



Semnan University



Research Article

Synthesis, Biological Investigation, and Docking Studies of Benzimidazole Derivatives as Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase Inhibitors

Maryam Rouhi¹, Sakineh Asghari¹, Zahra Ghanbarimasir*¹

Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 28/Sep/2023

Revised: 03/Jan/2024

Accepted: 06/Jan/2024

Keywords:

Benzimidazole, Piperazine, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Docking studies.

ABSTRACT

The cholinergic hypothesis is one of the hypotheses of Alzheimer's disease that shows the relationship between the onset and progression of the disease. One of the main ways to increase the level of acetylcholine is to inhibit cholinesterase enzymes. The benzimidazole core is very important in medicinal chemistry research due to its high affinity to various enzymes and protein receptors. The present study was conducted in the synthesis of benzimidazole derivatives with the aim of investigating butyrylcholinesterase (BuChE) and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity. In the first step of experimental study, the product 2-(chloromethyl)benzimidazole (**2**) was obtained, then the final three benzimidazole derivatives **3**, **4**, and **5** were synthesized from the reaction of 1 mmol 2-(Chloromethyl)benzimidazole and 1 mmol of piperazine or N-phenylpiperazine, and 2-phenylethan-1-amine, respectively. The structure of the prepared compounds was confirmed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and FT-IR spectroscopic methods. The ability of the compounds to inhibit AChE and BuChE was evaluated using Ellman's assay. The obtained results showed the significant inhibitory activities of these compounds. Among them, compound **5** with IC₅₀ = 0.28 μM showed the highest inhibition against BuChE enzyme. The inhibitory activity of compound **5** against BuChE was more than donepezil as a standard drug. In addition, the interaction of compound **5**, galantamine, and rivastigmine with BuChE enzyme was investigated using docking studies. In these studies, compound **5** with an energy value of -8.88 kcal/mol showed the best interaction with the active site of the receptor. According to the obtained results, compound **5** is the most promising compound for the development of benzimidazole derivatives against Alzheimer's disease.

DOI: <https://doi.org/10.22075/chem.2024.31585.2204>

© 2024 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

*.Corresponding author: Assistant Professor of Medicinal Chemistry. E-mail address: z.ghanbari@umz.ac.ir

How to cite this article: Rouhi, M., Asghari, S., & Ghanbari Masir, Z. (2024). Synthesis, biological investigation, and docking studies of benzimidazole derivatives as butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitors. *Applied Chemistry Today*, 19(71), 247-266. (in Persian)

سنتز، بررسی زیست‌شناختی و مطالعات داکینگ مشتقات بنزایمیدازول به عنوان

مهارکننده‌های آنزیم بوتیریل کولین استراز و استیل کولین استراز

مریم روحی، سکینه اصغری قراخیلی، زهرا قنبری مصیر*

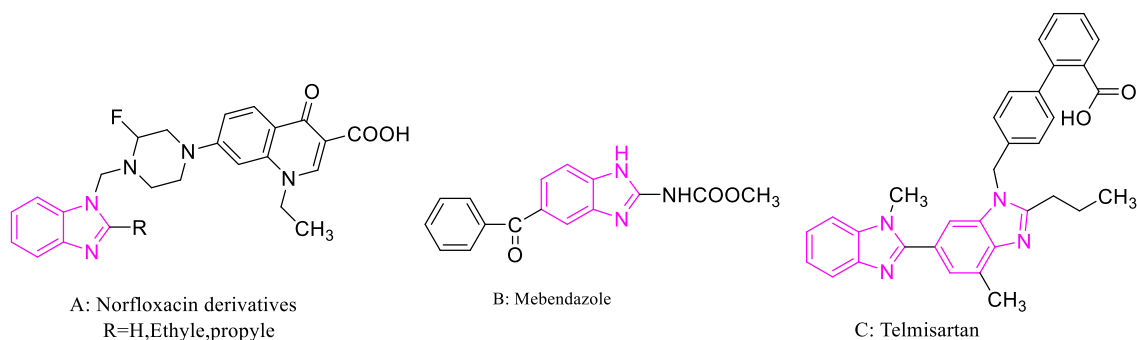
گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۷/۰۶	فرضیه کولینرژیک یکی از فرضیه‌های بیماری آلزایمر است که نشان دهنده رابطه بین شروع و پیشرفت بیماری است. یکی از راه‌های اصلی افزایش سطح استیل کولین مهار آنزیم‌های کولین استراز است. هسته بنزایمیدازول به دلیل تمایل زیاد به انواع آنزیم‌ها و گیرنده‌های پروتئینی در تحقیقات شیمی دارویی اهمیت زیادی دارد. مطالعه حاضر در راستای سنتز مشتقات بنزایمیدازول، با هدف بررسی فعالیت مهارکنندگی آنزیم‌های بوتیریل کولین استراز (BuChE) و استیل کولین استراز (AChE) انجام شد. در این مطالعه تجربی، ابتدا فراورده ۲-(کلرومتیل) بنزایمیدازول (۲) به دست آمد، سپس سه مشتق نهایی بنزایمیدازولی ۳، ۴ و ۵، به ترتیب از واکنش ۱ میلی‌مول از این فراورده و ۱ میلی‌مول پی‌پرازین یا <i>N</i> -فنیل پی‌پرازین و یا ۲-فنیل اتان-۱-آمین تهیه شدند. ساختار ترکیبات تهیه شده با روش‌های طیف‌سنجی ^{13}C - ^1H -NMR، FT-IR تأیید شدند. مهار آنزیم BuChE و AChE با استفاده از تست المن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تست، قدرت مهارکنندگی قابل توجه این ترکیبات را نشان داد. ترکیب ۵ با $IC_{50} = 0.28 \mu\text{M}$ بیشترین مهار را در مقابل آنزیم BuChE نشان داد. فعالیت مهارتی ترکیب ۵ در برابر BuChE بهتر از دونیزیل بود. علاوه بر این، برهمکنش ترکیب ۵، داروهای گلاتتامین و ریواستیگمین با آنزیم BuChE با استفاده از مطالعات داکینگ مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعات نیز ترکیب ۵ با میزان انرژی -8.88 kcal/mol بهترین برهمکنش را با جایگاه فعال گیرنده نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده، ترکیب ۵ امیدوارکننده‌ترین ترکیب برای توسعه مشتقات بنزایمیدازول در مقابل بیماری آلزایمر می‌باشد.
بازنگری مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۱۳	
پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۱۶	
کلمات کلیدی: بنزایمیدازول، پی‌پرازین، استیل کولین استراز، بوتیریل کولین استراز، مطالعات داکینگ.	

DOI: <https://doi.org/10.22075/chem.2024.31585.2204>This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

۱- مقدمه

بنزایمیدازول یک فارماکوفور مهم و یک ساختار شناخته‌شده در شیمی دارویی است، لذا در داروسازی کاربردهای بالقوه و محقق‌شده‌ای در ساخت داروها دارد. ساختار برخی مشتقات با خواص دارویی در زیر آمده است. برای مثال ترکیب A به‌عنوان آنتی‌بیوتیک [۱]، ترکیب B به‌عنوان ضدانگل [۲] و ترکیب C به‌عنوان ضد فشارخون [۳] شناخته‌شده است.



بیماری آلزایمر عاملی خطر آفرین برای نسل بشر می‌باشد. نخستین بار روان‌پزشک آلمانی به نام آلویز آلزایمر (Alois Alzheimer) در سال ۱۹۰۶ میلادی این بیماری چاره‌نشدنی را عنوان کرد. این بیماری یک اختلال عصبی است که با اختلالات شناختی متعدد مانند از دست دادن حافظه و مشکلات در یادگیری و یا تفکر مشخص می‌شود. بیماری آلزایمر با افزایش سن نمود پیدا می‌کند و عوامل ژنتیکی در آن نقش به‌سزایی دارند. در این بیماری اختلالات شناختی متعددی مانند از دست دادن حافظه و مشکلات در یادگیری و یا تفکر بروز می‌کند که معمولاً اختلالات حافظه‌ای تدریجی به وجود می‌آید و رشد می‌کند. در شروع بیماری، این اختلال رویدادهای اخیر را تحت تاثیر قرار می‌دهد ولی به‌مرور رویدادهای مربوط به گذشته هم دچار آسیب می‌شوند. چنین اختلال‌هایی، آسیب‌های اجتماعی و فردی فراوانی به بیمار وارد کرده و همین امر فرد بیمار را در معرض ابتلا به افسردگی و سایر بیماری‌های روحی قرار می‌دهد. معمولاً این اختلال در اشخاص بالای ۶۵ سال رخ می‌دهد [۴ و ۵]. علاوه بر زمینه ژنتیکی، عللی از جمله تجزیه پروتئین بتا آمیلوئید (Amyloid beta)، تجمع اجسام نوروفیبریلاری (Neurofibrillary Tangles)، کاهش فعالیت نورونی، آسیب سیناپسی و کاهش فعالیت کولینرژیک (Cholinergic) در نقاط خاصی از مغز هم می‌توانند در بروز آلزایمر نقش داشته باشند [۶].

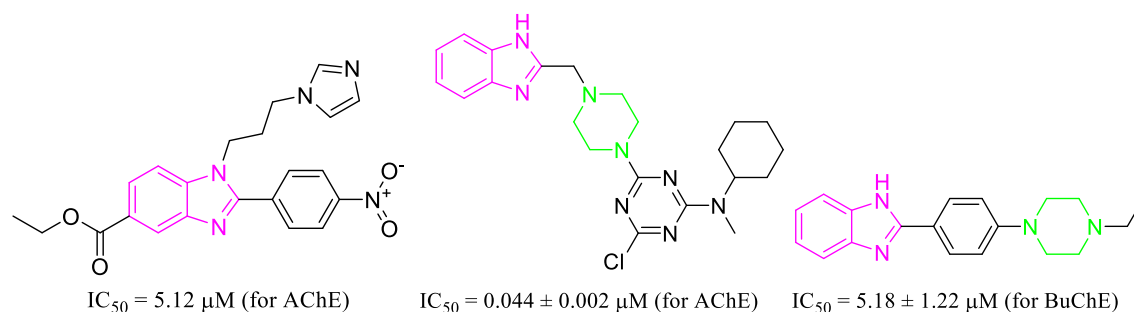
فرضیه‌های بی‌شماری برای تبیین این اختلال چند عاملی بر اساس عوامل ایجاد کننده مختلف مطرح شده‌است. یکی از این فرضیه‌ها، فرضیه کولینرژیک می‌باشد. کاهش سنتز انتقال‌دهنده عصبی استیل‌کولین خود موجب بیماری آلزایمر می‌شود. استیل‌کولین یکی از مواد شیمیایی است که سلول‌های عصبی (نورون‌ها) برای برقراری ارتباط با یکدیگر استفاده می‌کنند. این انتقال‌دهنده عصبی نقشی اساسی در عملکرد حافظه و فرایندهای یادگیری دارد. بیماری آلزایمر با کمبود انتقال‌دهنده عصبی استیل‌کولین در هیپوکامپ و قشر مغزی ارتباط تنگاتنگی دارد [۷].

فعالیت کم سیستم کولینرژیک که موجب بیماری آلزایمر می‌شود، به‌وسیله داروهایی که محل اثر آن‌ها آنزیم استیل‌کولین‌استراز است قابل درمان می‌باشد؛ بنابراین، مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز یک استراتژی امیدوار کننده در درمان بیماری آلزایمر در نظر گرفته می‌شود. در حال حاضر، دونپزیل (با نام تجاری Aricept)، گالانتامین (با نام تجاری Reminyl) و ریواستیگمین (با نام

تجاری Exelon)، به طور گسترده‌ای در درمان علائم بیماری آلزایمر استفاده می‌شود؛ اما اثربخشی این داروها با عوارض جانبی مانند اختلالات گوارشی، سمیت کبدی و افت فشار خون همراه می‌باشد [۸-۱۰].

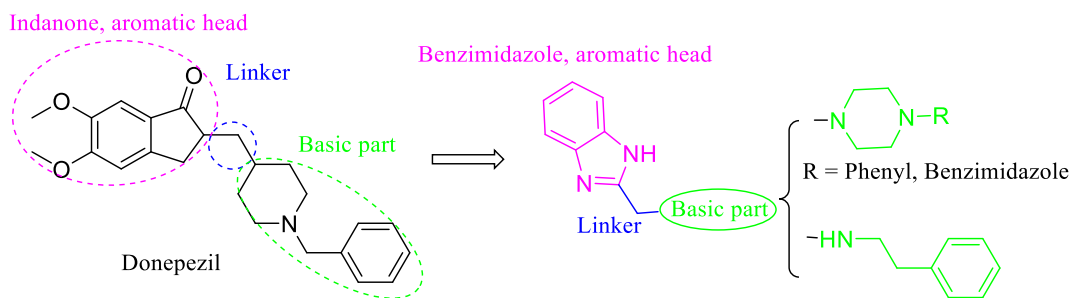
مانند استیل کولین استراز، بوتیریل کولین استراز (BChE) ناقل عصبی استیل کولین (ACh) را غیرفعال می‌کند و از این رو یک هدف درمانی مناسب در بیماری آلزایمر است که با کمبود کولینرژیک مشخص می‌شود [۱۱].

با توجه به این‌که بیماری آلزایمر، در عصر حاضر مشکلات عمده‌ای را برای انسان‌ها و خصوصا سالمندان ایجاد کرده است، سنتز داروهای جدید برای درمان آن همواره مورد توجه محققین بوده است. ترکیبات با هسته بنزایمیدازول به منظور مهار آنزیم کولین استراز با هدف درمانی بیماری آلزایمر مورد بررسی محققان قرار گرفته و نتایج مطلوبی را نشان داده‌اند. ساختار شیمیایی تعدادی از این ترکیبات در زیر نشان داده شده است [۱۲-۱۴].



پی‌پرازین یکی از هتروسیکل‌های ممتاز در شیمی دارویی است که به طور گسترده در ساخت عوامل فعال بر سیستم عصبی مرکزی (CNS) استفاده می‌شود [۱۵]. بسیاری از ساختارهای هیبریدی مبتنی بر پی‌پرازین به عنوان بازدارنده کولین استرازها برای درمان AD سنتز شده‌اند [۱۶ و ۱۷]. علاوه بر این، هیبریدهای پی‌پرازین نشان داده‌اند که نفوذپذیری خوبی در CNS و همچنین خواص محافظت کننده عصبی و آنتی اکسیدانی دارند [۱۸]. همه این یافته‌ها موجب شده است که پی‌پرازین به عنوان فارماکوفور دوم، برای ترکیب با بنزایمیدازول انتخاب شود.

در این مطالعه ساختار شیمیایی داروی دونپزیل به عنوان ترکیب راهنما مورد توجه قرار گرفته است. دونپزیل از دی متوکسی ایندانون تشکیل شده است که از طریق یک پیوند اتصال دهنده متیلن به *N*-بنزیل پی‌پریدین متصل می‌شود. این ترکیب دارای سه بخش اصلی شامل حلقه آروماتیک (ایندانون)، اتصال دهنده آلیفاتیک (متیلن) و بخش بازی (بنزیل پی‌پریدین) می‌باشد. در طراحی ترکیبات به جای حلقه ایندانون از حلقه بنزایمیدازول و از گروه‌های فنیل پی‌پرازین، بنزایمیدازول پی‌پرازین و فنیل اتیل آمین در بخش بازی استفاده شده است.



از این رو در این تحقیق مشتقاتی از بنزایمیدازولها سنتز و توانایی این ترکیبات، در مهار آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز که از عوامل بروز بیماری آلزایمر می باشد، بررسی شده است.

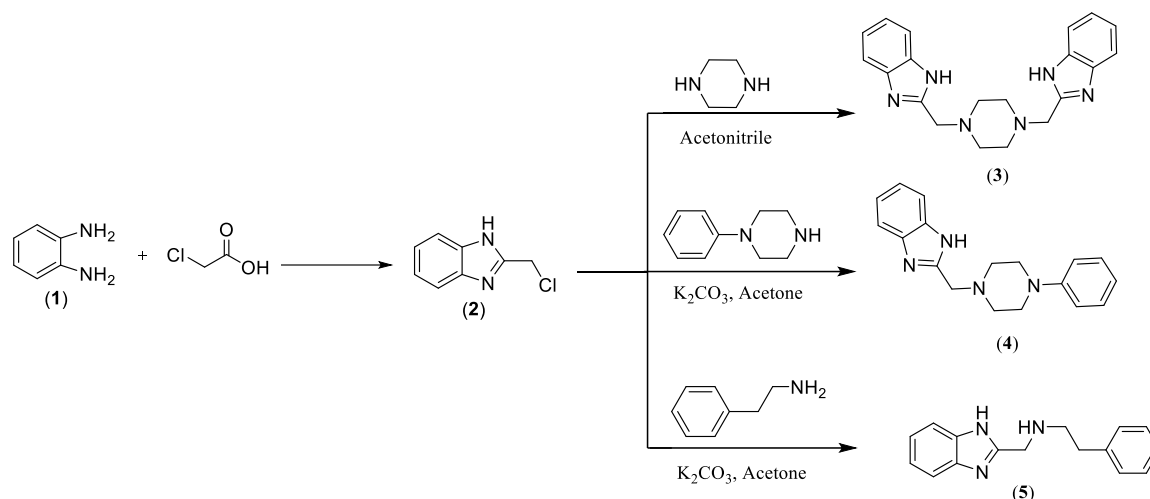
۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و تجهیزات

تمامی مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان و سیگما آلدریج خریداری شده و بدون خالص سازی مورد استفاده قرار گرفته است. نقطه ذوب مواد به وسیله دستگاه IA9100 از شرکت Electrothermal ثبت گردید. طیف مادون قرمز با استفاده از دستگاه طیف سنج FT-IR مدل VECTOR22 از شرکت BRUKER و طیف رزونانس مغناطیسی ¹H و ¹³C ترکیبات سنتز شده، با استفاده از دستگاه طیف سنج (400.13, 100.16 MHz) NMR از شرکت BRUKER تهیه شد.

۲-۲- سنتز ترکیبات

سنتز ترکیبات مورد نظر در شمای ۱ آورده شده است. روند پیشرفت هر مرحله از واکنش ها به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) تعقیب شده است. ساختار محصولات به دست آمده در هر مرحله بعد از خالص سازی، با استفاده از روش های مختلف اسپکتروسکوپی ¹H-NMR, ¹³C-NMR و FT-IR تعیین شد [۱۹ و ۲۰]. سرانجام پس از تأیید ساختار شیمیایی ترکیبات تهیه شده، اثرات زیست شناختی آن ها از روی فعالیت مهارکنندگی ترکیبات بر روی آنزیم بوتیریل کولین استراز و استیل کولین- استراز از طریق تست المن (Ellman's assay) ارزیابی شد.



شماى ۱: سنتز مشتقات بنزایمیدازول

۲-۲-۱- روش سنتز ۲-(کلرومتیل)بنزایمیدازول (۲)

از واکنش بین اورتوفیلین دی‌آمین (۱) و کلرواستیک اسید، فرآورده ۲-(کلرومتیل) بنزایمیدازول (۲) به دست آمد [۲۱]. مقدار ۱۰ میلی‌مول (۱/۰۸ گرم) اورتوفیلین دی‌آمین (۱) در ۵ میلی لیتر HCl (۵ نرمال) حل شد. سپس ۱۳ میلی‌مول (۱/۲۲۸ گرم) کلرو استیک اسید به محلول اضافه شد و واکنش به مدت ۳ ساعت بازروانی شد. تغییر رنگ محلول از بی‌رنگ به زرشکی، نشان‌دهنده انجام واکنش است. پس از اتمام واکنش، pH محلول با افزودن سود ۲۰ درصد و در ادامه به وسیله محلول سدیم-بی‌کربنات اشباع، خنثی شد. فرآورده ۲ با حلال استن به شکل بلورهای زرد پرتقالی نوبلور گشت.

۲-۲-۲- روش سنتز ۴،۱-بیس(۱H-بنزو[d]ایمیدازول-۲-یل)متیل)پی‌پیرازین (۳)

از واکنش جانیشینی هسته‌دوستی، بین ۲-(کلرومتیل) بنزایمیدازول (۲) و پی‌پیرازین، فرآورده (۳) حاصل شد. مقدار ۳ میلی‌مول (۰/۲۵۸ گرم) پی‌پیرازین در ۲۰ میلی لیتر استونیتریل حل شد. سپس ۱ میلی‌مول (۰/۱۶۶ گرم) ۲-(کلرو متیل) بنزایمیدازول (۲) در ۱۰ میلی لیتر استونیتریل حل و به آرامی به ظرف واکنش اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق همزده شد که طی واکنش رسوب قهوه‌ای رنگی در ظرف واکنش تشکیل شد که به وسیله کاغذ صافی جدا و سپس در حلال اتانول نوبلور شد. سرانجام فرآورده خالص (۳) به صورت رسوب قهوه‌ای روشن به دست آمد.

۲-۲-۳- روش سنتز ۲-(۴-فنیل پی‌پیرازین-۱-یل)متیل)بنزو[d]ایمیدازول (۴)

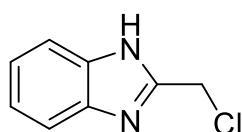
از واکنش جانیشینی هسته‌دوستی، بین ۲-(کلرومتیل)بنزایمیدازول (۲) و *N*-فنیل پی‌پیرازین، محصول ۲-(۴-فنیل پی‌پیرازین-۱-یل)متیل)بنزو[d]ایمیدازول (۴) حاصل شده است. مقدار ۱ میلی‌مول (۰/۱۵۷ میلی لیتر) *N*-فنیل پی‌پیرازین (۲) در ۲۰ میلی لیتر استن حل و ۱ میلی‌مول (۰/۱۳۹ گرم) پتاسیم کربنات به آن اضافه شد. سپس ۱ میلی‌مول (۰/۱۶۶ گرم) ۲-(کلرو

متیل)بنزایمیدازول (۲) به ظرف واکنش اضافه شد. محلول به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق همزده شد که فرآورده واکنش به صورت رسوب سفیدرنگی در ظرف واکنش تشکیل شد که با استفاده از کاغذ صافی از محلول آن جدا شد.

۲-۲-۴- روش *N*-(۱H-بنزو[d]ایمیدازول-۲-یل)متیل-۲-فنیل اتان-۱-آمین (۵)

از واکنش ۲-فنیل اتان-۱-آمین با ۲-(کلرومتیل) بنزایمیدازول (۲)، محصول (۵) به دست آمد. ۱ میلی مول (۰/۱۲۵ میلی لیتر) ۲-فنیل اتان-۱-آمین در ۲۰ میلی لیتر استون حل و در ادامه ۱ میلی مول (۰/۱۳۹ گرم) پتاسیم کربنات به آن اضافه شد. سپس ۱ میلی مول ۲-(کلرو متیل) بنزایمیدازول (۲) به مخلوط واکنش افزوده و مخلوط حاصل به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق همزده شد. پس از اتمام واکنش، حلال واکنش به وسیله دستگاه تبخیرکن چرخان در فشار کم خارج شد. پس از تبخیر حلال، به ماده باقیمانده اتیل استات اضافه شد. فاز اتیل استات به وسیله محلول سدیم بی کربنات اشباع شستشو داده شد تا ناخالصها وارد فاز آبی شود. در ادامه فاز آبی با استفاده از سدیم سولفات انیدرید خشک و به وسیله تبخیرکن چرخان حلال از محیط خارج شد. ماده‌ای صمغ مانند بر جا ماند که با افزودن حلال پنتان به آن، فرآورده واکنش به صورت رسوب شیری رنگ ته نشین و با استفاده از کاغذ صافی جدا شد.

۲-۳- نام ترکیبات شیمیایی، بازده واکنش، نقطه ذوب و اطلاعات طیفی



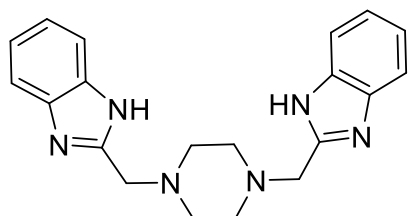
2-(chloromethyl)-1H-benzo[d]imidazole

Yield: 70%; mp: 142-145 °C

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{max} 3169 (NH), 3003 ($\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$), 2942 ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$), 1443 ($\text{C}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 740 (C-Cl).

^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6) δ : 4.93 (2H, s, CH_2), 7.20-7.23 (2H, m, 2CH_{Ar}), 7.56-7.58 (2H, m, 2CH_{Ar}), 12.70 (1H, brs, NH).

^{13}C NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6) δ : 38.3 (CH_2), 115.7 (2CH_{arom}), 123.2 (2CH_{arom}), 138.2 (2C_q) and 150.0 (C_q).



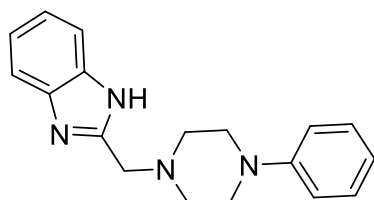
1,4-bis((1H-benzo[d]imidazol-2-yl) methyl)piperazine

Yield: 60%; mp: 260-263 °C

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{max} 3208 (NH), 2947 ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$), 1624 (C=N), 1460 ($\text{C}=\text{C}_{\text{Ar}}$).

^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.33 (4H, s, 2CH₂), 7.11-7.15 (4H, m, 4CH_{Ar}), 7.48 (4H, brs, 4CH_{Ar}), 12.25 (2H, brs, 2NH).

^{13}C NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6) δ : 53.1 (4CH₂), 56.2 (2CH₂), 115.4 (4CH_{arom}), 122.5 (4CH_{arom}), 136.3 (4C_q) and 152.1 (2C_q).



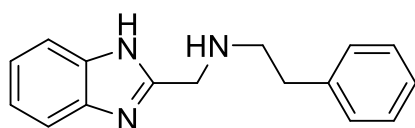
2-((4-phenylpiperazin-1-yl)methyl)-1H-benzo[d]imidazole

Yield: 80%; mp: 265-268 °C

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{max} 3442 (NH), 3055 (C_{sp2}-H), 2939 (C_{sp3}-H), 1630 (C=N), 1426 (C=C_{Ar}).

^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.62 (4H, t, $^3J_{\text{HH}}=4.8$ Hz, 2CH₂), 3.16 (4H, t, $^3J_{\text{HH}}=4.8$ Hz, 2CH₂), 3.78 (2H, s, CH₂), 6.76 (1H, t, $^3J_{\text{HH}}=7.6$ Hz, CH_{Ar}), 6.92 (2H, d, $^3J_{\text{HH}}=7.6$ Hz, 2CH_{Ar}), 7.12-7.16 (2H, m, 2CH_{Ar}), 7.20 (2H, t, $^3J_{\text{HH}}=7.6$ Hz, 2CH_{Ar}), 7.49-7.51 (2H, m, 2CH_{Ar}), 12.41 (1H, brs, NH).

^{13}C NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6) δ : 48.6 (2 N-CH₂), 53.2 (2 N-CH₂), 56.2 (N-CH₂), 115.8 (3 CH_{Ar}), 119.3 (C_q), 121.8 (C_q), 129.4 (3 CH_{Ar}), 151.5 (C_q), 152.0 (C_q).



N-((1H-benzo[d]imidazol-2-yl)methyl)-2-phenylethan-1-amine

Yield: 65%; mp: 250-253 °C

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{max} 3401 (NH), 3057 (C_{sp2}-H), 2922 (C_{sp3}-H), 1433 (C=C_{Ar}).

^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.75-2.80 (4H, m, 2CH₂), 3.93 (1H, s, NH), 4.08 (2H, s, CH₂), 7.10-7.28 (7H, m, 7CH_{Ar}), 7.52 (2H, brs, 2CH_{Ar}), 12.34 (1H, brs, NH).

^{13}C NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6) δ : 36.3 (CH₂), 52.3 and 56.2 (3 N-CH₂), 116.6, 119.0, 122.3, 126.3, 128.7, 129.0, 129.1, 140.4, 140.7, 153.0 and 154.8 (C_{Ar}).

۲-۴-تست المن

بررسی فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز با استفاده از تست المن انجام شد [۲۲]. پنج غلظت مختلف از هر ترکیب برای به دست آوردن محدوده ۲۰ الی ۸۰ درصد مهار آنزیم مورد آزمایش قرار گرفت. مخلوطی از بافر فسفات (۱/۱ مول در لیتر، pH = ۸/۰، ۳ میلی لیتر)، ۵،۵-دی تیوبیس (۲-نیتروبنزوتیک اسید) (DTNB، ۱۰۰ میکرولیتر)، استیل کولین استراز یا بوتیریل کولین استراز و محلول ترکیب (۱۰۰ میکرولیتر) به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس سوسترا (استیل تیوکولین یدید) اضافه شد. شاهد حاوی تمام اجزا بدون آنزیم برای واکنش غیر آنزیمی است. تغییرات جذب در ۴۱۲ نانومتر به مدت ۶ دقیقه در دمای

۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از طیف سنج پرتو دوگانه UV Unico اندازه‌گیری شد [۲۳]. همه آزمایشات در سه تکرار انجام شد. برای تعیین مقادیر IC₅₀ پنج غلظت مختلف از هر ترکیب تهیه شد. درصد بازداری هر غلظت اندازه‌گیری، سپس درصد بازداری در مقابل لگاریتم غلظت رسم شد. مقدار IC₅₀ به عنوان غلظتی که ۵۰ درصد مهار را بیان می‌کند، محاسبه شد.

۲-۵- محاسبات داکینگ مولکولی

ساختار پروتئین سه بعدی BChE انسانی از بانک اطلاعات پروتئین (PDB ID: 4TPK) دانلود شد [۲۴-۲۸]. زنجیره A به عنوان گیرنده هدف انتخاب شد. ساختار شیمیایی لیگاندها با استفاده از برنامه ChemDraw Professional 16.0 ترسیم و توسط برنامه Chem 3D به مختصات سه بعدی تبدیل شد و سطح انرژی لیگاندها توسط میدان نیروی MM2 در این برنامه بهینه گشت. در نهایت این فایل با فرمت pdb ذخیره و به عنوان ورودی نرم افزار AutoDock Tools 4.2 مورد استفاده قرار گرفت [۲۹]. جعبه‌گرید (Grid box) با اندازه ۶۰ × ۶۰ × ۶۰ انتخاب شد. مختصات مرکز ثقل لیگاند کریستالوگرافی موجود در جایگاه اتصال به عنوان مرکز جعبه‌گرید تعیین شد. پس از انجام محاسبات داکینگ، بهترین صورت‌بندی با پایین‌ترین میزان انرژی آزاد اتصال، انتخاب و در نهایت برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبی توسط نرم افزار Discovery Studio 4.5 مورد آنالیز قرار گرفت [۳۰].

۳-۳- بحث و نتیجه‌گیری

۳-۱-۳- بررسی طیف ترکیبات سنتزی

۳-۱-۳-۱- بررسی طیف ۲-(کلرومتیل) بنزایمیدازول (۲)

طیف FT-IR این ترکیب، ارتعاشات کششی پیوند C-Cl را در 740 cm^{-1} ، پیوند C=C حلقه آروماتیک را در 1443 cm^{-1} ، پیوندهای C_{sp³}-H و C_{sp²}-H را در ناحیه‌های 3003 cm^{-1} و 2942 cm^{-1} و پیوند H-N را در 3169 cm^{-1} نشان می‌دهد. طیف ¹H NMR این ترکیب در دمای اتاق، یک پیام یکتایی برای پروتون‌های متیلن در $4/93\text{ ppm}$ ، دو پیام چندتایی متفاوت، برای هیدروژن‌های آروماتیک در ناحیه‌های $7/23-7/20\text{ ppm}$ و نیز $7/58-7/56\text{ ppm}$ و همچنین یک پیام پهن برای NH بنزایمیدازولی در $12/70\text{ ppm}$ نشان می‌دهد.

طیف ¹³C NMR این ترکیب در دمای اتاق، یک پیام برای کربن متیلن در $38/3\text{ ppm}$ ، دو پیام متفاوت برای چهار کربن CH_{Ar} یکی در $115/7\text{ ppm}$ و دیگری در $123/2\text{ ppm}$ ، یک پیام برای دو کربن نوع چهارم حلقه در $138/2\text{ ppm}$ و همچنین یک پیام برای کربن نوع چهارم متصل به هترو اتم N در $150/0\text{ ppm}$ نشان می‌دهد.

۳-۱-۳-۲- بررسی طیف ۴،۱-بیس ((H-بنزو [d] ایمیدازول-۲-یل) متیل) پی‌پیرازین (۳)

طیف FT-IR این ترکیب یک پیام برای C=C_{Ar} در 1460 cm^{-1} ، یک پیام برای C=N در 1624 cm^{-1} ، پیک مربوط به پیوندهای (C_{sp³}-H) در 2947 cm^{-1} و پیام مربوط به NH را در 3208 cm^{-1} نشان می‌دهد.

طیف $^1\text{H NMR}$ این ترکیب در دمای اتاق، یک پیام یکتایی برای پروتون های متیلن در $3/33$ ppm، یک پیام چندتایی مربوط به دو پروتون CH_{Ar} در محدوده $7/15 - 7/11$ ppm، یک پیام پهن مربوط به دو پروتون CH_{Ar} در $7/48$ ppm و یک پیام پهن مربوط به NH بنزایمیدازول در $12/25$ ppm نشان می دهد.

طیف $^{13}\text{C NMR}$ این ترکیب در دمای اتاق، یک پیام مربوط به گروه متیلن در $53/1$ ppm، یک پیام دیگر مربوط به دو گروه متیلن دیگر در $56/2$ ppm، دو پیام متفاوت برای هشت گروه CH حلقه بنزنی یکی در $115/4$ ppm و دیگری در $122/5$ ppm، دو پیام برای کربن نوع چهارم یکی در $136/3$ ppm و دیگری مربوط به دو کربن متصل به هترواتم N در $152/1$ ppm نشان می دهد.

۳-۱-۳- بررسی طیف ۲-(۴-فنیل پیپیرازین-۱-یل) متیل-۱H-بنزو[d]ایمیدازول (۴)

طیف FT-IR این ترکیب یک پیام برای $\text{C}=\text{C}_{\text{Ar}}$ در 1426 cm^{-1} ، یک پیام برای $\text{C}=\text{N}$ در 1630 cm^{-1} ، دو پیک مربوط به پیوندهای $(\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}})$ و $(\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}})$ در ناحیه های 3055 و 2939 cm^{-1} و یک پیام مربوط به NH را در 3422 cm^{-1} نشان می دهد.

طیف $^1\text{H NMR}$ این ترکیب در دمای اتاق، دو پیام سه تایی با ثابت جفت شدن $^3J_{\text{HH}}=4/8$ Hz یکی در ناحیه $2/62$ ppm و دیگری در ناحیه $3/16$ ppm برای هیدروژن های متیلنی، یک پیام یکتایی در ناحیه $3/78$ ppm برای هیدروژن های متیلنی دیگر، یک پیام سه تایی با ثابت جفت شدن $^3J_{\text{HH}}=7/6$ Hz در ناحیه $6/76$ ppm برای پروتون CH_{Ar} حلقه بنزنی، یک پیام دوتایی با ثابت جفت شدن $^3J_{\text{HH}}=7/6$ Hz در ناحیه $6/92$ ppm برای دو پروتون CH_{Ar} حلقه بنزنی، یک پیام چندتایی در محدوده $7/12 - 7/16$ ppm برای دو پروتون CH_{Ar} حلقه بنزنی، یک پیام سه تایی با ثابت جفت شدن $^3J_{\text{HH}}=7/6$ Hz در ناحیه $7/20$ ppm برای دو پروتون CH_{Ar} حلقه بنزنی، یک پیام چندتایی در محدوده $7/49 - 7/51$ ppm برای دو پروتون CH_{Ar} حلقه بنزنی و همچنین یک پیام پهن برای NH بنزایمیدازول در ناحیه $12/41$ ppm نشان می دهد.

طیف $^{13}\text{C NMR}$ این ترکیب در دمای اتاق، یک پیام برای دو کربن N- CH_2 در ناحیه $48/6$ ppm، یک پیام برای دو کربن N- CH_2 در ناحیه $53/2$ ppm، یک پیام دیگر برای یک کربن N- CH_2 در ناحیه $56/2$ ppm، یک پیام برای سه کربن CH_{Ar} در ناحیه $115/8$ ppm، دو پیام متفاوت برای کربن نوع چهارم یکی در ناحیه $119/3$ ppm و دیگری در ناحیه $121/8$ ppm، یک پیام برای سه کربن CH_{Ar} در ناحیه $129/4$ ppm، دو پیام متفاوت برای کربن نوع چهارم یکی در ناحیه $151/5$ ppm و دیگری در ناحیه $152/0$ ppm نشان می دهد.

۴-۱-۳- بررسی طیف ۲-(۱H-بنزو[d]ایمیدازول-۲-یل) متیل-۲-فنیل اتان-۱-آمین (۵)

طیف FT-IR این ترکیب یک پیام برای $\text{C}=\text{C}_{\text{Ar}}$ در 1433 cm^{-1} ، دو پیک مربوط به پیوندهای $(\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}})$ و $(\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}})$ در ناحیه های 3057 و 2922 cm^{-1} و یک پیام مربوط به NH را در 3401 cm^{-1} نشان می دهد.

طیف $^1\text{H NMR}$ این ترکیب در دمای اتاق، یک پیک چندتایی در محدوده ppm ۲/۷۵-۲/۸۰ مربوط به دو متیلن، یک پیام یکتایی در ناحیه ppm ۳/۹۳ برای NH، یک پیام یکتایی در ناحیه ppm ۴/۰۸ برای پروتون های متیلن، یک پیام چندتایی در محدوده ppm ۷/۷-۱۰/۲۸ برای CH_{Ar} حلقه بنزی، یک پیام پهن در ناحیه ppm ۷/۵۲ برای CH_{Ar} و همچنین یک پیام پهن در ناحیه ppm ۱۲/۳۴ برای NH بنزایمیدازول نشان می دهد.

طیف $^{13}\text{C NMR}$ این ترکیب در دمای اتاق، یک پیام برای متیلن در ناحیه ppm ۳۶/۳، دو پیام مربوط به سه CH_2 متصل به هترواتم N یکی در ppm ۵۲/۳ و دیگری در ppm ۵۶/۲ و همچنین پیام های مربوط به کربن حلقه بنزی در ppm ۱۱۶/۶، ۱۱۹/۰، ۱۲۲/۳، ۱۲۶/۳، ۱۲۸/۷، ۱۲۹/۰، ۱۲۹/۱، ۱۴۰/۴، ۱۴۰/۷، ۱۵۳/۰ و ۱۵۴/۸ نشان می دهد.

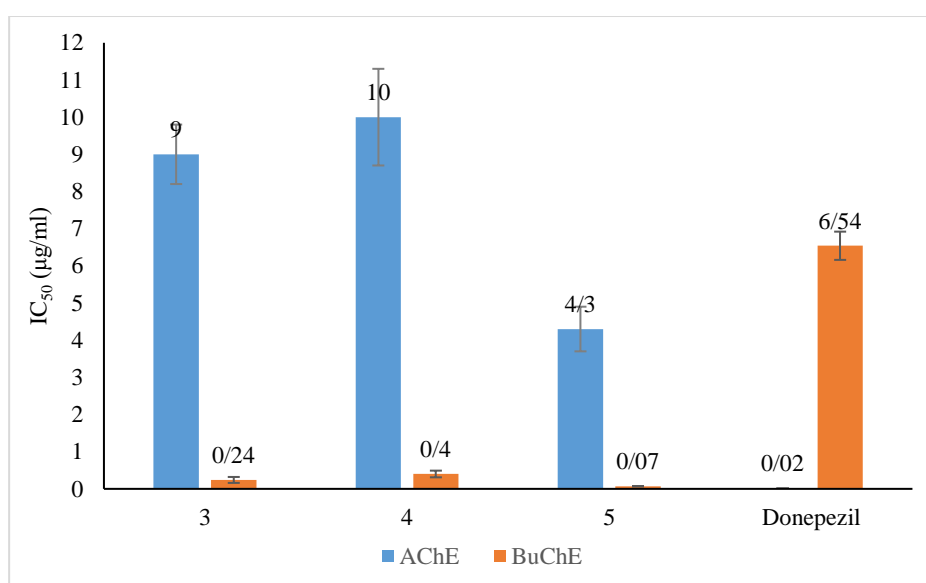
۳-۲- بررسی فعالیت ترکیبات در مهار آنزیم های AChE و BuChE

دو آنزیم AChE و BuChE در سیگنال دهی کولینرژیک نقش دارند. BuChE می تواند استیل کولین را هیدرولیز کرده و به این ترتیب در صورت کاهش سطح AChE، نقش آن را جبران کند. در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر، سطوح AChE کاهش می یابد، در حالی که سطوح BuChE طبق گزارش ها افزایش یافته یا بدون تغییر است و تغییرات در طول دوره بیماری بارزتر می شوند [۳۱]. از آنجا که روش المن یکی از روش های عمومی در تعیین توانایی ترکیبات در مهار آنزیم های AChE و BuChE می باشد که از دقت بالایی نیز برخوردار است، لذا از این روش جهت تعیین مقدار مهار آنزیمی استفاده شده است. میزان بازدارندگی آنزیم های AChE و BuChE هر ترکیب با استفاده از روش رنگ سنجی المن در میکرو پلیت های ۹۶ خانه ای و استفاده از فرمول محاسبه IC_{50} تعیین شده است. نتایج مقادیر فعالیت مهار کنندگی سه ترکیب سنتزی در جدول ۲ آمده است. ترکیب ۳ با بخش بنزایمیدازول-متیل-پی پرازین متصل به اسکلت اصلی بنزایمیدازول مهار $۱۰/۰ \pm ۱/۳$ و $۹/۰ \pm ۰/۸$ و $۰/۲۴ \pm ۰/۰۸$ میکروگرم بر میلی لیتر و ترکیب ۴ با بخش فنیل پی پرازینی متصل به بنزایمیدازول مهار $۱۰/۰ \pm ۱/۳$ و $۰/۴۰ \pm ۰/۰۹$ میکروگرم بر میلی لیتر و ترکیب ۵ با بخش فنیل اتیل آمین مهار $۴/۳ \pm ۰/۶$ و $۰/۰۷ \pm ۰/۰۰۶$ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب در مقابل AChE و BuChE نشان دادند. این نتایج بر حسب میکرومولار برای سه ترکیب ۳، ۴ و ۵ به ترتیب ۲۵/۹۸، ۳۴/۲۲ و ۱۷/۱۱ در برابر AChE و ۰/۶۹، ۱/۳۷ و ۰/۲۸ در برابر BuChE بودند. فعالیت مهار داروی استاندارد دونپزیل هم مقادیر $۰/۰۵۳$ و $۱۷/۲۳$ میکرومولار به ترتیب در مقابل AChE و BuChE می باشد.

جدول ۲. نتایج مقادیر IC_{50} آنزیم AChE و BuChE سه ترکیب سنتزی ۳، ۴، ۵ و داروی دونپزیل

ترکیبات	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
	AChE	BuChE
۳	$۹/۰ \pm ۰/۸$	$۰/۲۴ \pm ۰/۰۸$
۴	$۱۰/۰ \pm ۱/۳$	$۰/۴۰ \pm ۰/۰۹$
۵	$۴/۳ \pm ۰/۶$	$۰/۰۷ \pm ۰/۰۰۶$
دونپزیل	$۰/۰۲۰ \pm ۰/۰۰۱$	$۶/۵۴ \pm ۰/۳۸$

در بین مشتقات تست شده، ترکیب ۵ با دارا بودن مقادیر ۴/۳ و ۰/۰۷ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب بر روی آنزیم‌های AChE و BuChE، بیشترین قدرت مهارکنندگی را نشان داده است. مقایسه ستون دوم و سوم جدول ۲ نشان می‌دهد که این قدرت مهارکنندگی در مقابل آنزیم BuChE بیشتر بوده است. با توجه به مقادیر IC_{50} ، ترکیب ۵ دارای قدرت مهارکنندگی بیشتر در مقابل آنزیم BuChE است. همچنین در مورد برتری ساختار ۵ به نظر می‌رسد که فعالیت مهارکنندگی بیشتر ترکیب ۵، ناشی از جایگزین شدن ساختار حلقوی پی‌پیرازین با ساختاری خطی آمین باشد، که برهمکنش آن را با آنزیم تسهیل می‌کند. برای مطالعات داکینگ ترکیب ۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودار ۱ مقایسه میزان IC_{50} آنزیم AChE و BuChE سه ترکیب تهیه شده ۳، ۴، ۵ و داروی استاندارد دونپزیل را نشان می‌دهد.

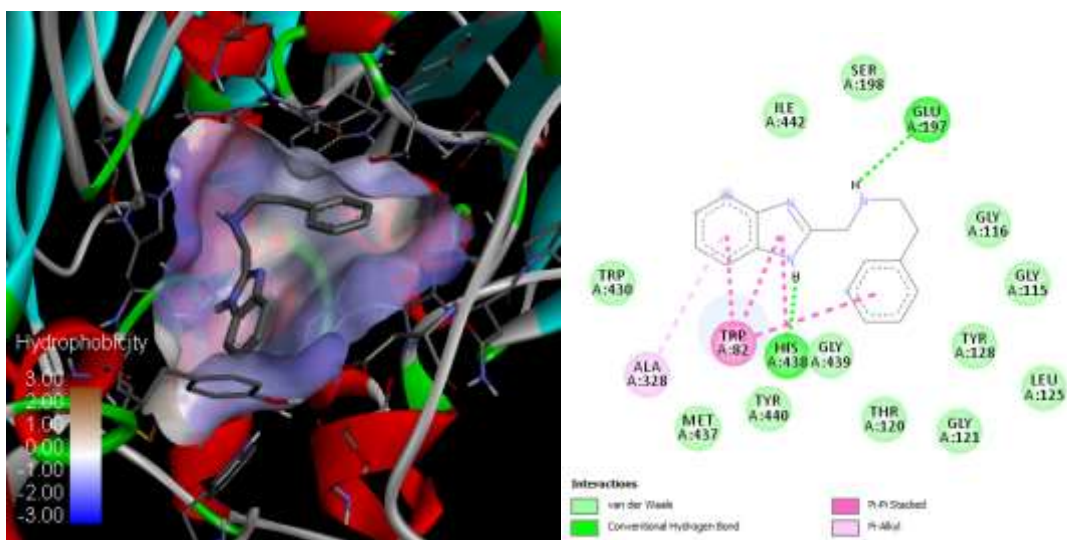


نمودار ۱: مقایسه میزان IC_{50} آنزیم AChE و BuChE سه ترکیب سنتزی ۳، ۴، ۵ و داروی استاندارد دونپزیل

۳-۳- مطالعات داکینگ مولکولی

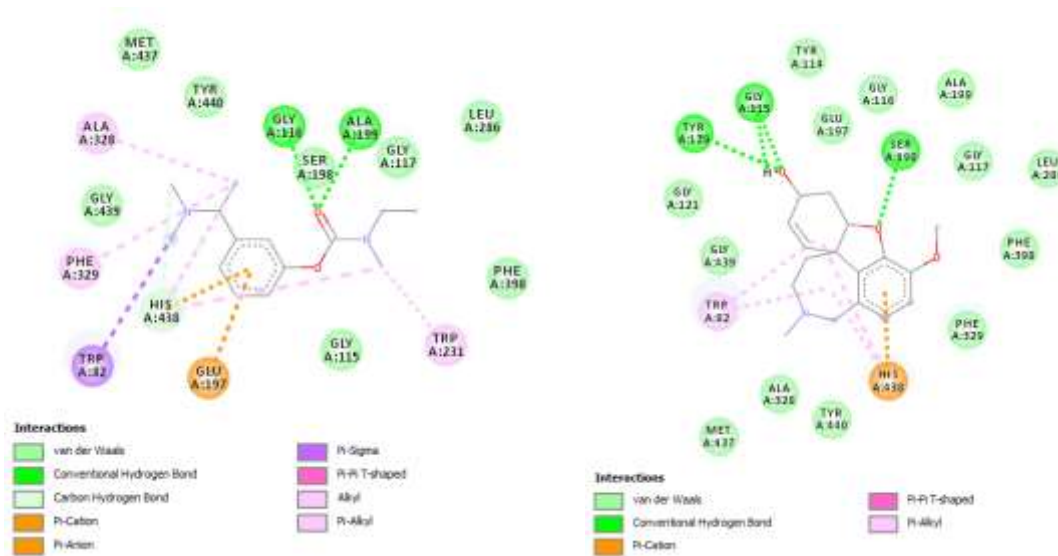
AChE و BuChE هیدرولیز انتقال دهنده عصبی استیل کولین را کاتالیز می‌کنند و در نتیجه به عنوان تنظیم کننده انتقال عصبی کولینرژیک عمل می‌کنند. برای هر دو آنزیم، هیدرولیز در نزدیکی پایین یک تنگه با عمق 20 \AA در سایت فعال انجام می‌شود. تعدادی از ریشه‌های آمینواسیدی مهم شامل سرین ۱۹۸ و هیستیدین ۴۳۸ در این تنگه در تسهیل کاتالیز و اتصال مهارکننده شناسایی شده‌اند. سایت دیگر، سایت آنیونی محیطی (peripheral anionic site) حاوی یک ریشه آسپارات می‌باشد. پاکت اتصال کولین شامل تریپتوفان ۸۲ و پاکت اتصال آسپل شامل تریپتوفان ۲۳۱، لوسین ۲۸۶ و والین ۲۸۸ می‌باشد [۳۲]. میزان انرژی اتصال ترکیب ۵ با گیرنده $-8/88 \text{ kcal/mol}$ بوده است. داکینگ ترکیب ۵ با گیرنده (BuChE) توسط نرم افزار Discovery Studio 4.5، شکل ۲ را نتیجه داد. تصویر سمت راست این شکل، نمایش دو بعدی برهمکنش‌های هیدروژنی (خط چین سبز رنگ) و واندروالسی ترکیب ۵ و تصویر سمت چپ نمایش سه بعدی برهمکنش‌های هیدروفوب لیگاند با رسپتور

را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، گروه NH حلقه بنزایمیدازول با آمینواسید هیستیدین ۴۳۸ در جایگاه فعال پیوند هیدروژنی برقرار کرده‌است که ریشه‌های آمینواسیدی کلیدی در این قسمت محسوب می‌شود. پیوند هیدروژنی دیگر شامل گلوتامات ۱۹۷ در جایگاه فعال با NH آلیفاتیک ساختار می‌باشد. حلقه بنزایمیدازول ترکیب ۵ با حلقه ایندول ریشه آمینواسید تریپتوفان ۸۲ برهمکنش پای پای استیکینگ ($\pi-\pi$ stacking) نشان داده‌است. ارزیابی نتایج داکینگ نشان دهنده مهار مناسب آنزیم BuChE توسط ترکیب ۵ می‌باشد.



شکل ۲. نحوه قرارگیری ترکیب ۵ در جایگاه فعال آنزیم BuChE: تصویر سمت راست نمایش دو بعدی و تصویر سمت چپ نمایش سه بعدی

در مقایسه ترکیب ۵، نحوه برهمکنش و انرژی اتصال دو ترکیب دارویی گالاتامین و ریواستیگمین نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. این دو ترکیب دارویی با قدرت مهارکنندگی که بر روی آنزیم BuChE دارند، در درمان بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳۳]. شکل ۳ برهمکنش گالاتامین و ریواستیگمین در جایگاه فعال آنزیم BuChE نشان می‌دهد. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، بیشترین انرژی اتصال مربوط به ترکیب ۵ می‌باشد. با توجه به مطالب بیان شده ترکیب ۵ می‌تواند نقش بازدارندگی در برابر آنزیم بوتیریل کولین استراز ایفا کند.



شکل ۳. به ترتیب از راست به چپ، برهمکنش گالانتامین و ریواسیتیگمین در جایگاه فعال آنزیم BuChE

جدول ۳. انرژی اتصال و فواصل پیوند هیدروژنی تخمین زده شده با استفاده از داکینگ مولکولی برای ترکیبات مهارکننده آنزیم BuChE

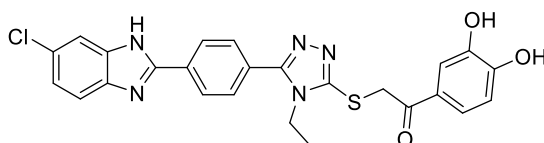
نام ترکیب	آمینو اسیدهای شرکت کننده	فواصل پیوند هیدروژنی بهینه شده (Å)	انرژی اتصال (kcal/mol)
۵	هیستیدین ۴۳۸	۲/۶۲	-۸/۸۸
ریواسیتیگمین	گلوتامیک اسید ۱۹۷	۳/۰۳	-۶/۴۴
	گلایسین ۱۱۶	۲/۸۱	
گالانتامین	آلانین ۱۹۹	۳/۳۲	-۸/۲۶
	تیروزین ۱۲۸	۲/۴۷	
	گلایسین ۱۱۵	۲/۶۷	
	گلایسین ۱۱۵	۲/۸۴	
	سرین ۱۹۸	۲/۸۷	

۴- نتیجه گیری

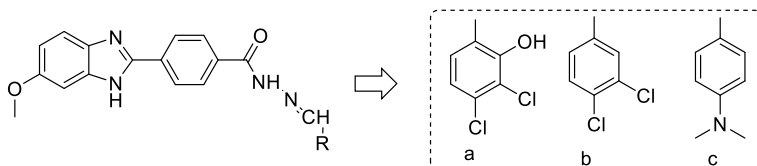
در این مطالعه مشتقات بنزایمیدازولی با بازده خوب تا عالی (۸۰-۶۰ درصد) سنتز شدند و فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل-کولین استراز و بوتیریل کولین استراز آن‌ها با تست المن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که ترکیبات سنتز شده نسبت به داروی استاندارد دونپزیل، دارای فعالیت مهارکنندگی قابل مقایسه‌ای در برابر بوتیریل کولین استراز بودند. در بین این ترکیبات، ترکیب ۵، فعالیت مهارکنندگی بیشتری (۱۷/۱۱ و ۰/۲۸ میکرومولار) به ترتیب در مقابل AChE و BuChE نشان داده است. برهمکنش ترکیب ۵ با آنزیم BuChE با استفاده از مطالعات داکینگ مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه با تحقیق ما، محققان دیگری نیز ترکیباتی با داربست ساختاری (scaffold) بنزایمیدازول، مهار AChE و BuChE را مورد ارزیابی قرار دادند که در ادامه اشاره شده‌است.

در سال ۲۰۲۲، خان و همکارانش یک سری ترکیبات بر پایه تری آزول-بنزایمیدازول سنتز کردند و فعالیت مهارکنندگی آنها بر روی آنزیمهای AChE و BuChE در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند. آنها گزارش کرده‌اند که همه این ترکیبات، فعالیت مهارکنندگی متوسط تا خوب در برابر AChE با مقادیر IC_{50} در محدوده ۰/۴-۱۹/۶۰ میکرومولار و در برابر BuChE با مقادیر IC_{50} در محدوده ۲۳/۳۰ - ۱/۵ میکرومولار نشان می‌دهند. سپس این مقادیر به دست آمده را با مقادیر گزارش شده برای دونپزیل (با میزان $IC_{50} = ۰/۱۲ \mu M$ در برابر AChE و $IC_{50} = ۴/۵ \mu M$ در برابر BuChE) به عنوان داروی مرجع، مقایسه کرده‌اند [۳۴].

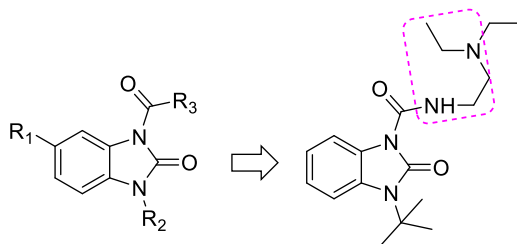
سویک و همکارانش در سال ۲۰۱۹، مشتقاتی از بنزایمیدازول را به هدف مهار آنزیم AChE تهیه کردند. ترکیب زیر در این سری، بیشترین قدرت مهارکنندگی را با IC_{50} ۲۹/۵ نانومولار در مقایسه با داروی استاندارد دونپزیل با IC_{50} ۲۱/۸ نانومولار نشان داده است [۳۵].



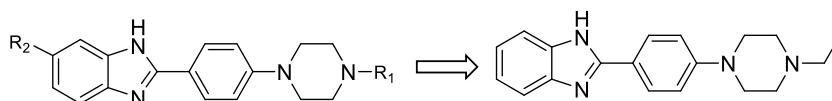
باشرا و همکارانش نیز در سال ۲۰۲۰ میلادی مشتقاتی از بنزایمیدازول با ساختارهای زیر تهیه کردند. در این بین، مشتقات **a** و **b** به ترتیب با مقادیر IC_{50} ۱/۵، ۰/۶ و ۰/۹ میکرومولار موجب مهار بالاتر آنزیم AChE شدند. داروی دونپزیل با غلظت مهارکنندگی ۰/۰۱۶ میکرومولار به عنوان استاندارد در نظر گرفته شد [۳۶].



در سال ۲۰۲۳ بلینسکایا به همراه همکاران، یکسری مشتقات بنزایمیدازول سنتز کردند. ثابت مهارکنندگی این ترکیبات را بر روی آنزیم BuChE به دست آوردند. بین این ترکیبات، ترکیب زیر بهترین مهارکننده آنزیم BuChE با ثابت مهار ۱/۷ میکرومولار بوده است [۳۷]. همانطور که در ساختار این ترکیب نشان داده شده است، این ترکیب حاوی بخش پی‌پرازین به صورت حلقه‌ی باز شده می‌باشد.



در سال ۲۰۱۷ کریمان و تیم تحقیقاتی‌اش یکسری مشتقات بنزایمیدازولی با ساختار پی‌پرازین تهیه کردند. بین این مشتقات، ترکیب زیر با $IC_{50} = 5/18 \mu M$ بهترین مهار را در مقابل آنزیم BuChE نشان داد [۳۸].



همانطور که در ساختارهای ترکیبات فعال در بالا مشاهده می‌شود، ساختار پی‌پرازین در کنار حلقه بنزایمیدازول منجر به تهیه ترکیبات فعال با قدرت مهارکنندگی آنزیم BuChE شده است. در نتیجه در مطالعه ما، هدف سنتز ترکیبات بنزایمیدازول-پی‌پرازین به عنوان مهارکنندگان کولین استراز با پتانسیل درمانی بیماری آلزایمر بوده است که ترکیب ۵ با شباهت به حلقه باز پی‌پرازین بیشترین قدرت مهارکنندگی را بر روی آنزیم‌های BuChE و AChE نشان داده است. این مهارکنندگی بر روی BuChE نسبت به داروی دونپیزیل بیشتر بوده است. در نتیجه می‌توان این ترکیب را به عنوان مهارکننده مناسب برای این آنزیم معرفی کرد که مستعد انجام تست‌های بیشتری به صورت درون تنی و برون تنی می‌باشد.

۵- تقدیر و تشکر

از حمایت‌های مالی شورای پژوهشی دانشگاه مازندران و همچنین از جناب آقای دکتر حمید ندری به خاطر کمک‌هایشان قدردانی می‌نماییم.

۶- فهرست منابع و مآخذ

- [1]. Walia, R., Hedaitullah, M., Naaz, S. F., Iqbal, K., & Lamba, H. S. (2011). Benzimidazole derivatives-an overview. *Int. J. Res. Pharm. Chem*, 1(3), 565-74.
- [2]. Yadav, G., & Ganguly, S. (2015). Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 419-443.
- [3]. Sharpe, M., Jarvis, B., & Goa, K. L. (2001). Telmisartan: a review of its use in hypertension. *Drugs*, 61(10), 1501-1529.
- [4]. Onor, M. L., Trevisiol, M., & Aguglia, E. (2007). Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clinical interventions in aging*, 2(1), 17-32.
- [5]. Whitehouse, P. J., Price, D. L., Clark, A. W., Coyle, J. T., & DeLong, M. R. (1981). Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 10(2), 122-126.
- [6]. Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239-259.

- [7]. Bullock, R., Touchon, J., Bergman, H., & Gambina, G. (2005). Rivastigmine and donepezil treatment in moderate to moderately-severe Alzheimer's disease over a 2-year period. *Current medical research and opinion*, 21(8), 1317.
- [8]. Ritchie, C. W., Ames, D., Clayton, T., & Lai, R. (2004). Metaanalysis of randomized trials of the efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 12(4), 358-369.
- [9]. Rösler, M., Bayer, T., Anand, R., Cicin-Sain, A., Gauthier, S., Agid, Y., ... & Gharabawi, M. (1999). Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *Commentary: Another piece of the Alzheimer's jigsaw. Bmj*, 318(7184), 633-640.
- [10]. Azaresh, E., & Rajabi, M. (2020). Determination of anti-dementia drugs in wastewater, serum and human urine samples by hollow fiber liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Applied Chemistry*, 15(56), 39-50.
- [11]. Greig, N. H., Utsuki, T., Ingram, D. K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., ... & Lahiri, D. K. (2005). Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 17213-17218.
- [12]. Ozadali-Sari, K., Küçükkılınç, T. T., Ayazgok, B., Balkan, A., & Unsal-Tan, O. (2017). Novel multi-targeted agents for Alzheimer's disease: Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of novel 2-[4-(4-substitutedpiperazin-1-yl) phenyl] benzimidazoles. *Bioorganic chemistry*, 72, 208-214.
- [13]. Wu, W. L., Wen, Z. Y., Qian, J. J., Zou, J. P., Liu, S. M., Yang, S., ... & Shi, D. H. (2022). Design, synthesis, characterization and evaluation of 1, 3, 5-triazine-benzimidazole hybrids as multifunctional acetylcholinesterases inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1257, 132498.
- [14]. Ali, S., Asad, M. H. H. B., Maity, S., Zada, W., Rizvanov, A. A., Iqbal, J., ... & Hussain, I. (2019). Fluoro-benzimidazole derivatives to cure Alzheimer's disease: In-silico studies, synthesis, structure-activity relationship and in vivo evaluation for β secretase enzyme inhibition. *Bioorganic Chemistry*, 88, 102936.
- [15]. Shaquiquzzaman, M., Verma, G., Marella, A., Akhter, M., Akhtar, W., Khan, M. F., ... & Alam, M. M. (2015). Piperazine scaffold: A remarkable tool in generation of diverse pharmacological agents. *European journal of medicinal chemistry*, 102, 487-529.
- [16]. Tripathi, P. N., Srivastava, P., Sharma, P., Tripathi, M. K., Seth, A., Tripathi, A., ... & Shrivastava, S. K. (2019). Biphenyl-3-oxo-1, 2, 4-triazine linked piperazine derivatives as potential cholinesterase inhibitors with anti-oxidant property to improve the learning and memory. *Bioorganic Chemistry*, 85, 82-96.

- [17]. Özkay, Ü. D., Can, Ö. D., Sağlık, B. N., Çevik, U. A., Levent, S., Özkay, Y., ... & Atlı, Ö. (2016). Design, synthesis, and AChE inhibitory activity of new benzothiazole-piperazines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(22), 5387-5394.
- [18]. 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.
- [19]. Herres, W., & Gronholz, J. (1984). Understanding FT-IR data processing. Part, 1, 352-356.
- [20]. Keeler, J. (2010). *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons.
- [21]. Lopes, A. B., Wagner, P., & Gulea, M. (2019). Synthesis of Benzimidazole-Fused Medium-Sized N, S-Heterocycles via Palladium-Catalyzed Cyclizations. *European Journal of Organic Chemistry*, 2019(6), 1361-1370.
- [22]. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- [23]. Jalili-Baleh, L., Nadri, H., Moradi, A., Bukhari, S. N. A., Shakibaie, M., Jafari, M., ... & Foroumadi, A. (2017). New racemic annulated pyrazolo [1, 2-b] phthalazines as tacrine-like AChE inhibitors with potential use in Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 280-289.
- [24]. <https://www.rcsb.org/>
- [25]. Heidari, A., Valikhani Fard, N., Noshiranzadeh, N., & Bikas, R. (2019). Synthesis of new dipeptides based on uracil and thymine and investigation of the molecular docking of these compounds as inhibitors of quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Chemistry*, 14(50), 277-290.
- [26]. Gholamjani Moghaddam, K., & Hashemianzadeh, M. (2015). Computational studies of the interactions between quinazolone derivatives and G-quadruplex DNA as an anticancer strategy. *Applied Chemistry*, 10(36), 177-186.
- [27]. Salehi, M., Kubickib, M., Jafari, M., Galini, M., & Soleimani, F. (2018). Synthesis, crystal structure, spectroscopic, molecular docking and DFT Studies of two Schiff base ligands derived from DL-1-Phenylethylamine. *Applied Chemistry*, 13(49), 103-116.
- [28]. Abedanzadeh, S., Khaghani Azar, M., & Davaeil, B. (2023). Synthesis and characterization of cyclometalated Pd (II) complex bearing tyrosine: Experimental and theoretical study of interaction with biomacromolecules. *Applied Chemistry*, 18(68), 217-234.
- [29]. Zhong, S., Hou, Y., Zhang, Z., Guo, Z., Yang, W., Dou, G., ... & Mou, Y. (2022). Identification of novel natural inhibitors targeting AKT Serine/Threonine Kinase 1 (AKT1) by computational study. *Bioengineered*, 13(5), 12003-12020.

- [30] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785-2791.
- [31]. 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.
- [32]. Brus, B., Kosak, U., Turk, S., Pislari, A., Coquelle, N., Kos, J., ... & Gobec, S. (2014). Discovery, biological evaluation, and crystal structure of a novel nanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor. *Journal of medicinal chemistry*, 57(19), 8167-8179.
- [33]. Motebennur, S. L., Nandeshwarappa, B. P., & Katagi, M. S. (2023). Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease: New Findings from 2021 and 2022. *Drugs and Drug Candidates*, 2(3), 571-590.
- [34]. Khan, Y., Rehman, W., Hussain, R., Khan, S., Malik, A., Khan, M., ... & Abdellatif, M. H. (2022). New biologically potent benzimidazole-based-triazole derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors along with molecular docking study. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 59(12), 2225-2239.
- [35]. Acar Cevik, U., Saglik, B. N., Levent, S., Osmaniye, D., Kaya Cavuşoglu, B., Ozkay, Y., & Kaplancikli, Z. A. (2019). Synthesis and AChE-inhibitory activity of new benzimidazole derivatives. *Molecules*, 24(5), 861.
- [36]. Adalat, B., Rahim, F., Taha, M., Alshamrani, F. J., Anouar, E. H., Uddin, N., ... & Zakaria, Z. A. (2020). Synthesis of Benzimidazole-Based Analogs as Anti Alzheimer's Disease Compounds and Their Molecular Docking Studies. *Molecules*, 25(20), 4828.
- [37]. Belinskaia, D. A., Voronina, P. A., Krivorotov, D. V., Jenkins, R. O., & Goncharov, N. V. (2023). Anticholinesterase and Serotonergic Evaluation of Benzimidazole-Carboxamides as Potential Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Pharmaceutics*, 15(8), 2159.
- [38]. Ozadali-Sari, K., Küçükılınc, T. T., Ayazgok, B., Balkan, A., & Unsal-Tan, O. (2017). Novel multi-targeted agents for Alzheimer's disease: Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of novel 2-[4-(4-substitutedpiperazin-1-yl) phenyl] benzimidazoles. *Bioorganic chemistry*, 72, 208-214.

