

Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby

Tacrine and its derivatives in the therapy of Alzheimer's disease

Jan Korábečný • Katarína Špilovská • Ondřej Benek • Kamil Musílek • Ondřej Soukup • Kamil Kuča

Došlo 13. srpna 2012 / Přijato 19. září 2012

Souhrn

Inhibitory cholinesteras mají příznivý vliv na kognitivní, funkční i behaviorální projevy Alzheimerovy choroby (AD) a v současné době představují téměř výhradně jedinou skupinu léčiv používaných pro terapii tohoto onemocnění. Tři z nich jsou schváleny k užívání americkou agenturou Food and Drug Administration – donepezil, rivastigmin a galantamin. Kromě inhibitorů cholinesteras se dále používá memantin, který je představitelem *N*-methyl-*D*-aspartátových (NMDA) nekompetitivních antagonistů. Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin) se stal prvním schváleným inhibitorem cholinesteras pro léčbu AD. Jeho nežádoucí účinky, zejména hepatotoxicita a gastrointestinální potíže, však limitují jeho další využití. Nové deriváty takrinu jsou intenzivně zkoumány ve snaze najít látky s nižší toxicitou a postihující více patologických mechanismů účastnících se AD. Předkládaná práce sumarizuje dosud publikované strukturní aspekty takrinových derivátů a zaměřuje se na jejich vybrané biologické vlastnosti. Jednotlivé sloučeniny jsou rozčleněny dle strukturních aspektů do tří základních skupin, které jsou diskutovány.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba • takrin a jeho deriváty • acetylcholinesterasa • inhibitor

Summary

Cholinesterase inhibitors have beneficial effects on the cognitive, functional, and behavioural symptoms of Alzheimer's disease (AD). Up to date, they represent almost the only drugs approved by the U.S. Food and Drug Administration agency for AD treatment. The group involves donepezil, rivastigmine and galantamine. Apart from the above mentioned cholinesterase inhibitors, memantine is used for AD treatment as well acting as *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) non-competitive antagonist. Tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine) was the first cholinesterase inhibitor approved for symptomatic AD treatment. However, its several side effects (hepatotoxicity and gastrointestinal discomfort) limited tacrine further use. Recently, novel tacrine analogues are extensively investigated in endeavour to find less toxic compounds with the “multi-target directed ligand” profile affecting more AD pathological mechanisms. The following study summarizes the knowledge of up to date published tacrine analogues, their structural aspects and biological properties. According to structural aspects, tacrine derivatives are divided into three groups, where they are discussed.

Keywords: Alzheimer's disease • tacrine and its derivatives • acetylcholinesterase • inhibitor

Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) patří mezi nejčastější formy demence. Její nepředvídatelnost a dosud neznámá etiologie ji činí stále větším problémem, nejen po stránce zdravotní, ale i po stránce sociální či ekonomické. AD většinou končí po 3–10 letech od stanovení diagnózy letálně^{1, 2)}.

Celosvětově zaujímá AD pátou nejrozšířenější příčinu úmrtí u lidí starších 65 let. Případy úmrtí zapříčiněné AD dramaticky narůstají. Mezi roky 2000 a 2008 bylo zaznamenáno 66 % případů úmrtí způsobených AD. Pro srovnání, případů úmrtí z důvodů srdečního selhání bylo okolo 13 %, mozkové příhody 20 % a úmrtí v důsledku rakoviny prostaty okolo 8 %^{1, 2)}.

V Americe je odhadováno 5,4 milionů pacientů s AD, přičemž 200 000 z nich je mladších 65 let (AD s časným začátkem), celkový počet demencí ve světě je v současné době odhadován ke 35,6 milionu lidí. Do roku 2050 se předpokládá nárůst až na 115,4 milionů pacientů¹⁾. Nej-

J. Korábečný • O. Benek
Univerzita Obrany Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví
a Fakultní nemocnice Hradec Králové

K. Špilovská
Univerzita Obrany Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví

K. Musílek
Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta a Fakultní nemocnice Hradec Králové

O. Soukup
Univerzita Obrany Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví
a Fakultní nemocnice Hradec Králové

prof. Ing. Kamil Kuča, Ph.D. (✉)
Univerzita Obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých studií a Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové
e-mail: kucakam@pmfhk.cz

rizikovější populací jsou osoby starší 85 let (více než 50 % případů AD). V České republice je odhadováno, že touto chorobou trpí přibližně 125 000 obyvatel, v rámci Evropské unie je to pak 6 milionů a toto číslo se s největší pravděpodobností do roku 2050 zdvojnásobí^{3–6}. Všechna výše zmíněná data podtrhují závažnost AD, přičemž dosud nebyla vyvinuta efektivní terapie AD. Hlavním důvodem jsou omezené znalosti základní patofyziologie AD. Ačkoliv v posledních 30 letech bylo dosaženo velkého pokroku na úrovni biologické, biochemické, toxikologické, tak i v oblasti farmaceutického výzkumu, zvažované terapeutické postupy selhávají nebo intervnují až příliš pozdě v průběhu nemoci^{1,4}.

Cholinergní teorie

Cholinergní hypotéza představuje první a dodnes přijímanou teorii vysvětlující podstatu vzniku AD. Téměř všechna současně používaná léčiva k mírnění symptomatických projevů všech forem AD se o ni opírají^{7,8}. Tato teorie vychází z poznatků ztráty cholinergní aktivity pozorované u pacientů s AD a z experimentálních studií na lidech i primátech. Tyto studie našly úzkou souvislost mezi rolí neuromediátoru acetylcholinu (ACh) a schopností učení a pamatování si⁹. Z blokády centrálního cholinergního systému skopolaminem u mladých jedinců lze vypožorovat podobné příznaky demence jako v populaci jedinců postižených AD. Tento paměťový deficit může být navracen do normálního stavu použitím inhibitorů cholinesteras, např. fysostigminem¹⁰. Tato experimentální studie vedla ke klinickým studiím jiného typu sloučenin, reverzibilních inhibitorů cholinesteras, které zaznamenaly největší příslib pro léčbu deficitních paměťových funkcí u pacientů s AD.

Při detailnějším pohledu na deficitní cholinergní systém při AD byla pozorována narušená signalizace z populace neuronů vycházející z bazální části předního mozku a Meynertova jádra do mozkové kůry a hipokampu. Rovněž koncentrace a aktivita cholinacetyltransferasy (ChAT) zodpovědné za tvorbu ACh se v průběhu AD významně snižuje v oblastech mozkové kůry a hipokampu^{11–13}. Ve stejných částech mozku pak bylo také potlačeno uvolňování ACh navozené depolarizací a dále byl snížen uptake cholinu do nervových zakončení, který je potřebný k doplnění zásob pro resyntézu nového ACh. Pokud vezmeme v úvahu, že prvotním ukazatelem AD jsou narušené paměťové funkce, pak výše zmíněná role ACh při cholinergní transmisi a jeho důležitost pro kognitivní funkce podporuje tyto závěry¹⁴. Všechna tato pozorování položila základ cholinergní teorii, kterou poprvé shrnul v roce 1982 ve své práci Bartus et al.¹⁵. Tato práce dodnes plně reflektuje vztah mezi cholinergní hypotézou, věkově závislou cholinergní dysfunkcí a demencí typu AD.

Takrin a jeho deriváty

Od první syntézy takrinu (1945) bylo připraveno velké množství takrinových analogů, které byly testovány nejen pro svůj potenciál v léčbě AD¹⁶. Takrin samotný disponuje skvělými biologickými vlastnostmi,

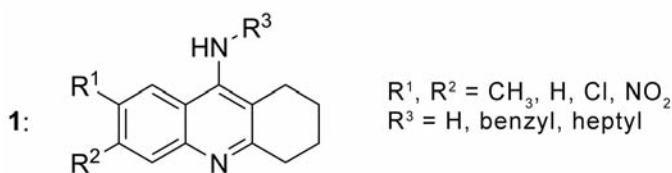
mezi které patří inhibice acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) v nM koncentraci a snadný vstup přes hematoencefalickou bariéru, který je pravděpodobně spojený s acetyl-*L*-karnitinovým transportním systémem^{17,18}. Současně připravované deriváty s ohledem na AD lze rozdělit do tří skupin. První je zastoupena monotakrinovými deriváty, ve kterých je různě modifikován základní skelet. Druhou skupinu prezentují homodimery takrinu. Tyto sloučeniny působí převážně pouze inhibičně na cholinesterasy (ChE) a jsou zpravidla symetrickými molekulami. Třetí skupina, která v posledních letech zaznamenala největší nárůst, je představována heterodimery takrinu. Zejména poslední jmenovaná skupina sdružuje sloučeniny s různým farmakologickým účinkem, zpravidla výhodným pro léčbu AD. Homodimery i heterodimery jsou shodně připravovány na podkladě poznatků o duální inhibici acetylcholinesterasy (AChE). Ta je výhodná zejména díky zesílenému účinku na AChE (efektivní koncentrace v řádu nM) a zpravidla i dlouhodobějšímu působení. Další výhodou přímo související s duální inhibicí těchto sloučenin je schopnost zamezit formování fibril proteinu β -amyloidu (β A) indukovaného prostřednictvím periferní anionické (aromatické) části AChE¹⁹. Spojení dvou sloučenin s rozdílným farmakologickým profilem má však i další nesporné výhody. Předně vzniká nová entita schopná působit na další cíle, které ovlivňují patologii dané nemoci, což je výhodné u multifaktoriálních onemocnění, tedy i u AD.

Monotakrinové inhibitory

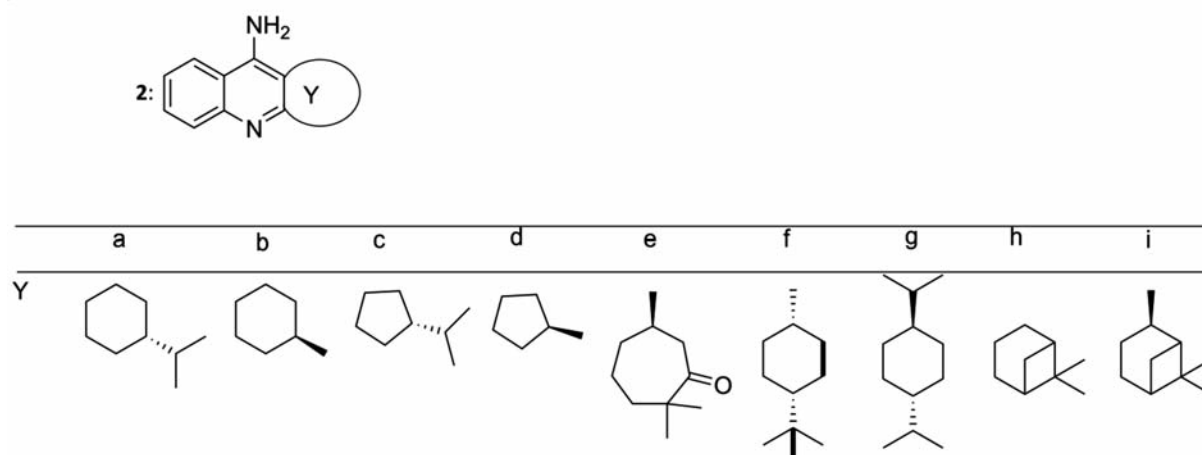
Velká srovnávací studie monotakrinových inhibitorů (**1**) byla provedena Recanatini et al. Deriváty se lišily substitucí v poloze 6, 7 a 9 takrinového skeletu. Nejvyšší afinitu k AChE ukázala analoga substituovaná v poloze 6 CH_3 , NO_2 nebo Cl skupinami (nejvyšší 6-Cl: $\text{IC}_{50} = 9,9$ nM). Zavedení Cl do obou poloh základního skeletu (6 i 7) vedlo ke sloučeninám s nízkou účinností. Objemné substituenty v poloze 9, jako je např. benzyl, rovněž snižují afinitu k AChE, naopak *n*-heptyl v této poloze zvyšuje účinnost²⁰. Pro polohy 6 a 7, elektronakceptorové (např. NO_2^-) substituenty zvyšovaly účinnost, zatímco elektrondonorové (např. benzyl) substituenty snižují inhibiční potenciál (obr. 1).

Chirálními terpenickými monotakriny (**2**) a jejich aktivitou se zabývali Pisoni et al. (obr. 2)²¹. Východí sloučeninou pro syntézu byl keton v opticky aktivní formě. Objemnější substituenty v poloze 1 vyústily v méně účinné inhibitory AChE. Zajímavý inhibiční potenciál vykázal sedmičlenný derivát s karbonylovou funkcí **2e** (derivát **2e**: $\text{IC}_{50} = 288$ nM), molekula **2d** dokonce převýšila inhibiční schopnost takrinu ($\text{IC}_{50} = 61$ nM).

Další sérií sloučenin připravených slovenským praco-



Obr. 1. Monotakrinové deriváty podrobené SAR studii

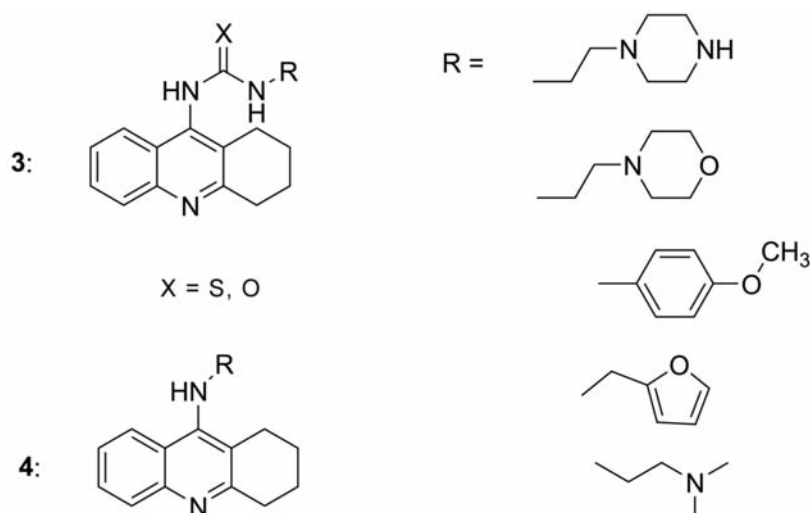


Obr. 2. Monotakriny připravené z chirálních terpenických cyklanonů

vištém v Košicích jsou monotakrinové deriváty lišící se substitucí v poloze 9²²⁾. Porovnávány byly thiomocovinnové nebo močovinnové deriváty (**3**) vázané na základní skelet takrinu nebo analoga bez těchto funkcí (**4**). Sledován byl také vliv připojeného heterocyklického systému nebo dimethylaminoskupiny (obr. 3). Nejvyšší afinitu k AChE prokázal morfolinový derivát navázaný přes močovinnovou funkční skupinu ($IC_{50} = 972$ nM) k takrinovému základu. Furanový derivát vázaný přes methylenový můstek k amino skupině takrinu vykázal nejlepší hodnotu IC_{50} k BChE (20, μ M).

Takrindihydropyridinovou řadu (zkráceně takripyriny, **5**) lze považovat za přechod od monotakrinů k duálně působícím inhibitorům AChE. Jak již název těchto sloučenin napovídá, jedná se o sérii látek sdružující jak inhibičně působící část molekuly vůči ChE (takrin), tak i dihydropyridinové uskupení antagonisticky působící na kalciovém kanálu (obr. 4). Blokátory kalciových kanálů mají silný neuroprotektivní účinek, který zůstává zachován i v molekule takripyrinů^{23, 24)}.

Takripyriny mající na benzenovém jádře v poloze 3 methoxy skupinu prokázaly nejvyšší účinnost vůči AChE ($IC_{50} = 58$ nM). Všechny inhibitory v této sérii shodně vykazovaly vysokou selektivitu k AChE^{23, 24)}.



Obr. 3. Takrinová analoga připravená substitucí v poloze 9

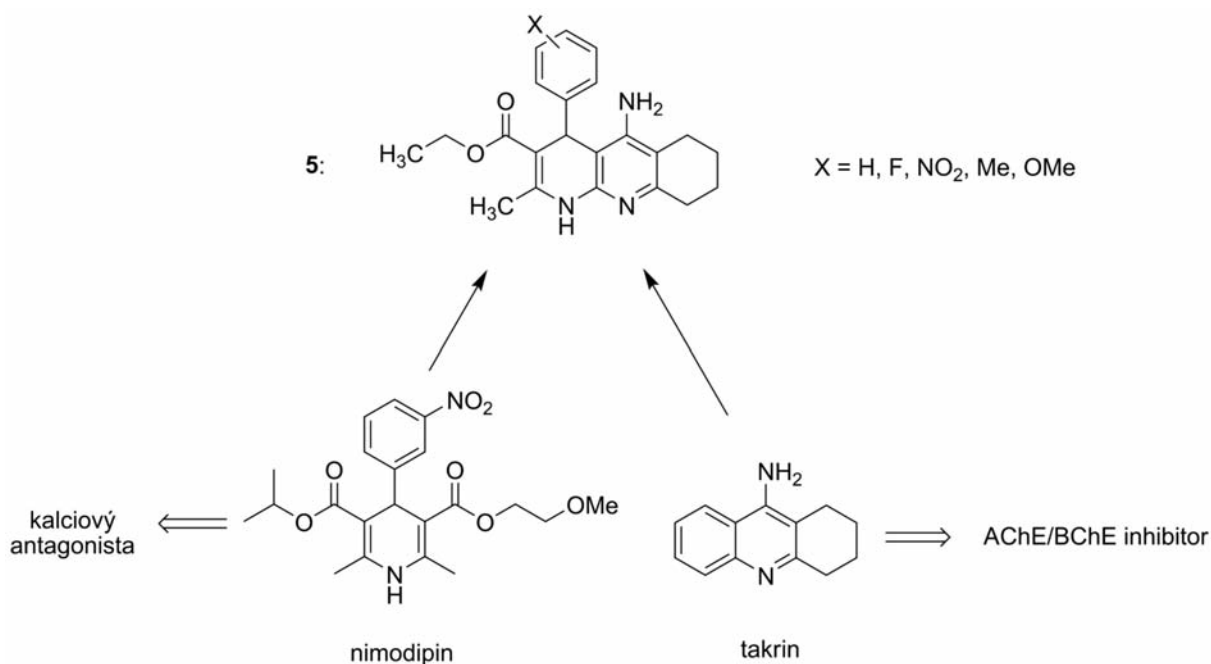
Další početnou skupinu takrinových sloučenin představují inhibitory AChE s nitrilovou skupinou v poloze 7 (obr. 5) (**6**). Vysokou účinnost i selektivitu k AChE měl derivát s dimethylaminovým uskupením v poloze 6 ($IC_{50} = 14$ nM). Podobně jako předchozí série takripyrinů i tyto sloučeniny působí neuroprotektivně²⁵⁾.

7-methoxytakrin (7-MEOTA) (obr. 6) byl vyvinut v České republice jako méně toxický derivát takrinu při zachování farmakologického profilu²⁶⁾. Nižší toxicita 7-MEOTA je vysvětlována pomocí hlavního metabolitu, 7-hydroxytakrinu, rovněž farmakologicky účinného analoga, který vzniká v organismu demethylací. 7-hydroxytakrin je následně konjugován s kyselinou glukuronovou a exkretován močí²⁷⁾. V rámci pokračování výzkumu se 7-MEOTA byly připraveny jeho nové deriváty, které se liší substitucí v poloze 9. Některé z nich převýšily účinnost 7-MEOTA i takrinu (obr. 6) (**7**)^{28–31)}.

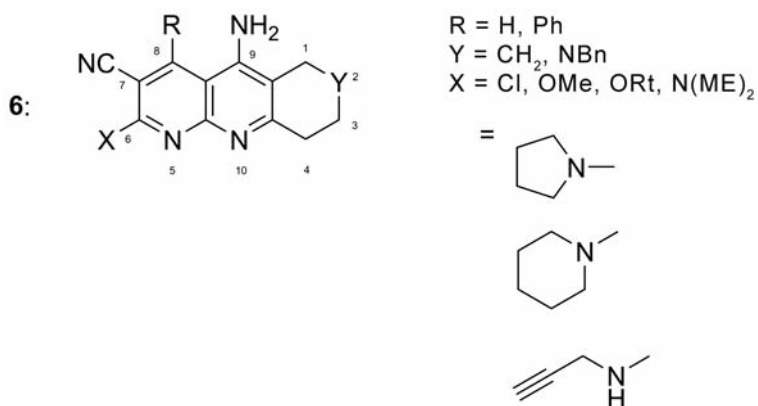
Bezesporně nejzajímavější sérií v oblasti monotakrinových látek jsou huperiny (obr. 11, **11**). V jejich struktuře můžeme nalézt jak takrinový, tak i huperzinový fragment. V rámci studie vztahů mezi strukturou a účinkem byla připravena velká řada derivátů lišící se substitucí v takrinové i huperzinové části molekuly. Tato analoga předčila referenční látky (huperzin A, takrin) nejen v inhibičních vlastnostech vůči AChE a BChE, ale i v dalších biologických vlastnostech (inhibice agregace $A\beta$, antioxidační vlastnosti, chelatace těžkých kovů aj.)^{32–36)}.

Takrinové homodimery

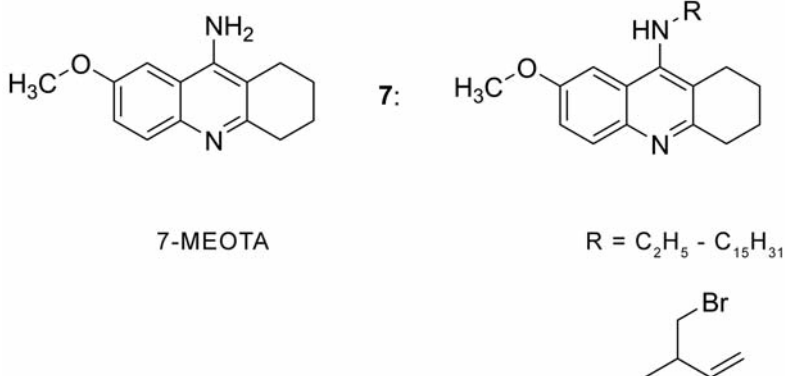
První homodimery takrinu byly nejprve navrženy a následně i připraveny Pangem et al. v roce 1996³⁷⁾. Předlohou strukturou se stal bis-7-takrin (**8**): $IC_{50/AChE} = 0.81$ nM, $IC_{50/BChE} = 5.66$ nM (obr. 7). Metodou molekulového modelování byla vypočítána jeho prostorová orientace v AChE z *Torpedo californica* (obr. 8)³⁸⁾. Preklinické studie odhalily nízkou perorální dostupnost bis-7-takrinu kvůli špatnému přechodu



Obr. 4. Takrindihydropyridiny – látky připravené spojením takrinu a 1,4-dihydropyridinu



Obr. 5. Monotakriny s nitrilovou skupinou v poloze 7



Obr. 6. 7-MEOTA a nově připravené deriváty substitucí v poloze 9 základního skeletu

přes intestinální bariéru a vysokou míru hepatální transformace. Po i. m. aplikaci na myších dosáhl maxima plazmatické koncentrace za 15 minut a snadno prostoupil hematoencefalickou bariérou³⁹. Bis-7-takrin

nahrazen 6-chlortakrinem, který více inhibuje AChE ($\text{IC}_{50} = 8,32 \text{ nM}$)^{44, 45}.

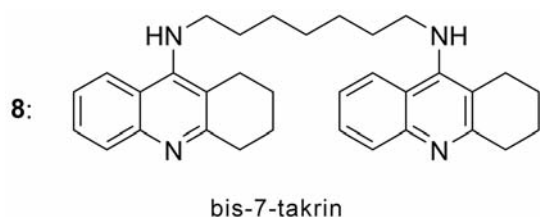
Na průkopnickou studii s bis-7-takrinem navázaly další práce, ve kterých dochází k pozvolnému přechodu

splňuje předpoklad duální inhibice – váže se v periferním anionickém místě i katalytickém místě AChE (obr. 8)³⁸. Z dalších účinků lze zmínit i slabé neuroprotektivní vlastnosti docílené inhibicí NMDA receptorů a neuronální NO synthasy. Mezi jeho pozitivní účinky lze zařadit i inhibici β -sekretasy (BACE-1) a antagonismus na GABA-ergních receptorech typu A^{40–42}.

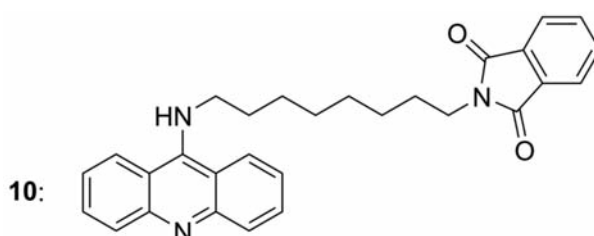
V souvislosti s připraveným bis-7-takrinem a jeho dobrými biologickými vlastnostmi byly nasynthetizovány a *in vitro* testovány zdvojené deriváty 7-MEOTA (9). Žádný z nich však nepřekonal aktivitu samotného takrinu ani bis-7-takrinu, což je pravděpodobně dáno nemožností volné rotace díky přemostění základního skeletu přes dva methylenové můstky (obr. 9)⁴³.

Takrinové heterodimery

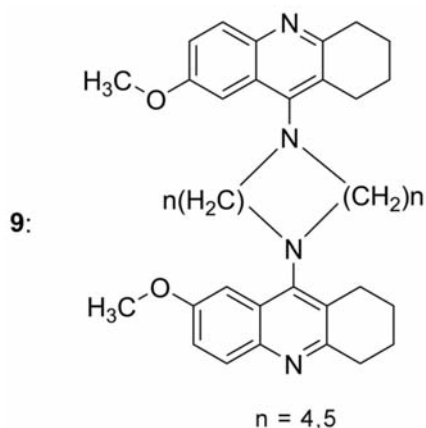
Takrinové heterodimery představují nejširší a v současnosti nejvíce studovanou skupinu sloučenin. Podnět k jejich výzkumu přinesla syntéza a následně zjištěné biologické vlastnosti bis-7-takrinu. Základní skelet takrinu bývá u některých derivátů v této skupině



Obr. 7. Bis-7-takrin – první duální inhibitor AChE připravený v roce 1996



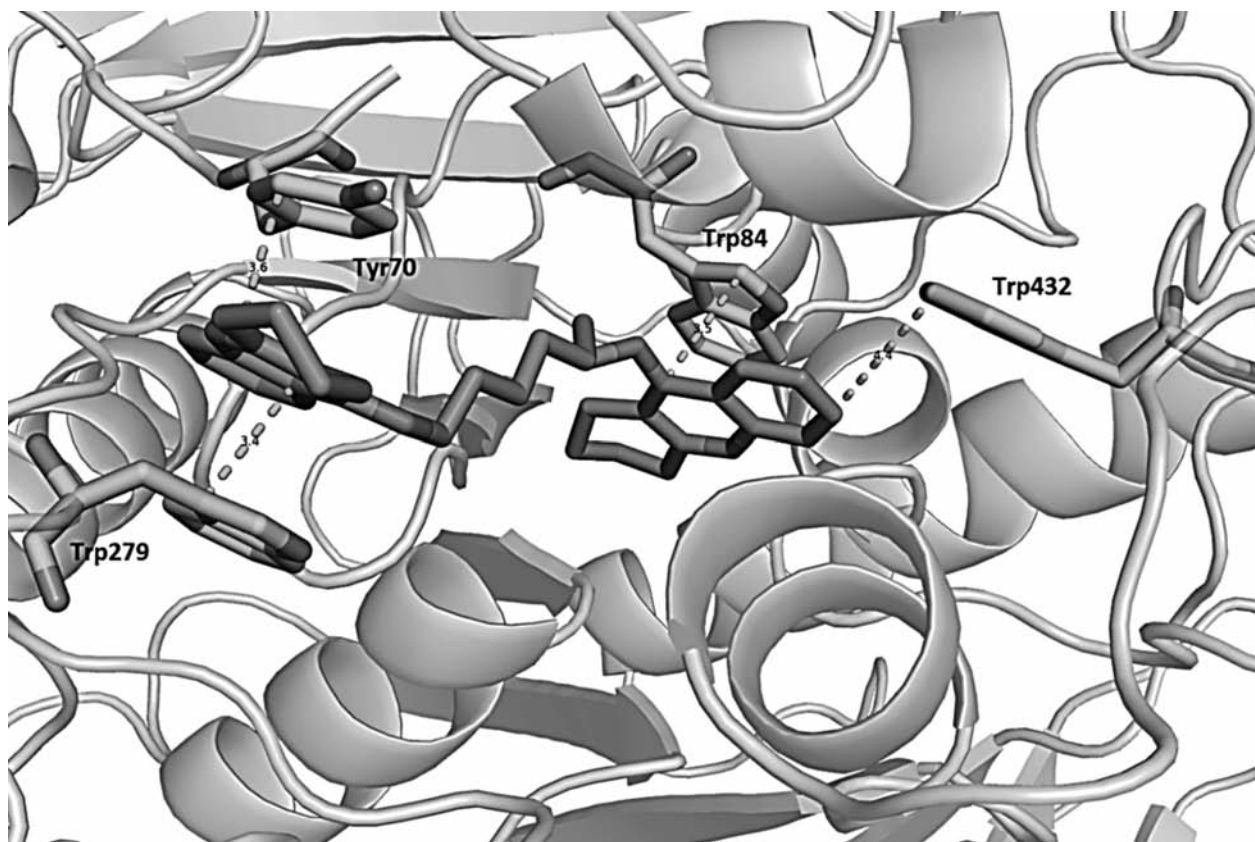
Obr. 10. Nejúčinnější sloučenina ze série takrin-donepezilových hybridů



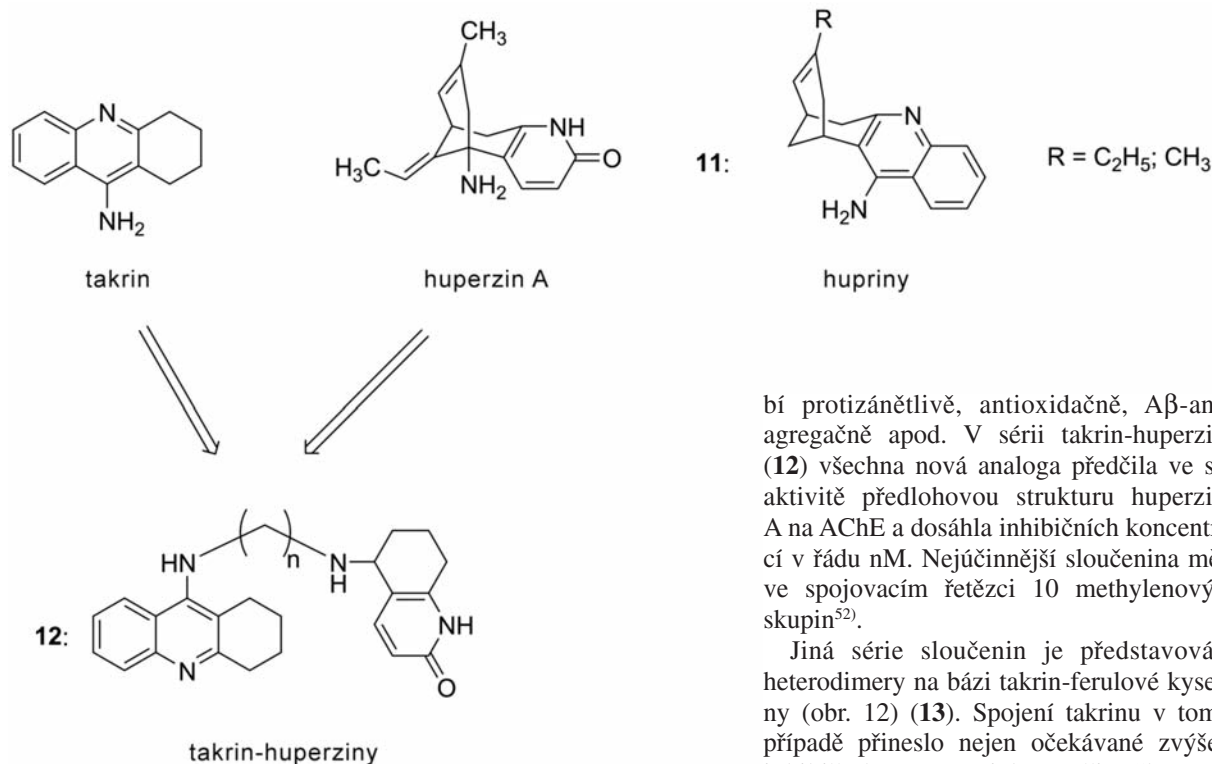
Obr. 9. Zdvojené deriváty 7-MEOTA přemostěné dvěma alkylovými řetězci

k takrinovým heterodimerům^{46–51}). Donepezil-takriny (**10**) byly publikovány D. Alonsem v roce 2005⁴⁶). Tyto hybridy se liší délkou spojovacího řetězce, nasyceností takrinového kruhu i charakterem spojovací funkční skupiny (obr. 10). Nejlepší výsledek v této sérii vykázala sloučenina s akridinovým základem připojená k donepezilové části (prezentované ftalimidem) přes osm methylenových skupin.

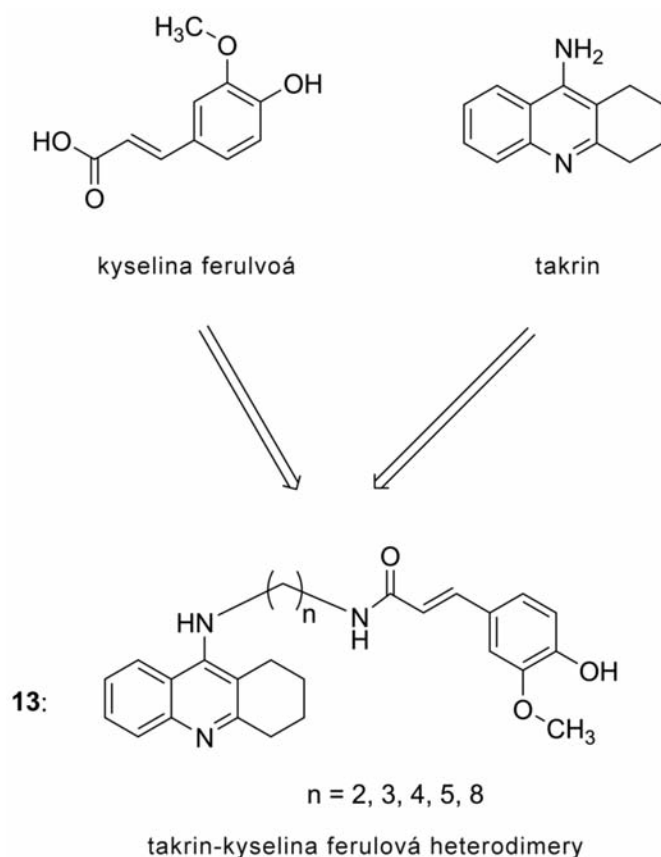
Další skupinou jsou heterodimery takrinu s huperzinem, které byly připraveny již v roce 1999, a navázaly tak na úspěšnou sérii huprinů (**11**, hybridní sloučeniny takrinu s huperzinem). Huperzin (obr. 11) je přírodní látka izolovaná z plavuně *Huperzia serrata*, která se odedávna využívá v čínském lidovém léčitelství. V některých oblastech světa dosáhla již klinické praxe (zejména v asijských státech), ve zbytku světa se nachází ve druhé fázi klinického testování. Svou pozornost přitahuje díky mnohočetným příznivým vlivům na organismus – půso-



Obr. 8. Prostorová orientace bis-7-takrinu v AChE z *Torpedo californica* (PDB code: 2ckm) a významné interakce s aminokyselinovými rezidui. Látka působí v periferním anionickém místě (Trp279, Tyr70) i katalytické části enzymu (Trp84, Trp432) a svou délkou mezi oběma takrinovými částmi dává látce charakter duálního inhibitoru. Vzdálenost je udávána v angstromech (Å). Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.)³⁸⁾.



Obr. 11. Takrin-huperzinové deriváty a hupriny

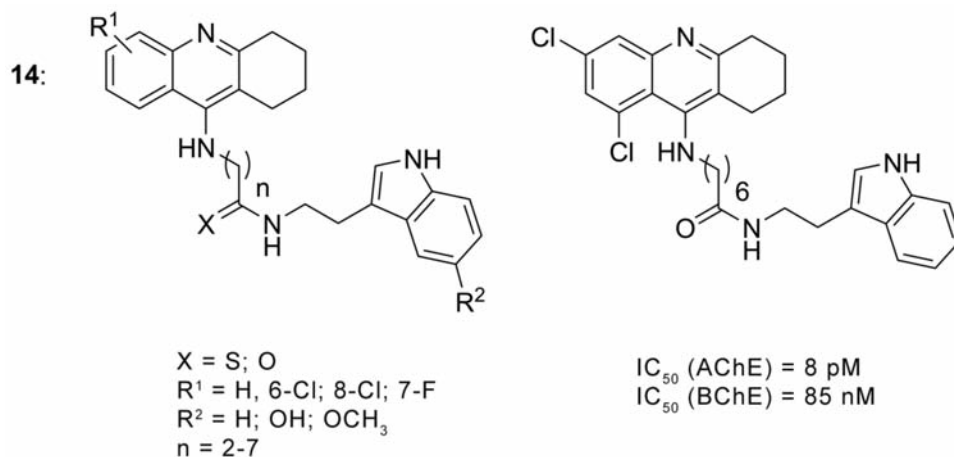


Obr. 12. Heterodimery takrin-ferulové kyseliny jako silné antioxidanty a duální inhibitory v terapii AD

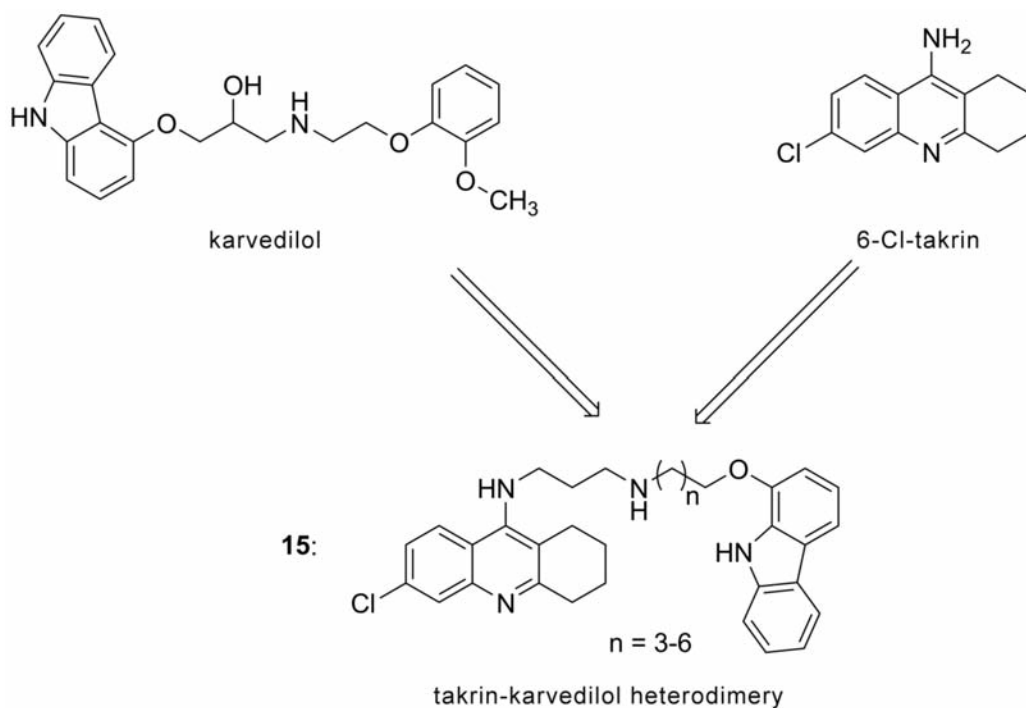
bí protizánětlivě, antioxidačně, $\text{A}\beta$ -antiagregačně apod. V sérii takrin-huperzinů (**12**) všechna nová analoga předčila ve své aktivitě předlohou strukturu huperzinu A na AChE a dosáhla inhibičních koncentrací v řádu nM. Nejúčinnější sloučenina měla ve spojovacím řetězci 10 methylenových skupin⁵².

Jiná série sloučenin je představována heterodimery na bázi takrin-ferulové kyseliny (obr. 12) (**13**). Spojení takrinu v tomto případě přineslo nejen očekávané zvýšení inhibičního potenciálu vůči ChE, ale i zavedení výrazných antioxidačních schopností (dáno vlastnostmi kyseliny ferulové) a $\text{A}\beta$ antiagregační schopností vyplývajících z duální inhibice AChE^{53–56}. Nejvyšší anti-AChE aktivitu projevila molekula s pěti uhlíky ve spojovacím řetězci, která více než desetkrát překonala takrin v jeho účinnosti na AChE ($\text{IC}_{50} = 4,4 \text{ nM}$). O jednu methylenovou skupinu vyšší homolog byl dále studován z hlediska přechodu přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Tento derivát zmírňuje skopolaminem navozenou paměťovou dysfunkci, z čehož lze předpokládat přístup látek této série přes HEB⁵⁷.

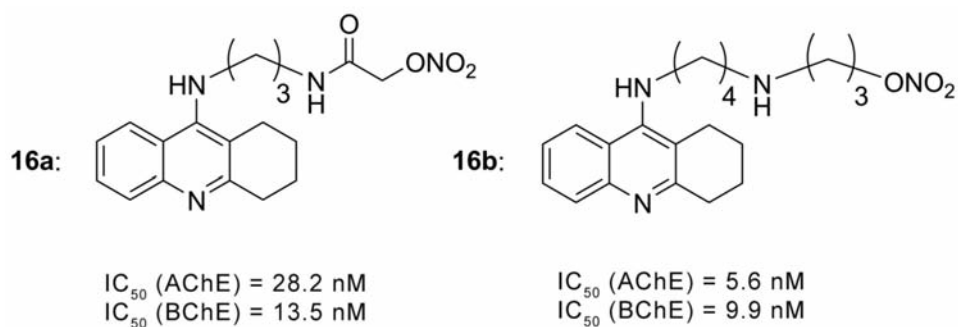
Další zajímavou skupinou jsou takrin-melatoninové heterodimery (obr. 13) (**14**)⁵⁸. V průběhu AD ubývají antioxidační schopnosti celého organismu, a nervový systém je tak náchylný k neurodegeneraci⁵⁹. Současný výzkum odhalil důležitou účast hormonu melatoninu v antioxidačních pochodech v průběhu AD. Jedná se o epifyzární hormon, jehož hladina s progresí onemocnění klesá⁶⁰. Melatonin rovněž stimuluje endogenní antioxidační enzymy, zlepšuje energetickou bilanci mitochondrií, snižuje míru hyperfosforylace a má neuroprotektivní vlastnosti anti-agregačním působením proti $\text{A}\beta$ ⁶¹. V připravené sérii je řada molekul s duálním mechanismem účinku na AChE (efektivní sub-nM koncentrace), všechny shodně vykazaly silné antioxidační vlastnosti a $\text{A}\beta$ antiagregační schopnosti. Na základě testů umělé semipermeabilní membrány prochází převážná většina takrin-melaninových analogů přes HEB⁶².



Obr. 13. Obecná struktura takrin-melatoninových inhibitorů (14, vlevo) a neúčinnější látky z této série (vpravo)



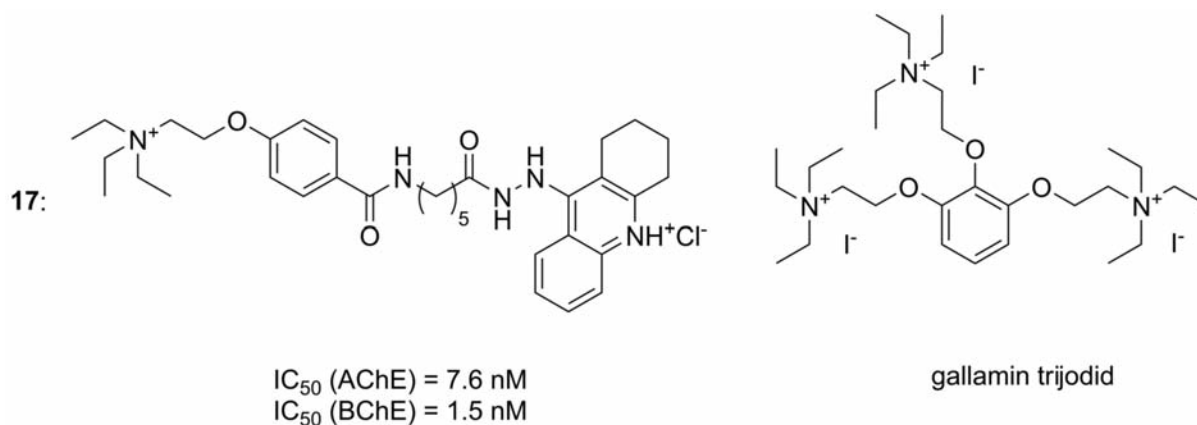
Obr. 14. Designová strategie takrin-karvedilol heterodimerů



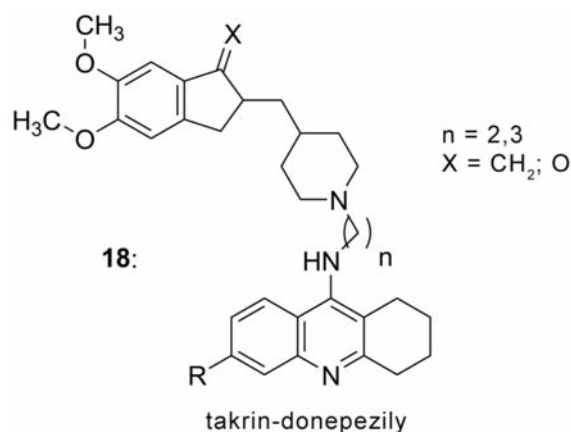
Obr. 15. Látky s nejlepším profilem v sérii takrin-NO donorů

Karvedilol je látkou používanou k hypertenzní léčbě. Kromě toho disponuje i neuroprotektivními vlastnostmi dané slabou afinitou k NMDA receptorům⁶³. Kombina-

ce karbazolové části karvedilolu s 6-chlortakrinem dala vznik tzv. karvedilol-takrinové (15) skupině sloučenin (obr. 14). Všechny připravené látky z této série inhibují



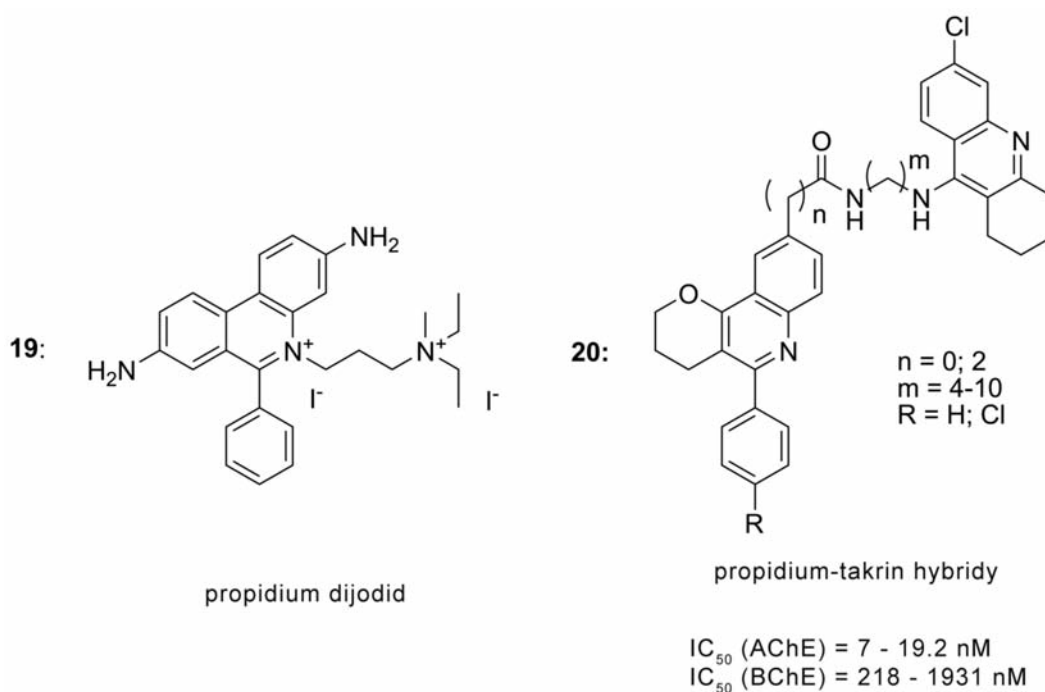
Obr. 16. Takrin-gallaminová série (17), pro ilustraci je zobrazena i struktura samotného gallaminu



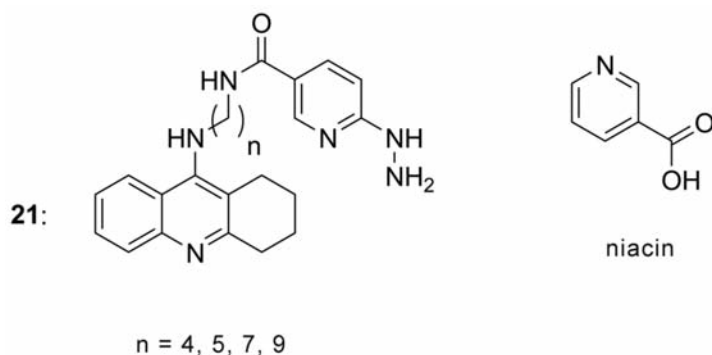
Obr. 17. Takrin-donepezilová řada (18). Nejvyšší afinitu k AChE demonstroval derivát s dvěma methylenovými můstky ($n = 2$) a kyslíkovým atomem v indanové části.

selektivně AChE, největší potenciál demonstrovala molekula s pěti methylenovými můstky ve spojovacím řetězci ($IC_{50} = 1,54$ nM). Tyto sloučeniny rovněž inhibují agregaci A β , a to jak indukovanou AChE, tak i autoagregačními pochody tohoto proteinu. Za zmínku stojí i antioxidační působení a již výše uvedené antagonistické působení na NMDA receptory⁶⁴.

Oxid dusnatý (NO) má důležitou fyziologickou funkci v CNS, kde působí jako mediátor v imunitním systému, vazomotorice i neurotransmisí⁶⁵. Při narušení jeho rovnováhy v organismu v průběhu AD hovoříme o tzv. nitrooxidativním stresu. V roce 2008 byla připravena série takrin-NO donorů (obr. 15). Chemicky se jedná o skupinu esterů kyseliny dusičné, které po aktivaci v organismu uvolňují NO. Všechny testované látky této řady prokázaly silnější inhibiční působení na oba cholinesterasové enzymy oproti takrinu. Při dalších studiích se ukázalo, že zmírňují skopolaminem navozené poruchy paměti, nezatěžují jaterní meta-



Obr. 18. Deriváty propidia s 6-chlortakrinem



Obr. 19. Takrin-niacinové deriváty

bolismus a interagují duálně s AChE⁶⁶). Látky s nejlepšími hodnotami IC₅₀ jsou vyznačeny na obrázku 15 (**16a**, **16b**).

Design další série molekul vzešel ze spojení gallaminu, typického alosterického modulátoru M₂ receptorů, s takrinem (obr. 16) (**17**). Gallamin je rovněž schopný inhibovat AChE v její periferní anionické části. Všechny deriváty ukázaly inhibiční potenciál v řádu nM koncentrací i vyšší alosterickou afinitu k M₂ receptorům než standardy takrin a gallamin⁶⁷).

Záměnou benzylové části ve struktuře donepezilu takrinem vznikly takrin-donepezily (obr. 17) (**18**). Donepezil se váže na periférii AChE, zatímco takrin je inhibitor aktivního místa. Nové sloučeniny tak získaly duální mechanismus účinku a vysokou selektivitu k AChE. Tato série molekul si zachovává většinu z donepezilové skeletu (ta je prezentována 5,6-dimethoxy-2-[(4-piperidinyl)methyl]-1-indanonem). U nových heterodimerů byla rovněž pozitivně hodnocena schopnost inhibovat tvorbu Aβ fibril indukovanou AChE⁶⁸).

Propididum dijodid (propidium, **19**) je prototypem periferního inhibitoru AChE (obr. 18). Jeho struktura zahrnuje kvartérní amoniovou funkci a aromatickou část a obě z nich mohou interagovat na periférii AChE pomocí kation-π a π-π interakcí. Spojení propidia, resp. jeho derivátu 5-fenylpyrano[3,2-c]chinolinu, s 6-chlortakrinem (**20**) přineslo zvýšení inhibiční účinnosti, poměrně vysokou selektivitu k AChE, zabránění formování Aβ fibril indukovaných AChE a μM až nM efektivní koncentrace vůči β-sekretase (obr. 18). Celá série byla sledována z hlediska prostupu HEB metodou umělé semi-permeabilní membrány, přičemž shodně u všech látek byla zaznamenána pozitivní korelace⁶⁹).

V poslední době se objevují nové práce poukazující na souvislost mezi AD a insuficiencí některých vitaminů, zejména vitaminů řady B⁷⁰). Jedním z nich je niacin (vitamin B₃), u kterého byla prováděna rozsáhlá klinická studie v souvislosti s demencí typu AD. Studie naznačila možný protektivní vliv niacinu v rozvoji AD nebo jiného typu demence⁷¹). V návaznosti na tyto poznatky byla připravena série takrin-niacinových derivátů Szymanski et al. (obr. 19) (**21**). U nich se opět předpokládá duální působení na AChE. Sloučeniny byly dosud testovány pouze na své cholinergní vlastnosti, žádná z nich však nepřekonala aktivitu takrinu pro obě testované ChE. Je však potřeba říci, že zatím se jedná o neucelenou sérii molekul s ohledem na délku spojovacího řetězce⁷²).

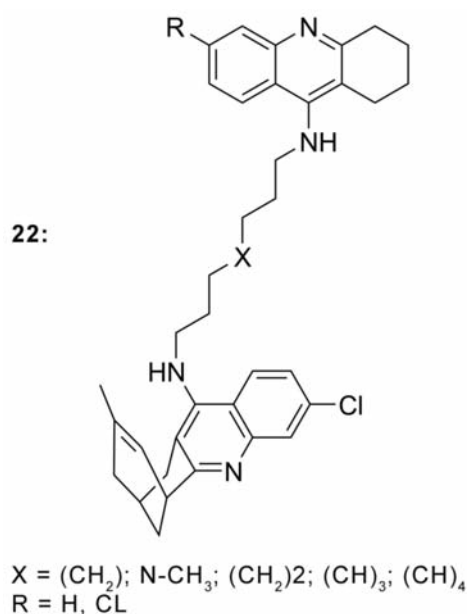
Jednou z nejnovějších a zároveň nejvíce prostudova-

ných sérií sloučenin z hlediska preklinického testování je skupina heterodimerů vzniklá spojením takrinu nebo 6-chlortakrinu s huprinem Y (**22**, derivát huperzinu a takrinu) (obr. 20). Takrin-hupriny blokují aktivní i periferní místo AChE, prakticky zcela zamezují agregaci Aβ, a to přímým vlivem na tento peptid nebo skrze inhibici periferního místa AChE. Působí také inhibičně vůči β-sekretase a na základě modelu umělé membrány (PAMPA-BBB test) prostupují snadno hematoencefalickou bariérou⁷³).

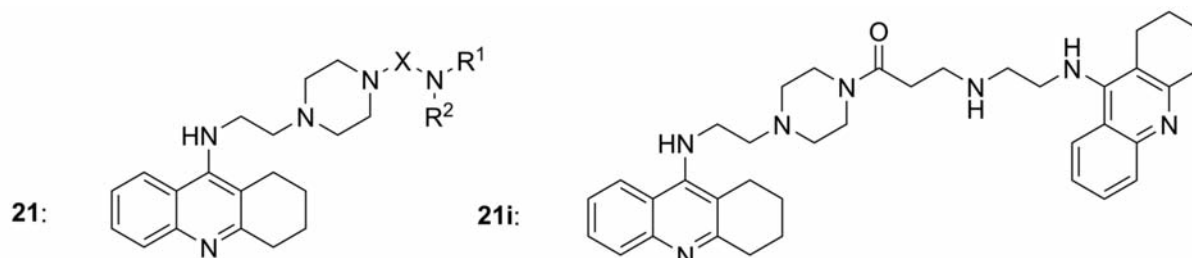
V návaznosti na výše uvedenou sérii thiomocovinových resp. močovinových monotakrinů (viz obr. 3), které vykázaly zajímavou míru selektivity k AChE, byla připravena série duálně působících heterodimerů takrinu obsahující piperazinový fragment ve spojovací části řetězce. Piperazin byl zvolen jako zástupce aminů s širokým biologickým účinkem, ke kterému je z jedné strany připojena terciární amino skupina a ze strany druhé takrinový skelet (obr. 21). Interakce s oběma částmi AChE byla následně potvrzena metodami *in silico*. Všechny připravené sloučeniny převýšily inhibiční potenciál srovnávacích standardů takrinu a 7-MEOTA pro AChE, efektivní koncentrace takrinu pro BChE nebyla překročena. Zajímavým se profiloval zejména analog **21i** (s připojeným takrinem k piperazinu přes amidický můstek), který *in vitro* vykázal vysokou míru selektivity vůči AChE (obr. 21)⁷⁴).

Závěr

Inhibitory cholinesteras mají v současné době nejrozšířenější zastoupení v terapii AD. Nejvíce probádanou a dále intenzivně zkoumanou skupinu představují inhibitory cholinesteras na bázi takrinu. Pro zvýšení účinnosti vůči AChE bývá takrin často zaměňován za 6-chlortakrin,



Obr. 20. Takrin-hupriny



- a:** X = CO(CH₂)₂; R¹,R² = piperidin-1-yl
b: X = CO(CH₂)₂; R¹,R² = methylcyklohexylamino
c: X = CO(CH₂)₂; R¹,R² = ethylcyklohexylamino
d: X = CO(CH₂)₂; R¹,R² = methylphenylamino
e: X = (CH₂)₃; R¹,R² = piperidin-1-yl
f: X = (CH₂)₃; R¹,R² = methylcyklohexylamino
g: X = (CH₂)₃; R¹,R² = ethylcyklohexylamino
h: X = (CH₂)₃; R¹,R² = methylphenylamino

- i:** IC₅₀ (AChE) = 4.49 nM; IC₅₀ (BChE) = 1520 nM
 SI (IC₅₀(BChE)/IC₅₀(AChE)) = 338.5

Obr. 21. Takrin-piperazinová série

pro nižší výskyt nežádoucích účinků je pak používána 7-MEOTA. Prvotní výzkum byl zaměřen na tzv. monotakrinové deriváty, u kterých byl sledován vliv velikosti nasyceného kruhu v takrinovém základu, substituce v různých polohách (zejména 6-, 7- a 9-) a v neposlední řadě chiralita (terpenické monotakriny). Velkým mezníkem ve vývoji předznamenala syntéza bis-7-takrinu, prvního duálně působícího homodimerního analoga. U této sloučeniny lze pozorovat nárůst v účinnosti inhibice na AChE, dané jeho prostorovým uspořádáním v aktivní části enzymu. Objevují se rovněž nové biologické vlastnosti, jako je např. inhibice agregace Aβ. Nevýhodou bis-7-takrinu byla jeho nízká perorální dostupnost a vysoká míra hepatální transformace na neúčinný metabolit. Bis-7-takrin však odstartoval nový směr vedoucí k syntézám četných heterodimerních i homodimerních sloučenin takrinu. Vznikají tak zcela nové entity duálně působících agens se zvýšeným inhibičním působením vůči oběma cholinestarám, sloučeniny blokující agregaci Aβ do fibril (dané inhibicí periferního anionického místa AChE) často se současným depolymerizačním efektem již vytvořených spletenců Aβ. Nové molekuly mají mnohdy navíc antioxidační vlastnosti, inhibují BACE-1 a jiné enzymové systémy účastnící se patologických pochodů v průběhu AD (monoaminoxidasa, GSK-3β), disponují chelatačními vlastnostmi vůči těžkým kovům nebo alostericky modulují receptory (muskarinové, nikotinové, GABA) aj. Vývoj nových duálně působících inhibitorů na bázi takrinu tak neustále pokračuje.

Střet zájmů: žádný.

Literatura

1. **Alzheimer's Association:** 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2012; 8, 131–168.

2. **Chopra K., Misra S., Kuhad A.** Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Pharmacother.* 2011; 12, 335–350.
3. **Launer L. J., Fratiglioni L., Andersen K., Breteler M. M. B., Copeland R. J. M., Dartiques J. F., Lobo A., Martínez-Lage J., Soinen H., Hofman A.** Regional differences in the incidence of dementia in Europe: EURODEM collaborative analyses 1999. Collective authors of Alzheimer Europe organization: Dementia in Europe Yearbook: 2008, 20; 1–178.
4. **Weiner M. W., Aisen P. S., Clifford R. J. Jr., Jagust W. J., Trojanowski J. Q., Shaw L., Saykin A. J., Morris J. C., Cairns N., Beckett L. A., Toga A., Green R., Walter S., Soares H., Snyder P., Siemers E., Potter W., Cole P. E., Schmidt M.** The Alzheimer's disease neuroimaging initiative: Progress report and future plans. *Alzheimers Dement.* 2010; 6, 202–211.
5. **Green R. C., Cupples L. A., Go R., Benke K. S., Edeki T., Griffith P. A., Williams M., Hipsy Y., Graff-Radford N., Bachman D., Farrer L. A.** MIRAGE Study Group. Risk of dementia among white and African-American relatives of patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.* 2002; 287, 329–336.
6. **Drtinová L., Pohanka M.** Alzheimerova demence: aspekty současné farmakologické léčby. *Čes. slov. Farm.* 2011; 60, 219–228.
7. **Bartus R. T., Dean R. L., Beer B., Lippa A. S.** The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982; 217, 408–414.
8. **Bartus R. T., Dean R. L., Goas J. A., Lippa A. S.** Age-related changes in passive avoidance retention: modulation with dietary choline. *Science* 1980; 209, 301–303.
9. **Perry E. K., Tomlinson B. E., Blessed G., Perry R. H., Cross A. J., Crow T. T.** Noradrenergic and cholinergic systems in senile dementia of Alzheimer type. *Lancet* 1981; 2, 8238–8249.
10. **Drachman D. A.** Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology* 1977; 27, 783–790.
11. **Bowen D. M., Smith C. B., White P., Davison A. N.** Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 1976; 99, 459–496.
12. **Davies P., Maloney A. J. F.** Selective loss of central cholinergic neurones in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976; 2, 1403.
13. **Perry E. K., Gibson P. H., Blessed G., Perry R. H., Tomlinson B. E.** Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J. Neurol. Sci.* 1977; 34, 247–265.
14. **Drachman D. A., Leavitt J.** Human memory and the cholinergic system. *Arch. Neurol.* 1974; 30, 113–121.
15. **Bartus R. T., Dean R. L., Beer B., Lippa A. S.** The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982; 217, 408–417.

16. Albert A. The chemical and biological properties of acridines. *Sci. Prog.* 1949; 37, 418–434.
17. Valenti P., Rampa A., Bisi A., Andrisano V., Cavrini V., Fin L., Buriani A., Giusti P. Acetylcholinesterase inhibition by tacrine analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997; 7, 2599–2602.
18. Lee N. Y., Choi H. O., Kang Y. S. The acetylcholinesterase inhibitors competitively inhibited an acetyl L-carnitine transport through the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.* 2012; 37, 1499–1507.
19. Inestrosa N. C., Alvarez A., Pérez C. A., Moreno R. D., Vicente M., Linker C., Casanueva O. I., Soto C., Garrido J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron.* 1996; 16, 881–891.
20. Recanatini M., Cavalli A., Belluti F., Piazzoli L., Rampa A., Bisi A., Gobbi S., Valenti P., Andrisano V., Bartolini M., Cavrini V. SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: Synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR, and structure-based CoMFA of tacrine analogues. *J. Med. Chem.* 2000; 43, 2007–2018.
21. dos Santos Pisoni D., Sobieski da Costa J., Gamba D., Petzhold C. L., de Amorim Borges A. C., Ceschi M. A., Lunardi P., Saraiva Gonçalves C. A. Synthesis and AChE inhibitory activity of new chiral tetrahydroacridine analogues from terpenic cyclanones. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45, 526–535.
22. Hamulakova S., Kristian P., Jun D., Kuca K., Imrich J., Daniel I., Bóhm S., Klika K. D. Synthesis, structure, and cholinergic effect of novel neuroprotective compounds bearing the tacrine pharmacophore. *Heterocycles* 2008; 76, 1219–1235.
23. Marco-Contelles J., León R., de Los Ríos C., Guglietta A., Terencio J., López M. G., García A. G., Villarroya M. Novel multipotent tacrine-dihydropyridine hybrids with improved acetylcholinesterase inhibitory and neuroprotective activities as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 2006; 49, 7607–7610.
24. Marco-Contelles J., León R., de los Ríos C., Samadi A., Bartolini M., Andrisano V., Huertas O., Barril X., Luque F. J., Rodríguez-Franco M. I., López B., López M. G., García A. G., Carreiras Mdo. C., Villarroya M. Tacripyrines, the first tacrine-dihydropyridine hybrids, as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 2009; 52, 2724–2732.
25. Samadi A., Valderas C., de los Ríos C., Bastida A., Chioua M., González-Lafuente L., Colmena I., Gandía L., Romero A., Del Barrio L., Martín-de-Saavedra M. D., López M. G., Villarroya M., Marco-Contelles J. Cholinergic and neuroprotective drugs for the treatment of Alzheimer and neuronal vascular diseases. II. Synthesis, biological assessment, and molecular modelling of new tacrine analogues from highly substituted 2-aminopyridine-3-carbonitriles. *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19, 122–133.
26. Dejmek L. 7-MEOTA. *Drugs Future* 1990, 15, 126–129.
27. 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.* 2008; 9, 332–335.
28. Korabecny J., Musilek K., Holas O., Binder J., Zemek F., Marek J., Pohanka M., Opletalova V., Dohnal V., Kuca K. Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20, 6093–6095.
29. Korabecny J., Musilek K., Holas O., Nepovimova E., Jun D., Zemek F., Opletalova V., Patocka J., Dohnal V., Nachon F., Hroudova J., Fisar Z., Kuca K. Synthesis and in vitro evaluation of N-(bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine as a cholinesterase inhibitor with regard to Alzheimer's disease treatment. *Molecules* 2010; 15, 8804–8812.
30. Korabecny J., Musilek K., Zemek F., Horova A., Holas O., Nepovimova E., Opletalova V., Hroudova J., Fisar Z., Jung Y.-S., Kuca K. Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine – new tacrine derivative with cholinergic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21, 6563–6566.
31. Hroudova J., Fisar Z., Korabecny J., Kuca K. In vitro effects of acetylcholinesterase inhibitors and reactivators on Complex I of electron transport chain. *Neuroendocrinol. Lett.* 2011; 32, 259–263.
32. Defaux J., Sala M., Formosa X., Galdeano C., Taylor M. C., Alobaid W. A., Kelly J. M., Wright C. W., Camps P., Muñoz-Torrero D. Huprines as a new family of dual acting trypanocidal-antiplasmodial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19, 1702–1707.
33. Vanlaer S., Voet A., Gielens C., De Maeyer M., Compernelle F. Bridged 5,6,7,8-tetrahydro-1,6-naphthyridines, analogues of huperzine A: Synthesis, modelling studies and evaluation as inhibitors of acetylcholinesterase. *Eur. J. Org. Chem.* 2009; 643–654.
34. Camps P., Contreras J., Font-Bardia M., Morral J., Muñoz-Torrero D., Solans X. Enantioselective synthesis of tacrine-huperzine A hybrids. Preparative chiral MPLC separation of their racemic mixtures and absolute configuration assignments by X-ray diffraction analysis. *Tetrahedron-Asymmetr.* 1998; 9, 835–849.
35. Ronco C., Jean L., Renard P.-Y. Improved synthetic pathway for the derivatization of huprine scaffold. *Tetrahedron* 2010; 66, 7399–7404.
36. Camps P., El Achab R., Morral J., Muñoz-Torrero D., Badia A., Baños J. E., Vivas N. M., Barril X., Orozco M., Luque F. J. New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): Highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 2000; 43, 4657–4666.
37. Pang Y. P., 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.* 1996; 271, 23646–23649.
38. Rydberg E. H., Brumshtein B., Greenblatt H. M., Wong D. M., Shaya D., Williams L. D., Carlier P. R., Pang Y. P., Silman I., Sussman J. L. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J. Med. Chem.* 2006; 49, 5491–5500.
39. Yu H., Li W. M., Kan K. K., Ho J. M., Carlier P. R., Pang Y. P., Gu Z. M., Zhong Z., Chan K., Wang Y. T., Han Y. F. The physicochemical properties and the in vivo AChE inhibition of two potential anti-Alzheimer agents, bis(12)-hupyridone and bis(7)-tacrine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008; 46, 75–81.
40. Li W., Xue J., Niu C., Fu H., Lam C. S., Luo J., Chan H. H., Xue H., Kan K. K., Lee N. T., Li C., Pang Y., Li M., Tsim K. W., Jiang H., Chen K., Li X., Han Y. Synergistic neuroprotection by bis(7)-tacrine via concurrent blockade of N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase. *Mol. Pharmacol.* 2007; 71, 1258–1267.
41. Li C., Carlier P. R., Ren H., Kan K. K., Hui K., Wang H., Li W., Li Z., Xiong K., Clement E. C., Xue H., Liu X., Li M., Pang Y., Han Y. Alkylene tether-length dependent gamma aminobutyric acid type A receptor competitive antagonism by tacrine dimers. *Neuropharmacology* 2007; 52, 436–443.
42. Zhou L., Liu Y. W., Peoples R. W., Yang M., Tian X., Ai Y. X., Pang Y. P., Li Z. W., Han Y. F., Li C. Y. Mechanism of bis(7)-tacrine inhibition of GABA: activated current in cultured rat hippocampal neurons. *Neuropharmacology* 2009; 57, 33–40.
43. Korabecny J., Holas O., Musilek K., Pohanka M., Opletalova V., Dohnal V., Kuca K. Synthesis and in vitro evaluation of new tacrine derivatives-bis-alkylene linked 7-MEOTA. *Lett. Org. Chem.* 2010; 7, 327–331.
44. Wlodek S. T., Antosiewicz J., McCammon J. A., Straatsma T. P., Gilson M. K., Briggs J. M., Humblet C., Sussman J. L. Binding of tacrine and 6-chlorotacrine by acetylcholinesterase. *Biopolymers* 1996; 38, 109–117.
45. Rosini M., Simoni E., Bartolini M., Cavalli A., Ceccarini L., Pascu N., McClymont D. W., Tarozzi A., Bolognesi M. L., Minarini A., Tumiatti V., Andrisano V., Mellor I. R., Melchiorre C. Inhibition of acetylcholinesterase, beta-amyloid aggregation, and NMDA receptors in Alzheimer's disease: a promising direction for the multi-target-directed ligands gold rush. *J. Med. Chem.* 2008; 51, 4381–4384.
46. Alonso D., Dorronsoro I., Rubio L., Muñoz P., Garcia-Palomeiro E., Del Monte M., Bidon-Chanal A., Orozco M., Luque F. J., Castro A., Medina M., Martínez A. Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. *Bioorg. Med. Chem.* 2005; 13, 6588–6597.
47. Muñoz-Torrero D., Camps P. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Med. Chem.* 2006; 13, 399–422.
48. Carlier P. R., Du D. M., Han Y., Liu J., Pang Y. P. Potent, easily synthesized huperzine A-tacrine hybrid acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999; 9, 2335–2338.
49. Musial A., Bajda M., Malawska B. Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14, 2654–2679.
50. Decker M. Recent advances in the development of hybrid molecules/designed multiple compounds with anti-amnesic properties. *Mini Rev. Med. Chem.* 2007; 7, 221–229.

51. Li W. M., Kan K. K., Carlier P. R., Pang Y. P., Han Y. F. East meets West in the search for Alzheimer's therapeutics - novel dimeric inhibitors from tacrine and huperzine A. *Curr. Alzheimer Res.* 2007; 4, 386–396.
52. Jiang H., Luo X., Bai D. Progress in clinical, pharmacological, chemical and structural biological studies of huperzine A: a drug of traditional Chinese medicine origin for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10, 2231–2252.
53. Fang L., Kraus B., Lehmann J., Heilmann J., Zhang Y., Decker M. Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multipotent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008; 18, 2905–2909.
54. Heilmann J., Calis I., Kirmizibekmez H., Schuhly W., Harput S., Sticher O. Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationships. *Planta Med.* 2000; 66, 746–748.
55. Yan J. J., Cho J. Y., Kim H. S., Kim K. L., Jung J. S., Huh S. O., Suh H. W., Kim Y. H., Song D. K. Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 133, 89–96.
56. Davalos A., Gomez-Cordoves C., Bartolome B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52, 48–54.
57. Pi R., Mao X., Chao X., Cheng Z., Liu M., Duan X., Ye M., Chen X., Mei Z., Liu P., Li W., Han Y. Tacrine-6-ferulic acid, a novel multifunctional dimer, inhibits amyloid- β -mediated Alzheimer's disease-associated pathogenesis in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2012; 7, Epub.
58. Fernández-Bachiller M. I., Pérez C., Campillo N. E., Páez J. A., González-Muñoz G. C., Usán P., García-Palomero E., López M. G., Villarroya M., García A. G., Martínez A., Rodríguez-Franco M. I. Tacrine-melatonin hybrids as multifunctional agents for Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. *ChemMedChem.* 2009; 4, 828–841.
59. Nunomura R. J., Castellani X., Zhu P. I., Moreira G., Perry M. A., Smith J. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006; 65, 631–641.
60. Reiter R. J., Tan D.-X., Manchester L. C., Terron M. P., Flores L. J., Koppisepi S. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv. Med. Sci.* 2007; 52, 11–28.
61. Masilamoni J. G., Jesudason E. P., Dhandayuthapani S., Ashok B. S., Vignesh S., Jebaraj W. C., Paul S. F., Jayakumar R. The neuroprotective role of melatonin against amyloid beta peptide injected mice. *Free Radical. Res.* 2008; 42, 661–673.
62. Rodríguez-Franco M. I., Fernández-Bachiller M. I., Pérez C., Hernández-Ledesma B., Bartolomé B. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J. Med. Chem.* 2006; 49, 459–462.
63. Lysko P. G., Lysko K. A., Webb C. L., Feuerstein G., Mason P. E., Walter M. F., Mason R. P. Neuroprotective activities of carvedilol and a hydroxylated derivative: role of membrane biophysical interactions. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56, 1645–1656.
64. Rosini M., Simoni E., Bartolini M., Cavalli A., Ceccarini L., Pascu N., McClymont D. W., Tarozzi A., Bolognesi M. L., Minarini A., Tumiatti V., Andrisano V., Mellor I. R., Melchiorre C. Inhibition of acetylcholinesterase, beta-amyloid aggregation, and NMDA receptors in Alzheimer's disease: a promising direction for the multi-target-directed ligands gold rush. *J. Med. Chem.* 2008; 51, 4381–4384.
65. Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2007; 11, 207–218.
66. Fang L., Appenroth D., Decker M., Kiehltopf M., Lupp A., Peng S., Fleck C., Zhang Y., Lehmann J. NO-donating tacrine hybrid compounds improve scopolamine-induced cognition impairment and show less hepatotoxicity. *J. Med. Chem.* 2008; 51, 7666–7669.
67. Elsinghorst P. W., Cieslik J. S., Mohr K., Tränkle C., Gütschow M. First gallamine-tacrine hybrid: design and characterization at cholinesterases and the M2 muscarinic receptor. *J. Med. Chem.* 2007; 50, 5685–5695.
68. Camps P., Formosa X., Galdeano C., Gómez T., Muñoz-Torrero D., Scarpellini M., Viayna E., Badia A., Clos M. V., Camins A., Pallàs M., Bartolini M., Mancini F., Andrisano V., Estelrich J., Lizondo M., Bidon-Chanal A., Luque F. J. Novel donepezil-based inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation. *J. Med. Chem.* 2008; 51, 3588–3598.
69. Camps P., Formosa X., Galdeano C., Muñoz-Torrero D., Ramírez L., Gómez E., Isambert N., Lavilla R., Badia A., Clos M. V., Bartolini M., Mancini F., Andrisano V., Arce M. P., Rodríguez-Franco M. I., Huertas O., Dafni T., Luque F. J. Pyrano[3,2-c]quinoline-6-chlorotacrine hybrids as a novel family of acetylcholinesterase- and beta-amyloid-directed anti-Alzheimer compounds. *J. Med. Chem.* 2009; 52, 5365–5379.
70. Morris M. C., Schneider J. A., Tangney C. C. Thoughts on B-vitamins and dementia. *J. Alzheimers Dis.* 2006; 9, 429–433.
71. Morris M. C., Evans D. A., Bienias J. L., Scherr P. A., Tangney C. C., Hebert L. E., Bennett D. A., Wilson R. S., Aggarwal N. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2004; 75, 1093–1099.
72. Szymański P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E. Synthesis and biological activity of derivatives of tetrahydroacridine as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Chem.* 2011; 39, 138–142.
73. Galdeano C., Viayna E., Sola I., Formosa X., Camps P., Badia A., Clos M. V., Relat J., Ratia M., Bartolini M., Mancini F., Andrisano V., Salmona M., Minguillón C., González-Muñoz G. C., Rodríguez-Franco M. I., Bidon-Chanal A., Luque F. J., Muñoz-Torrero D. Huprine-tacrine heterodimers as anti-amyloidogenic compounds of potential interest against Alzheimer's and prion diseases. *J. Med. Chem.* 2012; 55, 661–669.
74. Hamulakova S., Janovec L., Hrabínova M., Kristian P., Kuca K., Banasova M., Imrich J. Synthesis, design and biological evaluation of novel highly potent tacrine congeners for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 2012; 55, 23–31.