ORIGINAL ARTICLE

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

Roshanak Hariri[1]
Maryam Baeeri[2]
Negar Mohammadhosseini[3]
Saeed Emami[4]
Alireza Foroumadi[5]
Maliheh Barazandeh Tehrani[6]

[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 IC_{50} determination. Notably, derivatives 6b and 20b demonstrated the most robust inhibitory effects, with IC_{50} 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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ۲۲۷ آذر سال ۱۴۰۲ (۲۳-۱۳)

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[۱]
مریم بعیری[۲]
نگار محمدحسینی[۳]
سعید امامی[۴]
علیرضا فرومدی[۵]
ملیحه برازنده تهرانی[۶]

چکیده

سابقه و هدف: شیوع بیماری سرطان به همراه درمان‌های پرعارضه، یکی از مسائل مهم درمانی در دنیای امروز می‌باشد و تلاش محققین به منظور یافتن ترکیبات جدید با اثربخشی بهتر و عوارض کم‌تر در این راستا همواره مورد توجه است. آنزیم آروماتاز، نقش مهمی در ایجاد سرطان گیرنده استروژن مثبت پستان دارد. استروژن‌ها به دلیل نقشی که در رشد جنسی و تولید مثل دارند، در انسان و به‌طور عمده در زنان ضروری می‌باشند. اثرات نامطلوب موجود در برخی مهارکننده‌های آروماتاز، نیاز به کشف مهارکننده‌های جدید با توانایی گزینش‌پذیری بالاتر، سمیت کم‌تر و بهبود قدرت را روز به روز افزایش می‌دهند. لذا هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر مهارکنندگی و بررسی برهم کنش‌های بین مولکولی مشتقات تریازولیل کرومانون اکسیم اترها بر روی آنزیم آروماتاز موثر در سرطان پستان بود.

مواد و روش‌ها: 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.

یافته‌ها: از بین ۴۰ ترکیب بررسی شده، ۷ نمونه که بیش‌ترین اثرات مهاری را از خود نشان دادند جهت بررسی‌های بیش‌تر و تعیین IC_{50} انتخاب شدند، که در میان آن‌ها مشتقات 6b و 20b به‌ترتیب با IC_{50}هایی معادل ۰/۳۷ و ۰/۶۹ میکرومولار بهترین اثرات مهاری را از خود نشان دادند. هم‌چنین بررسی برهمکنش‌های 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 می‌رسد این ترکیبات توانایی مناسبی جهت مهار آنزیم آروماتاز از خود نشان می‌دهند و می‌توان 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

مولف مسئول: ملیحه برازنده– تهران: خیابان شانزده آذر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی E-mail: barazand@tums.ac.ir
۱. دانشجوی دکترای 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

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 سلول هایی 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). به‌دلیل 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 ازسرطان 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 رده زا 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 به‌صورت یک بیماری غیرتهاجمی و یا یک بیماری تهاجمی بدون متاستاز وجود داشته باشد. از آن‌جایی‌که 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 مخصوصا 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 رسپتور درگیر وضعیت منوپوز و ... بستگی دارد. از این روش‌ها می‌توان به جراحی، پرتودرمانی، بهبوددهنده‌های پاسخ ایمنی (مانند اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و ...)، شیمی درمانی و هورمون درمانی اشاره کرد(۱۲). بیش‌تر زنان مبتلا به سرطان پستان در مراحل اولیه درمان‌های سیستمیک کمکی دریافت می‌کنند. شیمی درمانی، هورمون درمانی 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). شیمی درمانی یک روش سیستمیک برای درمان سرطان می‌باشد و معمولا با سایر روش‌های درمانی همراه می‌گردد. داروهایی که در این روش به کار می‌رود می‌توانند به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

روی هر یک از فازهای چرخه سلولی اثر گذاشته و با توقف در آن مانع رشد بیش‌تر سلول‌های سرطانی شود. استفاده از شیمی درمانی در درمان سرطان پستان در دو زمان قبل و بعد از جراحی می‌تواند 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 می‌شود(۱۲). هورمون درمانی نیز به صورت سیستمیک صورت می‌گیرد اما در مواردی کاربرد دارد که سلول‌های سرطانی دارای گیرنده‌های هورمونی (استروژنی و پروژسترونی) باشند. در این روش سلول‌های سرطانی از هورمون استروژن که برای رشد به آن نیاز دارند محروم می‌گردند. داروهای این دسته شامل SERMها، مهارکننده‌های آروماتاز و آگونیست‌های 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 می‌شود(۱۲).

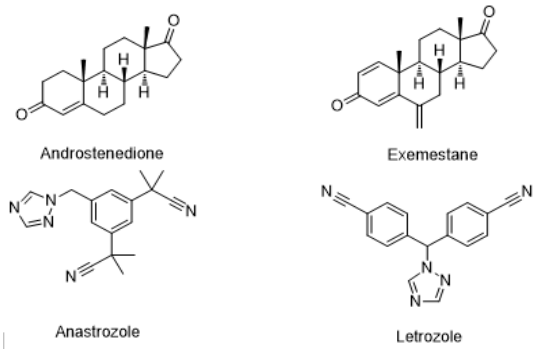
مهارکننده های آروماتاز

آنزیم‌های سیتوکروم P450 (CYP) برای هموستاز بیولوژیکی بسیار مهم هستند. این آنزیم‌ها دارای یک گروه آهن در جایگاه فعال خود می‌باشند(۱۵،۱۴). آروماتاز یک مونواکسیژناز از آنزیم‌های سیتوکروم بوده که مسئول تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌هاست(۱۸-۱۶). سوبسترای طبیعی این آنزیم آندرستون دی ان می‌باشد (تصویر شماره۱)(۱۹). عملکردهای فیزیولوژیکی استروژن‌ها از گلوکز و هموستاز چربی، عملکرد مغز، رشد فولیکولار، کانی‌سازی استخوان، بسته شدن اپی‌فیز تا هماهنگی فرآیند تخمک‌گذاری را شامل می‌شود(۲۱،۲۰). عدم توازن در سطح آروماتاز می‌تواند تعدادی از بیماری‌ها را در هر دو جنس آغاز کند. افزایش سطح آروماتاز بیش از حد طبیعی در سرطان‌های معده، کبد، ریه و هیپوفیز، کوتاهی قد و چاقی در هر دو جنس مشاهده می‌شود. هم‌چنین سطح بالای آن به‌طور اختصاصی در زنان در سرطان پستان، هیپرتروفی پستان، آندومتریوز، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و سرطان تخمدان نقش دارد و سرطان پروستات، ژنیکوماستی و هیپوگنادیسم مردان بیماری‌های ناشی از سطح بالای آروماتاز درمردان هستد(۲۳،۲۲). سرطان پستان شایع‌ترین 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 بافت‌های سرطانی پستان یافت می‌شود که به علت تولید استروژن درون زا باعث رشد و پیشرفت تومور می‌شود(۲۴). استفاده از آنتی‌استروژن‌ها و مهارکننده‌های آروماتاز(AI) اولین خط درمانی یا درمان هورمونی کمکی پس از جراحی برای سرطان پستان وابسته به استروژن بعد از یائسگی است(۲۷-۲۵). مهارکننده‌های آروماتاز از لحاظ ساختاری به دو دسته استروئیدی (مانند اگزمستان) و غیر استروئیدی (مانند لتروزول و آناستروزول) تقسیم می‌شوند. مهارکننده‌های استروئیدی از نظر ساختاری مشابه آندرستون دی ان بوده، به جایگاه فعال آروماتاز متصل شده و به‌طور غیر قابل برگشت آنزیم را مهار می‌نمایند؛ در حالی که بازدارنده های غیر استروئیدی به صورت برگشت‌پذیر با آهن آنزیم آروماتاز برهمکنش ایجاد می‌کنند. امروزه نسل سوم مهارکننده‌های آروماتاز با اثرات قوی مورد استفاده بالینی قرار گرفته‌اند، اما محدودیت‌های آن‌ها مانند عوارض جانبی (پوکی استخوان، درد مفاصل و عوارض قلبی عروقی) و هم‌چنین دوره درمان طولانی ۱۰ ساله با آن‌ها که می‌تواند موجب افزایش مقاومت درمانی شود باعث شده تا در راستای کاهش عوارض و بهبود رژیم درمانی سنتز و بررسی اثر مهارکننده‌های جدید آروماتاز همواره مورد توجه قرار گیرد(۳۰-۲۸).

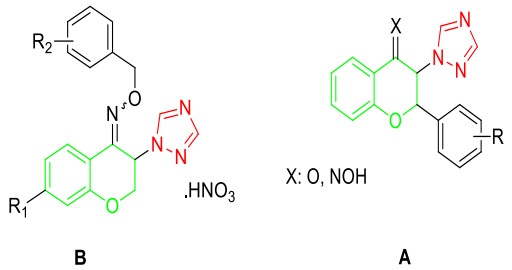
مطالعات زیادی در سال‌های اخیر جهت کشف ساختارهای مهارکننده آروماتاز صورت گرفته است. بر طبق این مطالعات ساختارهای حاوی حلقه تریازول(۳۳-۳۱)، فنیل کرومانون(۳۶-۳۴) و هم‌چنین هیبریدهای حاوی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

اکسیم اثرات مهاری خوبی بر آنزیم آروماتاز از خود نشان داده‌اند. 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 مهاری آروماتاز بررسی شده و سپس مطالعات داکینگ مولکولی بر روی بهترین ترکیبات انجام شد.



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



تصویر شماره ۲: ساختار ترکیبات سری A و B

مواد و روش‌ها

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, model Ht) خوانش شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Excel2010 و MyCurveFit، انجام شد. داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار AutoDock نسخه ۴/۲ صورت پذیرفت. ابتدا اثرات مهاری ۱۶ نمونه از ترکیبات سری A و ۲۴ نمونه از ترکیبات سری B (تصویر شماره۲) با استفاده از کیت نیمه آماده آروماتاز(Catalog # K984-100) با روش غربالگری بررسی شده و سپس ۷ نمونه که بیش‌ترین اثرات مهاری را از خود نشان دادند جهت بررسی‌های بیش‌تر و تعیین IC_{50} انتخاب شدند.

رسم منحنی استاندارد

ابتدا با افزودن ۱۰ میکرولیتر از محلول استاندارد (Mm۱) به ۹۹۰ میکرولیتر از بافر موجود، محلول رقیق ۱۰µM از آن تهیه شد و سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر از این محلول رقیق به ۹۵۰ میکرولیتر بافر محلول ۰/۵µM از استاندارد تهیه شد. در نهایت در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه غلظت‌های ۰،۱،۲،۳،۴،۶،۸،۱۰pmol/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 سانتریفیوژ مختصری شدند. سپس بافر قبل از مصرف تا دمای اتاق گرم شد. ویال لتروزول 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 سوبسترای آروماتاز در ۵۵ میکرولیتر استونیتریل خشک حل شد و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. آنزیم آروماتاز درست قبل از مصرف آماده شد و هر ویال آن برای ۵۰ چاهک کافی بود. ابتدا به هر ویال ۱ سی‌سی 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 سی‌سی رسید.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

آماده سازی و بررسی ترکیبات سنتزی

ابتدا غلظت‌های μM ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۵، ۰/۵ 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 سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن محلول تهیه شده شامل سوبسترای آروماتازو 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}

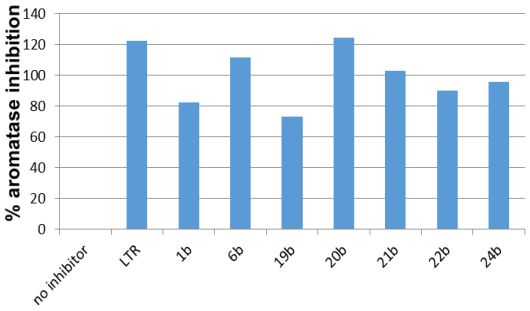
در نهایت تمام نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار Excel2010 مورد بررسی قرار گرفته و پس از رسم نمودارهای لوگاریتمی چهار پارامتره در سایت MyCurveFit، IC_{50} ترکیبات محاسبه شد.

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 نسخه۴/۲ با استفاده از الگوریتم Lamarckian انجام شد. اندازه جعبه ۴۰*۴۰*۴۰، با فاصله Å ۰/۳۷۵ با 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.

یافته‌ها

ابتدا اثرات مهاری ۲۴ نمونه از ترکیبات سری A و ۱۶ نمونه از ترکیبات سری B (تصویر شماره۲) با استفاده از کیت نیمه آماده آروماتاز (Catalog # K984-100) غربالگری و بررسی شد و سپس ۷ نمونه که بیش‌ترین اثرات مهاری را از خود نشان دادند جهت بررسی‌های بیش‌تر و تعیین IC_{50} انتخاب شدند. ۷ ترکیب 1b, 6b, 19b, 20b, 21b, 22b, 24b در پلیت ۹۶ خانه مورد بررسی مهارکنندگی آنزیم آروماتاز قرار گرفتند و در کنار آن‌ها از لتروزول به‌عنوان 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 به‌دست آمد. پس از سنجش این ترکیبات در غلظت‌های نهایی ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار، IC_{50} آن‌ها با رسم نمودار لوگاریتمی چهار پارامتره محاسبه شد که نتایج آن در جدول شماره۱ نمایش داده شده است.



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

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

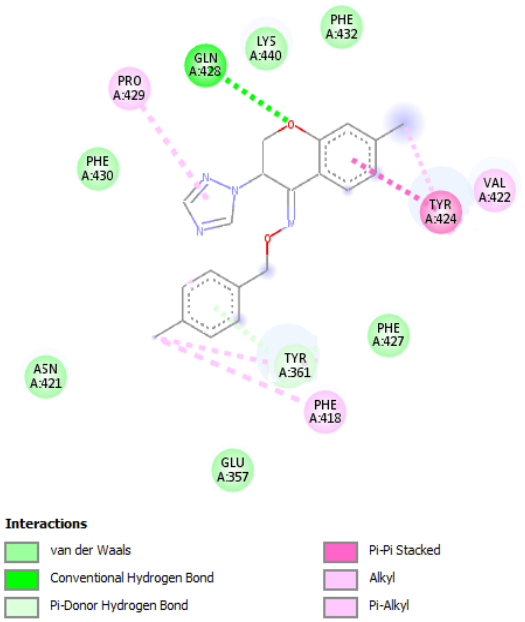
Geometry	R_2	R_1	IC_{50}(μM)	نام ترکیب
E	H	H	۵/۴۰	1b
Z	4-Cl	Cl	۰/۳۷	6b
Z	2,6-di Cl	H	۱۴/۳۵	19b
Z	3,4-di Cl	H	۰/۶۹	20b
Z	2F	H	۳/۶۲	21b
E	2F	H	۶/۷۹	22b
E	4F	H	۵/۸۵	24b
			۳/۸۷Nm	Letrozole

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

در نهایت نمونه‌های 6b و 20b که بیش‌ترین اثرات مهاری را از خود نشان داده بودند با استفاده از نرم‌افزار AutoDock جهت بررسی‌های 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. انعطاف‌پذیری کنفورماسیونی محل اتصال پروتئین یک مسئله مهم در مطالعات داکینگ مولکولی است. برای غلبه بر مسئله انعطاف‌پذیری تطبیقی از سایت اتصال پروتئین، آروماتاز وابسته به بستر (PDB id: 3EQM) به عنوان هدف داکینگ استفاده شد. حالت اتصال با کم‌ترین انرژی اتصال و بالاترین دسته‌بندی کلاستر به عنوان مدل نهایی برای آنالیز باکمک DockTools انتخاب شد. در این مطالعه، اتصال آنزیم آروماتاز مهارکننده‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار داکینگ مولکولی مشخص شد. برای مدل‌سازی همکنش بین آروماتاز و مهارکننده موجود از VIA Studio Discovery استفاده شد. نتایج به‌دست آمده AutoDock اطلاعات مربوط به جهت‌گیری اتصال فعل و انفعالات پروتئین- لیگاند را ارائه می‌دهد.

بحث

به نظر می‌رسد حضور اتم کلر در موقعیت پ حلقه فنیل توانسته اثر بخشی ترکیب را نسبت به ترکیب پایه بدون استخلاف، بهبود بخشد (6b و 20b به ترتیب با IC_{50}های معادل۰/۳۷ و۰/۶۹ میکرومولار). از سوی دیگر به نظر می‌رسد ممانعت فضایی حاصل از حضور همزمان دو اتم کلر در موقعیت۲ و ۶ باعث کاهش قابل توجه اثر بخشی شده است (19b با IC_{50} معادل۱۴/۳۵ میکرو مولار). هم‌چنین قرار گرفتن فلوئور در موقیت ارتو یا پارای حلقه فنیل اثر بخشی را در حدود ترکیب پایه بدون استخلاف حفظ می‌نماید (21b و 22b و 24b به ترتیب با IC_{50} های معادل ۳/۶۲ و ۶/۷۹ و۵/۸۵ میکرومولار). از سویی دیگر به نظر می‌رسد ترکیبات با شیمی فضایی Z اثربخشی بهتری در مهار این آنزیم از خود نشان می‌دهند. هم‌چنین نتایج حاصل از داکینگ مولکولی نشان‌دهنده آن است که ترکیب 6b دارای تعاملات مختلفی با آروماتاز می‌باشد از جمله پیوند هیدروژنی اکسیژن حلقه کرومان با Gln428، برهمکنش‌های واندروالسی با آمینواسیدهای Glu357، Asn421، Phe427، Phe430، Phe432، Lys440، برهمکنش Pi-Pi Stacke حلقه کرومان با Tyr424، برهمکنش هیدروژنی Pi-Donor با Tyr361 و برهمکنش‌های Pi-Alkyl با Phe418، Val422 و Pro429 (تصویر شماره ۳).



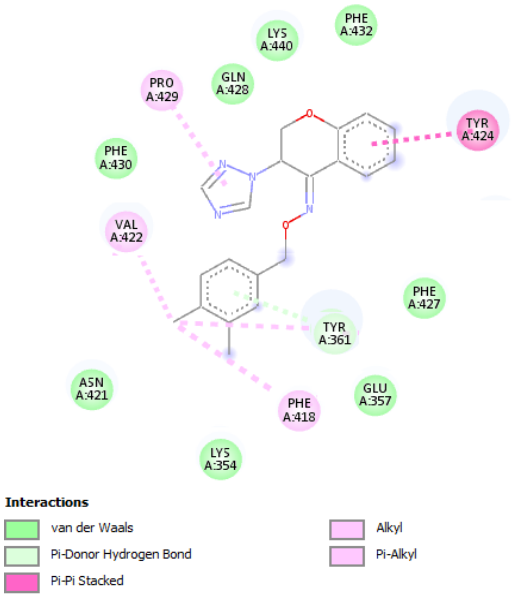
تصویر شماره ۳: برهمکنش های ترکیب 6b با آنزیم آروماتاز

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

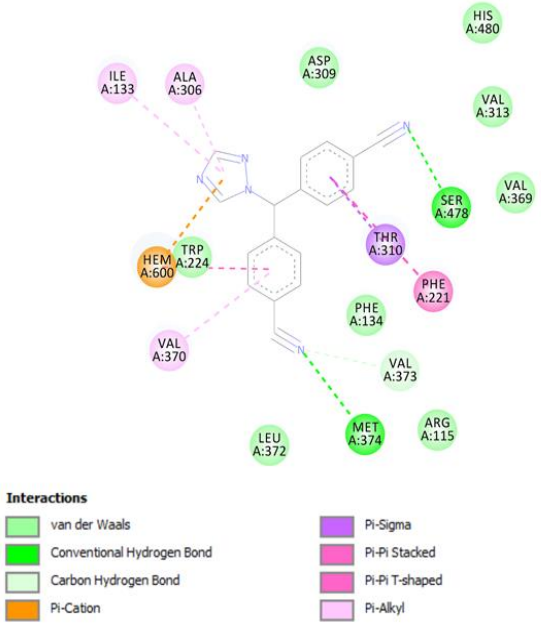
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

به علاوه تعامل لتروزول با آنزیم آروماتاز پیو
هیدروژنی نیتروزن‌های گروه‌های سیانیدی با
اسیدهای Met374 و Ser478، برهمکنش‌های واندر
با آمینو اسیدهای Arg115، Phe134، 24
Asp309، Val313، Val369، Leu372، 30
برهمکنش Pi-Pi Stacke حلقه فنیل با 21
برهمکنش‌های Pi-Alkyl حلقه فنیل و تریاز
آمینواسیدهای Ile133، Ala306، Val370 و هم
برهمکنش Pi-Cation با آهن توسط حلقه‌های
تریازول را شامل می‌شود (تصویر شماره ۵).

بررسی نتایج بیانگر آن است که برهمکنش‌ه
ترکیب 6b و 20b اشتراکات فراوانی را با آروماتا
می‌دهند، درحالی که مقایسه این دو ترکیب با لتروزول بیانگر جایگاه متفاوتی در مهار آروماتاز توسط این ترکیبات می‌باشد. در نتیجه به نظر می رسد نوع مهار این ترکیبات می تواند نا رقابتی 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 بیش‌تر در زمینه بررسی سمیت آن‌ها در آینده می‌باشد. با بررسی اثرات ترکیبات مختلف و مقایسه اثرات آن‌ها با توجه به ساختارشان می‌توان نتیجه گرفت به‌طور کلی ترکیبات دسته B اثربخشی بهتر و قابل ملاحظه‌تری نسبت به دسته A دارند. در دسته B نیز با مقایسه اثربخشی ترکیبات مختلف به نظر می‌رسد ترکیبات با شیمی فضایی Z اثربخشی بهتری از خود نشان می‌دهند، به‌طوری که برای مثال ترکیب 20b که در ساختار خود در موقیت‌های ۳و۴ دارای کلر می‌باشد و شیمی فضایی آن به صورت Z است نسبت به همتای خود با شیمی فضایی E در غلظت برابر ۴۰ میکرمولار به ترتیب دارای درصدهای مهار ۹۷/۰۳ و ۳۱/۹۲ درصد بر روی آنزیم می‌باشند. به علاوه با توجه به نتایج به نظر می‌رسد حضور گروه الکترون کشنده در موقعیت پارا اثر بخشی ترکیب را بهبود می‌بخشد و از این رو در راستای طراحی ترکیبات موثر در زمینه مهار آروماتاز بایستی به این نکات توجه گردد.



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



تصویر شماره ۵: برهمکنش های لتروزول 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 می‌باشد؛ لذا محققان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

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 theprediction 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

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. NilssonS, 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, DowsettM. 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 randomizedcontrolled 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, Fereidoonnezhad M, Faghih Z, Najdian A, KhabnadidehS, 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]

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 ERα/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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-10-29]