

طراحی و سنتز مشتقات ۱-بنزیل-۳-((۲،۳-دی اکسواپندولین-۱-ایل) متیل) پیریدینیم برמיד و بررسی اثرات مهار آنزیم استیل کولین استراز

محمد مغالو^۱ و بهروز میرزا^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری شیمی آلی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران

۲- دانشیار شیمی آلی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران

دریافت: تیر ۱۳۹۶، بازنگری: آذر ۱۳۹۶، پذیرش: آذر ۱۳۹۶

چکیده: در این مقاله، سنتز مشتقات جدید ۱-بنزیل-۳-((۲،۳-دی اکسواپندولین-۱-ایل) متیل) پیریدینیم گزارش شده است. سنتز این ترکیبات، طی دو مرحله از ایساتین و مشتقات ۳-(کلرومتیل) پیریدین و ۴-(کلرومتیل) پیریدین در شرایط بازی انجام شد. فعالیت ترکیبات سنتز شده در مهار آنزیم‌های استیل و بوتیریل کولین استراز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که ترکیبات سری ۴-پیریدین، اثر بهتری از سری ۳-پیریدین دارند و همچنین بهترین اثر مربوط به ترکیبات 5a، 5b، 5c، 5g و 5h بود که در میان آن‌ها ترکیب 5b با توانایی مهارکنندگی IC50 برابر با ۱،۰۰ μM، قوی‌ترین اثر را از خود بروز داد که می‌تواند در درمان بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ایساتین، استیل کولین استراز، بوتیریل کولین استراز، بیماری آلزایمر، کلرومتیل پیریدین

مقدمه

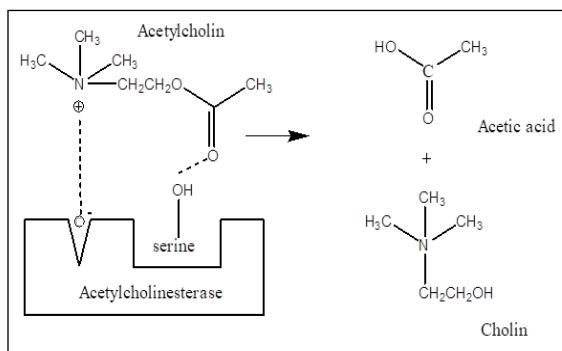
سینوکلئین و پپتید آمیلوئید بتا، ایجاد می‌شوند [۲]. بهترین راه درمان بیماری آلزایمر پیدا کردن درک درستی از زیست‌شناسی پیچیده این بیماری است. یافته‌های مطالعاتی نشان می‌دهد که نقص عملکرد ادراکی و رفتاری که در بیماران مبتلا به آلزایمر ایجاد می‌شود ممکن است با ناتوانی در انتقال پالس‌های عصبی در همایه‌های^۱ کولینرژیک ایجاد شود [۳]. امروزه روش‌های درمان آلزایمر براساس نظریه کولینرژیک استوار است و کارایی درمان این بیماری با کولینرژیک‌ها موجب تقویت این نظریه شده است. براساس این نظریه ۶ گروه از داروها برای بهبود نقص کولینرژیک در بیماران آلزایمری وجود دارد که عبارت‌اند از:

۱- مهارکننده استیل کولین استراز که آنزیم استیل کولین استراز

آلزایمر یک بیماری پیش‌رونده و همراه با اختلال عصبی است که با از دست‌دادن توانایی‌های شناختی و بروز اختلالات رفتاری شدید، در نهایت منجر به مرگ می‌شود. چهارمین علت مرگ‌ومیر مردم با بیش از ۶۵ سال سن، در کشورهای صنعتی به شمار می‌آید [۱]. در بیماری آلزایمر پروتئینی کروی شکلی در خارج نورون‌های برخی مناطق مغز و ساختارهای پروتئینی رشته‌ای در جسم سلولی نورون‌ها تشکیل می‌شود. این ساختارهای پروتئینی که به آن‌ها، اجسام آمیلوئیدی گفته می‌شود، در اثر برخی تغییرات در پروتئین‌های سلول‌های عصبی و به هم خوردن تعادل و تغییر در میزان و یا ساختار پروتئین‌های پرسنیلین، آپولیپوپروتئین E،

1. Synapse

کاربرد ایساتین در ترکیبات مهارکننده کولین استراز در مطالعات پیشین اثبات شده است. اشرف علی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ ترکیبات جدید اسپيرو بر پایه ایساتین را گزارش کردند. در این گزارش بیان شده که ترکیبات موردنظر، فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز از خود نشان داده‌اند [۱۲]. همچنین، در گزارش دیگری، کیا و همکارانش مشتقات جدید ایساتینی را سنتز کرده و فعالیت آن‌ها در مهار آنزیم ذکر شده را مورد مطالعه قرار دادند [۱۳]. در این گزارش، فعالیت ترکیبات در برابر آنزیم‌های استیل و بوتیریل کولین استراز بررسی شده و نتایج آن‌ها نشان داد که این ترکیبات، توانایی مهار آنزیم‌های مورد مطالعه را دارند. آنزیم استیل کولین استراز دارای دو جایگاه فعال آنیونی و استری برای اتصال به استیل کولین است. بر اساس تحلیل بلورنگاری، جایگاه آنیونی آنزیم دارای بار منفی عامل کربوکسیلات (COO^-) به‌جامانده از گلوتامیک اسید است که به مرکز مثبت سوپسترا یعنی $(\text{CH}_3)\text{N}^{3+}$ با نیروی الکتروستاتیک متصل می‌شود. جایگاه استری آنزیم، شامل دو آمینو اسید سرین و هیستیدین است که در آن حلقه ایمیدازول از آمینو اسید هیستیدین و گروه OH از آمینو اسید سرین اهمیت دارد. این قسمت به بخش استری استیل کولین متصل می‌شود و آن را تجزیه می‌کند. در آنزیم استیل کولین استراز، آمینو اسید سرین حمله هسته‌دوستی انجام می‌دهد و این حمله با زنجیر جانبی ایمیدازول هیستیدین، تقویت می‌شود که طرح‌واره این فرایند در شکل ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲ چگونگی آب‌کافت و تجزیه استیل کولین با آنزیم استیل کولین استراز

را مهار و در نتیجه فعالیت کولینرژیک را زیاد می‌کند تا عملکرد ادراکی بیشتر شود.

۲- پیش‌سازهای کولین، مانند فسفاتیدیل کولین که فراهمی زیستی کولینی را افزایش می‌دهند.

۳- آزادکننده‌های استیل کولین که آزادسازی استیل کولین را از پایانه‌های پیش‌هماپه‌ای^۱، تسهیل می‌کنند.

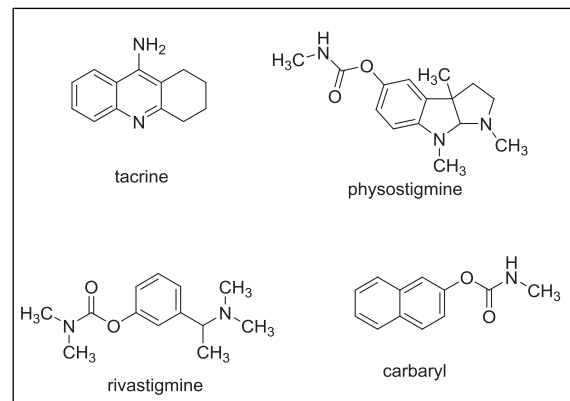
۴- پادکنشگر^۲ گیرنده^۳ M2 موسکارینی که به‌طور عمومی از طریق خودگیرنده‌ها^۴ (پیش‌هماپه‌ای)، آزادسازی استیل کولین را با باز خورد منفی تنظیم می‌کند.

۵- هم‌کنشگر^۵ گیرنده‌های M1 و M2 که نقش استیل کولین روی گیرنده‌های پس‌هماپه‌ای^۶ را تقلید می‌کنند.

۶- پادکنشگر نیکوتینی یا ترکیباتی که اثرات مشابه نیکوتینی دارند و سبب افزایش آزادسازی استیل کولین می‌شوند [۳].

ایساتین و مشتقاتش دارای فعالیت زیستی متفاوتی هستند. برخی از ویژگی‌های مشتقات ایساتین که در شرایط آزمایشگاهی سنتز شده‌اند شامل فعالیت ضدسرطان، ضدافسردگی، ضدانعقاد، ضد HIV و ضدالتهاب است [۴ تا ۸].

مهارکننده‌های کولین استراز به چند گروه قابل تقسیم‌اند: آمینوآکریدین‌ها- فیزوستیگمین و مشتقات آن- مشتقات بنزیل پیریدین مانند دونیزیل- آلکالوئیدهای گیاهی مثل هوپرزین که ساختار نمونه‌هایی از آن‌ها در شکل ۱ ارائه شده است [۹ تا ۱۱].



شکل ۱ ساختار برخی مهارکننده‌های مشهور آنزیم استیل کولین استراز

- | | | | | | |
|----------------|---------------|-------------|------------------|------------|-----------------|
| 1. Presynaptic | 2. Antagonist | 3. Receptor | 4. Autoreceptors | 5. Agonist | 6. Postsynaptic |
|----------------|---------------|-------------|------------------|------------|-----------------|

نیز سنتز شده و ویژگی‌های زیستی آن‌ها در مهار آنزیم کولین استراز در برابر شاهد دونپزیل مورد ارزیابی قرار گرفته است [۱۴]. بیشتر ترکیبات سنتز شده، توانایی مهار آنزیم یادشده را دارند و رفتارهای دونپزیل را در پیوند با جایگاه‌های کاتالیتیک آنزیم، پیروی می‌کرده‌اند.

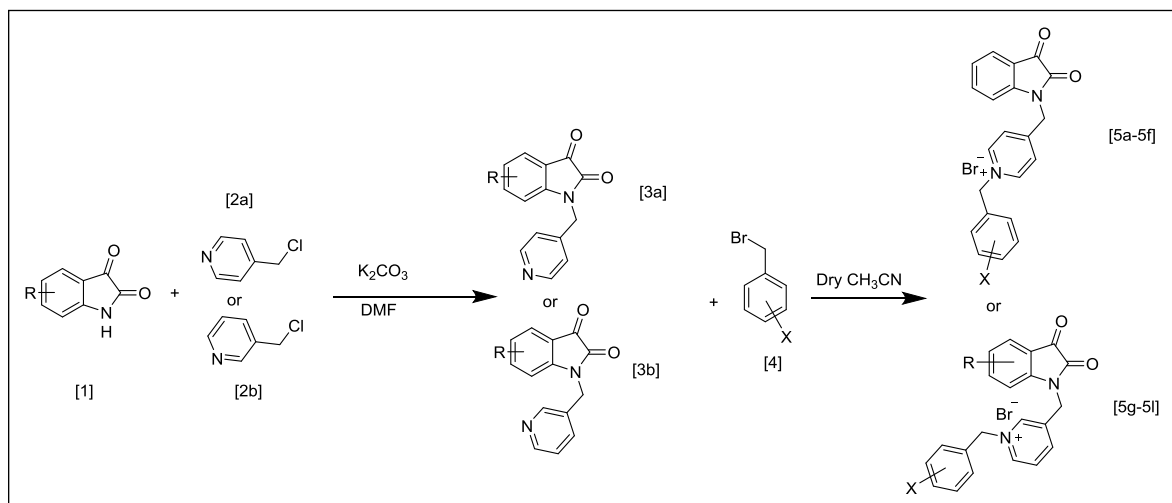
در این مقاله، هدف اصلی سنتز و طراحی مشتقات جدید مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز بر پایه ایساتین است که با مشتقات بنزیل پیریدین‌ها ادغام شده است. اطلاعات به‌دست آمده از ساختارهای دونپزیل و انساکولین، که از مهارکننده‌های مشهور کولین استراز بشمار می‌روند نشان می‌دهد که حضور گروه آمیدی یا کتونی در ساختار این ترکیبات با ایجاد پیوند هیدروژنی با جایگاه استراتیک آنزیم پتانسیل مناسبی به ترکیبات دارای این گروه‌ها در مهارکنندگی یک آنزیم القا کرده و اگر در قسمت پشت این گروه با توانایی ایجاد پیوند هیدروژنی حلقه‌های بالکی لیوفیل قرار گیرد، مهارکننده به‌طور ویژه‌تری آنزیم را مهار خواهد کرد. البته همه پیوندها مستلزم حضور گروه آمین کوارترن یا تشریاری در ساختارهای مربوط است که با فاصله مناسب نسبت به جایگاه استراتیک قرار گرفته باشد. از آنجا که ترکیبات سنتز شده از نظر اندازه و شباهت‌های ساختاری بیان شده در بالا رفتار دونپزیل و انساکولین را به‌خوبی پیروی می‌کنند، این انتظار وجود دارد که ترکیب سنتز شده ویژگی مهارکنندگی کولین استراز مطلوبی داشته باشد. در شکل ۳ طرح کلی این واکنش ارائه شده است.

بخش تجربی

مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

تمام مواد شیمیایی در این پژوهش که شامل ایساتین، مشتقات پیکولیل کلرید و مشتقات بنزیل مرید هستند از شرکت مرک آلمان و فلوکای سوئیس خریداری شده‌اند و هیچ‌گونه خالص‌سازی روی مواد انجام نگرفته است. نقطه ذوب ترکیبات با استفاده از دستگاه تعیین نقطه ذوب الکتروترمال ۹۱۰۰ به‌دست آمده است. طیف‌های IR با کمک دستگاه طیف‌سنج مدل FTIR-JASCO-460 plus گزارش شده است و طیف‌های NMR ترکیبات با دستگاه NMR مدل BRUKER DRX-500 AVANCE در حلال DMSO-d₆ ثبت شده است. به‌منظور بررسی پیشرفت واکنش، از کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) و ورقه‌های سیلیکاژل 60GF254 ساخت شرکت مرک آلمان، استفاده شده است.

ترکیبات مهارکننده برای این که هر دو جایگاه آنیونی و استری آنزیم را مهار کنند باید به‌گونه‌ای باشند که توانایی تولید پیوند هیدروژنی با اسیدآمینه سرین در بخش استری و توانایی تولید پیوند یونی با گروه کربوکسیلات اسیدآمینه گلوتامات در بخش آنیونی جایگاه فعال آنزیم کولین استراز را داشته باشند. در مهارکننده‌ها پیوند هیدروژنی با گروه‌های آمیدی یا کتونی یا کارباماتی ایجاد می‌شود که برخلاف استیل کولین که در این قسمت دارای گروه استری قابل آب‌کافت است، این گروه‌ها با آب‌کافت نمی‌شوند یا با سرعت کمتری آب‌کافت شده و برای مدت‌زمان محدودی آنزیم را مهار می‌کنند. در این فرصت، تعدادی از استیل کولین‌های بدن از دسترس آنزیم خارج و در نهایت باعث افزایش سطح استیل کولین در مغز شده که با اثر روی گیرنده‌های موسکاربینی سبب بهبود عوارض بیماری آلزایمر می‌شود. شبیه‌سازی مولکولی ترکیبات بر اساس مدل‌سازی داکینگ، حاوی نقش ایساتین در پیوند با آنزیم‌های مذکور است که در آن گروه‌های کربونیل کتونی یا آمیدی حلقه ایساتین با اسیدآمینه سرین، از مکان استری، پیوند هیدروژنی و حلقه پیریدینیم نیز با مکان آنیونی پیوند الکتروستاتیک ایجاد می‌کند. توصیف‌کننده‌های داکینگ مولکولی از برهمکنش‌های مؤثر بین آنزیم استیل کولین استراز و مشتقات ایساتین محاسبه می‌شوند. به‌بیان‌دیگر، حضور گروه‌های کربونیل در ساختار ایساتین به‌عنوان پذیرنده پیوند هیدروژنی، باعث افزایش فعالیت مهارکننده‌ها و حذف آن‌ها در حلقه‌های ایندولی و در نتیجه حذف پیوند هیدروژنی، باعث کاهش فعالیت مهارکننده‌ها می‌شود. این نتایج نشانگر اهمیت بالای پیوند هیدروژنی در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که حضور گروه‌های پذیرنده پیوند هیدروژنی در ساختار مهارکننده برای پیوند با جایگاه استری سبب تقویت قدرت مهارکننده‌ها می‌شود درحالی‌که حضور آمین کوارترن نقش اساسی را داشته و مانند اثر انگشت سبب شناسایی جایگاه آنیونی گیرنده شده و وجود آن الزامی است. لازم به ذکر است که در ساختار بعضی مهارکننده‌ها مانند دونپزیل گروه آمینی به‌صورت تشریاری موجود است که در pH فیزیولوژیک بدن پروتونه شده و فرم کاتیونی لازم برای پیوند را فراهم می‌کند. در حالت کلی سری جدیدی از مشتقات دونپزیل بر پایه ایندول‌های به‌دست آمده از مولکول ایساتین



شکل ۳ طرح کلی واکنش

شد. بازده واکنش در این مرحله، ۸۰ درصد برای حدواسط 3a و ۷۰ درصد برای حدواسط 3b است.

مرحله دوم: سنتز فرآورده‌های واکنش

در این مرحله مقادیر ۱ میلی‌مول از حدواسط‌های 3a و 3b که در مرحله قبل سنتز شدند، و ۱/۲ میلی‌مول از مشتقات بنزیل برمایید در ۷ میلی‌لیتر استونیتریل خشک حل شدند و تحت شرایط بازروانی قرار گرفت. پیشرفت واکنش با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه‌نازک کنترل شد. کامل شدن واکنش بسته به مشتقات بنزیل برمایید به کاررفته، بین ۲ تا ۳ ساعت به طول انجامید. در طی انجام واکنش، رسوب زرد تا قرمز رنگی در مخلوط واکنش پدیدار شد که پس از صاف کردن در حلال کلروفرم نوبلور شد. رسوب به دست آمده در ۵۰ میلی‌لیتر حلال کلروفرم ریخته و تا دمای جوش گرم شد. نتیجه این کار حل شدن تمام ناخالصی‌های باقیمانده حدواسط و بنزیل برمایید در کلروفرم و باقی ماندن رسوب خالص فرآورده‌ها در کلروفرم جوش بود که پس از صاف کردن و شستن چندباره با کلروفرم، فرآورده خالص تهیه شد. نقاط ذوب و داده‌های طیفی فرآورده‌های واکنش در بخش نتایج و بحث ارائه شده‌اند.

روش عمومی سنتز

مرحله اول: سنتز مشتقات ۱-(پیریدیل متیل) / ایندولین-۲،۳-دی‌اوان مقدار ۱۰ میلی‌مول از ایساتین در ۱۰ میلی‌لیتر حلال دی‌متیل‌فرمایید حل شد. سپس دوازده میلی‌مول پتاسیم کربنات معادل ۱/۶۵ گرم به آن افزوده و دمای مخلوط با استفاده از یک هیتر روی ۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. در ادامه ده میلی‌مول از مشتقات ۳-پیکولیل کلرید و ۳-پیکولیل کلرید به آرامی و در طی ۱ ساعت به مخلوط واکنش افزوده شدند. واکنش با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه‌نازک کنترل شد به طوری که پس از هر ساعت از پیشرفت واکنش، یک قطره از مخلوط واکنش را جدا کرده و به آن ۱ میلی‌لیتر آب و ۱ میلی‌لیتر اتیل استات افزوده و به خوبی هم‌زده شد. پس از جداسدن فاز آبی و آلی، از فاز بالایی که مربوط به اتیل استات بود، TLC گرفته شد. نتایج TLC حاکی از مصرف کامل واکنشگر و تولید کامل حدواسط‌های 3a و 3b پس از سه ساعت از پیشرفت واکنش بود. در ادامه برای خالص‌سازی، به مخلوط واکنش مقدار ۵۰ میلی‌لیتر آب افزوده شد. رسوب زرد مایل به نارنجی رنگی به دست آمده با کاغذ صافی، صاف و از مخلوط واکنش جدا شد. رسوب به دست آمده خشک و با اتانول مطلق نوبلور و برای استفاده در مرحله دوم واکنش آماده

به بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شد. در نهایت با آب مقطر محلول ۲/۵ واحد در میلی لیتر آنزیم ساخته می شود. این محلول استوک آنزیمی در قسمت های ۱ میلی لیتری در ۲۵- نگهداری شد و موقع لزوم ذوب و مورداستفاده قرار گرفت.

آزمون مهار استیل کولین/استراز

برای به دست آوردن IC50 نمونه های سنتز شده، غلظت های متفاوت هر نمونه آزمون و درصد مهار برای هر غلظت محاسبه شد. منحنی پاسخ/چنده برای هر نمونه رسم و از منحنی به دست آمده IC50 محاسبه شد.

از محلول های از پیش آماده شده نمونه ها، غلظت های 10^{-4} ، 10^{-5} ، 10^{-6} ، 10^{-7} ، 10^{-8} ، 10^{-9} مولار تهیه و آزمون شد به گونه ای که برای هر نمونه درصد مهار بین ۲۰ تا ۸۰ درصد به دست آید. پیش از آزمون آنزیم از فریزر خارج و در دمای اتاق ذوب شد و سپس تمام محلول های مورد نیاز به وسیله حمام آب به دمای ۲۵ درجه سانتی گراد رسانده شدند. هر غلظت به طور جداگانه ۳ بار آزمون شد و میانگین درصد مهار هر غلظت برای محاسبات منظور شد. از دونپزیل هیدروکلرید به عنوان داروی مرجع استفاده شد. IC50 دونپزیل در طول ۳ روز متفاوت و هر روز ۳ بار اندازه گیری و محاسبه شد که ۲۸ نانو مولار به دست آمد. پیش از انجام هر آزمون دستگاه طیف نورسنج در مود کینتیکی تنظیم و با استفاده از یک مخلوط شامل ترکیب های زیر، دستگاه صفر شد:

بافر فسفات (۳ میلی لیتر)، استیل تیوکولین یدید (۲۰ میکرولیتر)، محلول DTNB (۱۰۰ میکرولیتر) و ترکیب آزمون (۵۰ میکرولیتر)

تنظیمات دستگاه برای آزمون به شرح زیر بود:

Reading time = 6 min

λ max = 412 nm

Factor = 1

Min absorbance = 0

Max absorbance = 2

Scale = 5.0

آزمون مهار آنزیم کولین استراز

این آزمون با روش المن انجام شد. اساس این روش اندازه گیری سرعت تولید تیوکولین به عنوان فراورده کاتالیز آنزیمی بر استیل تیوکولین به عنوان سوبسترا است. تیوکولین پس از تولید شدن بی درنگ با ۵-دی تیوبیس-۲-نیتروبنزوئیک اسید واکنش می دهد تا آنیون زرد رنگ ۵-تیو-۲-نیتروبنزوات ایجاد شود. سرعت ایجاد رنگ در طول موج ۴۱۲ نانومتر به وسیله دستگاه طیف نورسنج اندازه گیری می شود. واکنش با تیول آن قدر سریع است که مرحله تعیین کننده سرعت تلقی نشود. افزون بر آن، واکنشگرهایی که استفاده می شوند در غلظت مورداستفاده باعث مهار آنزیم نمی شوند.

تهیه محلول ها

• بافر فسفات ۰/۱ مولار pH برابر با ۸

۲۲/۸ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۳ آبه در آب مقطر حل شده و به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد. ۱/۳۶ پتاسیم دی هیدروژن فسفات در آب مقطر حل و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. ۹۴۰ میلی لیتر از محلول ۱ و ۵۰ میلی لیتر از محلول ۲ به هم افزوده شده و با محلول پتاسیم هیدروکسید، pH آن برابر با ۸/۰ تنظیم شد.

• محلول ۰/۰۱ مولار DTNB

۰/۳۹۶ گرم DTNB و ۰/۱۵ گرم سدیم هیدروژن کربنات در آب مقطر حل شد تا ۱۰۰ میلی لیتر از محلول یاد شده به دست آید. محلول مدنظر در دمای ۳ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

• استیل تیوکولین یدید ۰/۰۷۵ مولار

۰/۲۱۷ گرم استیل تیوکولین یدید در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. این محلول در قسمت های ۰/۴ میلی لیتری در ویال اپندورف به شکل منجمد شده در ۲۵- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

• آنزیم استیل کولین استراز

آنزیم ۲۰۰۰ واحدی در ۱ میلی لیتر محلول ژلاتین ۱٪ حل شده و

روش انجام آزمون

مقدار ۳ میلی لیتر بافر فسفات، ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم با غلظت ۲/۵ واحد در میلی لیتر، ۵۰ میکرولیتر محلول نمونه موردنظر و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DTNB در یک لوله آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در گرمخانه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در ۴۱۰ دور در دقیقه قرار داده شد سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول استیل تیوکولین یدید به مخلوط افزوده و به مدت ۵ ثانیه هم زده شد. پس از آن جذب به مدت ۶ دقیقه در ۴۱۲ نانومتر خوانده و سرعت به دست آمده با دستگاه خوانده شد. بر اساس فرمول زیر درصد مهار محاسبه شد.

$$\text{فعالیت آنزیم } (\mu\text{mol/min}) =$$

$$[\Delta A / \Delta t (\text{rate}) \times 7.35 \times \text{حجم نهایی خوانده شده نمونه}] / 100$$

۹

$$\text{درصد فعالیت آنزیم} = 100 - \text{درصد مهار آنزیم}$$

به دلیل این که استیل تیوکولین به طور خودبه خودی با سرعت ۰/۰۰۱۶ واحد جذب در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تجزیه می شود برای حذف این خطا از مخلوط زیر به عنوان شاهد استفاده شد:

بافر فسفات (۳ میلی لیتر)، استیل تیوکولین یدید (۲۰ میکرولیتر)، محلول DTNB (۱۰۰ میکرولیتر) و آب مقطر (۱۰۰ میکرولیتر)

نتیجه ها و بحث

داده های طیفی فرآورده های واکنش

1-(2-chlorobenzyl)-4-((2,3-dioxindolin-1-

yl)methyl)pyridin-1-ium bromide (5a): Red solid;

yield: 78%, mp = 225-229 °C. IR (KBr): 1715

(C=O), 1670 (C=O amid), 2986 (C-H aromatic)

cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 5.73 (s,

2H, N- CH₂), 5.93 (s, 2H, N⁺- CH₂), 7.04 (m, 2H,

H_{5,6}), 7.31 (d, J= 7 Hz, 1H, H₇), 7.45-7.50 (m, 4H,

H_{4,4''}, 5''', 6''), 7.56-7.59 (m, 3H, H_{2',6',3''}), 8.97 (d,

J=5Hz, 2H, H_{3',5'}) ppm. C- NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 44.8, 60.6, 109.1, 109.9, 117.7, 119.2, 120.9, 125.3, 127.2, 128.1, 130.0, 131.2, 131.5, 131.7, 144.9, 145.1, 159.3, 163.5, 179.2.

1-(3-chlorobenzyl)-4-((2,3-dioxindolin-1-

yl)methyl)pyridin-1-ium bromide (5b): Red solid;

yield: 78%, mp = 225-229 °C. IR (KBr): 1715

(C=O), 1670 (C=O amid), 2986 (C-H aromatic)

cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 5.73 (s,

2H, N- CH₂), 5.90 (s, 2H, N⁺- CH₂), 7.03 (m, 2H,

H_{5,6}), 7.30 (d, J= 8.5 Hz, 1H, H₇), 7.43-7.47 (m,

3H, H₄, 5'', 6''), 7.54 (d, J=7 Hz, 1H, H_{4''}), 7.59 (d,

J=6.5 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.71 (s, 1H, H_{2''}), 9.18 (d,

J=7 Hz, 2H, H_{3',5'}) ppm. C- NMR (CDCl₃, 500

MHz): δ = 44.8, 61.5, 109.1, 109.8, 117.6, 119.1,

120.8, 125.3, 127.2, 127.7, 128.9, 129.3, 131.0,

133.5, 135.3, 136.2, 144.7, 159.0, 162.8, 180.1.

1-(4-chlorobenzyl)-4-((2,3-dioxindolin-1-

yl)methyl)pyridin-1-ium bromide (5c): Red solid;

yield: 80%, mp = 221-224 °C. IR (KBr): 1721

(C=O), 1685 (C=O amid), 2998 (C-H aromatic)

cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 5.71 (s,

2H, N- CH₂), 5.90 (s, 2H, N⁺- CH₂), 7.03 (m, 2H,

H_{5,6}), 7.29 (d, J= 8.5 Hz, 1H, H₇), 7.44 (m, 1H,

H₄), 7.51 (m, 2H, H_{2'',6''}), 7.55-7.56 (m, 4H,

H_{2',6',3''}, 5''), 9.0 (d, J=5 Hz, 2H, H_{3',5'}) ppm. C-

NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 44.7, 61.7, 109.1,

109.8, 117.7, 119.2, 120.9, 125.3, 127.2, 129.1,

130.9, 132.9, 134.2, 135.2, 135.9, 144.6, 144.8,

159.0, 163.4, 181.3.

aromatic) cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 2.29 (s, 3H, CH_3), 5.70 (s, 2H, N- CH_2), 5.75 (s, 2H, N^+ - CH_2), 7.03 (t, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.23 (d, J = 8 Hz, 2H, $\text{H}_{3'',5''}$), 7.29 (d, J = 8 Hz, 1H, H_7), 7.40 (d, J = 8 Hz, 2H, $\text{H}_{2'',6''}$), 7.45 (d, J = 7 Hz, 1H, H_4), 7.55 (d, J = 6 Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 9.06 (d, J =6 Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$) ppm. C- NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 20.6, 44.7, 62.5, 109.1, 109.8, 117.7, 119.2, 120.9, 125.3, 128.9, 129.7, 131.1, 135.2, 138.9, 144.4, 144.6, 158.9, 164.1, 179.3.

1-(2-fluorobenzyl)-4-((2,3-dioxindolin-1-yl)methyl)pyridin-1-ium bromide (5g): Red solid; yield: 78%, mp = 231-236 °C. IR (KBr): 1700 (C=O), 1680 (C=O amid), 2992 (C-H aromatic) cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 5.72 (s, 2H, N- CH_2), 5.90 (s, 2H, N^+ - CH_2), 7.03 (m, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.30 (m, 3H, $\text{H}_{7,4'',6''}$), 7.44 (m, 1H, H_4), 7.50 (m, 1H, H_5''), 7.58 (m, 3H, $\text{H}_{2',3'}$), 8.97 (d, J =5Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$) ppm. C- NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 44.8, 57.3, 116.0 ($J_{\text{C-F}}$ = 7.5 Hz), 117.7, 119.2, 120.9, 125.3 ($J_{\text{C-F}}$ = 15.5 Hz), 131.5, 132.1, 145.0, 159.2, 162.1 ($J_{\text{C-F}}$ = 220 Hz), 164.1, 178.0.

1-benzyl-4-((2,3-dioxindolin-1-yl)methyl)pyridin-1-ium bromide (5h): Red solid; yield: 78%, mp = 231-236 °C. IR (KBr): 1700 (C=O), 1680 (C=O amid), 2992 (C-H aromatic) cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 5.77 (s, 2H, N- CH_2), 5.93 (s, 2H, N^+ - CH_2), 7.02 (m, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.34 (d, J = 8 Hz, 1H, H_7), 7.41-7.45 (m, 4H, $\text{H}_{4,2'',4'',6''}$), 7.57-7.60 (m, 4H, $\text{H}_{3'',5''}$, $\text{H}_{2',6'}$), 9.25(d, J =5Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$) ppm. C- NMR (CDCl_3 , 500

4-((2,3-dioxindolin-1-yl)methyl)-1-(2-methylbenzyl)pyridin-1-ium bromide (5d): Red solid; yield: 71%, mp = 205-209 °C. IR (KBr): 1708 (C=O), 1688 (C=O amid), 2990 (C-H aromatic) cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 2.27 (s, 3H, CH_3), 5.75 (2H, s, N- CH_2), 5.91 (2H, s, N^+ - CH_2), 7.03 (m, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.19 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H_3''), 7.25 (t, J =7 Hz, H_5''), 7.27 (d, J =7 Hz, H_6''), 7.32 (m, 2H, $\text{H}_{1,4''}$), 7.44 (d, J = 7 Hz, 1H, H_4), 7.56-7.59 (d, J = 6Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 8.95 (d, J =5 Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$) ppm. C- NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 18.7, 44.8, 60.8, 109.1, 109.8, 117.6, 119.1, 120.9, 125.3, 126.6, 127.2, 129.4, 130.8, 132.0, 135.3, 135.9, 137.0, 144.6, 144.8, 158.9, 162.7, 180.8.

4-((2,3-dioxindolin-1-yl)methyl)-1-(3-methylbenzyl)pyridin-1-ium bromide (5e): Red solid; yield: 72%, mp = 199-202 °C. IR (KBr): 1706 (C=O), 1680 (C=O amid), 2988 (C-H aromatic) cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 2.29 (s, 3H, CH_3), 5.70 (2H, s, N- CH_2), 5.74 (2H, s, N^+ - CH_2), 7.02 (m, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.22 (d, J =7 Hz, 1H, H_4''), 7.29 (m, 2H, $\text{H}_{1,2''}$), 7.33 (m, 2H, $\text{H}_{5'',6''}$), 7.44 (d, J = 7 Hz, 1H, H_4), 7.55 (d, J =5.5 Hz, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 9.05 (d, J =5.5 Hz, 2H, $\text{H}_{3',5'}$) ppm. C- NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 20.8, 44.8, 61.5, 109.1, 109.8, 117.5, 119.6, 120.1, 125.5, 127.3, 129.3, 134.0, 135.3, 136.2, 144.8, 158.9, 161.8, 178.0.

4-((2,3-dioxindolin-1-yl)methyl)-1-(4-methylbenzyl)pyridin-1-ium bromide (5f): Red solid; yield: 70%, mp = 195-199 °C. IR (KBr): 1711 (C=O), 1689 (C=O amid), 3015 (C-H

1-((1-(4-methylbenzyl)-1H-pyridin-3-yl)methyl)indoline-2,3-dione bromide (5k):

Orange solid; yield: 75%, mp = 212-215 °C. IR (KBr): 1718 (C=O), 1680 (C=O amid), 3005 (C-H aromatic) cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 2.32 (s, 3H, CH_3), 5.58 (s, 2H, N- CH_2), 5.82 (s, 2H, N^+ - CH_2), 7.03 (m, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.22 (d, J= 8.5 Hz, 2H, $\text{H}_{3,5}$), 7.35 (d, J= 7 Hz, 1H, H_7), 7.37 (d, J= 8.5 Hz, 2H, $\text{H}_{2,6}$), 7.41 (d, J= 7 Hz, 1H, H_4), 8.02 (d, J= 8 Hz, 1H, H_6), 8.08 (t, J= 7 Hz, 1H, H_5), 8.95 (s, 1H, H_2), 9.15(d, J=6 Hz, 1H, H_4) ppm. C- NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 20.6, 42.5, 63.1, 109.0, 109.3, 109.8, 117.5, 117.7, 119.0, 127.2, 128.3, 128.7, 129.0, 129.6, 130.9, 135.2, 135.7, 139.0, 139.8, 164.3, 180.5.

1-((1-benzyl-1H-pyridin-3-yl)methyl)indoline-

2,3-dione bromide (5l): Orange solid; yield: 72%, mp = 198-201 °C. IR (KBr): 1723 (C=O), 1690 (C=O amid), 3025 (C-H aromatic) cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 5.60 (s, 2H, N- CH_2), 5.90 (s, 2H, N^+ - CH_2), 7.03 (m, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.38 (d, J= 7.5 Hz, 1H, H_7), 7.41 (d, J=8 Hz, 1H, H_1), 7.40-7.43 (m, 2H, $\text{H}_{2,4,6}$), 7.49 (m, 2H, $\text{H}_{3,5}$), 8.02 (d, J= 8 Hz, 1H, H_6), 8.08 (t, J= 7 Hz, 1H, H_5), 9.08(s, 1H, H_2), 9.19 (d, J=6 Hz, 1H, H_4) ppm. C- NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 42.6, 63.2, 109.1, 109.3, 109.8, 117.5, 117.7, 119.2, 120.9, 127.2, 128.4, 128.9, 129.2, 129.5, 134.0, 135.2, 135.7, 139.8, 164.5, 181.5.

شیمی سنتز ترکیبات

ابتدا یک واکنش SN^2 بین ایساتین و مشتقات ۳-پیکولیل کلرید

(MHz): δ = 44.8, 62.2, 109.1, 109.8, 117.6, 119.1, 120.8, 125.2, 127.1, 128.9, 134.1, 135.3, 135.9, 144.5, 144.6, 158.9, 163.3, 182.3.

1-(2-chlorobenzyl)-3-((2,3-dioxindolin-1-

yl)methyl)pyridin-1-ium bromide (5i): Orange solid; yield: 86%, mp = 209-213 °C. IR (KBr): 1728 (C=O), 1688 (C=O amid), 2981 (C-H aromatic) cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 5.60 (s, 2H, N- CH_2), 5.97 (s, 2H, N^+ - CH_2), 7.02 (m, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.35-7.45 (m, 6H, $\text{H}_{4,7,2,4,5,6}$), 8.13 (m, 1H, H_6), 8.20 (m, 1H, H_5), 8.62 (s, 1H, H_2), 9.07(d, J=5Hz, 1H, H_4) ppm. C- NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 42.5, 61.3, 109.0, 109.8, 117.5, 117.8, 127.2, 128.2, 129.9, 130.9, 131.7, 131.9, 135.1, 135.7, 139.9, 142.5, 144.1, 162.5, 180.8.

1-(4-chlorobenzyl)-3-((2,3-dioxindolin-1-

yl)methyl)pyridin-1-ium bromide (5j): Orange solid; yield: 77%, mp = 200-205 °C. IR (KBr): 1718 (C=O), 1683 (C=O amid), 2979 (C-H aromatic) cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 5.57 (s, 2H, N- CH_2), 5.87 (s, 2H, N^+ - CH_2), 7.02 (m, 2H, $\text{H}_{5,6}$), 7.34 (d, J= 7.5 Hz, 1H, H_7), 7.41 (d, J= 7 Hz, 1H, H_4), 7.49 (d, J= 7.5 Hz, 2H, $\text{H}_{2,6}$), 7.52 (d, J= 7.5 Hz, 2H, $\text{H}_{3,5}$), 8.03 (d, J= 8 Hz, 1H, H_6), 8.08 (t, J= 6.5 Hz, 1H, H_5), 8.92 (s, 1H, H_2), 9.07(d, J=6 Hz, 1H, H_4) ppm. C- NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 42.5, 62.4, 109.0, 109.3, 109.8, 117.5, 117.8, 119.2, 127.2, 128.3, 128.9, 129.2, 130.8, 131.0, 132.8, 134.2, 135.2, 135.7, 139.9, 163.3, 182.8.

نسبت به استیل کولین استراز در غلظت کمتر از ۷,۲۴ میکرومتر برای همه ترکیبات هدف وجود دارد. ترکیبات قوی تر 5a, 5b, 5c, 5g و 5h بودند که در میان آنها ترکیب 5b از سری ۱ (پیریدین-۴-ایل متیل) ایندولین با اثر مهارکنندگی IC50 برابر با ۱,۰۰ میکرومتر قوی ترین اثر را از خود نشان داد.

لازم به ذکر است که ترکیبات 3a و 3b نیز شروط لازم و کافی برای پیوند با جایگاه‌های استری و آنیونی آنزیم کولین استراز را دارند، زیرا حلقه پیریدین نیز می‌تواند در pH بدن پروتونه شده و تولید پیوند هیدروژنی کند. مطالعات پیشین که درباره داروی دونیزیل انجام شده است، نشان از پیوند آب‌گریزی اضافی به وجود آمده از پیوند حلقه بنزیلی متصل به گروه آمینی دارد. در این پژوهش، از این دارو الگوبرداری شده است و فقط ساختار فراورده‌های واکنش که احتمال بیشترین برهم‌کنش با گیرنده را دارند، آزمون شدند که نتایج مربوط در جدول ۱ ارائه شده است.

و ۴-پیکولیل کلرید رخ داده و به ترتیب حدواسط‌های ۱- (پیریدین-۳-ایل متیل) ایندولین-۲ و ۳-دی‌اون و ۱- (پیریدین-۴-ایل متیل) ایندولین-۲ و ۳-دی‌اون تولید می‌شود. در مرحله آخر یک واکنش SN² دیگر بین حدواسط‌ها و مشتقات متفاوت بنزیل برماید رخ داده و فراورده‌های 5a تا 5m که به شکل نمکی هستند، تولید می‌شوند.

بررسی اثر دارویی فراورده‌ها

فعالیت برون‌تنی فراورده‌های 5a تا 5m برای مهار آنزیم کولین استراز بررسی و با دونیزیل به‌عنوان داروی استاندارد مقایسه شد. آزمون در سه آزمایش مستقل انجام و همه داده به صورت Mean ± S.E. بیان شده‌اند. فعالیت ضدکولین استرازی (برحسب میکرومتر) فراورده‌ها که شامل دو سری ۱- (پیریدین-۳-ایل متیل) ایندولین و ۱- (پیریدین-۴-ایل متیل) ایندولین بودند، در جدول ۱ نشان داده شده است. مطالعه نتایج نشان داد که فعالیت مهارکنندگی قابل توجهی

جدول ۱ اثر مهارکنندگی آنزیم کولین استراز فراورده‌های 5a تا 5m

ردیف	کد نمونه	حلال	IC ₅₀ (AChE)μM	ساختار
۱	5a	DMSO	۳,۹۳	
۲	5b	DMSO	۱,۰۰	
۳	5c	DMSO	۸,۳۵	
۴	5d	DMSO	۳۲۵	

ادامه جدول ۱

ردیف	کد نمونه	حلال	IC ₅₀ (AChE) μM	ساختار
۵	5f	DMSO	۲۸۰	
۶	5e	DMSO	۲۳۰	
۷	5g	DMSO	۱۱,۳۵	
۸	5h	DMSO	۱۸,۲۵	
۹	5i	DMSO	۱۵۵	
۱۰	5j	DMSO	۲۴۵	
۱۱	5k	DMSO	۲۷۰	
۱۲	5l	DMSO	۱۹۵	

اورتو < پارا) پیروی می‌کرد. قرار دادن گروه متیل در موقعیت اورتو و متا و پارا حلقه بنزن، باعث کاهش شدید این اثر می‌شود به طوری که همه ترکیبات متیل‌دار اثر خوبی از خود به نمایش گذاشتند. مقایسه ترکیبات سری‌های ۱- (پیریدین-۴-۳-پیریدین نشان می‌دهد که ترکیبات دسته ۱- (پیریدین-۴-۳-ایل متیل) ایندولین به مراتب اثر بهتری از ترکیبات دسته ۱- (پیریدین-۳-۳-ایل متیل) ایندولین داشتند.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که اثر مهارکنندگی ترکیبات طراحی شده در برابر آنزیم استیل کولین استراز وابسته به نوع گروه استخلافی روی حلقه بنزیلی است، به طوری که اثر ترکیباتی که روی حلقه، هالوژن داشتند بهتر بوده و در بین هالوژن‌های کلر و فلوئور، ترکیبات کلردار اثر بهتری را به نمایش گذاشتند. همچنین، موقعیت قرار گرفتن هالوژن‌ها بر حلقه بنزیلی نیز در اثر دارویی آن‌ها نقش بسزایی داشت و از ترتیب (متا <

مراجع

- [1] Tramutola, A.C.; Lanzillotta, M.P.; Allan B. Brain research bulletin 133, 88-96, 2017.
- [2] Hong, S.; Victoria F.; Beja G.; Bianca M.; Nfonoyim, A.F.; Shaomin L.; Saranya R.; Katherine M.; Merry, A.; Science 352, 712-716, 2016.
- [3] Parsons, C.G.; Danysz, W.; Dekundy, A.; Pulte, I.; Neurotoxicity research 24, 358-369, 2013.
- [4] Han, K.; Zhou, Y.; Liu, F.; Guo, Q.; Wang, P.; Yang, Y.; Bioorg Med Chem Lett. 24, 591-594, 2014.
- [5] Zapata-Sudo, G.; Pontes, L.B.; Gabriel, D.; Mendes, T.; Ribeiro, N.M.; Pinto, A.C. Pharmacol Biochem Behavior. 86, 678-685, 2007.
- [6] Liang, C.; Xia, J.; Lei, D.; Li, X.; Yao, Q.; Gao, J. Eur J Med Chem. 74, 742-750, 2014.
- [7] Nisha, K.K.; Bhargava, G.; Land, K.M.; Chang, K.H.; Arora, R. Eur J Med Chem. 74, 657-663, 2014.
- [8] Medvedev, A.E.; Clow, A.; Sandler, M.; Glover, V.; Biochem pharmacol. 52, 385-391, 1996.
- [9] Anand, P.; Baldev, S.; Archives of pharmacal research 36, 375-399, 2013.
- [10] Singh, M.; Kaur, M.; Kukreja, H.; Chugh, R.; Silakari, O.; Singh, D.; European Journal of Medicinal Chemistry 70, 165-188, 2013.
- [11] Darreh-Shori, T., Soinenen. H.; Current Alzheimer Research 7, 67-73, 2010.
- [12] Ashraf, M.A.; Rusli, I.; Tan, S.C.; Yeong, K.Y.; Ang, C.W.; Suresh, P.; Raju S.K.; Hasnah, O.; Elumalai, M. Bioorganic & medicinal chemistry letters 20, 7064-7066, 2010.
- [13] Kia, Y.; Hasnah, O.; Raju, S.; Kumar, V.M.; Basiri, A.; Perumal, S.; Wahab, H.A.; Choi S.B.; Bioorganic & medicinal chemistry 21, 1696-1707, 2013.
- [14] Kong, D.L.; Guo, P.L.; Ming, S.W.; Zai, F.S.; Qiang, L.; ACS Sustainable Chemistry & Engineering 5, 3465-3470, 2017.

Design and Synthesis of 1-benzyl-3-((2,3-dioxoindolin-1-yl)methyl)pyridinium bromide and evaluation of acetyl- and butyryl-cholinesterase activity as Novel Anti Alzheimer Derivatives

M. Moghanlou¹ and B. Mirza^{2,*}

1. Ph.D Student in Organic Chemistry, Faculty of Science, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran
2. Associate Prof. of Organic Chemistry, Faculty of Science, Islamic Azad University, Karaj branch, Alborz, Iran

Received: July 2017, Revised: December 2017, Accepted: December 2017

Abstract: In this paper, the synthesis of novel 1-benzyl-3-((2,3-dioxoindolin-1-yl)methyl)pyridinium bromide is reported. The products were synthesized in two steps from isatin and 3-(chloromethyl)pyridine or 4-(chloromethyl)pyridine derivatives in basic conditions. The inhibition activity of the products was studied against acetyl- and butyryl-cholinesterase. The results showed that, 4-pyridine derivatives had higher activities than 3-pyridine derivatives. In addition, among 4-pyridine derivatives, the best activities were related to 5a, 5b, 5c, 5g, and 5h, while 5b had the highest inhibition activity by $IC_{50} = 1.00 \mu M$, which could be applied in the treatment of Alzheimer disease.

Keywords: isatin, acetyl-cholinesterase, butyryl-cholinesterase, Alzheimer disease, chloromethyl pyridine