

ORIGINAL ARTICLE

Comparison of phloretin and trilobatin effect for inhibition of butyrylcholinesterase activity: *In vitro* study and molecular docking simulation

Mostafa Zakariazadeh¹, Reza Haji Hosseini¹, Reza Khodarahmi², Somaieh Soltani^{3*}

¹Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.

²Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

³Department of Medicinal Chemistry, Pharmacy Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, 51664-14766, Iran.

Correspondence

Somaieh Soltani

Email: soltanis@tbzmed.ac.ir

How to cite

Zakariazadeh, N., Haji Hosseini, R., Khodarahmi, R., & Soltani, S. (2024). Comparison of phloretin and trilobatin effect for inhibition of butyrylcholinesterase activity: *In vitro* study and molecular docking simulation. *Experimental Animal Biology*, 12(48), 1-15.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most prevalent neurodegenerative disorder affecting the central nervous system. It is crucial to prevent and treat this disease. One of the objectives in treating Alzheimer's disease is to impede the function of the butyrylcholinesterase enzyme. Phloretin and trilobatin are natural polyphenolic dihydrochalcone compounds. Trilobatin is the glycosylated derivative of phloretin. Studies have indicated the efficacy of these compounds in enhancing learning and memory as well as neuroprotective properties. The effect of these compounds on the inhibition of butyrylcholinesterase activity has been investigated in this study. The results were compared in terms of inhibitory activity and molecular mechanism of interaction for each compound. It was found that phloretin and trilobatin inhibited enzyme activity by 42% and 25%, respectively. Prediction of compounds ADMET parameters was done. Molecular docking was utilized to survey the binding mode of compounds, interaction type, and calculate the binding free energy. According to the molecular docking result, the mean binding free energy for the enzymes' interaction with phloretin and trilobatin was calculated to be $-6.64(\pm 0.35)$ and $-5.92(\pm 0.93)$ kcal/mol, respectively. The presence of a glycosylated group in the trilobatin structure increases the number of rotatable bonds, hydrophilicity, and steric hindrance. It seems that these factors reduce the inhibition activity of trilobatin against enzyme in comparison to phloretin. Based on the presented study, these compounds generally don't have high inhibitory activity, but they can be regarded as key components in the development of novel anti-Alzheimer's drugs or as components of natural anti-Alzheimer's supplements.

KEYWORDS

Alzheimer's, butyrylcholinesterase, enzyme inhibition, molecular docking, polyphenol compounds.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

مقایسه تأثیر ترکیبات فلوریتین و تریلوباتین بر مهار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز: مطالعه برون‌تنی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

مصطفی زکریازاده^۱، رضا حاجی حسینی^۱، رضا خدارحمی^۲، سمیه سلطانی^{۳*}

چکیده

آلزایمر از شایع‌ترین بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی مرکزی است. پیشگیری و درمان این بیماری بسیار مهم است. یکی از اهداف درمانی برای بیماری آلزایمر مهار فعالیت آنزیم کولین استراز است. فلوریتین و تریلوباتین از ترکیبات طبیعی پلی‌فنلی دی‌هیدروچالکونی هستند. تریلوباتین مشتق قندی فلوریتین است. مطالعات نشان داده که این ترکیبات در یادگیری و حافظه مؤثر بوده و نیز خواص نوروپروتکتیوی دارند. در این مطالعه مهار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز توسط این ترکیبات بررسی شد. نتایج از لحاظ قدرت مهار و مکانیسم مولکولی برهم‌کنش برای هر ترکیب با آنزیم مقایسه شد. مهار فعالیت آنزیم توسط فلوریتین و تریلوباتین به ترتیب ۴۲ و ۲۵ درصد بوده است. پیش‌بینی پارامترهای ADMET ترکیبات انجام شد. داکینگ مولکولی برای بررسی نحوه اتصال ترکیبات، نوع برهم‌کنش‌ها و محاسبه انرژی آزاد اتصال به کار رفت. طبق نتایج شبیه‌سازی داکینگ مولکولی، میانگین انرژی آزاد اتصال برای برهم‌کنش فلوریتین و تریلوباتین با آنزیم به ترتیب $(\pm 0.35) -6.64$ و $(\pm 0.93) -5.92$ کیلوکالری/مول بود. گروه قندی در ساختار تریلوباتین باعث افزایش تعداد پیوندهای قابل چرخش، آبدوستی و ممانعت فضایی می‌شود. به نظر می‌رسد که این عوامل موجب کاهش قدرت مهار تریلوباتین علیه آنزیم در مقایسه با فلوریتین می‌شود. به طور کلی، براساس مطالعه حاضر این ترکیبات قدرت مهار بالایی ندارند، اما با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توانند به عنوان ترکیبات پیشرو در طراحی داروهای جدید علیه آلزایمر و یا بخشی از مکمل‌های طبیعی ضد آلزایمر در نظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی

آلزایمر، بوتیریل کولین استراز، ترکیبات پلی‌فنل، داکینگ مولکولی، مهار آنزیم.

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
^۲گروه فارماکوتکونوزی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
^۳گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

نویسنده مسئول:

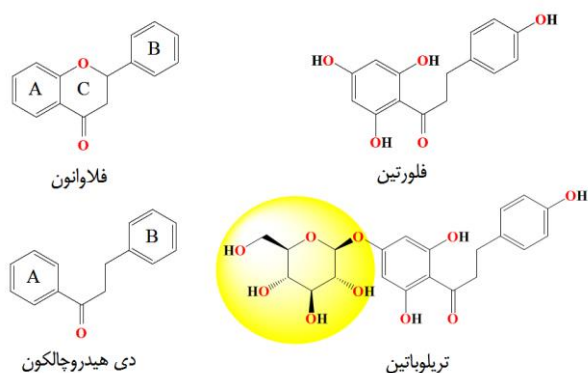
سمیه سلطانی

رایانامه: soltanis@tbzmed.ac.ir

استناد به این مقاله:

زکریازاده، مصطفی؛ حاجی حسینی، رضا؛ خدارحمی، رضا و سلطانی، سمیه (۱۴۰۳). مقایسه تأثیر ترکیبات فلوریتین و تریلوباتین بر مهار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز: مطالعه برون‌تنی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲(۴۸)، ۱-۱۵.

فلاونوئیدها از مشهورترین ترکیبات طبیعی در گیاهان هستند که جزو پلی‌فنل‌ها بوده و دارای ساختار دی‌فنیل پروپان (-C6-C3-C6) هستند (Dwivedi et al., 2017). ترکیبات دی‌هیدروچالکون از زیرشاخه فلاوانون از فلاونوئیدهاست که در آن حلقه C هتروسیکلی باز شده و حلقه‌های فنولی آروماتیک A و B به همدیگر متصل هستند. پلی‌فنول‌های طبیعی فلورترین ($C_{15}H_{14}O_5$) و تریلوباتین ($C_{21}H_{24}O_{10}$) از دی‌هیدروچالکون‌ها هستند (De Luca et al., 2022; Ibdah et al., 2017; Rudrapal et al., 2021) (شکل ۱).



شکل ۱. ساختار شیمیایی فلاوانون، دی‌هیدروچالکون، فلورترین و

تریلوباتین. بخش قندی تریلوباتین به رنگ زرد مشخص شده است. ساختار ترکیبات با نرم‌افزار Chem Draw Ultra نسخه ۱۰ تهیه شده است.

عمده‌ترین منبع فلورترین، سیب (*Malus domestica*) بوده و در میوه، برگ، ریشه و پوست آن یافت می‌شود (de Oliveira, 2016). تریلوباتین (phloretin-4'-O-glucoside) مشتق قندی فلورترین است (Ibdah et al., 2017) و از گیاه چای شیرین (Sweet tea) قابل استخراج است (Shang et al., 2022). فلورترین و تریلوباتین اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب، ضد سرطان و حفاظت کبدی را دارند (Gao et al., 2018; Shang et al., 2022; Zhong et al., 2020; Zuo et al., 2014). آنزیم بوتیریل کولین استراز (کولین استراز کاذب یا کولین استراز پلاسما) به عنوان گزینه جانشین در درمان آلزایمر مطرح است (Nordberg et al., 2013). مهار فعالیت استیل کولین استراز می‌تواند منجر به افزایش فعالیت بوتیریل کولین استراز شود (Giacobini, 2001). در مراحل میانی و پیشرفته آلزایمر، مقدار بوتیریل کولین استراز بر خلاف استیل کولین استراز در بافت مغزی افزایش می‌یابد (Ballard et al., 2005). بنابراین مهار فعالیت

مقدمه

آلزایمر^۱ از شناخته‌شده‌ترین بیماری‌های حال حاضر است که تخریب‌کننده سیستم عصبی مرکزی بوده و دارای ینشانه‌هایی مانند زوال عقل^۲، نقیصه‌های شناختی، فردی و یادگیری است (Breijyeh & Karaman, 2020; Srivastava et al., 2021). در سال ۲۰۲۰ حدود یک میلیون نفر افراد بالای ۶۰ سال آلزایمر داشته که تا سال ۲۰۵۰ دو برابر خواهد شد (Long et al., 2023). ریسک فاکتورهای مهم آلزایمر شامل سن، جنسیت، ژنتیک، عفونت و دیابت هستند (Breijyeh & Karaman, 2020). مهم‌ترین فرضیه‌های بیماری‌زایی آلزایمر عبارتند از سیستم کولینرژیک، پپتید بتا آمیلوئید، پروتئین تاو^۳ و التهاب (Kumar & Dogra, 2008). مهار فعالیت استیل کولین استراز^۴ (E.C. 3.1.1.7) و بوتیریل کولین استراز^۵ (E.C. 3.1.1.8)، مهار تجمع بتا آمیلوئید، مهار توده نوروفیبریلی^۶ تاو از اهداف درمانی آلزایمر می‌باشند (Cao et al., 2018; Self & Holtzman, 2023). فقدان نوروترانسمیتر استیل کولین در قشر مغز باعث نقایص شناختی می‌گردد. آلزایمر با سطح و مقدار استیل کولین ارتباط معکوسی دارد (Francis et al., 1999). کولین استرازها از دسته سربین هیدرولازها بوده که استیل کولین را به کولین و استات هیدرولیز می‌کنند (Massoulié et al., 1993). مهار آنزیم‌های کولین استراز باعث بهبود علائم شناختی در مبتلایان می‌شود (Ballard et al., 2011). اغلب داروهای موجود تنها باعث بهبود علائم آلزایمر می‌شوند (Blaikie et al., 2019; Stanciu et al., 2019). دو دسته از داروها برای درمان آلزایمر وجود دارند؛ ۱- مهارکننده آنزیم‌های کولین استراز (دونپزیل، گالانتامین، ریواستیگمین^۷)، ۲- آنتاگونیست گیرنده $^{8}NMDA$ (میمانتین) (Breijyeh & Karaman, 2020; Kumar & Singh, 2015). شناسایی ترکیبات جدید که سمیت کم‌تر و تأثیر بیش‌تری در بیماری آلزایمر داشته باشند ضروری است (Cummings et al., 2020; Cummings et al., 2014). در این بین، مطالعه بر روی ترکیبات طبیعی اهمیت زیادی در توسعه داروهای ضد آلزایمری دارد (Akhondzadeh & Abbasi, 2019).

1. Alzheimer's Disease
2. Dementia
3. Tau protein
4. Acetylcholinesterase
5. Butyrylcholinesterase
6. NFTs: Neurofibrilari Tangles
7. Rivastigmine
8. N-methyl d-aspartate, NMDA

(Hettich universal 16/16R-Germany)، ترازوی دیجیتال (Shimadzu-Libror-AEU210)، پی‌اچ‌متر (Corning pH meter 120-USA).

تهیه آنزیم بوتیریل کولین استراز

از نمونه خون موجود در آزمایشگاه به میزان ۵ میلی‌لیتر برای تهیه آنزیم بوتیریل کولین استراز استفاده شد. این میزان می‌تواند حدود ۴۰ میلی‌لیتر استوک آنزیم را در داخل بافر دی سدیم هیدروژن فسفات با اسیدیته ۸ فراهم نماید. خون مورد استفاده به لوله هپارینی منتقل و به مدت ۱ دقیقه به هم زده شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. این مرحله سه بار تکرار شد. بعد از جداسازی پلاسما از گلبول‌های قرمز، لوله حاوی پلاسما در روی یخ قرار داده شد و با بافر به میزان هشت برابر رقیق گردید. پلاسما حاوی آنزیم در میکروتیوب‌ها، جمع‌آوری و تا زمان سنجش فعالیت در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Karimi et al., 2010; Mozaffarnia et al., 2019).

سنجش مهار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز

برای سنجش مهار فعالیت آنزیم توسط ترکیبات از روش تغییر یافته ال‌من استفاده شد (Gurun et al., 1978; Sun et al., 2018). محلول‌های استوک بوتیریل تیوکولین یداید (سوبسترا) و معرف ال‌من در بافر دی سدیم هیدروژن فسفات و فلورتین و تریلوباتین در DMSO تهیه شدند. میزان نهایی DMSO در هر نمونه از ترکیبات فلورتین و تریلوباتین کمتر از ۱/۲ درصد می‌باشد (Yu et al., 2021). برای سنجش مهار آنزیم از غلظت‌های ۵-۴۰۰ میکرومولار ترکیبات فلورتین و تریلوباتین استفاده شد. به غیر از محلول DTNB (غلظت ۰/۵ میلی‌مولار با اسیدیته ۷) بقیه محلول‌ها در اسیدیته ۸ تهیه شدند. غلظت محلول سوبسترا ۱ میلی‌مولار است. محلول‌های حاوی ترکیبات به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه در داخل کووت‌ها انکوبه می‌شوند. واکنش آنزیمی با افزودن بوتیریل کولین استراز شروع می‌شود. فعالیت آنزیم با اندازه‌گیری افزایش میزان جذب ماده زرد رنگ ۵-تیو ۲ نیتروبنزوئیک اسید تولید شده از واکنش تیوکولین با DTNB در طول موج ۴۱۲ نانومتر و در مدت ۲۵۰ ثانیه است (Farrokhi et al., 2020; Mozaffarnia et al., 2020).

کولین استرازها از راه کارهای مهم در توسعه داروهای ضد آلزایمر است. تأثیر مفید دی‌هیدروچالکون‌ها علیه آلزایمر معلوم است (Barreca et al., 2017; Chen et al., 2020; Tomassini et al., 2013). فلوریدزین (phloretin-2'-O-glucoside) فعالیت مهاری علیه استیل کولین استراز دارد (Kamdi et al., 2021). مشتقات دی‌هیدروچالکونی از گیاه بُداغ داوودی با نام علمی *Viburnum davidii Franch* از خانواده *Adoxaceae*، مهارکننده کولین استرازها هستند (Tomassini et al., 2021). در فراموشی القاشده با اسکوپولامین و تیمار داخل صفاقی موش‌ها با فلورتین (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در روز)، موجب بهبود حافظه مکانی و کاهش فعالیت استیل کولین استراز در بافت مغزی شده است (Ghumatkar et al., 2015). باوجود گزارش‌های موجود مبنی بر خواص نوروپروتکتیوی فلورتین و تریلوباتین (Govindarajulu et al., 2021; Trifan & Luca, 2023)، تاکنون مطالعاتی برای تحلیل روابط ساختمان و فعالیت^۱ کولین استرازی این ترکیبات انجام نشده است. در این مطالعه از آنالیز دستگاهی اسپکتروسکوپی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی برای مطالعه میزان مهار آنزیم، مکانیسم مولکولی و همچنین تحلیل تأثیر گروه قندی در ساختار این ترکیبات بر مهار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز استفاده شده است. هم‌چنین پارامترهای فیزیکوشیمیایی و ADMET ترکیبات فلورتین و تریلوباتین مطالعه شده است.

روش‌شناسی پژوهش

مواد و دستگاه‌وری

پودرهای فلورتین (خلوص ۹۸ درصد) و تریلوباتین (خلوص ۹۵ درصد) تهیه‌شده از شرکت Chengdu Kindarco Biotech, China. پودر معرف ال‌من (DTNB)^۲ (شرکت سیگما)، بوتیریل تیوکولین یداید (شرکت TCI, Japan)، گالانتامین (شرکت Ranbaxy)، دی‌سدیم هیدروژن فسفات دوآبه، هیدروکلریدریک اسید و DMSO^۳ (شرکت مرک)، سدیم کلرید ۰/۹ درصد (شرکت ثامن، مشهد). دستگاه‌های مورد استفاده شامل دستگاه اسپکتروفتومتری مرئی-فرابنفش با پرتو دوگانه با کووت ۱ سانتی‌متر (Shimadzu-UV-Vis1800-Japan) مجهز به حمام آب گرم (Shimadzu-TB-85-Japan)، سانتریفیوژ یخچال‌دار

1. Structure-Activity Relationship, SAR
2. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB
3. Dimethyl sulfoxide, DMSO

پارامترهای مختلف ADMET برای فلوریتین و تریلوباتین توسط وب سرویس‌های PreADMET, SwissADME (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/adme/>) و Deep-PK (<https://biosig.lab.uq.edu.au/deeppk/>) مورد پیش‌بینی قرار گرفته و نتایج حاصل به‌طور جداگانه بررسی و آنالیز شد. شایان ذکر است که برای استفاده از این وب سرویس‌ها، از ساختار شیمیایی فلوریتین و تریلوباتین در قالب نمایش ساختار دو بعدی SMILE و فرمت‌های مولکولی SDF و Mol آن‌ها استفاده شده است.

تهیه ساختار مولکولی فلوریتین و تریلوباتین

ساختار سه‌بعدی ترکیبات با نرم‌افزار ChemDraw Ultra10.0 تهیه و سپس با نرم‌افزار HyperChem8.0.8 بهینه‌سازی انرژی با روش‌های مکانیک مولکولی (MM+) و نیمه‌تجربی (AM1) انجام گرفت (Afkham *et al.*, 2022; Zakariazadeh *et al.*, 2015). بعد از اتمام بهینه‌سازی انرژی، ترکیبات با فرمت mol2 ذخیره شدند که از نرم‌افزار Open Babel2.3.2 استفاده شد.

شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

شبیه‌سازی داکینگ مولکولی ترکیبات با آنزیم توسط نرم‌افزار AutoDock4.2.6 انجام شد (Farsad *et al.*, 2022; Karami *et al.*, 2019). ساختار آنزیم از سایت (www.rcsb.org) با کد 4BDS و قدرت تفکیک 2.10 Å انتخاب شد. نرم‌افزار AutoDockTools1.5.6 برای آماده‌سازی ساختارهای آنزیم و ترکیبات استفاده شد. ابتدا همه مولکول‌های آب، هترواتم‌ها و هترولیگاند‌های موجود بر روی ساختار آنزیم بوتیریل کولین استراز مانند یون‌های سولفات و کلرید، گلیسرول، فوکوپیرانوز، گلوکوپیرانوز، ترکیب تاکرین و غیره حذف شدند. اتم‌های هیدروژن، بار الکتریکی و پیوندهای قابل چرخش ترکیبات تنظیم شدند. جعبه گرید در سه جهت محورهای مختصات با اندازه‌های ۶۴×۶۴×۶۲ Å³ و فاصله بین نقاط شبکه ۰.۳۷۵ Å در جایگاه فعال تعیین گردید. تعداد ۱۵۰ عدد اجرا^۶ و الگوریتم ژنتیک برای شبیه‌سازی استفاده شد. سرانجام داده‌هایی مانند انرژی آزاد اتصال، تعداد گروه‌بندی‌ها^۷، جایگاه‌های اتصال، پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی بین ترکیبات با اسید

تخمین درصد مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز

از میزان شدت جذب ثبت‌شده در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلفی از ترکیبات، درصد فعالیت و نیز درصد مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز با استفاده از روابط (۱) و (۲) محاسبه شدند.

$$\text{رابطه (۱)} \quad 100 \times \frac{\text{میانگین جذب در حضور ترکیب}}{\text{میانگین جذب کنترل منفی}} = \text{فعالیت آنزیمی}$$

$$\text{رابطه (۲)} \quad \text{فعالیت آنزیمی} - 100 = \text{درصد مهارکنندگی}$$

مطالعه پارامترهای فیزیکوشیمیایی و ADMET ترکیبات فلوریتین و تریلوباتین

مطالعه خواص فارماکوکینتیکی و فارماکودینامیکی ترکیبات شیمیایی بخش جدایی‌ناپذیر در توسعه اکثر داروها و پردازش‌های غربال‌گری پربازده^۱ است (Yu & Wilson, 2010). بهینه‌سازی خواص ترکیبات قبل از ارزیابی‌های بالینی برای کاهش ضررهای مالی و نیز جلوگیری از شکست‌های محتمل که بیش‌تر به‌خاطر مشکلات سمیت و اثرات جانبی آن‌هاست، در طرح‌های توسعه داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Pantaleão *et al.*, 2022). در واقع سرنوشت داروها را با استفاده از پنج پارامتر مهم که عبارتند از جذب، توزیع، متابولیسم و دفع به‌همراه پارامتر سمیت که به اصطلاح ADMET نامیده می‌شود، می‌توان در بدن مشخص نمود (Ferreira & Andricopulo, 2019; Hodgson, 2001). این شاخص‌ها اثر بیولوژیکی و چرخه عمر دارو در بدن موجود زنده را معلوم می‌کنند و در فرایند توسعه و کشف داروهای کم‌خطر، با عوارض نامطلوب کم‌تر و با اثربخشی بیش‌تر کمک می‌کنند (Khandan Alamdari *et al.*, 2023; Vrbancic & Slauter, 2017). در این مطالعه با استفاده از وب سرویس رایگان PubChem (<http://www.swissadme.ch/>) و Swiss ADME مقادیر پارامترهای فیزیکوشیمیایی ترکیبات فلوریتین و تریلوباتین محاسبه شدند. ترکیبات از منظر ترکیب همانندی دارو^۲ و ترکیب همانندی پیشرو^۳ طبق قواعد لیپینسکی^۴ و اصل گوسی^۵ توسط وب سرویس Swiss ADME مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس

1. High throughput screening, HTS
2. Drug-likeness
3. Lead-likeness
4. Lipinski rule
5. Ghose

6. Spacing
7. Run
8. Clusters

فعالیت آنزیم کاهش و میزان درصد مهار فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد. نمودارها حاکی از مهار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز در حضور هر دو ترکیب است و پاسخ درصد مهار فعالیت آنزیم وابسته به غلظت ترکیبات است. شدت مهار فلوریتین و تریلوباتین علیه آنزیم به ترتیب برابر با ۴۲ درصد و ۲۵ درصد بوده که قدرت مهار فلوریتین از تریلوباتین بیش‌تر است ($P < 0.05$).

پیش‌بینی پارامترهای فیزیکوشیمیایی و ADMET

ترکیبات فلوریتین و تریلوباتین

الف) بررسی از جنبه ترکیب شبیه به دارو و ترکیب شبیه به پیشرو

با توجه به مقادیر محاسبه‌شده پارامترهای فیزیکوشیمیایی ترکیبات فلوریتین و تریلوباتین (جدول ۱)، این ترکیبات حائز شرایط قواعد لیپینسکی هستند. این قواعد عبارتند از (الف) وزن مولکولی ترکیب بیش از ۵۰۰ دالتون نباشد، (ب) میزان چربی دوستی (LogP) زیر ۵ باشد، (ج) تعداد اتم‌های پیوند هیدروژنی دهنده از پنج عدد بیش‌تر نباشد و (د) تعداد اتم‌های پیوند هیدروژنی گیرنده از ۱۰ عدد بیش‌تر نباشد (Lipinski *et al.*, 1997). همه این قوانین مضربی از عدد پنج هستند. هرچند که تریلوباتین از لحاظ تعداد اتم‌های پیوند هیدروژنی دهنده بیش‌تر از پنج عدد است.

آزمینه‌های آنزیم مشخص شدند. سایت (<https://proteins.plus>) با ابزار pose view و نیز سایت (<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de>) به ترتیب برای نمایش‌های دو بعدی و سه‌بعدی برهم‌کنش‌ها استفاده شدند. نرم‌افزار PyMOL 1.1 برای نمایش گرافیکی کمپلکس‌های آنزیم و ترکیبات به کار برده شد (Baghban *et al.*, 2021; DeLano, 2002).

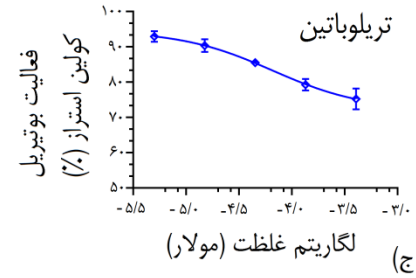
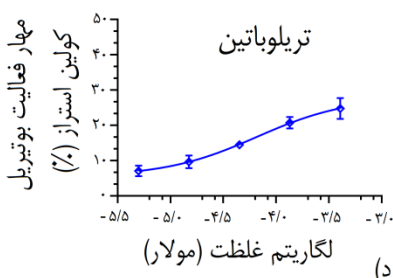
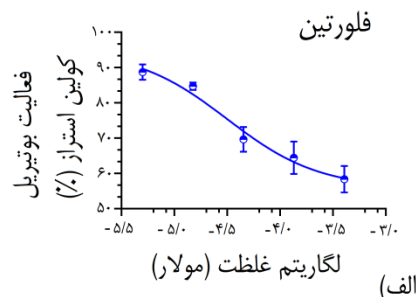
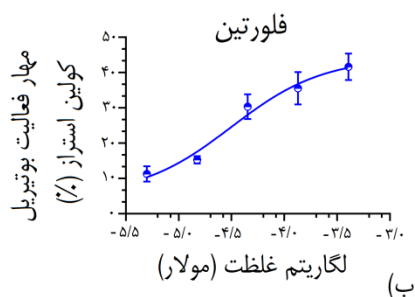
آنالیز آماری

نتایج مهار آنزیمی به صورت میانگین ($\pm$ انحراف معیار) حاصل از سه بار تکرار تهیه شد. آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) از لحاظ سطح معنی‌داری ($p\text{-value} < 0.05$) در تفاوت میانگین‌ها بررسی شد.

یافته‌های پژوهش

مهار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز

سنجش مهار آنزیم توسط گالاتانمین (کنترل مثبت) انجام شد و مقدار $IC_{50} = 38.7 (\pm 2.4) \mu M$ محاسبه شد. با توجه به شکل (۲)، نمودارهای لگاریتم غلظت با درصد فعالیت آنزیم (الف و ج) و لگاریتم غلظت با درصد مهار فعالیت آنزیم (ب و د) در حضور ترکیبات با روش رگرسیون غیرخطی و با نرم‌افزار GraphPad Prism 9 تهیه شد. با افزایش غلظت فلوریتین و تریلوباتین، درصد



شکل ۲. درصد فعالیت (الف و ج) و درصد مهار فعالیت بوتیریل کولین استراز (ب و د) توسط فلوریتین و تریلوباتین

با دوز مؤثر، دوز ایمن و مقاومت داروها به‌ویژه در درمان دارویی سرطان از اهمیت زیادی برخوردار است. این گلیکوپروتئین توانایی خارج کردن داروها از سیتوپلاسم سلول‌ها با استفاده از انرژی حاصل از تجزیه ATP را دارد (Veiga-Matos *et al.*, 2023). خاصیت مهارکنندگی و سوبسترا بودن لیگاندها برای عملکرد این ناقل مهم هستند. هیچ کدام از این دو ترکیب فلورتین و تریلوباتین مهارکننده این ناقل نیستند. براساس پیش‌بینی، تریلوباتین برخلاف فلورتین می‌تواند سوبسترای آن باشد، زیرا معمولاً سوبستراهای این ناقل، وزن مولکولی بیش‌تر از ۴۰۰ دالتون دارند (Didziapetris *et al.*, 2003).

اصل گوسی که از شاخص‌های دیگری برای سنجش ترکیب با خواص ترکیب شبیه به دارو است (Ghose *et al.*, 1999)، برای فلورتین و تریلوباتین شامل می‌گردد. در بررسی خصوصیت ترکیب شبیه به دارو برای فلورتین و تریلوباتین طبق قواعد مربوط به دیتا بانک شیمی دارویی جامع^۱، نشان‌دهنده مشمول بودن فلورتین و تریلوباتین برای این خصوصیت است. هم‌چنین در بررسی خاصیت ترکیب همانندی پیشرو، تریلوباتین به‌خاطر وزن مولکولی بیش‌تر از ۳۵۰ (گرم/مول) باعث نقض این خصوصیت شده اما فلورتین دارای شرایط ترکیب شبیه به پیشرو است (Teague *et al.*, 1999).

ب) بررسی پارامتر جذب

با توجه به مقادیر پیش‌بینی‌شده، میزان جذب فلورتین (۷۹ درصد) نسبت به تریلوباتین (۲۷ درصد) از طریق سیستم گوارشی بیش‌تر است. فلورتین و تریلوباتین به‌ترتیب به ترکیباتی با توانایی جذب خوب و متوسط از طریق سیستم گوارشی تقسیم می‌شوند (Yee, 1997). نفوذپذیری لیگاندها از طریق مدل Caco-2 و مدل MDCK^۲ که بر پایه سلولی هستند در ارزیابی جذب از طریق سیستم گوارشی نیز به‌کار گرفته می‌شوند (Yazdanian *et al.*, 1998). طبق مقادیر محاسبه‌شده (جدول ۲)، جذب گوارشی تریلوباتین نسبت به فلورتین کم است. در بررسی توانایی جذب از طریق پوستی (پارامتر LogKp (Singh & Singh, 1993) (جدول ۲)، شدت جذب پوستی تریلوباتین از فلورتین کم است. در بحث جذب، پمپ پروتئینی به‌نام گلیکوپروتئین نفوذپذیر^۴ که یک نوع ناقل غشایی است دخیل می‌باشد. این ناقل در جذب داروها اثر حیاتی داشته و میزان بیان آن

ج) بررسی پارامتر توزیع

نفوذپذیری از سد خونی مغزی^۵ یکی از فاکتورهای مهم در بررسی پارامتر توزیع داروهاست و بالاخص برای ترکیباتی که هدف آن‌ها سیستم اعصاب مرکزی است، از اهمیت بیش‌تری برخوردار است (Wu *et al.*, 2023). طبق مقادیر محاسبه‌شده از طریق روش‌های پیش‌بینی، میزان نفوذپذیری (LogBB) فلورتین از تریلوباتین حدود ۱۸ برابر بیش‌تر است (جدول ۲). شدت نفوذپذیری فلورتین متوسط و تریلوباتین ضعیف است (Ma *et al.*, 2005). توانایی اتصال به پروتئین‌های پلاسمایی از دیگر فاکتورهای اثرگذار بر توزیع داروهاست. میزان داروی متصل شده به پروتئین‌های پلاسمایی و شکل آزاد آن، بر دوز مؤثر و فعالیت دارو تأثیر دارد (Schmidt *et al.*, 2010). توانایی اتصال فلورتین و تریلوباتین به پروتئین‌های پلاسمایی به‌ترتیب ۶۲ درصد و ۷۵ درصد است.

جدول ۱. مقادیر محاسبه‌شده پارامترهای فیزیکوشیمیایی فلورتین و تریلوباتین

ترکیب	وزن مولکولی (گرم/مول)	XLogP3 (چربی دوستی ذاتی)	pH7.4 در LogD (چربی دوستی مؤثر)	تعداد اتم‌های پیوند هیدروژنی دهنده	تعداد اتم‌های پیوند هیدروژنی گیرنده	حل پذیری در آب (میلی گرم/ میلی لیتر)
فلورتین	۲۷۴/۲۷	۲/۶۳	۲/۵۸	۴	۵	۰/۱۱
تریلوباتین	۴۳۶/۴۱	۰/۵۴	۰/۶۹	۷	۱۰	۰/۸۵

جدول ۲. مقادیر پیش‌بینی‌شده نفوذپذیری از طریق سیستم گوارشی، پوست و سد خونی مغزی

ترکیب	Caco-2 (nm/s)	MDCK (cm/s)	LogKp (cm/s)	LogBB
فلورتین	۱۸/۱۰۴	۲۹/۷۲۶	-۶/۱۱	-۰/۱۳
تریلوباتین	۱۱/۴۱۰	۰/۷۶۳	-۸/۵۸	-۱/۳۹

1. Comprehensive medicinal chemistry, CMC
2. Human colorectal adenocarcinoma cell line
3. Madin-Darby Canine Kidney cells
4. Permeability glycoprotein, P-gp
5. Blood Brain Barrier, BBB

د) بررسی پارامتر متابولیسم

آنزیم‌های مختلف کبدی در دو فاز مسئول متابولیسم داروها هستند. در فاز یک منواکسیژنازها یا سیتوکروم‌های P450 حاوی گروه هم، واکنش‌های اکسیداسیونی، هیدروکسیلاسیون و غیره را انجام داده و در فاز دوم واکنش‌های کونژوگاسیونی توسط آنزیم‌های دیگر کاتالیز می‌شود. افزایش انحلال‌پذیری در آب و تسهیل دفع از اهداف متابولیسم داروهاست. داروها برای سیتوکروم‌ها می‌توانند سوبسترا، مهارکننده و القاکننده باشند. مهارکننده‌ها و القاکننده‌ها باعث تغییر در دوز مؤثر دارو می‌شوند. عوارض جانبی و تداخلات دارویی به‌خاطر اتصال ترکیبات دارویی به سیتوکروم‌هاست (Guengerich, 1997; Manikandan & Nagini, 2018; Zhao et al., 2021). با بررسی خاصیت مهارکنندگی و سوبسترای فلورتین و تریلوباتین بر روی انواع مختلفی از سیتوکروم‌ها مانند CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 و CYP3A4 مشاهده شد که تریلوباتین بر هیچ کدام از این سیتوکروم‌ها نه سوبستراست و نه مهارکننده. احتمالاً به‌خاطر داشتن گروه قندی، توسط آنزیم‌های دیگری متابولیزه شده و از مکانیسم متابولیسمی متفاوتی برخوردار است. فلورتین سوبسترای CYP1A2 و CYP2C9 بوده و برای CYP1A2 و CYP3A4 مهارکننده می‌باشد. برای دیگر سیتوکروم‌ها خاصیت سوبسترای و مهارکنندگی ندارد. با توجه به توانایی اتصال فلورتین به سیتوکروم‌های مختلف ممکن است سبب تداخلات دارویی در مصرف همزمان با داروها شود.

ه) بررسی پارامتر دفع

پارامتر دفع برای فلورتین و تریلوباتین توسط فاکتورهای کلیرانس، نیمه‌عمر و مهار ناقل کاتیونی آلی^۲ پیش‌بینی شد. میزان کلیرانس فلورتین برابر با ۷/۲۵ میلی لیتر/دقیقه/کیلوگرم و تریلوباتین ۱۲/۶۴ میلی لیتر/دقیقه/کیلوگرم است. با توجه به آب‌دوست بودن تریلوباتین میزان کلیرانس آن بیش‌تر است. نیمه‌عمر پیش‌بینی شده هر دارو زیر سه ساعت و کم است. ناقل‌های کاتیونی آلی^۲ که در سلول‌های اپی تلیال لوله پیچیده نزدیک در نفرون‌ها قرار دارند، در جذب ترکیبات کاتیونی آلی، داروهای متعدد و گزنویوتیک‌ها به داخل این سلول‌ها نقش دارند (Kuehne et al., 2022; Łapczuk-Romańska et al., 2023). اهمیت حیاتی این ناقل‌ها در کلیرانس اولیه کلیوی بوده و مهار آن‌ها باعث تداخل دارو - دارو می‌شود (Yin & Wang, 2016). براساس نتایج، فلورتین و تریلوباتین مهارکننده این ناقل نیستند.

و) بررسی پارامتر سمیت

در بررسی پتانسیل جهش‌زائی فلورتین و تریلوباتین از طریق تست ایمز^۳، پیش‌بینی شده که تریلوباتین نسبت به فلورتین سمی است. همچنین این ترکیبات فاقد توانایی سرطان‌زائی در موش و رت هستند. مهار کانال پتاسیمی hERG^۴ توسط بعضی داروها باعث آریتمی قلبی شده و اثرات ناخواسته سمیت قلبی مشهود می‌شود. مهار این کانال موجب شکست توسعه داروها در مراحل ارزیابی‌های بالینی می‌شود (Kalyaanamoorthy & Barakat, 2018). فلورتین و تریلوباتین مهارکننده این کانال پتاسیمی نیستند. این ترکیبات برای بیماری‌های تنفسی بی‌خطر هستند. براساس پیش‌بینی‌ها مسمومیت کبدی در فاز II محتمل بوده و حساسیت پوستی توسط هر دو ترکیب امکان‌پذیر است.

به‌طور کلی طبق نتایج حاصل از پیش‌بینی پارامترهای ADMET و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این ترکیبات، فلورتین از ویژگی‌های مناسب‌تر و بهتری برای ترکیب همانندی دارو نسبت به تریلوباتین برخوردار است. از آنجایی که توانایی جذب فلورتین از طریق سیستم گوارشی بیش‌تر است، می‌تواند در اشکال خوراکی مصرف شود. با توجه به میزان جذب کم تریلوباتین از طریق سیستم گوارشی و نیز پوستی که ناشی از آبدوستی و حلالیت بیش‌تر در محیط آبی به‌خاطر حضور گروه قندی آن است (جدول‌های ۱ و ۲)، می‌توان پیشنهاد داد که از اشکال دارویی دیگر یا فرم‌های نانوذرات برای افزایش جذب استفاده شود.

معتبرسازی شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

برای اطمینان از روش انجام و پارامترهای انتخاب‌شده در داکینگ مولکولی از معتبرسازی^۵ استفاده می‌شود. در این روند، ترکیب کریستالی انتخاب و داکینگ مجدد^۶ می‌شود و سپس مقدار انحراف جذر میانگین مربعات^۶ بین اتم‌های متناظر در ساختار کریستال با داک شده محاسبه می‌گردد. مقدار RMSD کم‌تر از ۲ آنگستروم تأیید درستی بر عملیات داکینگ است (Afkham et al., 2022; Mansouri et al., 2022). تاکرین در ساختار 4BDS که در جایگاه فعال آنزیم قرار دارد دوباره داکینگ مجدد شد. در طی داکینگ مجدد، ساختار کریستال داروی تاکرین از جایگاه فعال پروتئین برداشته شده و بدون تغییری در ساختارش در همان جایگاه داک

2. Ames

3. human Ether-a-go-go-Related Gene, hERG

4. Validation

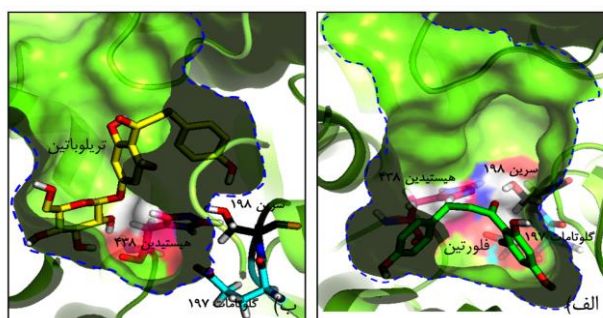
5. Re-dock

6. Root Mean Square Deviation, RMSD

1. Organic Cation Transporter-2, OCT-2

مطالعه برهم‌کنش فلوریتین و تریلوباتین با آنزیم بوتیریل کولین استراز به روش داکینگ مولکولی

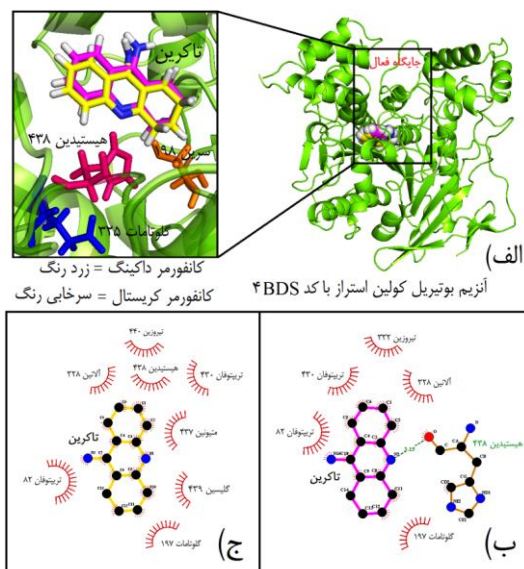
حداقل ترین مقدار انرژی آزاد اتصال برای برهم‌کنش فلوریتین و تریلوباتین با آنزیم به ترتیب $-7/62 \text{ Kcal/mol}$ و $-8/45 \text{ Kcal/mol}$ هستند. هم‌چنین مقدار میانگین انرژی آزاد اتصال در برهم‌کنش‌های فلوریتین و تریلوباتین با آنزیم به ترتیب برابرند با Kcal/mol $(\pm 0/93) -5/92$ و $(\pm 0/35) -6/64$ میانگین انرژی آزاد اتصال برای برهم‌کنش فلوریتین تا حدودی از تریلوباتین بیش‌تر است. در شکل (۴) کانفورم‌های داک‌شده در جایگاه فعال مشاهده می‌شود. تمایل اتصال ترکیبات به ناحیه کاتالیتیکی نسبت به ناحیه جنبی جایگاه فعال آنزیم بیش‌تر است.



شکل ۴. نمایش کانفورم‌های حاصل از داکینگ فلوریتین (الف) و تریلوباتین (ب) در جایگاه فعال آنزیم بوتیریل کولین استراز

حضور گروه‌های هیدروکسیل و کربونیل در ساختار ترکیبات باعث افزایش تمایل به تشکیل پیوند هیدروژنی می‌شود. در جدول (۳) و شکل (۵) اسیدهای آمینه شرکت‌کننده در پیوند هیدروژنی مشخص می‌باشند. اسیدهای آمینه قطبی مانند آسپارات، گلوتمات، آسپارژین و گلوتامین و اسیدهای آمینه حاوی گروه هیدروکسیل مانند سرین و تیروزین نقش عمده‌ای در تشکیل پیوند هیدروژنی دارند. تعداد پیوند هیدروژنی تشکیل‌شده توسط تریلوباتین تا حدودی نسبت به فلوریتین به‌خاطر حضور گروه قندی بیش‌تر است. حضور حلقه‌های آروماتیک در ساختار ترکیبات، برهم‌کنش غیر کووالانسی از نوع $\pi-\pi$ را امکان‌پذیر می‌سازد. از نظر تعداد و نوع اسیدهای آمینه شرکت‌کننده در برهم‌کنش‌های $\pi-\pi$ بین دو ترکیب تفاوتی دیده نمی‌شود که این اسیدهای آمینه عبارتند از تیروزین 440 ، هیستیدین 438 ، تریپتوفان 430 ، تیروزین 332 ، فنیل آلانین 339 ، تریپتوفان 331 ، تیروزین 128 ، تریپتوفان 82 قابل ذکر است که همه این اسیدهای آمینه به‌جز هیستیدین 438 جزو اسیدهای آمینه آروماتیک مهمی هستند که در جداره شیار جایگاه فعال آنزیم قرار دارند. در شکل (۵) برهم‌کنش $\pi-\pi$

می‌شود. بعد از اتمام داکینگ مجدد، ساختارهای روی هم قرار گرفته^۱ تاکرین کریستال با کانفورمر داک‌شده (شکل ۳-الف) انطباق خیلی بیش‌تری داشته که مقدار $\text{RMSD}=0.74\text{\AA}$ و انرژی آزاد اتصال $-6/47 \text{ Kcal/mol}$ می‌باشد. در بررسی اسید آمینه‌های برهم‌کنش دهنده با ساختار کریستال تاکرین و نیز کانفورمر حاصل از داکینگ تاکرین که به‌صورت دو بعدی در شکل (۳-ب و ج) نشان داده شده است، ساختار کریستال تاکرین با شش اسید آمینه که عبارتند از تریپتوفان 82 ، گلوتمات 197 ، آلانین 338 ، تیروزین 332 ، تریپتوفان 430 و هیستیدین 438 برهم‌کنش دارد و هم‌چنین کانفورمر حاصل از داکینگ تاکرین با ۸ اسید آمینه که شامل تریپتوفان 82 ، گلوتمات 197 ، آلانین 338 ، تریپتوفان 430 ، متیونین 437 ، هیستیدین 438 ، گلیسین 439 و تیروزین 440 دارای برهم‌کنش غیرقطبی است. با توجه به این شکل، اسید آمینه‌های تریپتوفان 82 ، گلوتمات 197 ، آلانین 338 ، تریپتوفان 430 و هیستیدین 438 در هر دو ساختار کریستال و کانفورمر حاصل از داکینگ تاکرین، در برهم‌کنش‌ها مشترک هستند.



شکل ۳. الف) ساختار ثانویه بوتیریل کولین استراز. جایگاه فعال آنزیم با اسیدهای آمینه کاتالیتیک تریبا، داروی تاکرین کریستال و کانفورمر داک‌شده که روی هم قرار گرفته‌اند، ب) ساختار کریستال تاکرین در جایگاه فعال آنزیم با اسیدهای آمینه برهم‌کنش دهنده و ج) کانفورمر حاصل از داکینگ تاکرین در جایگاه فعال آنزیم با اسیدهای آمینه برهم‌کنش دهنده. توجه: خط چین سبز رنگ و نیم‌دایره‌های قرمز رنگ به ترتیب نشان‌دهنده پیوند هیدروژنی (ب) و برهم‌کنش‌های غیرقطبی است (ب و ج).

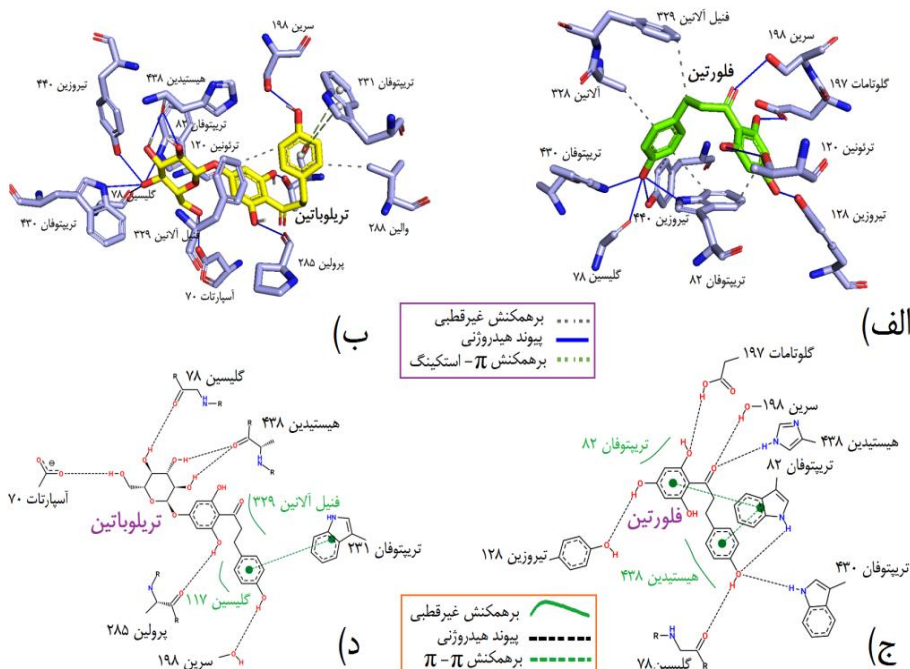
مطالعه توزیع انرژی آزاد اتصال کانفورمرها

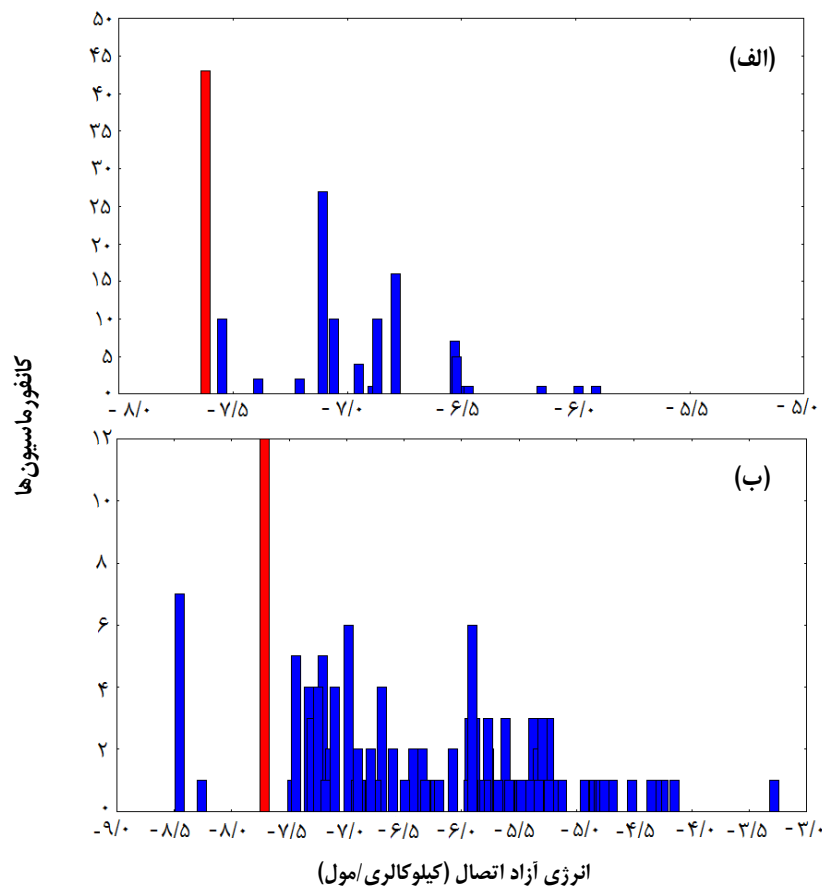
تعداد گروه‌بندی ایجادشده برای ۱۵۰ کانفورمر در شبیه‌سازی داکینگ فلوریتین و تریلوباتین با آنزیم به ترتیب ۱۸ و ۷۵ عدد است (شکل ۶). ورود کانفورمرهای مختلف در گروه‌بندی بیش‌تر و تعداد کم کانفورمر در هر کدام از گروه‌بندی‌ها در برهم‌کنش تریلوباتین با آنزیم نسبت به فلوریتین، احتمال برهم‌کنش تصادفی را نشان می‌دهد. تنوع زیاد کانفورم‌اسیون‌ها برای تریلوباتین احتمالاً ناشی از حضور گروه قندی است که باعث افزایش انعطاف آن شده است. شکل (۶) گروه‌بندی کانفورمرها را برای دو ترکیب نشان می‌دهد.

π بین فلوریتین با تریپتوفان ۸۲ و تریلوباتین با تریپتوفان ۲۳۱ مشخص است. برهم‌کنش هیدروفوبی از دیگر برهم‌کنش‌های غیر کووالانسی بوده که بین ترکیبات با اسیدهای آمینه آنزیم تشکیل می‌شود. با توجه به اندازه بزرگ‌تر تریلوباتین امکان برهم‌کنش هیدروفوبی نیز بیش‌تر است (جدول ۳). اسیدهای آمینه غیرقطبی مانند گلیسین، لوسین، ایزولوسین، والین، متیونین، تریپتوفان در این نوع برهم‌کنش‌ها مشارکت دارند. قابل ذکر است که فلوریتین و تریلوباتین توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی، برهم‌کنش π - π و هیدروفوبی را با اسیدهای آمینه جایگاه کاتالیتیک تریاد (هیستیدین ۴۳۸ و سرین ۱۹۸) را دارند.

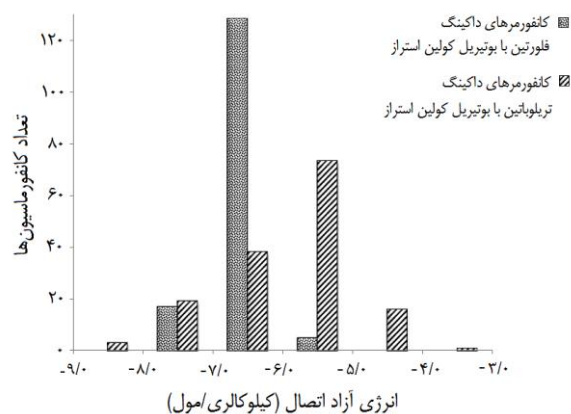
جدول ۳. اسیدهای آمینه شرکت‌کننده در تشکیل پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش غیر قطبی در شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

ترکیب	پیوند هیدروژنی	برهم‌کنش غیر قطبی
فلوریتین	گلوتامین ۶۷-آسپارژین ۶۸-آسپاراتات ۷۰-گلیسین ۷۸-تریپتوفان ۷۸-تریپتوفان ۸۲-آسپارژین ۸۳-گلیسین ۱۱۵-گلیسین ۱۱۶-گلیسین ۱۱۷-ترئونین ۱۲۰-تریپتوفان ۱۲۸-گلوتامات ۱۹۷-سرین ۱۹۸-آلانین ۱۹۹-پروлін ۲۸۵-لوسین ۲۸۶-تیروزین ۳۳۲-تریپتوفان ۴۳۰-هیستیدین ۴۳۸-تیروزین ۴۴۰	ایزولوسین ۶۹-آسپاراتات ۷۰-گلیسین ۷۸-سرین ۷۹-تریپتوفان ۸۲-آسپارژین ۸۳-پروлін ۸۴-گلیسین ۱۱۵-گلیسین ۱۱۶-گلیسین ۱۱۷-گلوتامین ۱۱۹-ترئونین ۱۲۰-لوسین ۱۲۵-تیروزین ۱۲۸-سرین ۱۹۸-آلانین ۱۹۹-تریپتوفان ۲۳۱-ترئونین ۲۸۴-پروлін ۲۸۵-لوسین ۲۸۶-سرین ۲۸۷-والین ۲۸۸-آلانین ۳۲۸-فنیل آلانین ۳۲۹-تیروزین ۳۳۲-فنیل آلانین ۳۹۸-هیستیدین ۴۳۸-متیونین ۴۳۷-تریپتوفان ۴۳۰-هیستیدین ۴۳۸-گلیسین ۴۳۹-تیروزین ۴۴۰
تریلوباتین	گلوتامین ۶۷-ایزولوسین ۶۹-آسپاراتات ۷۰-گلوتامین ۷۱-سرین ۷۲-گلیسین ۷۸-سرین ۷۹-تریپتوفان ۸۲-آسپارژین ۸۳-گلیسین ۱۱۵-گلیسین ۱۱۶-ترئونین ۱۲۰-تریپتوفان ۱۲۸-گلوتامات ۱۹۷-سرین ۱۹۸-ترئونین ۲۸۴-پروлін ۲۸۵-لوسین ۳۲۲-تریپتوفان ۴۳۰-هیستیدین ۴۳۸-تیروزین ۴۴۰	آسپارژین ۶۸-ایزولوسین ۶۹-آسپاراتات ۷۰-سرین ۷۲-سرین ۷۹-تریپتوفان ۸۲-آسپارژین ۸۳-پروлін ۸۴-گلیسین ۱۱۵-گلیسین ۱۱۶-گلیسین ۱۱۷-گلوتامین ۱۱۹-ترئونین ۱۲۰-گلیسین ۱۲۱-لوسین ۱۲۵-تیروزین ۱۲۸-سرین ۱۹۸-آلانین ۱۹۹-تریپتوفان ۲۳۱-ترئونین ۲۸۴-پروлін ۲۸۵-لوسین ۲۸۶-سرین ۲۸۷-والین ۲۸۸-آلانین ۳۲۸-فنیل آلانین ۳۲۹-تیروزین ۳۳۲-فنیل آلانین ۳۹۸-تریپتوفان ۴۳۰-متیونین ۴۳۷-تریپتوفان ۴۳۸-هیستیدین ۴۳۸-گلیسین ۴۳۹-تیروزین ۴۴۰





شکل ۶. نمودار ستونی تعداد گروه‌بندی‌های ایجاد شده برای ۱۵۰ عدد کانفورمر. فلورترین (الف) و تریلوباتین (ب). ستون قرمز رنگ نشان‌دهنده گروه‌بندی با بیش‌ترین تعداد کانفورمر است.



شکل ۷. توزیع مقدار انرژی آزاد اتصال کانفورمرهای فلورترین و تریلوباتین براساس تعداد کانفورمرها

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاکی از کاهش فعالیت آنزیم در حضور ترکیبات است. شدت مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز توسط فلورترین بیش‌تر است. با توجه به این‌که تفاوت ترکیبات از لحاظ ساختاری فقط

در توزیع مقدار انرژی آزاد اتصال کانفورمرها براساس تعداد که در شکل (۷) مشاهده می‌شود، بازه مقدار انرژی آزاد اتصال برای کمپلکس‌های فلورترین با آنزیم بین $-5/91$ و $-7/62$ کیلوکالری بر مول است، در حالی که برای کمپلکس‌های تریلوباتین با آنزیم بین $-3/28$ و $-8/45$ کیلوکالری بر مول است. بیش‌ترین میزان فراوانی تعداد کانفورمر از لحاظ مقدار انرژی آزاد اتصال برای کمپلکس‌های فلورترین با آنزیم در بین بازه $-6/0$ و $-8/0$ کیلوکالری بر مول و برای کمپلکس‌های تریلوباتین با آنزیم در بین بازه $-5/0$ و $-7/0$ کیلوکالری بر مول است. مشاهده می‌شود که مقدار انرژی آزاد اتصال برای فلورترین یک واحد منفی‌تر و بازه مقدار انرژی آزاد اتصال برخلاف تریلوباتین محدودتر است. انرژی‌های آزاد اتصال کانفورمرهای ایجاد شده برای کمپلکس‌های تریلوباتین با آنزیم دارای محدوده‌ای، گسترده بوده که احتمالاً ناشی از انعطاف‌پذیری زیاد به‌خاطر گروه قندی و عدم تمایل به‌قرارگیری در جایگاه‌های اتصال محدود و ثابت است.

د- از عوامل دیگر می‌توان به تعداد بیش‌تر پیوندهای قابل چرخش تریلوباتین (هفت عدد) نسبت به فلورتین (چهار عدد) را نام برد. این ویژگی باعث افزایش انعطاف‌پذیری تریلوباتین نسبت به فلورتین شده (Gürsoy & Smieško, 2017) و در نتیجه باعث تشکیل کانفورمرهای متنوع‌تری از تریلوباتین می‌شود. بنابراین، تریلوباتین حاضر در اکتیوسایت آنزیم نسبت به فلورتین منعطف‌تر و ناپایدارتر است. در نتیجه، کانفورمرهای تریلوباتین تمایل اتصال به جایگاه‌های مختلفی در جایگاه فعال را دارند. میزان مهار کم آنزیم توسط تریلوباتین نسبت به فلورتین با یافته‌های قبلی مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که توسط Katalinic (2010) انجام یافته حاکی است که مشتقات قندی فلاونوئیدی از قدرت مهار کم‌تری علیه آنزیم بوتیریل کولین استراز برخوردارند (Katalinić *et al.*, 2010). در دیگر مطالعات نیز مشخص شده که قدرت مهار آنزیم‌های کولین استرازی توسط ترکیبات غیرقندی نسبت به مشتقات قندی آن‌ها بیش‌تر است (Ademosun *et al.*, 2016; Balkis *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015; Szwajgier, 2014). بنابراین، برای آگاهی بیش‌تر این اختلاف توسط ترکیبات قندی و غیرقندی در مهار کولین استرازا، پژوهش‌های بیش‌تری لازم است. هرچند که ترکیبات طبیعی فلاونوئیدی فوولی از قدرت مهار کمی نسبت به ترکیبات سنتزی برخوردار هستند، اما با توجه به فراوانی در منابع غذایی طبیعی، ارزانی، داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و اثرات جانبی کم‌تر در مقایسه با ترکیبات سنتزی می‌توانند در پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر مفید واقع شوند (Işik & Beydemir, 2021; Szwajgier, 2013).

تشکر و قدردانی

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهش‌گران و فناوران کشور (INSF) برگرفته از طرح شماره (۴۰۰۳۱۳۸) انجام شده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی توسط نویسندگان وجود ندارد.

مربوط به گروه قندی (O-glucoside) تریلوباتین است، بنابراین می‌توان کاهش شدت مهار فعالیت آنزیم توسط تریلوباتین را به حضور این گروه دانست. دلایلی که به‌نظر گروه قندی تریلوباتین سبب کاهش میزان مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز می‌شود را می‌توان به شرح زیر بیان نمود:

الف- گروه قندی به‌خاطر حجم‌بودن ($152/3\text{\AA}^3$)، باعث ایجاد ممانعت فضایی شده و از برهم‌کنش و قرارگیری پایدار کانفورمرهای تریلوباتین از لحاظ شکل فضایی مناسب در داخل جایگاه فعال آنزیم جلوگیری می‌کند. نقش ممانعت فضایی گروه قندی در ساختار ترکیب روتین بر کاهش میزان مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز قبلاً اشاره شده است (Shallangwa & Adeniji, 2021).

ب- محدودیت ایجادشده توسط گروه قندی در برهم‌کنش و مهار بیش‌تر آنزیم، می‌تواند به‌خاطر قطبیت ذاتی ترکیب و نیز حل‌پذیری بیش‌تر ترکیبات قندی در بافر آبی محیط باشد. تریلوباتین نسبت به فلورتین قطبی است ($\log P \text{ phloretin} = 3.50$, $\log P \text{ trilobatin} = 1.43$) و جایگاه فعال آنزیم بیش‌تر از اسید آمینه‌های غیر قطبی تشکیل یافته است (Giacobini, 2001). بنابراین، از نظر بررسی ماهیت قطبیت، سازگاری کم‌تری بین تریلوباتین و جایگاه فعال آنزیم وجود دارد. همچنین امکان تشکیل پیوند هیدروژنی توسط گروه‌های هیدروکسیل گروه قندی تریلوباتین با حلال آبی موجود در محیط نسبت به فلورتین بیش‌تر است که باعث تمایل بیش‌تر تریلوباتین به محیط قطبی خارج شیار جایگاه فعال می‌شود (Slámová *et al.*, 2018).

ج- تعداد گروه هیدروکسیل در ساختار تریلوباتین هفت عدد و در فلورتین چهار عدد می‌باشد. با توجه به مطالعات قبلی نشان داده شده است که تعداد گروه هیدروکسیل بیش‌تر در ساختار ترکیبات فلاونوئیدی مانع از مهار بیش‌تر آنزیم بوتیریل کولین استراز توسط این دسته از ترکیبات می‌شود (Katalinić *et al.*, 2010).

References

- Ademosun, A. O., Oboh, G., Bello, F., & Ayeni, P. O. (2016). Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 21(4), NP11-NP17.
- Afkham, S., Hanaee, J., Zakariazadeh, M., Fathi, F., Shafiee, S., & Soltani, S. (2022). Molecular mechanism and thermodynamic study of Rosuvastatin interaction with human serum albumin using a surface plasmon resonance method combined with a multi-spectroscopic, and molecular modeling approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168, 106005.
- Akhondzadeh, S., & Abbasi, S. H. (2006). Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, 21(2), 113-118.

- Baghban, R., Ghasemali, S., Farajnia, S., Hoseinpoor, R., Andarzi, S., Zakariazadeh, M., & Zarredar, H. (2021). Design and in silico evaluation of a novel cyclic disulfide-rich anti-VEGF peptide as a potential antiangiogenic drug. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27, 2245-2256.
- Balkis, A., Tran, K., Lee, Y. Z., Balkis, K. N., & Ng, K. (2015). Screening flavonoids for inhibition of acetylcholinesterase identified baicalein as the most potent inhibitor. *Journal of Agricultural Science*, 7(9), 26.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *the Lancet*, 377(9770), 1019-1031.
- Ballard, C. G., Greig, N. H., Guillozet-Bongaarts, A. L., Enz, A., & Darvesh, S. (2005). Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Current Alzheimer Research*, 2(3), 307-318.
- Barreca, D., Currò, M., Bellocco, E., Ficarra, S., Laganà, G., Tellone, E., Galtieri, A., & Lentile, R. (2017). Neuroprotective effects of phloretin and its glycosylated derivative on rotenone-induced toxicity in human SH-SY5Y neuronal-like cells. *Biofactors*, 43(4), 549-557.
- Blaikie, L., Kay, G., & Lin, P. K. T. (2019). Current and emerging therapeutic targets of alzheimer's disease for the design of multi-target directed ligands. *MedChemComm*, 10(12), 2052-2072.
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive review on Alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules*, 25(24), 5789.
- Cao, J., Hou, J., Ping, J & ,Cai, D. (2018). Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 13, 1-20.
- Chen, N., Wang, J., He, Y., Xu, Y., Zhang, Y., Gong, Q., & Gao, J. (2020). Trilobatin protects against A β 25–35-induced hippocampal HT22 cells apoptosis through mediating ROS/p38/Caspase 3-dependent pathway. *Frontiers in pharmacology*, 11, 584.
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M., & Zhong, K. (2020). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 6(1), e12050.
- Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's research & therapy*, 6(4), 1-7.
- Dangles, O. (2012). Antioxidant activity of plant phenols: chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 692-714.
- De Luca, F., Di Chio, C., Zappalà, M., & Ettari, R. (2022). Dihydrochalcones as Antitumor Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 29(30), 5042-5061.
- de Oliveira, M.R. (2016). Phloretin-induced cytoprotective effects on mammalian cells: A mechanistic view and future directions. *Biofactors*, 42(1), 13-40.
- DeLano, W.L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr*, 40(1), 82-92.
- Didziapetris, R., Japertas, P., Avdeef, A., & Petrauskas, A. (2003). Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity. *Journal of drug targeting*, 11(7), 391-406.
- Dwivedi, S., Malik, C., & Chhokar, V. (2017). Molecular structure, biological functions, and metabolic regulation of flavonoids. *Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments*, 171-188.
- Farrokhi, H., Mozaffarnia, S., Rahimpour, K., Rashidi, M. R., & Teimuri-Mofrad, R. (2020). Synthesis, characterization and investigation of AChE and BuChE inhibitory activity of 1-alkyl-4-[(5, 6-dimethoxy-1-indanone-2-yl) methylene] pyridinium halide derivatives. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 17, 593-600.
- Farsad, S. A., Haghaei, H., Shaban, M., Zakariazadeh, M., & Soltani, S. (2022). Investigations of the molecular mechanism of diltiazem binding to human serum albumin in the presence of metal ions, glucose and urea. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(15), 6868-6879.
- Ferreira, L. L., & Andricopulo, A. D. (2019). ADMET modeling approaches in drug discovery. *Drug discovery today*, 24(5), 1157-1165.
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., & Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66(2), 137-147.
- Gao, J., Liu, S., Xu, F., Liu, Y., Lv, C., Deng, Y., Shi, J., & Gong, Q. (2018). Trilobatin protects against oxidative injury in neuronal PC12 cells through regulating mitochondrial ROS homeostasis mediated by AMPK/Nrf2/Sirt3 signaling pathway. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 267.
- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., & Wendoloski, J. J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of combinatorial chemistry*, 1(1), 55-68.
- Ghumatkar, P. J., Patil, S. P., Jain, P. D., Tambe, R. M., & Sathaye, S. (2015). Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 135, 182-191.
- Giacobini, E. (2001). Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? *Drugs & aging*, 18, 891-898.
- Gorun, V., Proinov, I., Băltescu, V., Balaban, G., & Bâzu, O. (1978). Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations. *Analytical biochemistry*, 86(1), 324-326.
- Govindarajulu, M., Ramesh, S., Neel, L., Fabbrini, M., Buabeid, M., Fujihashi, A., Mohanakumar, K. P. ...& Dhanasekaran, M. (2021). Nutraceutical based SIRT3 activators as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 144, 104958.

- Guengerich, F. P. (1997). Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Advances in pharmacology*, 43, 7-35.
- Gürsoy, O., & Smieško, M. (2017). Searching for bioactive conformations of drug-like ligands with current force fields: how good are we? *Journal of Cheminformatics*, 9, 1-13.
- Hodgson, J. (2001). ADMET—turning chemicals into drugs. *Nature biotechnology*, 19(8), 722-726.
- Ibdah, M., Martens, S., & Gang, D. R. (2017). Biosynthetic pathway and metabolic engineering of plant dihydrochalcones. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(10), 2273-2280.
- Işık, M., & Beydemir, Ş. (2021). The impact of some phenolic compounds on serum acetylcholinesterase: kinetic analysis of an enzyme/inhibitor interaction and molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(17), 6515-6523.
- Kalyanamoothy, S., & Barakat, K. H. (2018). Development of safe drugs: the hERG challenge. *Medicinal Research Reviews*, 38(2), 525-555.
- Kamdi, S. P., Badwaik, H. R., Raval, A., & Nakhate, K. T. (2021). Ameliorative potential of phloridzin in type 2 diabetes-induced memory deficits in rats. *European Journal of Pharmacology*, 913, 174645.
- Karami, K., Ramezanzpour, A., Zakariazadeh, M., Shahpiri, A., Kharaziha, M., & Kazeminasab, A. (2019). Luminescent Palladacycles Containing a Pyrene Chromophore; Synthesis, Biological and Computational Studies of the Interaction with DNA and BSA. *ChemistrySelect*, 4(17), 5126-5137.
- Karimi, G., Iranshahi, M., Hosseinalizadeh, F., Riahi, B., & Sahebkar, A. (2010). Screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of terpenoid and coumarin derivatives from the genus *Ferula*. *Pharmacologyonline*, 1, 566-574.
- Katalinić, M., Rusak, G., Barović, J. D., Šinko, G., Jelić, D., Antolović, R., & Kovarik, Z. (2010). Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(1), 186-192.
- Khandan Alamdari, S., Farahmand, S., Haji Hosseini, R., & Bakhshi khani, G. (2023). Computational design of E6 protein inhibitors for the treatment of HPV16 disease. *Experimental animal Biology*, 12(2), 1-14. <https://doi.org/10.30473/eab.2023.68784.1920>
- Kuehne, A., Floerl, S., & Hagos, Y. (2022). Investigations with drugs and pesticides revealed new species- and substrate-dependent inhibition by Elacridar and Imazalil in human and mouse organic cation transporter OCT2. *International journal of molecular sciences*, 23(24), 15795.
- Kumar, A., & Dogra, S. (2008). Neuropathology and therapeutic management of Alzheimer's disease--An update. *Drugs of the Future*, 33(5), 433-446.
- Kumar, A., & Singh, A. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological reports*, 67(2), 195-203.
- Łapczuk-Romańska, J., Drożdżik, M., Oswald, S., & Drożdżik, M. (2023). Kidney Drug Transporters in Pharmacotherapy. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2856.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.
- Long, S., Benoist, C., & Weidner, W. (2023). World Alzheimer report 2023. Reducing dementia risk: never too early, never too late. *Alzheimer's Disease International (ADI): London, UK*, 7.
- Ma, X.-L., Chen, C., & Yang, J. (2005). Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(4), 500-512.
- Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Current drug targets*, 19(1), 38-54.
- Mansouri, A., Kowsar, R., Zakariazadeh, M., Hakimi, H., & Miyamoto, A. (2022). The impact of calcitriol and estradiol on the SARS-CoV-2 biological activity: A molecular modeling approach. *Scientific Reports*, 12(1), 717.
- Massoulié, J., Sussman, J., Bon, S., & Silman, I. (1993). Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Progress in brain research*, 98, 139-146.
- Mozaffarnia, S., Parsaee, F., Payami, E., Karami, H., Soltani, S., Rashidi, M. R., & Teimuri-Mofrad, R. (2019). Design, Synthesis and Biological Assessment of Novel 2-(4-Alkoxybenzylidene)-2, 3-dihydro-5, 6-dimethoxy-1H-inden-1-one Derivatives as hAChE and hBuChE Enzyme Inhibitors. *ChemistrySelect*, 4(32), 9376-9380.
- Mozaffarnia, S., Teimuri-Mofrad, R., & Rashidi, M.-R. (2020). Design, synthesis and biological evaluation of 2, 3-dihydro-5, 6-dimethoxy-1H-inden-1-one and piperazinium salt hybrid derivatives as hAChE and hBuChE enzyme inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 191, 112140.
- Nordberg, A., Ballard, C., Bullock, R., Darreh-Shori, T., & Somogyi, M. (2013). A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. *The primary care companion for CNS disorders*, 15(2), 26731.
- Pantaleão, S. Q., Fernandes, P. O., Gonçalves, J. E., Maltarollo, V. G., & Honorio, K. M. (2022). Recent advances in the prediction of pharmacokinetics properties in drug design studies: a review. *ChemMedChem*, 17(11), 202100542.
- Rudrapal, M., Khan, J., Dukhyil, A. A. B., Alarousy, R. M. I. I., Attah, E. I., Sharma, T., ... & Bendale, A. R. (2021). Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: Chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics. *Molecules*, 26(23), 71.
- Schmidt, S., Gonzalez, D., & Derendorf, H. (2010). Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(3), 1107-1122.
- Self, W. K., & Holtzman, D. M. (2023). Emerging diagnostics and therapeutics for Alzheimer disease. *Nature Medicine*, 1-13.

- Shallangwa, G. A., & Adeniji, S. E. (2021). Binding profile of protein–ligand inhibitor complex and structure based design of new potent compounds via computer-aided virtual screening. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 24, 100256 .
- Shang, A., Liu, H.-Y., Luo, M., Xia, Y., Yang, X., Li, H.-Y.,...& Gan, R.-Y. (2022). Sweet tea (*Lithocarpus polystachyus* rehd.) as a new natural source of bioactive dihydrochalcones with multiple health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(4), 917-934 .
- Singh, S., & Singh, J. (1993). Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. *Medicinal Research Reviews*, 13(5), 569-621 .
- Slámová, K., Kapešová, J., & Valentová, K. (2018). Sweet flavonoids: Glycosidase-catalyzed modifications. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2126 .
- Srivastava, S., Ahmad, R., & Khare, S. K. (2021). Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 216, 113320.
- Stanciu, G.D., Luca, A., Rusu, R.N., Bild, V., Beschea Chiriac, S.I., Solcan, C.,...& Ababei, D. C. (2019). Alzheimer's disease pharmacotherapy in relation to cholinergic system involvement. *Biomolecules*, 10(1), 40.
- Sun, M., Su, M., & Sun, H. (2018). Spectroscopic investigation on the interaction characteristics and inhibitory activities between baicalin and acetylcholinesterase. *Medicinal Chemistry Research*, 27(6), 1589-1598 .
- Szwajgier, D. (2013). Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(3-4), 125-132 .
- Szwajgier, D. (2014). Anticholinesterase activities of selected polyphenols—a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(1), 59-64 .
- Teague, S. J., Davis, A. M., Leeson, P. D., & Oprea, T. (1999). The design of leadlike combinatorial libraries. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(24), 3743-3748 .
- Tomassini, L., Ventrone, A., Frezza, C., Fabbri, A. M., Fortuna, S., Volpe, M. T., & Cometa, M. F. (2021). Phytochemical analysis of *Viburnum davidii* Franch. and cholinesterase inhibitory activity of its dihydrochalcones. *Natural Product Research*, 35(24), 5794-5800 .
- Trifan, A., & Luca, S. V. (2023). Phloretin: Advances on Resources, Biosynthesis Pathway, Bioavailability, Bioactivity, and Pharmacology. In J. Xiao (Ed.), *Handbook of Dietary Flavonoids* (pp. 1-31). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94753-8_26-1
- Veiga-Matos, J., Morales, A. I., Prieto, M., Remião, F., & Silva, R. (2023). Study Models of Drug–Drug Interactions Involving P-Glycoprotein: The Potential Benefit of P-Glycoprotein Modulation at the Kidney and Intestinal Levels. *Molecules*, 28(22), 7532 .
- Viet, M. H., Chen, C.-Y., Hu, C.-K., Chen, Y.-R., & Li, M. S. (2013). Discovery of dihydrochalcone as potential lead for Alzheimer's disease: in silico and in vitro study. *PloS one*, 8(11), e79151 .
- Vrbanac, J., & Slauter, R. (2017). ADME in drug discovery. In *A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development* (pp. 39-67). Elsevier .
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 217 .
- Xie, Y., Yang, W., Chen, X., & Xiao, J. (2014). Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure–activity relationship. *Food & Function*, 5(10), 2582-2589 .
- Yazdani, M., Glynn, S. L., Wright, J. L., & Hawi, A. (1998). Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharmaceutical research*, 15(9), 1490 .
- Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharmaceutical research*, 14, 763-766 .
- Yin, J., & Wang, J. (2016). Renal drug transporters and their significance in drug–drug interactions. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(5), 363-373 .
- Yu, S., He, M., Zhai, Y., Xie, Z., Xu, S., Yu, S.,...& Song, Y. (2021). Inhibitory activity and mechanism of trilobatin on tyrosinase: kinetics, interaction mechanism and molecular docking. *Food & Function*, 12(6), 2569-2579 .
- Yu, X.-Q., & Wilson, A. G. (2010). The role of pharmacokinetic and pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug discovery and development. *Future Medicinal Chemistry*, 2(6), 923-928 .
- Zakariazadeh, M., Barzegar, A., Soltani, S., & Aryapour, H. (2015). Developing 2D-QSAR models for naphthyridine derivatives against HIV-1 integrase activity. *Medicinal Chemistry Research*, 24, 2485-2504 .
- Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X.,...He, L., & Qin, S. (2021). Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *International journal of molecular sciences*, 2, 2(23), 12808.
- Zhong, H., Hao, L., Li, X., Wang, C., & Wu, X. (2020). Anti-inflammatory Role of Trilobatin on Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury through Activation of AMPK/GSK3β-Nrf2 Pathway. *Signa Vitae*, 16(2), 160.
- Zuo, A.-R., Yu, Y.-Y., Shu, Q.-L., Zheng, L.-X., Wang, X.-M., Peng, S.-H., ... & Cao, S.-W. (2014). Hepatoprotective effects and antioxidant, antityrosinase activities of phloretin and phloretin isonicotinyl hydrazone. *Journal of the Chinese Medical Association*, 77(6), 290-301.