

Study of Molecular Docking and Prediction of Toxicity of Morin Analogues as Anti-Cancer Agents and Aromatase Inhibitors

Tooba Abdizadeh¹

1.Assistant Professor, Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-3833335652, Email: abdizadeh.t@skums.ac.ir. ORCID ID: 0000-0003-2715-562X

ABSTRACT

Background and Aim: After lung cancer, breast cancer is the main cause of death from cancer among women. Aromatase is a key enzyme involved in the development of estrogen receptor-positive breast cancer, which catalyzes the final stage of estrogen biosynthesis from the conversion of androstenedione and testosterone, and can be a promising target in the treatment of hormone-dependent breast cancer. In this study, the effects of morin and its analogues on aromatase enzyme were evaluated.

Materials and Methods: In this descriptive-analytical study, for bioinformatics assessment, the 3D structure of morin analogues (15 compounds), the standard drug (anastrozole) and aromatase enzyme were obtained from PubChem and PDB databases, respectively. Molecular docking studies in relation to the effects of the compounds on the aromatase enzyme were performed using MOE-2014 software. Then the physicochemical properties and biological activity of the compounds were predicted using Swiss ADME, PASS and Swiss Target Prediction browsers.

Results: The findings of the present study showed that morin analogues were non-toxic and favorable in terms of physicochemical properties. Also, all morin analogues were capable of inhibiting the aromatase enzyme. The best docking results belonged to galangin, morin, quercetin and rhamnetin compounds with strong binding energy (-13.90 to -14.79 kcal/mol) compared to anastrozole. The prediction coefficient of biological activities of these compounds was 0.175 to 0.952. Proteases, kinases, oxidoreductases, cytochrome P450 and lyases were the main predicted targets for all proposed compounds in the study.

Conclusion: Based on the results of bioinformatics studies, morin analogues, because of their suitable placement in the active site of the aromatase, provide more effective inhibition than the standard chemical drug and can be good candidates for hormone-dependent breast cancer treatment in the in vitro and in vivo studies.

Keywords: Morin, Molecular docking, Aromatase, Breast cancer

Received: May 31, 2022

Accepted: Oct 15, 2022

How to cite the article: Tooba Abdizadeh. Study of Molecular Docking and Prediction of Toxicity of Morin Analogues as Anti-Cancer Agents and Aromatase Inhibitors. *SJKU* 2023;28(4):39-65.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

مطالعه داکینگ مولکولی و پیش‌بینی سمیت آنالوگ‌های مورین به عنوان عوامل ضد سرطان و مهارکننده آنزیم آروماتاز

طوبی عبدی زاده^۱

۱. استادیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران، پست الکترونیک: abdzadeh.t@skums.ac.ir
تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۵۶۵۲، کد اراکید: ۵۶۲X-۲۷۱۵-۰۰۰۳-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: پس از سرطان ریه، سرطان سینه عامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در میان زنان است. آروماتاز، یک آنزیم کلیدی است که در ایجاد سرطان گیرنده استروژن مثبت سینه نقش دارد و مرحله نهایی بیوسنتز استروژن را از تبدیل آندروستندیون و تستوسترون کاتالیز می‌کند و می‌تواند یک هدف امیدوارکننده برای درمان سرطان سینه وابسته به هورمون باشد. در این تحقیق اثر بخشی مورین و آنالوگ‌هایش بر روی آنزیم آروماتاز مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش توصیفی-تحلیلی، جهت بررسی بیوانفورماتیکی، ساختار سه بعدی آنالوگ‌های مورین (۱۵ ترکیب)، داروی استاندارد (آناستروزول) و آنزیم آروماتاز به ترتیب از پایگاه داده‌های PubChem و PDB دریافت گردید. مطالعات داکینگ مولکولی ترکیبات بر روی آنزیم آروماتاز با استفاده از نرم افزار MOE-2014 انجام شد. سپس خصوصیات فیزیکوشیمیایی و فعالیت بیولوژی ترکیبات با استفاده از مرورگرهای Swiss ADME، PASS، Swiss Target Prediction و پیش‌بینی گردید.

یافته‌ها: یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که آنالوگ‌های مورینی مورد بررسی از لحاظ خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب و فاقد سمیت هستند و همچنین تمامی آنالوگ‌های مورینی قادر به مهار آنزیم آروماتاز می‌باشند. بهترین نتایج داکینگ مربوط به ترکیبات گالانجین، مورین، کوئرستین و رامنتین با داشتن انرژی اتصال قوی (۱۳/۹۰- تا ۱۴/۷۹- کیلو کالری برمول) نسبت به داروی آناستروزول می‌باشند. این ترکیبات تمایل بیشتری برای اتصال با آمینواسیدهای Arg115، Met374 و Thr310 و دیگر آمینواسیدهای کلیدی جایگاه فعال آنزیم آروماتاز دارند. ضریب پیش‌بینی فعالیت‌های بیولوژیکی این ترکیبات ۰/۱۷۵ تا ۰/۹۵۲ است و پروتئازها، کینازها، اکسیدوردوکتازها، سیتوکروم P450 و لیازاها اهداف اصلی پیش‌بینی شده برای همه ترکیبات پیشنهادی می‌باشند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعات بیوانفورماتیکی، آنالوگ‌های مورین به دلیل قرارگیری مناسب در جایگاه فعال آنزیم آروماتاز، مهار مؤثرتری را نسبت به داروی شیمیایی استاندارد ایجاد می‌کنند و می‌توانند کاندیدهای مناسبی جهت درمان سرطان سینه در بررسی‌های برون‌تنی و درون‌تنی باشند.

کلمات کلیدی: مورین، داکینگ مولکولی، آروماتاز، سرطان سینه

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۳/۱۰ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۷/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۲۳

مقدمه

سرطان یکی از کشنده‌ترین بیماری‌ها در جهان است و یکی از شناخته شده‌ترین و شایع‌ترین سرطان‌ها، سرطان سینه است که در زنان، به عنوان عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در رتبه دوم قرار دارد (۱ و ۲). میزان مرگ و میر ناشی از سرطان سینه نشان می‌دهد که این سرطان روز به روز در حال افزایش است و حدود ۱۱/۶ درصد زنان در سراسر جهان به سرطان سینه مبتلا هستند (۳). عوامل خطر سرطان سینه شامل سن، سابقه شخصی، سابقه خانوادگی، رژیم غذایی، ورزش، چاقی و میزان بالای استروژن و سطح تستوسترون پس از یائسگی می‌باشند (۴). انواع مختلفی از درمان برای سرطان سینه از جمله جراحی، پرتودرمانی، شیمی درمانی و هورمون درمانی در دسترس است (۵).

در زنان سالم، استروژن‌ها به طور عمده در تخمدان‌ها و همچنین در بافت چربی، پستان، پوست و استخوان تولید می‌شوند (۶). پس از یائسگی، پستان‌ها منبع اصلی تولید استروژن هستند که میزان استروژن‌های تولید شده در پستان در مقایسه با تخمدان‌ها که توسط زنان قبل از یائسگی تولید می‌شود چهار تا شش برابر بیشتر از میزان موجود در سرم است. تقریباً ۶۰ درصد سرطان‌های قبل از یائسگی و ۷۵ درصد از سرطان‌های بعد از یائسگی وابسته به هورمون هستند (۷)، این بدان معنی است که استروژن‌های درون‌زا در اصل برای تکثیر مورد نیاز هستند. بسیاری از داروهای مورد استفاده در درمان سرطان سینه گیرنده استروژن از نظر مکانیسمی مبتنی بر تداخل در تولید استروژن یا عملکرد استروژن هستند (۸).

تکثیر سلول‌های سرطانی در سرطان سینه توسط سیگنالی که هنگام اتصال استروژن به گیرنده‌های استروژن آزاد می‌شود، تحریک می‌شوند. در مسیرهای بیوستتزی، استروژن‌ها (استرون،

استرادیول و استریول) از کلسترول از طریق پروژستازن‌ها و آندروژن‌ها سنتز می‌شوند (۹). آروماتاز، آنزیمی است که در شبکه آندوپلاسمی سلول‌های تولیدکننده استروژن قرار دارد و در تبدیل آندروژن به استروژن عمل می‌کند. آروماتاز دارای خاصیت منحصر به فردی برای آروماتاسیته کردن بخش آلیسکلیک حلقه شش عضوی آندروستندیون یا تستوسترون برای تولید استروژن دارد. این آنزیم از زنجیره پلی پپتیدی شامل ۵۰۳ اسید آمینه و یک گروه پروستاتیک هم در محل فعال آن تشکیل شده است. شکاف ویژه آندروژن متشکل از آمینو اسیدهای آب-گریز و قطبی در محدوده محل اتصال آروماتاز واقع شده است (۱۰). برای جلوگیری از تولید استروژن، مهار آنزیم از طریق استفاده از مهارکننده‌های آروماتاز ضروری است. مهارکننده‌های آروماتاز فقط برای زنان یائسه مؤثر است، زیرا آن‌ها مانع تولید استروژن در تخمدان‌ها نمی‌شوند، بلکه فقط بر روی استروژن محلی تولید شده توسط سلول‌های سرطانی سینه عمل می‌کنند؛ بنابراین، مهارکننده‌های آروماتاز، به عنوان خط مقدم درمان سرطان سینه وابسته به استروژن است (۱۱).

مهارکننده‌های آروماتاز (Aromatase Inhibitors, AIs) مزایای زیادی نسبت به درمان سنتی سرطان سینه با استفاده از داروهای تعدیل‌کننده انتخابی گیرنده استروژن (SERMS, Selective Estrogen Receptor Modulators) دارند. این مزایا شامل برگشت‌پذیری، انسداد کامل آنزیم و احتمالاً کاهش عوارض جانبی می‌باشند (۱۲). داروهای مهارکننده آروماتاز اغلب بر اساس شباهت ساختاری آن‌ها با استروئیدها به عنوان مهارکننده‌های استروئیدی یا غیر استروئیدی (non-Steroidal Aromatases Inhibitors, NSAIs) یا بر اساس زمان تکامل آن‌ها به عنوان نسل‌های اول، دوم و سوم

طبقه بندی می‌شوند (۱۳ و ۱۴). مطالعات زیادی در حال انجام بر روی نسل سوم مهارکننده‌های آروماتاز غیراستروئیدی (NSAIs) متمرکز شده است که می‌توان آن‌ها را بر اساس داربست (Scaffold) آن‌ها به کلاس‌های زیر تقسیم کرد. دسته اول NSAIs شامل مولکول‌های دارویی مهارکننده آروماتاز نسل سوم تری‌آزولی مانند لتروزول و آناستروزول است که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration, FDA) تایید شده است و به عنوان داروهای خط اول در درمان سرطان سینه در زنان یائسه استفاده می‌شوند (۱۰). ویژگی این مهارکننده‌ها، وجود گروه‌های دی‌آریل متیل و ایمیدازول یا تری‌آزول در ترکیباتی مانند آریل-ایمیدازول و آزولیل بنزیل است. از آنجایی که این مهارکننده‌های آروماتاز از تغییرات ساختاری مولکول‌های دارویی سنتزی NSAIs بدست آمده‌اند، ممکن است در صورت مصرف طولانی‌مدت عوارض جانبی مشابه داروهای NSAIs داشته باشند (۱۵). دسته دوم NSAIs شامل محصولات طبیعی و مشتقات آن‌ها مانند فلاونوئیدها، کومارین-ها، رسوراترول (Resveratrol) و لیگنان (Lignan) است (۱۶ و ۱۷). علیرغم پیشرفت و توسعه در زمینه تحقیقات سرطان و درمان‌های نویدبخش و از آنجایی که مردم از عوارض جانبی داروهای شیمیایی مهارکننده آروماتاز مطلع هستند، هنوز تقاضای زیادی برای کشف داروهای جدید ایمن و مؤثر با اثرات جانبی کم بر سلامت انسان وجود دارد. محصولات طبیعی با اثرات جانبی کمتر، نقش مهمی در توسعه عوامل ضد سرطان دارند؛ بنابراین برنامه‌های مختلف کشف دارو به سرمایه‌گذاری در این منبع عظیم طبیعی ادامه می‌دهند (۱۸).

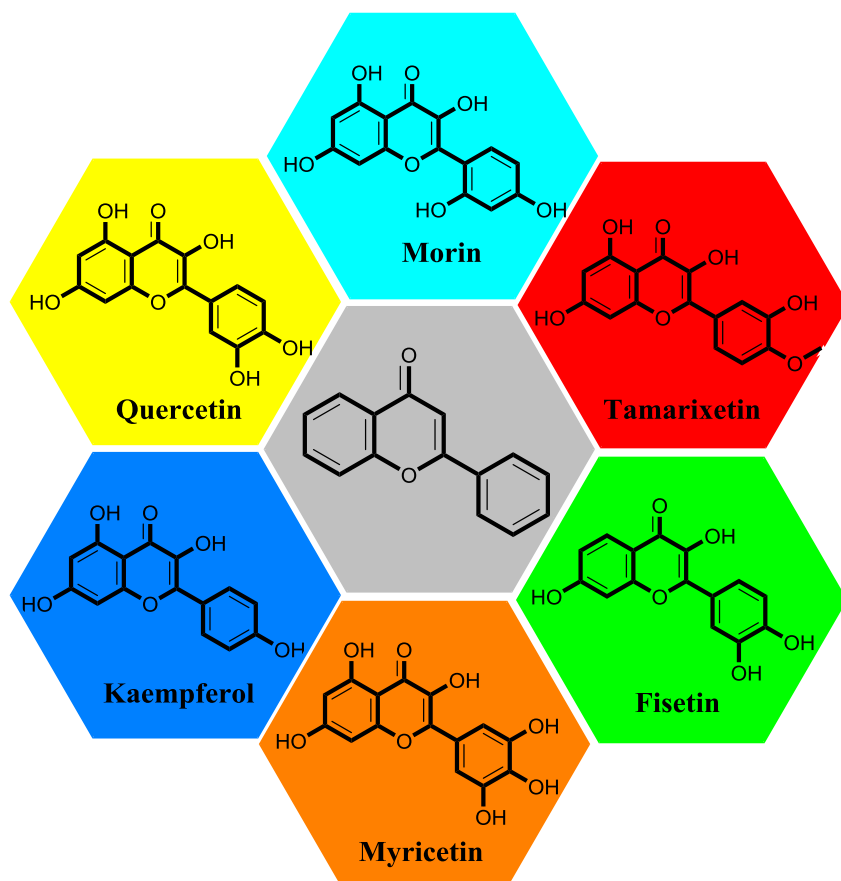
کشف اثرات درمانی یک ترکیب شیمیایی، تازه آغاز راهی است که ممکن است تحقیق، توسعه و اجرای آن سالیان زیادی به طول بیانجامد. در حقیقت زمان بر بودن، پرهزینه بودن و عدم دسترسی آسان به مواد اولیه دارویی جهت سنتز و داشتن

عوارض جانبی متعدد داروهای شیمیایی از معایب داروهای شیمیایی است یکی از راهکارهای جدید درمانی، غیر از طراحی و سنتز شیمیایی داروها، جستجوی مواد مؤثره دارویی در بین ترکیبات طبیعی به منظور دستیابی به داروهایی با کمترین اثرات جانبی و صرف هزینه و زمان کوتاه‌تر است. امروزه روش‌های *in Silico* به عنوان یکی از کم هزینه‌ترین و سریع‌ترین راهکارها برای رسیدن به ترکیب الگو و یا دارو مؤثر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۹).

گیاهان دارویی به دلیل منشأ طبیعی دارای عوارض جانبی کمتری نسبت به مواد شیمیایی هستند و دارای خواص گوناگونی از قبیل خواص ضد قارچی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد اکسیدانی، ضد تشنج و ضد تب هستند (۲۱ و ۲۰). در میان ترکیبات متنوع گیاهی، ترکیبات پلی فنولی مانند فلاونوئیدها، خواص متعدد دارویی از قبیل ضد اکسیدان، ضد باکتری، ضد سرطان، ضد التهاب، ضد ویروس و حفاظت‌کننده سیستم ایمنی دارند و توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۲۲ و ۲۳). فلاونوئیدها شامل فلاون‌ها، ایزوفلاون‌ها، فلاوانون‌ها و ایزوفلاوانون‌ها، معمولا در بسیاری از گیاهان و سبزی‌ها یافت می‌شوند و فرآیندهای متابولیک کلیدی انسان را از طریق گیرنده‌های هورمونی استروئیدی تعدیل می‌کنند، یا آنزیم‌های مهم دخیل در بیوسنتز خود هورمون‌های استروئیدی را مهار می‌کنند. پلی فنولیک‌های ایزوفلاون مانند جنیستین (Genistein) به دلیل این فعالیت بیولوژیکی به عنوان «استروژن گیاهی» شناخته شده‌اند (۲۴). کوئرستین فلاونوئید طبیعی است که به وفور در منابع غذایی مانند پیاز، کلم بروکلی، سیب یافت می‌شود و برای درمان سرطان سینه استفاده می‌شود و با تأثیر بر سطح استرادیول به دیگر اشکال استروژن، سطح استروژن را کاهش می‌دهد (۲۵). نتایج تحقیقات نشان داد که ترکیبات فلاونوئیدی مانند سیلاندرین و ویسکومیزید A و همچنین مشتقات گلوکوکورونیدی این فلاونوئیدها، به طور مؤثر آنزیم

آنزیم دارند (۲۹)؛ بنابراین، در این مطالعه سعی شده است که میزان فعالیت مهارکنندگی ترکیب مورین و آنالوگهایش (شکل ۱) بر روی آنزیم آروماتاز با استفاده از داکینگ مولکولی مورد ارزیابی قرار گیرد و اثربخشی هر کدام از این ترکیبات در محیط *in Silico* به منظور پیدا کردن یک ترکیب مؤثر در درمان سرطان سینه بررسی شود. با هدف بررسی و شناسایی دقیق مکانیسم اتصال آنالوگهای مورین با اسکلت ساختاری فلاونوئیدی به جایگاه فعال آنزیم، روش داکینگ مولکولی اجرا و نتایج به دست آمده از آن مورد تجزیه و تحلیل و در نهایت پیش بینی خطر سمیت و فعالیت بیولوژیک ترکیبات توسط مرورگر SwissADME، PASS، Swiss Target و Prediction ارزیابی گردید و جهت انجام روش داکینگ مولکولی از نرم افزار MOE-2014 Molecular Operating Environment, استفاده شده است.

اروماتاز را مهار می کنند (۲۶). پراسیتا و همکارانش با استفاده از داکینگ مولکولی نشان دادند که از بین آنالوگهای طبیعی کورکومین مورد مطالعه، اسید فرولیک بهترین تمایل اتصال را با تمام گیرنده‌های اختصاصی سلول سرطان پستان (FGF، MMP9، RNRM1، TGF-beta، DHFR، VEGF و آروماتاز) دارد (۲۷). در مطالعه‌ای، ترکیبات پلی فنولی لیگنان‌ها، فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها و کومسترون اتصال محکمی با آنزیم آروماتاز دارند (۱۷) و در مطالعه دیگری نشان داد که آلکالوئیدهای استروئیدی می‌توانند برهمکنش‌های الکترواستاتیکی مطلوبی با جایگاه فعال آنزیم آروماتاز نشان دهند و شکل و حجم فضایی ترکیبات عامل محدود کننده در اثرات بازدارندگی آنها است (۲۸). متابولیت‌های ثانویه گیاه *macrocephala DC Jurinea* با آنزیم آروماتاز تأثیر متقابل دارند و متابولیت‌های بدون قطعات قند بهترین اتصال را با این

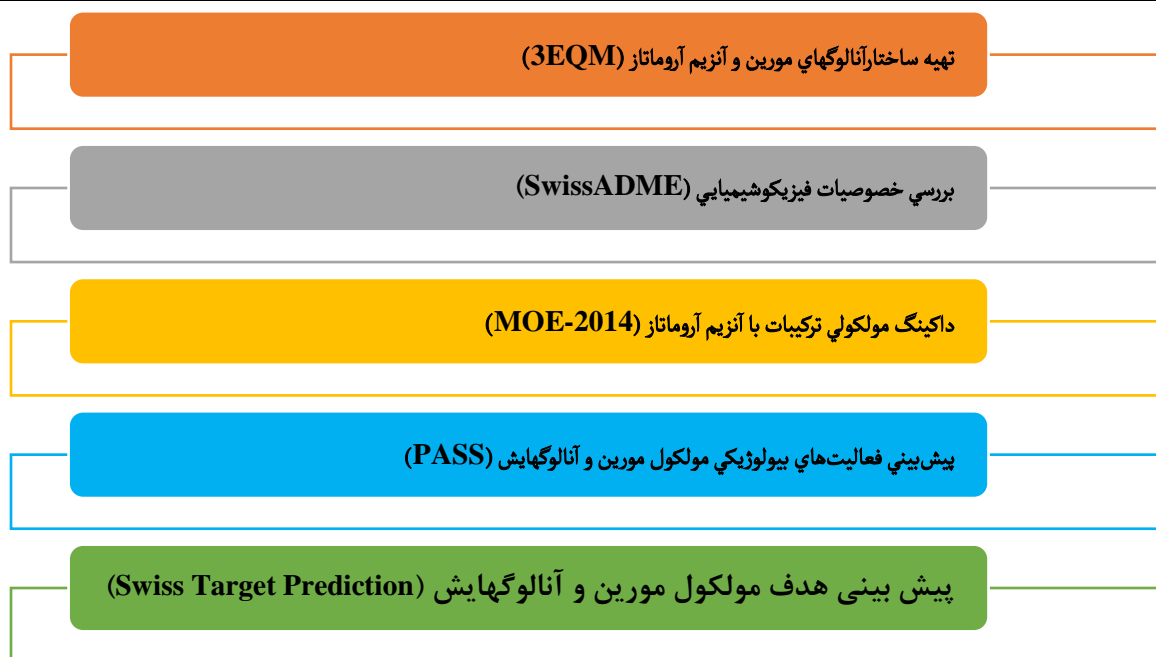


شکل ۱. ساختار اصلی آنالوگ‌های مورین

مواد و روش‌ها

هدف اصلی این مطالعه ارزیابی مورین و آنالوگ‌هایش به عنوان مهارکننده‌های آنزیم آروماتاز در جهت شناسایی دارویی مؤثر به منظور درمان سرطان سینه بود. آنزیم آروماتاز به دلیل نقش مهم آن در سرطان سینه وابسته به هورمون انتخاب گردید. خواص فیزیکوشیمیایی مورین و آنالوگ‌هایش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داکینگ مولکولی تمام ترکیبات مورین با آنزیم آروماتاز انجام شد و

ترکیبات با اثر مهاری بهتر که میل اتصال قوی‌تری برای آروماتاز نشان دادند برای تحقیقات بیشتر توسط PASS، SwissTarget prediction و متابولیسم انتخاب شدند و مورد ارزیابی قرار گرفتند. این مطالعه به صورت *in silico* برای شناسایی ترکیبات ضد آروماتاز بالقوه برای درمان سرطان سینه انجام شد (شکل ۲).



شکل ۲. نمای شماتیکی از رویکرد محاسباتی مورد استفاده برای شناسایی آنالوگ های مورین به عنوان مهارکننده برای آنزیم آروماتاز

آماده سازی پروتئین و لیگاندها
این پژوهش به شیوه توصیفی-تحلیلی انجام شد. ابتدا، از میان ترکیبات مؤثر گیاهان دارویی، ترکیب مورین و آنالوگ هایش (۱۵ ترکیب) که دارای خاصیت ضد سرطانی بودند انتخاب شدند. جهت مقایسه عملکرد ترکیبات مورینی ذکر شده و دستیابی به نتایج قابل اطمینان برهمکنش مولکولی، داروی ضد آروماتاز آناستروزول به عنوان استاندارد مورد مطالعه قرار گرفت. ساختار سه بعدی ترکیبات و داروی استاندارد از پایگاه PubChem به آدرس <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> دریافت شدند (جدول ۱). بهینه سازی ساختارها توسط نرم افزار Hyperchem7 در میدان نیروی مکانیک مولکولی (Molecular Mechanics, MM+) تا زمان به دست آمدن گرادیان ریشه میانگین مربعی کمتر از ۰/۰۱ کیلوکالری بر آنگستروم مول انجام شد. کنفورمسیون نهایی ساختارها با روش نیمه تجربی AM1 محاسبه شد و با استفاده از الگوریتم

Polak-Ribiere از نظر انرژی بهینه شدند. ساختار سه بعدی آنزیم آروماتاز با شماره دسترسی 3EQM با قدرت تفکیک $2/9 \text{ \AA}$ (۳۰) از پایگاه داده پروتئین (Protein Data Bank, PDB) دریافت شد. در طول فرآیند آماده سازی پروتئین با استفاده از نرم افزار MOE-2014 (۲۶) مولکول های آب و لیگاند اصلی آن حذف شدند، در حالی که هیدروژن های قطبی و بارهای گستگیگر (بارهای الکتریکی اتم که به صورت تجربی محاسبه می گردد) به پروتئین اضافه و هیدروژن های غیرقطبی در اتم کربن مجاور ادغام شدند. ساختار پروتئین توسط الگوریتم کمینه سازی انرژی MOE با استفاده از میدان نیروی MMFF94X با روش گرادیان مزدوج به حداقل رسید. سپس، ساختار پروتئین برای مطالعات داکینگ مولکولی ذخیره شد.

بررسی ترکیبات با قانون لیپینسکی (Lipinski) برای ارزیابی اینکه یک ترکیب می تواند خواص دارویی داشته باشد و برای پیش بینی میزان جذب، برای تمام ترکیبات، قانون

لیپینسکی در نظر گرفته می‌شود. قانون لیپینسکی (Lipinski's "rule of five") پیش‌بینی می‌کند که جذب یا نفوذ مناسب در مواردی اتفاق می‌افتد که ترکیب مورد نظر دارای ویژگی‌های مانند وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون، فاکتور چربی دوستی (LogP) کمتر از ۵، تعداد اتم‌های پذیرنده هیدروژن کمتر از ۱۰ و تعداد اتم‌های دهنده هیدروژن کمتر از ۵ باشد؛ لذا ترکیبی که این ویژگی‌های را داشته باشد و از قانون لیپینسکی برخوردار باشد، جذب بیشتر و اثربخشی بیشتری دارد (۳۱)؛ لذا برای بررسی ترکیبات از لحاظ این قانون از پایگاه SwissADME استفاده شد.

پیش‌بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و بیولوژیک ترکیبات مورد بررسی

به‌طور کلی، دارا بودن خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب در کنار اثر بخشی دارویی از شاخص‌های مهم جهت ارزیابی یک مولکول به عنوان یک کاندید دارویی مناسب است؛ لذا در این مطالعه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل حلالیت در آب، مساحت قسمت‌های قطبی مولکول (Topological Polar Surface Area, TPSA)، جذب گوارشی (GI absorption)، میزان نفوذ سد خونی- مغزی و قابلیت مهار سیتوکرومی که در طراحی پیش‌دارو بصورت خوراکی یا تزریق وریدی یا جذب پوستی نقش دارند با استفاده از پایگاه‌های SwissADME بر اساس قانون لیپینسکی، Swiss Target Prediction و PASS-Way2Drug پیش‌بینی شد. سرورهای مذکور نرم‌افزارهای آنلاین هستند که با دریافت اطلاعات مولکول شیمیایی در قالب فایل Structure Data File, SDF یا Simplified molecular-input line-entry system, Smile امکان پیش‌بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی را فراهم می‌آورند (۳۳ و ۳۲).

داکینگ مولکولی

به منظور ارزیابی ترکیب مورین و آنالوگ‌هایش و دارویی استاندارد (آناستروزول) در مهار آنزیم آروماتاز از روش داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار MOE-2014 استفاده شد. در MOE، تمایل اتصال گیرنده-لیگاند با تمام هندسه‌های اتصال ممکن بر اساس یک مقدار عددی به نام S-score اولویت‌بندی می‌شوند. MOE می‌تواند پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش‌های آبگریز، گوگرد-LP، کاتیون- π و قرار گرفتن کمپلکس در معرض حلال را شناسایی کند؛ بنابراین، در این کار، برهمکنش‌های بین ترکیبات و پروتئین گیرنده با تعداد دفعات برهمکنش ۳۰ بر اساس این S-score پیش‌بینی می‌شوند. در طول فرایند شبیه‌سازی داکینگ مولکولی، پروتئین آروماتاز به عنوان یک ساختار صلب در نظر گرفته شد، در حالی که لیگاندها کاملاً انعطاف پذیر بودند. با استفاده از ماژول مکان‌یاب کاشته شده در MOE، محل فعال پروتئین آروماتاز تعیین شد تا اطلاعاتی از نحوه برهمکنش پروتئین-لیگاند و انرژی آزاد اتصال به دست آید و محل فعال با حداقل یک اتم در فاصله ۴/۵ Å در لیگاند در ساختار کریستالی آروماتاز تعریف شد. داکینگ مولکولی با استفاده از الگوریتم مکان‌یابی تطبیق مثلث در ترکیب با تابع امتیازدهی London dG برای اختصاص انرژی‌های اتصال آزاد نظری مجتمع‌های پروتئین-لیگاند و میدان نیرو به عنوان روش پالایش انجام شد. بررسی‌های کمی از حیث انرژی پیوندی توسط بهترین کنفورماسیون ترکیبات با انرژی‌های اتصال (S-score kcal/mol) ارزیابی شدند و بررسی‌های کیفی از حیث برهمکنش بین لیگاندها و پروتئین شامل برهمکنش‌های هیدروژنی، هیدروفوبی و π - π با آمینواسیدهای موجود در پاکت اتصال پروتئین توسط ماژول LigX در نرم‌افزار MOE آنالیز شد. خاطر نشان می‌شود که در کنار محیط‌های *in vivo* و *in vitro* محیط *in silico* به عنوان

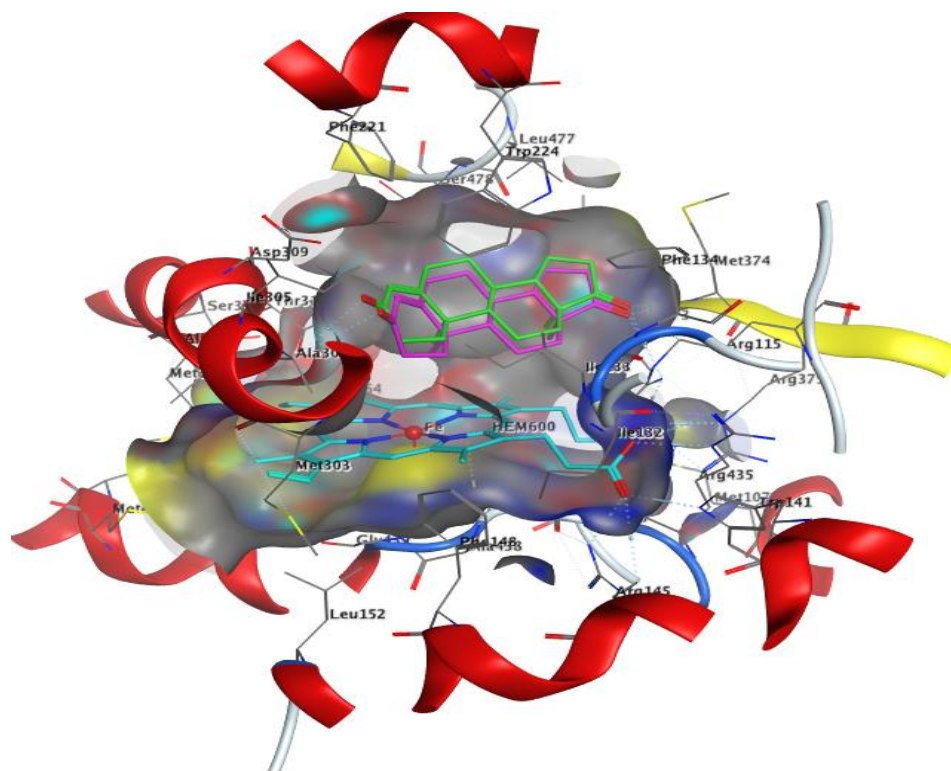
ساختار داک شده پس از قرار دادن آن بر روی کمپلکس اصلی متبلور شده دارای انحراف میانگین ریشه‌ی دوم (Root-Mean-Square-Deviation, RMSD)، 0.61 \AA بود که نشان‌دهنده اعتبار روش است. در اینجا، آمینواسیدهایی که در مجاورت 6.5 \AA از مهارکننده آندروستندیون نشان داده شده‌اند، به عنوان باقی‌مانده‌های اتصال اصلی در نظر گرفته می‌شوند. همچنین، آمینواسیدهایی مانند Arg115، Arg145، Met374، Arg435، Leu372، Val370، Gly439، Ser478، Cys437، Ala438، Val373، Met303، Thr310 و Met311 در پاکت کاتالیتیکی آروماتاز قرار دارند.

یک محیط کارآمد در خصوص تجزیه و تحلیل جزئیات فرایندهای پیچیده زیستی محسوب می‌شود.

یافته‌ها

داکینگ مولکولی

در ابتدا به منظور اعتبار سنجی عملیات داکینگ، لیگاند آندروستندیون از جایگاه فعال آنزیم آروماتاز (3EQM) برداشته شد و پس از انجام داکینگ مورد مقایسه قرار گرفت. پروتکل داکینگ با داکینگ مجدد لیگاند آندروستندیون در ساختار آروماتاز تأیید شد. در شکل ۳ می‌توان مشاهده کرد که مولکول آندروستندیون به موقعیت‌های مشابه آروماتاز در مقایسه با شکل کریستالوگرافی اصلی خود متصل شده است و



شکل ۳. اعتبار سنجی مجدد برای آندروستندیون. مهارکننده کریستالوگرافی (سبز)، مهارکننده مجدد داک شده آندروستندیون (ارغوانی) و ساختار هم (آبی روشن) در داخل جایگاه اتصال 3EQM

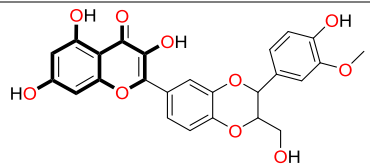
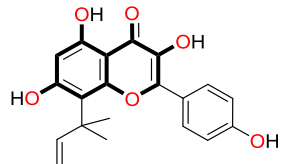
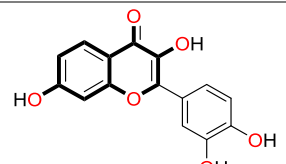
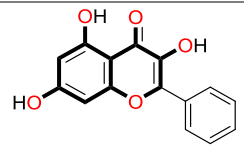
انرژی‌های مهارى ۱۳/۹۰-، ۱۴/۷۹-، ۱۴/۳۳- و ۱۴/۷۲- کیلوکالری برمول نسبت به داروی استاندارد بکار رفته بر روی آروماتاز قوی‌تر است. همچنین، دیگر آنالوگ‌های مورین با انرژی‌های مهارى ۱۱/۸۶- تا ۱۳/۸۸- کیلوکالری برمول، اثر مهارى بهتری نسبت به داروی استاندارد دارند؛ بنابراین می‌توان گفت اثر مهارى آنالوگ‌های مورین بر روی آروماتاز نسبت به داروی استاندارد بیشتر می‌باشد.

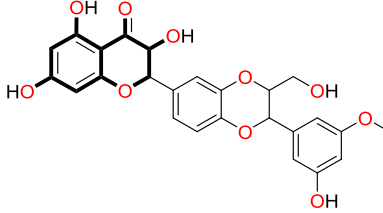
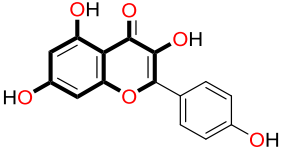
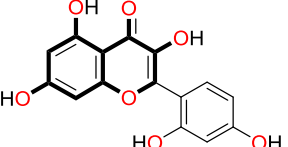
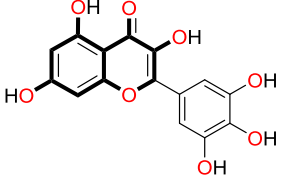
پس از اعتبار سنجی داکینگ، ساختار سه‌بعدی آنالوگ‌های مورین و داروی استاندارد در جایگاه فعال آنزیم آروماتاز داک شدند. نتایج به دست آمده از داکینگ مولکولی میان آنزیم آروماتاز با هر کدام از آنالوگ‌های مورین و داروی استاندارد در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود اکثر آنالوگ‌های مورین، با توجه به انرژی حاصل از برهمکنش لیگاند-گیرنده، اتصال مناسبی با آنزیم مذکور دارند و در جدول مهم‌ترین آمینواسیدهای درگیر در جایگاه فعال آنزیم و کلیه برهمکنش‌های لیگاندها شامل پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش هیدروفوبی و arene-H ذکر شده است.

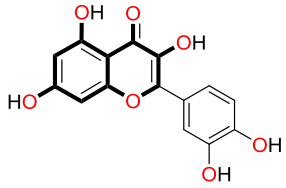
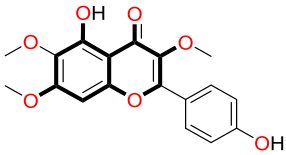
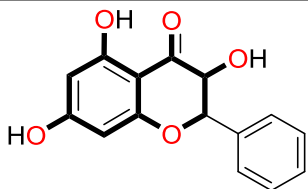
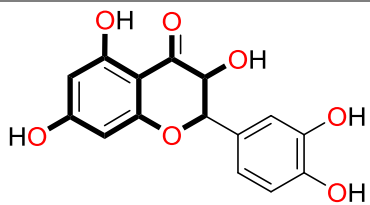
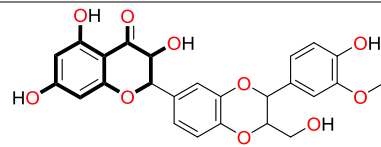
پس از اعتبار سنجی پروتکل داکینگ، بررسی نتایج داکینگ آنالوگ‌های مورین نشان داد که تمام آنالوگ‌ها، فضای مشابه با لیگاند آندروستندیون درون جایگاه فعال آروماتاز اشغال می‌کنند. بر اساس نتایج جدول ۱ و شکل ۴، دو معیار مهم در تعیین بهترین حالت داک شده، کمترین (منفی‌ترین) انرژی اتصال آزاد تخمین زده شده و همچنین بیشترین برهمکنش-های مناسب با آمینو اسیدهای اصلی جایگاه فعال آروماتاز می‌باشند. نتایج حاصل از بررسی داروی استاندارد بکار رفته به عنوان کنترل مثبت در جدول ۱، حاکی از برهمکنش آناستروزول با انرژی مهارى ۱۰/۳۸- کیلوکالری برمول با جایگاه فعال آنزیم آروماتاز بود. داروی آناستروزول با آمینواسیدهای Arg115، Met374، Thr310 و Cys437 پیوند هیدروژنی و با آمینواسیدهای Val370، Phe134، Leu372، Trp224، Leu477، Val373، Phe430، Ala306 و Ile133 برهمکنش هیدروفوبی برقرار کرده است (شکل ۴. الف).

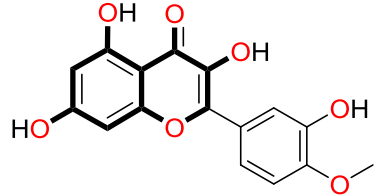
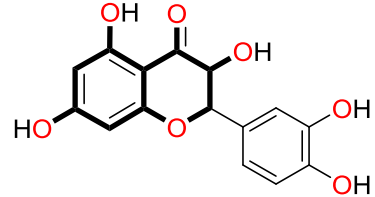
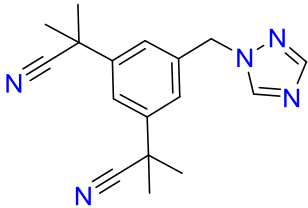
بر اساس جدول ۳، از میان ۱۵ آنالوگ مورین، اثر مهارى ترکیبات گالانجین، مورین، کوئرستین و رامنتین به ترتیب با

جدول ۱. انرژی اتصال و برهمکنش‌های موجود بین ترکیبات مورد مطالعه و آمینواسیدهای جایگاه فعال آنزیم آروماتاز

برهمکنش arene-H	برهمکنش‌های هیدروفوب	پیوند هیدروژنی	انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)	نام ترکیب	ساختار
Val370	Met364, Ile133, Val369, Glu302, Phe148, Ala306, Met303, Ala438, Thr310, Pro429, Leu152	Arg115, Ser314, Cys437	-۱۲/۴۰	دهیدروسیلیبین	
Cys437	Met437, Val370, Pro429, Met364, Leu477, Trp224, Phe134, Leu372, Ser314	Arg115, Ser478	-۱۲/۸۸	۸-(۱،۱)-دی متیل آلیل-کمپفرید	
Val370, Cys437	Met374, Leu372, Phe430, Met364, Val373, Phe134, Leu477, Trp224	Arg115, Pro429	-۱۳/۰۷	فیستین	
Val370, Cys437	Val373, Pro429, Leu372, Phe430, Leu477, Phe134, Trp224	Arg115, Met374,	-۱۳/۹۰	گالانجین	

Thr310	Ala443, Met446, Phe430, Ala306, Trp224, Val373, Met303, Val370, Ile442, Leu477	Met374, Cys437, Met311, Leu372	-۱۲/۳۸	ایزوسیلیبین C	
Cys437	Met374, Phe134, Ile133, Val373, Leu152, ala306, Leu372, Ala307	Arg115, Ala438, Thr310	-۱۳/۸۸	کامپفرول	
Thr310	Met374, Leu372, Val370, Ala306, Trp224, Val373, Phe134, Ile133, Cys437	Arg115, Leu477, Ser478	-۱۴/۷۹	مورین	
Val370	Met374, Phe430, Met364, Val373, Met107, Phe432	Arg115, Pro429, Arg435	-۱۳/۷۹	میریستین	

Val370	Leu477, Leu372, Val373, Trp224, Phe221, Ile305, Phe134, Ile133, Phe430, Ala306,	Arg115, Met374, Asp309	-۱۴/۳۳	کوئرستین	
Cys437	Ala443, Met447, Ala306, Met364, Arg375, Pro429, Val370, Phe430, Val373, Gly436, Ser314	Arg115, Met311	-۱۳/۲۴	پندولتین	
Cys437	Val373, Ile398, Leu372, Phe134, Val370, Arg435, Phe430, Trp224, Gly436, Thr310, Gly431	Arg115, Pro429	-۱۱/۸۶	پینو بانکسین	
Val370	Val373, Phe134, Ile133, Met364, Leu477, Phe430, Trp224, Phe221, Thr310	Arg115, Met374, Pro429	-۱۴/۷۲	رامنتین	
-	Leu477, Val370, Ala438, Met311, Phe203, Met446, Leu372, Phe134, Met374, Val373, Ile133, Leu152	Arg115, Thr310, Cys437, Met303	-۱۳/۸۵	سیلیمارین	

Val370	Ile132, Met374, Pro429, ala438, Ile133, Phe430, Met364, Phe148, Met311, Ser314, Met447	Arg115, Thr310	-۱۳/۰۲	تاماریکستین	
Val370	Phe134, Trp224, Leu372, Ala438, Ile133, Val373, Phe430, Cys437, Leu477, Phe221, Thr310, Ser478	Arg115, Met374	-۱۳/۱۵	تاکسیفولین	
-	Val373, Ile133, Val370, Phe134, Leu372, Trp224, Leu477, Phe430, Ala306, Gly436, Arg435	Arg115, Met374, Cys437, Thr310	-۱۰/۳۸	آناستروزول	

تشکیل پیوند هیدروژنی توسط استخلاف‌های هیدروکسیل کربن‌های ۵ و ۷ و گروه کربونیل کربن ۴ حلقه فلاونوئید با آمینواسیدهای Arg115، Leu477 و Ser478 است. ترکیب مورین نیز مشابه گالانجین دارای برهمکنش arene-H بین حلقه فنول ترکیب و آمینواسید Thr310 است (شکل ۴. ج). یکی از تفاوت‌های مهم این دو ترکیب در استخلاف‌های حلقه فلاونوئید است. در مورین، حلقه فنیل در موقعیت ۲ هسته فلاونوئید، دارای دو استخلاف هیدروکسیل در موقعیت‌های ۲' و ۴' است، درحالی‌که در ترکیب گالانجین، حلقه فنیل فاقد استخلاف هیدروکسیل است؛ بنابراین استخلاف‌های هیدروکسیل حلقه فنیل در موقعیت ۲ در مورین بر روی جهت-گیری فضایی ترکیب در جایگاه اتصال آنزیم مؤثر است و احتمالاً برای سیستم مفیداست و این امر می‌تواند یکی از دلایل افزایش انرژی اتصال و افزایش اثر ضد سرطانی این ترکیب نسبت به گالانجین شود.

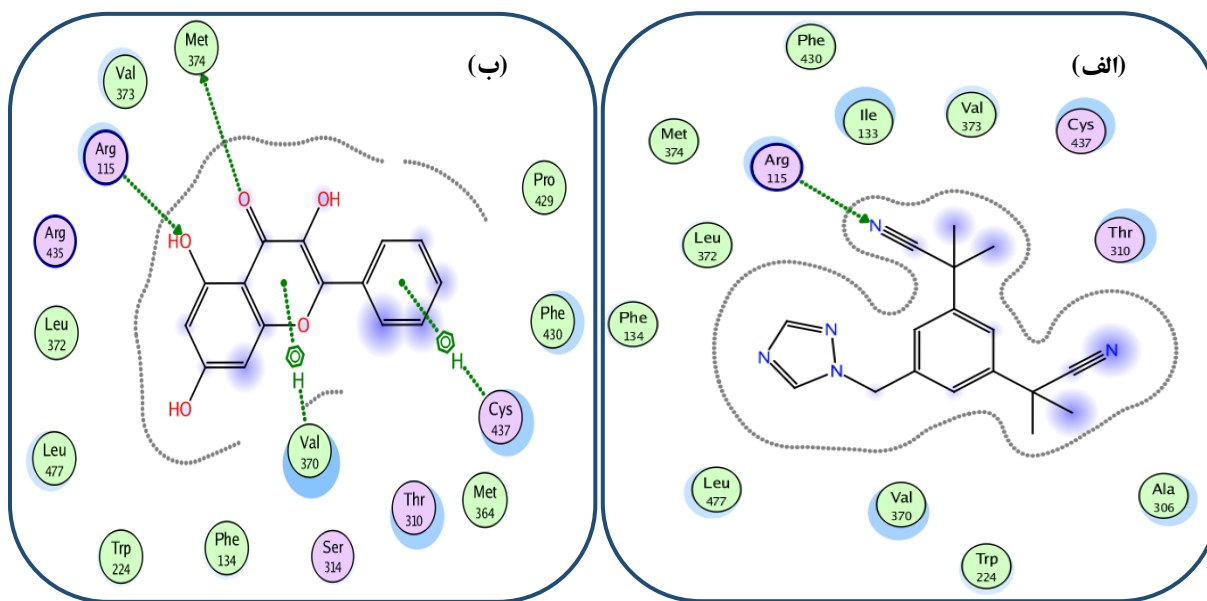
برای ترکیب کوئرستین، نتایج داکینگ نشان داد که برهمکنش‌های عمده این ترکیب مشابه گالانجین و مورین از نوع برهمکنش‌های هیدروفوب و پیوند هیدروژنی می‌باشند. کوئرستین توانایی تشکیل ۳ پیوند هیدروژنی توسط استخلاف‌های هیدروکسیل کربن‌های ۵ و ۴' حلقه‌های فنول و گروه کربونیل کربن ۴ حلقه فلاونوئید با آمینواسیدهای Met374، Asp309 و Arg115 را دارد (شکل ۴. د). همچنین، کوئرستین از طریق حلقه فنول کربن ۲ حلقه فلاونوئید با آمینو اسید Val370 برهمکنش arene-H برقرار کرده است. این ترکیب به دلیل وجود حلقه فنول و استخلاف‌های هیدروکسیل در ساختار خود در مقایسه با گالانجین اثر ضد آروماتاز بهتری را نشان می‌دهد و دارای ساختار قابل انعطاف‌پذیر است، همچنین مشابه با ساختار مورین، برهمکنش‌های مشابه با آمینواسیدهای جایگاه فعال دارد و انرژی اتصال مناسب‌تری نشان می‌دهد که احتمالاً کانونرمر مناسب در فضای سه بعدی

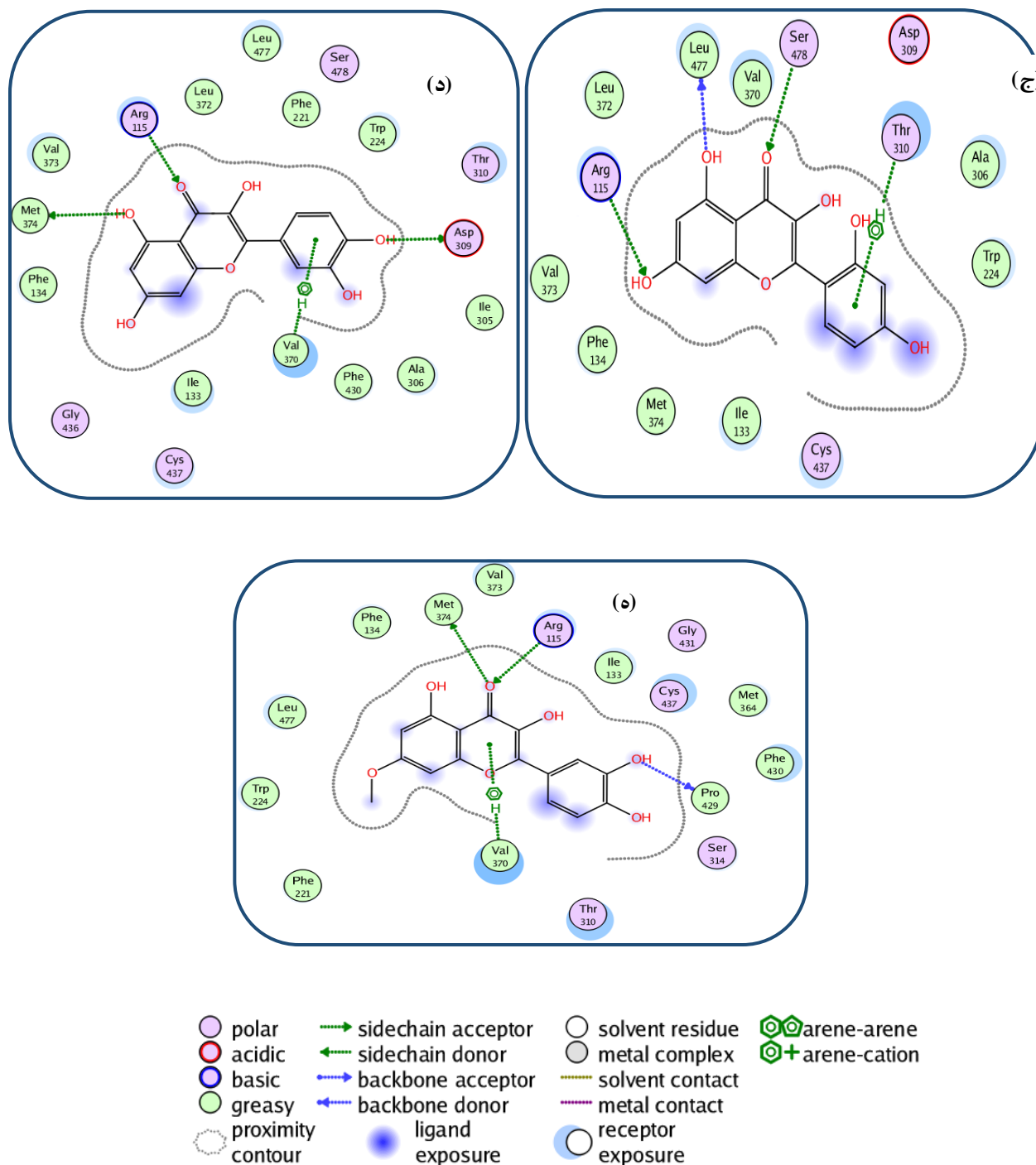
مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که در میان آنالوگ‌های مورین، ترکیب گالانجین به آنزیم آروماتاز با پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوبی متصل می‌گردد. استخلاف هیدروکسیل در کربن موقعیت ۵ و گروه کربونیل کربن موقعیت ۴ حلقه فلاونوئید با آمینواسیدهای Arg115 و Met374 پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند و این گروه‌های هیدروکسیل و کربونیل باعث افزایش میزان حلالیت این ترکیب می‌شوند و در صورت مصرف خوراکی برای انسان جذب گوارشی خوبی نشان می‌دهد. علاوه بر این، ترکیب گالانجین قادر به ایجاد برهمکنش arene-H است که بین حلقه فلاونوئیدی و فنیل متصل به موقعیت ۲ حلقه فلاونوئیدی ترکیب با آمینواسیدهای Val370 و Cys437 ایجاد می‌گردند (شکل ۴. ب). لازم به ذکر است که این حلقه فنیل و هسته فلاونوئیدی باعث افزایش لیوفیلیسیته ترکیب می‌شود و لیوفیلیسیته ترکیب گالانجین (LogP برابر ۱/۹۹) می‌تواند روی برهمکنش‌های هیدروفوبی با آروماتاز تأثیر داشته باشد. همچنین، حلقه فلاونوئیدی و فنیل ترکیب گالانجین با آمینواسیدهای Val373، Pro429، Phe430، Leu372، Met364، Trp224، Phe134 و Leu477 برهمکنش‌های هیدروفوبی تشکیل می‌دهد.

ترکیب مورین به دلیل دارا بودن بخش‌های هیدروفیل (استخلاف هیدروکسیل) و هیدروفوب (حلقه آروماتیک) توانایی تشکیل پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوبی با آمینواسیدهای جایگاه فعال آنزیم را دارد و یک ترکیب تقریباً هیدروفیل با LogP برابر ۱/۳۰ است. مقدار لیوفیلیسیته این ترکیب کمتر از لیوفیلیسیته گالانجین است؛ بنابراین میزان حلالیت این ترکیب بیشتر است و جذب گوارشی بهتری را نشان می‌دهد. مورین، در مقایسه با سایر آنالوگ‌های مورینی و داروی استاندارد اثر ضد آروماتاز و انرژی اتصال قوی‌تری را نشان می‌دهد. این ترکیب قادر به

جایگاه فعال، باعث افزایش برهمکنش‌ها شده است. مقدار لیوفیلیسیته کوئرستین (LogP برابر ۱/۲۳) تقریباً برابر با لیوفیلیسیته مورین است و به دلیل وجود استخلاف هیدروکسیل و ایجاد کانفورمر مناسب در جایگاه فعال انرژی اتصال بیشتری نسبت به گالانجین نشان می‌دهد. نتایج داکینگ خاصی از این ترکیبات موجب ایجاد اتصالات هیدروفوبی یا پیوند هیدروژنی بین ترکیبات و گیرنده می‌شوند که این امر قدرت ترکیبات را افزایش می‌دهد. بررسی ساختار این آنالوگ‌ها در پروتئین آروماتاز، نشان داد که وجود حلقه‌های آروماتیک و استخلاف‌های هیدروکسیل باعث افزایش قدرت ضد سرطانی ترکیب می‌شود.

نتایج داکینگ مولکولی و اثر فیزیکوشیمیایی و فارماکوکینتیک ترکیب رامنتین همبستگی خوبی با یکدیگر دارند و هر دو مقادیر خوبی را نشان می‌دهند. این ترکیب علاوه بر برهمکنش‌های هیدروفوب با آمینواسیدهای Val373، Phe410، Trp224، Phe134 و Leu477، سه پیوند هیدروژنی از طریق گروه کربونیل و استخلاف هیدروکسیل به ترتیب با آمینواسیدهای Arg115، Met374 و Pro429 تشکیل می‌دهد. این ترکیب مشابه ترکیبات مورین و کوئرستین، احتمالاً با هیدروفیلیسیته مناسب





شکل ۴. نمایش برهمکنش‌های مجموعه لیگاند-پروتئین به صورت دو بعدی، (الف) آناستروزول، (ب) گالانجین، (ج) مورین، (د) کوئرستین و (ه) رامنتین

توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی پارامتر دیگری برای نفوذپذیری دارو است که برای جذب ایده آل تعداد دهندگان پیوند هیدروژنی و پذیرندگان پیوند هیدروژنی باید به ترتیب کمتر از ۵ و ۱۰ باشد. نتایج به دست آمده از قانون لیپینسکی با توجه به پایگاه SwissADME در جدول ۲ آورده شده است. طبق این نتایج، تمام آنالوگ‌های مورین از قانون لیپینسکی پیروی می‌کنند.

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پارامترهای فارماکوکینتیک بر اساس قانون لیپینسکی و تعریف قانون ۵ تایی، پیش بینی قابل جذب بودن ترکیبات از راه خوراکی بر اساس وزن مولکولی، فاکتور چربی دوستی و تعداد اتم‌های دهنده و پذیرنده پیوند هیدروژنی ارائه می‌شود. $LogP$ ، میزان لیوفیلیسیته ماده را نشان می‌دهد که می‌بایست بین ۱ الی ۵ باشد، پس، هر اندازه میزان آن از ۵ بزرگتر باشد میزان چربی دوستی ماده بیشتر و جذب گوارشی آن کمتر خواهد بود.

جدول ۲. پارامترهای لیپینسکی داروهای استاندارد و آنالوگ‌های مورین

نام ترکیب	وزن مولکولی ^۱	پذیرندگان پیوند هیدروژنی ^۲	دهندگان پیوند هیدروژنی ^۳	$LogP^4$	Lipinski
دهیدروسیلیبین	۴۸۰/۴۲	۱۰	۵	۲/۳۳	بله
۸-(۱،۱)-دی متیل آلپیل-کمپفاید	۳۶۸/۳۸	۶	۳	۳/۵۶	بله
فیستین	۲۸۶/۲۴	۶	۴	۱/۵۵	بله
گالانجین	۲۷۰/۲۴	۵	۳	۱/۹۹	بله
ایزوسیلیبین C	۴۸۲/۴۴	۱۰	۵	۱/۶۹	بله
کامپفرول	۲۸۶/۲۴	۶	۴	۱/۵۸	بله
مورین	۳۰۲/۲۴	۷	۵	۱/۲۰	بله
میربستین	۳۱۸/۲۴	۸	۶	۰/۷۹	بله
کوئرستین	۳۰۲/۲۴	۷	۵	۱/۲۳	بله
پندولتین	۳۴۴/۳۲	۷	۲	۲/۴۳	بله
پینو بانکسین	۲۷۲/۲۵	۵	۳	۱/۳۹	بله
رامنتین	۳۱۶/۲۶	۷	۴	۱/۶۳	بله
سیلیمارین	۴۸۲/۴۴	۱۰	۵	۱/۵۹	بله
تاماریکستین	۳۱۶/۲۶	۷	۴	۱/۸۵	بله
تاکسیفولین	۳۰۴/۲۵	۷	۵	۰/۶۳	بله
آناستروزول	۲۹۳/۳۷	۴	۴	۲/۳۵	بله

^۱ وزن مولکولی ≥ 500

^۲ پذیرندگان پیوند هیدروژنی ≥ 10

^۳ دهندگان پیوند هیدروژنی ≥ 5

^۴ $LogP \geq 5$

داروی آناستروزول دارای حلالیت و نفوذپذیری مناسب و جذب گوارشی بالا است و قابلیت مصرف خوراکی دارد. همچنین، مشاهده شد که از میان مورین و آنالوگ‌هایش، دهیدروسیلیبن، ایزوسیلیبن C، میریستین و سیلیمارین با داشتن حلالیت نسبی، نفوذپذیری نامناسب و جذب گوارشی کم، قابلیت مصرف خوراکی نداشته و می‌بایست به صورت تزریق وریدی استفاده شوند؛ اما دیگر ترکیبات بررسی شده در جدول با داشتن نفوذپذیری مناسب و جذب گوارشی بالا، قابلیت مصرف خوراکی دارند. به خاطر ایمن بودن بیشتر، میزان نفوذ سد خونی-مغزی، فعالیت سیستم عصبی-مرکزی و خطر سمیت ترکیبات نیز محاسبه شد. مغز توسط سد خونی-مغزی از گردش سیستمیک محافظت می‌کند. همه آنالوگ‌های مورین برخلاف داروی لتروزول بر سیستم عصبی-مرکزی غیرفعال بودند؛ لذا اختلالی روی سیستم عصبی-مرکزی ایجاد نمی‌کنند و محدوده نرمالی را نشان دادند، همچنین پیش‌بینی خطر سمیت ترکیبات نشان داد که آنالوگ‌های مورین دارای خطرات سمیت جهش‌زا و تومورزا، سمیت کبدی و حساسیت پوستی نمی‌باشند؛ بنابراین بیشتر ترکیبات طبیعی مورینی انتخاب شده، خواص فارماکوکینتیکی و فیزیکوشیمیایی مناسبی را از خود نشان دادند.

همچنین، آنالوگ‌های مورین از لحاظ خصوصیات فیزیکوشیمیایی دیگر و پارامترهای فارماکوکینتیک مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۳). LogS میزان حلالیت ماده را نشان می‌دهد که میزان بالای صفر آن، نشان دهنده حلالیت بالا و میزان کمتر از ۱۰-، نشان‌دهنده نامحلول بودن ماده مورد نظر است. فاکتور مهم دیگری که نقش مستقیمی در نفوذپذیری ترکیبات زیست فعال دارد مساحت‌های قطبی مولکول (TPSA) است. بر اساس مطالعات انجام شده، نفوذپذیری ترکیبات با افزایش جرم ماده و کاهش Polar Surface Area, PSA بیشتر می‌شود. ترکیباتی که PSA بزرگتر از 140 \AA^2 دارند فاقد نفوذپذیری مناسب می‌باشند. سیتوکروم‌ها از آنزیم‌های مهم در بدن هستند که به‌طور عمده در کبد و روده یافت می‌شوند و مولکول‌های آلی خارجی مانند سموم یا داروها را اکسید می‌کنند تا بتوانند از بدن خارج شوند؛ بنابراین بررسی این سیتوکروم‌ها در جذب و اثر بخشی دارو بسیار مؤثر است و چنانچه ترکیب کاندید شده، مهارکننده این سیتوکروم‌ها نباشد می‌توان عنوان کرد که دارو قابلیت جذب گوارشی خوبی دارد و به‌صورت خوراکی قابل مصرف است. در نهایت برای اثر بخشی یک دارو به صورت خوراکی، تزریق وریدی یا جذب پوستی باید برآیندی از فاکتورهای ذکر شده را در نظر گرفت. بر اساس جدول ۳،

جدول ۳. بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی داروهای استاندارد و آنالوگ‌های مورین مورد مطالعه

نام ترکیب	LogS _۱	TPSA ^۲	جذب گوارشی	BBB permeant	مهار کننده سیتوکروم CYP1A2	مهار کننده سیتوکروم CYP2C19	مهار کننده سیتوکروم CYP2C9	مهار کننده سیتوکروم CYP2D6	مهار کننده سیتوکروم CYP3A4	AMES toxicity
دهیدرو سیلیبن	-۴/۹۹	۱۵۹/۰۵	پایین	خیر	خیر	خیر	بله	خیر	بله	خیر
دی متیل آلیل-کمپفید	-۵/۳۲	۱۰۰/۱۳	بالا	خیر	خیر	خیر	بله	خیر	خیر	خیر

فیستین	-۳/۳۵	۱۱۱/۱۳	بالا	خیر	بله	خیر	خیر	بله	بله	خیر
گالانجین	-۳/۴۶	۹۰/۹۰	بالا	خیر	بله	خیر	خیر	بله	بله	خیر
ایزوسیلیب C _n	-۴/۴۸	۱۵۵/۱۴	پایین	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	بله	خیر
کامپفرول	-۳/۳۱	۱۱۱/۱۳	بالا	خیر	بله	خیر	خیر	بله	بله	خیر
مورین	-۳/۱۶	۱۳۱/۳۶	بالا	خیر	بله	خیر	خیر	بله	بله	خیر
میرستین	۳/۰۱	۱۵۱/۵۹	پایین	خیر	بله	خیر	خیر	بله	بله	خیر
کوئرستین	-۳/۱۶	۱۳۱/۳۶	بالا	خیر	بله	خیر	خیر	بله	بله	خیر
پندولتین	-۴/۱۶	۹۸/۳۶	بالا	خیر	بله	خیر	بله	بله	بله	خیر
پینو بانکسین	-۲/۹۵	۸۶/۹۹	بالا	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
رامنتین	-۳/۳۶	۱۲۰/۳۶	بالا	خیر	بله	خیر	خیر	بله	بله	خیر
سیلیمارین	-۴/۱۴	۱۵۵/۱۴	پایین	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	بله	خیر
تاماریکس تین	-۴/۰۴	۱۲۰/۳۶	بله	خیر	بله	خیر	خیر	بله	بله	خیر
تاکسیفول ن	-۲/۶۶	۱۲۷/۴۵	بالا	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
آناستروزو ل	-۳/۰۴	۷۸/۲۹	بالا	بله	خیر	خیر	خیر	بله	خیر	بله

$$\text{LogS}^1 (10^{-10} \text{ تا } 10^{-1})$$

$$\text{TPSA}^2 \geq 140 \text{ \AA}^2$$

Pi) و احتمال غیرفعال بودن (Prediction of activity, Pa) و احتمال غیرفعال بودن (Probable inactivity, Pi) می‌دهد. Pa بالاتر به این معنی است که فعالیت بیولوژیکی احتمال بیشتری برای یک ترکیب دارد. علاوه بر این، محققان طیف‌های فعالیت بیولوژیکی ترکیبات گالانجین، مورین، کوئرستین و رامنتین را شناسایی کردند که

بررسی خصوصیات بیولوژی ترکیب مورین و آنالوگ‌هایش مطالعات طراحی دارو، PASS را به عنوان یک ابزار محبوب استفاده شده در تقریباً هر صنعت دارویی با توجه به تجزیه و تحلیل رابطه ساختار-فعالیت در نظر گرفته‌اند. امتیاز پیش‌بینی فعالیت‌های بیولوژیکی را بر اساس نسبت احتمال فعال بودن

بر اساس ساختار فلاونوئیدی ترکیبات مربوطه است که با ضریب پیش بینی متوسط برابر با $0/80$ (Pa در محدوده $0/175$ تا $0/952$ است، هنگامی که $Pa > Pi$) برای این ترکیبات نشان داده شده است.

در پایگاه داده PASS ذخیره شده اند. جدول ۴ نتایج پیش بینی دوازده فعالیت بیولوژیکی را برای آنالوگ های مورینی انتخاب شده نشان می دهد. شایان ذکر است، نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده کاربرد عمده طرح PASS برای پیش بینی فعالیت های بیولوژیکی گالانجین، مورین، کوئرستین و رامنتین

جدول ۴. نتایج پیش بینی PASS از فعالیت های بیولوژیکی ترکیبات گالانجین، مورین، کوئرستین و رامنتین

ردیف	-	گالانجین	مورین	کوئرستین	رامنتین
	فعالیت بیولوژیک	Pa	Pi	Pa	Pi
۱	Antimutagenic	0/947	0/001	0/940	0/001
۲	Antineoplastic	0/796	0/012	0/787	0/014
۳	Apoptosis agonist	0/886	0/005	0/877	0/005
۴	Aromatase inhibitor	0/201	0/009	0/175	0/009
۵	Alopecia treatment	0/566	0/028	0/571	0/111
۶	Immunosuppressant	0/373	0/073	0/357	0/082
۷	Ovulation inhibitor	0/474	0/072	0/658	0/034
۸	Antiseborrheic	0/852	0/010	0/844	0/022
۹	Anticarcinogenic	0/709	0/008	0/703	0/007
۱۰	Antiinflammatory	0/680	0/018	0/689	0/020
۱۱	Chemoprotective	0/681	0/004	0/676	0/004
۱۲	Hepatoprotectant	0/664	0/008	0/662	0/007

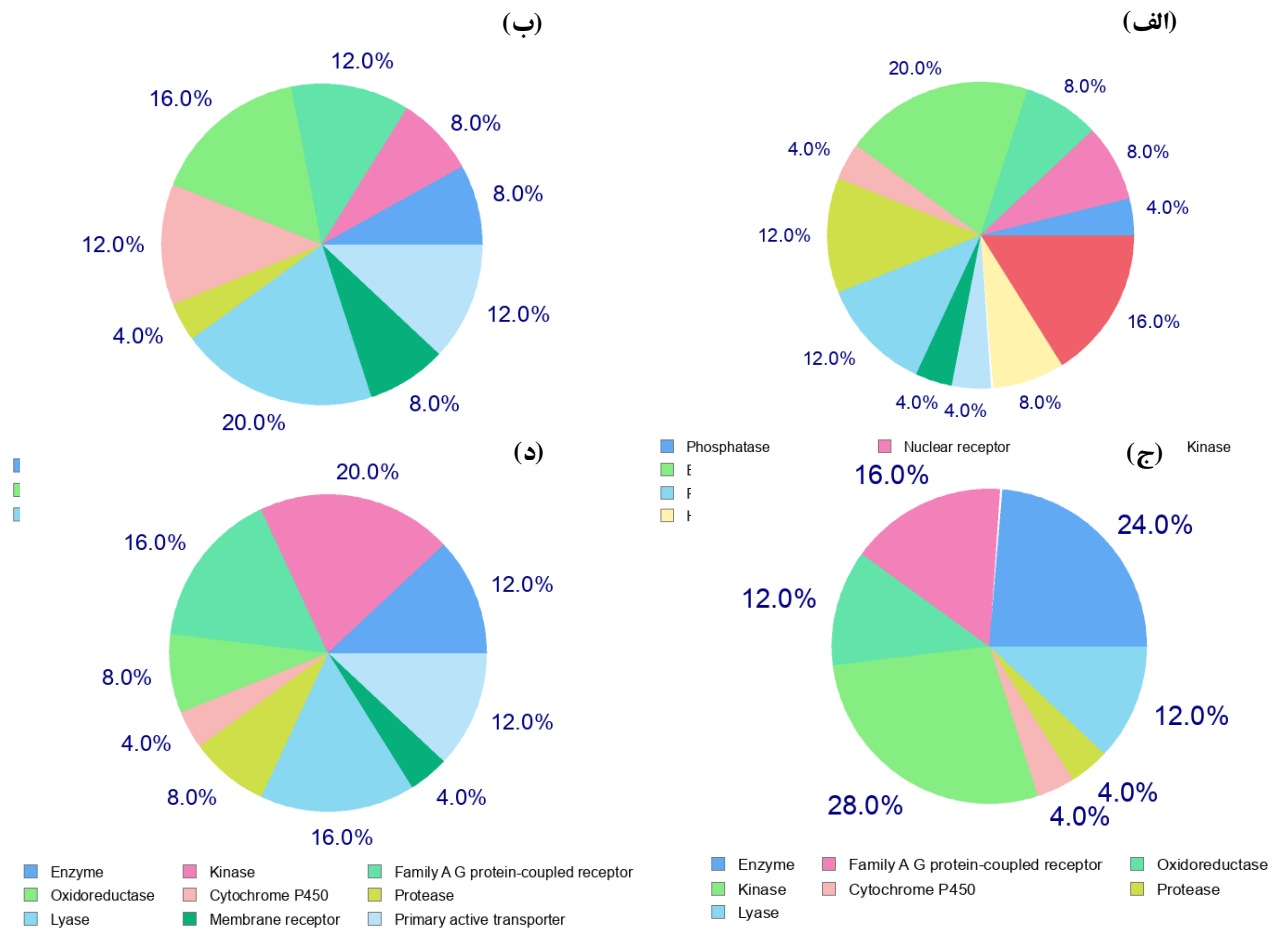
پیش بینی هدف

نشان داد که پروتازها، کینازها، گیرنده های جفت شده با پروتئین خانواده A، آنزیم ها، اکسیدوردوکتازها، سیتوکروم P450، ناقل فعال اولیه و لیازها اهداف اصلی پیش بینی شده برای همه ترکیبات پیشنهادی بودند. همچنین نمودار دایره ای گالانجین، ۸ درصد هیدرولاز و ۸ درصد گیرنده هسته ای را پیش بینی کرد. برای مورین، نمودار دایره ای ۸ درصد

مطالعات هدف مولکولی برای یافتن عوارض جانبی فنوتیپی یا واکنش متقابل بالقوه ناشی از عمل گالانجین، مورین، کوئرستین و رامنتین بر روی پروتئین ها به عنوان بهترین آنالوگ های مورینی مهم هستند. شکل ۵، درصد زیست فعالی آنالوگ های با اثر مهاری بهتر را با توجه به اهداف پروتئینی انتخاب شده نشان می دهد. تجزیه و تحلیل نمودارهای دایره ای

سیتوکروم P450، آنزیم‌ها و لیازها هستند که واکنش دارویی را بر این اساس تحریک می‌کنند. همچنین، این تجزیه و تحلیل توضیحی برای استفاده گالانجین، مورین، کوئرستین و رامنتین به عنوان مهارکننده‌های آروماتاز ارائه می‌کند.

هیدرولاز و گیرنده هسته‌ای و ۴ درصد فسفاتاز، ناقل الکتروشیمی و فاکتور رونویسی را نشان داد و برای رامنتین، نمودار دایره ای ۴ درصد گیرنده غشایی را پیش بینی کرد. مکان‌های احتمالی هدف که ممکن است آنالوگ‌های مورین انتخاب شده به آن‌ها متصل شوند، اکسیدوردوکتاز، کیناز،



شکل ۵. ۲۵ هدف پیش‌بینی شده برای ترکیبات (الف) گالانجین، (ب) مورین، (ج) کوئرستین و (د) رامنتین

نقش دارد. سرطان سینه وابسته به هورمون در زنان یائسه را می‌توان با مهار بیوسنتز استروژن با کمک مهارکننده‌های آروماتاز درمان کرد. در این مطالعه، مکانیسم‌های آنالوگ‌های مورین بر روی آنزیم آروماتاز و نحوه برهمکنش این ترکیبات

بحث
آروماتاز یک آنزیم حیاتی برای کاتالیز واکنش آروماتیزاسیون در مرحله آخر و محدود کننده سرعت است که در تبدیل سوبستراهای آندروژنی به یک بستر استروژنی

Arg115، Thr310 و Ala306 برهمکنش‌های مؤثری دارد (۳۴). در تحقیق Rampogu و همکاران (۲۰۱۹) خاصیت ضد سرطانی ترکیبات طبیعی آلکالوئیدی، کومارینی، فلاونوئیدی و AfroDB بر روی آنزیم آروماتاز با استفاده از داکینگ مولکولی و مدل فارماکوفور بررسی شده است. نتایج مطالعه نشان داد که آمینواسیدهای Met374، Leu372، Asp371، Leu477، Val370، Ser478، Thr310 و Arg115 نقش مهمی را در اتصال ترکیبات طبیعی به این پروتئین دارند (۳۵). همچنین در سال ۲۰۲۰ El-Kersh و همکاران به بررسی فعالیت‌های ضد استروژنی و ضد آروماتاز ترکیبات موجود در پوست مرکبات پرداختند و اظهار داشتند که ترکیبات نارینجین، نارینجین و کوئرستین کمترین مقدار IC₅₀ را نشان دادند و دارای فعالیت ضد استروژنی می‌باشند و استفاده از آن‌ها را در بیماران سرطان سینه قبل و بعد از یانگی پیشنهاد می‌کنند (۳۶). در سال ۲۰۲۱ Rafeeq و همکاران به بررسی ۵۰۳ ترکیبات طبیعی پایگاه داده ZINC به عنوان مهارکننده-های آروماتاز پرداختند و نتایج نشان داد که ترکیبات ZINC69482055، ZINC69482510 و ZINC406719 بالاترین انرژی اتصال (-۸/۴۵، -۱۰/۳۵ و -۸/۷۵ کیلوکالری بر مول) را دارند و با آمینواسیدهای کلیدی Leu477، Phe134، Thr310، Val370، Arg115، Trp224، Arg435 و Met374 پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوبی برقرار می‌کنند (۳۷). در سال ۲۰۲۲ Hamed و همکاران به بررسی عصاره هیدرو متانولی برگ‌های گیاه Carica Papaya Linn به عنوان مهارکننده آروماتاز (CYP19A) پرداختند و نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که ترکیب Clitorin قوی‌ترین برهمکنش را با آروماتاز (CYP19A1) برای گیرنده سرطان سینه با انرژی اتصال RMSD ۱/۵۶ Å کیلوکالری بر مول و مقدار ۱۴/۲۰۷۴ نشان داد و می‌تواند نقش امیدوارکننده‌ای برای طراحی، توسعه

با جایگاه فعال آروماتاز در جستجوی مهارکننده‌های آروماتاز قوی و انتخابی به عنوان جایگزین لیگاند استروئیدی طبیعی مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایج داکینگ شدت اتصال بین آروماتاز که نقش مهمی در ایجاد سرطان گیرنده استروژن مثبت سینه دارد را با آنالوگ‌های مورین تخمین می‌زند و به عنوان یک هدف درمانی بالقوه می‌تواند در نظر گرفته شود، زیرا مهار آن می‌تواند از پیشروی سرطان سینه جلوگیری کند. هم مطالعه داکینگ مولکولی و هم تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیکوشیمیایی ثابت کردند که گروه‌های ۳-OH، ۵-OH، ۷-OH و ۳، ۴-دی هیدروکسیل برای فعالیت مهاری آروماتاز بسیار مهم هستند و اعتقاد بر این است که ویژگی ساختاری معمولی فلاونوئید فعال هستند. همچنین، در بررسی نتایج به دست آمده، مشخص شد در مجموع، این ترکیبات کاندید شده فعالیت بیولوژیک، خواص فیزیکوشیمیایی و اثر مهاری خوب تا قوی را بر روی آنزیم آروماتاز نشان می‌دهند که نتایج داکینگ هم این فعالیت‌ها را تایید می‌کند. علاوه بر این، بررسی برهمکنش‌های داکینگ حاکی از آن است که آمینواسیدهای Val370، Cys437، Phe134، Met364، Pro429، Leu477، Trp224 و به ویژه آمینواسیدهای Arg115 و Met374 نقش کلیدی در برهمکنش آنالوگ‌های مورین با آنزیم آروماتاز دارند و می‌توان این‌طور استنباط کرد که تشکیل پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوب از عوامل مهم در مهار آنزیم آروماتاز می‌باشند. در سال ۲۰۲۰ Banjare و همکاران اثر ۳۳ ترکیب فلاونوئید را با استفاده از داکینگ مولکولی در مهار آنزیم آروماتاز نشان دادند. نتایج نشان داد که ترکیب 3-([1H-imidazol-1-yl]-methyl)-7-methoxy-2-(4-nitrophenyl)-4H-chromen-4-one، یک فلاون مشتق از ایمیدازول با بالاترین انرژی اتصال (۱۴۹/۲۷۱- کیلوکالری بر مول) با آمینواسیدهای جایگاه فعال آنزیم از قبیل Ile133، Phe134، Met374

ویژگی‌های فارماکوکینتیکی مناسب و سمی نبودن، خواص بیولوژیک مطلوب و امتیاز داکینگ منفی و اتصالات قوی با آنزیم می‌توانند باعث مهار آنزیم آروماتاز شوند. هرچند انتظار می‌رود که با بررسی بیشتر و مطالعه دقیق‌تر این ترکیبات در شرایط *in vitro* و *in vivo* بتوان از این ترکیبات طبیعی به عنوان مهارکننده‌های بالقوه در مهار آنزیم آروماتاز استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با کد مصوب ۳۶۳۰ و کد اخلاق IR.SKUMS.REC.1399.237 در معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد است. بدین وسیله از آن معاونت محترم و مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد نهایت قدردانی را به عمل می‌آوریم. طبق نظر نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Mahvi DA, Liu R, Grinstaff MW, Colson YL, Raut CP. Local cancer recurrence: the realities, challenges, and opportunities for new therapies. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):488-505.
2. Shah V, Bhaliya1 J, Patel GM. In silico docking and ADME study of deketene curcumin derivatives (DKC) as an aromatase inhibitor or antagonist to the estrogen-alpha positive receptor (E α +): potent application of breast cancer. *Struct Chem.* 2022;33(2):571-600.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6):394-424.
4. Adhikari N, Baidya SK, Jha T. Effective anti-aromatase therapy to battle against estrogen-mediated breast cancer: comparative SAR/QSAR assessment on steroidal aromatase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2020;208:112845.
5. Grizzi G, Ghidini M, Botticelli A, Tomasello G, Ghidini A, Grossi F, Fusco N, Cabiddu M, Savio T, Petrelli F. 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.

و پیشرفت داروهای ضدسرطان داشته باشد (۳۸). علاوه بر این، در سال ۲۰۱۹ Rampogu و همکاران به بررسی ترکیبات گیاهی بر روی آنزیم آروماتاز با استفاده از روش‌های محاسباتی پرداختند. در این مطالعه، ۳۶ ترکیب گیاهی برای درمان سرطان سینه بررسی شدند که نتایج حاکی از اتصال‌های قوی آمینواسیدهای Phe134، Met374 و Val370 آروماتاز از طریق پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوب با ترکیبات کورکومین، کپسایسین، اسید رزمارینیک و ۶-شوگاول بود (۳۹). در تحقیقی مشابه Ma و همکاران (۲۰۲۲) اتصال مستحکم اسید اورسولیک با آنزیم CYP19A1 آروماتاز و مهار آن را نشان دادند که اسید اورسولیک با آمینو اسیدهای Val370، Ala306، Trp224، Ile133، Leu372، Val373، Met374، Cys437، Ala438 و Leu477 برهمکنش هیدروفوب ایجاد می‌کند (۴۰).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه مشخص کرد که از میان آنالوگ‌های مورین، ترکیبات گالانجین، مورین، کوئرستین و رامنتین به دلیل

6. Santen RJ, Simpson E. History of estrogen: its purification, structure, synthesis, biologic actions, and clinical implications. *Endocrinology*. 2019;160(3):605-25.
7. Korzets Y, Yariv O, Mutai R, Moore A, Shochat T, Goldvaser H. The Impact of Endogenous Estrogen Exposures on the Characteristics and Outcomes of Estrogen Receptor Positive, Early-stage Breast Cancer. *Discov Oncol*. 2021;12(1):26.
8. Starek-Świechowicz B, Budziszewska B, Starek A. Endogenous estrogens—breast cancer and chemoprevention. *Pharmacol Rep*. 2021;73(6):1497-512.
9. Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer lett*. 2015;356(2):231-43.
10. Jha T, Adhikari N, Halder AK, Saha A. Ligand-and structure-based drug design of non-steroidal aromatase inhibitors (NSAIs) in breast cancer. *Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design, Predictive Toxicology, and Risk Assessment*. IGI Global, 2015: 400-70.
11. Hero M, Varimo T, Raivio T. Aromatase inhibitors in puberty. *Curr Opin Endocr Metab Res*. 2020;14:37-41.
12. Patel HK, Bihani T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2018;186:1-24.
13. Rani S, Raheja K, Luxami V, Paul K. A review on diverse heterocyclic compounds as the privileged scaffolds in non-steroidal aromatase inhibitors. *Bioorg Chem*. 2021;113:105017.
14. Kümler I, Knoop AS, Jessing CA, Ejlersen B, Nielsen DL. Review of hormone-based treatments in postmenopausal patients with advanced breast cancer focusing on aromatase inhibitors and fulvestrant. *ESMO open*. 2016;1(4):e000062.
15. Ghosh D, Lo J, Egbuta C. Recent progress in the discovery of next generation inhibitors of aromatase from the structure–function perspective. *J Med Chem*. 2016;59(11):5131-48.
16. Akça KT, Demirel MA, Süntar I. The Role of Aromatase Enzyme in Hormone Related Diseases and Plant-Based Aromatase Inhibitors as Therapeutic Regimens. *Curr Top Med Chem*. 2022;22(3):229-46.
17. Karkola S, Wähälä K. The binding of lignans, flavonoids and coumestrol to CYP450 aromatase: a molecular modelling study. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;301(1-2):235-44.
18. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(2):111-29.
19. Romano JD, Tatonetti NP. Informatics and computational methods in natural product drug discovery: a review and perspectives. *Front. genet*. 2019;10:368.
20. Pohl F, Kong Thoo Lin P. The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: in vitro, in vivo and clinical trials. *Molecules*. 2018;23(12):3283.
21. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020;83(3):770-803.
22. Rupasinghe H. Special Issue “flavonoids and their disease prevention and treatment potential”: Recent advances and future perspectives. *Molecules*. 2020;25(20):4746.
23. Cao Y-L, Lin J-H, Hammes H-P, Zhang C. Flavonoids in Treatment of Chronic Kidney Disease. *Molecules*. 2022;27(7):2365.
24. Lephart ED. Modulation of aromatase by phytoestrogens. *Enzyme Res*. 2015;2015.

25. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD. Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Curr Sports Med Rep*. 2009;8(4):206-13.
26. Awasthi M, Singh S, Pandey VP, Dwivedi UN. Molecular docking and 3D-QSAR-based virtual screening of flavonoids as potential aromatase inhibitors against estrogen-dependent breast cancer. *J Biomol Struct Dyn*. 2015;33(4):804-19.
27. Praseetha NG, Divya UK, Nair S. Identifying the potential role of curcumin analogues as anti-breast cancer agents; an in silico approach. *Egypt J Med Hum Genet*. 2022;23(1):100.
28. Ali A, Jan NU, Ali S, Ahmad B, Ali A, Samrana S, Jahan A, Ali H, Khan IA, Rahim H, Ali I. Steroidal alkaloids efficient aromatase inhibitors with potential for the treatment of postmenopausal breast cancer. *Chem Biol Drug Des*. 2020;95(2):233-9.
29. Gürbüz P, Doğan ŞD, Gündüz MG, Uzun K, Uzunhisarcıklı E, Yerer MB. Isolation, Characterization and in Silico Studies of Secondary Metabolites from *Jurinea macrocephala* DC. with Antiproliferative Activity. *Chem Biodivers*. 2022;19(4):e202100867.
30. Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. 2009;457:219-23.
31. (a) Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;44(1):235-49. (b) Shah V, Bhaliya J, Patel GM. In silico docking and ADME study of deketene curcumin derivatives (DKC) as an aromatase inhibitor or antagonist to the estrogen-alpha positive receptor (E α +): potent application of breast cancer. *Struct Chem*. 2022;33(2):571-600.
32. Egan WJ, Merz KM, Baldwin JJ. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J Med Chem*. 2000;43(21):3867-77.
33. (a) Goel RK, Singh D, Lagunin A, Poroikov V. PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. *Med Chem Res*. 2011;20:1509-14. (b) Muegge I, Heald SL, Brittelli D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J Med Chem*. 2001;44(12):1841-6.
34. Banjare L, Verma SK, Jain AK, Thareja S. Design and pharmacophoric identification of flavonoid scaffold-based aromatase inhibitors. *J Heterocycl Chem*. 2020;57(9):3483-92.
35. Rampogu S, Park C, Son M, Baek A, Zeb A, Lee G, Lee KW. Modulation of aromatase by natural compounds—A pharmacophore guided molecular modelling simulations. *S Afr J Bot*. 2019;120:230-40.
36. El-Kersh DM, Ezzat SM, Salama MM, Mahrous EA, Attia YM, Ahmed MS, Elmazar, MM. Anti-estrogenic and anti-aromatase activities of citrus peels major compounds in breast cancer. *Sci Rep*. 2021;11(1):7121.
37. Rafeeq MM, Sain ZM, Alturki NA, Alzamami A, Asiri SA, Mashraqi MM, Alqosaibi AI, Alnamshan MM, Almutairi A, Alanazi AM, Alam Q. Computational Screening of Natural Compounds for the Discovery of Potential Aromatase Inhibitors: A Promising Therapy for Estrogen-Dependent Breast Cancer. *J Pharm Res Int*. 2021;33:72-8.
38. Hamed AN, Abouelela ME, El Zowalaty AE, Badr MM, Abdelkader MS. Chemical constituents from *Carica papaya* Linn. leaves as potential cytotoxic, EGFR wt and aromatase (CYP19A) inhibitors; a study supported by molecular docking. *RSC advances*. 2022;12(15):9154-62.

39. Rampogu S, Park C, Ravinder D, Son M, Baek A, Zeb A, et al. Pharmacotherapeutics and molecular mechanism of phytochemicals in alleviating hormone-responsive breast cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.

40. Ma WL, Chang N, Yu Y, Su YT, Chen GY, Cheng WC, et al. Ursolic acid silences CYP19A1/aromatase to suppress gastric cancer growth. *Cancer Med*. 2022;11(14): 2824-35.