

# بررسی تجربی و محاسبه‌ای برهمکنش مشتق‌های گوناگونی از سیستم هتروسیکلی ایمیدازوآکریدین با آنزیم اوره آز

جواد محمدی، مهدی پردل\*، محمدرضا بزرگمهر

گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

**چکیده:** در این کار پژوهشی، مشتق‌های گوناگونی از سامانه هتروسیکلی، ایمیدازو [۴، ۵-a] آکریدین که دارای پیشینه مناسبی از فعالیت‌های زیستی می‌باشند، با استفاده از واکنش ترکیب‌های آلکیل‌دار شده بنزوایمیدازول با آریل استونیتریل‌های گوناگون با بازده‌های بالا تهیه شد و پس از خالص‌سازی و اثبات ساختار آن‌ها، در آزمایشگاه و به صورت تجربی برهمکنش آن‌ها با آنزیم اوره آز بررسی شد. نتیجه‌های تجربی از بررسی  $IC_{50}$  آن‌ها نشان می‌دهد که این ترکیب‌ها در مقایسه با استاندارد تیواوره قابلیت بازدارندگی بسیار مناسبی از خود در برابر آنزیم اوره آز نشان می‌دهند. همچنین به منظور بررسی دقیق‌تر مکان‌های برهمکنش در لیگاند‌های مورد نظر و آنزیم اوره آز، از روش شبیه‌سازی و داکینگ مولکولی استفاده شد. مطالعه‌ها نشان می‌دهد که مشتق دارای کلر دارای بیش‌ترین برهمکنش با آنزیم اوره آز می‌باشد. همچنین بررسی و مقایسه نتیجه‌های تجربی و محاسبه‌ای نشان می‌دهد که این مطالعه‌ها همخوانی بسیار مناسب و نزدیکی با یکدیگر دارند.

**واژگان کلیدی:** ایمیدازوآکریدین، بازدارندگی، اوره آز،  $IC_{50}$ ، شبیه‌سازی مولکولی

**KEYWORDS:** Imidazoacridine, Inhibition, Urease,  $IC_{50}$ , Molecular simulation

## مقدمه

پیلوری در شرایط اسیدی در معده می‌شود [۹]. عفونت هلیکوباکتر پیلوری باعث زخم معده و اثنی عشر می‌شود که می‌تواند منجر به سرطان معده (دومین عامل مرگ و میر در سراسر جهان) شود [۱۰]. بیماری زخم معده به دلیل افزایش فعالیت آنزیم اوره آز و در نتیجه افزایش پایداری و کلونی شدن باکتری‌های بیماری‌زا است [۱۱]. از این رو از مهارکننده‌های اوره آز برای توقف فعالیت هلیکوباکتر پیلوری و درمان این گونه بیماری‌ها استفاده می‌شود [۱۲]. از سوی دیگر، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اوره آز‌های میکروبی در ایجاد بیماری‌هایی مانند سنگ کلیه و پیلونفریت [۱۳]، کمای کبدی، عفونت‌های دستگاه ادراری، لنفوم معده، زخم معده و کارسینوم معده نقش دارند [۱۴، ۱۵]. با توجه به این که این فرایند یک

اوره آز یک متالوآنزیم از خانواده آمیلوهیدرولاز است (شکل ۱)، که آنزیم اصلی در هیدرولیز اوره به آمونیاک و دی‌اکسید کربن است و بنابراین نقش مهمی در چرخه نیتروژن دارد [۱]. این آنزیم یک متالوآنزیم دارای نیکل است [۲] که با پیوند شیمیایی یا فیزیکی به تکیه‌گاه‌های آلی [۳، ۴] و معدنی [۵، ۶] تثبیت می‌شود. در کشاورزی، عملکرد اوره به عنوان کود کارآمد خاک به دلیل نگرانی‌های زیست محیطی و آسیب بدن که به فعالیت اوره آز نسبت داده می‌شود، محدود می‌شود [۷]. اوره آز اغلب در گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌های گوناگون وجود دارد و به عنوان عامل بیماری‌زای کلیدی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مانند هلیکوباکتر پیلوری کشف شده است [۸]. این آنزیم منجر به رشد باکتری‌های پاتوژن گوناگون (مانند هلیکوباکتر

\*Email: mehdipordel58@mshdiau.ac.ir

\* عهده‌دار مکاتبات

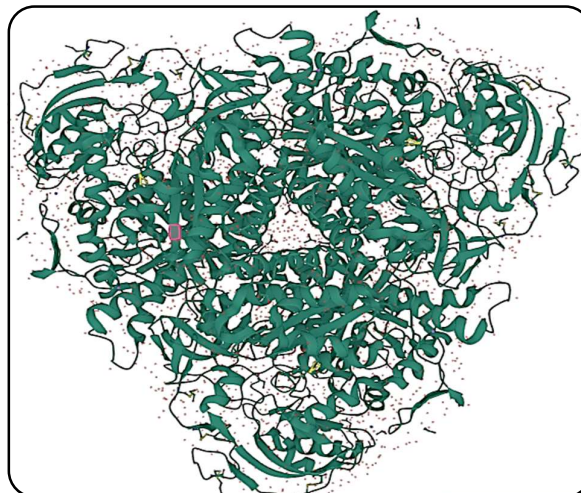
مقاومت در برابر داروهای موجود، هستند. این امر نیاز به مهارکننده‌های جدید بهبود یافته را نشان می‌دهد که می‌توانند به طور موثر با عفونت‌های باکتریایی مقابله کنند [۳۵، ۳۶]. متأسفانه اغلب ترکیب‌ها بازدارنده اوره آز، ویژگی‌های نامطلوبی مانند پایداری نسبتاً کم یا سمیت بالا را نشان می‌دهند که استفاده بالینی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۳۷]. با توجه به آن چه که در مباحث بالا گذشت و نیز در ادامه سنتز ترکیب‌های فعال زیستی توسط این گروه پژوهشی [۴۲-۳۸]، طراحی، سنتز و برهمکنش‌های تجربی و محاسبه‌ای یک سری کارآمد از مشتق‌های گوناگون فعال زیستی [۴۳-۴۵]، از سیستم هتروسیکلی ایمیدازواکریدین ارایه می‌شود که نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که بیش‌تر این ترکیب‌ها می‌توانند به عنوان داروهای موثری در این زمینه معرفی شوند.

### بخش تجربی

نقطه ذوب به وسیله دستگاه نقطه ذوب الکتروگرایی AI۹۱۰۰ ثبت شد. طیف‌های  $^1\text{H-NMR}$  به وسیله دستگاه اسپکترومتر DRX-300 FT در فرکانس ۴۰۰ MHz با استفاده از حلال کلروفرم گرفته شد. طیف‌های  $^{13}\text{C-NMR}$  نیز توسط این دستگاه در فرکانس ۱۰۰ MHz با استفاده از حلال کلروفرم گرفته شد. جابه جایی‌های شیمیایی با استفاده از تترا متیل سیلان (TMS) به عنوان استاندارد داخلی اندازه گیری شدند. طیف‌های جذبی بر روی اسپکتروفوتومتر Varian 50-bio UV-Visible ثبت شد. اسکن UV-Vis از ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر انجام شد. ترکیب‌های ۳a-d مطابق با دستور کار تجربی مقاله‌های گذشته سنتز شدند [۴۸-۴۶]. آنزیم اوره آز (jack bean urease) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. سایر ترکیب‌های شیمیایی لازم برای انجام این کار پژوهشی، از شرکت‌های Merck و Sigma-Aldrich خریداری شدند.

### روش تهیه ترکیب‌های ۳a-d

در ابتدا با استفاده از متیل یدید (۵ میلی‌لیتر)، ترکیب ۵-نیترو-بنزوایمیدازول (۱۵۰ میلی‌مول) در حلال DMF (۲۰۰ میلی‌لیتر) و باز KOH (۲۰ گرم)، متیل دار شد. پس از انجام واکنش که با استفاده از TLC کنترل می‌شد، محتویات ظرف واکنش به داخل آب و یخ (۵۰۰ میلی‌لیتر) ریخته شد و رسوب‌های به دست آمده با استفاده از قیف بوشنر صاف و در مجاورت هوا خشک شد. بازده واکنش: ۷۵٪/۷۵ نقطه ذوب ترکیب به دست آمده: ۷۷-۷۵ درجه سلسیوس (نقطه ذوب مرجع: ۷۷-۷۴ درجه سلسیوس [۴۶])



شکل ۱ - آنزیم اوره آز

مسیر ضروری برای تامین انرژی باکتری‌ها است، مهار اوره آز می‌تواند برای از بین بردن باکتری‌ها مفید باشد. در این راستا، مطالعه‌های متعددی نشان داده‌اند که مهارکننده‌های اوره آز می‌توانند برای درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری مفید باشند [۱۶]. با وجود ترکیب‌های متعددی که دارای پتانسیل مهار اوره آز هستند، تعداد کمی از ترکیب‌ها هم برای درمان اوره آز وجود دارند. بنابراین، کشف مهارکننده‌های اوره آز مؤثر و ایمن، به دلیل سهم اوره‌آزها در شرایط گوناگون بیماری زایی، موضوع بسیار مهمی در پژوهش‌های دارویی است [۱۷]. پژوهش‌های گذشته نشان دادند که ترکیب‌های مبتنی بر آکریدین اهداف دارویی گوناگونی از جمله داروهای ضد باکتری [۱۸]، عامل‌های ضد مالاریا [۱۹]، داروهای ضد التهابی [۲۰]، داروهای ضد ویروسی [۲۱] و داروهای ضد HIV [۲۲] را نشان می‌دهند. در پژوهشی که به عنوان تست آنزیم اوره آز در یکی از ترکیب‌ها آکریدین انجام شد، مشخص شد که اوره آز می‌تواند برای تشخیص سریع گونه‌های بروسلا حتی در کشت‌های خون معمولی استفاده شود [۲۳]. از طرفی آزول‌ها به دلیل توانایی آن‌ها در ایجاد پیوندهای هیدروژنی و سایر برهمکنش‌های غیرکووالانسی با جایگاه‌های هدف آنزیم‌های گوناگون، اهمیت ساختاری مشخصی دارند. این بخش‌های هتروسیکلیک کوچک در ساختار ترکیب‌ها ضد التهاب [۲۴]، ضد سرطان [۲۵، ۲۶]، ضد میکروبی [۲۷] و ضد سل [۲۸] گنجانده شده‌اند. همچنین، چندین گزارش در مورد فعالیت مهارکنندگی اوره آز توسط مشتق‌های آزول‌ها وجود دارد [۳۴-۲۹]. بیش‌ترین چالش‌های درمانی در این زمینه، مسیرهای سنتز خسته کننده، وجود عوارض جانبی دارو، هزینه درمان و گاهی مواقع ایجاد

سپس، ترکیب‌ها ۱-متیل-۵-نیترو-بنزایمیدازول (۲۰ mmol) و آریل استونیتریل‌های ۲a-d (۲۵ mmol) به محلول KOH (۶۰ mmol) در متانول (۲۰ mL) در دمای محیط اضافه شد. پس از همزدن محلول به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط، رسوب‌های به دست آمده شده توسط قیف بوشنر صاف شد و با استفاده از حلال‌های متانول و سپس استن شستشو داده شد. جامد به دست آمده ۳a-d به وسیله حلال تبلور اتانول متبلور و خالص سازی شد [۴۸،۴۷].

### داده‌های طیفی ترکیب‌های ۳a-d

3-Methyl-3H-imidazo[4,5-a]acridine-11-carbonitrile (3a). m.p.: 331–333 °C (lit.[46] m.p.: 332–334 °C); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4.30 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 7.88 (d, J = 9.5 Hz, 1H, Ar H), 7.91-7.97 (m, 3H, Ar H), 8.20 (d, J = 9.5 Hz, 1H, Ar H), 8.46 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar H), 9.21 (s, 1H, Ar H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 44.5, 110.0, 115.8, 116.6, 117.2, 121.9, 124.2, 124.3, 128.8, 129.6, 132.0, 134.9, 137.0, 140.6, 146.3, 147.4 ppm.

3,8-Dimethyl-3H-imidazo[4,5-a]acridin-11-carbonitrile (3b). m.p.: 305–308 °C (lit.[46] m.p.: 307–309 °C); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.27 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 7.69 (dd, J = 8.9 Hz, J' = 2.3 Hz, 1H, Ar H), 7.88 (d, J = 9.5 Hz, 1H, Ar H), 8.09 (d, J = 2.3 Hz, 1H, Ar H), 8.11 (d, J = 9.5 Hz, 1H, Ar H), 8.34 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar H), 9.15 (s, 1H, Ar H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 22.0, 36.3, 110.1, 114.6, 115.9, 116.7, 117.3, 119.5, 121.8, 124.4, 132.9, 134.3, 134.8, 138.0, 140.7, 146.4, 147.3 ppm.

8-Methoxy-3-methyl-3H-imidazo[4,5-a]acridine-11-carbonitrile (3c). m.p.: 321–324 °C (lit.[47] m.p.: 320–322 °C); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4.06 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.63 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 7.51 (dd, 1 H, H(9); J<sub>1</sub> = 9.0 Hz, J<sub>2</sub> = 2.2 Hz, Ar H), 7.52 (d, 1 H, H(7), J = 2.2 Hz), 7.59 (d, 1 H, H(10) J = 9.5 Hz, Ar H), 7.90 (d, 1 H, H(5) J = 9.0 Hz, Ar H), 8.33 (d, 1 H, H(4), J = 9.5 Hz, Ar H), 9.15 (s, 1 H, Ar H), ppm; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 44.5, 55.8, 106.6, 110.4, 116.0, 116.8, 117.2, 120.7, 122.1, 124.1, 125.6, 129.1, 134.6, 136.8, 147.5, 147.8, 161.2 ppm.

8-Chloro-3-methyl-3H-imidazo[4,5-a]acridine-11-carbonitrile (3d). m.p. 323-325 °C (lit.[48] m.p.: 325–327 °C); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4.27 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 7.88 (dd, J = 9.0 Hz, J' = 2.3 Hz, 1H, Ar H), 7.91 (d, J = 9.5 Hz, 1H, Ar H), 8.05 (d, J = 9.5 Hz, 1H, Ar H), 8.28 (d, J = 2.3 Hz, 1H, Ar H), 8.51 (d, J = 9.0 Hz, 1H, Ar H), 9.12 (s, 1H, Ar H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 44.6, 115.6, 115.7, 116.7, 117.6, 124.3, 124.5, 125.8, 129.5, 132.4, 132.8, 135.1, 137.2, 142.5, 146.2, 148.1 ppm.

### روش بررسی برهمکنش آنزیمی [۴۹]

مخلوط واکنش دارای محلول ۲۵ میکرولیتر آنزیم (اوره آز) و ۵۵ میکرولیتر بافر در pH = ۶/۸ با ۱۰۰ میلی‌مولار اوره، با غلظت ۵ میکرولیتر و ترکیب‌های مورد آزمایش ۳a-d (از غلظت ۰/۵ تا

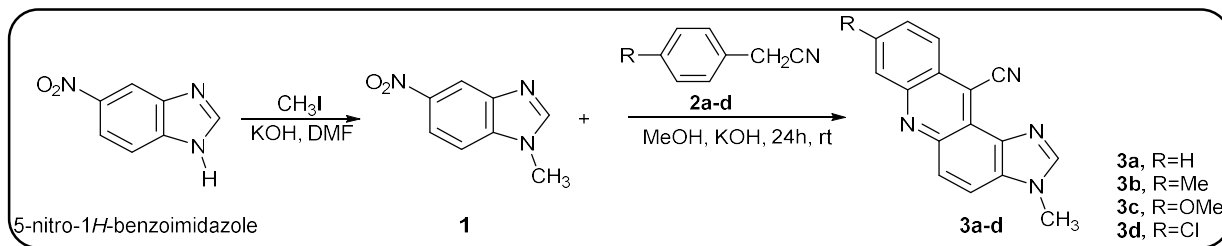
$$(1) \quad 100 \times (\text{جذب کنترل/جذب نمونه}) - 100 = \text{بازدارندگی} \%$$

### روش محاسبه‌ای

پنج جعبه شبیه‌سازی گوناگون طراحی شد. در جعبه اول، آنزیم اوره آز با کد 4GY7 pdb [۵۰] در بانک اطلاعات پروتئین در مرکز جعبه شبیه‌سازی قرار گرفت. در جعبه‌های بعدی، آنزیم اوره آز به همراه ترکیب‌های ۳a-d قرار داده شد. آنزیم اوره آز در مرکز جعبه قرار داده شد و ترکیب‌های ۳a-d به طور تصادفی قرار گرفتند. تمام شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی با نرم‌افزار Gromacs نسخه ۱.۲.۵ و میدان نیروی اتمی Charm27 انجام شد. ساختار این ترکیب‌ها با استفاده از روش تابعی چگالی B3LYP با تابع پایه ۶-۳۱\* G<sup>\*</sup> بهینه شد. برای کنترل بهینه‌سازی، محاسبه‌های فرکانس انجام شد و فرکانس‌های مجازی مشاهده نشد. تمامی محاسبه‌ها از ابتدا توسط بسته نرم‌افزاری GAMESS [۵۱] انجام شد. وب سرور SwissParam [۵۲] برای تعیین پارامترهای میدان نیرو ترکیب‌های عنوان استفاده شد. برای حذف انرژی جنبشی اولیه سامانه و حذف تماس‌های نامناسب بین اتم‌ها از الگوریتم نزول شیب [۵۳] برای بهینه‌سازی سامانه‌های طراحی شده استفاده شد.

### نتیجه‌گیری و بحث

همان‌گونه که در شکل ۲ به تصویر کشیده شده است، در ابتدا برای تهیه ماده اولیه مورد نظر، از واکنش ۵-نیترو-بنزایمیدازول در حلال DMF و شرایط بازی KOH، ترکیب ۱-متیل-۵-نیتروبنزایمیدازول (۱) با بازده مناسب به دست می‌آید. در ادامه از واکنش این ترکیب متیل‌دار شده با آریل استونیتریل‌های ۲a-d



شکل ۲ - سنتز ایمیدازو آکریدین های ۳a-d

جدول ۱ - نتیجه‌های بازدارندگی ترکیب‌های سنتز شده ۳a-d در برابر آنزیم اوره آز

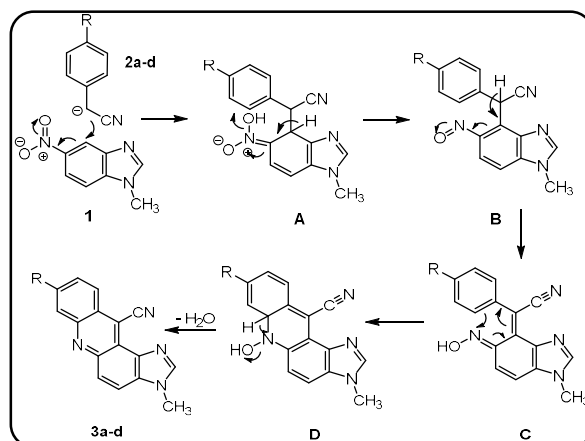
ترکیب	IC <sub>50</sub> ± SEM (μM)
3a	۲۲/۲۱ ± ۰/۶۰
3b	۲۰/۰۷ ± ۰/۴۰
3c	۱۲/۲۳ ± ۰/۱۰
3d	۹/۸۷ ± ۰/۵۰
تیواوره (استاندارد)	۲۰/۹۴ ± ۰/۷۰

درجه متغیری از پتانسیل بازدارندگی با مقدار IC<sub>50</sub> در بازه بین ۰/۱۰ ± ۹/۲۳ تا ۰/۶۰ ± ۲۳/۱۰ میکرومولار در مقایسه با تیوره استاندارد با IC<sub>50</sub> ۲۰/۹۴ ± ۰/۷۰ میکرومولار را نشان می‌دهند (جدول ۱). در بین مشتق‌های سنتز شده، ترکیب‌های ۳b-d بهتر از استاندارد تیواوره ظاهر شدند و ویژگی‌های بازدارندگی بهتری را نشان دادند. همچنین در بین این ترکیب‌ها نیز، مشتق ۳d که دارای گروه کلر در موقعیت حلقه آروماتیک می‌باشد بهترین نتیجه بازدارندگی را از خود بروز می‌دهد. به نظر می‌رسد این ترکیب برهمکنش‌های مناسب‌تری با آنزیم اوره آز داشته که سبب افزایش پتانسیل بازدارندگی در برابر این آنزیم می‌شود. در این مطالعه مشاهده می‌شود که ماهیت استخلاف‌ها بر روی حلقه‌های آروماتیک تأثیر زیادی بر قدرت مهارکنندگی ترکیب‌های سنتز شده دارد. به منظور بررسی بیش‌تر این برهمکنش‌ها، محاسبات شیب‌سازی و داکینگ مولکولی برای رسیدن به این هدف به کار گرفته شد.

#### بررسی محاسباتی (شیب‌سازی دینامیک مولکولی)

برای مطالعه نظری برهمکنش ترکیب‌های سنتز شده با آنزیم اوره آز، نخست ساختار بهینه شده لیگندهای ۳a-d با استفاده از نرم‌افزار گوسین به دست آمد (شکل ۴).

یک روش مناسب برای بررسی تغییرهای ساختاری ترکیب‌ها، نمودار R<sub>g</sub> (شعاع ژیراسیون) می‌باشد که می‌تواند فعالیت و پایداری ترکیب را مشخص کند، این آنالیز میزان فشردگی صورتبندی

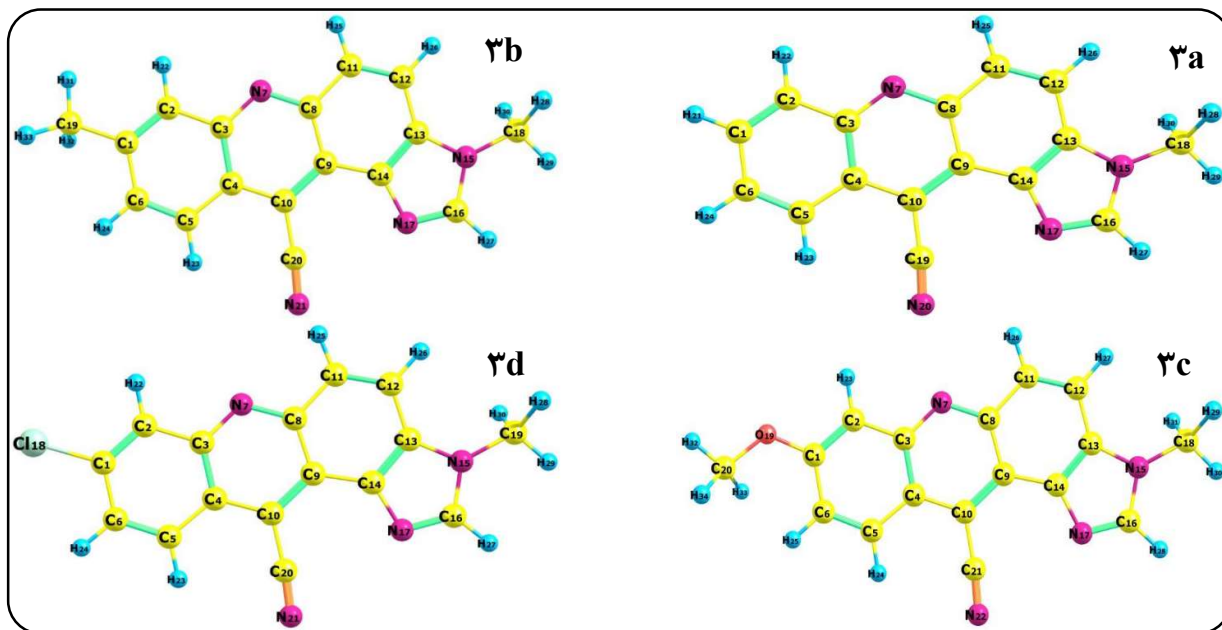


شکل ۳ - مکانیسم محتمل و پیشنهادی، برای تهیه ایمیدازو آکریدین های ۳a-d

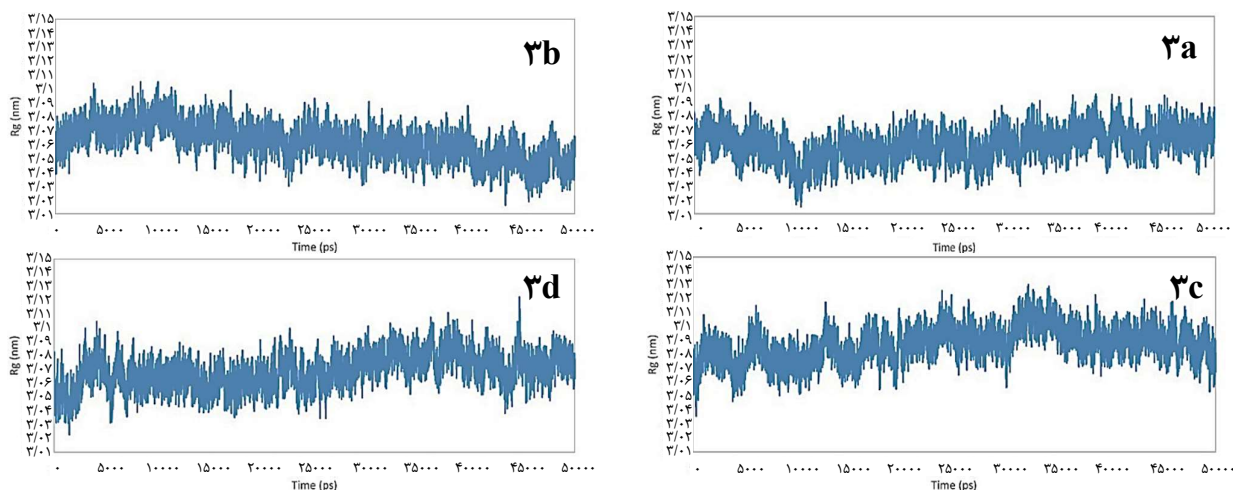
در حلال متانول و شرایط بازی، فراورده‌های مورد نظر ۳a-d، طی یک واکنش حلقه‌زایی با بازده مناسب سنتز می‌گردند. ساختار ترکیب‌های به‌دست آمده از مقایسه ویژگی‌های طیفی و نقطه ذوب‌های آن‌ها با ترکیب‌های که در پژوهش‌های گذشته این گروه سنتز شده بودند، تایید می‌شود (بخش تجربی) [۴۸-۴۶]. مکانیسم واکنش مورد نظر نیز در مقاله‌های گذشته با استفاده از روش‌های محاسبه‌ای DFT در سطح بالا، به صورت ترمودینامیکی و سینتیکی مطالعه، بررسی و منتشر شده است [۵۴]. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، با حمله نوکلئوفیلی کربانیون آریل استونیتریل‌های ۲a-d، حد واسط A ایجاد شده و در ادامه و در اثر حذف آب، حد واسط B تولید می‌شود. سپس در اثر توتومری این ترکیب، حد واسط C به وجود آمده و در ادامه با حلقه‌زایی آن به حد واسط D رسیده و سرانجام در اثر خروج یک مولکول آب، ترکیب‌های هتروسیکلی آروماتیک ۳a-d، تهیه می‌گردند.

#### مطالعه برهمکنش آنزیمی ترکیب‌های سنتز شده ۳a-d با اوره آز

جزئیات تجربی آزمایش‌ها را می‌توان در بخش تجربی یافت. مطابق با نتیجه‌های آزمایش، کلیه ترکیب‌های سنتز شده ۳a-d



شکل ۴ - ساختار بهینه شده لیگندهای 3a-d



شکل ۵ - نمودارهای شعاع ژیراسیون آنزیم در سامانه‌های گوناگون

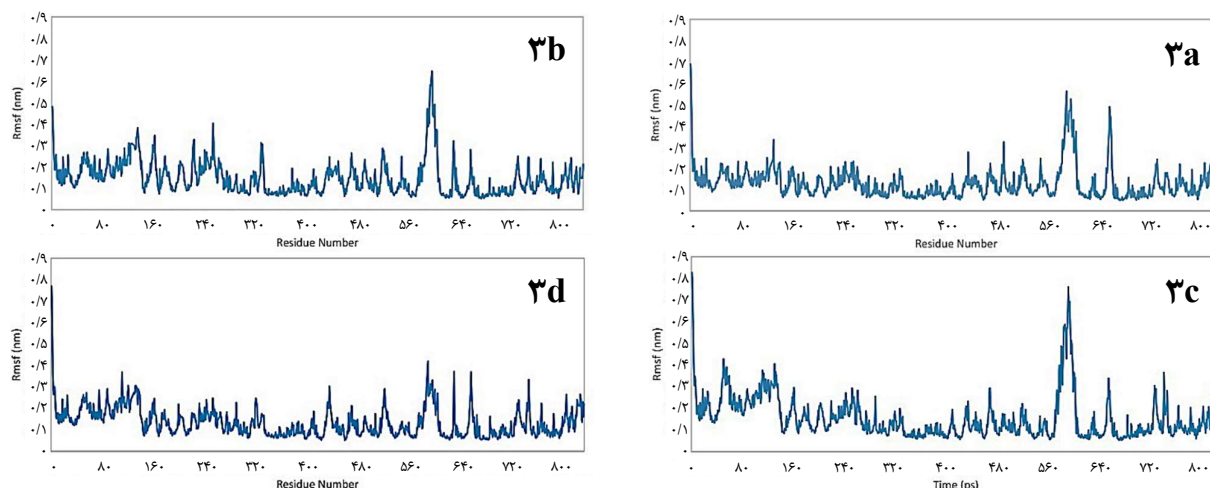
که ساختار آنزیم در حضور لیگندهای گوناگون تغییرهای کنفورماسیونی داشته است به طوری که بیش‌ترین مقادارهای شعاع ژیراسیون در سامانه 3b و کم‌ترین مقادارها در سامانه 3d مشاهده شد. افزایش شعاع ژیراسیون در این سامانه‌ها نشان‌دهنده باز شدن ساختار آنزیم و کاهش شعاع ژیراسیون نشان‌دهنده تاخوردگی ساختار آنزیم است. همچنین مقادارهای RMSF (The root-mean-square-fluctuation) دنباله‌های آنزیم مربوطه در همه سامانه‌های طراحی شده، محاسبه شد و نتیجه‌ها در شکل ۶ نشان داده است. RMSF معیاری از

را نشان می‌دهد. مقادارهای شعاع ژیراسیون ترکیب با استفاده از معادله زیر به دست آمد:

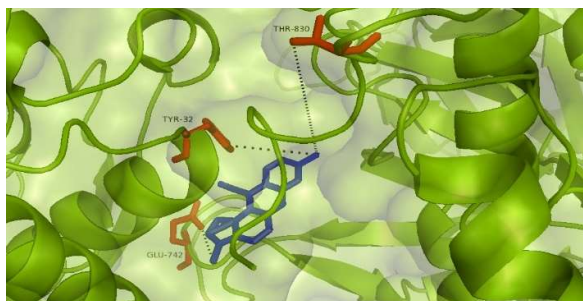
$$R_g = \left( \frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

که  $m_i$  جرم اتمی  $i$  و موقعیت اتمی  $i$  وابسته به مرکز جرم مولکول است. نتیجه‌های  $R_g$  سامانه‌های مورد مطالعه محاسبه شد و نتیجه‌ها در شکل ۵ نشان داده می‌شود.

نتیجه‌های شعاع ژیراسیون آنزیم در زمان‌های گوناگون، نشان داد



شکل ۶ - نمودارهای آنالیز آنزیم در سامانه‌های گوناگون



شکل ۷ - شماتیک موقعیت قرارگیری لیگاند ۳b و دنباله‌های آنزیم در یکی از سامانه‌های شبیه‌سازی (لیگاند با رنگ آبی و دنباله‌های موردنظر با رنگ قرمز مشخص شدند)

ایمیدازواکردین با استخلاف کلر (۳d) دارای پایدارترین سطح انرژی داکینگ در قیاس با سایر ترکیب‌های سنتز شده می‌باشد.

از مقایسه نتیجه‌های آنالیز Rmsf با نتیجه‌های به دست آمده از لیگ پلات، مشاهده می‌شود که در همه سامانه‌ها بیش‌تر دنباله‌های درگیر برهمکنش با لیگاند همان دنباله‌هایی هستند که انعطاف‌پذیری‌شان کاهش یافته است که این دنباله‌ها به عنوان جایگاه‌های اتصال معرفی می‌شوند.

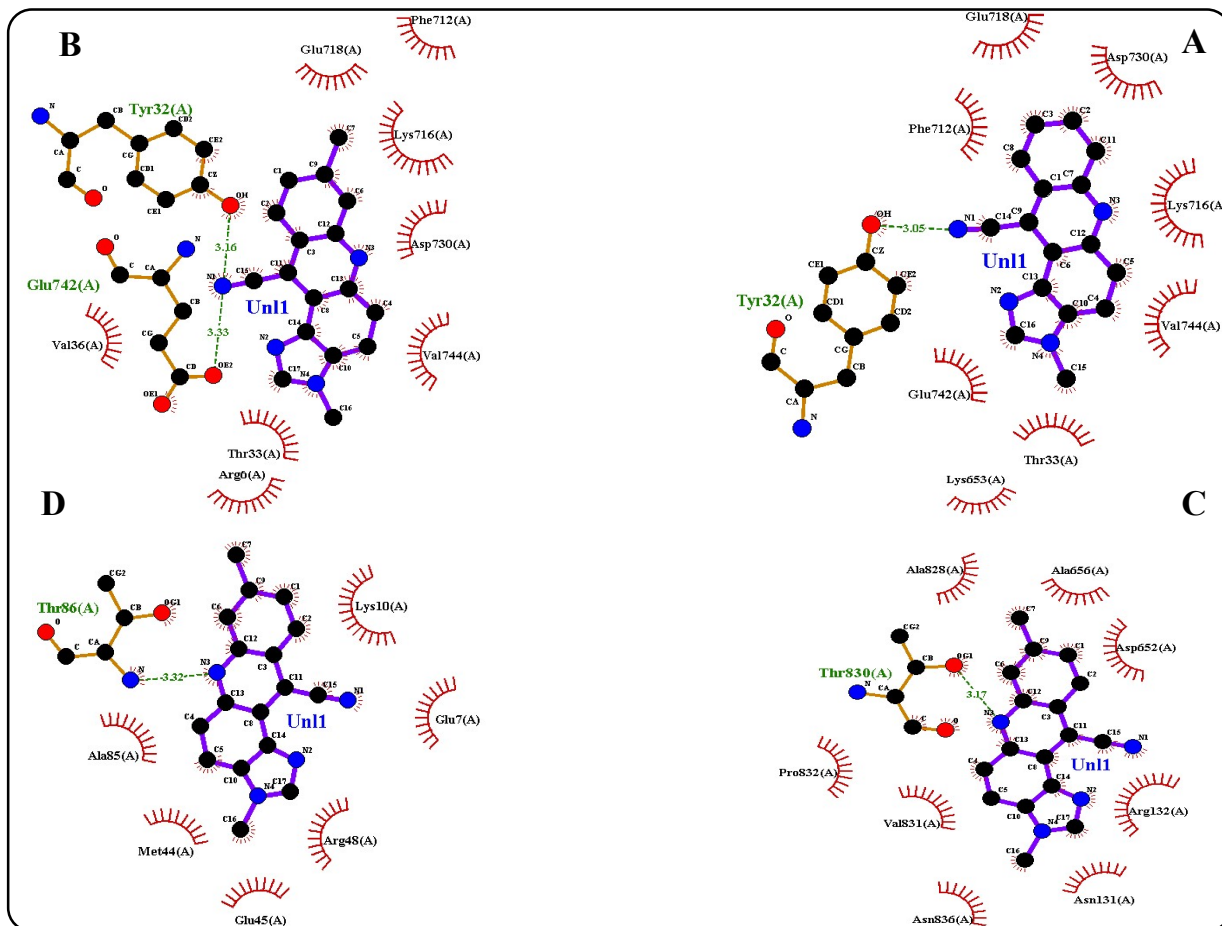
از این دنباله‌ها، دنباله‌هایی که انعطاف‌پذیری‌شان هم کاهش یافته شامل دنباله‌های Tyr32، Thr33، Val36، Ala37، Arg646، Val744، Val831 و Leu833 در سامانه ۱ و دنباله‌های Tyr32، Thr33، Val36، Ala85، Asn131، Arg132، Asp652، Asn836 و Val831، Thr830، Ala828، Val744، Glu742، Ala656، Thr91، Val36، Thr33، Ala16، Glu7 در دنباله‌های ۲ و

انعطاف‌پذیری دنباله‌های پروتئین به‌شمار می‌رود.

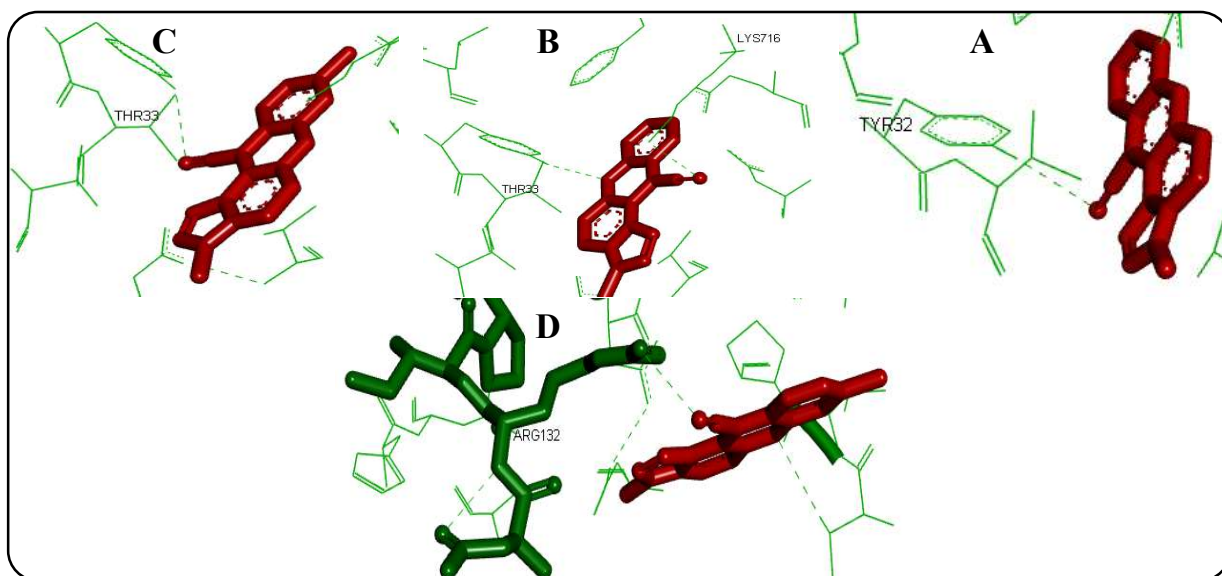
نتیجه‌های این آنالیز نشان می‌دهند که دنباله‌های گوناگون آنزیم در طول شبیه‌سازی انعطاف‌پذیری متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. انعطاف‌پذیری دنباله His594 در همه سامانه‌های شبیه‌سازی افزایش چشمگیری داشته است. بیش‌ترین مقدار انعطاف‌پذیری مربوط به دنباله Met1 در سامانه ۳a مشاهده می‌شود. دنباله‌هایی که کم‌ترین انعطاف‌پذیری را نشان می‌دهند برای اتصال لیگاند به آنزیم مناسب هستند. به همین خاطر، با توجه به نتیجه‌های آنالیز Rmsf و مشخص شدن دنباله‌ها با انعطاف‌پذیری کم در هر سامانه و احتمال برخورد لیگاند با این دنباله‌ها، داکینگ مولکولی را در موقعیت دنباله‌های مورد نظر آنزیم و در حضور لیگاند انجام داده و از خروجی داکینگ هر سامانه، فایل pdbqt به‌عنوان فایل خروجی به‌دست آمد. نرم‌افزار داکینگ مورد استفاده در این پژوهش، اتوداک بود. با توجه به فایل خروجی و با استفاده از نرم‌افزار لیگ پلات، دنباله‌های درگیر برهمکنش با لیگاند به صورت پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروفوب بین اتم‌های لیگاند و این دنباله‌ها به‌دست آمد. و نتیجه‌ها در جدول ۲ و ۳ گزارش شد. در شکل ۷ نیز موقعیت‌های دنباله‌های مورد نظر در مجاورت لیگاند ۳b در یکی از سامانه‌ها نشان داده شده است. شکل‌های ۸ و ۹ و نیز جدول‌های ۴ و ۵ مربوط به برهمکنش‌های هیدروفوب آمینواسیدها با لیگاند‌ها و آمینواسیدهای درگیر پیوند هیدروژنی با لیگاند‌ها در برخی از سامانه‌های مورد مطالعه می‌باشند.

همچنین انرژی داکینگ هر لیگاند با آنزیم اوره از نیز تعیین شد و در جدول ۳ ثبت شد. نتیجه‌ها نشان‌دهنده این است که مشتق





شکل ۸ - آمینواسیدهای درگیر واکنش با لیگاندها در برخی از سامانه‌های مورد مطالعه: (A) ترکیب ۳a، (B,C,D) ترکیب ۳b



شکل ۹ - آمینواسیدهای درگیر پیوند هیدروژنی با لیگاند در برخی از سامانه‌های گوناگون: (A,B) ترکیب ۳a، (C,D) ترکیب ۳b

جدول ۲ - مشخصه‌های دنباله‌های درگیر پیوند هیدروژنی با لیگاند در سامانه‌های گوناگون

شماره سامانه	نام دنباله آنزیم	اتم دهنده دنباله	اتم گیرنده لیگاند	طول پیوند هیدروژنی
۳a	Tyr32	OH	N	۳/۰۴
	Lys716	N	N	۳/۱۶
۳b	Tyr32	OH	N	۳/۱۶
	Thr86	N	N	۳/۳۲
	Arg132	N	N	۳/۰۶
	Glu742	O	N	۳/۳۳
۳c	Thr830	O	N	۳/۱۷
	Tyr32	OH	N	۳/۱۶
	Leu144	N	N	۲/۹۶
	Glu742	O	N	۳/۳۳
	Ile137	N	N	۳/۱۹
	Glu742	O	N	۳/۳۱
	His76	O	N	۳/۱۷
۳d	Ile137	N	N	۳/۱۹
	Glu742	O	N	۳/۳۱
	Glu7	O	N	۳/۳۴
	Tyr32	OH	N	۲/۹۲

جدول ۳ - دنباله‌های درگیر برهمکنش هیدروژن با لیگاند در سامانه‌های گوناگون

نام سامانه	برهمکنش هیدروژن
۳a	Thr33, Val36, Ala37, Thr578, Gly642, Ser645, Arg646, Gln649, Phe712, Lys716, Glu718, Asp730, Glu742, Val744, Val831, Leu833, Ser834, Phe838
۳b	Arg6, Glu7, Lys10, Thr33, Val36, Met44, Glu45, Arg48, Ala85, Asn131, Arg132, Asp652, Ala656, Phe712, Lys716, Glu718, Asp730, Glu742, Val744, Ala828, Val831, Asn836
۳c	Leu13, Ala16, Thr33, Val36, Ala37, Leu44, Glu142, Gly264, Pro266, Phe273, Ile274, Glu710, Phe712, Lys716, Glu718, Asp730, Pro743, Val744
۳d	Arg6, Ala16, Tyr32, Thr33, Val36, Ala37, Met44, Glu45, Arg48, Thr86, Thr91, Ile133, Gly135, Glu136, Ile137, Lys709, Pro710, Ser711, Phe712, Lys716, Glu718, Asp730, Asn735, Val744

جدول ۴ - انرژی داکینگ ترکیب‌های هتروسیکلی ۳a-d در برهمکنش با آنزیم اوره ازه

ترکیب	انرژی داکینگ (kcal/mol)
۳a	-۷/۶
۳b	-۸/۱
۳b	-۸/۳
۳d	-۸/۷

دینامیک مولکولی، برهمکنش مشتق‌های گوناگونی از سیستم هتروسیکلی ایمیدازوآکریدین با آنزیم اوره از مورد مطالعه قرار گرفت. برای تهیه این لیگندها، مشتق متیل‌دار شده ۵- نیتروبنزایمیدازول با آریل استونیتریل‌های گوناگون وارد واکنش شد و مشتق‌های ایمیدازو آکریدین مورد نظر که پیش‌تر ویژگی‌های زیستی فراوانی از خود نشان داده‌اند، سنتز شدند. بررسی تجربی برهمکنش این ترکیب‌ها با آنزیم اوره‌از با استفاده از دستورکارهای معتبر نشان داد که مشتق دارای کلر از این ترکیب‌ها دارای بهترین قدرت بازدارندگی در بین ترکیب‌های سنتز شده و نیز استاندارد تیواره می‌باشد. برای بررسی بهتر این برهمکنش‌ها، از روش محاسبه‌ای استفاده شد. نتیجه‌های این مطالعه‌های تئوری نشان داد که انعطاف‌پذیری دنباله‌هایی که جایگاه اتصال هستند، به دلیل برخورد با لیگاند کاهش می‌یابد که با نتیجه‌های آنالیز RMSF این پژوهش در مورد اغلب دنباله‌هایی که جایگاه اتصال معرفی شدند، تطابق داشت. عمل داکینگ مولکولی را بر روی این دنباله‌ها انجام داده و قوی‌ترین برهمکنش‌ها (پیوند هیدروژنی و برهمکنش

،Glu718, Lys716, Pro710, Glu136, Gly135, Ile133, Val744, Glu742, Thr830 در سامانه ۳ و دنباله‌های Ala16, Leu13, Thr33, Val36, Ala37, Leu44, Glu142, Gly264, Pro266, Ile274, Glu710, Pro743, Glu742, Val744 در سامانه ۴ هستند.

با توجه به نتیجه‌های جدول ۵، به نظر می‌رسد، حضور اتم الکترون کشنده کلر در موقعیت R (خلاف برای گروه CN) در ترکیب هتروسیکلی ایمیدازوآکریدین، باعث کاهش گشتاور دوقطبی کل در ترکیب ۳d شده و در نتیجه باعث افزایش برهمکنش‌های هیدروژن بین لیگاند و آنزیم می‌شود.

اتم هیدروژن N-H در اوره به عنوان گیرنده پیوند هیدروژنی عمل می‌کند که با نتیجه‌های تشکیل پیوند هیدروژنی جدول ۴ مطابقت دارد. سامانه‌هایی که بیش‌ترین برهمکنش با لیگاند(پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های هیدروژن) را داشته باشند، بیش‌ترین جایگاه‌های اتصال لیگاند و آنزیم را هم دارا هستند. که به ترتیب شامل این سامانه‌ها هستند:  $3d > 3c > 3b > 3a$

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش با استفاده از روش تجربی و نیز شبیه‌سازی



هیدروفوب) در هر سامانه مشخص شد. این موقعیت‌ها همان جایگاه‌های اتصال آنزیم به لیگاند در هر سامانه هستند. از مقایسه اطلاعات تجربی و محاسبه‌ای می‌توان دریافت که نتیجه‌های این دو بررسی با یکدیگر همخوانی مناسبی دارند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۴

## مراجع

- [1] Mazzei L., Musiani F., Ciurli S., [The Structure-based Reaction Mechanism of Urease, A Nickel Dependent Enzyme: Tale of a Long Debate](#), *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **25(6)**: 829-845 (2020).
- [2] Zambelli B., Mazzei L., Ciurli S., [Intrinsic Disorder in the Nickel-Dependent Urease Network](#), *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **174**: 307-330 (2020).
- [3] Ren C., Wang H., Cheng Y., Ma X., Wang Y., [Cyclodextrin Polymer-Confined Urease for the Fast and Efficient Removal of Urea](#), *New Journal of Chemistry*, **46(40)**: 19112-19117 (2022)
- [4] de Fátima Â., de Paula Pereira C., Olímpio C.R.S.D.G., de Freitas Oliveira B.G., Franco L.L., da Silva P.H.C., [Schiff bases and their Metal Complexes as Urease Inhibitors—A Brief Review](#), *Journal of Advanced Research*, **13**: 113-126 (2018).
- [5] Yun-Tong L., Jing-Wen D., Yao L., Yi-Tong G., Chao-Nan S., Fu-Yao L., Zhong-Lu Y., [Syntheses, Crystal Structures and Urease Inhibition of Two Manganesen \(III\) Complexes with Bis-Schiff Bases](#), *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, **34(6)**: 1192-1198 (2018).
- [6] Wang H., Xu C., Zhang X., Zhang D., Jin F., Fan Y., [Urease Inhibition Studies of Six Ni \(II\), Co \(II\) and Cu \(II\) Complexes with Two Sexidentate N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Donor Bis-Schiff base Ligands: An Experimental and DFT Computational Study](#), *Journal of Inorganic Biochemistry*, **204**: 110959 (2020).
- [7] Matczuk D., Siczek A., [Effectiveness of the use of Urease Inhibitors in Agriculture: A Review](#), *International Agrophysics*, **35**: 197-208 (2021).
- [8] Graham D.Y., Miftahussurur M., [Helicobacter Pylori Urease for Diagnosis of Helicobacter Pylori Infection: A Mini Review](#), *Journal of advanced research*, **13**: 51-57 (2018).
- [9] Cunha E.S., Chen X., Sanz-Gaitero M., Mills D.J., Luecke H., [Cryo-EM Structure of Helicobacter Pylori Urease with an Inhibitor in the Active Site at 2.0 Å Resolution](#), *Nature communications*, **12(1)**: 1-8 (2021).
- [10] Choi H., Jeong S.H., Kim T.Y., Yi J., Hahn S.K., [Bioinspired Urease-Powered Micromotor as an Active Oral Drug Delivery Carrier in Stomach](#), *Bioactive materials*, **9**: 54-62 (2022).
- [11] Takeshita H., Watanabe E., Norose Y., Ito Y., Takahashi H., [Neutralizing Antibodies for Helicobacter Pylori Urease Inhibit Bacterial Colonization in the Murine Stomach in Vivo](#), *Biomedical Research*, **40(2)**: 87-95 (2019).

- [12] Rego Y.F., Queiroz M.P., Brito T.O., Carvalho P.G., de Queiroz V.T., de Fátima Â., Macedo J.F., [A Review on the Development of Urease Inhibitors as Antimicrobial Agents Against Pathogenic Bacteria](#), *Journal of advanced research*, **13**: 69-100 (2018).
- [13] Hameed A., Al-Rashida M., Uroos M., Qazi S.U., Naz S., Ishtiaq M., Khan K.M., [A Patent Update on Therapeutic Applications of Urease Inhibitors](#), *Expert opinion on therapeutic patents*, **29(3)**: 181-189 (2019).
- [14] Chang S.H., Hsieh P.L., Tsai G.J., [Chitosan Inhibits Helicobacter Pylori Growth and Urease Production and Prevents its Infection of Human Gastric Carcinoma Cells](#), *Marine drugs*, **18(11)**: 542 (2020).
- [15] Yanai H., Iizasa H., Chihara D., Murakami T., Nishikawa J., Yoshiyama H., [Epstein-Barr Virus Detection using Gastric Biopsy Specimens after Rapid Urease Test for Helicobacter Pylori](#), *Endoscopy International Open*, **7(4)**: E431-E432 (2019).
- [16] Li H., Wang R., Sun H., [Systems Approaches for Unveiling the Mechanism of Action of Bismuth Drugs: New Medicinal Applications Beyond Helicobacter Pylori Infection](#), *Accounts of Chemical Research*, **52(1)**: 216-227 (2018).
- [17] Pop R., Tăbăran A.F., Ungur A.P., Negoescu A., Cătoi C., [Helicobacter Pylori-Induced Gastric Infections: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Approaches using Silver Nanoparticles](#), *Pharmaceutics*, **14(7)**: 1463 (2022).
- [18] Zhang C., Guo J., Zou X., Guo S., Guo Y., Shi R., Yan F., [Acridine-Based Covalent Organic Framework Photosensitizer with Broad-Spectrum Light Absorption for Antibacterial Photocatalytic Therapy](#), *Advanced Healthcare Materials*, **10(19)**: 2100775 (2021).
- [19] Fonte M., Tassi N., Gomes P., Teixeira C., [Acridine-Based Antimalarials-from the Very First Synthetic Antimalarial to Recent Developments](#), *Molecules*, **26(3)**: 600 (2021).
- [20] Kothamunireddy V.D., Galla R., [Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Novel Acridine Derivatives for Anti-Inflammatory and Analgesic Activities](#), *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **83(5)**: 1016-1023 (2021).
- [21] Famarzi M., Pordel M., Morsali A., [Synthesis, Antiviral, Antibacterial, and Cytotoxicity Assessment of some 3H-Benzo \[a\] Imidazo \[4, 5-j\] Acridines and 3H-Benzo \[a\] Pyrazolo \[3, 4-j\] Acridines](#), *Russian Journal of Organic Chemistry*, **56(8)**: 1438-1445 (2020).
- [22] Perrone R., Butovskaya E., Daelemans D., Palu G., Pannecouque C., Richter S.N., [Anti-HIV-1 Activity of the G-Quadruplex Ligand BRACO-19](#), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69(12)**: 3248-3258 (2014).
- [23] Isaac I.O., Al-Rashida M., Rahman S.U., Alharthy R.D., Asari A., Hameed A., Iqbal J., [Acridine-based \(thio\) Semicarbazones and Hydrazones: Synthesis, in Vitro Urease Inhibition, Molecular Docking and in-Silico ADME Evaluation](#), *Bioorganic chemistry*, **82**: 6-16 (2019).

- [24] Prasher P., Sharma M., "Azole" as Privileged Heterocycle for Targeting the Inducible Cyclooxygenase Enzyme, *Drug Development Research*, **82(2)**: 167-197 (2021).
- [25] Hou Y., Shang C., Wang H., Yun J., *Isatin-Azole Hybrids and their Anticancer Activities*, *Archiv der Pharmazie*, **353(1)**: 1900272 (2020).
- [26] Rani D., Garg V., Dutt R., *Anticancer Potential of Azole Containing Marine Natural Products: Current and Future Perspectives*, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, **21(15)**: 1957-1976 (2021).
- [27] Devasia J., Nizam A., Vasantha V.L., *Azole-based Antibacterial Agents: A Review on Multistep Synthesis Strategies and Biology*, *Polycyclic Aromatic Compounds*, **42(8)**: 5474-5495 (2022).
- [28] Das R., Asthana G.S., Suri K.A., Mehta D., Asthana A., *Recent Developments in Azole Compounds as Antitubercular Agent*, *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, **16(3)**: 290-306 (2019).
- [29] de Castro Spadari C., Barreto T.L., de Queiroz V.T., de Paiva W.F., Fernandes S.A., de Fátima Â., Ishida K., *Ketoconazole/Calix [n] Arenes-based Compounds Improve the Antifungal Activity Against Azole-Resistant Candida Isolates*, *Journal of Medical Mycology*, **32(2)**: 101254 (2022).
- [30] Alade A.A., Naghizadeh Z., Wessels C.B., Stolze H., Militz H., *Adhesion Performance of Melamine-Urea-Formaldehyde Joints of Copper Azole-Treated Eucalyptus Grandis at Varied Bonding Process Conditions*, *Construction and Building Materials*, **314**: 125682 (2022).
- [31] Chaudhry F., Naureen S., Aslam M., Al-Rashida M., Rahman J., Huma R., Ain Khan M., *Identification of Imidazolylpyrazole Ligands as Potent Urease Inhibitors: Synthesis, Antiurease Activity and In Silico Docking Studies*, *ChemistrySelect*, **5(38)**: 11817-11821 (2020).
- [32] Zaib S., Younas M.T., Zarai S.O., Khan I., Anbar H.S., El-Gamal M.I., *Discovery of Urease Inhibitory Effect of Sulfamate Derivatives: Biological and Computational Studies*, *Bioorganic Chemistry*, **119**: 105545 (2022).
- [33] Rafiq M., Saleem M., Jabeen F., Hanif M., Seo S.Y., Kang S.K., Lee K.H., *Facile Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Studies of Novel Substituted Azole Derivatives*, *Journal of Molecular Structure*, **1138**: 177-191 (2017).
- [34] Bektaş H., Ceylan Ş., Demirbaş N., Alpay-Karaoğlu Ş., Sökmen B.B., *Antimicrobial and Antiurease Activities of Newly Synthesized Morpholine Derivatives Containing an Azole Nucleus*, *Medicinal Chemistry Research*, **22(8)**: 3629-3639 (2013).
- [35] Abdulwahab H.G., Harras M.F., El Menofy N.G., Hegab A.M., Essa B.M., Selim A.A., El-Zahabi H.S., *Novel Thiobarbiturates as Potent Urease Inhibitors with Potential Antibacterial Activity: Design, Synthesis, Radiolabeling and Biodistribution Study*, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **28(23)**: 115759 (2020).
- [36] Islam M., Khan A., Shehzad M.T., Hameed A., Ahmed N., Halim S.A., Al-Harrasi A., *Synthesis and Characterization of New Thiosemicarbazones, as Potent Urease Inhibitors: In Vitro and in Silico Studies*, *Bioorganic chemistry*, **87**: 155-162 (2019).

- [37] Song W.Q., Liu M.L., Li S.Y., Xiao Z.P., [Recent Efforts in the Discovery of Urease Inhibitor Identifications](#), *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **22(2)**: 95-107 (2022).
- [38] Sobhani S., Pordel M., Beyramabadi S.A., [Design, Synthesis, Spectral, Antibacterial Activities and Quantum Chemical Calculations of New Cu \(II\) Complexes of Heterocyclic Ligands](#), *Journal of Molecular Structure*, **1175**: 677-685 (2019).
- [39] Takhti S., Pordel M., Bozorgmehr M.R., Davoodnia A., [New Hybrids based on Benzimidazole and Diazepine Moieties: Design, Synthesis, Characterization, Molecular Docking Studies and their in Vitro Interactions with Benzodiazepine Receptors](#), *J. Biomol. Struc. Dyna.*, 1-9 (2022).
- [40] Takhti S., Pordel M., Davoodnia A., Bozorgmehr M.R., [Imidazo \[4', 5': 3, 4\] Benzo \[1, 2-e\]\[1, 4\] Diazepins as New Heterocyclic Systems: Synthesis, Characterization and Their in Vitro Interactions with Benzodiazepine Receptors](#), *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1-7 (2022).
- [41] Anbarani H.M., Pordel M., Bozorgmehr M.R., [Interaction of Imidazo \[4, 5-a\] Acridines with Acetylcholinesterase](#), *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1-7 (2022).
- [42] Ramezani S., Pordel M., Davoodnia A., [Synthesis, Spectral, DFT Calculations and Antibacterial Studies of Fe \(III\) Complexes of New Fluorescent Schiff bases Derived from Imidazo \[4', 5': 3, 4\] Benzo \[1, 2-c\] Isoxazole](#), *Applied Organometallic Chemistry*, **32(3)**: e4178 (2018).
- [43] Faramarzi M., Pordel M., Morsali A., [Synthesis, Antiviral, Antibacterial, and Cytotoxicity Assessment of Some 3H-Benzo \[a\] imidazo \[4, 5-j\] acridines and 3H-Benzo \[a\] pyrazolo \[3, 4-j\] acridines](#), *Russian Journal of Organic Chemistry*, **56(8)**: 1438-1445 (2020).
- [44] Karimi N., Pordel M., Davoodnia A., Sadeghian H., Mousavian M., [Synthesis, Characterization and Biological Evaluations of New Imidazo \[4, 5-a\] Acridines as Potential Antibacterial Agents](#), *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **53(1)**: 52-56 (2019).
- [45] Adhikari A., Bhakta S., Ghosh T., [Microwave-Assisted Synthesis of Bioactive Heterocycles: an Overview](#), *Tetrahedron*, 133085 (2022).
- [46] Pordel M., [Synthesis of New Fluorescent Compounds from Benzimidazole](#), *Journal of Chemical Research*, **36(10)**: 595-597 (2012).
- [47] Maroofi V., Pordel M., Chegini H., Ramezani S., [Synthesis, Spectral Studies and Quantum-Chemical Investigations on the Powerful Fluorophores: Imidazo \[4, 5-a\] Acridines](#), *Journal of fluorescence*, **25(5)**: 1235-1243 (2015).
- [48] Sahraei R., Pordel M., Behmadi H., Razavi B., [Synthesis of a New Class of Strongly Fluorescent Heterocyclic Compounds: 3H-Imidazo \[4, 5-a\] Acridine-11-Carbonitriles](#), *Journal of luminescence*, **136**: 334-338 (2013).
- [49] Wani T.A., Bakheit A.H., Zargar S., Bhat M.A., Al-Majed A.A., [Molecular Docking and Experimental Investigation of New Indole Derivative Cyclooxygenase Inhibitor to Probe its Binding Mechanism with Bovine Serum Albumin](#), *Bioorganic Chemistry*, **89**: 103010 (2019)
- [50] Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E., [The Protein Data Bank](#), *Nucleic acids research*, **28(1)**: 235-42 (2000).

- [51] Zoete V., Cuendet M.A., Grosdidier A., Michielin O., [SwissParam: a Fast Force Field Generation Tool for Small Organic Molecules](#), *Journal of computational chemistry*, **32**: 2359-2368 (2011)
- [52] Luenberger D.G., Ye Y., “[Linear and Nonlinear Programming](#)”, Vol. 2, Springer, (1984).
- [53] Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G., [A Smooth Particle Mesh Ewald Method](#), *The Journal Of Chemical Physics*, **103**: 8577-8593 (1995).
- [54] Zonozi F., Pordel M., Beyramabadi S.A., Morsali A., [Theoretical Investigation on the Kinetics and Mechanism of the Synthesis of Fluorescent 3, 8-Disubstituted-3H-Imidazo \[4, 5-a\] Acridine-11-Carbonitriles](#), *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism*, **41(4)**: 365-370 (2016).