

The comparison of the effect of different inhibitors on aromatase enzyme effective in the breast cancer by molecular docking method

Mahboobeh Kian¹, Elham Tazikeh-Lemeski²

¹ PhD Candidate, Department of Chemistry, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

² Associate Professor, Department of Chemistry, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

Abstract

Background: Aromatase is an enzyme that plays an important role in the development of estrogen-positive breast cancer. Estrogens are essential in human and mainly in women because of their role in sexual development and reproduction. Adverse effects of some aromatase inhibitors increase the need to discover new inhibitors with higher selectivity, lower toxicity and improved potency. In this study, the binding state of all three generations of aromatase inhibitors to the molecular structure of this protein using molecular docking method has been studied.

Materials and methods: In general, the inhibitors based on steroid scaffolds (formestane and exemestane) have higher binding energy than azole scaffolds (fadrozole, anastrozole, letrozole), which may be due to their high structural strength.

Results: Among all the considered structures studied, exemestane had the highest (negative) binding energy as well as the lowest inhibitory constant. The free energy of binding and the inhibitory constants was -8.77 kcal mol⁻¹ and 373.32 nM respectively, which means that aromatase activity will be inhibited at the low concentrations of this anti-cancer drug.

Conclusion: The knowledge gained from this study will have important implications regarding for pharmaceutical design.

Keywords: *Aromatase enzyme, Inhibitor, Molecular docking, Exemestane (Aromasin).*

Cited as: Kian M, Tazikeh-Lemeski E, The comparison of the effect of different inhibitors on Aromatase enzyme effective in the breast cancer by molecular docking method. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(4): 396-407.

Correspondence to: Elham Tazikeh-Lemeski

E-mail: Elham.tazikeh@gorganiau.ac.ir

ORCID ID: 000-0001-9939-1344

Tel: 01732151434

Received: 4 Feb 2020; **Accepted:** 19 Apr 2020

مقایسه اثر مهارکننده‌های مختلف بر روی آنزیم آروماتاز موثر در سرطان پستان به کمک روش داکینگ مولکولی

محبوبه کیان^۱، الهام تازیکه لمسکی^۲

^۱ دانشجوی دکتری، گروه شیمی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

^۲ دانشیار، گروه شیمی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آروماتاز، آنزیمی است که 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 به طور عمده در زنان ضروری هستند. اثرات نامطلوب موجود در برخی مهارکننده‌های آروماتاز، نیاز به کشف مهارکننده‌های جدید با توانایی‌های گزینش پذیری بالاتر، سمیت کمتر و بهبود قدرت را روز به روز افزایش می‌دهند. در این مطالعه، حالت اتصال هر سه نسل از مهارکننده‌های آنزیم آروماتاز به ساختار مولکولی این پروتئین با استفاده از روش داکینگ مولکولی بررسی شده است.

روش بررسی: به طور کلی، مهارکننده‌ها بر اساس داربست استروئیدی (فرمستان و اگزومستان)، انرژی اتصال بیشتری از داربست آزول (فادروزول، آناستروزول و لتروزول) به نمایش می‌گذارند که این می‌تواند به دلیل استحکام ساختاری بالای این مهارکننده‌ها باشد. **یافته‌ها:** از بین تمامی ساختارهای مورد مطالعه، اگزومستان بیشترین (منفی‌ترین) انرژی اتصال و همچنین کمترین مقدار ثابت بازدارندگی را به خود اختصاص داد. مقادیر انرژی آزاد اتصال (ΔG_b) و ثابت مهارکنندگی (k_i) اگزومستان به ترتیب $-1/77$ کیلوکالری بر مول و $373/32$ نانومولار بود؛ این بدان معنی است که در غلظت‌های پایینی از این دارو، فعالیت آنزیم آروماتاز مهار خواهد شد. **نتیجه‌گیری:** دانش به دست آمده از این مطالعه پیامدهای مهمی در طراحی‌های دارویی پیش رو خواهد داشت. **واژگان کلیدی:** آنزیم آروماتاز، مهارکننده، داکینگ مولکولی، اگزومستان (آروماسین).

مقدمه

هورمون، جراحی است که توسط رادیوتراپی انجام می‌شود. علاوه بر این، درمان غدد درون ریز (بهمراه/ بدون) شیمی درمانی بسته به مرحله تومور انجام می‌شود. در زنان سالم، استروژن‌ها به طور عمده در تخمدان‌ها و همچنین در بافت چربی، پستان، پوست و استخوان تولید می‌شوند (۲). پس از یائسگی، سینه‌ها منبع اصلی تولید استروژن هستند. برای حالت دوم، میزان استروژن‌های تولید شده در پستان قابل مقایسه با آن است که در تخمدان‌ها توسط زنان قبل از یائسگی تولید می‌شود که چهار تا شش برابر بیشتر از میزان موجود در سرم است. تقریباً ۶۰٪ سرطان‌های قبل از یائسگی و ۷۵٪ از سرطان‌های بعد از یائسگی وابسته به

سرطان در جهان یکی از دلایل اصلی مرگ و میر است و در اثر آن حدود ۶/۷ میلیون نفر در سال ۲۰۰۷ فوت شده‌اند. در زنان، سرطان پستان عامل اصلی مرگ و میر و موضوع جدیدی در بین سرطان‌هاست (۱). یک روش درمانی معمول برای سرطان پستان در مراحل اولیه و حساس به

آدرس نویسنده مسئول: گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گروه شیمی، الهام تازیکه لمسکی

(Email: Elham.tazikhe@gorganiau.ac.ir)

ORCID ID: 000-0001-9939-1344

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۹/۱/۳۱

هورمون هستند (۳)، این بدان معنی است که استروژن‌های درون‌زا در اصل برای تکثیر مورد نیاز هستند. بسیاری از داروهای مورد استفاده در درمان سرطان پستان گیرنده استروژن از نظر مکانیسمی مبتنی بر تداخل در تولید استروژن یا عملکرد استروژن هستند. آروماتاز، آنزیمی است که در شبکه آندوپلاسمی سلول‌های تولید کننده استروژن قرار دارد و در تبدیل آندروژن به استروژن عمل می‌کند. این ترکیب از زنجیره پلی پپتیدی از ۵۰۳ اسید آمینه و یک گروه پروستاتیک هم در محل فعال آن تشکیل شده است. شکاف ویژه آندروژن متشکل از باقی مانده‌های آب-گریز و قطبی در محدوده محل اتصال آروماتاز واقع شده است. برای جلوگیری از تولید استروژن، مهار آنزیم از طریق استفاده از مهارکننده‌های آروماتاز ضروری است. AI‌ها فقط برای زنان یائسه موثر است، زیرا آنها مانع تولید استروژن در تخمدان‌ها نمی‌شوند، بلکه فقط بر روی استروژن محلی تولید شده توسط سلول‌های سرطانی پستان عمل می‌کنند. بنابراین، AI به عنوان خط مقدم درمان سرطان پستان وابسته به استروژن است (۱). ساختمان کریستالوگرافی آنزیم آروماتاز در سال ۲۰۰۹ معرفی شده است (۴). ژن این آنزیم ده پروموتور دارد؛ بنابراین می‌توان در بسیاری از موارد با اتصال به آن، تغییرات کاربردی متفاوتی را در این آنزیم ایجاد کرد (۸-۵). اخیراً ساختار بلوری آروماتاز جفت انسان توسط Ghosh و همکارانش شناسایی شده است (۹). در دسترس بودن جزئیات ساختاری در سایت فعال آروماتاز در درک خصوصیات اتصال AI‌ها و همچنین ارزیابی واکنش کلیدی مورد نیاز در مکانیسم آروماتاز کمک می‌کند. این امر فرصتی را فراهم می‌کند که با درک آن می‌توان از اساس مولکولی برای ویژگی آنزیم آروماتاز و مکانیسم کاتالیزوری منحصر به فرد آن، که برای رشد نسل بعدی AI‌ها ضروری است، استفاده کرد. مشابه این روش را در بررسی مهار آنزیم تایروزیناز با آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی مختلف موثر در جلوگیری از لک‌های پوستی بررسی و برتری اثر کوچیک اسید را نسبت به بقیه مشاهده کردیم (۱۰). همچنین در بررسی دیگری در مطالعه برهمکنش بین پروتئین آمیلوئید بتا با یون فلزی روی و نقش آن در بیماری آلزایمر، با کمک روش مدل‌سازی و دینامیک مولکولی نتایج جالبی به دست آمد که دلیلی بر قدرت این روش در توضیح بسیاری از برهمکنش‌های پروتئین-لیگاند می‌تواند باشد (۱۱). تا به امروز، سه نسل از AI‌ها در دسترس هستند (شکل ۱).

اولین نسل AI‌ها، آمینوگلوتمتیماید (aminoglutethimide) است که در اواخر دهه ۱۹۷۰ به بازار عرضه شد (۱۴-۱۲). این دارو قادر بود محیطی با کمبود استروژن در بیماران ایجاد کند، ولی در مصرف کنندگان سطح آندروستندیون (Androstenedion) به شدت بالا می‌رفت (۱۵، ۱۶). با گذشت زمان مشخص شد که در حقیقت این دارو یک مهارکننده آروماتاز است (۲۰-۱۷). متأسفانه، آمینوگلوتمتیماید به دلیل دارا بودن چندین عیب از جمله مهم‌ترین آنها سمیت بالا (۲۱، ۲۲) و عدم گزینش پذیری، از ایده آل بودن دارو به دور بود، زیرا همزمان قادر بود سایر آنزیم‌های CYP450 را که در بیوسنتز کورتیزول و آلدوسترون وجود دارد را نیز مهار کند. چنین نقص‌هایی، کاربرد آن را محدود و منجر به خروج نهایی آن از بازار شد. با این وجود، آمینوگلوتمتیماید برای AI‌های بعدی با تکیه بر توسعه بیشتر، قدرت انتخاب پذیری بالاتر و سمیت کمتر به کار گرفته شده است. به این صورت صفحه‌های جدیدی در کتاب درمان هورمونی سرطان پستان ایجاد شد که شامل شکل گرفتن ایده مهارکننده‌های جدید آروماتاز برای درمان سرطان پستان بود به شکلی که عوارض سمی آمینوگلوتمتیمایدها را نداشته باشد. در ادامه به نسل دوم مهارکننده‌ها، فادروزول (fadrozole) که شامل یک گروه ایمیدازول است توجه شد (۲۳)، که از آمینوگلوتمتیماید، گزینش پذیری و قوی‌تر بود. با این وجود، هنوز هم اثراتی در بیوسنتز آلدوسترون، پروژسترون و کورتیکواسترون از خود نشان داد. فرمستان (Formestane) (۲۴)، اولین AI انتخابی است که در آزمایش بالینی مورد استفاده قرار گرفت و نشان داده شد که مؤثر است و به خوبی توسط بیمار تحمل می‌شود (۲۵). سرانجام، نسل سوم AI‌ها شامل تریازول (triazole)، آناستروزول (exemestane) (۲۶) و لتروزول (letrozole) (۲۷) و یک آنالوگ استروئیدی، به نام اگزمستان (exemestane) (۲۷) بود این AI‌ها در مقایسه با تاموکسیفن، در مرحله مقدماتی و پیشرفته سرطان سینه، اثرات بهتر و سمیت کمتری نشان داده‌اند. به همین دلیل، آخرین نسل AI‌ها توسط FDA به عنوان داروهای رده اول برای درمان سرطان پستان توصیه شده است. آناستروزول و لتروزول، مشتقات غیر استروئیدی و مهار کننده رقابتی آندروستندیون (androstenedione) (سابستریت طبیعی) هستند.

آروماتاز را باید با توجه به ساختار آنها به دو کلاس مجزا تقسیم بندی کرد: استروئیدی و غیر استروئیدی.

مواد و روشها

در دوران اخیر، مهار آنزیم آروماتاز با استفاده از روش‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه، بر روی تمامی سه نسل مهار کننده های آروماتاز متمرکز شده‌ایم (شکل ۱). به دلیل شباهت فراوان آگزمستان (۶- متیلن-آندرواستا-۱-۴-دی-ان-۳ و ۱۷-دیون) با سابستریط طبیعی (آندروستندیون)، ساختار این مهار کننده مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (شکل ۲). آگزمستان نوعی آنالوگ استروئیدی است که به صورت کاتالستی به یک گونه واکنش شیمیایی تبدیل شده و منجر به غیرفعال شدن برگشت ناپذیر آروماتاز می‌شود. تفاوت اصلی بین آگزمستان و آندروستندیون عبارت از جایگزینی گروه متیلیدین بر روی C₆ است که وجود متیلیدین پیوند آگزمستان در محل فعال، با استفاده از "گیره آب‌گریز" متشکل از رزیدجوهای Thr-310، Val-370 و Ser-478 بهبود پیدا خواهد کرد. لازم به ذکر است که رزیدجوهای درگیر در پیوند هیدروفوبی شامل F134, F221, V370, L372, V373, L477, W224, A306, D309, T310 S478 هستند (۳۹) و وجود پیوند دوگانه بین کربن‌های شماره ۱ و ۲ در آگزمستان که فعالیت مهار کنندگی آن به این پیوند مرتبط می‌شود (شکل ۳) (۴۰). چگونگی نحوه اتصال و مشارکت رزیدجوهای لیگندهای مختلف با آنزیم آروماتاز در شکل ۴ قابل مشاهده است.

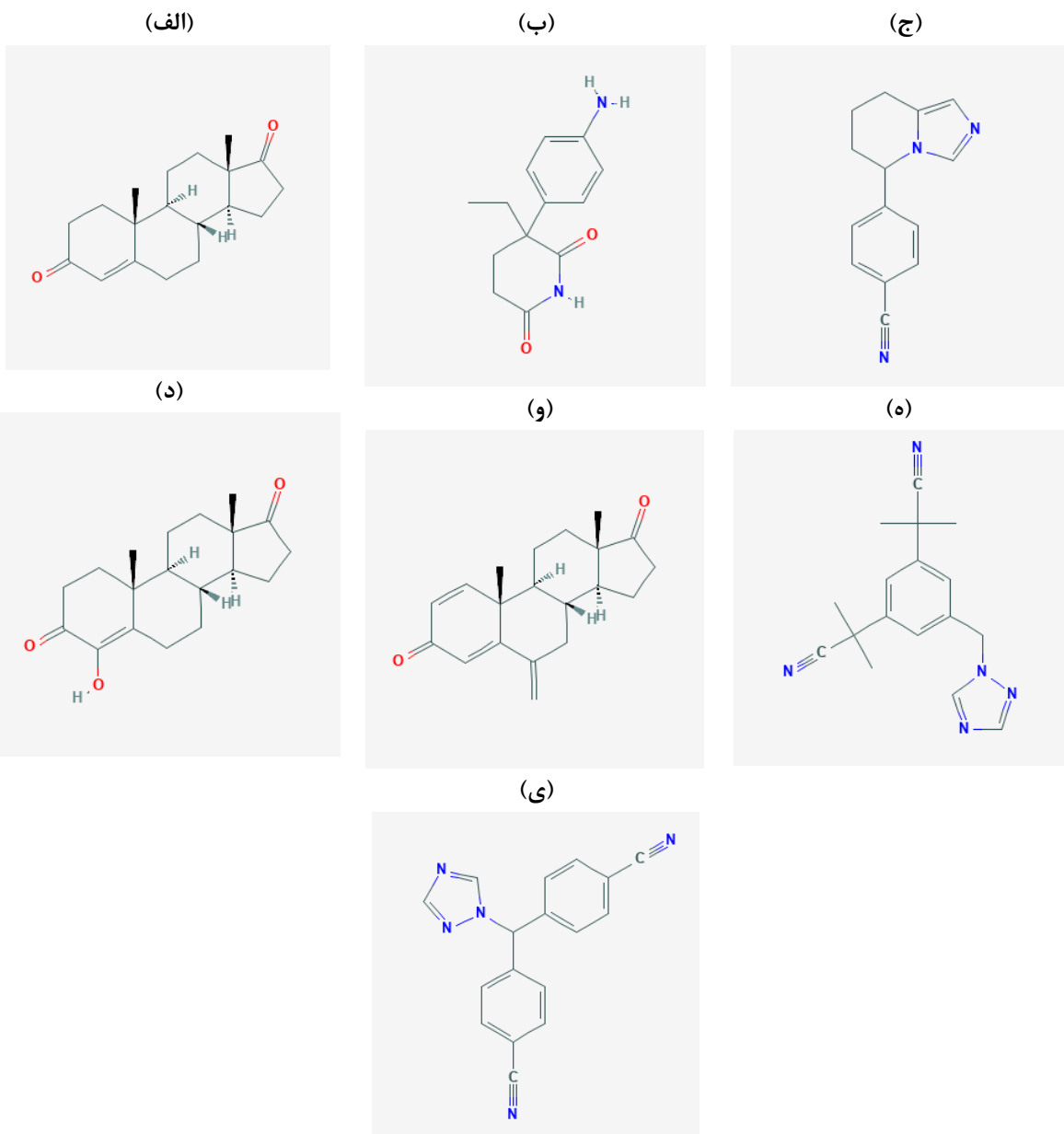
تهیه ساختار پروتئین و لیگاند

ساختار کریستالی آروماتاز (PDB ID: 3EQM) به عنوان هدف داکینگ برای هر سه نسل از داروهای AI پس از برداشتن بستر طبیعی آندروستندیون استفاده شد (۴۱). برای تهیه ساختار آروماتاز برای داکینگ، اتمهای هیدروژن ضروری، بارهای اتمی کولمن و پارامترهای انحلال با استفاده از AutoDockTools (۴۲) و PyRx0.3 (۴۳) اضافه شد. برای هماهنگی کوردیناسیون فلز در انجام شبیه سازی‌های داکینگ محاسبه شد. مجموعه‌ای از بار حاصل، از کار Favia و همکاریانش، بر روی رزیدجو heme و اتم آهن به دست آمد (۴۴). داروهای AI که شامل آمینوگلوتماید، فرمستان، فادرزول، آناستروزول و لتروزول است، از PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (۴۵) به دست آمد و به عنوان لیگاند استفاده شد. ساختارهای لیگاند با استفاده از روش B3LYP/6-31G (d) (۴۶) از نظر هندسی با گوسین ۰۹ (۴۷) بهینه شدند. در مرحله بعد، ساختارهای لیگاند با ادغام اتم‌های هیدروژن غیر قطبی، اضافه کردن بارهای جزئی و تعیین پیوندهای قابل چرخش، برای داکینگ آماده شدند.

مهار کننده‌های استروئیدی ساختار مشابهی با ASD بستر طبیعی دارند و از این رو به عنوان بسترهای شبه آروماتاز عمل می‌کنند. به گونه‌ای که این مهار کننده‌ها به طور غیرقابل برگشت محل فعال آنزیم را به هم متصل می‌کنند و بنابراین به عنوان یک غیرفعال کننده مکانیسم یا مهار کننده خودکشی در نظر گرفته شوند، به طور غیرقابل برگشت به رسپتور آروماتاز می‌چسبند و باعث تخریب ترکیب پروتئین و دارو می‌شوند (۲۸، ۲۹). در بین نسل دوم‌ها، فرمستان و در بین نسل سوم‌ها آگزمستان از این گروه هستند. انواع غیراستروئیدی که بیشتر ترکیبات مبتنی بر آزلو مانند آناستروزول یا لتروزول هستند که مشتقات تریازول هستند. این مهار کننده‌ها برای اتصال آنزیم به طور برگشت پذیر با بستر طبیعی رقابت می‌کنند؛ بنابراین با تکه‌های هم-آهن کوفاکتور تداخل می‌کنند (۳۳-۳۰). از ناحیه P450 به آروماتاز می‌چسبند، پس می‌توانند بدون ایجاد تخریب از آن جدا شوند. خود آمینوگلوتماید و روگلتاماید و فادرزول از نسل اول و دوم و آنسترازول و لتروزول از نسل سوم از این گونه هستند (۳۷-۳۴).

در حال حاضر روش درمانی اول برای سرطان پستان وابسته به هورمون پیشرفته مبتنی بر نسل سوم AI است. این خانواده از مهار کننده‌ها شامل سه ترکیب است: آناستروزول، لتروزول و آگزمستان که به ترتیب با نام‌های تجاری Arimidex®, Femara® و Aromasin® به بازار عرضه می‌شوند (۳۸). بنابراین، مهار آنزیم آروماتاز با استفاده از داروهای شناخته شده به عنوان مهار کننده‌های آروماتاز خط مقدم درمانی این نوع سرطان‌ها است.

رویکردهای شبیه سازی مولکولی شیمی محاسباتی برای موفقیت در مورد واکنش‌های شیمیایی و مکانیسم‌های اتصال طیف گسترده‌ای از سیستم‌های بیولوژیکی و شیمیایی با موفقیت به کار گرفته شده‌اند. تاکنون، ابزارهای محاسباتی بی شماری برای طراحی دارو در دسترس است و داکینگ مولکولی بستر مناسبی برای درک مکانیسم مولکولی حاکم بر مهار آنزیم فراهم می‌کند. در این مطالعه، حالت اتصال آروماتاز با هر سه نسل از AI، با استفاده از متصل شدن مولکولی به ساختار بلوری آروماتاز، توضیح و ترکیب مولکولی تمامی مهار کننده‌ها از نظر هندسی بهینه و پیش بینی می‌شود که اطلاعات به دست آمده از این مطالعه برای طراحی بیشتر AI‌های جدید سودمند باشد.



شکل ۱. انواع ساختارهای شیمیایی مهارکننده های آروماتاز (گرفته شده از پایگاه Pubchem). الف. Androstenedione (سابستریت طبیعی)، ب. Aminoglutethimide (مهار کننده نسل اول)، ج. Fadrozole (مهار کننده نسل دوم)، د. Formestane (مهار کننده نسل دوم)، و. Exemestane (مهار کننده نسل سوم)، ه. Anastrozole (مهار کننده نسل سوم)، ی. Letrozole (مهار کننده نسل سوم).

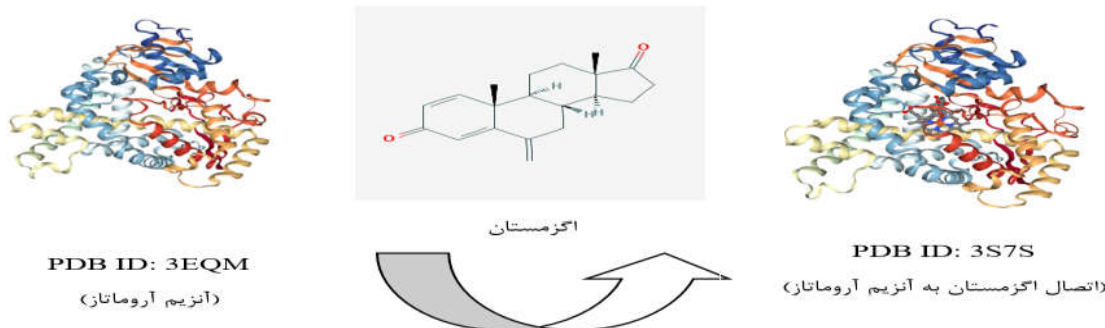
داکینگ مولکولی

محاسبات داکینگ با کمک نرم افزار AutoDock، نسخه ۴٫۲ با استفاده از الگوریتم Lamarckian (۴۸) و PyRx 0.3 انجام شد. اندازه جعبه $50 \times 64 \times 78 \text{ \AA}$ با فاصله 0.375 \AA با استفاده از AutoGrid ساخته شد (۴۲). شبکه در مختصات x و y و z از $83/35$ ، $490/60$ و $50/60$ محور قرار داشت که به عنوان رزیدجو محل اتصال گزارش شد (۹). موقعیت اولیه، جهت گیری و

چرخش مولکول های لیگاند به طور تصادفی تنظیم شد. توزیع جمعیت از ۲۵۰ نمونه تصادفی استفاده شد. به منظور اعتبارسنجی صحت سیستم داکینگ، سابستریت طبیعی آندروستندیون دوباره به آروماتاز متصل شد و جهت گیری آن با توجه به ساختار کریستالی مشخص شد. مجذور انحراف مربع میانگین (RMSD) بین ساختار کریستالی مشاهده شده و ساختار پیش بینی شده بدست آمده از AutoDock مقدار 1.350 \AA را



شکل ۲. ساختار شیمیایی مهارکننده اگزمستان (الف) و سابستریت طبیعی آندروستندیون (ب)



شکل ۳. نمایش اتصال اگزمستان به آنزیم آروماتاز با کمک داکینگ مولکولی (گرفته شده از پایگاه Protein Data Bank)

در هیستوگرام را نمایش می‌دهد. از طرف دیگر، موقعیت‌های اتصال برای آمینوگلوتمتاید، آناستروزول و لتروزول، خطوط فرکانسی متعددی را نشان می‌دهند که بیشترین جمعیت با حداقل انرژی را به نمایش می‌گذارد. نتایج به دست آمده از AutoDock اطلاعات مربوط به جهت گیری اتصال از فعل و انفعالات پروتئین-لیگاند را ارائه می‌دهد که علاوه بر این، انرژی‌های آزاد اتصال (ΔG_b) و ثابت بازدارندگی مهارکننده‌ها (K_i) محاسبه می‌شود که در جدول ۱ فهرست شده‌اند.

یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصل از جدول ۱، از سابستریت (آندروستندیون) به مهارکننده‌های نسل سوم، کاهش مقدار ΔG_b از $-۸/۳۴$ به $-۶/۵۴$ کیلوکالری بر مول و افزایش مقدار ثابت مهارکنندگی این آنزیم از $۷۷۲/۱۱$ نانو مولار به $۱۶/۵$ میکرو مولار، حاکی از سطح انرژی بالاتر محصولات نسبت به ساختارهای داکینگ شده است. با مقایسه بین سه نسل از AIها، مشاهده شد که قدرت مهارکنندگی آنزیم آروماتاز به طور پیوسته از نسل اول تا نسل سوم افزایش یافته است. همچنین آمینوگلوتمتاید (اولین نسل از AI) در

نشان داد. تجزیه و تحلیل نتایج اتصال با استفاده از AutoDockTools (۴۹) و PyMOL (۵۰) انجام شد. داکینگ مولکولی برای روشن کردن حالت اتصال آروماتاز و مهارکننده‌های آن انجام شد. برای این منظور، در مجموع ۶ مهارکننده (شکل ۱) به محل اتصال آروماتاز متصل شدند. 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 کمترین انرژی اتصال بالاترین دسته بندی کلاستر به عنوان مدل نهایی برای آنالیز با کمک AutoDockTools و PyMOL انتخاب شد. در این مطالعه، اتصال آنزیم آروماتاز با مهارکننده‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار داکینگ مولکولی مشخص شد. AutoDock با استفاده از الگوریتم Lamarckian برای مدل سازی برهمکنش بین آروماتاز و مهارکننده‌های آن استفاده شد. محاسبات داکینگ مولکولی برای آندروستندیون، فادروزول، فرمستان و اگزمستان، یک حالت واحد از تعامل لیگاند-گیرنده که با حضور یک نوار فرکانس تنها

جدول ۱. مقادیر انرژی‌های آزاد پیوندی ($\Delta G_{\text{binding}}$) و ثابت بازدارندگی (K_i) سابستریت طبیعی (a)، مهارکننده های آروماتاز نسل اول (b)، مهارکننده‌های آروماتاز نسل دوم (c) و مهارکننده های آروماتاز نسل سوم (d)

Ligand	Binding Energy $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal mol ⁻¹)	Inhibition Constant K_i	H-Bond Interaction
Androstenedione ^a	-۸/۳۴	۷۷۲/۱۱nM	Met 374, Thr 310
Aminoglutethimide ^b	-۶	۴۰/۲۷μM	Asp 309, Asp 371, Leu 372
Fadrozole ^c	-۷/۵۵	۲/۹۳μM	-
Formestane ^c	-۸/۵۵	۵۴۲/۸۹nM	Met 374, Ser478
Exemestane ^d	-۸/۷۷	۳۷۳/۳۲nM	Met 374
Anastrozole ^d	-۷/۶۱	۲/۶۲μM	Arg 375, Arg 435
Letrozole ^d	-۶/۵۴	۱۶/۱۵μM	Ala 438

تحلیل مقایسه‌ای ازگرمستان با آندروستندیون نشان داد که اولی یک گروه متیلیدین اضافی را در موقعیت C6 فراهم می‌کند که دارای یک تماس واندروالس محکم‌تر و قوی‌تر با بقایای پروتئین اطراف است (۹). همچنین جالب است بدانیم فرمستان و ازگرمستان که تنها AI با داربست استروئیدی هستند، بالاترین ΔG_b یعنی به ترتیب -۸/۵۵ و -۸/۷۷ کیلو کالری بر مول و بهترین عملکرد K_i به ترتیب ۵۴۲/۸۹ و ۳۷۳/۳۲ نانو مولار را به دست آوردند. نسل سوم AI، از آناستروزول و لتروزول تشکیل شده است. لازم به ذکر است که این AIها نسبت به دو نسل قبلی (به استثنای فادروزول) با یکدیگر تفاوت دارند، زیرا از اتم‌های نیتروژن تشکیل شده‌اند، که مسئولیت هماهنگی با گروه هم (heme) را بر عهده دارد (۵۲). آناستروزول و لتروزول اتصال قوی اما برگشت پذیری را برای گروه هم تشکیل می‌دهند (۵۳، ۵۴). از نظر درمان، این نسل دارای خصوصیات بالاتری است، به طوری که ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ برابر فعال‌تر و ۹۶٪ در مهار آروماتیزاسیون آندروستندیون در بدن از آمینوگلوتمتاید مؤثرتر است (۵۵).

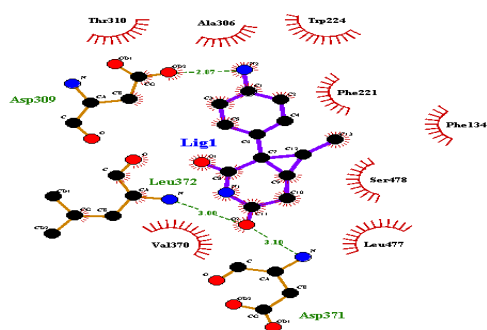
بحث

در این مطالعه، بررسی برهمکنش آنزیم آروماتاز با مهارکننده‌های مختلف با کمک مدل‌سازی مولکولی انجام پذیرفت. نتایج نشان دادند که رزیدجوه‌ای: قطبی (D309)، (T310، S478 و M374)، آروماتیک (F134، F221 و W224) و غیر قطبی (A306، A307، V370، L372 و L477) در اتصال آروماتاز با AIها نقش کلیدی داشتند.

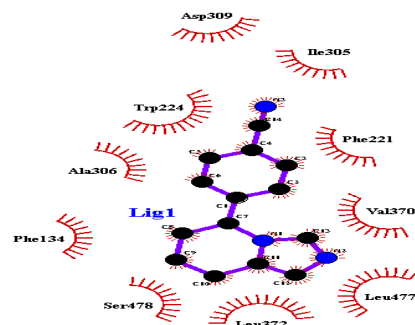
مطالعه حاضر توسط مطالعات قبلی مورد تایید است، زیرا مطابق مطالعات انجام گرفته پیشین، هرگز توانایی

تعامل آگریزی با محل اتصال آروماتاز به همراه تعامل پیوند هیدروژنی با Asp 309, Asp 371, Leu 372 درگیر می‌شود (۵۱).

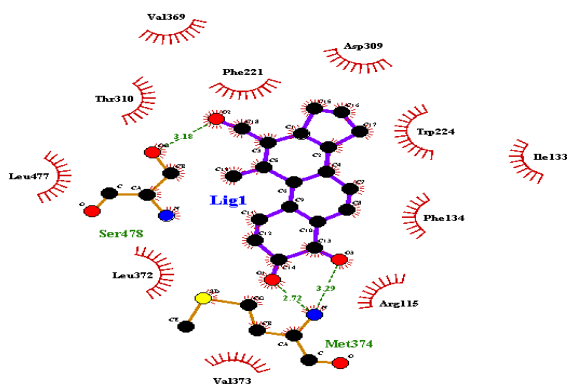
علیرغم داشتن چندین نقطه تعامل، به طرز شگفت‌آوری آمینوگلوتمتاید انرژی اتصال نسبتاً کم (۶- کیلو کالری بر مول) و ثابت بازدارندگی نسبتاً زیاد (۴۰/۲۷ میکرو مولار) دارد. چنین نتایجی (کم بودن مقدار انرژی آزاد اتصال و زیاد بودن مقدار ثابت مهارکنندگی)، ناکارآمدی آمینوگلوتمتاید را به عنوان AI نشان خواهد داد. نسل دوم AIها، از فادروزول و فرمستان تشکیل شده است. مشاهده شده است که برای فادروزول و فرمستان، تفاوت معنی‌داری در انرژی اتصال (-۷/۵۵ و -۸/۵۵ کیلو کالری بر مول) و ثابت بازدارندگی (۲/۹۳ میکرو مولار و ۵۴۲/۸۹ نانو مولار) به ترتیب برای فادروزول فرمستان، را نشان داد. این تفاوت را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که فادروزول و فرمستان داربست ساختاری متفاوتی دارند، که در اولی یکی از مشتقات آزول است، در حالی که دومی یک مشتق استروئید است. علاوه بر این، حالت‌های داکینگ برای هر دو ساختار کاملاً متفاوت بودند که فادروزول به طور عمده در تماس سطحی واندروالس آگریز و هماهنگی نیتروژن آزول آن با اتم آهن heme بود، که به مقدار ΔG_b پایین‌تر کمک می‌کند (جدول ۱). از طرف دیگر، فرمستان در هر دو برهمکنش، پیوند آگریز و پیوند هیدروژنی با گروه‌های Met 374 و Ser 478، شرکت می‌کند که ارزش ΔG_b بالاتر آن را به خود اختصاص داده است. ازگرمستان مهار قدرت-مندی را از خود نشان داد، اما به صورت برگشت ناپذیر به آروماتاز متصل می‌شود. شبیه به فرمستان، ازگرمستان نیز در تشکیل پیوند هیدروژنی با آمین چارچوب Met 374 همراه با تعامل آگریز درگیر می‌شود. علاوه بر این، تجزیه و



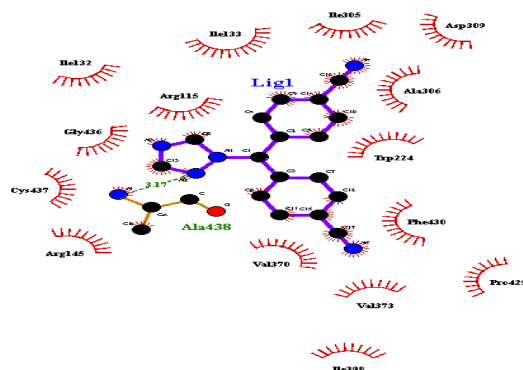
Aminoglutethimide_Complex



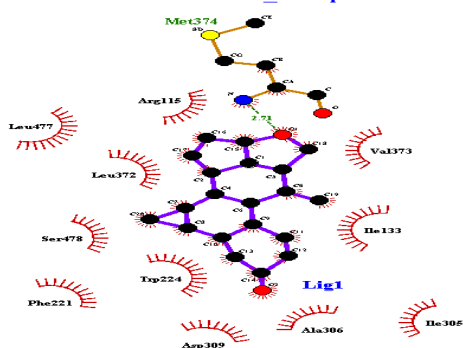
Fadrozole_Complex



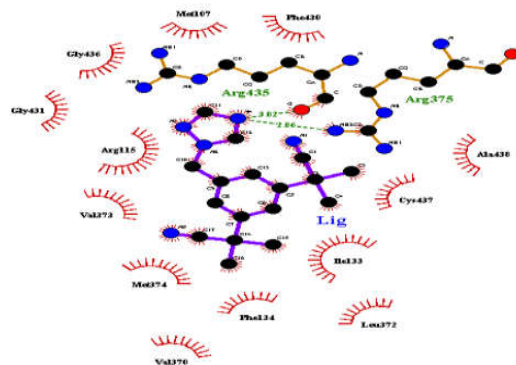
Formestane_Complex



Letrosol_Complex



Examestane_Complex



شکل ۴. نمایش نحوه اتصال مهارکننده‌های مختلف به آنزیم آروماتاز و مشارکت رزیدجوه‌های مختلف در محل فعال آنزیم

تاموکسیفن مطالعاتی انجام گرفته، از جمله، مقایسهٔ اگزامستان با تاموکسیفن که همچنان برتری این دارو بر تاموکسیفن در بیماران بعد از یائسگی ثابت شده است و در مطالعهٔ دیگری که بر روی آناسترازول و لتروزول در مقایسه با تاموکسیفن در این خانمها انجام گرفته است، نتایج کاملاً به نفع مهارکننده‌های آروماتاز است و به طور مشخصی پاسخ به درمان را بهبود بخشیده‌اند (۵۷، ۵۸). اولین عارضه جانبی استفاده از مهارکننده‌های آروماتاز، اختلالات استخوانی (استئوپوروز) و متابولیسم لیپیدها

مهارکنندگی متوسط در نسل اول و دوم از ۹۰ درصد بیشتر نبوده است، ولی این میزان در نسل سومی‌ها به ۹۸ درصد می‌رسد. البته این توانایی در بین نسل سومی‌ها هم بسیار متفاوت است و باید گفت که در تمام مطالعات تجربی انجام گرفته، لتروزول قوی‌ترین قدرت مهار و کمترین سطح استروژن پلاسمایی را ایجاد کرده است (۵۶). زمانی که در بافت‌ها بررسی استروژن بافتی انجام می‌شود، کاهش استروژن در مورد لتروزول و آنسترازول برابر است (۵۵، ۵۶). در گذشته، در خصوص مقایسه داروهای مذکور با

اگزومستان دارای ΔGb بالاتری نسبت به مهارکننده های با ساختار آزول مانند فادروزول، آناستروزول، لتروزول هستند که این به علت ساختار محکم (rigid) آنها در مقابل ساختار دارای انعطاف (flexible) ترکیبات آزولی می تواند باشد. در نهایت از بین مهارکننده های با ساختار استروئیدی، اگزومستان (آروماسین) بیشترین اثر مهار کنندگی را از خود نشان می دهد که این نتایج در توافق با نتایج تجربی پیشین (۶۱، ۶۳، ۶۸-۶۶) و بررسی های مشابه جدیدی است که بر روی این دارو (۷۰، ۷۱) و همچنین داروی ضد سرطانی ایفوسفامید با کمک محاسبات مکانیک کوانتومی انجام گرفته است (۷۳). در واقع اگزومستان، مهارکننده خودکشی آروماتاز نسل سوم است که هم اکنون در معالجه سرطان پستان بسیار مورد استفاده قرار می گیرد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش در مرکز شیمی محاسباتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان تحقق پذیرفت و یافته های حاصله، مستخرج از رساله دکتری می باشد.

(مشکلات قلبی- عروقی) است. به طور مشخصی تقریباً تمامی مهارکننده های آروماتاز باعث افزایش متوسط استئوپورز می شوند و جالب اینکه عمل تاموکسیفن درست برعکس است و دانسیته استخوانی را افزایش می دهد (۵۹، ۶۰). مطالعات مختلف، هم در مورد اگزومستان (۶۱) و هم در مورد لتروزول (۶۲) نشان داده اند که این داروها باعث استئوپورز متوسط می شوند (۶۳) و اکثر مطالعات افزایش میزان شکستگی استخوانی را با این داروها در مقایسه با تاموکسیفن نشان داده اند (۶۴، ۶۵) و جالب اینکه اثر جانبی این داروها بر روی استخوان با قطع مصرف دارو قابل برگشت است (۶۶). در خصوص عارضه دوم، اگزومستان و لتروزول آثار بسیار کمی بر لیپیدهای پلاسما دارند (۶۷، ۶۸). عارضه دیگری که به این داروهای مهارکننده نسبت داده می شود، مشکلات مفصلی و اسکلتی- عضلانی و خشکی صبحگاهی ناشی از مصرف آنها است که برخی از مصرف کنندگان این داروها از آن شکایت داشته (۶۹) و این حتی باعث میشود که بیش از نیمی از مبتلایان، دارو را مصرف نکنند. از این مطالعه نتیجه گیری می شود که در مجموع مهارکننده های با ساختار استروئیدی مانند فرمستان و

REFERENCES

1. Fontham ETH, Thun MJ, Ward E, Balch AJ, Delancey JOL, Samet JM. American Cancer Society perspectives on environmental factors and cancer. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 343-351.
2. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 116-124.
3. Russo J, Lareef MH, Balogh G, Guo S, Russo IH. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 87: 1-25.
4. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86: 24-219.
5. Santen R J, Brodie H, Simpson E R, Siiteri P K, Brodie A. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocrine Rev* 2009; 30: 343-375.
6. Clyne CD, Kovacic A, Speed CJ. Regulation of aromatase expression by the nuclear receptor LRH-1 in adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 39-44.
7. Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Yamaguchi Y, Kitada K, Honma S, Moriya T, Hirakawa H, Evans DB, Hayashi S, Ohuchi N, Sasano H. Aromatase localization in human breast cancer tissues: possible interactions between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Res* 2005; 65: 657-63.
8. Mendelson CR, Jiang B, Shelton JM. Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 67: 4945-54.
9. Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 2009; 457: 219-23.
10. Azami F, Tazikeh-Lemeski E, Mahmood-Janloo MA. Kojic Acid Effect on the Inhibitory Potency of Tyrosinase. *J Chem Health Res* 2017; 7: 147-155.
11. Tazikeh-Lemeski E. The study of the interaction between amyloid beta protein and zinc ion and its role in Alzheimer's disease. *Med Sci* 2015; 25: 198-205.
12. Santen RJ, Santner S, Davis B. Aminoglutethimide inhibits extraglandular estrogen production in postmenopausal women with breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 1257- 1265.

13. Graves PE, Salhanick HA. Stereoselective inhibition of aromatase by enantiomers of aminoglutethimide. *Endocrinology* 1979; 105:52-57.
14. Attar E, Bulun S E. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis. *Fertil Steril* 2006; 85: 1307-1318.
15. Brodie AM, Njar VC. Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment. *Steroids* 2000; 65: 171-179.
16. Lønning P E. The potency and clinical efficacy of aromatase inhibitors across the breast cancer. *Ann Oncol* 2011; 22: 503-514.
17. Geisler J, Lønning PE. Aromatase inhibition: translation into a successful therapeutic approach. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2809-2821.
18. Smith I E, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *New Engl J Med* 2003; 348: 2431-2442.
19. Recanatini M, Bisi A, Cavalli A, Belluti F, Gobbi S, Rampa A, et al. A new class of nonsteroidal aromatase inhibitors: design and synthesis of chromone and xanthone derivatives and inhibition of the P450 enzymes aromatase and 17 α -hydroxylase/C17, 20-lyase. *J Med Chem* 2001; 44: 672-680.
20. Ford N A, Devlin K L, Lashinger L M, Hursting S D. Deconvoluting the obesity and breast cancer link: secretome, soil and seed interactions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2013; 18: 267-275.
21. Miller WR. Background and development of aromatase inhibitors. In: Furr BJA, editor. *Aromatase inhibitors*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Basel; 2008.
22. Avvaru S P, Noolvi M N, Aminbhavi T M, Chkraborty S, Dash A, Shukla SS. Aromatase inhibitors evolution as potential class of drugs in the treatment of postmenopausal breast cancer women. *Mini Rev Med Chem* 2018; 18: 609-621.
23. Geisler J. Aromatase inhibitors and inactivators for the treatment of postmenopausal breast cancer: a review. *Cur Med Chem Immunol* 2003; 3: 261-276.
24. Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrinol Rev* 2005; 26: 331-345.
25. Miller W R, Jackson J. The therapeutic potential of aromatase inhibitors: Expert Opin Investig Drugs 2003; 12: 337-351.
26. Plourde PV, Dyroff M, Dowsett M, Demers L, Yates R, Webster A. ARIMIDEX: A new oral, once-a-day aromatase inhibitor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 175-179.
27. Dutta U, Pant K. Aromatase inhibitors: Past, present and future in breast cancer therapy. *Med Oncol* 2008; 25: 113-124.
28. Miller WR, Dixon JM. Endocrine and clinical endpoints of exemestane as neoadjuvant therapy. *Cancer Control* 2002; 9: 9-15.
29. Hong Y, Yu B, Sherman M. Molecular basis for the aromatization reaction and exemestane-mediated irreversible inhibition of human aromatase. *Mol Endocrinol* 2007; 21: .14-401.
30. Lombardi P. Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2002;1587: 326-337.
31. Galeazzi R, Massaccesi L. Insight into the binding interactions of CYP450 aromatase inhibitors with their target enzyme: a combined molecular docking and molecular dynamics study. *J Mol Model* 2011; 1-14.
32. Hong Y Y, Rashid R, Chen S A. Binding features of steroidal and nonsteroidal inhibitors. *Steroids* 2011; 76: 802-806.
33. Cepa M, da Silva EJT, Correia-da-Silva G, Roleira FMF, Teixeira NAA. Synthesis and biochemical studies of 17-substituted androst-3-enes and 3,4-epoxyandrostanes as aromatase inhibitors. *Steroids* 2008;73:1409-1415.
34. Newell D R, Silvester J, McDowell C, Burtles S S .The Cancer Research UK experience of pre-clinical toxicology studies to support early clinical trials with novel cancer therapies. *Eur J Cancer* 2004; 40: 899-906.
35. Geisler J, Lønning P E. Resistance to endocrine therapy of breast cancer: recent advances and tomorrow's challenges. *CI Breast Cancer* 2001; 1: 297-308.
36. Lønning PE. Estradiol measurement in translational studies of breast cancer. *Steroids* 2015; 99:26-31.

37. Recanatini M, Cavalli A, Valenti P. Nonsteroidal aromatase inhibitors: recent advances. *Med Res Rev* 2002; 22: 282-304.
38. Santen R J, Brodie H, Simpson E R, Siiteri P K, Brodie A. History of aromatase: Saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr Rev* 2009; 30: 343-375.
39. Ghosh D, Lo J, Morton D, Valette D, Xi J, Griswold J, et al. Novel aromatase inhibitors by structure-guided design. *J Med Chem* 2012; 55: 8464-8476.
40. Brueggemeier R W. Overview of the pharmacology of the aromatase inactivator exemestane. *Breast Cancer Res. Treat* 2002; 74: 177-185.
42. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010;31:455-61.
43. Latha MS, Saddala MS. Molecular docking based screening of a simulated HIF-1 protein model for potential inhibitors. *Bioinformation* 2017;13:388-393.
44. Favia AD, Cavalli A, Masetti M, Carotti A, Recanatini M. Three-dimensional model of the human aromatase enzyme and density functional parameterization of the iron-containing protoporphyrin IX for a molecular dynamics study of heme-cysteinato cytochromes. *Proteins* 2006; 62: 1074-1087.
45. Cheng T, Zhao Y, Li X, Lin F, Xu Y, Zhang X, et al. Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *J Chem Inf Model* 2007; 47: 2140-2148.
46. Ahuja B L, Khera S, Mathur S, Heda N L. Compton profile study of tin. *Curr Prot Bioinf* 2006; 243: 625-634.
47. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian03. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA. 2003.
48. Greff K, Srivastava RK, Koutnik J, Steunebrink BR, Schmidhuber J. LSTM: A Search Space Odyssey. *IEEE Trans Neural Netw Learn Syst* 2017;28:2222-2232.
49. Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr Prot Bioinf* 2008; 24: 8.14.1-8.14.40.
50. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins* 2006; 65 :15-26.
51. Wheeler SE, Houk KN. Substituent effects in the benzene dimer are due to direct interactions of the substituents with the unsubstituted benzene. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 10854-10855.
52. Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Naenna T, Prachayasittikul VA .practical overview of quantitative structure-activity relationship. *EXCLI J.* 2009; 74-88.
53. Hong Y, Li H, Yuan Y-C, Chen S. Molecular Characterization of Aromatase. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1155: 112-120.
54. Buzdar A.U, Robertson JF, Eiermann W, Nabholz JM. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane. *Cancer* 2002; 95: 2006-2016.
55. Geisler J, Helle H, Ekse D. Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6330-5.
56. Geisler J, Helle H, Ekse D, Duong N K, Evans D B, Nordbo, Lønning P E. Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels. *Clin Cancer Res* 2008;14: 6330-6335.
57. Eiermann W, Paepke S, Appfelstaedt J. Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: arandomized double-blind multicenter study. *Ann Oncol* 2001; 12: 1527-32.
58. Semiglazov V, Kletsel A, Semiglazov V. Exemestane (E) vs tamoxifen (T) as neoadjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with ER+ breast cancer (T2N1-2, T3N0-1, T4N0M0). *J Clin Oncol* 2005; 23:16S.
59. Coleman R, Banks L, Girgis S. Skeletal effects of exemestane on bone-mineral density bone biomarkers and fracture incidence in postmenopausal women with early breast cancer participating in the Intergroup Exemestane Study (IES): a randomised controlled study. *Lancet Oncol* 2007; 8: 119-27.
60. Eastell R, Adams JE, Coleman RE. Effect of anastrozole on bone mineral density: 5-year results from the anastrozole, tamoxifen, alone or in combination trial 18233230. *J Clin Oncol* 2008; 1; 26: 1051-7.
61. Brufsky A, Bundred N, Coleman R. Integrated analysis of zoledronic acid for prevention of aromatase inhibitor-associated bone loss in postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole. *Oncologist* 2008; 13: 503-14.

62. Lønning PE, Geisler J, Krag LE. Effects of exemestane administered for 2 years versus placebo on bone mineral density, bone biomarkers, and plasma lipids in patients with surgically resected early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5126–37.
63. Perez EA, Jesse RG, Pritchard KI. Effect of letrozole versus placebo on bone mineral density in women with primary breast cancer completing 5 or more years of adjuvant tamoxifen: a companion study to NCICCTG MA.17. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3629–35.
64. Coates AS, Keshaviah A, Thurlimann B. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine- responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol* 2007; 25: 486–92.
65. Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 559–70.
66. Geisler J, Lonning PE, Krag LE. Changes in bone and lipid metabolism in postmenopausal women with early breast cancer after terminating 2-year treatment with exemestane: a randomised, placebo-controlled study. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2968–75.
67. Bonanni B, Johansson H, Gandini S, Guerrieri-Gonzaga A, Torrasi R, Sandri M T, et al. Effect of low dose tamoxifen on the insulin-like growth factor system in healthy women. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 69: 21-27.
68. Lønning PE, Geisler J. Indications and limitations of third- gene ration aromatase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 723-39.
69. Partridge AH, LaFountain A, Mayer E. Adherence to initial adjuvant anastrozole therapy among women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 556–62.
70. Kian M, Tazikheh-Lemeski E. B₁₂Y₁₂ (Y: N, P) fullerene-like cages for drug-delivery systems; Molecular modeling investigation. *J Mol Structure* 2020; In Press.
71. Kian M, Tazikheh-Lemeski E. Adsorption behavior of Aromasin onto C₂₀ and C₂₄ nano-cages: Density functional theory study. *Stru Chemist* 2020; In Press.
72. Soltani A, Tazikheh-Lemeski E, Javan, M. A comparative theoretical study on the interaction of pure and carbon atom substituted boron nitride fullerenes with ifosfamide drug. *J Mol Liquids* 2020; 297:1-8.