

## PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK / REVIEW ARTICLE

# PROKOGNITIVNÍ POTENCIÁL BIS(7)-TAKRINU JAKO ZVAŽOVANÉHO TERAPEUTIKA

## NEURODEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ

## PRO-COGNITIVE EFFECT OF BIS(7)-TACRINE AS POTENTIAL THERAPEUTIC AGENT AGAINST NEURODEGENERATIVE DISORDERS

Jan Korábečný<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 02, Hradec Králové, Česká republika

<sup>2</sup> Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

Přijato 1. února 2018.

Zrevidováno 8. února 2018.

Zveřejněno 9. března 2018.

### Souhrn

Na základě poznatků získaných z krystalografie acetylcholinesterasy (AChE) byly koncipovány nové homo- i heterodimerní molekuly, které jsou schopné vázat se do obou anionických míst enzymu a tím nejen zvýšit svůj inhibiční potenciál, ale i současně ovlivňovat další patologické mechanismy AD. Průkopnickou molekulou se v tomto ohledu stal bis(7)-takrin, který vznikl zdvojením takrinu přes alifatický můstek o délce sedmi uhlíkových atomů. Bis(7)-takrin je zajímavou multipotentní sloučeninou, která je schopna ovlivňovat řadu receptorových i enzymových systémů za podmínek *in vitro* i *in vivo*. Stal se rovněž předlohou pro celou řadu nových sloučenin s dalšími pozitivními vlastnostmi, které jsou relevantní pro terapii AD.

*Klíčová slova: acetylcholinesterasa; Alzheimerova choroba; bis(7)-takrin; neurodegenerace; takrin*

### Summary

The acetylcholinesterase (AChE) structure elucidation has significantly contributed to the development of both novel homo- and heterodimer molecules that are capable of simultaneous binding to both anionic sites of the enzyme. This mostly resulted into improved AChE inhibition potency concurrently affecting other pathological hallmarks of the disease. In this regard, bis(7)-tacrine can be considered as the pioneering molecule. It consists of two tacrine moieties connected via alkylene tether of seven carbon atoms. In *in vitro* and *in vivo*, bis(7)-tacrine revealed interesting multipotent profile capable to affect several enzymes and receptors which are implicated in the pathogenesis of AD. It also became a key structural template in the development of other more potent compounds intended for the therapy of neurodegenerative disorders.

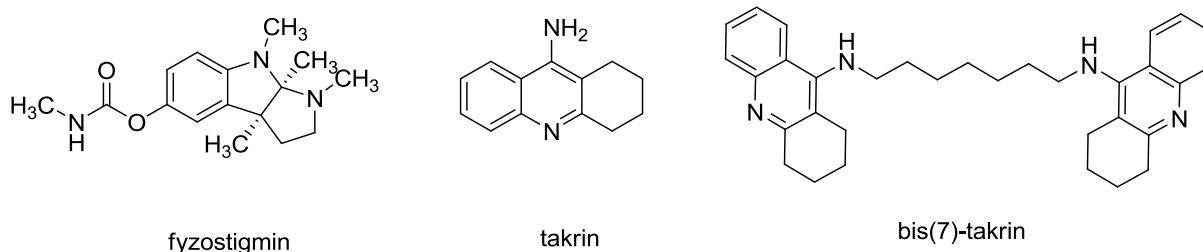
*Key words: acetylcholinesterase; Alzheimer's disease; bis(7)-tacrine; neurodegeneration; tacrine*

## Úvod

Roku 1991 byla poprvé objasněna krystalografická struktura acetylcholinesterasy (AChE, E.C. 3.1.1.7) vědeckou skupinou okolo Sussmana a Silmana.(1) Tento unikátní enzym, který terminuje přenos vzruchu na synapsích hydrolýzou neuromediátoru acetylcholinu (ACh), pracuje s velkou specifitou a rychlostí.(2) To, co předcházelo tomuto objevu byly pouze neúplné informace, které poukazovaly například na toxicitu nervově paralytických látek, možnost ovlivnění některých nemocí jako je léčba glaukomu, myasthenia gravis nebo Alzheimerovy demence (AD).(3,4) Kinetické studie prováděné s tímto enzymem odhalily existenci dvou míst označovaných jako esteratické a anionické místo, které dohromady tvoří aktivní část enzymu souhrnně označovanou jako vazebné místo pro cholin.(5) Kromě přítomnosti těchto dvou míst existuje rovněž další, tzv. periferní anionické místo.(6) Tato část enzymu určuje výhradně substrátovou specifitu.

Centrální kognitivní deficit u pacientů s AD úzce koreluje s mírou kognitivního narušení.(7) Strategii pro léčbu tohoto onemocnění je posílení cholinergní transmise.(8) Toho je v zásadě možné docílit několika způsoby, nejpřínosnější z nich a farmakologicky využívaný však dodnes zůstává pouze tzv. nepřímá cesta, tj. inhibice AChE, která byla prvně studována s využitím fyzostigminu (Obr. 1).(9) Po něm následoval další reversibilní inhibitor, takrin (Obr. 1).(10) I přes velice kontroverzní závěry klinických studií byl takrin následně zaveden na trh jako první léčivo k užívání u pacientů s AD.(11) Takrin není zcela efektivní u všech pacientů s AD. Jeho užívání je velice často doprovázeno závažnými nežádoucími účinky jako jsou hepatotoxicita a gastrointestinální dyskomfort. S ohledem na poškozování jaterního endotelu bylo nezbytné provádět sledování hladin jaterních enzymů v krvi (alaninaminotransferasa, aspartátaminotransferasa).(12) Ačkoliv bylo užívání takrinu zastaveno v roce 1996 a k jeho úplnému stažení z trhu došlo v roce 2013, stále představuje základní stavební kámen v oblasti medicíně chemie pro vývoj nových léčiv cílených na neurodegenerativní onemocnění.(13–15) Většina současně prováděných studií si klade za cíl vytvořit zejména netoxické a více potentní deriváty odvozené od takrinu. Existuje celá řada přístupů jak tohoto docílit, nejčastěji aplikovanou a široce akceptovanou metodikou je vývoj hybridních sloučenin, které jsou schopné ovlivnit více patologických mechanismů onemocnění najednou.(16,17) Jednu z takto definovaných sloučenin představuje bis(7)-takrin (Obr. 1), který je homodimerem odvozeným od takrinu.(18) Jeho unikátnost vychází z designu kombinující představy o tzv. duálních inhibitech AChE, tj. sloučenin schopných současně interagovat s oběma anionickými místy AChE a tím stupňovat inhibiční potenciál vůči AChE a současně udělit nově vzniklé sloučenině nemoc-modifikující vlastnosti.(19) Zejména druhá aktivita je hodně skloňována s přihlédnutím k faktu, kdy AChE byla nalezena v senilních placích amyloidu beta (A $\beta$ ).(20) V této souvislosti se hovoří o tzv. necholinergní roli AChE, kdy tento enzym interaguje s A $\beta$  a podněcuje jeho fibrilizaci do komplexnějších útvarů.(21) Celý tento proces je zprostředkován hydrofobním prostředím periferního anionického místa enzymu. S tímto ohledem stoupl význam duálních nebo selektivně působících inhibitorů v této části AChE.(16)

Předkládaná práce sumarizuje poznatky z *in vitro* a *in vivo* oblasti pro bis(7)-takrin. Rovněž jsou nastíněny další trendy směřování vývoje nových léčiv pro neurodegenerativní onemocnění, které byly inspirovány bis(7)-takrinem.



**Obrázek 1.** Struktury inhibitorů AChE – fyzostigminu, takrinu a bis(7)-takrinu.

**Bis(7)-takrin a jeho deriváty**

Bis(7)-takrin se profiloval jako vysoce selektivní inhibitor AChE převyšující téměř 1500× aktivitu takrinu (takrin AChE  $IC_{50}$  = 590 nM; bis(7)-takrin AChE  $IC_{50}$  = 0,4 nM).<sup>(18)</sup> S přihlédnutím ke specifitě interakcí s AChE a odlišnosti od další, příbuzné cholinesterasy, butyrylcholinesterasy (BChE, E.C. 3.1.1.8), byla navíc výrazně potencována selektivita bis(7)-takrin vůči AChE a to téměř 1000×. Takrin je v tomto ohledu spíše selektivním inhibitorem BChE (takrin BChE  $IC_{50}$  = 44 nM; bis(7)-takrin AChE  $IC_{50}$  = 390 nM). Zajímavostí rovněž zůstává poznatek o délce linkeru mezi oběma takrinovými částmi. Zatímco fragmenty kratší než sedm methylenových můstků nebyly zprvu studovány, sloučeniny obsahující linker C8 a delší vykazovaly s narůstající délkou slabší inhibiční potenciál vůči AChE. Na druhou stranu byla mírně navyšována aktivita vůči BChE až do C9 s následnou sestupnou tendencí (Tabulka 1). Sledování vztahu mezi strukturou a účinkem pro AChE úzce koreluje s poznatky o struktuře aktivního místa, kdy vzdálenost mezi oběma anionickými částmi enzymu je okolo 20 Å.<sup>(22)</sup> Tato vzdálenost odpovídá právě délce řetězce o sedmi uhlících spojující obě takrinové podjednotky. V navazující studii byl rovněž sledován efekt takrinových homodimerů s kratšími alkylovými řetězci.<sup>(23)</sup> Výsledky rovněž jednoznačně poukázaly na nejvyšší účinnosti v případě bis(7)-takrinu. Data pro další deriváty jsou uvedena v Tabulce 1. Kromě toho byla dělána řada dalších derivátů, které sledovaly strukturně-aktivitní rysy v případě změny na aromatické části jednoho nebo obou takrinových fragmentů, dále velikost cykloalkylové části takrinu, to vše v kontrastu s délkou spojovacího linkeru. Za zmínku stojí zejména obměna takrinu za více účinný 6-chlortakrin nebo naopak méně účinný, ale netoxický 7-methoxytakrin.<sup>(24–26)</sup>

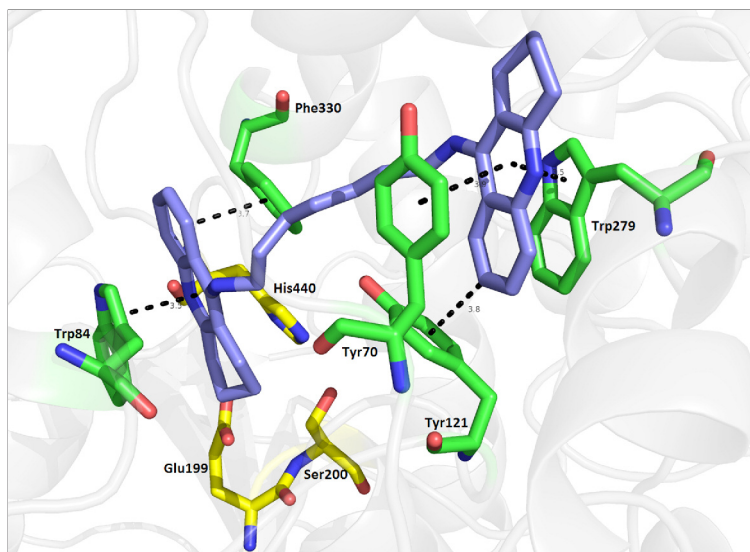
**Tabulka 1.** Hodnoty  $IC_{50}$  pro AChE/BChE a selektivity pro AChE u takrinu a od něj odvozených homodimerů.

sloučenina	$IC_{50}$ AChE (nM) <sup>a</sup>	$IC_{50}$ BChE (nM) <sup>a</sup>	selektivita pro AChE <sup>b</sup>
takrin	590	44	0,1
bis(2)-takrin	711	102	0,14
bis(3)-takrin	254	152	0,6
bis(4)-takrin	157	252	1,6
bis(5)-takrin	28	329	11,7
bis(6)-takrin	3,8	119	31,6
bis(7)-takrin	0,4	390	980
bis(8)-takrin	0,66	340	520
bis(9)-takrin	0,77	190	250
bis(10)-takrin	3,1	440	140

<sup>a</sup> použity enzymy izolované z laboratorního potkana; <sup>b</sup> počítáno jako  $IC_{50}$  BChE/  $IC_{50}$  AChE

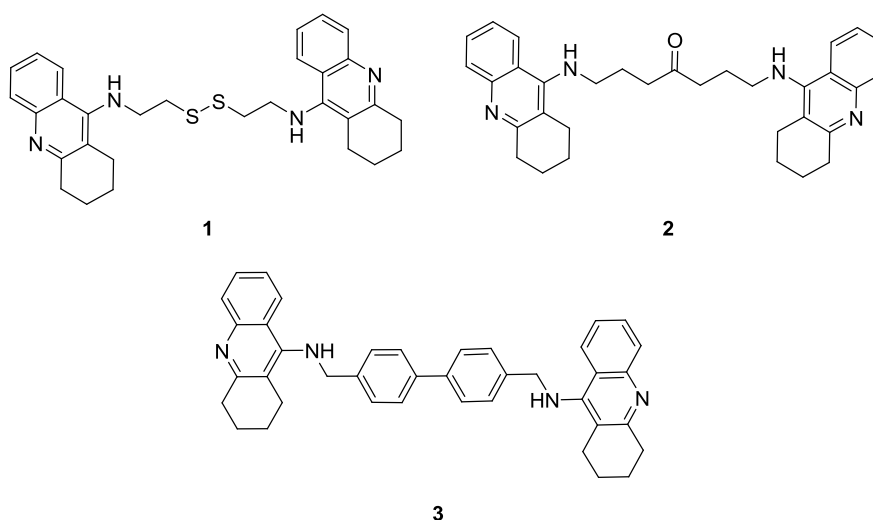
Krystalografická struktura AChE z parejnoka kalifornského (*Torpedo californica*) s bis(7)-takrinem, která byla objasněna roku 2006 korelovala s původními představami o vazbě ligandu do aktivního místa AChE.<sup>(27)</sup> Bis(7)-takrin je obklopen paralelně Trp84 a Phe330 ve své proximální takrinové části, kde se na jeho lokalizaci podílí zejména  $\pi$ - $\pi$ /kation- $\pi$  interakce. Podobně je tomu i v periferním anionickém místě, kde distální takrinová jednotka čelí Tyr70 a Trp279 (Obr. 2). V rámci studie byly ještě provedeny testy s bis(5)-takrinem, tedy takrinovým homodimerem spojeným pomocí pětiuhlíkatého linkeru, které poukázaly na nižší afinitu tohoto ligandu vůči AChE. Výsledek tohoto efektu je zapříčiněn zejména konformačními změnami v periferní anionické části enzymu, kde částečně vymizelo „sendvičové“ uspořádání distální takrinové jednotky mezi Trp279 a Tyr70.

Zajímavé výsledky zejména s ohledem selektivního charakteru inhibice AChE inspirovaly další světové vědecké skupiny k vývoji nových derivátů odvozených od bis(7) takrinu. Z nich lze vypíchnout zejména cystamin-takrinový homodimer **1** (Obr. 3).<sup>(28,29)</sup> Tato sloučenina je v porovnání s bis(7)-takrinem méně cytotoxická (stanoveno na SH-SY5Y buněčné linii), rovněž inhibuje AChE i BChE (AChE  $IC_{50}$  = 5,04 nM; BChE  $IC_{50}$  = 4,23 nM), zabraňuje samovolné agregaci A $\beta$  (bis(7)-takrin  $IC_{50}$  autoagregace A $\beta$  = 8,4  $\mu$ M; **1**  $IC_{50}$  autoagregace A $\beta$  = 24,2  $\mu$ M)



**Obrázek 2.** Krystalografická struktura bis(7)-takrinu v AChE z parejnika kalifornského (PDB ID: 2CKM). (27) Bis(7)-takrin je ilustrován modře, aminokyselinová residua vázající ligand zeleně a katalytická triáda enzymu žlutě. Obrázek byl vytvořen pomocí softwaru PyMol Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

a ovlivňuje AChE-indukovanou agregaci A $\beta$  (bis(7)-takrin AChE-indukovaná agregace = 68,0 %; **1** AChE-indukovaná agregace = 52,6 %). Z dalších příznivých vlastností **1** lze jmenovat cytoprotektivní potenciál stanovený na SH-SY5Y buněčné linii vůči peroxidu vodíku, schopnost snižovat intracelulární hladiny reaktivních forem kyslíku a inhibice anti-apoptických proteinových kinas (ERK1/2 a Akt). Jiné bis(7)-takrinové deriváty využívaly ve spojovacím řetězci polyethylenglykolový fragment různé délky nebo diamidy. Přítomnost takových fragmentů zajišťovala chelatační účinek vůči některým prvkům (např. železo, měď), jejichž kumulace byla prokázána např. v amyloidních placích u pacientů s AD, kde se přímo podílí na stabilitě takto zformovaných plaků. Příkladem takovéto multipotentní sloučeniny s chelatačními vlastnostmi je **2** (Obr. 3). (30,31) Zavedením aromatického substituentu do linkerové části naopak vyústilo v silný anti-amyloidní efekt (přímá interakce s A $\beta$  nebo nepřímá inhibice kumulace A $\beta$  pomocí AChE-indukované agregace A $\beta$ ), který je dobře pozorovatelný na sloučenině **3**. Mimo jiné byla rovněž potencována inhibiční aktivita vůči BACE-1. (32)



**Obrázek 3.** Bis(7)-takrinové deriváty s vystupňovanými antioxidačními (**1**), Cu/Fe chelatačními (**2**) a anti-amyloidními (**3**) vlastnostmi.

### **In vitro studie s bis(7)-takrinem**

Bis(7)-takrinu byl sledován pro svůj protektivní potenciál na buněčné linii odvozené z feochromocytomu dřeně nadledvin laboratorního potkana (PC12).(33) Poškození buněk bylo navozeno pomocí peroxidu vodíku. Výsledky stanovení jasně prokázaly, že bis(7)-takrin snižoval cytotoxicitu navozenou peroxidem vodíku a to výrazně účinněji než samotný takrin.

V následujících *in vitro* experimentech bylo sledováno, zda je efekt bis(7)-takrinu zprostředkován pouze inhibicí AChE nebo zda se na jeho efektu podílí některé další systémy. Za tímto účelem byla prvně testována možnost ovlivnění GABA<sub>A</sub> receptorů.(34,35) Pozitivní alosterická modulace těchto receptorů může snížit vyplavování neuromediátoru ACh v různých částech mozku.(36) Na tomto základě může být dosaženo nootropního efektu cestou antagonizování GABA<sub>A</sub> receptorů. Na základě receptorové vazebné studie byl bis(7)-takrin shledán kompetitivním antagonistou GABA<sub>A</sub> receptorů, který vykazoval 18× silnější vazbu než samotný takrin (bis(7)-takrin  $K_i = 6 \mu\text{M}$ ). Z výsledků pozorování tak lze usuzovat, že efekt bis(7)-takrinu je výsledkem synergního působení, tj. inhibice AChE a antagonismem GABA<sub>A</sub> receptorů. Jiné stanovení porovnávalo afinitu různých takrinových homodimerů k GABA<sub>A</sub> receptorům.(41) Výsledky pozorování ukázaly, že kratší fragmenty mají vyšší antagonistický potenciál k těmto receptorům, přičemž nejúčinnější byl bis(2)-takrin.

Za zmínku rovněž stojí pozitivní účinek bis(7)-takrinu na modelu ischemie.(37–39) V rámci této studie byl bis(7)-takrin aplikován v dávkách 1-10 nM. Astrocyty byly zvoleny jako vhodný typ buněčné linie pro tento experiment. Z výsledků analýz vyplývá protektivní charakter bis(7)-takrinu na modelu ischemie, který může být přínosným např. při léčbě vaskulární demence.(40)

Dalším zjištěným mechanismem účinku bylo, že takrin stejně jako bis(7)-takrin ovlivňují spontánní synaptickou aktivitu nikotinových receptorů.(42) Obdobný trend v afinitě na daný cíl, který byl pozorován u GABA<sub>A</sub> receptorů lze vypočítat i v tomto případě, kdy bis(7)-takrin vykázal 100×-1000× vyšší afinitu k tomuto receptoru oproti takrinu. Zajímavostí je, že přesný mechanismus se u obou derivátů lišil. Zatímco bis(7)-takrin se vázal na nikotinový receptor v poměru 1:1, neovlivňoval současně vaznost  $\alpha$ -bungarotoxinu, selektivně se vážícího ligandu na tento receptor, na rozdíl od takrinu. Ze závěrů studie je možné rovněž vyčíst, že vazba bis(7)-takrinu na nikotinový receptor se pomalu disociuje, u takrinu dochází k rychlému odloučení z vazby. V obou případech se však jedná o antagonistický efekt.

Jiným receptorovým systémem, který byl studován v souvislosti s komplexním účinkem bis(7)-takrinu byl serotoninový receptor 5-HT<sub>3</sub>.(43) Proces učení a pamatování je složitý a komplexní děj, na kterém se podílí celá řada neurotransmiterů a receptorů. Jedním z nich je rovněž 5-HT<sub>3</sub> receptor, jehož inhibice vede k presynaptickému uvolňování ACh a tím pádem ke zlepšení paměťových funkcí. Tyto experimenty s bis(7)-takrinem byly prováděny na trigeminálních ganglionových neuronech a poukázaly na kompetitivní charakter inhibice 5-HT<sub>3</sub> receptorů. Tento efekt, kromě zmíněné inhibice AChE, může rovněž výrazně přispívat k pochopení anti-alzheimerovského profilu bis(7)-takrinu.

Glutamátem indukovaná excitotoxicita tvoří jednu z patofyziologických hypotéz AD.(44) Na této teorii staví užívání memantinu, tedy kompetitivního antagonisty NMDA receptorů.(45,46) Některé studie s inhibitory AChE rovněž poukázaly, že zlepšení kognitivních funkcí nemusí být u nich nutně mediováno pouze inhibicí AChE, ale i ovlivněním NMDA receptorů.(47) Na základě těchto informací byl zkoumán vliv bis(7)-takrinu a donepezilu na NMDA receptory.(48–51) Studie byla vykonána na cerebrálních granulárních neuronech, kde bylo pozorováno, že aplikace 75  $\mu\text{M}$  glutamátu měla za následek buněčnou apoptózu. Současná koaplikace bis(7)-takrinu v dávkách od 0,1 až do 1  $\mu\text{M}$  výrazně zabraňovala apoptóze. Efekt byl dávkově i časově závislý. Donepezil dokonce ani při nejvyšších dávkách (1  $\mu\text{M}$ ) neměl proti-apoptický efekt. Studie dále ukázala, že protekce bis(7)-takrinu není zprostředkována cestou cholinergní transmise, naopak je dle všeho podporována inhibicí extracelulární signálně-regulační kinasy (ERK1/2) a p38 mitogen-aktivované protein kinasy (MAPK), které shodně regulují apoptózu indukovanou právě glutamátem.(52,53) Bis(7)-takrin přímo inhibuje NR1/NR2B podjednotku NMDA receptoru. Tato inhibice má pomalý nástup, je nekompetitivní a napěťově závislá.(54) Bis(7)-takrin mechanisticky reguluje hladiny intracelulárního vápníku vazbou na NMDA receptory ve vazebném místě pro MK-801.(55,56) Vazba bis(7)-takrinu na NMDA receptory je závislá na pH, největšího terapeutického efektu bylo docíleno v kyselé oblasti hodnot pH.(57)



Zvýšená produkce oxidu dusnatého (NO) je spjata s řadou patofyziologických pochodů. Mimo jiné přispívá k neurotoxické A $\beta$ , glutamátu a L-argininu.(58,59) Celý proces je bludným kruhem, kdy nadměrné hladiny glutamátu zapříčiňují aktivaci syntasy produkující NO. Snížení produkce NO nepřímo, tj. inhibicí této syntasy, je tak další možnou strategií k navýšení protektivního potenciálu exponovaných neuronů.(60) V rámci další studie bylo sledováno právě možné ovlivnění syntasy produkující NO bis(7)-takrinem.(61) V modelu kortikálních buněčných linií bis(7)-takrin nejenže potlačoval glutamátem navozenou aktivaci syntasy produkující NO, ale byl schopen i přímé inhibice tohoto enzymu.(62)

Šestidenní *in vitro* studie na primární, kortikální buněčné linii odhalila další pozitivní atributy bis(7)-takrinu pro léčbu neurodegenerativních onemocnění.(63) Předně byl bis(7)-takrin schopen ochránit tyto buněčné linie přímo proti cytotoxickému vlivu A $\beta_{42}$ , dále zmírňoval příznaky apoptózy navozené A $\beta_{42}$  a v neposlední řadě blokoval L-typ vápníkového kanálu, čímž opět nepřímo snižoval toxicitu A $\beta_{42}$ . Podobný neuroprotektivní efekt byl dříve objeven u selektivního blokátoru vápníkového kanálu nimodipinu.(64) Dle dalších pozorování je pravděpodobné, že bis(7)-takrin je schopen rovněž inhibovat draselné kanály a tím snižovat jejich nadměrnou stimulaci, která je rovněž pozorovatelná u pacientů s AD.(65–67)

Další studie ukazují na přímé zapojení bis(7)-takrinu do amyloidní kaskády. Snižování produkce A $\beta$  je v tomto případě docíleno dvěma mechanismy a to inhibicí beta sekretasy (BACE-1), enzymu, který je zapojen do tvorby A $\beta$  v tzv. amyloidní cestě zpracování amyloidního prekurzorového proteinu (APP), a rovněž aktivací tzv.  $\alpha$ -cesty, která zpracovává APP za vzniku netoxických fragmentů A $\beta$ .(68) Aktivace  $\alpha$ -cesty je zřejmě zprostředkována přes proteinovou kinasu C (PKC).(69)

### ***In vivo* studie s bis(7)-takrinem**

Efekt bis(7)-takrinu za *in vivo* podmínek byl studován v tzv. skopolaminové studii s dospělými potkany s využitím behaviorálních testů v Morrisově vodním bludišti.(70) Bis(7)-takrin byl porovnáván s parentním takrinem. Skopolamin je známým alkaloidem schopným navodit dočasně ztrátu paměti doprovázenou četnými kognitivními dysfunkcemi.(71) Účinek skopolaminu je zprostředkován antagonizováním muskarinových receptorů. V podmínkách pětidenního testování *in vivo* byly obě sloučeniny aplikovány intraperitoneálně (i.p.) nebo intragastricky (i.g.). Výsledek aplikace obou sloučenin jednoznačně poukázal na mírnění příznaků navozených skopolaminem, přičemž efekt bis(7)-takrinu se projevoval již při 24× nižších dávkách v porovnání s takrinem a to bez rozdílu cesty aplikace. Při stanovení anti-AChE aktivity *in vivo* byla zjištěna dávkově závislá inhibice jak pro takrin, tak i jeho homodimer bis(7)-takrin.(72) Relativním srovnáním účinku vykázal bis(7)-takrin 10× vyšší účinnost v porovnání s takrinem. Výsledný efekt bis(7)-takrinu byl rovněž nezávislý na způsobu podání (i.p. nebo i.g.) na rozdíl od takrinu, který měl menší dostupnost po perorálním podání. Při ekvivalentním podání obou sloučenin byla sérová BChE inhibice menší u bis(7)-takrinu, což může předznamenat výrazně nižší toxický profil v porovnání s takrinem. Toxicita bis(7)-takrinu však nebyla předmětem této studie. Obdobných výsledků z behaviorální studie bylo dosaženo na myších.(73) V jiné studii byl použit k navození amnézie cykloheximid, který zastupoval skopolamin. Výsledky behaviorálních studií však byly obdobné jako v případě podávání skopolaminu, ale koaplikace cykloheximidu s bis(7)-takrinem vedla k potenciaci akutní toxicity obou sloučenin.(74)

Obdobný *in vivo* experiment byl vykonán s aziridiniovou solí, AF64A, která neurotoxicky navozuje cholinergní deficit podobný tomu, který je pozorován u pacientů s AD.(75) AF64A byla aplikována intracerebroventrikulárně. Způsobila pokles aktivity cholinacetyltransferasy (ChAT), enzymu zodpovědného za syntézu ACh *de novo*, o 47% v hipokampu. Antidotní efekt bis(7)-takrinu byl pozorován s využitím Morrisova vodního bludiště.(76) Bis(7)-takrin prokázal dávkově závislé zmírnění symptomů navozených AF64A bez přímého ovlivnění ChAT.

Behaviorální studie porovnávající efektivitu bis(7)-takrinu ve vztahu ke kognitivním funkcím byla provedena na 17 dní a 30 dní starých myších.(77) Dávky byly odstupňované od 1,25 do 10,0  $\mu$ mol/kg. Za použití pasivního testu vyhýbání bylo většího terapeutického potenciálu dosaženo v případě léčby skupiny starších myší. Efekt bis(7)-takrinu byl výraznější než u samotného takrinu. Vyšší dávky (20,0  $\mu$ mol/kg) byly doprovázeny motorickými dysfunkcemi a jaterním selháváním.

Farmakokinetika bis(7)-takrinu po jednorázovém intravenózním podání (i.v.; 0,3 mg/kg) laboratorním potkanům vyústila v rychlou plasmatickou distribuci s maximem okolo 11. minuty. Eliminační poločas bis(7)-takrinu byl 264 minut. Distribuční objem byl spočítán na 1,42 l/kg, tato hodnota předpokládá distribuci léčiva do extravaskulárních tkání.(78,79) Absorpce a metabolizace se staly předmětem dalšího studia. Permeabilita bis(7)-takrinu skrze umělou, lipidickou membránu byla téměř kompletní, zatímco absorpce přes Caco-2 buněčné linie byla podstatně nižší (až 56 % léčiva neprostupovalo). Intestinální perfuze bis(7)-takrinu proběhla pouze z 10 %, přes 90 % sloučeniny nebylo adsorbováno. Dle tohoto nálezu lze konstatovat, že bis(7)-takrin není vhodný pro perorální aplikaci. Bis(7)-takrin vykázal vysokou afinitu k plasmatickým proteinům (99,9 %). Hydroxylace bis(7)-takrinu se jeví jako pravděpodobný mechanismus metabolizace tohoto léčiva jaterními mikrosomy.(80) Tato data jsou odrazem fyzikálně-chemických vlastností bis(7)-takrinu, zejména jeho vysoké lipofility ( $\log P = 8,2$ ). Za zmínku stojí rovněž malá rozpustnost ve vodě (12,71 mg/ml). Experimentálně byly rovněž stanoveny hodnoty  $pK_a$ , které jsou 8,70 a 10,66 což koreluje s přítomností dvou různých dusíkových atomů v molekule.(81)

Ačkoliv je bis(7)-takrin považován za bezpečnější léčivo v porovnání s takrinem, jeho podávání je rovněž provázeno hepatotoxickým působením. Současná koaplikace hepatoprotektiva tak může výrazně přispět k potlačení těchto nežádoucích efektů, které byly důvodem ke stažení takrinu z trhu. Schisandrin B je představitelem hepatoprotektivně působící sloučeniny využívané proti působení různých xenobiotik.(82) Jeho současné podávání s takrinem nebo bis(7)-takrinem výrazně snižovalo jejich toxický profil a navíc schisandrin B přispíval k lepším kognitivním projevům v testu pasivního vyhýbání prováděném na myších.(83)

## **Závěr**

Bis(7)-takrin se stal průkopnickou molekulou zejména s ohledem základního výzkumu tzv. multipotentních sloučenin, které jsou schopné současně ovlivňovat mnoho patologických mechanismů u neurodegenerativních onemocnění současně.(84) Slibný potenciál bis(7)-takrinu byl pozorován za podmínek *in vitro* v celé řadě studií. Zde je ovšem potřeba nahlížet na jeho působení vůči různým enzymům a receptorům zcela kriticky, protože dle současných kritérií bis(7)-takrin spadá mezi tzv. PAINS (Pan-Assay Interference Compounds).(85) Otázkou tak zůstává skutečná relevance *in vitro* dosažených dat, jejich validita může být ověřena pouze za podmínek *in vivo*. Nepřípustný farmakokinetický profil, zejména nedostatečná absorpce a relativně rychlá metabolizace, je hlavní překážkou pro další testování. Dnes již víme, že toto je dáno fyzikálně-chemickými parametry léčiva, které jsou v případě bis(7)-takrinu neslučitelné pro perorální absorpci i následný přechod do CNS. I přesto všechno zcela bezpochyby bis(7)-takrin pomohl nasměrovat vědecké kroky ve vývoji léčiv k novým, multipotentním sloučeninám ve vztahu k neurodegenerativním chorobám.

## **Poděkování**

Práce byla podpořena Dlouhodobým záměrem rozvoje a organizace – zdravotnická problematika ZHN (Fakulta vojenského zdravotnictví), finančními prostředky Fakultní nemocnice Hradec Králové (č. 00179906) a Grantovou agenturou České republiky, projekt číslo 16-08554S.

## **Acknowledgment**

The work was supported by Long-term development plan (Faculty of Military Health Sciences), by MH CZ - DRO (University Hospital Hradec Kralove, No. 00179906) and Grant Agency of Czech Republic, project No. 16-08554S.

## **Prohlášení o střetu zájmu**

Žádný střet zájmu.

## **Declaration of conflict of interest**

Author declare no conflict of interest.

## Reference

1. Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 23. srpen 1991;253(5022):872–9.
2. Hofer P, Fringeli UP. Acetylcholinesterase kinetics. *Biophys Struct Mech*. 1981;8(1–2):45–59.
3. Almasieh M, MacIntyre JN, Pouliot M, Casanova C, Vaucher E, Kelly MEM, et al. Acetylcholinesterase inhibition promotes retinal vasoprotection and increases ocular blood flow in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 3. květen 2013;54(5):3171–83.
4. Komloova M, Musilek K, Dolezal M, Gunn-Moore F, Kuca K. Structure-activity relationship of quaternary acetylcholinesterase inhibitors - outlook for early myasthenia gravis treatment. *Curr Med Chem*. 2010;17(17):1810–24.
5. Nachmansohn D, Wilson IB. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*. 1951;12:259–339.
6. Taylor P, Lappi S. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry (Mosc)*. 6. květen 1975;14(9):1989–97.
7. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in Brain Cholinesterases in Senile Dementia of Alzheimer Type. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1. červenec 1978;4(4):273–7.
8. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 30. červenec 1982;217(4558):408–14.
9. Mohs RC, Davis BM, Johns CA, Mathé AA, Greenwald BS, Horvath TB, et al. Oral physostigmine treatment of patients with Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. leden 1985;142(1):28–33.
10. Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, Tachiki K, Kling A. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *N Engl J Med*. 13. listopad 1986;315(20):1241–5.
11. Patocka J, Jun D, Kuca K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. *Curr Drug Metab*. květen 2008;9(4):332–5.
12. Balson R, Gibson PR, Ames D, Bhathal PS. Tacrine-Induced Hepatotoxicity. *CNS Drugs*. 1. září 1995;4(3):168–81.
13. Spilovska K, Korabecny J, Sepsova V, Jun D, Hrabínova M, Jost P, et al. Novel Tacrine-Scutellarin Hybrids as Multipotent Anti-Alzheimer's Agents: Design, Synthesis and Biological Evaluation. *Mol Basel Switz*. 16. červen 2017;22(6).
14. Nepovimova E, Korabecny J, Dolezal R, Babkova K, Ondrejicek A, Jun D, et al. Tacrine-Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *J Med Chem*. 25. listopad 2015;58(22):8985–9003.
15. Spilovska K, Korabecny J, Horova A, Musilek K, Nepovimova E, Drtinova L, et al. Design, synthesis and in vitro testing of 7-methoxytacrine-amantadine analogues: a novel cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Chem Res*. 1. červen 2015;24(6):2645–55.
16. Spilovska K, Korabecny J, Nepovimova E, Dolezal R, Mezeiova E, Soukup O, et al. Multitarget Tacrine Hybrids with Neuroprotective Properties to Confront Alzheimer's Disease. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(9):1006–26.
17. Prati F, Cavalli A, Bolognesi ML. Navigating the Chemical Space of Multitarget-Directed Ligands: From Hybrids to Fragments in Alzheimer's Disease. *Mol Basel Switz*. 8. duben 2016;21(4):466.
18. Pang YP, Quiram P, Jelacic T, Hong F, Brimijoin S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 27. září 1996;271(39):23646–9.
19. del Monte-Millán M, García-Palomero E, Valenzuela R, Usán P, de Austria C, Muñoz-Ruiz P, et al. Dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: potential new disease-modifying agents for AD. *J Mol Neurosci MN*. 2006;30(1–2):85–8.
20. Alvarez A, Opazo C, Alarcón R, Garrido J, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J Mol Biol*. 26. září 1997;272(3):348–61.
21. De Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC. A Structural Motif of Acetylcholinesterase That Promotes Amyloid  $\beta$ -Peptide Fibril Formation. *Biochemistry (Mosc)*. 1. září 2001;40(35):10447–57.
22. Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem Biol Interact*. 6. září 2010;187(1–3):10–22.



23. Carlier PR, Han YF, Chow ES, Li CP, Wang H, Lieu TX, et al. Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg Med Chem.* únor 1999;7(2):351–7.
24. Hu M-K, Wu L-J, Hsiao G, Yen M-H. Homodimeric Tacrine Congeners as Acetylcholinesterase Inhibitors. *J Med Chem.* 1. květen 2002;45(11):2277–82.
25. Lee SK, Park MK, Jhang HE, Yi J, Nahm K, Cho DW, et al. Preparation of 7-Methoxy Tacrine Dimer Analogs and Their In vitro/In silico Evaluation as Potential Cholinesterase Inhibitors. *Bull Korean Chem Soc.* červen 2015;36(6):1654–60.
26. Korabecny J, Holas O, Musilek K, Pohanka M, Opletalova V, Dohnal V, et al. Synthesis and In Vitro Evaluation of New Tacrine Derivates-Bis-Alkylene Linked 7-MEOTA. *Lett Org Chem.* 1. červen 2010;7(4):327–31.
27. Rydberg EH, Brumshtein B, Greenblatt HM, Wong DM, Shaya D, Williams LD, et al. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of Bis5-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J Med Chem.* 7. září 2006;49(18):5491–500.
28. Minarini A, Milelli A, Tumiatto V, Rosini M, Simoni E, Bolognesi ML, et al. Cystamine-tacrine dimer: a new multi-target-directed ligand as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease treatment. *Neuropharmacology.* únor 2012;62(2):997–1003.
29. Eslami M, Hashemianzadeh SM, Bagherzadeh K, Seyed Sajadi SA. Molecular perception of interactions between bis(7)tacrine and cystamine-tacrine dimer with cholinesterases as the promising proposed agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J Biomol Struct Dyn.* 2016;34(4):855–69.
30. Bolognesi ML, Cavalli A, Valgimigli L, Bartolini M, Rosini M, Andrisano V, et al. Multi-target-directed drug design strategy: from a dual binding site acetylcholinesterase inhibitor to a trifunctional compound against Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 27. prosinec 2007;50(26):6446–9.
31. Qian S, He L, Mak M, Han Y, Ho C-Y, Zuo Z. Synthesis, biological activity, and biopharmaceutical characterization of tacrine dimers as acetylcholinesterase inhibitors. *Int J Pharm.* 30. prosinec 2014;477(1–2):442–53.
32. Bolognesi ML, Bartolini M, Mancini F, Chiriano G, Ceccarini L, Rosini M, et al. Bis(7)-tacrine derivatives as multitarget-directed ligands: Focus on anticholinesterase and anti-amyloid activities. *ChemMedChem.* 2. srpen 2010;5(8):1215–20.
33. Xiao XQ, Lee NT, Carlier PR, Pang Y, Han YF. Bis(7)-tacrine, a promising anti-Alzheimer's agent, reduces hydrogen peroxide-induced injury in rat pheochromocytoma cells: comparison with tacrine. *Neurosci Lett.* 1. září 2000;290(3):197–200.
34. Li CY, Wang H, Xue H, Carlier PR, Hui KM, Pang YP, et al. Bis(7)-tacrine, a novel dimeric AChE inhibitor, is a potent GABA(A) receptor antagonist. *Neuroreport.* 17. březen 1999;10(4):795–800.
35. Zhou L, Liu Y-W, Peoples RW, Yang M, Tian X, Ai Y-X, et al. Mechanism of bis(7)-tacrine inhibition of GABA-activated current in cultured rat hippocampal neurons. *Neuropharmacology.* červenec 2009;57(1):33–40.
36. Moore H, Sarter M, Bruno JP. Age-dependent modulation of in vivo cortical acetylcholine release by benzodiazepine receptor ligands. *Brain Res.* 20. listopad 1992;596(1–2):17–29.
37. Zhao Y, Li W, Chow PCY, Lau DTK, Lee NTK, Pang Y, et al. Bis(7)-tacrine, a promising anti-Alzheimer's dimer, affords dose- and time-dependent neuroprotection against transient focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 11. červenec 2008;439(2):160–4.
38. Shu X-J, Liu W, Zhang L, Yang R, Yi H-L, Li C-L, et al. Effect of bis(7)-tacrine on cognition in rats with chronic cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 23. březen 2012;512(2):103–8.
39. Li J, Lu Z, Xu L, Wang Q, Zhang Z, Fang J. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine in a rat model of pressure-induced retinal ischemia. *Cell Biochem Biophys.* březen 2014;68(2):275–82.
40. Han Y-F, Wu D-C, Xiao X-Q, Chen PMY, Chung W, Lee NTK, et al. Protection against ischemic injury in primary cultured astrocytes of mouse cerebral cortex by bis(7)-tacrine, a novel anti-Alzheimer's agent. *Neurosci Lett.* 14. červenec 2000;288(2):95–8.
41. Li C, Carlier PR, Ren H, Kan KKW, Hui K, Wang H, et al. Alkylene tether-length dependent gamma-aminobutyric acid type A receptor competitive antagonism by tacrine dimers. *Neuropharmacology.* únor 2007;52(2):436–43.
42. Ros E, Aleu J, Gomez de Aranda I, Cantí C, Pang YP, Marsal J, et al. Effects of bis(7)-tacrine on spontaneous synaptic activity and on the nicotinic ACh receptor of *Torpedo* electric organ. *J Neurophysiol.* červenec 2001;86(1):183–9.
43. Luo J-L, Zhang J, Guan B-C, Pang Y-P, Han Y-F, Li Z-W. Inhibition by bis(7)-tacrine of 5-HT-activated current in rat TG neurons. *Neuroreport.* 7. červen 2004;15(8):1335–8.

44. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* říjen 2004;45(5):583–95.
45. Zemek F, Drtinova L, Nepovimova E, Sepsova V, Korabecny J, Klimes J, et al. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opin Drug Saf.* červen 2014;13(6):759–74.
46. Spilovska K, Zemek F, Korabecny J, Nepovimova E, Soukup O, Windisch M, et al. Adamantane - A Lead Structure for Drugs in Clinical Practice. *Curr Med Chem.* 2016;23(29):3245–66.
47. Horak M, Holubova K, Nepovimova E, Krusek J, Kaniakova M, Korabecny J, et al. The pharmacology of tacrine at N-methyl-D-aspartate receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 3. duben 2017;75:54–62.
48. Li W, Pi R, Chan HHN, Fu H, Lee NTK, Tsang HW, et al. Novel dimeric acetylcholinesterase inhibitor bis(7)-tacrine, but not donepezil, prevents glutamate-induced neuronal apoptosis by blocking N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem.* 6. květen 2005;280(18):18179–88.
49. Fu H, Li W, Liu Y, Lao Y, Liu W, Chen C, et al. Mitochondrial proteomic analysis and characterization of the intracellular mechanisms of bis(7)-tacrine in protecting against glutamate-induced excitotoxicity in primary cultured neurons. *J Proteome Res.* červenec 2007;6(7):2435–46.
50. Liu Y-W, Luo J-L, Ren H, Peoples RW, Ai Y-X, Liu L-J, et al. Inhibition of NMDA-gated ion channels by bis(7)-tacrine: whole-cell and single-channel studies. *Neuropharmacology.* červen 2008;54(7):1086–94.
51. Fang JH, Wang XH, Xu ZR, Jiang FG. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine against glutamate-induced retinal ganglion cells damage. *BMC Neurosci.* 3. březen 2010;11:31.
52. Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, et al. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem.* 25. červenec 1997;272(30):18518–21.
53. Jiang Q, Gu Z, Zhang G, Jing G. Diphosphorylation and involvement of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in glutamate-induced apoptotic-like death in cultured rat cortical neurons. *Brain Res.* 28. únor 2000;857(1):71–7.
54. Liu Y, Li C. Inhibition of N-methyl-D-aspartate-activated current by bis(7)-tacrine in HEK-293 cells expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B receptors. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban.* prosinec 2012;32(6):793–7.
55. Woodruff GN, Foster AC, Gill R, Kemp JA, Wong EH, Iversen LL. The interaction between MK-801 and receptors for N-methyl-D-aspartate: functional consequences. *Neuropharmacology.* červenec 1987;26(7B):903–9.
56. Liu Y-W, Li C-Y, Luo J-L, Li W-M, Fu H-J, Lao Y-Z, et al. Bis(7)-tacrine prevents glutamate-induced excitotoxicity more potently than memantine by selectively inhibiting NMDA receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 16. květen 2008;369(4):1007–11.
57. Luo J, Li W, Liu Y, Zhang W, Fu H, Lee NTK, et al. Novel dimeric bis(7)-tacrine proton-dependently inhibits NMDA-activated currents. *Biochem Biophys Res Commun.* 21. září 2007;361(2):505–9.
58. Yamauchi M, Omote K, Ninomiya T. Direct evidence for the role of nitric oxide on the glutamate-induced neuronal death in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 12. leden 1998;780(2):253–9.
59. Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, et al. Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem.* 26. listopad 2004;279(48):50310–20.
60. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science.* 11. červen 1999;284(5421):1845–8.
61. Li W, Lee NTK, Fu H, Kan KKW, Pang Y, Li M, et al. Neuroprotection via inhibition of nitric oxide synthase by bis(7)-tacrine. *Neuroreport.* 3. duben 2006;17(5):471–4.
62. Li W, Xue J, Niu C, Fu H, Lam CSC, Luo J, et al. Synergistic neuroprotection by bis(7)-tacrine via concurrent blockade of N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase. *Mol Pharmacol.* květen 2007;71(5):1258–67.
63. Fu H, Li W, Lao Y, Luo J, Lee NTK, Kan KKW, et al. Bis(7)-tacrine attenuates beta amyloid-induced neuronal apoptosis by regulating L-type calcium channels. *J Neurochem.* září 2006;98(5):1400–10.
64. Ueda K, Shinohara S, Yagami T, Asakura K, Kawasaki K. Amyloid beta protein potentiates Ca<sup>2+</sup> influx through L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem.* leden 1997;68(1):265–71.
65. Nie H, Yu W-J, Li X-Y, Yuan C-H, Pang Y-P, Li C-Y, et al. Inhibition by bis(7)-tacrine of native delayed rectifier and KV1.2 encoded potassium channels. *Neurosci Lett.* 29. leden 2007;412(2):108–13.

66. Yu SP. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol.* červenec 2003;70(4):363–86.
67. Li X-Y, Zhang J, Dai J-P, Liu X-M, Li Z-W. Actions of bis(7)-tacrine and tacrine on transient potassium current in rat DRG neurons and potassium current mediated by K(V)4.2 expressed in *Xenopus* oocyte. *Brain Res.* 8. března 2010;1318:23–32.
68. Fu H, Li W, Luo J, Lee NTK, Li M, Tsim KWK, et al. Promising anti-Alzheimer's dimer bis(7)-tacrine reduces beta-amyloid generation by directly inhibiting BACE-1 activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 15. únor 2008;366(3):631–6.
69. Fu H, Dou J, Li W, Cui W, Mak S, Hu Q, et al. Promising multifunctional anti-Alzheimer's dimer bis(7)-Cognitin acting as an activator of protein kinase C regulates activities of  $\alpha$ -secretase and BACE-1 concurrently. *Eur J Pharmacol.* 25. listopad 2009;623(1):14–21.
70. Wang H, Carlier PR, Ho WL, Lee NT, Pang YP, Han YF. Attenuation of scopolamine-induced deficits in navigational memory performance in rats by bis(7)-tacrine, a novel dimeric AChE inhibitor. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* března 1999;20(3):211–7.
71. Bymaster FP, Heath I, Hendrix JC, Shannon HE. Comparative behavioral and neurochemical activities of cholinergic antagonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* říjen 1993;267(1):16–24.
72. Wang H, Carlier PR, Ho WL, Wu DC, Lee NT, Li CP, et al. Effects of bis(7)-tacrine, a novel anti-Alzheimer's agent, on rat brain AChE. *Neuroreport.* 17. března 1999;10(4):789–93.
73. Pan S-Y, Yu Z-L, Xiang C-J, Dong H, Fang H-Y, Ko K-M. Comparison studies of tacrine and bis(7)-tacrine on the suppression of scopolamine-induced behavioral changes and inhibition of acetylcholinesterase in mice. *Pharmacology.* 2009;83(5):294–300.
74. Pan S-Y, Zhang Y, Guo B-F, Han Y-F, Ko K-M. Tacrine and bis(7)-tacrine attenuate cycloheximide-induced amnesia in mice, with attention to acute toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* říjen 2011;109(4):261–5.
75. Fisher A, Mantione CR, Abraham DJ, Hanin I. Long-term central cholinergic hypofunction induced in mice by ethylcholine aziridinium ion (AF64A) in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* červenec 1982;222(1):140–5.
76. Liu J, Ho W-L, Lee NT-K, Carlier PR, Pang Y-P, Han Y-F. Bis(7)-tacrine, a novel acetylcholinesterase inhibitor, reverses AF64A-induced deficits in navigational memory in rats. *Neurosci Lett.* 24. března 2000;282(3):165–8.
77. Pan SY, Yu ZL, Dong H, Lee NTK, Wang H, Fong WF, et al. Evaluation of acute bis(7)-tacrine treatment on behavioral functions in 17-day-old and 30-day-old mice, with attention to drug toxicity. *Pharmacol Biochem Behav.* 1. duben 2007;86(4):778–83.
78. Yu H, Ho JMK, Kan KKW, Cheng BWH, Li W-M, Zhang L, et al. Development of a high performance liquid chromatography-tandem mass method for determination of bis(7)-tacrine, a promising anti-Alzheimer's dimer, in rat blood. *J Pharm Biomed Anal.* 3. září 2007;44(5):1133–8.
79. Zhang L, Li Z, Yu H, Hua Y, Li WM, Ming LW, et al. Selective and sensitive determination of bis(7)-tacrine, a high erythrocyte binding acetylcholinesterase inhibitor, in rat plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr BMC.* duben 2008;22(4):414–20.
80. Zhang L, Yu H, Li WM, Cheung MC, Pang YP, Gu ZM, et al. Preclinical characterization of intestinal absorption and metabolism of promising anti-Alzheimer's dimer bis(7)-tacrine. *Int J Pharm.* 5. červen 2008;357(1–2):85–94.
81. Yu H, Li W-M, Kan KKW, Ho JMK, Carlier PR, Pang Y-P, et al. The physicochemical properties and the in vivo AChE inhibition of two potential anti-Alzheimer agents, bis(12)-hupyrindone and bis(7)-tacrine. *J Pharm Biomed Anal.* 7. leden 2008;46(1):75–81.
82. Hancke JL, Burgos RA, Ahumada F. *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Fitoterapia.* 1. říjen 1999;70(5):451–71.
83. Pan SY, Han YF, Carlier PR, Pang YP, Mak DHF, Lam BYH, et al. Schisandrin B protects against tacrine- and bis(7)-tacrine-induced hepatotoxicity and enhances cognitive function in mice. *Planta Med.* března 2002;68(3):217–20.
84. Li W, Mak M, Jiang H, Wang Q, Pang Y, Chen K, et al. Novel anti-Alzheimer's dimer Bis(7)-cognitin: cellular and molecular mechanisms of neuroprotection through multiple targets. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* leden 2009;6(1):187–201.
85. Baell JB, Nissink JWM. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017-Utility and Limitations. *ACS Chem Biol.* 19. leden 2018;13(1):36–44.