگ بوده است (۲).

سرطان پستان تکثیر بدخیم سلول‌های اپیتلیالی است که مجاری یا لبول‌های پستان را درگیر می‌کند. سرطان پستان یک بیماری کلونال است، بدین معنی که یک سلول واحد در اثر مجموعه‌ای از جهش‌های پیکره‌ای یا جهش‌های رده‌زا تغییر شکل یافته و توده‌ای به وجود خواهد آورد که در نهایت تمام توان بدخیمی را بروز خواهد داد (۳). بنابراین ممکن است سرطان پستان تا مدت‌های طولانی به صورت یک بیماری غیرتهاجمی و یا یک بیماری تهاجمی بدون متاستاز وجود داشته باشد. از آنجایی که سلول‌های پستان دارای خصوصیات سلولی مشابه در مردان و زنان می‌باشد، این بیماری در هر دو جنس روی می‌دهد. البته میزان بروز آن در مردان نسبت به زنان ۱/۱۰۰ می‌باشد. در سال ۲۰۱۰ حدود ۱۸۰۰۰۰ مورد سرطان مهاجم پستان و ۴۰۰۰۰ مورد مرگ در ایالات متحده رخ داده است (۴). بدخیمی‌های اپیتلیال پستان شایع‌ترین علت سرطان در زنان به‌شمار می‌آید (۲).

خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان آسیایی یک پنجم تا یک دهم زنان آمریکای شمالی و اروپای غربی است. از هر ۹ نفر زنی که در آمریکای شمالی تا سن ۸۰ سالگی زندگی می‌کنند، یک نفر ممکن است به سرطان مهاجم پستان مبتلا شود. غلظت استروژن و پروژسترون در زنان آسیایی به میزان چشمگیری پایین‌تر از زنان آمریکای شمالی و اروپای غربی است. این تفاوت‌ها را نمی‌توان بر اساس اصول ژنتیکی توضیح داد زیرا زنان آسیایی که در جوامع غربی زندگی می‌کنند از نظر غلظت هورمون‌های استروئیدی جنسی و خطرات مربوطه با زنان هم‌تای غربی خود تفاوتی ندارند. زنان مهاجر و مخصوصاً دختران آن‌ها از نظر وزن و قد با زنان آسیایی که در آسیا زندگی می‌کنند تفاوت‌های چشمگیری نشان می‌دهند. قد و وزن از عوامل مهم تنظیم‌کننده سن منارک به‌شمار می‌رود و اثرات قابل ملاحظه‌ای بر غلظت پلاسمایی استروژن‌ها دارد (۵). عوامل موثر در ابتلا به سرطان پستان شامل سن منارک و منوپوز (۶)، سن اولین بارداری (۷)، عوامل ژنتیکی (۹، ۸) و مصرف فراورده‌های هورمونی (۱۱، ۱۰) می‌باشد. روش‌های درمانی به عواملی مانند سن بیمار، شدت بیماری، نوع رستپور درگیر وضعیت منوپوز و ... بستگی دارد. از این روش‌ها می‌توان به جراحی، پرتودرمانی، بهبوددهنده‌های پاسخ ایمنی (مانند اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و ...)، شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی اشاره کرد (۱۲). بیش‌تر زنان مبتلا به سرطان پستان در مراحل اولیه درمان‌های سیستمیک کمکی دریافت می‌کنند. شیمی‌درمانی، هورمون‌درمانی و درمان‌های هدفمند بافتی اثربخشی درمان‌های موضعی قطعی (جراحی، پرتودرمانی یا هر دو) را افزایش می‌دهند و به‌طور قابل توجهی عود سرطان و مرگ بیمار را کاهش می‌دهند (۱۳، ۱۲). شیمی‌درمانی یک روش سیستمیک برای درمان سرطان می‌باشد و معمولاً با سایر روش‌های درمانی همراه می‌گردد. داروهایی که در این روش به کار می‌رود می‌توانند به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم

روی هر یک از فازهای چرخه سلولی اثر گذاشته و با توقف در آن مانع رشد بیش تر سلول های سرطانی شود. استفاده از شیمی درمانی در درمان سرطان پستان در دو زمان قبل و بعد از جراحی می تواند صورت پذیرد، که در حالت اول باعث کاهش حجم توده و کاهش گستردگی ناحیه جراحی و در حالت دوم باعث نابودی سلول های باقی مانده پس از عمل می شود (۱۲). هورمون درمانی نیز به صورت سیستمیک صورت می گیرد اما در مواردی کاربرد دارد که سلول های سرطانی دارای گیرنده های هورمونی (استروژنی و پروژسترونی) باشند. در این روش سلول های سرطانی از هورمون استروژن که برای رشد به آن نیاز دارند محروم می گردند. داروهای این دسته شامل SERM ها، مهارکننده های آروماتاز و آگونیست های هورمون آزادکننده گنادوتروپین، از تولید استروژن جلوگیری کرده یا اثرات آن را متوقف می کنند، در نتیجه از تحریک یک تومور حساس به استروژن جلوگیری می شود (۱۲).

مهارکننده های آروماتاز

آنزیم های سیتوکروم P450 (CYP) برای هموستاز بیولوژیکی بسیار مهم هستند. این آنزیم ها دارای یک گروه آهن در جایگاه فعال خود می باشند (۱۴، ۱۵). آروماتاز یک مونواکسیژناز از آنزیم های سیتوکروم بوده که مسئول تبدیل آندروژن ها به استروژن هاست (۱۸-۱۶). سوبسترای طبیعی این آنزیم آندروستون دی ان می باشد (تصویر شماره ۱) (۱۹). عملکردهای فیزیولوژیکی استروژن ها از گلوکز و هموستاز چربی، عملکرد مغز، رشد فولیکولار، کانی سازی استخوان، بسته شدن اپی فیز تا هماهنگی فرآیند تخمک گذاری را شامل می شود (۲۰، ۲۱). عدم توازن در سطح آروماتاز می تواند تعدادی از بیماری ها را در هر دو جنس آغاز کند. افزایش سطح آروماتاز بیش از حد طبیعی در سرطان های معده، کبد، ریه و هیپوفیز، کوتاهی قد و چاقی در هر دو جنس مشاهده می شود. هم چنین سطح بالای آن به طور

اختصاصی در زنان در سرطان پستان، هیپرتروفی پستان، آندومتریوز، سندرم تخمدان پلی کیستیک و سرطان تخمدان نقش دارد و سرطان پروستات، ژنیکوماستی و هیپوگنادیسم مردان بیماری های ناشی از سطح بالای آروماتاز در مردان هستند (۲۲، ۲۳). سرطان پستان شایع ترین سرطان در زنان است که استروژن نقش اصلی در ایجاد و پیشرفت آن دارد. در زنان پس از یائسگی، بیان غیر طبیعی و بیش از حد آروماتاز در بافت های سرطانی پستان یافت می شود که به علت تولید استروژن درون زا باعث رشد و پیشرفت تومور می شود (۲۴). استفاده از آنتی استروژن ها و مهارکننده های آروماتاز (AI) اولین خط درمانی یا درمان هورمونی کمکی پس از جراحی برای سرطان پستان وابسته به استروژن بعد از یائسگی است (۲۷-۲۵). مهارکننده های آروماتاز از لحاظ ساختاری به دو دسته استروئیدی (مانند آگزوستان) و غیر استروئیدی (مانند لثروزول و آناستروزول) تقسیم می شوند. مهارکننده های استروئیدی از نظر ساختاری مشابه آندروستون دی ان بوده، به جایگاه فعال آروماتاز متصل شده و به طور غیر قابل برگشت آنزیم را مهار می نمایند؛ در حالی که بازدارنده های غیر استروئیدی به صورت برگشت پذیر با آهن آنزیم آروماتاز برهمکنش ایجاد می کنند. امروزه نسل سوم مهارکننده های آروماتاز با اثرات قوی مورد استفاده بالینی قرار گرفته اند، اما محدودیت های آن ها مانند عوارض جانبی (پوکی استخوان، درد مفاصل و عوارض قلبی عروقی) و هم چنین دوره درمان طولانی ۱۰ ساله با آن ها که می تواند موجب افزایش مقاومت درمانی شود باعث شده تا در راستای کاهش عوارض و بهبود رژیم درمانی سنتز و بررسی اثر مهارکننده های جدید آروماتاز همواره مورد توجه قرار گیرد (۳۰-۲۸).

مطالعات زیادی در سال های اخیر جهت کشف ساختارهای مهارکننده آروماتاز صورت گرفته است. بر طبق این مطالعات ساختارهای حاوی حلقه تریازول (۳۳-۳۱)، فنیل کرومانون (۳۶-۳۴) و هم چنین هیبریدهای حاوی

نسخه ۴/۲ صورت پذیرفت. ابتدا اثرات مهاري ۱۶ نمونه از ترکیبات سری A و ۲۴ نمونه از ترکیبات سری B (تصویر شماره ۲) با استفاده از کیت نیمه آماده آروماتاز (Catalog # K984-100) با روش غربالگری بررسی شده و سپس ۷ نمونه که بیشترین اثرات مهاري را از خود نشان دادند جهت بررسی های بیش تر و تعیین IC₅₀ انتخاب شدند.

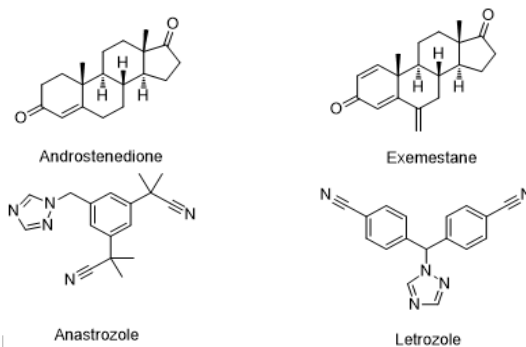
رسم منحنی استاندارد

ابتدا با افزودن ۱۰ میکرولیتر از محلول استاندارد (Mm^۱) به ۹۹۰ میکرولیتر از بافر موجود، محلول رقیق ۱۰ μM از آن تهیه شد و سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر از این محلول رقیق به ۹۵۰ میکرولیتر بافر محلول ۰/۵ μM از استاندارد تهیه شد. در نهایت در چاهک های پلیت ۹۶ خانه غلظت های ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۰ pmol/well در فلوئورسانس Ex/Em=488/527nm اندازه گیری شدند.

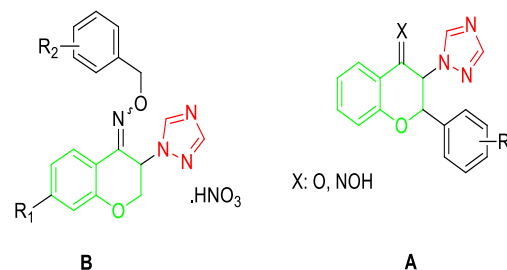
آماده سازی کیت

ابتدا ویال ها قبل از باز شدن تا دمای اتاق گرم شده و سپس سانتیفریوژ مختصری شدند. سپس بافر قبل از مصرف تا دمای اتاق گرم شد. ویال لئروزول در ۵۵ میکرولیتر استونیتریل حل شده سپس ۵ میکرولیتر از محلول حاصل به ۹۹۵ میکرولیتر بافر اضافه شد. ویال NADPH در همان زمان تست در ۲۲۰ میکرولیتر بافر حل شده و در طی مصرف در یخ نگهداری شد. ویال β-NADP⁺ در ۱۱۰ بافر حل شد. ویال سوسترای آروماتاز در ۵۵ میکرولیتر استونیتریل خشک حل شد و در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد. آنزیم آروماتاز درست قبل از مصرف آماده شد و هر ویال آن برای ۵۰ چاهک کافی بود. ابتدا به هر ویال ۱ سی سی بافر افزوده شده و پس از مخلوط کردن و تهیه محلول همگن حجم آن با بافر به ۲۴۵۰ میکرولیتر رسانده شد، سپس ۵۰ میکرولیتر NADPH به آن افزوده شد تا حجم کل به ۲/۵ سی سی رسید.

اکسیم اثرات مهاري خوبی بر آنزیم آروماتاز از خود نشان داده اند. بنابراین در مطالعه امامی و همکاران (۳۷) ترکیبات تریازولیل کرومانون اکسیم اترها (ترکیبات سری A و B) سنتز شدند (تصویر شماره ۲) و در مطالعه حاضر، این ترکیبات از نظر اثرات مهاري آروماتاز بررسی شده و سپس مطالعات داکینگ مولکولی بر روی بهترین ترکیبات انجام شد.



تصویر شماره ۱: ساختار آندروستون دی ان و مهار کننده های آروماتاز



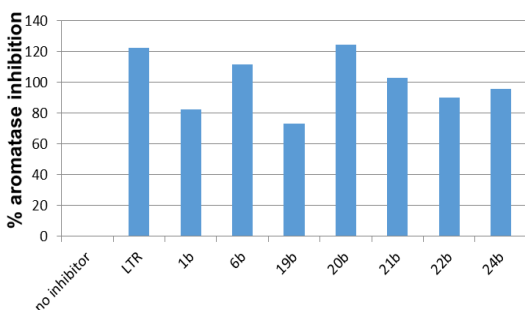
تصویر شماره ۲: ساختار ترکیبات سری A و B

مواد و روش ها

این مطالعه که در دسته پژوهش بنیادی قرار دارد، با کد اخلاق IR.TUMS.VCR.REC.1397.714 در دانشگاه علوم پزشکی تهران تصویب گردید. کیت نیمه آماده آروماتاز (Catalog # K984-100) از نماینده انحصاری شرکت Biovision در ایران خریداری شد. نتایج تست با دستگاه ELISAREADER (Biotech, Synergy، مدل Ht) خوانش شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزارهای Excel 2010 و MyCurveFit، انجام شد. داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار AutoDock

یافته‌ها

ابتدا اثرات مهاري ۲۴ نمونه از ترکیبات سری A و ۱۶ نمونه از ترکیبات سری B (تصویر شماره ۲) با استفاده از کیت نیمه آماده آروماتاز (Catalog # K984-100) غربالگری و بررسی شد و سپس ۷ نمونه که بیشترین اثرات مهاري را از خود نشان دادند جهت بررسی‌های بیش‌تر و تعیین IC_{50} انتخاب شدند. ۷ ترکیب مورد بررسی مهارکنندگی آروماتاز قرار گرفتند و در کنار آن‌ها از لتروزول به عنوان کنترل مثبت و جهت مقایسه اثرات استفاده شد. پس از خوانش با روش کینتیکی در طول موج ۴۸۸/۵۲۷ nm در ۶۰ دقیقه نتایج نمودار شماره ۱ به دست آمد. پس از سنجش این ترکیبات در غلظت‌های نهایی ۱، ۰/۱، ۰/۱۰، ۰/۲۰ و ۰/۴۰ میکرومولار، IC_{50} آن‌ها با رسم نمودار لوگاریتمی چهار پارامتره محاسبه شد که نتایج آن در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است.



نمودار شماره ۱: درصد مهار آروماتاز در غلظت ۴۰ میکرومولار از ترکیبات و لتروزول (۱/۰ میکرومولار)

جدول شماره ۱: نتایج IC_{50} ترکیبات بر حسب میکرومولار

Geometry	R ₂	R ₁	نام ترکیب
E	H	H	1b
Z	4-Cl	Cl	6b
Z	2,6-di Cl	H	19b
Z	3,4-di Cl	H	20b
Z	2F	H	21b
E	2F	H	22b
E	4F	H	24b
			Letrozole

IC_{50} (μ M)

آماده سازی و بررسی ترکیبات سنتزی

ابتدا غلظت‌های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۰۰، ۰/۲۰۰، ۰/۵، ۰/۱۰ از هر نمونه تهیه شده و در چاهک‌های مرتبط ریخته شد. سپس به آن آنزیم افزوده شده و پلیت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از آن محلول تهیه شده شامل سوپسترای آروماتاز و β -NADP⁺ به چاهک‌ها افزوده شد و بلافاصله پلیت با دستگاه ELISAREADER در طول موج 488/527nm با کینتیک به مدت ۶۰ دقیقه خوانده شد.

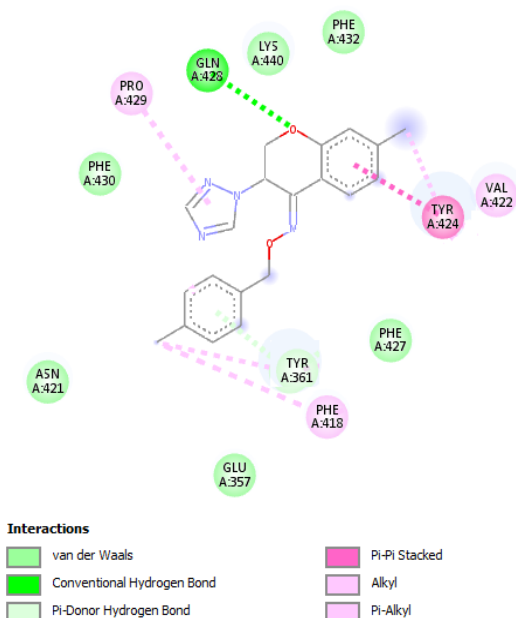
بررسی نتایج و محاسبه IC_{50}

در نهایت تمام نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار Excel2010 مورد بررسی قرار گرفته و پس از رسم نمودارهای لوگاریتمی چهار پارامتره در سایت MyCurveFit، IC_{50} ترکیبات محاسبه شد.

داکینگ مولکولی

ساختار کریستالی آروماتاز (PDB ID: 3EQM) جهت مطالعه داکینگ مولکولی استفاده شد. برای تهیه ساختار آروماتاز جهت داکینگ، اتم‌های هیدروژن ضروری، بارهای اتمی کولمن و پارامترهای انحلال با استفاده از AutoDockTools اضافه شد. برای هماهنگی کوردیناسیون فلز در انجام شبیه‌سازی‌های داکینگ محاسبه شد. ساختار داروی لتروزول به عنوان رفرنس از PubChem برداشته شد. در مرحله بعد، ساختار لیگاند با ادغام اتم‌های هیدروژن غیر قطبی، اضافه کردن بارهای جزئی و تعیین پیوندهای قابل چرخش، برای داکینگ آماده شد. محاسبات داکینگ با کمک نرم‌افزار AutoDock نسخه ۴/۲ با استفاده از الگوریتم Lamarckian انجام شد. اندازه جعبه ۴۰*۴۰*۴۰، با فاصله ۰/۳۷۵ Å استفاده از AutoGrid ساخته شد. شبکه در مختصات Z,y,x از ۸۳/۴۲۳ و ۵۰/۱۱۴ و ۴۶/۳۷۳ محور قرار داشت. در نهایت تجزیه و تحلیل نتایج اتصال با استفاده از برنامه BIOVIA Discovery Studio تعیین گردید.

شیمی فضایی Z اثربخشی بهتری در مهار این آنزیم از خود نشان می دهند. هم چنین نتایج حاصل از داکینگ مولکولی نشان دهنده آن است که ترکیب 6b دارای تعاملات مختلفی با آروماتاز می باشد از جمله پیوند هیدروژنی اکسیژن حلقه کرومان با Gln428، برهمکنش های واندروالسی با آمینو اسیدهای Glu357، Asn421، Phe427، Phe430، Phe432، Lys440، برهمکنش Pi-Pi Stacke حلقه کرومان با Tyr424 و برهمکنش هیدروژنی Pi-Donor با Tyr361 و برهمکنش های Pi-Alkyl با Val422، Phe418 و Pro429 (تصویر شماره ۳).



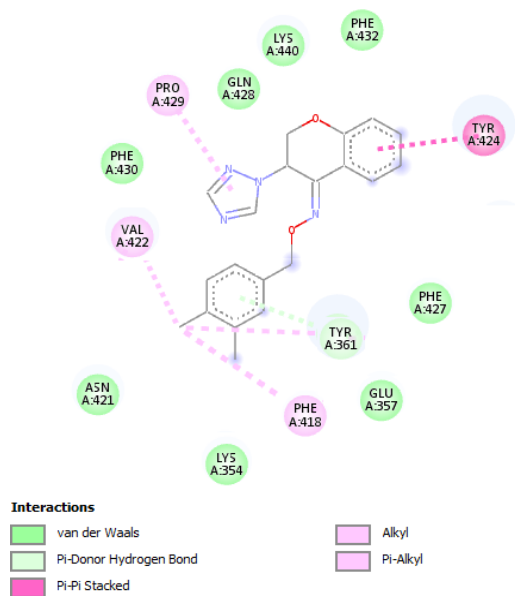
تصویر شماره ۳: برهمکنش های ترکیب 6b با آنزیم آروماتاز

هم چنین بررسی داکینگ مولکولی ترکیب 20b با آنزیم آروماتاز نشان دهنده برهمکنش های مختلفی از جمله برهمکنش های واندروالسی با آمینو اسیدهای Lys354، Glu357، Asn421، Phe427، Gln428، Phe430، Lys440، Phe432 و برهمکنش Pi-Pi Stacked با آمینو اسید Tyr424، برهمکنش هیدروژنی Pi-Donor با Tyr361 و برهمکنش های Pi-Alkyl با Val422، Phe418 و Pro429 می باشد (تصویر شماره ۴).

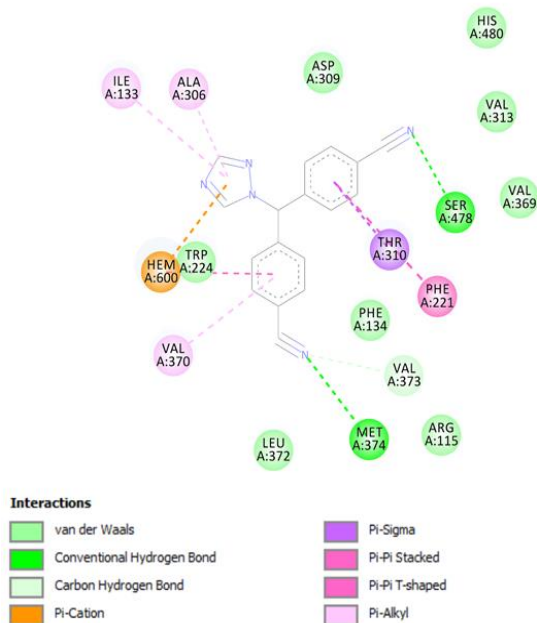
در نهایت نمونه های 6b و 20b که بیش ترین اثرات مهاری را از خود نشان داده بودند با استفاده از نرم افزار AutoDock جهت بررسی های اتصالات ترکیبات با آنزیم آروماتاز مورد بررسی قرار گرفتند. برای ارزیابی صحت انجام داکینگ، بستر متصل از ساختار کریستالی آروماتاز خارج و دوباره به آنزیم متصل شد. انعطاف پذیری کنفورماسیونی محل اتصال پروتئین یک مسئله مهم در مطالعات داکینگ مولکولی است. برای غلبه بر مسئله انعطاف پذیری تطبیقی از سایت اتصال پروتئین، آروماتاز وابسته به بستر (PDB id: 3EQM) به عنوان هدف داکینگ استفاده شد. حالت اتصال با کم ترین انرژی اتصال و بالاترین دسته بندی کلاستر به عنوان مدل نهایی برای آنالیز با کمک DockTools انتخاب شد. در این مطالعه، اتصال آنزیم آروماتاز مهار کننده های مورد مطالعه با استفاده از نرم داکینگ مولکولی مشخص شد. برای مدل سازی همکنش بین آروماتاز و مهار کننده موجود از VIA Studio Discovery استفاده شد. نتایج به دست آمد AutoDock اطلاعات مربوط به جهت گیری اتصاف و انفعالات پروتئین - لیگاند را ارائه می دهد.

بحث

به نظر می رسد حضور اتم کلر در موقعیت پد حلقه فنیل توانسته اثر بخشی ترکیب را نسبت به ترکیب پایه بدون استخلاف، بهبود بخشد (6b و 20b به ترتیب با IC_{50} های معادل ۰/۳۷ و ۰/۶۹ میکرومولار). از سوی دیگر به نظر می رسد ممانعت فضایی حاصل از حضور همزمان دو اتم کلر در موقعیت ۲ و ۶ باعث کاهش قابل توجه اثر بخشی شده است (19b با IC_{50} معادل ۱۴/۳۵ میکرو مولار). هم چنین قرار گرفتن فلونور در موقعیت ارتو یا پارای حلقه فنیل اثر بخشی را در حدود ترکیب پایه بدون استخلاف حفظ می نماید (21b و 22b و 24b به ترتیب با IC_{50} های معادل ۳/۶۲ و ۶/۷۹ و ۵/۸۵ میکرومولار). از سوی دیگر به نظر می رسد ترکیبات با



تصویر شماره ۴: برهمکنش های ترکیب 20b با آنزیم آروماتاز



تصویر شماره ۵: برهمکنش های لئوزول با آنزیم آروماتاز

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه نهایت تشکر را دارند. این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده علوم دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران می باشد؛ لذا محققان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می دارند.

به علاوه تعامل لئوزول با آنزیم آروماتاز پیو هیدروژنی نیتروژن های گروه های سیانیدی با اسیدهای Met374 و Ser478، برهمکنش های واندرو با آمینو اسیدهای Phe134، Arg115، Asp309، Leu372، Val369، Val313، Tyr424، Tyr427، Tyr361، Glu357، Phe418، Val422، Phe430، Phe432، Lys440، Gln428، Pro429، Asn421، Lys354، Val370، Ala306، Ile133 و هم برهمکنش Pi-Cation با آهن توسط حلقه های تریازول را شامل می شود (تصویر شماره ۵).

بررسی نتایج بیانگر آن است که برهمکنش ترکیب 6b و 20b اشتراکات فراوانی را با آروماتاز

می دهند، درحالی که مقایسه این دو ترکیب با لئوزول بیانگر جایگاه متفاوتی در مهار آروماتاز توسط این ترکیبات می باشد. در نتیجه به نظر می رسد نوع مهار این ترکیبات می تواند نارقابتی و یا غیر رقابتی باشد که برای تعیین دقیق نوع آن به مطالعات بیشتر کینتیکی نیاز است. از سوی دیگر برای بررسی و مقایسه عوارض این ترکیبات نیاز به تحقیقات بیش تر در زمینه بررسی سمیت آن ها در آینده می باشد. با بررسی اثرات ترکیبات مختلف و مقایسه اثرات آن ها با توجه به ساختارشان می توان نتیجه گرفت به طور کلی ترکیبات دسته B اثربخشی بهتر و قابل ملاحظه تری نسبت به دسته A دارند. در دسته B نیز با مقایسه اثربخشی ترکیبات مختلف به نظر می رسد ترکیبات با شیمی فضایی Z اثربخشی بهتری از خود نشان می دهند، به طوری که برای مثال ترکیب 20b که در ساختار خود در موقیت های ۳ و ۴ دارای کلر می باشد و شیمی فضایی آن به صورت Z است نسبت به همتای خود با شیمی فضایی E در غلظت برابر ۴۰ میکرومولار به ترتیب دارای درصد های مهار ۹۷/۰۳ و ۳۱/۹۲ درصد بر روی آنزیم می باشند. به علاوه با توجه به نتایج به نظر می رسد حضور گروه الکترون کشنده در موقعیت پارا اثر بخشی ترکیب را بهبود می بخشد و از این رو در راستای طراحی ترکیبات موثر در زمینه مهار آروماتاز بایستی به این نکات توجه گردد.

References

1. Chu E, Sartorelli AC, Katzung B. Basic and clinical pharmacology. Cancer chemotherapy 12th ed. Boston: McGraw-Hill; 2012. p. 949-976.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58(2): 71-96.
3. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine, 19e: Mcgraw-hill; 2015.
4. Ma J, Jemal A. Breast cancer statistics. Breast cancer metastasis and drug resistance. 2013: 1-18.
5. Falk R, Fears T, Hoover R, Pike M, Wu A, Nomura A, et al. Does place of birth influence endogenous hormone levels in Asian-American women? British Journal of Cancer 2002; 87(1): 54-60.
6. Pherson KM, Steel C, Dixon J. ABC of breast diseases: breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ 2000; 321(7261): 624-628.
7. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. Breast Cancer Research 2006; 8(4): 1-11.
8. Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer. Cancer Cell 2007; 11(2): 103-105.
9. Ford D, Easton D, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. Am J Hum Genet 1998; 62(3): 676-689.
10. Cancer CGoHFIB. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. The Lancet 1997; 350(9084): 1047-1059.
11. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. N Eng J Med 2002; 346(26): 2025-2032.
12. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham P. Treatment of breast cancer. Am Fam Physician 2010; 81(11): 1339-1346.
13. Grizzi G, Ghidini M, Botticelli A, Tomasello G, Ghidini A, Grossi F, et al. Strategies for increasing the effectiveness of aromatase inhibitors in locally advanced breast cancer: an evidence-based review on current options. Cancer Manag Res 2020; 12: 675-686.
14. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol Ther 2013; 138(1): 103-141.
15. Sychev DA, Ashraf GM, Svistunov AA, Maksimov ML, Tarasov VV, Chubarev VN, et al. The cytochrome P450 isoenzyme and some new opportunities for the prediction of negative drug interaction in vivo. Drug Des Devel Ther 2018; 12: 1147-1156.
16. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr Rev 1994; 15(3): 342-355.
17. Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. Endocr Rev 2005; 26(3): 331-345.

18. Chan HJ, Petrossian K, Chen S. Structural and functional characterization of aromatase, estrogen receptor, and their genes in endocrine-responsive and-resistant breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016; 161: 73-83.
19. Sanderson JT. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci* 2006; 94(1): 3-21.
20. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, et al. Aromatase—a brief overview. *Annu Rev Physiol* 2002; 64(1): 93-127.
21. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson Gr, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001; 81(4): 1535-1565.
22. Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, et al. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52: 185-213.
23. Blakemore J, Naftolin F. Aromatase: contributions to physiology and disease in women and men. *Physiology* 2016; 31(4): 258-269.
24. Bhardwaj P, Au CC, Benito-Martin A, Ladumor H, Oshchepkova S, Moges R, et al. Estrogens and breast cancer: Mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019; 189: 161-170.
25. Saha T, Makar S, Swetha R, Gutti G, Singh SK. Estrogen signaling: An emanating therapeutic target for breast cancer treatment. *Eur J Med Chem* 2019; 177: 116-143.
26. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *JAMA* 2019; 321(3): 288-300.
27. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(24): 2431-2442.
28. Chumsri S, Howes T, Bao T, Sabnis G, Brodie A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 125(1-2): 13-22.
29. Tseng OL, Spinelli JJ, Gotay CC, Ho WY, McBride ML, Dawes MG. Aromatase inhibitors are associated with a higher fracture risk than tamoxifen: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2018; 10(4): 71-90.
30. Khosrow-Khavar F, Filion K, Al-Qurashi S, Torabi N, Bouganim N, Suissa S, et al. Cardiotoxicity of aromatase inhibitors and tamoxifen in postmenopausal women with breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 2017; 28(3): 487-496.
31. Chamduang C, Pingaew R, Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. Novel triazole-tetrahydroisoquinoline hybrids as human aromatase inhibitors. *Bioorg Chem* 2019; 93: 103327.
32. Dytrtová JJ, Bělonožníková K, Jakl M, Ryšlavá H. Triazoles and aromatase: The impact of copper cocktails. *Environ Pollut* 2020; 266(pt 1): 115201.
33. Mojaddami A, Sakhteman A, Fereidoonzhad M, Faghieh Z, Najdian A, Khabnadideh S, et al. Binding mode of triazole derivatives as aromatase inhibitors based on docking, protein ligand interaction fingerprinting, and molecular dynamics simulation studies. *Res Pharm Sci* 2017; 12(1): 21-30.
34. Bonfield K, Amato E, Bankemper T, Agard H, Steller J, Keeler JM, et al. Development of a new class of aromatase inhibitors: design, synthesis and inhibitory activity of 3-phenylchroman-4-one (isoflavanone) derivatives. *Bioorg Med Chem* 2012; 20(8): 2603-2613.

35. Yamaguchi Y, Nishizono N, Oda K. Evaluation of Synthesized Ester or Amide Coumarin Derivatives on Aromatase Inhibitory Activity. *Biol Pharm Bull* 2020; 43(8): 1179-1187.
36. Luo G, Li X, Zhang G, Wu C, Tang Z, Liu L, et al. Novel SERMs based on 3-aryl-4-aryloxy-2H-chromen-2-one skeleton-A possible way to dual ER α /VEGFR-2 ligands for treatment of breast cancer. *Eur J Med Chem* 2017; 140: 252-273.
37. Emami S, Shojapour S, Faramarzi MA, Samadi N, Irannejad H. Synthesis, in vitro antifungal activity and in silico study of 3-(1,2,4-triazol-1-yl) flavanones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 66: 480-488.