

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

PŘÍRODNÍ LÁTKY A JEJICH β -SEKRETASOVÁ INHIBIČNÍ AKTIVITA

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Vedoucí katedry: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2015

Kateřina Kočová

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY

DIPLOMA THESIS

NATURAL PRODUCTS AND THEIR β -SECRETASE INHIBITORY ACTIVITY

Supervisor: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Head of Department: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2015

Kateřina Kočová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat PharmDr. Jakobovi Chlebkovi, PhD. za vedení mé diplomové práce, za jeho odborné rady a cenné připomínky.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové

jméno, příjmení

Obsah

Seznam použitých zkratk a vysvětlivek

Přehled obrázků, tabulek a grafů

1. Úvod	1
2. Alzheimerova choroba	3
2.1. Definice a symptomatologie	3
2.2. Rizikové faktory	3
2.3. Etiopatogeneze Alzheimerovy choroby	4
2.3.1. Tvorba a agregace A β	4
2.3.1.1. Štěpení amyloidového prekurzorového proteinu.....	4
2.3.1.2. γ -Sekretasa	5
2.3.1.3. Klasifikace strukturních jednotek a seskupení A β	7
2.3.2. Deficit acetylcholinu	8
2.3.3. Reaktivní sloučeniny kyslíku a zánět	9
2.3.4. Intracelulární agregace hyperfosforylovaných τ -proteinů.....	9
2.4. Současné a klinicky zkoušené přístupy léčby Alzheimerovy choroby	10
2.4.1. Inhibitory cholinesteras	10
2.4.2. Antagonisté NMDA receptorů.....	11
2.4.3. Vakcinace a imunizace.....	11
2.4.4. Blokátory oligomerace solubilního A β	11
2.4.5. Modulátory γ -sekretasy.....	12
2.4.6. Statiny.....	12
2.4.7. Agonisté jádrového transkripčního faktoru PPAR γ	12
2.4.8. Sloučeniny MPACs	12
2.4.9. Agonisté M1 muskarinových receptorů	13

2.4.10. Antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace (rAGEs)	13
2.4.11. Agonisté nikotinových receptorů	13
2.4.12. Další možné farmakoterapeutické přístupy	13
3. β-Sekretasa	15
3.1. Fyziologické funkce a substráty BACE 1	16
3.2. Vlastní katalytický mechanismus BACE 1	17
3.3. β -sekretasa 2	19
4. Inhibice β-sekretasy	20
4.1. Metody testování inhibice a aktivity BACE 1 <i>in vitro</i>	20
4.1.1. Fluorescenční metody	20
4.1.2. Spektrofotometrické metody	23
4.1.3. Metoda využívající HPLC s imobilizovaným enzymem	23
4.1.4. Doplnkové metody	24
4.2. Výzkum syntetických inhibitorů BACE 1	24
4.3. <i>In silico</i> vývoj inhibitorů	26
5. Inhibitory BACE 1 přírodního původu	27
5.1. Primární metabolity	27
5.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
5.2. Sekundární metabolity	27
5.2.1. Fenolické látky	27
5.2.1.1. Katechiny a jejich estery	27
5.2.1.1.1. <i>Camellia sinensis</i>	27
5.2.1.2. Hydroxyaromatické kyseliny	30
5.2.1.2.1. <i>Cornus officinalis</i>	30

5.2.1.2.2. <i>Homalomena occulta</i>	31
5.2.1.2.3. <i>Sanguisorba sp.</i>	32
5.2.1.2.4. <i>Punica granatum</i>	33
5.2.1.2.5. <i>Perilla frutescens var. acuta</i>	33
5.2.1.3. Rotenoidy	33
5.2.1.3.1. <i>Abronia nana</i>	33
5.2.1.4. Florotaniny	34
5.2.1.4.1. <i>Eisenia bicyclis</i>	34
5.2.1.4.2. <i>Ecklonia cava</i>	35
5.2.1.5. Lignany	36
5.2.1.5.1. <i>Magnolia officinalis</i>	36
5.2.1.6. Kumariny (furanokumariny)	37
5.2.1.6.1. <i>Angelica dahurica</i>	37
5.2.1.7. Stilbeny	38
5.2.1.7.1. <i>Smilax china</i>	38
5.2.1.7.2. <i>Vitis thunbergii var. taiwaniana</i>	38
5.2.1.7.3. <i>Vitis vinifera</i>	39
5.2.1.7.4. <i>Paeonia lactiflora</i>	39
5.2.1.8. Ellagitaniny	39
5.2.1.8.1. <i>Geranium thunbergii</i>	39
5.2.1.9. Styrylpyrony	40
5.2.1.9.1. <i>Phellinus linteus</i>	40
5.2.1.9.2. <i>Auricularia polytricha</i>	40
5.2.1.10. Diarylheptanoidy	40
5.2.1.10.1. <i>Curcuma longa</i>	40
5.2.2. Flavonoidy	41
5.2.2.1. Flavony	41
5.2.2.1.1. <i>Nelumbo nucifera</i>	41
5.2.2.1.2. <i>Morus lhou</i>	42
5.2.2.1.3. Luteolin	43
5.2.2.1.4. Myricetin	45
5.2.2.2. Flavanony	46

5.2.2.2.1. <i>Balanophora involucrata</i>	46
5.2.2.2.2. <i>Sophora flavescens</i>	46
5.2.2.2.3. <i>Psoralea corylifolia</i>	47
5.2.2.3. Chalkony a dihydrochalkony	48
5.2.2.3.1. <i>Balanophora involucrata</i>	48
5.2.2.3.2. <i>Sophora flavescens</i>	48
5.2.2.3.3. <i>Psoralea corylifolia</i>	48
5.2.2.3.4. <i>Glycyrrhiza glabra</i>	48
5.2.2.4. Flavonoly	49
5.2.2.4.1. <i>Sophora flavescens</i>	49
5.2.2.4.2. <i>Petasites japonicus</i>	50
5.2.2.5. Isoflavony	50
5.2.2.5.1. <i>Ficus benamina</i>	50
5.2.2.5.2. <i>Psoralea corylifolia</i>	50
5.2.2.6. Flavonoidní dimery amentoflavonového typu	51
5.2.3. Kumarano-chroman-4-ony	52
5.2.3.1. <i>Ficus benamina</i>	52
5.2.4. Chromony	52
5.2.4.1. <i>Aloe vera</i> a <i>Aloe nobilis</i>	52
5.2.5. Terpeny	52
5.2.5.1. Monoterpeny	52
5.2.5.1.1. <i>Lavandula luisieri</i>	52
5.2.5.2. Seskviterpeny	53
5.2.5.2.1. <i>Murraya koenigii</i>	53
5.2.5.2.2. <i>Cornus officinalis</i>	53
5.2.5.3. Diterpeny	54
5.2.5.3.1. <i>Aralia cordata</i>	54
5.2.5.4. Triterpeny	55
5.2.5.4.1. <i>Cornus officinalis</i>	55
5.2.5.4.2. <i>Panax notoginseng</i>	55
5.2.5.4.3. <i>Polygala tenuifolia</i>	57
5.2.5.4.4. <i>Daedalea sp.</i>	57

5.2.5.5. Meroterpeny	57
5.2.5.5.1. <i>Psoralea corylifolia</i>	57
5.2.6. Alkaloidy	58
5.2.6.1. Karbazolové alkaloidy	58
5.2.6.1.1. <i>Murraya koenigii</i>	58
5.2.6.1.2. <i>Ianthella sp.</i>	59
5.2.6.2. Isochinolinové alkaloidy	59
5.2.6.2.1. <i>Nelumbo nucifera</i>	59
5.2.6.2.2. <i>Coptis chinensis</i>	60
5.2.6.3. Pyridinové.....	61
5.2.6.3.1. <i>Piper nigrum</i>	61
5.3. Neidentifikované sloučeniny	61
5.3.1. <i>Cytospora rhizophorae</i>	61
5.4. Souhrnný přehled přírodních látek s betasekretasovou inhibiční aktivitou	62
6. Závěr	69
7. Použitá literatura.....	72
Abstrakt	82
Abstract.....	83

Seznam použitých zkratk a vysvětlivek

A β	β -amyloid
β -APP	β -amyloidový prekurzorový protein
AD	Alzheimerova choroba
ADAM10	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ADDL	A β -derived diffuse ligands
AGEs	konečné produkty glykace
ACH	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
APH-1	anterior pharynx-defective 1
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
BACE 1	β -sekretasa 1 (beta-site APP cleaving enzyme 1)
BACE 2	β -sekretasa 2
BChE	butyrylcholinesterasa
BD	biologická dostupnost
CNS	centrální nervová soustava
EGKG	epigallokatechin-gallát
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GSK-3 β	glykogen synthasa kinasa-3 β
HEB	hematoencefalická bariéra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
hrBACE 1-IMER	human recombinant BACE 1-immobilized enzyme reactor
LDH	laktátdehydrogenasa
LDL	low density lipoprotein
MPCAs	metal-protein attenuating compounds
MYR	myricetin

NADPH-oxidasa	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát-oxidasa
NMDA	<i>N</i> -methyl D-aspartát
NSAID	nesteroidní protizánětlivá léčiva
NÚ	nežádoucí účinek
PEN-2	presenilin enhancer 2
PM	plazmatická membrána
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RF	rizikový faktor
ROS	reaktivní kyslíkové sloučeniny
SOD	superoxid-dismutasa
SPR	technologie plasmonové povrchové rezonance
TČM	tradiční čínská medicína
THCH	2,2',4'-trihydroxychalkon
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TRF-Q	time-resolved fluorescence quenching

Přehled obrázků, tabulek a grafů

Obr. 1: Schéma štěpení APP.	5
Obr. 2: Schéma uložení BACE 1.	15
Obr. 3: Katalytický mechanismus BACE 1.	18
Obr. 4: LY2811376.	25
Obr. 5: (-)-Epigallokatechin-gallát.....	28
Obr. 6: <i>Corni fructus</i> [68].	30
Obr. 7: Kyselina <i>p</i> -kumarová (1) a kyselina gallová (2).	31
Obr. 8: 2-[(<i>Z</i>)-heptadec-11-enyl]-6-hydroxybenzoová kyselina (1), 2-[(6 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-heptadeka-6,9,12-trienyl]-6-hydroxybenzoová kyselina (2), 2-[(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-heptadeka-9,12-dienyl]-6-hydroxybenzoová kyselina (3) a 2-hydroxy-6-(12-fenyldodecyl)benzoová kyselina (4)	32
Obr. 9: Boeravinon D.	34
Obr. 10: Diekol.....	35
Obr. 11: 4- <i>O</i> -methylhonokiol.	36
Obr. 12: Isoimperatorin (1), imperatorin (2) a (+)-oxypeucedanin (3).	37
Obr. 13: Resveratrol.	38
Obr. 14: Korilagin.....	39
Obr. 15: Hispidin.....	40
Obr. 16: Kurkumin.	41
Obr. 17: Kuwanon C (1) a kuwanon A (2).	43
Obr. 18: Luteolin.....	44
Obr. 19: Myricetin.	45
Obr. 20 <i>Sophora flavescens</i> [102].	47
Obr. 21: Kushenol A.....	47
Obr. 22: 2,2',4'-trihydroxychalkon.....	49
Obr. 23: Kushenol C.....	50
Obr. 24: Neokorylin.	50
Obr. 25 <i>Lavandula luisieri</i> [111].	53
Obr. 26: Loganin.	54
Obr. 27: 7-oxo-pimara-8(14),15-dien-19-ová kyselina.....	54

Obr. 28: Ginsenosid Rg1.	56
Obr. 29: Bakuchiol.	57
Obr. 30: Mahanimbin.	58
Obr. 31: <i>Murraya koenigii</i> [121].	58
Obr. 32: Neferin.	59
Obr. 33: Groenlandicin (1) a epiberberin (2).	60
Obr. 34: Piperin.	61
Tab. 1: Porovnání strukturních typů A β	8
Tab. 2: Souhrnný přehled přírodních sloučenin s BACE 1 inhibiční aktivitou vyjádřenou v IC ₅₀ [μ M].	68
Graf 1: Znázornění inhibičních aktivit kyseliny <i>p</i> -kumarové, gallové a ursolové v porovnání s resveratrolem..	55

1. Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, které se klinicky projevuje syndromem demence. Tuto nemoc poprvé popsal v roce 1907 německý lékař Alois Alzheimer. V současnosti je AD považována za nejčastější příčinu všech demencí a také za pátou nejčastější příčinu smrti. Její prevalence neustále vzrůstá. V roce 2010 onemocněním trpělo odhadem 36 mil. lidí po celém světě a předpokládá se, že populace s AD v roce 2030 vzroste na 66 mil. a v roce 2050 na 115 mil. Vysoký vzrůst souvisí s celosvětovým stárnutím populace. Spolu se současnými statistikami a budoucími odhady se toto onemocnění stává významným zdravotnickým a socioekonomickým problémem. AD je břemenem devastujícím kvalitu života nejenom samotným nositelům, ale také jejich blízkým [1; 2].

Kompletní etiopatogeneze vzniku AD zatím nebyla úplně objasněna. Jednou z hypotéz je, že klíčovou roli při vzniku AD hraje amyloid β ($A\beta$). Další vývoj a sekundární důsledky, provázející tvorbu a ukládání $A\beta$, včetně hyperfosforylace τ -proteinů, deficitu acetylcholinu (ACH), zánětu, tvorby neurofibrilárních klubek a reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS), přispívají k manifestaci a progresi onemocnění [3].

AD zatím nelze léčit kauzálně, tudíž je nemocí nevléčitelnou. Současnou symptomatickou terapií lze pouze dosáhnout oddálení těžkých stádií a zmírnění příznaků. Založeny na důkazech jsou z kognitivní terapie zatím pouze dva přístupy, a sice terapie inhibitory cholinesteras a inhibitory *N*-methyl *D*-aspartátových (NMDA) receptorů. Dále existuje celá škála dalších terapeutických přístupů, jejichž zapojení do nynějšího úzkého výběru léčiv vyžaduje podrobnější a rozsáhlejší klinické studie [2].

Nejdůležitější v patogenezi AD se zdá být amyloidová teorie. V mozku pacientů s AD velmi často nalézáme patologické senilní plaky tvořené $A\beta$. Předmětem výzkumů se proto stala celá řada protiamyloidových terapeutických postupů. Jedním z nich je pátrání po inhibitech enzymu β -sekretasy 1 (BACE 1 - beta-site APP cleaving enzyme 1). BACE 1 spolu s γ -sekretasou postupně štěpí transmembránový amyloidového prekurzorového proteinu (APP) a dávají tím vznik toxickému $A\beta$ ($A\beta_{40}$ a $A\beta_{42}$). Výzkum

se soustředí na vývoj syntetických inhibitorů i na jejich hledání v přírodních zdrojích. Zkoušení syntetických inhibitorů BACE 1 se potýká s mnoha překážkami, jako neschopnost prostupu hematoencefalickou bariérou (HEB) a plazmatickými membránami (PM), nízkou biologickou dostupností (BD) či závažnými nežádoucími účinky (NÚ). Z těchto důvodů se přistoupilo ke screeningu léčivých rostlin, jakožto zdroji mnoha biologicky aktivních látek [1; 2; 4].

Screening biologicky aktivních látek rostlin je nedílnou součástí výzkumu nových terapeutických možností AD. Tato rešeršní diplomová práce, vypracovaná na základě informací publikovaných v odborných článcích, má za cíl informovat, zhodnotit a podat ucelený přehled doposud prozkoumaných přírodních látek s inhibiční aktivitou vůči BACE 1, popsat fyziologické funkce BACE 1 v organismu a jeho mechanismus přičinění k patofyziologii AD a uvést přehled jednotlivých metod detekce inhibice BACE 1 (zejména fluorescenční metodu) společně se zhodnocením jejich výhod a nevýhod.

2. Alzheimerova choroba

2.1. Definice a symptomatologie

AD je chronické, progresivní, neurodegenerativní onemocnění populace středního a hlavně vyššího věku. Při AD dochází k narušení vyšších korových funkcí – paměti, orientace, myšlení, schopnosti učení a řeči. AD je zodpovědná za 60 % všech demencí. Nemoc začíná nenápadně a plíživě a postupně činí nemocného zcela závislým na svém okolí. V počátečním stádiu se nejdříve u nemocného začíná zhoršovat krátkodobá paměť a je porušena schopnost učení se novým informacím. Pacient je v této fázi soběstačný. Ve druhé fázi pacienti už nezvládají běžné denní úkony, mají problémy s řečí a jsou dezorientovaní časově i místně. Jsou málo soběstační a paměť je již chorobou značně postižena. V konečném stádiu je pacient nesoběstačný, nepoznává blízké osoby a objevuje se úplná ztráta paměti. Nemocní umírají na interkurentní infekce nebo na následky úrazů. AD všeobecně provází změny osobnosti, chování, úsudku a poruchy emocí. Progrese onemocnění je značně individuální. Délka choroby od objevení prvních příznaků až k úmrtí je 7-15 let [5; 6].

Symptomatologii můžeme rozdělit na poruchy kognitivní a nekognitivní. Kognitivní poruchy souvisí hlavně s poškozením vyšších korových funkcí. Nekognitivními poruchami se míní hlavně symptomy behaviorálního a psychologického rázu jako agrese, apatie, halucinace, bludy, deprese či anxieta [5].

V současnosti je AD nemocí nevléčitelnou. V terapii se uplatňují farmakologické i nefarmakologické přístupy. Současně dostupné léky mohou průběh nemoci pouze zpomalit či pozastavit. Výzkum v oblasti hledání nových terapeutických přístupů léčby je na rapidním vzestupu a je zacílen na klinické, buněčně-molekulární, genetické a další terapeutické přístupy. Skutečná příčina onemocnění nebyla zatím s jistotou identifikována. Hlavním rizikovým faktorem (RF) je však zcela zřejmě věk [1; 5].

2.2. Rizikové faktory

RF pro vznik AD je především věk. Riziko propuknutí onemocnění s věkem stoupá exponenciálně. Onemocnění může propuknout i u starších lidí, u kterých

nenalézáme typické rizikové faktory pro vaskulární příhody, kteří zároveň nemají genetickou predispozici nebo neutrpěli žádný cerebrální úraz. U této skupiny pacientů je právě proces stárnutí převládajícím faktorem pro patogenezi AD. Stárnoucí mozek prodělává řadu patofyziologických procesů. V důsledku ztráty integrity venul a arteriol je snížen metabolismus glukózy a krevní průtok mozkiem. Patofyziologické změny vyvolané stárnutím se mohou podílet či být dokonce iniciátorem patogeneze AD [1].

Dalším významným RF je přítomnost genu pro apolipoprotein E4, který zvyšuje riziko onemocnění u heterozygotů čtyřnásobně a homozygotů dvanáctinásobně [1].

Studie prokázaly také souvislost mezi AD a cerebrovaskulárním onemocněním, které podle všeho urychluje produkci, agregaci a ukládání A β a tím přispívá k symptomatologii a patologii AD. RF pro AD jsou tedy velmi podobné těm pro vznik cerebrovaskulárního onemocnění. Jedná se zejména o arteriální hypertenzi, hypercholesterolémii, hyperhomocysteinémii, aterosklerózu, obezitu, kouření či fibrilaci síní. Mezi jiné faktory přispívající ke vzniku AD patří ženské pohlaví, nízké vzdělání, Downův syndrom či alkoholismus [1; 7].

2.3. Etiopatogeneze Alzheimerovy choroby

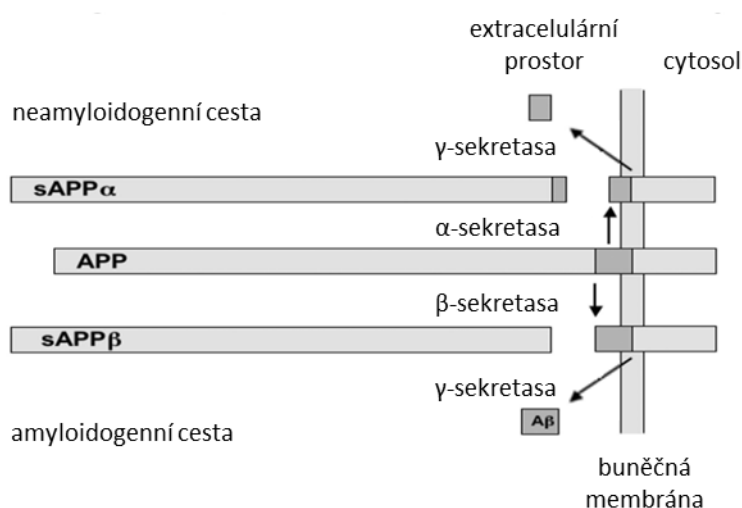
2.3.1. Tvorba a agregace A β

Významnou roli v patogenezi AD hraje ukládání A β v mozku. A β je běžným metabolitem, vytvářeným většinou buněčných typů, ačkoliv neurony v mozku jsou hlavním producentem. A β je peptid sestávající se z 39-43 aminokyselin. Na akumulaci se nejvíce podílí jeho izoformy A β 1-40 a A β 1-42, přičemž A β 1-40 se ukládá perivaskulárně kolem cerebrálních artérií a způsobuje angiopatii a A β 1-42 je součástí senilních plaků, které jsou uloženy extraneuronálně, v parenchymu mozku. Plaky jsou typickým histopatologickým nálezem u AD [1].

2.3.1.1. Štěpení amyloidového prekurzorového proteinu

A β vzniká postupnou proteolýzou z APP, což je transmembránový glykoprotein, který je exprimován v mnoha tkáních a nachází se hlavně na synapsích neuronů. Jeho hlavní funkce není známa, ale podílí se na regulaci tvorby synapsí a transportu železa. Existují dvě cesty štěpení APP [1; 8].

První variantou je štěpení BACE 1 a následně γ -sekretasou (Obr. 1). Štěpením BACE 1 se uvolní extracelulární, rozpustný fragment sAPP β a C-terminální membránově vázaný peptid C99. γ -sekretasa štěpí fragment C99 uvnitř jeho transmembránové domény a posléze uvolní intracelulární doménu APP a polypeptidy A β -40 a A β -42. Tyto peptidy jsou v oligomerních formách toxické a mají tendenci vytvářet fibrily, shlukovat se, nakonec vytvářet plaky či se podílet na cerebrální amyloidní angiopatii. Vzniklý A β je následně uvolňován exocytózou a je vylučován do intersticiální tekutiny [9].



Obr. 1: Schéma štěpení APP. Upraveno podle [1].

Druhou možností je štěpení α -sekretasou a posléze γ -sekretasou (Obr. 1). α -Sekretasa štěpí APP blíže k buněčné membráně. Vytváří rozpustnou ektodoménu sAPP α a membránově vázaný C83 fragment, ten je záhy štěpen γ -sekretasou a vznikají tak kratší fragmenty, které nevytváří A β , působí neuroprotektivně a podílí se na neuroplasticitě. Tato cesta štěpení nevede tedy k vytvoření ložisek A β , nazývá se neamyloidogenní [1; 9].

2.3.1.2. γ -Sekretasa

Enzym γ -sekretasa patří do rodiny transmembránových aspartátových proteas, jedná se o komplexní strukturu, skládající se z více podjednotek. Komplex γ -sekretasy nebyl doposud zcela popsán, skládá se však minimálně ze 4 samostatných proteinů – presenilinu, nikastrinu, APH-1 (anterior pharynx-defective 1) a PEN-2 (presenilin

enhancer 2). Poslední poznatky nasvědčují, že pátý protein CD147 by mohl hrát roli v regulaci aktivity komplexu. Jeho absence totiž zvyšuje aktivitu komplexu. Presenilin je katalytickou podjednotkou γ -sekretasy a patří do skupiny aspartátových proteas. Bylo prokázáno, že mutace v genu pro presenilin, je RF pro vznik AD. V genomu byly zjištěny dvě formy genu pro presenilin a dvě formy pro APH-1. U jednoho z homologů APH-1 mohou alternativním sestřihem vzniknout dvě izoformy. Komplex γ -sekretasy tak nabývá minimálně šesti různých forem, které mohou být tkáňově nebo buněčně specifickými. Primární úlohou nikastrinu je stabilizace komplexu [10; 11].

γ -Sekretasa je schopna štěpit APP na více místech a generovat peptidy o 39-42 aminokyselinách. Mutace genů pro APP nebo presenilin jsou spojeny s vyšší produkcí A β -42 a stojí za výskytem časně familiární formy AD. Některé důkazy nasvědčují tomu, že různé formy γ -sekretasy jsou zodpovědné za tvorbu různých izoform A β . γ -Sekretasa je také velmi důležitá ve zpracování Notch proteinů. Notch proteiny jsou rodinou transmembránových proteinů, účastní se laterální inhibice (schopnost neuronu snížit aktivitu sousedních neuronů, tímto způsobem je znemožněno šíření akčních potenciálů) v embryogenezi. Dalším substrátem γ -sekretasy jsou integrální membránové proteiny, z nichž některé jsou rozhodující pro normální buněčné funkce [10; 11].

Bylo syntetizováno několik silných inhibitorů γ -sekretasy. Preklinické studie prokázaly jejich účinek na snížení koncentrace A β . V roce 2001 proběhlo první testování inhibitoru *in vivo*, jednalo se o dipeptidickou sloučeninu DAPT. Od té doby vstoupilo do klinického zkoušení minimálně šest dalších sloučenin. Z farmakodynamického hlediska byl nejlépe prozkoumán semagacestat. Tato látka účinně snižovala hladinu A β v plazmě, mozkomíšním moku a v mozku, avšak jako nové potenciální léčivo neuspěla. Výzkum semagacestatu byl ve třetí fázi klinického zkoušení přerušeno, jelikož průkazně nezpomaloval progresi onemocnění. Navíc, byla ve skupině léčené semagacestatem zjištěna významně vyšší incidence rakoviny kůže, než ve skupině užívající placebo [10; 12].

Inhibitory γ -sekretasy mohou způsobit atrofii brzlíku, hyperplazii střevních buněk nebo poruchy funkce imunitního systému. Tyto NÚ se vyskytují v důsledku

inhibice zpracování Notch proteinů. Byly syntetizovány i inhibitory, které do zpracování Notch proteinů nezasahují a jsou nadále předmětem výzkumů [10].

2.3.1.3. Klasifikace strukturních jednotek a seskupení A β

Peptid A β -42 je považován za více patogenní a toxický než A β -40. Za agregaci a neurotoxicitu A β -42 jsou zodpovědné jeho intermolekulární paralelní struktura β -skládaného listu a β -otočka. N- a C-konce tvoří intramolekulární struktury β -skládaného listu, které stabilizují každou molekulu. Naproti tomu A β -40 není intramolekulárními β -skládanými listy stabilizován. A β -42 je proto více náchylný k akumulaci a vytváření fibril. Zato A β -40 je méně fibrilogenní a více rozpustný. Poměr A β -40 ku A β -42 pravděpodobně přispívá k variabilitě vývoji onemocnění. Menší tendence vytváření plaků je tedy při vyšší hodnotě poměru [1].

Uspořádání A β se klasifikuje do dvou podskupin: amorfní a fibrilární. Fibrilární forma je oproti amorfní ve vyšší koncentraci. Amorfní forma vytváří difúzní plaky, které jsou pozorovány při normálním stárnutí mozku. Zato fibrilární uspořádání je hlavní komponentou neuritických plaků zodpovědných za neurotoxicitu a neurodegeneraci, která je provázána odumíráním neuronů a sterilním zánětem. Neuritické plaky jsou také, avšak v daleko menší míře, nacházeny u zdravého stárnoucího mozku [1; 13; 14].

Jinou klasifikací je rozdělení A β na rozpustný a nerozpustný. Rozpustný je tvořen amorfní formou a nerozpustný fibrilární. *In vivo* se rozpustný A β nachází v krevní plasmě, mozkomíšním moku a v intra- a extracelulárních prostorech. Nerozpustný A β je převážně v extracelulárním prostoru v mozku. Hladiny rozpustné i nerozpustné formy A β jsou při AD zvýšené, korelace mezi hladinou rozpustného A β a mírou kognitivního poškození je větší. Avšak korelace mezi množstvím senilních plaků a stupněm poškození kognitivních funkcí je nižší. Tyto zjištění naznačují, že rozpustný A β může iniciovat neurodegeneraci a také, že senilní plaky nemusí být primární patofyziologií [1; 15].

Studie prokázaly několik velikostních typů A β útvarů (Tab. 1). Základní protein pro všechny útvary je monomerní A β . Nízkomolekulární A β je nejmenší jednotkou plaku. Ostatní molekuly vznikající agregací, se nazývají oligomerní A β , ADDL (A β -derived diffuse ligands – od A β odvozené difúzní ligandy), protofibrily a fibrily.

V systému shluků je mezi monomery a protofibrilami udržována rovnováha, ale finální vývoj z protofibrily na fibrily je irreverzibilní. Shluky A β mají tendenci se zvětšovat. Pokud nastanou vhodné podmínky, jako jsou optimální pH, teplota, koncentrace elektrolytů, dostatečný počet jednotek A β a inkubační doba, agregáty se zvětšují a stávají se obtížně rozpustitelnými. [16; 17].

	Struktura	průměr	neurotoxicita	barvitelnost kongo červení
monomerní Aβ		0,1-0,2	-	-
nízkomolekulární Aβ	monomery – dimery	0,6-	+	-
ADDL	trimery - 24mery	50	+	+
oligomerní Aβ			+	+
protofibrily		60-80	+	+
protofilamenta		25-30	+	+
fibrily	5-6 protofilament	70-120	+	+

Tab. 1: Porovnání strukturních typů A β . ADDL – od A β odvozené difuzní ligandy. Upraveno podle [1].

Monomerní jednotky a dimery jsou převážně v konformaci α -helixu. V přechodu na oligomery se konformace mění na β -skládaný list, v této konformaci jsou rovněž protofibrily a fibrily. Konformaci β -skládaného listu lze specificky detekovat kongo červení nebo thioflavinem T [1].

Neurotoxické jsou především větší agregáty, ale také nízkomolekulární A β . Neurotoxicita amyloidních agregací a jejich konečných struktur – fibril, vede v konečném důsledku ke ztrátě synaptických spojení a nakonec ke zničení celého neuronu. Jsou postiženy aferentní i eferentní dráhy hipokampu. Míra poškození dobře koreluje se zhoršováním paměti a s jinými kognitivními a neuropsychiatrickými funkcemi [1].

2.3.2. Deficit acetylcholinu

Jedním z dalších aspektů etiopatogeneze je deficit ACH. V mozku pacientů s AD jsou postiženy všechny oddíly cholinergního systému. Mimo snížené hladiny ACH, se

zde nachází také deficit cholinacetyltransferasy (enzymu, který se podílí na syntéze ACH) a porucha funkce enzymu acetylcholinesterasy, který ACH degraduje. Defektní cholinergní transmise zčásti stojí za kognitivními poruchami [18].

2.3.3. Reaktivní sloučeniny kyslíku a zánět

Při stárnoucím procesu, ale také jako důsledek ischemie, jsou uvolňovány ROS. Ty se postupně ukládají v mozku a ničí buněčné složky, jako lipidy, proteiny a DNA. U pacientů s AD bylo v leukocytech nalezeno vyšší množství oxidovaných párů bazí DNA. NADPH oxidasa (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát-oxidasa) je zodpovědná za produkci ROS v mozkových cévách. Oproti tomu superoxid-dismutasa 1 (SOD 1) se dle výzkumů jeví být ochranným enzymem proti toxickému působení APP na endotel. SOD 1 redukuje množství škodlivých volných radikálů [1].

Chronický zánět se vyznačuje aktivovanými mikroglie, reaktivními astrocyty a jinými markery včetně faktorů komplementu a cytokinů, které často lokálně provází A β . Navíc samotný A β zesiluje patologické a zánětlivé odpovědi. Studie ukázaly, že protizánětlivé látky můžou zpomalit progresi AD, ačkoliv žádná prospektivní studie tyto zjištění nepotvrdila [1].

2.3.4. Intracelulární agregace hyperfosforylovaných τ -proteinů

τ -Protein se hojně nachází v neuronech centrální nervové soustavy (CNS) a v jiných orgánových soustavách je ve značně menším množství. τ -Protein se ve svém defosforylovaném nebo částečně fosforylovaném stavu váže na mikrotubuly a stabilizuje tím architekturu buněčného cytoskeletu. Je vysoce rozpustný a upravuje stabilitu axonálních mikrotubulů. Lidský τ -protein je skupinou šesti izoform, odvozených od jediného genu alternativním sestřihem mRNA. Jednotlivé izoformy se liší počtem vazebných míst pro tubulin [19].

Nálezem při AD je intracelulární hyperfosforylovaný τ -protein. Za hyperfosforylaci τ -proteinu je zodpovědný enzym glykogen synthasa kinasa 3 β (GSK-3 β), kterou spouští za účasti cyklin dependentní kinasy 5. Zvýšená exprese GSK-3 β má za následek zánik neuronů, hyperfosforylaci τ -proteinů a pokles kognitivních funkcí. Proto se inhibice GSK-3 β jeví být další možnou metodou v terapii nejenom AD, ale i dalších neurodegenerativních onemocnění. Neuronová vlákna postižená

degradovaným τ -proteinem polymerují a vytváří vlákna ve tvaru šroubovice a vlákna přímá. Tyto vlákna jsou podkladem pro vznik neurofibrilárních klubek. Tyto útvary mohou poškodit architektoniku buňky až do té míry, že buňka zanikne. Senilní plaky $A\beta$ jsou spolu s depozity hyperfosforylovaných τ -proteinů, prvotními patologickými změnami, které se objevují před manifestací AD [8; 19; 20; 21]

2.4. Současné a klinicky zkoušené přístupy léčby Alzheimerovy choroby

Farmakoterapii lze rozdělit na kognitivní, která zlepšuje porušené kognitivní funkce a terapii nekognitivní, která ovlivňuje především psychologické příznaky a poruchy chování. Z kognitiv jsou v klinické praxi používány inhibitory acetylcholinesterasy (AChE) a inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému. Pro tyto dvě skupiny existují důkazy o účinnosti ověřené opakovanými klinickými studii. Další přístupy jsou používány jako doplňkové nebo vyžadují podrobnější a rozsáhlejší klinické studie. AD stále zůstává onemocněním nevyléčitelným. K dispozici je pouze symptomatická léčba [5].

2.4.1. Inhibitory cholinesteras

Inhibitory AChE byly prvními schválenými léčivy pro symptomatickou léčbu AD, v praxi používají se u lehkých a středně těžkých forem. V současné době jsou k dispozici kognitiva donepezil, rivastigmin a galanthamin, léčiva inhibující enzym AChE, která odbourává ACh. Tímto mechanismem dochází ke zvýšení množství ACh na synapsích [22].

V roce 1980 byl vědci v Číně identifikován nový silný, selektivní, reverzibilní inhibitor AChE, seskviterpenoidní alkaloid huperzin A z rostliny *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. (Huperziaceae). Bylo uskutečněno mnoho preklinických a klinických studií, které potvrdili jeho příznivý vliv na průběh AD. Huperzin A byl pro léčbu AD poprvé schválen v Číně v roce 1994. Ve srovnání s donepezilem a rivastigminem má huperzin A delší trvání účinku, méně NÚ, vyšší perorální BD a lépe proniká HEB [23; 24].

V pozdních fázích AD je ACh z větší části degradován butyrylcholinesterázou (BChE). Na základě tohoto zjištění začaly být intenzivně zkoumány i inhibitory BChE. Rovněž je významný výzkum inhibitorů s duální AChE i BChE inhibiční aktivitou [25].

2.4.2. Antagonisté NMDA receptorů

Pokles kognitivních funkcí u pacientů s AD je spojen s neuronálním poškozením, které je mimo jiné způsobeno nadměrnou aktivací glutamátových NMDA receptorů. Hlavními spouštěči této aktivace se zdají být A β a nadměrná exprese τ -proteinů. V praxi se jako nekompetitivní antagonisty NMDA receptorů používá memantin, který se používá na léčbu středně těžké až těžké formy AD. Memantin je schopen snížit glutaminergní toxicitu a tím zmírnit symptomatické projevy nemoci. V klinických studiích dosáhl kýženého efektu v monoterapii, ale také v kombinaci s donepezilem [2; 3; 22].

2.4.3. Vakcinace a imunizace

Vakcinace a imunizace jsou v současnosti předmětem výzkumu. Studie prokázaly, že pasivní přenos monoklonálních protilátek proti A β z očkovaných myší na modelové myši snížil mozkovou amyloidózu. První analýza účinnosti provedená u malé podskupiny pacientů, léčených AN1792, prokázala vytvoření příslušných protilátek a významně pomalejší pokles kognitivních funkcí. Ve fázi zkoušení je také aktivní imunizace A β [2; 3].

2.4.4. Blokátory oligomerace solubilního A β

Strategie tohoto farmakoterapeutického přístupu vychází z poznání fibrilárních agregátů A β . Nerozpustná fibrilární forma je totiž hlavní součástí neuritických plaků. Nadějnou sloučeninou se jevil být tramiprosat, který dokázal vázat rozpustný A β (udržovat ho nefibrilární formě) a snižovat tím vytváření depozic A β . V klinických studiích však neprošel [3; 12].

Dále se zkoušel scylloinositol, který stabilizoval A β v nefibrilární formě. Klinické studie byly přerušeny z důvodu, že se neprokázal klinický účinek a navíc se vyskytly neočekávaná úmrtí a infekce [3].

2.4.5. Modulátory γ -sekretasy

Tyto látky ovlivňují pouze tu část γ -sekretasy, která je zodpovědná za štěpení β -APP. Byl zkoušen především *R*-enantiomer flurbiprofenu – tarenflurbil. Ve studiích se však neprokázalo podstatné zlepšení projevů AD [3].

2.4.6. Statiny

Gen pro apolipoprotein E (ApoE) je dáván do souvislosti s AD. Tento gen má tři alelické varianty - ApoE2, ApoE3 a ApoE4, které kódují lipidy-vázající protein APOE. U pacientů, kteří mají jednu nebo dvě alely ApoE4, bylo shledáno vyšší riziko onemocnění AD, kdežto u nosičů ApoE2 bylo riziko onemocnění ve srovnání se zdravou populací nižší. Epidemiologické studie naznačují určité spojení mezi zvýšenou hladinou cholesterolu během života a zvýšeným rizikem propuknutí AD v pozdějším věku. Kromě toho u pacientů, užívajících statiny (inhibitory HMG-CoA reductasy), se výrazně snížilo riziko rozvinutí AD [3].

2.4.7. Agonisté jádrového transkripčního faktoru PPAR γ

PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) je jádrový receptor, který se spolupodílí na protizánětlivém účinku, zároveň snižuje toxicitu A β v mozku a ovlivňuje citlivost vůči inzulinu. Působí upregulaci antiapoptotického faktoru Bcl-2. Proto jsou zkoušeny v terapii AD i agonisté receptoru PPAR γ , kupříkladu rosiglitazon a pioglitazon [26].

Výsledky klinických studií a údaje o bezpečnosti však ukázaly, že rosiglitazon ani pioglitazon nejsou vhodnými kandidáty na léčbu AD [27].

2.4.8. Sloučeniny MPACs

A β a APP interagují se zinkem, mědí nebo železem, což naznačuje, že tyto kovy mohou hrát roli v jejich agregaci. V této souvislosti jsou testovány sloučeniny MPACs (metal-protein attenuating compounds), které vykazují chelatační vlastnosti. Kliočinol a další sloučeniny, byly podrobeny testování v souvislosti s aktivitou A β . Statisticky významné účinky kliočinolu byly pozorovány jen u velmi těžkých forem AD [3].

2.4.9. Agonisté M1 muskarinových receptorů

M1 muskarinové receptory pravděpodobně zasahují do AD prostřednictvím několika mechanismů. Mají vliv na A β a hyperfosforylaci τ -proteinu. Agonista těchto receptorů AF267B zvýšil neamyloidogenní cestu zpracování APP *in vitro* a snížil cerebrální hladinu A β *in vitro* i *in vivo*. Dále byl zkoušen i agonista talsakludin [3].

Obě sloučeniny však neuspěly již v první fázi klinického zkoušení kvůli NÚ v důsledku periferní cholinergní stimulace [12].

2.4.10. Antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace (rAGEs)

Pokročilá glykace je neenzymatický řetězec reakcí. Dochází ke slučování molekul cukrů s molekulami proteinů a lipidů. Jedná se o normální proces, ale ve stáří a zvláště u AD je počet reakcí vyšší. Makromolekuly proteinů a lipidů se znehodnocují a konečné produkty glykace (AGEs) se vážou na své receptory (RAGEs). Vazba na tyto membránově zakotvené receptory spouští zánětlivou reakci. Na tento typ receptorů se váže i A β , proto je zkoušena řada sloučenin, které tyto receptory inhibují, nebo blokují cestu tvorby AGEs [26].

2.4.11. Agonisté nikotinových receptorů

U AD dochází ke snižování počtů některých typů nikotinových receptorů. Konkrétně receptory $\alpha 7$ a $\alpha 7\beta 2$ nikotinové receptory působí neuroprotektivně a snižují škodlivost shluků A β . Jiný typ nikotinových receptorů uvolňuje ACh a růstové faktory. Donepezil nejenže inhibuje AChE, ale působí také na tyto receptory. Jejich stimulace vede také ke snížené buněčné apoptózy [26].

2.4.12. Další možné farmakoterapeutické přístupy

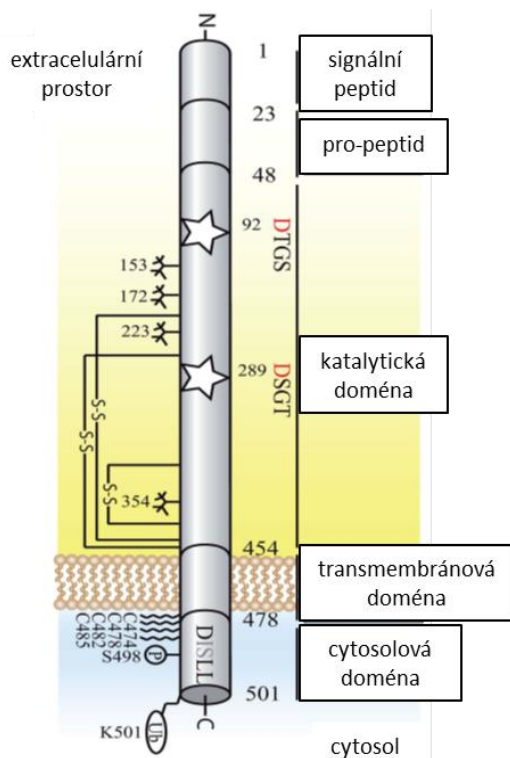
Další skupinou látek, která prochází klinickým zkoušením, jsou sloučeniny působící proti oxidativnímu poškození. Oxidační stres se totiž spolupodílí na patogenezi AD.

Provádí se také výzkum sloučenin, které ovlivňují astrocyty. Vychází ze zjištění, že amyloidní plaky jsou obklopeny aktivovanými astrocyty, které produkují ROS [3].

Zkouší se například stimulace aktivity α -sekretasy (štěpí APP na kratší fragmenty a $A\beta$ nevzniká) nebo inhibice enzymu GSK-3 β , který je zodpovědný za hyperfosforylaci τ -proteinu. Za zmínku stojí i klinické zkoušení protizánětlivých látek, např. etanerceptu, který je antagonistou TNF- α (tumor nekrotizující faktor α) nebo některá nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID), u nichž byla nalezena modulační γ -sekretasová aktivita [3; 26].

Další doplňkové postupy, které si však žádají podrobnější prozkoumání, zahrnují užití nootropik, standardizovaných extraktů z *Ginkgo Biloba* L. (Ginkgoaceae) či látek zvyšujících produkci nervových růstových faktorů [2].

3. β -Sekretasa



Obr. 2: Schéma uložení BACE 1.
Upraveno podle [29].

BACE 1 byl poprvé identifikován a naklonován v roce 1999. Hladina BACE 1 je při AD zvýšená. Dosud ale nebylo zjištěno, jaký mechanismus tuto elevaci zapříčiňuje. Je však ověřené, že BACE 1 je iniciátorem vzniku ložisek A β a proto se jeho inhibice jeví být slibnou metodou v terapii AD [9; 28; 29].

BACE 1 (Obr. 2) je protein sestávající se z 501 aminokyselin, spolu se svým homologem BACE 2 patří do rodiny transmembránových aspartátových proteas. Aktivní místo enzymu BACE 1 je na extracelulární proteinové doméně [9].

Pro svou katalytickou činnost potřebuje BACE 1 dva aspartáty. Poněvadž BACE 1 tvoří dimery, je pravděpodobné, že každý z monomerů poskytuje jeden aspartát. Ačkoliv je BACE 1 lokalizována do různých buněčných organel, své nejvyšší aktivity dosahuje v endozomech a v menší míře v trans části Golgiho aparátu. Enzym se nejprve v endoplazmatickém retikulu syntetizuje ve formě zymogenu. Konečná maturace BACE 1 probíhá v Golgiho aparátu, kde je podroben komplexní glykosylaci a odstranění prodomény. Už zymogen sám o sobě má proteolytickou aktivitu, ale ta je dvojnásobně zesílena až odstraněním prodomény. Hlavní úlohou prodomény však není potlačení enzymatické aktivity, ale usnadnění správného poskládání katalytické domény. Zymogenní sekvence, která je prodoménou, tvoří pomyslnou klapku, se schopností blokovat aktivní doménu a zabránit přístupu substrátu. V uzavřené poloze klapky má zymogen nízkou aktivitu a pouze dílčí aktivity dosahuje při konfiguraci otevřené klapky. Zralý enzym s odštěpenou zymogenní sekvencí je při optimálních podmínkách plně aktivní [9; 29].

Největší exprese a enzymatické aktivity dosahuje BACE 1 v mozku. Kromě mozku byla vysoká hladina BACE 1 mRNA nalezena také v pankreatu. Kvůli alternativnímu sestřihu a posttranskripční inaktivaci, je zde enzymatická aktivita poměrně nižší. Pankreatické formy BACE 1 neštěpí APP, ale jiné substráty, jako například enteropeptidasy [29].

Aktivitu BACE 1 reguluje komplexní souhra transkripčních, translačních a posttranslačních mechanismů. Na transkripční úrovni zvyšuje hladinu BACE 1 mRNA prostřednictvím různých působků například hypoxický a oxidační stres [29].

3.1. Fyziologické funkce a substráty BACE 1

Objasnění fyziologických funkcí a poznání substrátů BACE 1 je důležité pro předpověď možných toxicit spojených s inhibicí tohoto enzymu. S jistotou výsledky studií mluví o fyziologických funkcích BACE 1 uvnitř i mimo CNS [28]. Vassar a kol. [30] například vyzdvihují funkci BACE 1 v axonovém vedení, neurogenezi či při tvorbě svalového vřetenka.

Při testování myší, kterým byl odstraněn gen kódující BACE 1, se vyskytly četné vývojové a behaviorální NÚ: poruchy růstu, paměti, hypomyelinizace, záchvaty, poruchy axonového vedení a poruchy chování podobné schizofrenii [28].

Tyto projevy odrážejí funkci rozličných substrátů BACE 1. Mezi substráty BACE 1 patří membránově vázaná α -2,6-sialyl-transferasa v Golgiho aparátu, APP a jeho proteinové homology, protein spojený s receptorem pro LDL (low density lipoprotein), β -podjednotka 2 a 4 napětově-řízeného sodíkové kanálu, neuregulin-1 a neuregulin-3. Prostřednictvím neuregulinu-1 se BACE 1 podílí na periferní myelinizaci a tvorbě svalového vřetenka. Přesto, že APP zůstává předním substrátem BACE 1, fyziologické funkce a zpracování tohoto substrátu enzymem BACE 1 zůstávají nejasné. Bylo zjištěno, že genetické vymazání celé délky APP, způsobilo redukci hmotnosti celého těla, ale i mozku a také poruchy paměti [28; 29].

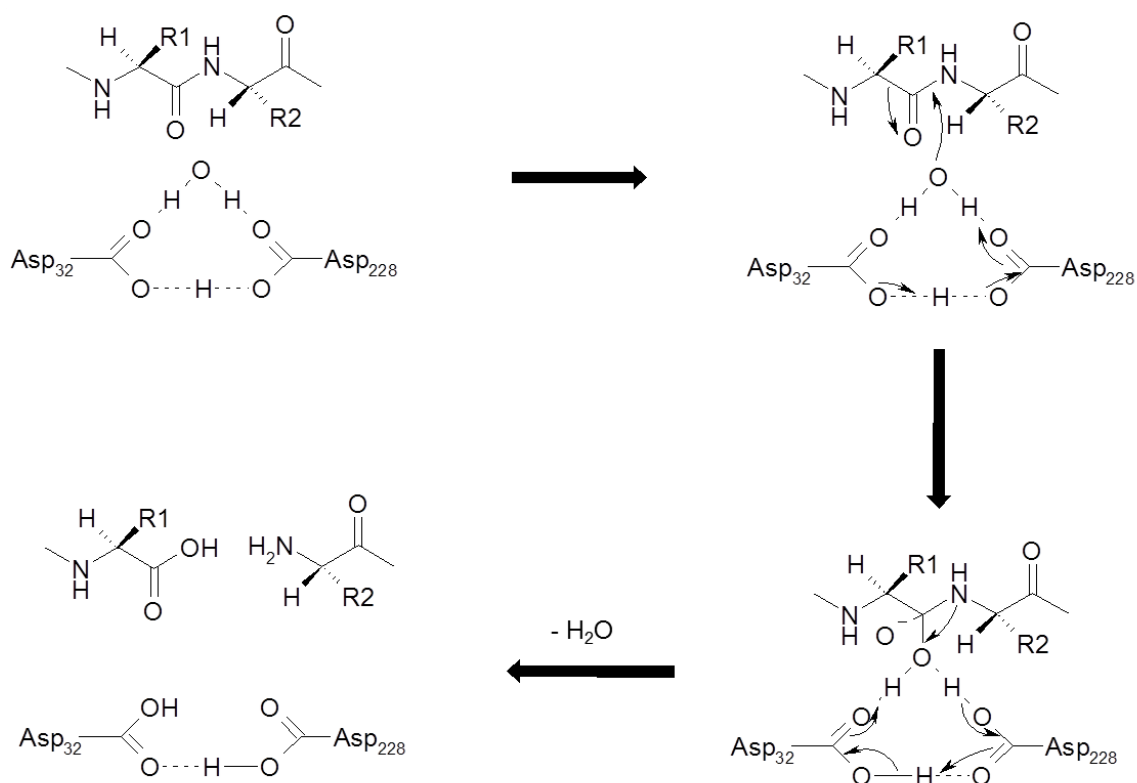
Poznání komplexní regulace aktivity BACE 1, vzrůstající počet pozorovaných fenotypů u myší bez genu kódujícího BACE 1 a zpracování různých substrátů vypovídá

o všestranné funkci této proteasy během vývoje a i v dospělosti. Tyto zjištění však snižují naděje, že se inhibice BACE 1 obejde bez vedlejších účinků [29].

Základní výzkum neustále odhaluje nové fyziologické funkce BACE 1 uvnitř i mimo nervového systému. Nedávné proteomické studie zjistili mnoho dalších substrátů BACE 1. Zatím však chybí jejich ověření v *in vitro* i *in vivo* testování a také porozumění funkcím BACE 1 na molekulární úrovni. Rovněž porozumění subcelulárního uložení samotného enzymu může poskytnout důležité vodítko k identifikaci jeho dalších klíčových substrátů a fyziologických mechanismů s nimi spojených, obzvláště pak v neuronech, kam bude inhibice BACE 1 zacílena [30].

3.2. Vlastní katalytický mechanismus BACE 1

Štěpení (Obr. 3) pomocí BACE 1 je prokázáno v kyselých kompartmentech jako endozomy a v trans části Golgiho aparátu. Enzym dosahuje nejvyšší aktivity při pH 4,0-4,5. Kyselé pH se rovněž používá při *in vitro* testování. Enzymatická aktivita BACE 1 je zprostředkována acidobazickým mechanismem pomocí dvou asparagových kyselin – Asp32 a Asp228, které se nachází poblíž sebe. Tato aspartátová katalytická místa mají v kyselém pH celkový náboj -1 a jsou tvořena hydrofilní a malou hydrofobní kapsou. Antiparalelní β -vlásenka řídí přístup substrátu k tomuto aktivní místu a také ho nastavuje do správné pozice pro katalýzu. Regulace aktivity BACE 1 tj. substrátová afinita a katalytické vlastnosti, jsou ovládané řadou konformačních změn mezi aktivní a neaktivní formou [31].



Obr. 3: Katalytický mechanismus BACE 1. Upraveno podle [31].

V aktivním místě BACE 1 hrají důležitou roli dvě molekuly vody. Podílí se na funkci a stabilitě enzymu. První molekula vody je zapojena do proteolýzy a umožňuje vytvoření tetrahedrálního meziprojektu, což je klíčový krok pro rozbití peptidické vazby. Druhá molekula vody se podílí v tomtéž kroku na stabilizaci vzniklého meziprojektu [31].

Vlastním mechanismem je vytvoření vodíkové vazby protonovaného Asp₃₂ s karbonylovým kyslíkem peptidické vazby. Neprotovaný Asp₂₂₈ interaguje s molekulou vody. Vzniklý tetrahedrální meziprojekt se rozpadá, za současného rozštěpení peptidické vazby a vznikem dvou peptidů. Enzym je zároveň obnoven pro další katalýzu [31].

3.3. β -sekretasa 2

β -sekretasa 2 (BACE 2) je homologní k BACE 1 a sdílí s ní podobnost v 64 % aminokyselinové sekvence. BACE 2 patří také do skupiny aspartátových proteas. Navzdory podobnosti s BACE 1 se od něj odlišuje svým spektrem substrátů a subcelulární lokalizací [9].

Exprese BACE 2 v mozku je velmi nízká a nemá na ukládání A β přílišný vliv [9]. Některé zdroje uvádějí, že BACE 2 sice APP zpracovává, ale tvorbu A β neovlivňuje, ba dokonce snižuje [32]. Azkona a kol. [33] zkoušeli nastolit nadměrnou expresi BACE 2 na transgenním myším modelu a zjistili, že BACE 2 na kognitivní dysfunkci nebo zeslabení cholinergního přenosu vliv nemá. Co se fyziologických funkcí BACE 2 týče, bylo prokázáno, že se podílí na pigmentaci a funkci pankreatických β -buněk [32; 34].

BACE 2, jako jedna z mála membránových proteas, je zapojena do regulace pankreatických β -buněk. Specifickým substrátem je v této souvislosti protein Tmem27, který je lokalizovaný na povrchu membrán β -buněk pankreatu a je BACE 2 štěpen. Je také substrátem BACE 1, ale existují důkazy, že je daleko více zpracováván BACE 2. Bylo zjištěno, že vyšší množství Tmem27 je spojeno se zmnožením β -buněk pankreatu a že pokud je Tmem27 rozštěpen, pak takovou funkci ztrácí [35].

Ve výzkumu inhibitorů BACE 1 by mohl potencionálně nastat problém ve zkřížené inhibici. Původní inhibitory BACE 1 by mohly BACE 2 zkříženě inhibovat a v důsledku této interakce by docházelo k vedlejším účinkům. Pokud by tyto důsledky nebyly akceptovatelné, požadavky na specifitu inhibitorů BACE 1 by ještě více vzrostly [9].

4. Inhibice β -sekretasy

Většina vědců se v současnosti domnívá, že příčinou AD je nadměrná akumulace A β . Amyloidová hypotéza však nebyla do dnešní doby s jistotou ověřena. Někteří se domnívají, že za etiopatogenezi může být zodpovědný spíše hyperfosforylovaný τ -protein. S identifikací a poznáním role BACE 1 v amyloidogenní cestě štěpení APP, se výzkum sloučenin s betasekratasovou inhibiční aktivitou stal jedním z dalších zájmů studia nových terapeutických možností AD. Všechny sloučeniny, vykazující inhibiční aktivitu vůči BACE 1, musí dosahovat terapeutických hladin obzvláště v mozku, kde je aktivita tohoto enzymu nejvyšší [30].

4.1. Metody testování inhibice a aktivity BACE 1 *in vitro*

4.1.1. Fluorescenční metody

In vitro aktivita a inhibice BACE 1 jsou nejčastěji určovány pomocí FRET (fluorescence resonance energy transfer) principu, založeném na fluorescenčním rezonančním přenosu energie [31].

Jako substráty se používají syntetické peptidy, které ve své struktuře mají fluorofor (donor) a zhášec (akceptor) a sekvenci obsahující švédskou mutaci APP, která je štěpena BACE 1 až 60× rychleji. Ty jsou navzájem spojené peptidickým řetězcem. V nerozštěpeném substrátu je fluorescence donorové skupiny zhášena přilehlým akceptorem. Podmínkou je, že se emisní spektrum donoru překrývá s absorpčním spektrem akceptoru a vzdálenost mezi molekulami je menší než 100Å. Fluorofor je excitován specifickou vlnovou délkou a namísto fluorescence je energie přenesena na akceptor. Pokud dojde k rozštěpení peptidického řetězce, v tomto případě enzymem BACE 1, fluorescence už není „zhášena“ a je měřitelná. Fluorescence je přímo úměrná míře probíhající proteolýzy. V případě testování inhibice BACE 1 se fluorescence snižuje v důsledku přítomnosti testovaného inhibitoru [31; 36; 37].

Praktický rozsah testování inhibice fluorescence je omezen dostatečnou linearitou pouze v nízkém podílu rozštěpeného substrátu (5-10 %). Výběr substrátů pro BACE 1 je tedy závislý nejen na kinetických parametrech hydrolýzy substrátu a sekvenci jeho aminokyselin, ale i na síle fluorescenčního signálu a účinnosti zhášení. Substráty

se liší hlavně strukturou fluoroforu a zhášeče, dále v délce, struktuře spojovacího peptidického řetězce a rozpustnosti. Délka peptidického řetězce je důležitá, jelikož ovlivňuje rozpoznání substrátu a rychlostní konstantu štěpení. Každý substrát vyžaduje jinou vlnovou délku pro excitaci a emisi a specifickou koncentraci. S tím souvisí i odlišná optimální koncentrace BACE 1 [38; 39; 40; 41].

Citlivost testování je definována jako poměr ΔF (F - fluorescence) ke koncentraci substrátu, který odráží rychlost přeměny substrátu a sílu fluorescenčního signálu po hydrolýze. Rychlost přeměny substrátu závisí na délce a povaze sekvence aminokyselin. Testování nízkých koncentrací substrátu a enzymu vyžaduje citlivou metodu využitím fluoroforu s intenzivní fluorescencí a páru akceptor-donor s účinným rezonančním přenosem energie. Zatímco v případě použití metody FRET ve vysokovýkonném screeningu (high-throughput screening – HTS) jsou substrát i enzym přítomny ve vysoké koncentraci [41].

Pro porovnání substrátů se určuje rychlostní konstanta druhého řádu k_{cat}/K_M , kde k_{cat} je rychlost tvorby produktu. K_M je Michaelisova konstanta, která vyjadřuje koncentraci substrátu potřebnou pro enzym k dosažení své poloviční maximální rychlosti reakce. Poměr k_{cat}/K_M vypovídá o katalytické účinnosti, to znamená, jak rychle reaguje substrát s BACE 1. Je nutné znát přesnou koncentraci enzymu. Ta se obvykle určuje titrací proti známému pevně vázajícímu, silnému inhibitoru. Měří se ztráta aktivity BACE 1 v závislosti na zvyšující se koncentraci inhibitoru [42; 43].

K hodnocení testovaných inhibitorů BACE 1 se používá hodnota inhibiční koncentrace IC_{50} . Jedná se o koncentraci inhibitoru, který redukuje aktivitu enzymu na 50 %. K určení této hodnoty se porovnávají intenzity fluorescence v přítomnosti inhibitoru a bez něj. Následným vynesemím závislosti procentuální inhibice, v důsledku přítomnosti testovaného inhibitoru, na jeho koncentraci do grafu je získána inhibiční křivka, ze které lze odečíst hodnotu IC_{50} [31].

Mezi nevýhody metody FRET patří příspěvek rušících signálů nerozštěpených fluoroforů do celkové hodnoty fluorescenčního signálu. Citlivost analýzy je tudíž snížena a možné použitelné koncentrace substrátu klesají až pod hodnoty K_M . Rozsah použitelných koncentrací FRET substrátů je dále snížen kvůli jejich malé rozpustnosti a

mezimolekulárnímu zhášení. Průběh screeningu nových syntetických i přírodních sloučenin může být narušen například přítomností konjugovaných aromatických kruhů. Tyto sloučeniny mohou absorbovat nebo zhášet světlo a tím vytvářet falešně pozitivní nebo negativní výsledky. Za falešně pozitivní výsledky jsou také zodpovědné některé inhibitory, které vytváří agregáty mnoha molekul interagujících v roztoku s enzymem. Vliv tohoto jevu pak roste s uplynulým časem [31; 44].

Řešením nevýhod testování klasickými FRET metodami může být přístup uplatňující TRF-Q technologii (time-resolved fluorescence quenching). V této technologii je fluorescence vzorku sledována funkcí času po excitaci zábleskem nebo světlem. Tato analýza využívá peptidu, připojeném k Eu^{3+} chelátu na N-konci a k organickému zhášeči na C-konci. Při excitaci vlnovou délkou 330 nm produkt proteolytického štěpení poskytne zvýšení fluorescence při vlnové délce 615 nm, které lineárně koreluje s aktivitou enzymu. Hlavní výhodou této technologie je podstatné snížení rušících vlivů testovaných sloučenin díky chelátové skupině, která poskytuje dlouhotrvající emisi světla a má vysokou afinitu k BACE 1. Technologie TRF-Q tímto způsobem snižuje riziko falešně pozitivních/negativní výsledků. Nevýhodou je však finanční nákladnost přístrojového vybavení a substrátu [45; 46].

Existují i jiné biologické metody k testování inhibice BACE 1. Sice jejich užití v rámci analýzy BACE 1 není tolik časté, ale mohou být použity za účelem prověření výsledků získaných FRET metodami [31].

Polarizace fluorescence je test založený na vlastnostech malých fluoroforů navázaných na velké molekuly. Fluorofory dosahují po excitaci lineárně polarizovaným světlem vysokých hodnot emise. Při této analýze se substrát, s biotinem na jednom konci a fluoroforovým značením na druhém konci, inkubuje s BACE 1. Ve směsi je také streptavidin, který specificky váže biotin. Rozsah inhibice se hodnotí měřením hodnoty polarizace záření, která je nižší ve vzorku bez inhibitoru. Tato metoda je homogenní a umožňuje stanovení inhibiční konstanty, problémem je ale nižší citlivost [47].

Jako substrát pro BACE 1 byl testován i kasein značený fluorescenčním isothiokyanátem (kasein-FITC). Bylo zjištěno, že BACE 1 má vyšší afinitu k tomuto substrátu než k proteinu obsahujícímu švédskou mutaci APP, je jím dokonce

saturovatelná. Za pomoci fluorescenční detekce byly získány hodnoty IC_{50} vybraných inhibitorů cholinesteras. Metoda s využitím kaseinu-FITC poskytuje srovnatelné výsledky s nejčastěji používanou metodou FRET [48].

4.1.2. Spektrofotometrické metody

Mancini a kol. [48] ve své studii použili rovněž spektrofotometrickou metodu s využitím *N*- α -benzoyl-D,L-arginin *p*-nitroanilidu (BAPNA) jako vhodného substrátu proteas. Štěpením tohoto substrátu enzymem BACE 1 vzniká produkt *p*-nitroanilin. Jedná se o žlutou sloučeninu absorbující viditelné záření při maximu vlnové délky $\lambda = 405$ nm. Získané výsledky byly ověřeny srovnáním s referenční metodou (FRET). Jejich závěry ukázaly, že BACE 1 má nižší afinitu k substrátu BAPNA než k peptidu obsahujícímu švédskou mutaci APP (běžně používaném ve FRET technologii). Metoda je však dostatečně citlivá, přesná a tudíž vhodná ke screeningu BACE 1 inhibitorů.

4.1.3. Metoda využívající HPLC s imobilizovaným enzymem

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metodou, kterou lze využít k selektivní detekci fluorescenčních hydrolytických produktů. Tímto se eliminují interference jiných absorbujících nebo fluorescenčních skupin. Mancini a kol. [49] použili HPLC k testování nových inhibitorů humánní rekombinantní BACE 1 (hrBACE 1) s použitím fluorescenční detekce. Tento přístup využil principu imobilizovaného enzymu na monolytickém disku. Oproti klasickým rozpustným enzymům má tu výhodu, že může být použit kontinuálně a opakovaně. Imobilizace je proces, který chemickou reakcí váže enzym na adsorbent. Enzym se obvykle také stává stabilnějším. Další výhodou je cena a rychlost analýzy [49; 50].

HrBACE 1 byla imobilizována ethylendiaminem na monolitickém disku. Jako substrát byl použit fluorogenní peptid (M-2420), který obsahoval švédskou mutaci APP. Po nastříknutí na hrBACE 1-IMER (human recombinant BACE 1 – immobilized enzyme reactor) substrát M-2420 byl enzymaticky štěpen na methoxykumarylový fragment, který byl detekován při $\lambda_{exc} = 320$ nm a $\lambda_{em} = 420$ nm [49].

Substrát M-2420 však není použitelný při testování přírodních heterocyklických a aromatických sloučenin kvůli jejich fluorescenčnímu rušení. De Simone a kol. [51] vyvinuli metodu, ve které použili jako substrát fluorogenní peptid, založený na

struktura 4-(4-dimethylaminofenylazo)benzoová kyselina/5-[(2-aminoethyl) amino] naftalen-1-sulfonové kyselině, jehož produkt štěpení rušen není. Fluorescenční signál byl měřen při vlnové délce $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} = 485 \text{ nm}$.

4.1.4. Doplnkové metody

Biosenzorová metoda je analýzou pro rychlé testování inhibitorů BACE 1, využívá technologii plasmonové povrchové rezonance (SPR). Jedná se o optickou detekční techniku. Při stanovení se měří změna indexu lomu, která je vyvolaná interakcí biomolekul. Během měření kinetiky sledované interakce dvou biomolekul, lze zároveň zjistit množství stanovované látky ve směsi. Jedná se o metodu velice citlivou, která se vyznačuje rychlou detekcí a kvantifikací. Lze zjistit i vlastnosti biomolekul a vzájemné vazby mezi nimi, poskytuje však pouze informace o afinitě inhibitoru, nikoliv o inhibiční konstantě [52; 53].

Izotermní titrační kalorimetrie je podobně jako metoda biosenzorová pouze doplňková k metodám testování inhibice. Poskytuje údaje z přímého měření tepla spojeného s tvorbou a rozpadem nekovalentních vazeb při vzniku komplexů. Neslouží však k určení inhibičních konstant [54].

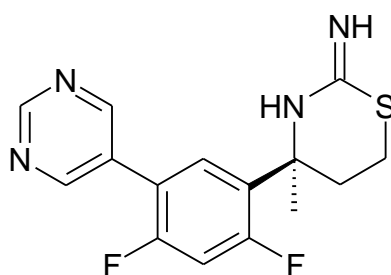
4.2. Výzkum syntetických inhibitorů BACE 1

Prvotními zkoušenými látkami inhibující BACE 1 byly syntetické sloučeniny peptidického charakteru. První takovou sloučeninou byla v roce 2000 struktura označená jako OM99-2. Tento inhibitor se sestával z osmi aminokyselin a byl navržen dle vazebného místa BACE 1 k APP. Od té doby bylo zkompletováno mnoho jiných inhibitorů podobné molekulové hmotnosti [31; 55].

Prvotní peptidické inhibitory BACE 1 inhibitorů disponovaly vysokou afinitou a selektivou pro tento enzym a zároveň účinně snižovaly plazmatickou hladinu A β . Například CTS-21166 byl peptidomimetický inhibitor, který postoupil do první fáze klinických studií. U zdravých dobrovolníků se dosáhlo v plazmě snížení A β o 80 %. Nakonec se však žádná z peptidických sloučenin jako nové léčivo neujala z důvodu velmi nízké prostupnosti PM a HEB a špatné perorální BD [30; 55].

Výhodným mechanismem novějších sloučenin byla schopnost vazby na BACE 1 doménu a na transferrinový receptor a tím usnadnění prostupu HEB. Tento přístup dosahoval výborné selektivity vůči BACE 1 [30].

Průlomem byl objev malých nepeptidových molekul jako acylguanidinu, aminopyridinu či isothiurey, které se však vázaly s nižší afinitou na katalytické zbytky asparagových kyselin BACE 1. Další nadějnou skupinou byla třída iminoheterocyklických sloučenin. Jejich příkladem je iminohydantoin, který dosáhl nebývalé kombinace výhodných vlastností, a sice nízké molekulové hmotnosti a vysoké afinity k BACE 1 ve srovnání s předchozími peptidomimetickými inhibitory [30].



Obr. 4: LY2811376.

Další sloučenina LY2811376 (cyklická isothiomočovina) (Obr. 4) významně snižovala koncentraci A β v CNS u hlodavců a psů a postoupila do první fáze klinického vývoje. LY2811376 dle prvních zpráv u zdravých dobrovolníků snižovala hladinu A β v mozkomíšním moku. Vývoj této sloučeniny byl nakonec ukončen z důvodu degenerace gliových buněk a buněk sítnice, která byla zjištěna během preklinických toxikologických studií u hlodavců [30].

Několik dalších inhibitorů BACE 1 postoupilo do první fáze klinického vývoje. Byly to LY-2886721, E-2069 a MK-8931. Měly vysokou afinitu k BACE 1 a byly jeho selektivními inhibitory. Účinně snižovaly hladiny A β -40 a A β -42 v periferní a centrální nervové soustavě u hlodavců či primátů. Vývoj LY-2886721 byl ve druhé fázi klinického vývoje u pacientů s AD nakonec ukončen z důvodu abnormálních výsledků jaterních testů. Tyto nálezy nebyly však ve vztahu k inhibici BACE 1. E-2069 and MK-8931 stále zůstávají v klinickém zkoušení. E-2069 byl zkoušen u pacientů s časnými příznaky, výsledek této studie zůstává zatím neznámý. Účinek MK-8931 je posuzován u pacientů

s prodromální a mírnou až středně těžkou formou AD. Nyní se nachází ve třetí fázi klinického zkoušení [12; 30].

Možné vedlejší účinky inhibice BACE 1, které byly popsány u myši s deficitem tohoto enzymu, se nemusí ve skutečnosti projevit, protože inhibice BACE 1 není úplná. BACE 1 si zachovává reziduální aktivitu, která by mohla dostatečně zajistit jeho důležité fyziologické funkce. Navíc mnoho z vývojových funkcí BACE 1, kterou je například myelinizace, se dospělých pacientů s AD netýká. Nicméně existují i vývojové procesy, které se v dospělém mozku vyskytují, a sice neurogeneze nebo axonální vedení v hipokampu. Tyto funkce by už dotčeny být mohly. Udržování svalového vřeténka je také funkcí BACE 1, která probíhá v dospělosti [30].

4.3. *In silico* vývoj inhibitorů

Metody *in silico* se v současnosti stávají stále důležitějším nástrojem ve vývoji nových léčiv zejména díky své rychlosti, ceně a efektivnosti. S využitím moderních výpočetních metod započal Semighini [56] hledání nových inhibitorů BACE 1 prozkoumáním databáze chemických struktur všech současných BACE 1 inhibitorů. Byly identifikovány farmakofory, tedy skupiny fyzikálně-chemických vlastností zodpovědné za schopnost interagovat s enzymem, které byly dále rozděleny na několik podskupin. Podle požadavků na přítomnost jednotlivých kombinací vlastností molekuly výpočetní program navrhl desetitisíce molekul. Tato velká různorodá skupina látek byla zúžena vyřazením molekul postrádajících základní vlastnosti BACE 1 inhibitorů. Molekula je schopna inhibovat katalytickou aktivitu tohoto enzymu, pokud interaguje alespoň s jednou aspartátovou skupinou a β -vlásečkou v katalytickém místě. Tento požadavek zredukoval počet potenciálních molekul na 98. Na základě požadovaných specifických chemických vlastností a interakcí s aktivním místem enzymu bylo vybráno 10 nejvhodnějších molekul, které byly zakoupeny k testování. 3 testované molekuly již v $1\mu\text{M}$ koncentraci skutečně vykazovaly BACE 1 inhibiční aktivitu (36-49 %).

5. Inhibitory BACE 1 přírodního původu

Látky přírodního původu byly a jsou jedním z hlavních zdrojů pátrání po nových strukturálních typech léčiv v terapii nejenom AD. V rámci hledání nových sloučenin inhibujících BACE 1 a potažmo amyloidogenní cestu štěpení APP bylo prozkoumáno již mnoho léčivých rostlin. Inhibiční aktivita vůči BACE 1 byla objevena u řady přírodních látek, obzvláště metabolitů polyfenolické struktury. Vhodnými kandidáty na nová léčiva jsou především sekundární metabolity rostlin s relativně nízkou molekulovou hmotností a vysokou lipofilitou [4; 55; 57].

5.1. Primární metabolity

5.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Lee a kol. [58] ve své studii hodnotili BACE 1 inhibiční aktivitu extraktů z mikroorganismů, a sice kvasinek, bakterií a hub. Kvasinky a houby obecně měly vyšší inhibiční schopnosti než kvasinky a houby. Celkově vykazoval nejvyšší inhibiční aktivitu extrakt ze *Saccharomyces cerevisiae* K-7 Meyen ex E.C. Hansen (Saccharomycetaceae). *S. cerevisiae* je využívána při alkoholovém kvašení a v předchozích studiích bylo prokázáno, že produkuje látku s inhibičními účinky na angiotenzin I. konvertující enzym a sloučeninu s antiangiogenními účinky.

Jako účinná složka extraktu *S. cerevisiae* se ukázal být oktapeptid se sekvencí aminokyselin Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Ile-Gly-Ser s hodnotou $IC_{50} = 2,59 \mu M$. V porovnání se syntetickými oktapeptidy však byl méně účinný. Inhibice byla kinetickými studiemi vyhodnocena jako nekompetitivní [58].

5.2. Sekundární metabolity

5.2.1. Fenolické látky

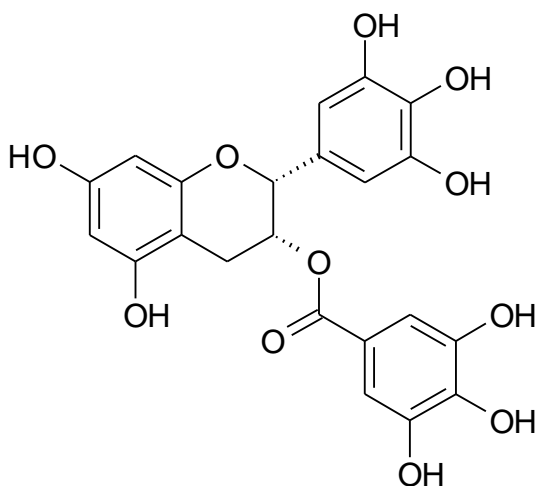
5.2.1.1. Katechiny a jejich estery

5.2.1.1.1. *Camellia sinensis*

Camellia sinensis (L.) Kuntze (Theaceae) je stálezelený keř nebo menší stromek původem z jihovýchodní Číny. Zelený čaj je pochutinou, proslulou pro své zdraví

prospěšné účinky, zejména chemopreventivní, hepatoprotektivní a protizánětlivé. Má také příznivý vliv kardiovaskulární onemocnění a rakovinu [4].

Fytochemická analýza zeleného čaje je vzhledem k četnému množství sloučenin, vznikajících během sušení a technologického zpracování čajových lístků, složitá. Na variabilitu sloučenin působí také změny a kolísání klimatu při sklizni či zahradnické postupy. Všechny obsahové účinné látky v zeleném čaji se dělí na těkavé a netěkavé. List čajovníku obsahuje mnoho polyfenolických látek s převahou katechinů. Hlavními obsaženými katechiny jsou epikatechin, epikatechin-gallát, epigallokatechin a epigallokatechin-gallát (EGKG). EGKG (Obr. 5) je nejaktivnější polyfenolickou sloučeninou zeleného čaje s prokázanými silnými antioxidačními vlastnostmi. Mezi další významné obsažené látky patří kofein, vyskytující se hlavně v mladých výhonech a nejmladších lístcích, dále theofylin, theobromin, flavonoidní glykosidy a silice [4].



Obr. 5: (-)-Epigallokatechin-gallát.

Ve studii provedené Okelem a kol. [59] bylo zjištěno, že extrakty ze zeleného i černého čaje vykazují *in vitro* koncentračně závislou inhibiční aktivitu vůči AChE i BChE. U extraktu ze zeleného čaje byla také prokázána inhibice BACE 1.

Příznivé účinky zeleného čaje jsou přičítány katechinu EGKG. Jeho neuroprotektivní účinky byly zkoumány v několika studiích. Zhang a kol. [60] ve své studii prokázali, že EGKG silně inhibuje aktivitu AChE a navíc zvyšuje inhibiční účinek alkaloidu huperzinu A na AChE. V několika dalších *in vitro* studiích EGKG chránil neurony před neurotoxickými působky. Dále byly objeveny protektivní účinky EGKG při

stárnutí myší navozeném D-galaktózou. V jiné studii se prokázalo, že EGKG snižuje hladiny A β *in vitro* i *in vivo* [4].

Výsledky studie Reznichenka a kol. [61] naznačují, že EGKG může mít pozitivní vliv na stárnutí a neurodegenerativní onemocnění, tím že zpomaluje neuronální degeneraci. U EGKG byla prokázána indukce růstu neuritů u PC12 buněk (buněčná linie odvozená z feocytochromu krysí dřeně nadledvin).

Vzhledem k faktu, že EGKG zvyšuje zpracování APP na α APPs *in vitro*, na prozkoumání terapeutického potenciálu této sloučeniny bylo zaměřeno mnoho výzkumů. Vědci zjistili, že výluh zeleného čaje o koncentraci 0,03 mg/ml snížil aktivitu BACE 1 o 27 % po pěti minutách inkubace, zatímco po šedesáti minutách aktivita dále klesala, dosáhla zmenšení o 38 %. Konkrétně analýzy ukázaly, že by EGKG v závislosti na své dávce mohl snižovat intracelulární tvorbu A β [59].

U buněčné kultury MC65 inkubované s EGKG při koncentraci 20 μ M klesla produkce A β o 20-30 %. Také epikatechin při analýze dokázal snížit produkci A β . Výsledky však ukázaly, že purifikovaný EGKG měl u buněčných kultur větší schopnost redukovat tvorbu A β než když byl ve směsi celý extrakt ze zeleného čaje [62].

Další analýzy, které se konkrétněji zaměřily na působení EGKG na BACE 1, zjistily, že EGKG inhibuje lipopolysacharidem navozenou zvýšenou hladinu A β prostřednictvím útlumu aktivity BACE 1 a γ -sekretasy [63].

V dalších výzkumech se inhibice BACE 1 projevila *in vitro* i u dalších sloučenin ethylacetátového výluhu zeleného čaje. Jeon a kol. [64] prokázali inhibiční aktivitu u EGKG s hodnotou $IC_{50} = 1,6 \mu$ M, (-)-gallokatechin-gallátu ($IC_{50} = 1,8 \mu$ M), (-)-epikatechinu ($IC_{50} = 2,3 \mu$ M), (-)-epigallokatechinu ($IC_{50} = 2,4 \mu$ M), (-)-gallokatechinu ($IC_{50} = 2,5 \mu$ M), (+)-epikatechinu ($IC_{50} = 2,8 \mu$ M), (-)-katechinu ($IC_{50} = 3,0 \mu$ M), (+)-katechinu ($IC_{50} = 3,5 \mu$ M), (-)-epikatechin-gallátu ($IC_{50} = 4,5 \mu$ M) a (-)-katechin-gallátu ($IC_{50} = 6,0 \mu$ M). Z těchto údajů o inhibičních koncentracích vyplývá, že pyrogalolová skupina (benzen-1,2,3-triol) je zodpovědná za signifikantní inhibici BACE 1.

Ve výzkumu provedeném Giuntou a kol. [65] byla myší potrava obohacena EGKG a rybím olejem. Výsledkem bylo zvýšení produkce sAPP α – posílení

neamyloidogenního způsobu zpracování APP. Ukázalo se, že použití EGKG a rybího oleje má synergické působení.

5.2.1.2. Hydroxyaromatické kyseliny

5.2.1.2.1. *Cornus officinalis*

Droga *Corni fructus* (Obr. 6) z rostliny *Cornus officinalis* Torr. ex Dur. (Cornaceae) je v tradiční čínské medicíně (TČM) indikována při tuberkulóze, astmatu a alergii. Má také příznivé účinky na močové cesty a chronickou nefritidu. Samotný plod pak vykazuje účinky hypoglykemické, imunomodulační a protizánětlivé. Obsahuje mnoho biologicky aktivních látek. Kupříkladu iridoid morronisid je neuroprotektivní a zmírňuje poškození při mozkové ischemii a zlepšuje paměť. Iridoidní glykosidy snižují ztrátu neuronů inhibicí jejich apoptózy při cerebrálním poranění [66; 67].

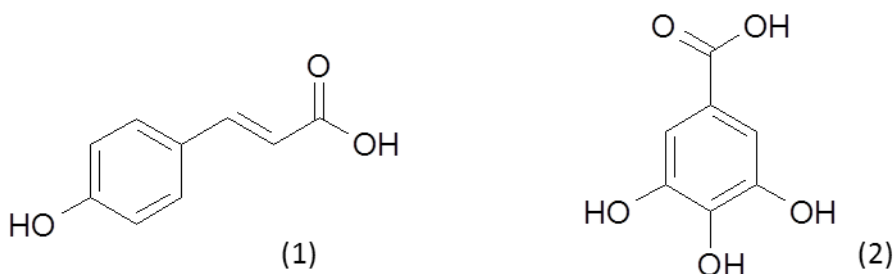


Obr. 6: *Corni fructus* [68].

Prvním krokem stanovení látek s inhibičním účinkem na BACE 1 byla příprava ethanolového extraktu vysušených plodů matečné rostliny *C. officinalis*. Extrakt byl odpařen do sucha a posléze rozpuštěn ve vodě. Testovala se různá rozpouštědla. V průběhu testování vykazovala značnou inhibiční aktivitu frakce rozpuštěná v ethylacetátu. Sloučeniny této frakce byly pomocí kolonové chromatografie izolovány a identifikovány jako kyselina gallová a *p*-kumarová (Obr. 7) [66].

Obě izolované sloučeniny enzym BACE 1 inhibovaly v závislosti na své dávce. Kyselina gallová byla více aktivní než kyselina *p*-kumarová v koncentracích 1-10 μ M. Na

druhou stranu v nevyšší testované koncentraci 100 μM byla zaznamenána nejméně snížená aktivita enzymu BACE 1 působením kyseliny *p*-kumarové. Ta však byla méně účinná než resveratrol ($\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$), který byl při testování použit jako pozitivní kontrola. Kyselina *p*-kumarová vykazovala hodnotu $\text{IC}_{50} = 90 \mu\text{M}$. Z *Corni fructus* byly izolovány ještě BACE 1 inhibitory terpenické struktury [66].



Obr. 7: Kyselina *p*-kumarová (1) a kyselina gallová (2).

Kyselina *p*-kumarová je navíc schopná chránit neurony před 5-S-cysteinyldopaminem, endogenním neurotoxinem. Tato neurotoxická sloučenina indukuje kaspasy-3, které řídí neuronální apoptózu [66].

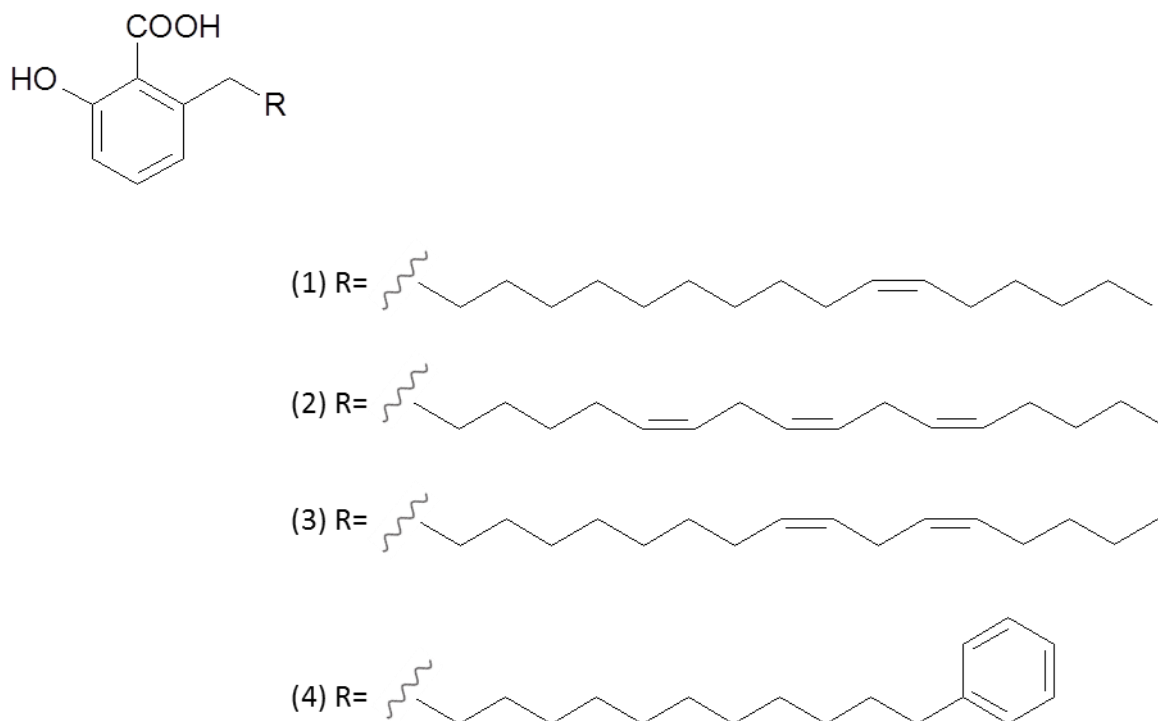
K určení konkrétního typu inhibice byly provedeny kinetické studie, které pracovaly s různými koncentracemi substrátu a inhibitoru. Inhibice byla vyhodnocena jako nekompetitivní. Kyselina *p*-kumarová se váže na alosterická místa enzymu, neovlivňuje navázání substrátu do aktivního místa a inhibice je závislá pouze na její koncentraci [66].

Izolované sloučeniny nemohou být přímo považovány za nová potencionální léčiva, protože jejich inhibiční aktivita není tolik silná v porovnání se syntetickými sloučeninami. Avšak jejich struktury se mohou stát výchozími pro návržení nových nepeptidových sloučenin. Navíc kyselina *p*-kumarová se svou specifickou inhibiční aktivitou vůči BACE 1 a nízkou molekulovou hmotností se jeví být perspektivní sloučeninou v překročení HEB [66].

5.2.1.2.2. *Homalomena occulta*

Homalomena occulta (Lour.) Schott (Araceae) se používá v TČM k léčbě žaludečních onemocnění, revmatické artritidy a také jako protizánětlivý prostředek a tonikum. Z ethanolického extraktu kořene *H. occulta* byly izolovány čtyři sloučeniny

s betasekretasovou inhibiční aktivitou: 2-[(Z)-heptadec-11-enyl]-6-hydroxybenzoová kyselina (1), 2-[(6Z,9Z,12Z)-heptadeka-6,9,12-trienyl]-6-hydroxybenzoová kyselina (2), 2-[(9Z,12Z)-heptadeka-9,12-dienyl]-6-hydroxybenzoová kyselina (3) a 2-hydroxy-6-(12-fenyldodecyl)benzoová kyselina (4) (Obr. 8). Všechny kyseliny jsou strukturně podobné kyselině anakardové [69].



Obr. 8: 2-[(Z)-heptadec-11-enyl]-6-hydroxybenzoová kyselina (1), 2-[(6Z,9Z,12Z)-heptadeka-6,9,12-trienyl]-6-hydroxybenzoová kyselina (2), 2-[(9Z,12Z)-heptadeka-9,12-dienyl]-6-hydroxybenzoová kyselina (3) a 2-hydroxy-6-(12-fenyldodecyl)benzoová kyselina (4)

U všech čtyř sloučenin byla stanovena přibližně stejně silná inhibiční aktivita vůči BACE 1 s hodnotami $IC_{50} = 6,23 \mu\text{M}$ (1), $6,28 \mu\text{M}$ (2), $7,93 \mu\text{M}$ (3) a $7,65 \mu\text{M}$ (4). Dle kinetických studií se v případě všech čtyř sloučenin jedná o nekompetitivní inhibici [69].

5.2.1.2.3. *Sanguisorba sp.*

Z rozpustné ethylacetátové frakce *Sanguisorbae radix* z *Sanguisorba sp.* (autoři studie neuvedli použitý druh), (Rosaceae), byly izolovány dvě sloučeniny s betasekretasovou inhibiční aktivitou, a sice 1,2,3-trigalloyl-4,6-hexahydroxydifenoyl-13-D-glukopyranosid (tellimagrandin II) a 1,2,3,4,6-pentagalloyl-13-D-glukopyranosid.

Hodnoty IC_{50} těchto dvou sloučenin byly 3,10 μM a 3,76 μM . Jejich inhibiční účinek vůči α -sekretase a jiným serinovým proteasám byl nižší, dají se tedy považovat za relativně specifické inhibitory vůči BACE 1. Izolované sloučeniny nejsou přímo využitelné jako nová léčiva, protože jsou relativně hydrofilní a mají velkou molekulovou hmotnost [70].

5.2.1.2.4. *Punica granatum*

Ze slupky *Punica granatum* L. (Punicaceae) byly izolovány dvě sloučeniny vykazující betasekretasovou inhibiční aktivitu – kyselina ellagová a punikalagin. U kyseliny ellagové byly prokázány účinky protinádorové a antioxidační. Obě sloučeniny inhibovaly BACE 1 v závislosti na své dávce s hodnotami $IC_{50} = 3,9 \mu\text{M}$ a 0,41 μM [71].

5.2.1.2.5. *Perilla frutescens* var. *acuta*

Z extraktu rostliny *P. frutescens* var. *acuta* izolovali Choi a kol. [72] kyselinu rozmarýnovou, která prokazovala inhibiční aktivitu vůči BACE 1 s hodnotou $IC_{50} = 21 \mu\text{M}$. Kyselina rozmarýnová se vyskytuje hlavně v čeledi Lamiaceae. Je známo, že má neuroprotektivní, antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační účinky. Mimo kyseliny rozmarýnové tento extrakt obsahoval i BACE 1 inhibitor, flavon luteolin.

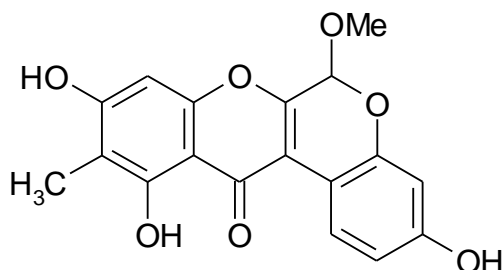
Iuvone T. a kol. [73] ve své studii hodnotili vliv standardizovaného extraktu z listů *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) a jeho účinné složky kyseliny rozmarýnové na $A\beta$ navozenou toxicitu u buněčných kultur (PC12 buněk). V této studii se potvrdily již výše zmíněné účinky kyseliny rozmarýnové, včetně vlivu antiapoptického.

5.2.1.3. Rotenoidy

5.2.1.3.1. *Abronia nana*

Abronia nana S. Wats. je rostlinou rodu *Abronia* (Nyctaginaceae), u kterého však doposavad nebylo provedeno moc fytochemických rozborů. Kromě toho nebyly také publikovány žádné zmínky o jeho biologické aktivitě. Rozšířených je pouze několik druhů rodu *Abronia*, mnohé jsou poměrně vzácné či endemické. Pro Parka a kol. [74] bylo k jejich studii obtížné získat potřebné množství rostlinného materiálu, aby mohli izolovat sekundární metabolity této rostliny, proto tuto překážku vyřešili suspenzními buněčnými kulturami.

Ze suspenzních kultur byly izolovány 4 sloučeniny s inhibiční aktivitou vůči BACE 1: C-methylrotenoid s názvem abronion A (do té doby neznámá sloučenina s $IC_{50} = 62,2 \mu M$) a tři již známé rotenoidy označované jako boeravinon D ($IC_{50} = 4,8 \mu M$) (Obr. 9), boeravinon A methylether a mirabijalon D ($IC_{50} = 4,2 \mu M$). Boeravinon A methylether vyvíjel pouze nepatrnou betasekretasovou inhibiční aktivitu [74].



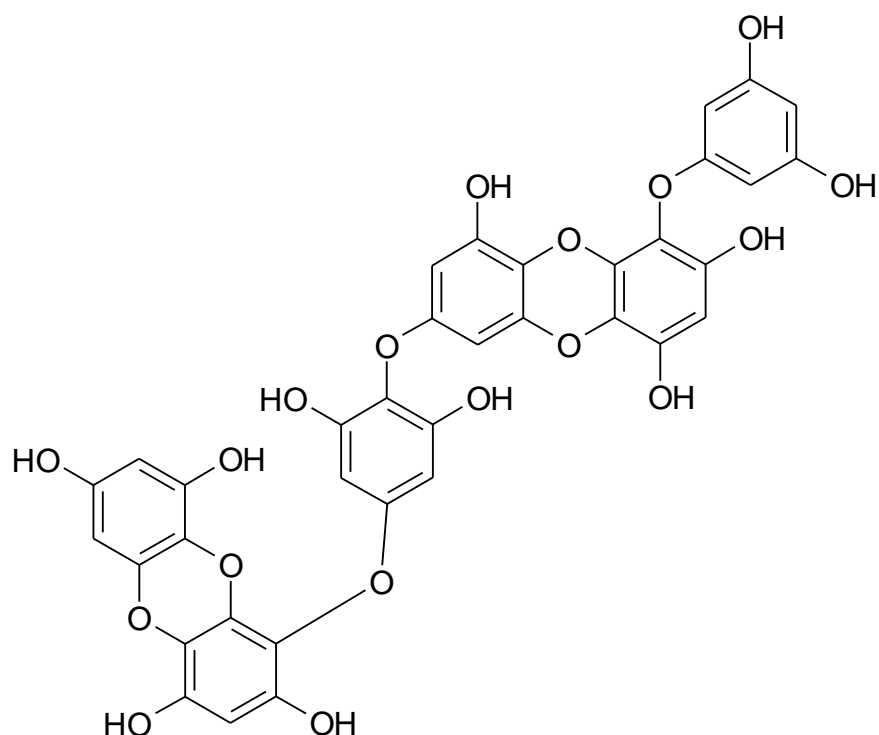
Obr. 9: Boeravinon D.

5.2.1.4. Florotaniny

5.2.1.4.1. *Eisenia bicyclis*

Eisenia bicyclis (Kijellman) Setchell (Lessoniaceae) je hnědá řasa bohatá na florotaniny. Je konzumována jako potravina a také je využívána k výrobě alginátu sodného. Florotaniny vykazují spoustu biologických účinků, kupříkladu protinádorové, hepatoprotektivní, protizánětlivé, antioxidační a antihyperlipidemické účinky [75].

V rámci prověřování BACE 1 inhibičních účinků florotaninů byla ethylacetátová frakce methanolového extraktu *E. bicyclis* shledána jako nejúčinnější. Jako účinné florotaniny s inhibičním účinkem byly izolovány: floroglucinol ($IC_{50} = 36,47 \mu M$), dioxinodehydroekol ($IC_{50} = 5,35 \mu M$), ekol ($IC_{50} = 12,20 \mu M$), florofurofukoekol-A ($IC_{50} = 2,13 \mu M$), diekol ($IC_{50} = 2,21 \mu M$) (Obr. 10), trifloroethol A ($IC_{50} = 11,68 \mu M$) a 7-floroethol ($IC_{50} = 8,59 \mu M$). V *in vitro* antioxidačních testech florotaniny vyvíjely silnou aktivitu proti ONOO⁻ a ROS [75].



Obr. 10: Diekol.

5.2.1.4.2. *Ecklonia cava*

Choi a kol. [8] izolovali z hnědé řasy *Ecklonia cava* Kjellman (Lessoniaceae) celkem 5 polyfenolických sloučenin a identifikovali je jako: ekol, 6,6'-biekol, 8,8'-biekol, diekol, a florofurofukoekol-A. Jedná se o oligomery floroglucinolu (benzen-1,3,5-triol), který je základní strukturální jednotkou polyfenolů řas, flortaninů. Flortaniny mají jedinečnou strukturu, která se u suchozemských rostlin nenachází. Zejména skupina dibenzo-1,4,-dioxinová se nachází u malého počtu druhů řas a díky nízké molekulové hmotnosti a rigidní struktuře je schopna interagovat s různými biologickými molekulami.

Choi a kol. [8] ve své studii hodnotili vliv výše zmíněných izolovaných sloučenin na aktivitu AChE, BChE, BACE 1 a GSK-3 β a na syntézu APP. Izolované sloučeniny vykazovaly mírnou inhibiční aktivitu na AChE v rozsahu μM , nejvyšší hodnota IC_{50} byla stanovena u 8,8'-biekolu ($\text{IC}_{50} = 16,0 \pm 9,4 \mu\text{M}$). Testované sloučeniny vyvíjely obecně vyšší inhibiční aktivitu na BChE než na AChE. Nejúčinnějšími inhibitory BChE byly diekol s $\text{IC}_{50} = 2,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$ a florofurofukoekol-A s $\text{IC}_{50} = 0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Sloučeninami, které významněji inhibovaly BACE 1, byly florofurofukoekol-A (58,3 %) a diekol (36,8%).

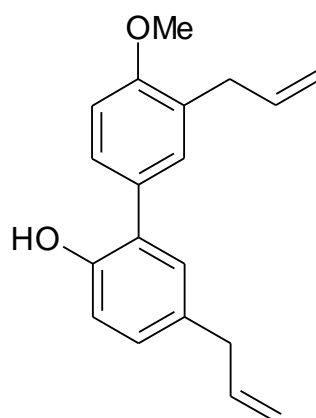
Inhibiční aktivita zde byla porovnávána v % inhibice a při koncentraci inhibitoru 1 μ M. Co se týče inhibice biosyntézy APP, jako nejaktivnější se ukázaly být sloučeniny florofurofukoekol-A a 8,8'-biekol. Polyfenoly z *E. cava* také vykazovaly v koncentraci 50 μ M 15-40% inhibici enzymu GSK-3 β , který spouští hyperfosforylaci τ -proteinu.

5.2.1.5. Lignany

5.2.1.5.1. *Magnolia officinalis*

Magnolia officinalis Rehd. ex Wils. (Magnoliaceae) se v TČM používá k léčbě neuróz, úzkostí, horečky a bolestí hlavy. Bioaktivními sloučeninami *M. officinalis* jsou magnolol, honokiol a obovatol, které jsou protizánětlivé a prostřednictvím antioxidantního účinku působí neuroprotektivně. Navíc u magnololu a honokiolu byl zjištěn inhibiční účinek na AChE [76; 77].

Lee a kol. [76] z ethanolového extraktu kůry *M. officinalis* izolovali novou sloučeninu 4-*O*-methylhonokiol. Ve své studii prokázali, že ethanolový extrakt *M. officinalis* a 4-*O*-methylhonokiol potlačily projevy poškozené paměti u myší, vyvolané působením A β ₁₋₄₂. Navíc 4-*O*-methylhonokiol snižoval buněčnou apoptózu navozenou A β ₁₋₄₂ *in vivo* a rovněž vykazoval přímé inhibiční účinky na agregaci a fibrilogenezi A β . Lee. a kol. v další *in vitro* studii zjistili, že 4-*O*-methylhonokiol (Obr. 11) omezuje tvorbu ROS indukovanou A β ₁₋₄₂ a zmírňuje neurotoxicitu nastolenou A β ₁₋₄₂ a peroxidem vodíku. Byla u něj také zjištěna přímá inhibiční aktivita na BACE 1 s hodnotou IC₅₀ = 10,3 μ M. 4-*O*-methylhonokiol BACE 1 inhiboval v závislosti na své dávce. Celkový extrakt z *M. officinalis* také inhiboval genovou expresi BACE 1 [76; 77].



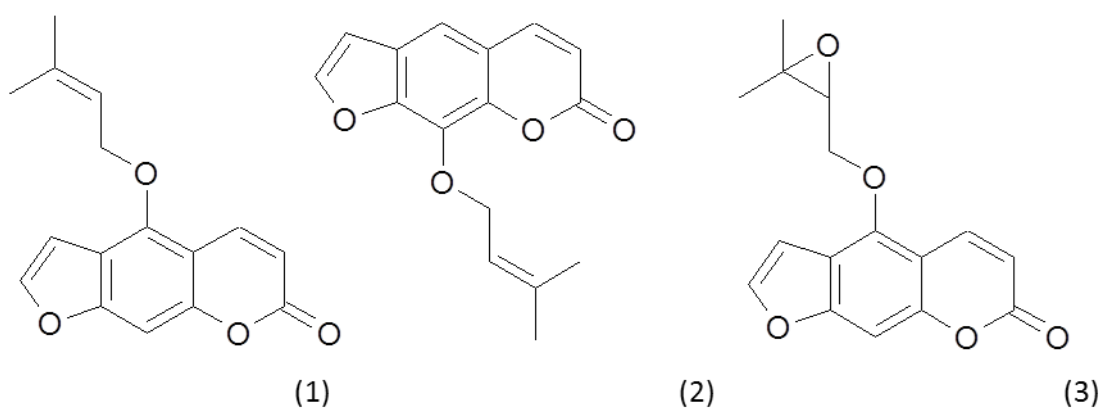
Obr. 11: 4-*O*-methylhonokiol.

5.2.1.6. Kumariny (furanokumariny)

5.2.1.6.1. *Angelica dahurica*

Angelica dahurica Hoffm. (Apiaceae) je vytrvalá bylina rostoucí v Koreji, Číně a Japonsku. Kořen tohoto druhu byl užíván v tradiční lidové medicíně k léčbě bolesti hlavy, krvácení a neuralgií [78].

Z extraktu kořene *A. dahurica* bylo izolováno pět sloučenin, vykazujících inhibiční účinek na BACE 1. Byly identifikovány jako furanokumariny. Jedná se o isoimperatorin, imperatorin, (+)-oxypeucedanin (Obr. 12), (+)-byakangelikol a (+)-byakangelicin. Všechny inhibovaly BACE 1 v závislosti na své dávce. Byly stanoveny jejich hodnoty IC_{50} . Ve výsledku vykazoval nejsilnější inhibiční schopnosti imperatorin s $IC_{50} = 91,8 \pm 7,5 \mu M$ a druhý nejsilnější (+)-byakangelikol s $IC_{50} = 104,9 \pm 2,4 \mu M$. Molekuly furanokumarinů mají nízkou molekulovou hmotnost a mohly by po perorálním či transdermálním podání přejít přes HEB. Také bylo u těchto pěti sloučenin pozorováno, že jejich inhibiční aktivita je ovlivněna jejich strukturou. Inhibitor imperatorin mající skupinu 3-methylbut-2-enoxy na C8 měl silnější inhibiční aktivitu než isoimperatorin s touto skupinou na C5. (+)-oxypeucedanin, který byl slabším inhibitorem než isoimperatorin, měl tutéž skupinu na C5 a navíc dvojná vazba byla zde nahrazena epoxy skupinou [78].



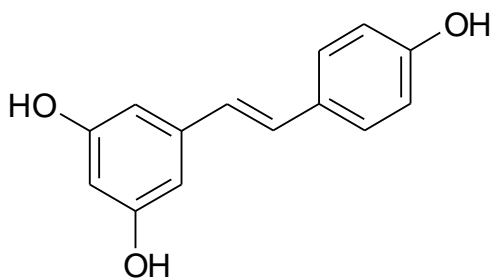
Obr. 12: Isoimperatorin (1), imperatorin (2) a (+)-oxypeucedanin (3).

5.2.1.7. Stilbeny

5.2.1.7.1. *Smilax china*

V rámci hledání inhibitorů BACE 1 z přírodních zdrojů, bylo zjištěno, že rozpustná ethylacetátová frakce ze *Smilax rhizoma*, vykazuje silnou inhibiční aktivitu. Byly použity oddenky druhu *Smilax china* L. (Smilacaceae). Jako aktivní sloučeniny byly identifikovány směs *trans/cis* resveratrolu ($IC_{50} = 15 \mu M$), oxyresveratrol ($IC_{50} = 7,6 \mu M$), verafenol ($IC_{50} = 4,2 \mu M$) a *cis*-scirpusin A ($IC_{50} = 10 \mu M$). Byla prokázána jejich nekompetitivní inhibice vůči BACE 1 s účinkem závislým na jejich dávce [79].

Je známo, že samotný resveratrol chrání před kardiovaskulárními onemocněními a rakovinným bujením, přisuzují se mu také účinky antioxidační, antibakteriální a protistárnoucí. Kromě *S. china* je hojně nalézán také ve slupkách a jadércích *Vitis vinifera*, *Arachis hypogea*, v rostlinách z rodu *Morus* či ve slupkách *Citrus paradisis*. Resveratrol (Obr. 13) má dvě izomerické formy, biologicky inaktivní *cis*-formu a aktivní *trans*-formu [80].



Obr. 13: Resveratrol.

5.2.1.7.2. *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana*

Jiná studie Hu a kol. [81] zjistila inhibiční účinnost vůči BACE 1 u trimeru resveratrolu, miyabenolu C. Ten byl izolován ze stonků a listů rostliny *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* Sieb. et Zucc (Vitaceae), ale je také nalézán u jiných druhů z rodu *Vitis*. Především studie objevily u miyabenolu C účinky antiproliferační, pro-apoptické u nádorových buněk, inhibiční vůči protein-kinasám a estrogenní. Hu J. a kol. na buněčných strkturách prokázali, že miyabenol C může výrazně snížit sekreci A β a zvýšit uvolňování sAPP α . Miyabenol C snižoval aktivitu BACE 1 *in vitro* i *in vivo* a neměl vliv na γ -sekretasu ani α -sekretasu.

5.2.1.7.3. *Vitis vinifera*

Choi a kol. [82] objevili BACE 1 inhibiční aktivitu u sloučenin izolovaných z extraktu kůry *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). Jednalo se o dimer resveratrolu, (+)-vitisinol E ($IC_{50} = 14,4 \pm 0,3 \mu M$), a čtyři oligomery resveratrolu, (+)- ϵ -viniferin ($IC_{50} = 10,6 \pm 0,2 \mu M$), (+)-ampelopsin A ($IC_{50} = 26,6 \pm 0,2 \mu M$), (+)-vitisin A ($IC_{50} = 0,8 \pm 0,1 \mu M$) a (-)-vitisin B ($IC_{50} = 0,4 \pm 0,1 \mu M$).

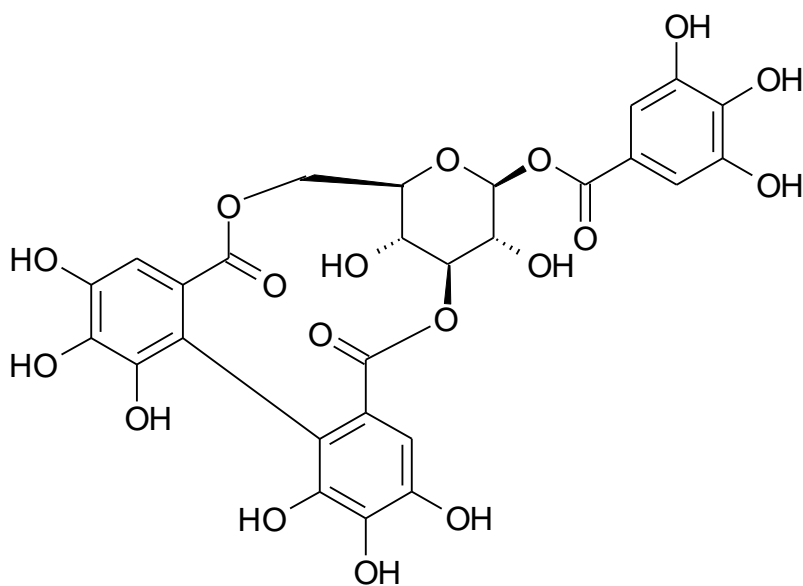
5.2.1.7.4. *Paeonia lactiflora*

Betasekretasová inhibiční aktivita oligomerů resveratrolu byla rovněž zjištěna ve studii Choi a kol. [83]. Zde byly resveratrolové oligomerní sloučeniny izolovány z extraktu semene *Paeonia lactiflora* Pall. (Paeoniaceae). Jedna z aktivních sloučenin byla identifikována jako (-)-7a,8a-cis- ϵ -viniferin.

5.2.1.8. Ellagitanniny

5.2.1.8.1. *Geranium thunbergii*

Z *Geranium thunbergii* Siebold ex Lindl. & Paxt. (Geraniaceae) byly izolovány dvě sloučeniny s betasekretasovou inhibiční aktivitou – geraniin a korilagin (Obr. 14) s hodnotami $IC_{50} = 4 \mu M$ a $IC_{50} = 34 \mu M$ [84].

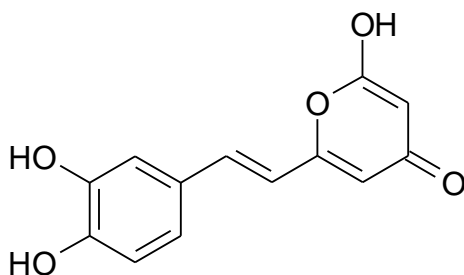


Obr. 14: Korilagin.

5.2.1.9. Styrylpyrony

5.2.1.9.1. *Phellinus linteus*

Phellinus linteus (Berkeley & M. A. Curtis) Teng (Hymenochaetaceae) je léčivá houba, která se již po staletí v asijských zemích používá k léčbě dyspepsií, průjmů a krvácení. Existují vědecky podložené důkazy o jejím příznivém působení na imunitu a protizánětlivém účinku. Také potlačuje růst nádorů a metastáz indukci apoptózy. Z kultivačního média *P. linteus* byl izolován nekompetitivní inhibitor BACE 1, hispidin (Obr. 15). Ten inhiboval BACE 1 s hodnotou $IC_{50} = 4,9 \mu M$ [85; 86].



Obr. 15: Hispidin.

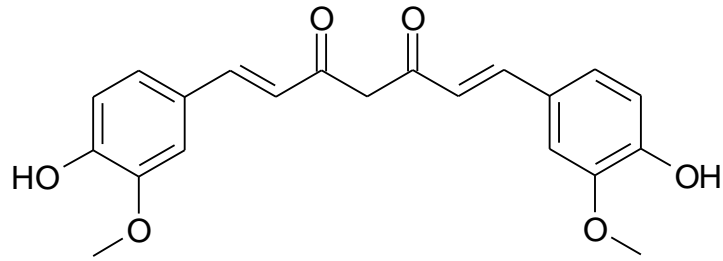
5.2.1.9.2. *Auricularia polytricha*

Benett a kol. [87] zkoumali vliv extraktů z tepelně upravených hub na aktivitu BACE 1. Inhibiční aktivita byla objevena u polyfenolů odvozených od hispidinu, izolovaných z houby *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc. (Auriculariaceae). Tyto sloučeniny se nacházely v tepelně upravené i neupravené houbě.

5.2.1.10. Diarylheptanoidy

5.2.1.10.1. *Curcuma longa*

Z oddenků *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) byly izolovány sloučeniny kurkumin ($IC_{50} = 560 \mu M$) (Obr. 16), demethoxykurkumin ($IC_{50} = 630 \mu M$), bisdemethoxykurkumin ($IC_{50} = 1500 \mu M$). Kurkumin má také účinky antioxidační, protinádorové a protizánětlivé. V této studii se také hodnotila inhibiční aktivita methanolového extraktu z oddenků *C. longa* na aktivitu AChE v koncentracích 250 $\mu g/ml$ (53,7 %) a 500 $\mu g/ml$ (76,4 %) [88].



Obr. 16: Kurkumin.

Studie Liu a kol. [89] zkoumala vliv směsi kurkuminoidů na A β -42, APP a BACE 1. Kurkumin se ukázal být neaktivnější sloučeninou. Účinně snižoval produkci A β -42 a expresi proteinu APP. V další studii Wang a kol. [90] hodnotili vliv kurkuminoidů z oddenku *C. longa* na aktivitu BACE 1 a chování u modelového organismu *Drosophila melanogaster* s navozenou AD (indukovanou nadměrnou expresí genu pro BACE 1 a jeho substrát APP). Nadměrná exprese APP/BACE 1 se projevila pohybovými poruchami. Nejvyšší inhibiční aktivity BACE 1 dosahovala sloučenina bisdemethoxykurkumin s hodnotou IC₅₀ = 17 μ M. Podávání kurkuminoidů snižovalo u modelového organismu vývoj behaviorálních a morfologických vad.

Kurkumin také příznivě ovlivňuje degradaci τ -proteinu. Huang a kol. [91] ve své studii na buněčných strukturách testovali inhibiční účinky kurkuminu na buněčnou signalizaci hyperfosforylace τ -proteinu navozenou A β . Výsledky studie dokládají důkazy o schopnosti kurkuminu inhibovat tuto buněčnou signalizaci.

Kurkumin byl pro svůj komplexní účinek (inhibice BACE 1, AChE a ovlivnění degradace τ - proteinu) podroben testování v klinické studii pro léčbu AD [92]. Tato studie byla randomizovaná a dvojitě zaslepená. Byl testován účinek oproti placebo. Kurkumin byl dobře snášen. Tato studie však klinickou účinnost kurkuminu na průběh AD neprokázala. Byly však získány informace o nízké BD [88].

5.2.2. Flavonoidy

5.2.2.1. Flavony

5.2.2.1.1. *Nelumbo nucifera*

Studie Jung a kol. [93] porovnávala biologickou aktivitu různých částí rostliny *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Nelumbonaceae). Konkrétně byla hodnocena inhibiční

aktivita vůči BACE 1, AChE, BChE a schopnost vychytávat peroxynitrit ONOO^- . Značný inhibiční potenciál vykazoval extrakt embrya ze semene *N. nucifera*, a proto byl podroben detailnějšímu prozkoumání. Z extraktu byl izolován flavon vitexin s inhibiční aktivitou vůči BACE 1 s $\text{IC}_{50} = 19,25 \pm 3,03 \mu\text{M}$, AChE s $\text{IC}_{50} = 16,62 \pm 1,43 \mu\text{M}$, a BChE $\text{IC}_{50} = 11,53 \pm 2,21 \mu\text{M}$. Extrakt embrya ze semene *N. nucifera* také vykazoval významnou schopnost vychytávat ONOO^- s hodnotou $\text{IC}_{50} = 4,96 \pm 1,06 \mu\text{M/ml}$. Z extraktu embrya ze semene *N. nucifera* byly ještě izolovány bisbenzylisochinolinové alkaloidy s BACE 1 inhibiční aktivitou.

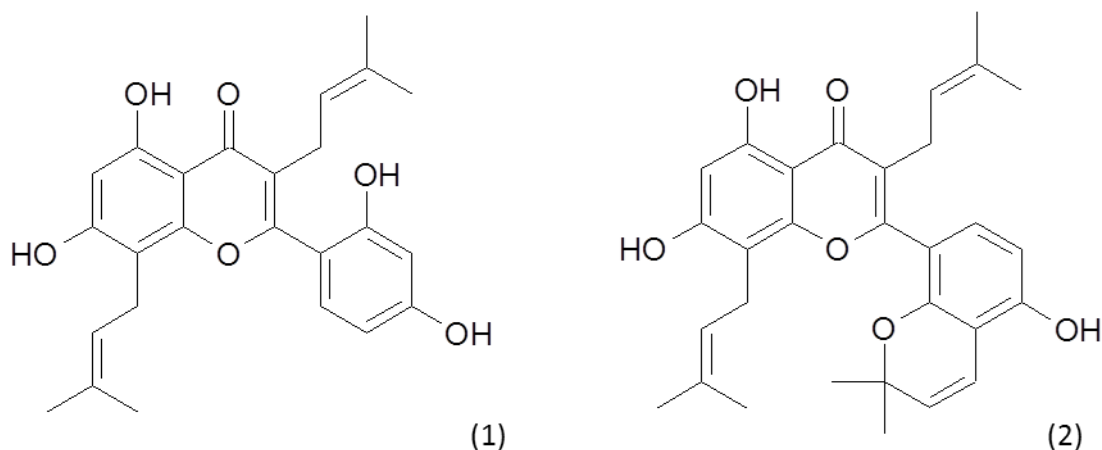
5.2.2.1.2. *Morus lhou*

Cho a kol. [94] ve své studii prokázali, že flavony obsažené v kůře kmene *Morus lhou* L. (Moraceae) inhibují BACE 1. Bioaktivními složkami této rostliny jsou dále kumariny a terpenoidy. Extrakty vykazují širokou škálu farmaceutických účinků, zejména neuroprotektivní, hypoglykemické, antibakteriální a protizánětlivé.

Značnou inhibiční aktivitu vykazoval methanolový extrakt *M. lhou* s $\text{IC}_{50} = 78,4 \mu\text{g/ml}$. Z extraktu bylo izolováno osm flavonových sloučenin s inhibiční aktivitou, z nichž většina byla prenylovaných (nesoucích hydrofobní 3-methyl-but-2-en-1-ylovou skupinu). Tyto sloučeniny byly identifikovány jako norartokarpetin, kuwanon C (Obr. 17), morusin, kuwanon A (Obr. 17), cyklomorusin, morusinol, neocyklomorusin a mormin. Všechny sloučeniny vykazovaly v závislosti na dávce reverzibilní inhibici BACE 1 aktivity. Hodnoty IC_{50} identifikovaných sloučenin se pohybovaly v rozmezí 3,4 až 146,1 μM . Nejúčinnějšími sloučeninami byly kuwanon C s $\text{IC}_{50} = 3,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$ a kuwanon A s $\text{IC}_{50} = 5,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ [94].

U výše zmíněných sloučenin byl hledán vztah mezi strukturou a inhibičním účinkem. Všechny struktury mají společnou resorcinolovou skupinu a prenylované sloučeniny jsou účinnější než nesubstituovaná analoga. Kuwanon C, nesoucí prenylované skupiny na C3 a C8, vykazoval nejsilnější inhibiční betasekretasovou aktivitu. Zvýšení hydrofilicity navázáním hydroxyly na prenylovou skupinu vedlo ke snížení účinku. Sloučeniny, u kterých nebyly hydroxyly resorcinolové skupiny substituované, vykazovaly silnější inhibiční aktivitu. Nižší aktivitu měly sloučeniny, u nichž byly prenylové skupiny součástí uzavřeného pentacyklu. Z toho se dá usoudit,

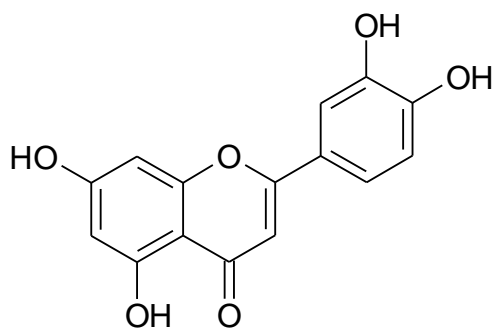
že nezbytnou pro inhibici je volná hydroxylová skupina na C7 a/nebo také vhodná konformace kruhů A a C, kterou nelze vytvořit u pentacyklických analogů. Nejsilnější inhibitory měly volnou resorcinolovou skupinu a nejméně jednu prenylovou skupinu na C3 na kruhu A [94].



Obr. 17: Kuwanon C (1) a kuwanon A (2).

5.2.2.1.3. Luteolin

Luteolin (Obr. 18) je po chemické stránce 5, 7, 3', 4' – tetrahydroxyflavon a je jedním nejčastějších rostlinných flavonoidů. Je přítomen zejména ve formě glykosidů. Glykosidické sloučeniny odvozené od luteolinu jsou například orientin, isoorientin nebo cynarosid. Luteolin je nalézán nejen u rostlin krytosemenných, ale také v mechorostech, kapradňorostech a jehličnanech. Tento flavonoid a jeho glykosidy se vyskytují ve více než 213 druhů rostlin, které se používají jako koření nebo v tradičních medicínách. Luteolin je obsažen například v *Apium graveolens*, *Capsicum annuum*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Olea europaea* nebo *Origanum vulgare*. Luteolin se jako aglykon nebo glykosid nachází také u rostlin ovlivňujících CNS. Mezi tyto se řadí zejména *Bacopa monieri*, *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum*, *Hypericum brasiliense*, *Melissa officinalis*, *Passiflora incarnata* (a *P. edulis*, *P. caerulea*, *P. alata*), *Papaver rhoeas*, *Tanacetum parthenium*, *Vitex agnus-castus* a *Centella asiatica* [57].



Obr. 18: Luteolin.

Četné studie se shodují, že luteolin má potenciál k prevenci a léčbě mnoha chorob. Tento flavonoid má protizánětlivé, antioxidační, antimikrobiální a antiapoptické účinky. Navíc inhibuje proteinkinasu C, trijodthyronin deiodinazu či NADPH-oxidasu. V současné době řada studií naznačuje, že luteolin funguje v prevenci rakoviny. Dosáhl určitého terapeutického potenciálu u buněčných kultur rakoviny prsu, cervikálního karcinomu, rakoviny tlustého střeva, rakoviny plic a karcinomu prostaty [57].

Luteolin a jeho glykosidy mají neuroprotektivní účinky. Jedna z *in vitro* studií ukázala, že luteolin (izolovaný ze zralých semen rostliny *Perilla frutescens*) značně omezil nárůst produkce ROS a v primární kultuře kortikálních neuronů výrazně zvrátil neurotoxicitu navozenou peroxidem vodíku [57].

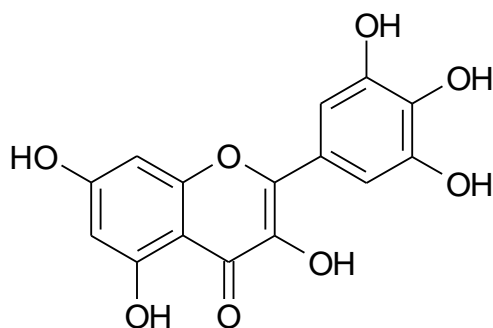
Studie Choi a kol. [72] prokázala v methanolovém extraktu *Perilla frutescens* var. *acuta* (Thunb.) Kudo (Lamiaceae) luteolin, který inhiboval BACE 1 s hodnotou $IC_{50} = 0,5 \mu M$. Kromě luteolinu Choi a kol. z tohoto extraktu izolovali ještě kyselinu rozmarýnovou s inhibičními účinky na BACE 1.

V jiné studii, provedené Liu a kol. [95] znovu potvrdili neuroprotektivní účinky luteolinu, tentokrát izolovaného z *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. (Lamiaceae). Prokázali, že se po podání luteolinu snížila sekrece A β -42, dále se zvýšila životnost buněk a aktivita SOD 1 a snížilo se uvolňování ROS. Tato studie se prováděla na buněčné linii SH-SY5Y s nadměrnou expresí APP se švédskou mutací při mědi vyvolané neurotoxicitě.

Také bylo zjištěno, že luteolin podávaný u myší zlepšil cholinerní neuronální aktivitu prostřednictvím inhibice AChE a zvýšil hladinu ACh v mozkové kůře [96].

5.2.2.1.4. Myricetin

Myricetin (MYR) je po chemické stránce 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavon (Obr. 19). MYR jako takový se nachází v jádrovém dřevě *Soymidia febrifuga* a nadzemních částech *Haplopappus canescens*. Velmi rozšířené jsou i jeho glykosidické formy, například jeho 3-glukosid se vyskytuje v okvětních lístcích *Primula sinensis*, 3-galaktosid v listech *Camellia sinensis* nebo 3-arabinosid v bobulích *Vaccinium macrocarpon*. MYR byl také nalezen v kůře kmene *Myrica rubra*. Nedávné fytochemické analýzy provedené Sultanem a Anwarem [97] ukázaly, že MYR je obsažen v nejvyšších množstvích sestupně v listech *Spinacia oleracea*, květech *Brassica oleracea*, kořenech *Daucus carota*, kořenech *Brassica rapa* a v semenech *Pisum sativum*. MYR je rovněž významně obsažen v listech *Moringa oleifera*, *Aloe barbadensis*, v plodech *Ficus religiosa* a kůře *Acacia nilotica* [57].



Obr. 19: Myricetin.

MYR inhibuje aktivitu testosteron 5 α -reduktasy a má tedy významný antiandrogenní účinek. V současné době je klasifikován jako flavonoid s výraznými antioxidantními účinky. Výsledky novějších studií poukazují také na jeho neuroprotektivní účinek, jehož dosahuje ovlivněním tvorby A β a inhibicí sekretas. Myricetin také vykazoval významnou anxiolytickou aktivitu modifikací serotonergního přenosu [57].

Shimmyo a kol. [98] použili k objasnění účinku MYR na sekreci A β a sekretasovou aktivitu model s vyvolanou neurotoxitou. Primární kortikální neurony potkanů byly vystaveny působení A β -42 (1 μ M) po dobu 48 hodin. Bylo zjištěno, že MYR o koncentraci 10 μ M v buněčné kultuře výrazně snížil hladinu A β -40 i A β -42. MYR o koncentraci 10 μ M snížil aktivitu BACE 1 v neuronech o 75 %. Hodnota IC₅₀ pro

myricetin byla 2,8 μM . Po podání MYR byla také zjištěna zvýšená neuronální aktivita α -sekretasy a snížená aktivita enzymu kaspasy-3.

5.2.2.2. Flavanony

5.2.2.2.1. *Balanophora involucrata*

V *Balanophora involucrata* Hook. f. (Balanophoraceae) byly objeveny inhibitory BACE 1 flavanonového typu. *B. involucrata* je parazitním organismem, který roste na kořenech rostlin rodu *Rhododendron* v jižní Číně. Zde se také celá rostlina tradičně používá jako analgetikum a protizánětlivý prostředek. Phytochemické studie objevily přítomnost triterpenických látek, taninů, fenylpropanoidů, flavonoidů a jejich glykosidů [99].

Během screeningu BACE 1 přírodních inhibitorů Tao a kol. [99] zjistili, že ethylacetátový podíl extraktu z celé rostliny *B. involucrata* vykazuje významnou inhibiční aktivitu vůči BACE 1. Následný phytochemický rozbor této rostliny vedl k identifikaci a izolaci dvou flavanonů. Významné inhibiční aktivity vůči BACE 1 dosáhla v koncentraci 10 μM sloučenina (S)-5,7,3',5'-tetrahydroxy-flavanon-7-O- β -D-glukopyranosid (10,4 % inhibice). Kromě flavanonů obsahoval extrakt z *B. involucrata* i dihydrochalkonové sloučeniny s BACE 1 inhibiční aktivitou [99].

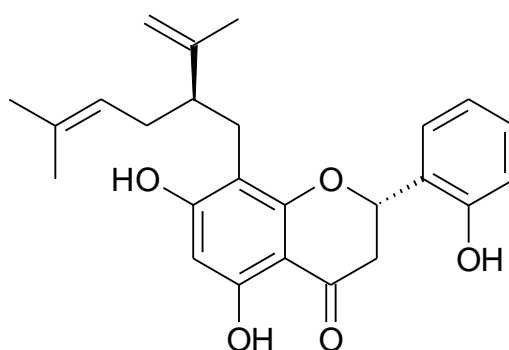
5.2.2.2.2. *Sophora flavescens*

Sophora flavescens Aiton (Fabaceae) (Obr. 20) je trvalým keřem, jehož sušený kořen *Sophorae radix* je tradiční rostlinnou drogou používanou v severovýchodní Asii. Přisuzují se jí účinky protirakovinné, protizánětlivé, antipyretické, analgetické a anthelmintické. Z chloroformové frakce kořene této rostliny byly izolovány a identifikovány osm lipofilních alkylovaných flavanonových sloučenin, z nichž pět látek prokázalo při testování silnou inhibiční aktivitu vůči BACE 1, a sice: sophoraflavanon G (IC_{50} = 5,2 μM), kurarinon (IC_{50} = 3,3 μM), leachianon A (IC_{50} = 8,4 μM), kushenol A (IC_{50} = 2,6 μM) (Obr. 21) a (2S)-20-methoxy kurarinon (IC_{50} = 6,7 μM). Izolované sloučeniny se podrobily testování na buněčných strukturách i *in vitro*. U všech sloučenin byla zjištěna nekompetitivní inhibice a snižování sekrece $\text{A}\beta$ v závislosti na jejich dávce. Co se struktury týče, všechny sloučeniny tvoří flavanonový skelet s navázanou 5-methyl-2-(prop-1-en-2-yl)hex-4-en-1-ylovou skupinou [100; 101].



Obr. 20 *Sophora flavescens* [102].

Jung a kol. [103] ve své studii navázali na předchozí zjištění o inhibiční účinnosti flavanonových sloučenin ze *Sophora flavescens*, které ač byli v extraktu ve vysoké koncentraci, jejich inhibiční aktivita vůči BACE 1 nespĺnila vysoká očekávání. Navíc bylo prokázáno, že chalkony a flavonoly mají vyšší biologickou aktivitu než flavanonony. Tato fakta vedla k dalšímu hledání jiných možných složek, které by potencionálně mohli přispívat k silné inhibiční aktivitě extraktu *S. flavescens*. Jung a kol. objevili inhibiční aktivitu vůči BACE 1 ještě u flavanonové sloučeniny leachianonu G ($IC_{50} = 8,56 \mu M$) z dichlormethanolové frakce extraktu. Z extraktu *S. flavescens* byly izolovány ještě chalkony a flavonoly s betasekretasovou inhibiční aktivitou.



Obr. 21: Kushenol A.

5.2.2.2.3. *Psoralea corylifolia*

Choi a kol. [104] izolovali z extraktu semen *Psoralea corylifolia* L. (Fabaceae) flavanonové sloučeniny 7,8-dihydro-8-(4-hydrofenyl)-2,2-dimethyl-2 H,6 H-[1,2- B:5,4-

B']dipyran-6-on ($IC_{50} = 1,6 \pm 0,1 \mu M$) a bavachinin ($IC_{50} = 3,8 \pm 0,2 \mu M$). Z rostliny *P. corylifolia* byl izolován ještě BACE 1 inhibitor terpenového typu a jiné flavonoidy s betasekretasovou inhibiční aktivitou.

5.2.2.3. Chalkony a dihydrochalkony

5.2.2.3.1. *Balanophora involucrata*

Balanophora involucrata, ze které byla izolována výše zmíněná aktivní flavanonová sloučenina (S)-5,7,3',5'-tetrahydroxy-flavanon-7-O- β -D-glukopyranosid, obsahuje i BACE 1 inhibitory dihydrochalkonového typu. V koncentraci 100 μM byla nejsilnějším inhibitorem dihydrochalkonová sloučenina 3,4,2',6'-tetrahydroxydihydroflavon-4'-O- β -D-glukopyranosid (21,4% inhibice) [99].

5.2.2.3.2. *Sophora flavescens*

Jung a kol. [103] dále z extraktu *Sophora flavescens* izolovali další BACE 1 inhibitory: kuraridinol ($IC_{50} = 7,10 \mu M$) a kuraridin ($IC_{50} = 6,03 \mu M$) a xanthohumol ($IC_{50} = 7,19 \mu M$). Extrakt *S. flavescens* obsahuje mimo těchto chalkonů ještě flavonoly a flavanony s inhibiční aktivitou vůči BACE 1.

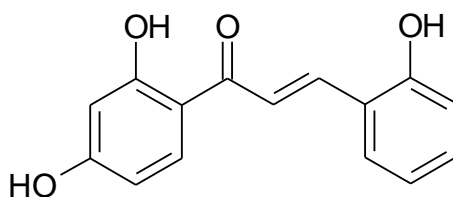
5.2.2.3.3. *Psoralea corylifolia*

Choi a kol. [104] ze semen *Psoralea corylifolia*, kromě jiných flavonoidů a sloučenin terpenické struktury s BACE 1 inhibiční aktivitou, izolovali ještě chalkony bavachromen ($IC_{50} = 7,2 \pm 0,2 \mu M$), isobavachromen ($IC_{50} = 9,8 \pm 0,3 \mu M$) a bavachalkon ($IC_{50} = 10,2 \pm 0,3 \mu M$).

5.2.2.3.4. *Glycyrrhiza glabra*

Glycyrrhiza glabra L. (Fabaceae) je vytrvalá rostlina a má velmi dlouhou tradici užívání. Čínští lékaři lékořiči používali po staletí k léčbě hepatitidy. Mnohé laboratorní studie prokázaly její antibakteriální a antimykotické působení. Tradičně se využívá při léčbě kašle a nachlazení, gastritidě, pálení žáhy, kožních a jaterních onemocněních. V poslední době se objevuje stále více poznatků o použití *G. glabra* v souvislosti s demencemi. Například bylo zjištěno, že její vodný extrakt výrazně zlepšuje kognitivní deficit u myší, vyvolaný podáním skopolaminu [55].

Zhiyuan a kol. [55] ve svém výzkumu zjistili, že sloučenina 2,2',4'-trihydroxychalkon (THCH) obsažená v *G. glabra* funguje jako BACE 1 inhibitor a účinně zmírňuje poruchy paměti u myší. THCH (Obr. 22) má antioxidační, protizánětlivé a protinádorové účinky. THCH inhiboval rekombinantní BACE 1 s hodnotou $IC_{50} = 2,45 \mu\text{M}$ a jednalo se o nekompetitivní inhibici. THCH potvrdil své specifické inhibiční vlastnosti vůči BACE 1 i v buněčných kulturách a u transgenních myší. V obou případech snižoval produkci A β -40 a A β -42. U myší bylo zjištěno zmenšení amyloidních plaků v hipokampu a zlepšení poruch paměti – to bylo zjištěno pomocí testu Morrisonova vodního bludiště, pomocí kterého se ověřuje myší prostorová paměť. Výhodou THCH je jeho nízká molekulová hmotnost, která mu umožňuje prostoupit přes HEB.

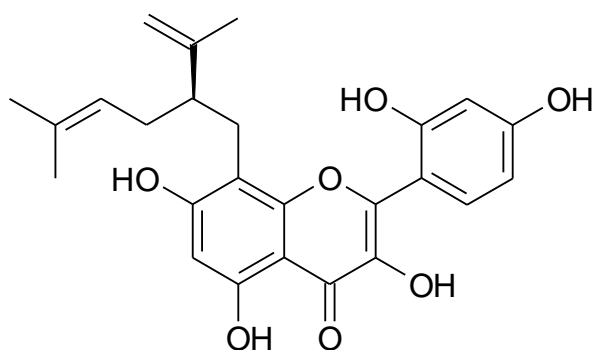


Obr. 22: 2,2',4'-trihydroxychalkon.

5.2.2.4. Flavonoly

5.2.2.4.1. *Sophora flavescens*

Jung a kol. [103] zjistili betasekretasovou inhibiční aktivitu u flavonolů 8-lavandulylkempferolu ($IC_{50} = 7,29 \mu\text{M}$) a kushenolu C ($IC_{50} = 5,45 \mu\text{M}$) (Obr. 23), izolovaných z ethylacetátové frakce extraktu *Sophora flavescens*. Mimo jiné ve stejné studii byl u 8-lavandulylkempferolu zjištěn také významný inhibiční účinek na BChE a AChE. Z dichlormethanolové frakce extraktu byl ještě izolován desmetylanhydroikaritin ($IC_{50} = 1,86 \mu\text{M}$). Mimo těchto flavonolů byly u *S. flavescens* prokázány i BACE 1 inhibitory chalkonového a flavanonového typu. Studie Junga a kol. dokládá, že chalkony a flavonoly spíše než flavanony stojí za silnou inhibiční betasekretasovou aktivitou extraktu *S. flavescens*.



Obr. 23: Kushenol C.

5.2.2.4.2. *Petasites japonicus*

Z extraktu listů *Petasites japonicus* (Siebold & Zucc.) Maxim. (Asteraceae) byly izolovány dvě sloučeniny s betasekretasovou inhibiční aktivitou – kvercetin a kempferol 3-*O*-(6''-acetyl)- β -glukopyranosid. Hodnota IC_{50} u kvercetinu byla stanovena 2,1 μ M [105].

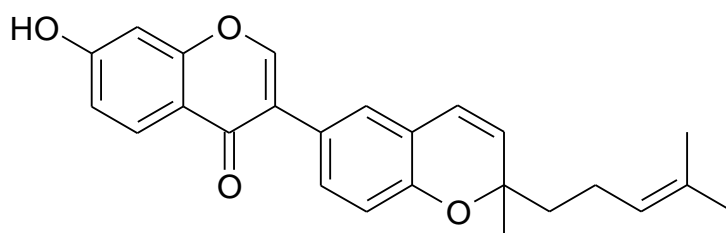
5.2.2.5. Isoflavony

5.2.2.5.1. *Ficus benjamina*

Rozbor aktivního extraktu z plodů *Ficus benjamina* (Miq.) Barrett. (Moraceae) vedl k izolaci šesti nových sloučenin typů isoflavonů. Některé isoflavony vykazovaly pouze mírnou betasekretasovou inhibiční aktivitu [106].

5.2.2.5.2. *Psoralea corylifolia*

Ze semen rostliny *Psoralea corylifolia* byla izolována nová isoflavonová sloučenina neokorylin s betasekretasovou inhibiční aktivitou vůči BACE 1 ($IC_{50} = 0,7 \pm 0,1 \mu$ M). *P. corylifolia* obsahuje kromě neokorylinu (Obr. 24) i jiné BACE 1 inhibitory flavonoidového a terpenového typu [104].

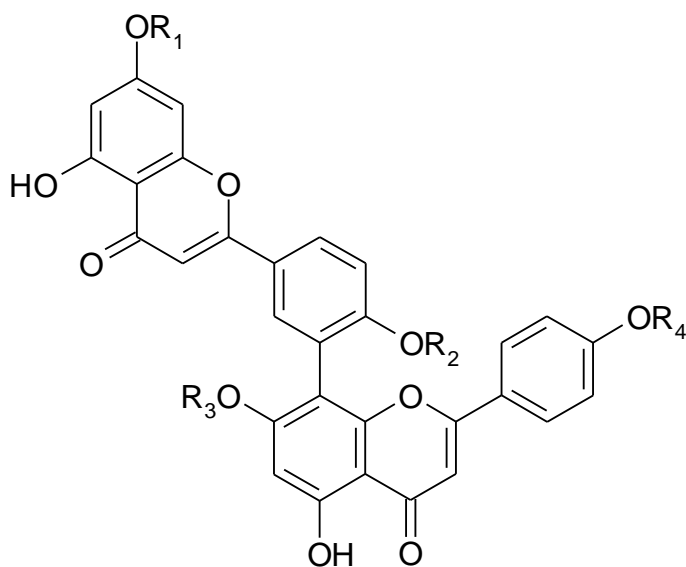


Obr. 24: Neokorylin.

5.2.2.6. Flavonoidní dimery amentoflavonového typu

Biflavonoidy jsou rostlinné látky obsažené hlavně u nahosemenných rostlin. Jedná se o flavonoidové dimery spojené vazbami C-C nebo C-O-C. Inhibiční účinek vůči BACE 1 byl popsán u biflavonoidů amentoflavonového typu [107].

Sasaki a kol. [107] podrobili chloroformové a acetonové extrakty různých rostlin analýze a identifikovali 21 biflavonoidních sloučenin. Většina z nich byla amentoflavonového typu s flavonoidy spojenými vazbou mezi uhlíky C3' a C8''. Sloučeniny, které dosahovaly nejvýznamnějších IC₅₀ hodnot byly: 2,3-dihydro-6-methylginkgetin (IC₅₀ = 0,35 μM) izolovaný z *Cephalotaxus harringtonia* var. *fastigiana* (Carrière) Rehder, (Taxodiaceae), 2,3-dihydroamentoflavon (IC₅₀ = 0,75 μM) z extraktu *Cycas revoluta* Thunb., (Cycadaceae), podokarpusflavon A (IC₅₀ = 0,99 μM) z *Podocarpus macrophyllus* var. *macrophyllus* Thunb. (Podocarpaceae) a sekvojaflavon (IC₅₀ = 1,4 μM) a amentoflavon (IC₅₀ = 1,54 μM) ze stromu *Cunninghamia lanceolata* (Lambert) Hooker (Cupressaceae) [107].



Obr. 17: Obecný vzorec biflavonoidu amentoflavonového typu.

Výsledky dokládají, že pro betasekretasovou inhibiční aktivitu je potřebná přítomnost biflavonoidu sestávající se ze dvou molekul apigeninu (4',5,7-trihydroxyflavon), spojených v polohách C3' a C8'' a také dvou či více hydroxylových skupin v R1 a R4 pozicích (Obr. 17). Navíc přítomnost methylu v pozici C6 zvyšuje inhibiční účinnost [107].

Bylo také prokázáno, že některé z amentoflavonových biflavonoidů působí neuroprotektivně v případě neuronů, u kterých byla navozena buněčná smrt oxidačním stresem a produkcí A β [107].

Biflavonoidním sloučeninám se také věnovala studie Shrestha a kol. [108]. Ti izolovali 6 biflavonoidů z plodů *Rhus parviflora* Roxb. (Anacardiaceae) a posuzovali jejich cytotoxické a neuroprotektivní účinky. Pouze u jednoho z izolovaných biflavonoidů byla zjištěna betasekretasová inhibiční aktivita, a sice u agathisflavonu s IC₅₀ = 10 μ M.

5.2.3. Kumarano-chroman-4-ony

5.2.3.1. *Ficus benjamina*

Z aktivního extraktu plodů *Ficus benjamina* (Miq.) Barrett. (Moraceae) byly kromě isoflavonů izolovány ještě dvě sloučeniny se strukturou kumarano-chroman-4-on. Obě kumaranové sloučeniny měly jen mírnou betasekretasovou inhibiční aktivitu [106].

5.2.4. Chromony

5.2.4.1. *Aloe vera* a *Aloe nobilis*

Z *Aloe vera* (L.) Burm. f. a *Aloe nobilis* Haw. (Xanthorrhoeaceae) byly izolovány chromonony allo-aloesin D, C-2'-dekumaroil-aloesin G, 2'-O-kumaroil-(S)-aloesinol a 2'-O-[P-methoxy-(E)-cinnamoyl]-(S)-aloesinol s inhibiční aktivitou vůči BACE 1 [109].

5.2.5. Terpeny

Vlastnosti terpenoidů jsou pro inhibici BACE 1 velice příhodné, mají nízkou molekulovou hmotnost a jsou hydrofobní. Tyto atributy zajišťují jejich schopnost přestupu přes HEB a PM [110].

5.2.5.1. Monoterpeny

5.2.5.1.1. *Lavandula luisieri*

Videira a kol. [110] testovali několik silic, z nichž jedna vykazovala betasekretasovou inhibiční aktivitu, a to silice z *Lavandula luisieri* Rivas Mart. (Lamiaceae) (Obr. 12). Rostlina *L. luisieri* je endemitem, rostoucím na Pyrenejském

poloostrově a její silice je tvořena neobvyklými nekrodanovými (1,2,2,3,4-pentamethylcyklopentanovými) monoterpenoidy. Tato silice má antimikrobiální a antioxidační účinky a je zdrojem účinných látek proti kvasinkám a rodu *Aspergillus*. Inhibiční aktivita silice byla stanovována za použití různých koncentrací a ukázalo se, že inhibice je závislá na dávce s přibližnou hodnotou $IC_{50} = 121 \mu\text{g/ml}$. Hlavní inhibiční aktivita byla připsána monoterpenickému ketonu 2,3,4,4-tetra-methyl-5-methylen-cyklopent-2-enon [110; 111].



Obr. 25 *Lavandula luisieri* [112].

5.2.5.2. Seskviterpeny

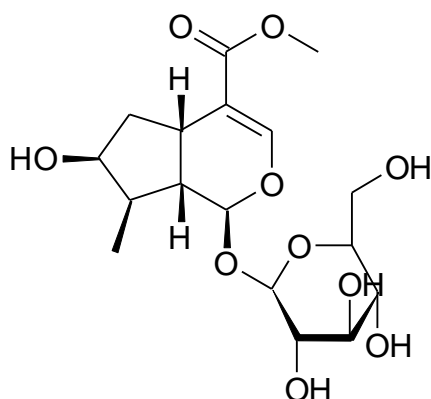
5.2.5.2.1. *Murraya koenigii*

Z extraktu listů *Murraya koenigii* (L.) Spreng. (Rutaceae) byly izolovány seskviterpeny s betasekretasovou inhibiční aktivitou – α - a β -karyofylen ($IC_{50} = 2300 \mu\text{M}$ a $IC_{50} = 4200 \mu\text{M}$) a β -karyofylen-oxid ($IC_{50} = 1200 \mu\text{M}$). Byl také testován inhibiční vliv methanolového extraktu z listů *M. koenigii* na aktivitu AChE v koncentracích $250 \mu\text{g/ml}$ (9,7 %) a $500 \mu\text{g/ml}$ (12,7 %). Zde byla inhibiční aktivita hodnocena v % inhibice. Mimo těchto seskviterpenů *M. koenigii* obsahuje také karbazolové alkaloidy s inhibiční aktivitou vůči BACE 1 [88].

5.2.5.2.2. *Cornus officinalis*

Jako další přírodní inhibitor BACE 1 byl z plodů *Cornus officinalis* Torr. ex Dur. (Cornaceae) izolován loganin (Obr. 26) s $IC_{50} = 92 \mu\text{M}$. U loganinu bylo prokázáno zlepšení kognitivních funkcí u myší, kterým byla navozena ztráta paměti

skopolaminem. Mimo loganinu obsahuje *C. officinalis* i jiné sloučeniny s inhibiční aktivitou vůči BACE 1 – kyselinu ursolovou a hydroxyaromatické kyseliny [113; 114].

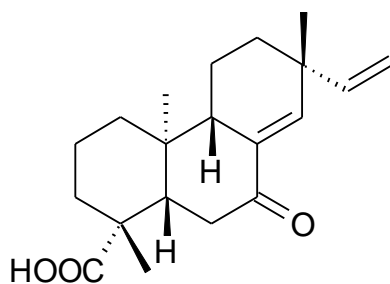


Obr. 26: Loganin.

5.2.5.3. Diterpeny

5.2.5.3.1. *Aralia cordata*

Z kořene *Aralia cordata* Thunb. (Araliaceae) bylo izolováno 14 diterpenoidních sloučenin a byla u nich testována inhibiční aktivita vůči AChE, BChE, BACE 1 a schopnost vylučovat ONOO^- a $\text{NO}\cdot$. Schopnost inhibovat BACE 1 byla zjištěna u 16 α -hydroxy-17-isovaleroyloxy-kauran-19-ové kyseliny s $\text{IC}_{50} = 18,58 \mu\text{M}$. Tato sloučenina vykazovala také inhibiční aktivitu vůči BChE s $\text{IC}_{50} = 25,37 \mu\text{M}$. Významnější inhibice BACE 1 dosahovaly také sloučeniny 7-oxo-pimara-8(14),15-dien-19-ová kyselina (Obr. 27) a 17-hydroxy-kaur-15-en-19-ová kyselina (tato kyselina také inhibovala BChE s $\text{IC}_{50} = 19,59 \mu\text{M}$) s $\text{IC}_{50} = 24,1$ a $23,4 \mu\text{M}$. Tyto kyseliny vykazovaly nevýznamnou AChE inhibiční aktivitu. U žádné z testovaných diterpenoidních sloučenin nebyla zjištěna vylučovací schopnost [115].

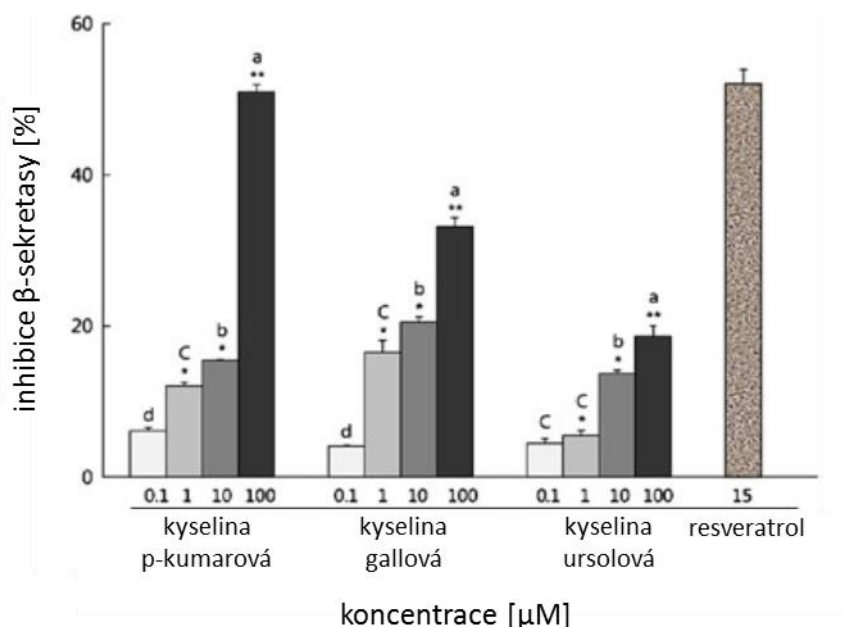


Obr. 27: 7-oxo-pimara-8(14),15-dien-19-ová kyselina.

5.2.5.4. Triterpeny

5.2.5.4.1. *Cornus officinalis*

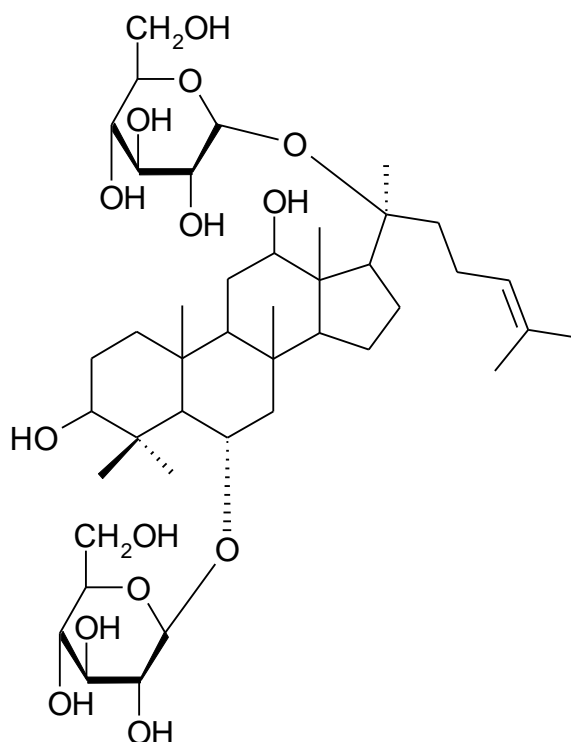
Mimo BACE 1 inhibitorů typu hydroxyaromatických kyselin (kyselina gallová a *p*-kumarová, srovnání v Grafu 1) a seskviterpenu loganinu byla z extraktu *Corni fructus* izolována ještě triterpenická sloučenina, kyselina ursolová. Ta ale vykazovala pouze zanedbatelnou betasekrasovu inhibiční aktivitu [66].



Graf 1: Znázornění inhibičních aktivit kyseliny *p*-kumarové, gallové a ursolové v porovnání s resveratrole. Upraveno podle [66].

5.2.5.4.2. *Panax notoginseng*

Panax notoginseng (Burk.) F. H. Chen (Araliaceae) je čínskou rostlinou hojně využívanou v TČM ke zlepšení kognitivních funkcí jako paměti a schopnosti učení. Vzhledem k tomuto faktu byla vypracována studie, která měla za úkol objasnit mechanismy těchto účinků. Hlavní aktivní složkou *P. notoginseng* je ginsenosid Rg1, triterpenický saponin. Ginsenosid Rg1 (Obr. 28) byl testován na ovlivnění produkce A β a protektivní účinky u A β navozené neurotoxicitě [116].



Obr. 28: Ginsenosid Rg1.

Ginsenosid Rg1 inhiboval BACE 1 *in vitro* v závislosti na své dávce s $IC_{50} = 6,18$ μ M. Prokázal se také jeho pozitivní vliv na životaschopnost buněčné linie PC12, která byla inkubována společně s toxickými frakcemi A β . Ginsenosid Rg1 rovněž u buněčné linie PC12 snižoval, v závislosti na své dávce, uvolňování enzymu laktátdehydrogenasy (LDH) indukované přítomným A β . LDH je uvolňována v poškozených tkáních a je markerem poruchy či poranění. V dalším testování, kdy opět buněčná linie PC12 byla vystavena A β byly měřeny hladiny oxidu dusnatého (NO). Jeho hladina byla v důsledku přítomného A β naměřena neobvykle vyšší. V této souvislosti předběžné přidání ginsenosidu Rg1 do inkubované směsi mělo za následek snížení hladiny NO. NO má významné vasoaktivní, imunologické a neurofyziologické funkce, avšak může být i neurotoxický. Chová se totiž jako volný radikál [116].

Ginsenosid Rg1 v závislosti na své dávce inhiboval uvolňování ROS a peroxidaci lipidů navozené A β . Rovněž zabraňoval intracelulárnímu vzestupu hladiny Ca $^{2+}$. Jedním z mechanismů toxicity A β totiž je, že disponuje schopností vytvářet v plazmatických membránách neuronů málo selektivní kanálky. Jejich prostřednictvím pak rozvrací membránový potenciál a umožňuje zvýšený vtok Ca $^{2+}$ do neuronu přímo skrze

A β -kanálky nebo nepřímo aktivací napětově-řízených Ca²⁺ kanálů. Dále v buněčných liniích inkubovaných s A β ginsenosid Rg1 snižoval aktivitu kaspasy-3, která hraje klíčovou roli v apoptóze buňky [116].

5.2.5.4.3. *Polygala tenuifolia*

Další terpenoidy vykazující betasekretasovou inhibiční aktivitu byly izolovány z rostliny *Polygala tenuifolia* Willd. (Polygalaceae). *P. tenuifolia* se v TČM používá ke zlepšení kognitivních funkcí. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že tenuigenin extrahovaný z *P. tenuifolia* má příznivý vliv na snížené cholinergní funkce navozené A β . Toto zjištění přezkoumali Jia a kol. [117]. Ti zjistili, že tenuigenin inhibuje BACE 1 *in vitro* s IC₅₀ = 0,25 μ g/ml. Extrakt z *P. tenuifolia* snižoval u buněčných kultur produkci A β . V této studii bylo pracováno se sumárním extraktem, tenuigeninem. Aktivní sloučenina pocházející z tenuigeninu nebyla známa. Pozdější studie Lv a kol. [118] potvrdila účinnost u purifikované komponenty tenuifolinu, jakožto směsi triterpenových saponinů. Tenuifolin snižoval sekreci A β inhibicí BACE 1 s IC₅₀ = 76,1 μ M a dále zlepšoval učení a paměť [119].

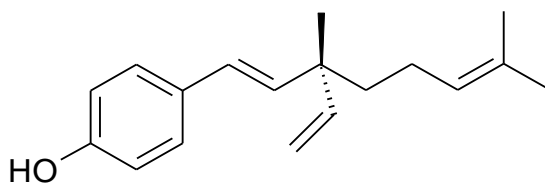
5.2.5.4.4. *Daedalea sp.*

Z extraktu plodnice houby *Daedalea sp.* (Polyporaceae) byly izolovány tři triterpenické sloučeniny s betasekretasovou inhibiční aktivitou, daedaloly A-C. Hodnota IC₅₀ byla u daedanolu C naměřena 14,2 μ M [120].

5.2.5.5. Meroterpeny

5.2.5.5.1. *Psoralea corylifolia*

Choi a kol. [104] izolovali z extraktu semen *Psoralea corylifolia* BACE 1 inhibitor bakuchiol s IC₅₀ = 21,3 \pm 0,3 μ M. Kromě bakuchiolu (Obr. 29) byly v tomto extraktu nalezeny i flavonoidy s inhibiční aktivitou vůči BACE 1.



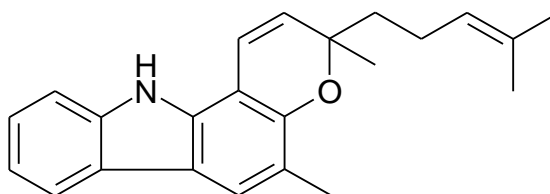
Obr. 29: Bakuchiol.

5.2.6. Alkaloidy

5.2.6.1. Karbazolové alkaloidy

5.2.6.1.1. *Murraya koenigii*

Aromatické listy *Murraya koenigii* (L.) Spreng. (Rutaceae) (Obr. 31) mají účinky hypoglykemické, hepatoprotektivní, antibakteriální, antioxidační, imunomodulační, protizánětlivé a podporují hojení. Z listů bylo izolováno několik karbazolových alkaloidů: murrayanin, mahanimbin (Obr. 30), girinimbin, murrayacin, isomurrayazolin, isomahanimbin, koenimbidin nebo mahanin. Konkrétně u mahanimbinu byla zjištěna inhibiční aktivita vůči AChE *in vitro* [121].



Obr. 30: Mahanimbin.



Obr. 31: *Murraya koenigii* [122].

Mani a kol. [121] zkoumali u myši vliv celkového alkaloidového extraktu z listů *M. koenigii* na kognitivní funkce a mozkovou cholinesterasovou aktivitu. Ztráta paměti byla u myši navozena skopolaminem nebo diazepamem. Ukázalo se, že u starších i mladých myši vyšší dávky extraktu výrazně zlepšily paměť a úspěšně zvrátily amnézii.

Alkaloidový extrakt z listů *M. koenigii* také v závislosti na své dávce snižoval cholinesterasovou aktivitu a tím zvyšoval hladinu ACH [121].

Rovněž byla hodnocena betasekretasovou inhibiční aktivita tohoto extraktu *in vitro*. Alkaloidový extrakt z *M. koenigii* inhiboval BACE 1 s hodnotou $IC_{50} = 1,7 \mu\text{g/ml}$. Inhibice byla vyhodnocena jako nekompetitivní. Kromě karbazolových alkaloidů, byly v *M. koenigii* nalezeny také BACE 1 inhibitory seskviterpenické struktury [121].

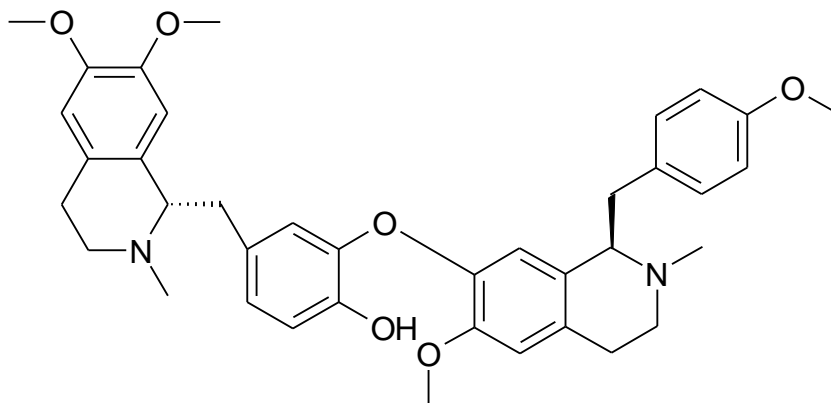
5.2.6.1.2. *lanthella* sp.

Fytochemická analýza australské mořské houby *lanthella* sp. (lanthellidae) ukázala přítomnost diktydendrinů F-J. Byla u nich objevena betasekretasová inhibiční aktivita, pohybující se u diktydendrinů F, H-J v rozmezí hodnot $IC_{50} = 1-2 \mu\text{M}$. U některých byly objeveny účinky cytotoxické. Jediný diktydendrin J, mající neobvyklou 1,2-diketonovou skupinu, nevykazoval cytotoxické účinky a inhiboval BACE 1 s hodnotou $IC_{50} = 2 \mu\text{M}$ [123].

5.2.6.2. Isochinolinové alkaloidy

5.2.6.2.1. *Nelumbo nucifera*

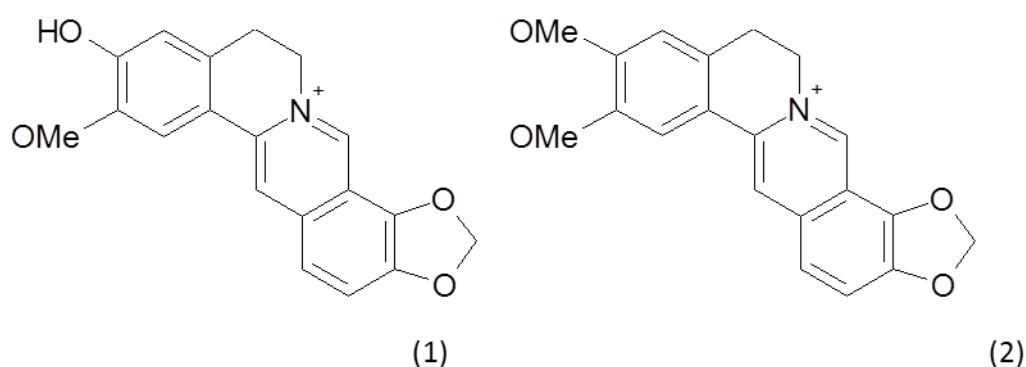
Jung a kol. [93] z extraktu embrya ze semen rostliny *Nelumbo nucifera* izolovali kromě flavonu vitexinu i alkaloidy bisbenzylisochinolinového typu s inhibiční aktivitou vůči BACE 1. Alkaloid liensinin inhiboval BACE 1 s $IC_{50} = 6,37 \pm 0,13 \mu\text{M}$, AChE s $IC_{50} = 0,34 \pm 0,02 \mu\text{M}$ a BChE s $IC_{50} = 9,96 \pm 0,47 \mu\text{M}$. Další izolovaná sloučenina neferin (Obr. 32) inhibovala BACE 1 s $IC_{50} = 28,51 \pm 4,04 \mu\text{M}$, AChE s $IC_{50} = 14,19 \pm 1,46 \mu\text{M}$ a BChE $IC_{50} = 37,18 \pm 0,59 \mu\text{M}$.



Obr. 32: Neferin.

5.2.6.2.2. *Coptis chinensis*

O *Coptis chinensis* Franch. (Ranunculaceae) a jeho izolovaných alkaloidech je známo, že mají celou řadu biologických aktivit, včetně účinku neuroprotektivního a antioxidačního. V této souvislosti byly testovány isochinolinové alkaloidy z *Coptidis rhizoma*: berberin, palmatin, jateorrhizin, epiberberin (Obr. 33), coptisin a groenlandicin (Obr. 33). Alkaloidy byly testovány na BACE 1 a cholinesterasovou inhibiční aktivitu a jejich schopnost zhášet ROS. Jejich cholinesterasová inhibiční aktivita byla měřena spektrofotometrickou metodou. Všechny izolované alkaloidy významně inhibovaly AChE s IC_{50} v rozmezí hodnot 0,44 až 1,07 μ M. Také u nich byla zjištěna inhibiční aktivita vůči BChE s IC_{50} v rozmezí hodnot 3,32 až 6,84 μ M. Z testovaných alkaloidů pouze groenlandicin a epiberberin vykazovaly dobrou BACE 1 inhibici s $IC_{50} = 19,68$ a 8,55 μ M. Kinetická analýza vyhodnotila inhibici jako nekompetitivní. Přítomnost methyldioxy skupiny na kruhu D se ukázala být pro inhibiční schopnosti těchto dvou alkaloidů jako klíčová. Groenlandicin i epiberberin navíc dosahovaly dobré schopnosti inhibovat obě cholinesterasy [124].



Obr. 33: Groenlandicin (1) a epiberberin (2).

Mimo inhibice BACE 1 a cholinesteras se stejná studie také zabývala vlivem již zmíněných alkaloidů na oxidační stres, který také přispívá k patogenezi AD. U isochinolinových alkaloidů byla konkrétně zjištěna schopnost vychytávat sloučeninu $ONOO^-$. $ONOO^-$ vzniká z radikálů $NO\cdot$ a $\cdot O_2^-$ a je vysoce oxidující a nitrační, oxiduje buněčné komponenty, včetně proteinů, lipidů, uhlovodíků a DNA, zvyšuje podíl agregovaného A β a stimuluje zánětlivou reakci. Groenlandicin a jateorrhizin vykazovaly

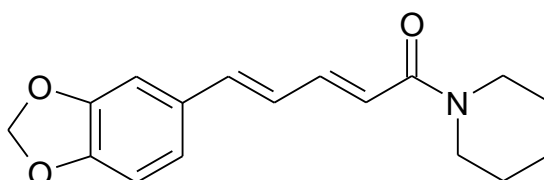
nejsilnější ONOO⁻ vychytávací schopnosti s IC₅₀ = 0,84 a 0,78 μM. Avšak pouze groenlandicin a coptisin vykazovaly celkovou ROS inhibující aktivitu [124].

Alkaloidy z *C. chinensis* mají vysoký potenciál ve vývoji terapie AD. Mnohé z nich inhibují současně aktivitu cholinesteras i BACE 1 a navíc mají antioxidační schopnosti. Obzvláště groenlandicin dosahuje vysokých inhibičních schopností, má výrazné ONOO⁻ vychytávací schopnosti a dobrou schopnost inhibovat ROS [124].

5.2.6.3. Pyridinové

5.2.6.3.1. *Piper nigrum*

Z plodů *Piper nigrum* L. (Piperaceae) byl izolován pyridinový alkaloid piperin (Obr. 34), který inhiboval BACE 1 s hodnotou IC₅₀ = 580 μM. Piperin vykazuje antioxidační a tlumící účinky a díky své nízké molekulové hmotnosti může přestoupit přes HEB. Hodnotil se také inhibiční vliv methanolového extraktu plodů *P. nigrum* na aktivitu AChE v koncentracích 250 μg/ml (21,6 %) a 500 μg/ml (36,2 %). Zde byla inhibiční aktivita hodnocena v % inhibice [88].



Obr. 34: Piperin.

5.3. Neidentifikované sloučeniny

5.3.1. *Cytospora rhizophorae*

V rámci hledání nových přírodních inhibitorů BACE 1 Harrun a kol. [125] studovali biologickou aktivitu sloučenin pocházejících z endofytických hub malajských léčivých rostlin. Endofytické houby tvoří mycelia v rostlinných pletivech. Harrun a kol. ve své studii zkoušeli 212 endofytických extraktů, z nichž 29 inhibovalo BACE 1 více než z 90 %. Neaktivnější extrakty, jejichž hodnoty dosahovaly hodnot IC₅₀ menších než 3 μg/ml, pocházely z houby *Cytospora rhizophorae* Kohlm. et E. Kohlm. (Valsaceae). Vysoce účinné extrakty endofytických hub byly izolovány z kořene *Cinnamomum porrectum* (Roxb.) Kosterm. (Lauraceae) a z *Polyalthia glauca* (Hassk.) F. Muell.

(Annonaceae). V této studii nebyly identifikovány konkrétní účinné složky extraktů [125].

5.4. Souhrnný přehled přírodních látek s betasekretasovou inhibiční aktivitou

V následující části je uveden souhrnný tabulkový přehled (Tab. 2) přírodních látek s betasekretasovou inhibiční aktivitou.

Rostlina	Čeď	Aktivní sloučenina	Strukturní typ	IC ₅₀ [μM]	Ref.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetaceae	Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Ile-Gly-Ser	peptid	2,6	58
<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	epigallokatechin-gallát	katechiny a jejich estery	1,6	64
		(-)-gallokatechin-gallát		1,8	
		(-)-epikatechin		2,3	
		(-)-epigallokatechin		2,4	
		(-)-gallokatechin		2,5	
		(+)-epikatechin		2,8	
		(-)-katechin		3	
		(+)-katechin		3,5	
		(-)-epikatechin-gallát		4,5	
		(-)-katechin-gallát		6	
<i>Cornus officinalis</i>	Cornaceae	kys. <i>p</i> -kumarová	hydroxyaromatické kys.	90	66
		kys. gallová	triterpen	neuedeno	
		kys. ursolová			
		loganin	seskviterpen	92	
<i>Homalomena occulta</i>	Araceae	2-[(Z)-heptadec-11-enyl]-6-hydroxybenzoová kys.	hydroxyaromatické kys.	6,23	69
		2-[(6Z,9Z,12Z)-heptadeka-6,9,12-trienyl]-6-hydroxybenzoová kys.		6,28	
		2-[(9Z,12Z)-heptadeka-9,12-dienyl]-6-hydroxybenzoová kys.		7,93	
		2-hydroxy-6-(12-fenyldodecyl)benzoová kys.		7,65	
<i>Sanguisorba sp.</i>	Rosaceae	1,2,3-trigalloyl-4,6-hexahydroxydiphenoyl-13-D-glukopyranosid		3,1	70
		1,2,3,4,6-pentagalloyl-13-D-glukopyranosid		3,76	
<i>Punica granatum</i>	Lythraceae	ellagová kys.		3,9	71
		punikalagin		0,41	

Rostlina	Čeď	Aktivní sloučenina	Strukturní typ	IC ₅₀ [μM]	Ref.
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i>	Lamiaceae	kys. rozmarýnová	hydroxyaromatické kys.	21	72
				flavon	
<i>Abronia nana</i>	Nyctaginaceae	mirabijalon D	rotenoidy	4,2	74
		boeravinon D		4,8	
		abronion A		62,2	
<i>Eisenia bicyclis</i>	Lessoniaceae	florofurofucoekol-A	florotaniny	2,13	75
		diekol		2,21	
		dioxinodehydroekol		5,35	
		7-floroethol		8,6	
		trifloroethol A		11,7	
		ekol		12,2	
		floroglucinol		36,5	
<i>Magnolia officinalis</i>	Magnoliaceae	4-O-methylhonokiol	lignan	10,3	76
<i>Angelica dahurica</i>	Apiaceae	imperatorin	kumariny	91,8	78
		(+)-byakangelicol		104,9	
<i>Smilax china</i>	Smilacaceae	verafenol	stilbeny	4,2	79
		oxyresveratrol		7,6	
		<i>cis</i> -scirpusin A		10	
		<i>cis/trans</i> resveratrol		15	
<i>Vitis thunbergii</i> var. <i>taiwaniana</i>	Vitaceae	miyabenol C		neuveđeno	81
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	(+)-vitisinol E		14,4 ± 0,3	82
		(+)-ε-viniferin		10,6 ± 0,2	
		(+)-ampelopsin A		26,6 ± 0,2	
		(+)-vitisin A		0,8 ± 0,1	

Rostlina	Čeď	Altivní sloučenina	Strukturní typ	IC ₅₀ [μM]	Ref.
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	(-)-vitisin B	stilbeny	0,4 ± 0,1	82
<i>Paeonia lactiflora</i>	Paeoniaceae	(-)-7a,8a-cis-ε-viniferin		neuveďeno	83
<i>Geranium thunbergii</i>	Geraniaceae	geraniin	ellagitaniny	4	84
		korilagin		34	
<i>Phellinus linteus</i>	Hymenochaetaceae	hispidin	styrylpyrony	4,9	85
<i>Auricularia polytricha</i>	Auriculariaceae	polyfenoly odvozené od hispidinu		neuveďeno	87
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	kurkumin	diarylheptanoidy	560	88
		demethoxykurkumin		630	
		bisdemethoxykurkumin		1500	
		bisdemethoxykurkumin		17	
<i>Nelumbo nucifera</i>	Nelumbonaceae	liensinin	isochinolinové alkaloidy	6,37 ± 0,13	93
		neferin		28,51 ± 4,04	
		vitexin		19,25 ± 3,03	
<i>Morus lhou</i>	Moraceae	kuwanon C	flavony	3,4	94
		kuwanon A		5,3	
	neuveďeno	myricetin		2,8	
<i>Sophora flavescens</i>	Fabaceae	sophoraflavanon G	flavanony	5,2	100
		kurarinon		3,3	
		leachianon A		8,4	
		kushenol A		2,6	
		(2S)-20-methoxy kurarinon		6,7	
		leachianon G	8,6	103	
		kushenol C	5,5		
		8-lavandulylkempferol	7,3		
		desmethylanhydroikaritin	1,9		

Rostlina	Čeleď	Aktivní sloučenina	Strukturní typ	IC ₅₀ [μM]	Ref.
<i>Sophora flavescens</i>	Fabaceae	xanthohumol	chalkony	7,2	103
		kuraridinol		7,1	
		kuraridin		6	
<i>Psoralea corylifolia</i>	Fabaceae	neokorylin	isoflavon	0,7 ± 0,1	104
		bakuchiol	meroterpen	21,3 ± 0,3	
		bavachromen	chalkony	7,2 ± 0,2	
		isobavachromen		9,8 ± 0,3	
		bavachalkon		10,2 ± 0,3	
		7,8-dihydro-8-(4-hydrofenyl)-2,2-dimethyl-2 H,6 H-[1,2- B:5,4- B']dipyran-6-on	flavanony	1,6 ± 0,1	
		bavachinin		3,8 ± 0,2	
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Fabaceae	2,2',4'-trihydroxychalkon	chalkon	2,45	55
<i>Petasites japonicus</i>	Asteraceae	kvercetin	flavonoly	2,1	105
		kempferol 3-O-(6''-acetyl)-β-glukopyranosid		neuveдено	
<i>Ficus benjamina</i>	Moraceae	neuveденy	isoflavony	neuveденo	106
			kumarano-chroman-4-ony		
<i>Cephalotaxus harringtonia</i> <i>var. fastigiana</i>	Taxodiaceae	2,3-dihydro-6-methylginkgetin	flavonoidní dimery amentoflavonového typu	0,4	107
<i>Cycas revoluta</i>	Cycadaceae	2,3-dihydroamentoflavon		0,8	
<i>Podocarpus macrophyllus</i> <i>var. macrophyllus</i>	Podocarpaceae	podokarpusflavon A		1	
<i>Cunninghamia lanceolata</i>	Cupressaceae	sekvojaflavon		7,4	
		amentoflavon		1,5	
<i>Rhus parviflora</i>	Anacardiaceae	agathisflavon		10	
<i>Murraya koenigii</i>	Rutaceae	α-karyofylen	seskviterpen	2300	88

Rostlina	Čeľad'	Aktivní sloučenina	Strukturní typ	IC ₅₀ [μM]	Ref.
<i>Murraya koenigii</i>	Rutaceae	β-karyofylen	seskviterpeny	4200	88
		β-karyofylen-oxid		1200	
		alkaloidový extrakt	karbazolové alkaloidy	1,7*	121
<i>Aralia cordata</i>	Araliaceae	16α-hydroxy-17-isovaleroyloxy-kauran-19-ová kys.	diterpeny	18,58	115
		17-hydroxy-kaur-15-en-19-ová kys.		23,4	
		7-oxo-pimara-8(14),15-dien-19-ová kys.		24,1	
<i>Panax notoginseng</i>	Araliaceae	ginsenosid Rg1	triterpeny	6,2	116
<i>Polygala tenuifolia</i>	Polygalaceae	tenuifolin		76,1	118
<i>Daedalea sp.</i>	Polyporaceae	daedanol C		14,2	120
<i>Ianthela sp.</i>	Ianthellidae	diktyodendrin J	karbazolový alkaloid	2	123
<i>Coptis chinensis</i>	Ranunculaceae	groenlandicin	isochinolinové alkaloidy	19,7	124
		epiberberin		8,6	
<i>Piper nigrum</i>	Piperaceae	piperin	pyridinové alkaloidy	580	88
<i>Aloe vera, nobilis</i>	Xanthorrhoeaceae	allo-aloesin D	chromony	neuveдено	109
		C-2'-dekumaroyl-aloesin G			
		2'-O-kumaroyl-(S)-aloesinol			
		2'-O-[p-methoxy-(E)-cinnamoyl]-(S)-aloesinol			
<i>Lavandula luisieri</i>	Lamiaceae	celková inhibiční aktivita silice	monoterpeny	121*	110
<i>Cytospora rhizophorae</i>	Valsaceae	endofytický extrakt	neidentifikované sloučeniny	< 3*	125
<i>Ecklonia cava</i>	Lessoniaceae	florofurofukoekol A	florotaniny	58,3**	8
		diekol		36,8**	
<i>Balanohora involucrata</i>	Balanophoraceae	(S)-5,7,3',5'-tetrahydroxy-flavanon-7-O-β-D-glukopyranosid	flavanon	10,4***	99
		3,4,2',6'-tetrahydroxydihydroflavon-4'-O-β-D-glukopyranosid	dihydrochalkon	31,4****	

* hodnoty IC₅₀ jsou uvedeny v µg/ml

** inhibiční aktivita je vyjádřena v % inhibice při koncentraci inhibitoru 1 µM

*** inhibiční aktivita je vyjádřena v % inhibice při koncentraci inhibitoru 10 µM

**** inhibiční aktivita je vyjádřena v % inhibice při koncentraci inhibitoru 100 µM

Tab. 2: Souhrnný přehled přírodních sloučenin s BACE 1 inhibiční aktivitou vyjádřenou v IC₅₀ [µM].

6. Závěr

Screening rostlin, v rámci testování jejich sekundárních metabolitů jako inhibitorů BACE 1, přinesl širokou škálu sloučenin různých strukturních typů. Jejich přímé využití v terapii AD je však často omezeno jejich nevhodnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi nebo příliš vysokou hodnotou IC_{50} . Vhodnými kandidáty na nová potenciální léčiva s mechanismem inhibice BACE 1 jsou zejména sloučeniny dostatečně lipofilní a mající zároveň nízkou molekulovou hmotnost. Tyto dvě vlastnosti jsou nezbytné pro prostup PM a HEB. Přílišná kyselost nebo bazicita sloučenin jsou z hlediska absorpce nežádoucí. Je nutné, aby již nízké koncentrace inhibitoru vykazovaly vysokou inhibiční aktivitu vůči BACE 1, která je vyjadřována nejčastěji hodnotou IC_{50} . Perspektivními sloučeninami se v tomto ohledu jeví být obzvláště ty s $IC_{50} < 10 \mu M$ [4; 55; 57].

Z hlediska potenciálního terapeutického využití jsou nadějně polyfenolické sloučeniny katechiny a jejich estery izolované z extraktu *Camellia sinensis*. Biologicky nejaktivnějším katechinem je EGKG. Katechiny prostupují HEB a výzkumy u nich prokázaly mnoho dalších příznivých působení na AD. Mimo velmi dobré inhibiční aktivity vůči BACE 1, zvyšují i aktivitu α -sekretasy, snižují translaci APP mRNA, snižují produkci a hladinu $A\beta$, snižují $A\beta$ navozenou zvýšenou aktivitu kaspas a neuronální apoptózu. V závislosti na své koncentraci inhibují také AChE a BChE a mají antioxidační účinky. BD katechinů je však omezená. Ta je zapříčiněná jejich vysokou polaritou a molekulovou hmotností [126; 127; 128; 129].

Jinými fenolickými sloučeninami, které splňují podmínky k přestupu přes HEB a zároveň mají dobrou inhibiční aktivitu, jsou resveratrol a jeho deriváty verafenol, oxyresveratrol a *cis*-scirpusin A. Resveratrol má sice absorpci 75 %, ale skutečná BD je kolem 1 %. Resveratrol totiž ve střevě a játrech podléhá rozsáhlé metabolizaci. V budoucím výzkumu se mohou uplatnit analoga resveratrolu, která mají zlepšenou BD. Resveratrol prokazatelně snižuje produkci $A\beta$, chrání neurony před toxickým působením $A\beta$, zabraňuje kognitivnímu poškození a má také účinky antioxidační. Jeho neuroprotektivní účinky byly doloženy četnými studiemi [79; 126; 130; 131].

Z dalších fenolických sloučenin jsou schopny přes HEB prostoupit furanokumariny, hydroxyaromatická kyselina *p*-kumarová a diarylheptanoid kurkumin. Jejich inhibiční účinek na BACE 1 je však slabý a proto nejsou prakticky využitelné. V klinické studii [92] bylo prokázáno, že kurkumin přes HEB přestupuje ale jeho BD je velmi nízká, protože podléhá vysokému first pass efektu. [66; 78; 132].

Flavonoidní sloučeniny jako takové dobře procházejí HEB. Mají však nízkou BD. Absorpci předchází jejich deglykosylace, která se děje za pomoci dvou enzymů v tenkém střevě. Všechny flavonoidy nejsou ale jejich substráty a proto pokračují do tlustého střeva, kde jsou flavonoidy hydrolyzovány střevní mikroflórou. Degradovány jsou také uvolněné aglykony. Navíc absorpce v tlustém střevě je minimální. Aglykony jsou po absorpci ve velké míře konjugovány a plazmatická koncentrace volných aglykonů je velmi nízká [133].

Ze skupiny flavonů dosahovaly nejnižších hodnot IC_{50} sloučeniny luteolin ($IC_{50} = 0,5 \mu M$) a myricetin ($IC_{50} = 2,8 \mu M$). Po perorálním podání byla absolutní biodostupnost myricetinu nízká – kolem 10 % [134]. U skupiny flavanonů vykazovaly nejlepší hodnoty IC_{50} sloučeniny kushenol A ($IC_{50} = 2,6 \mu M$) a kurarinon ($IC_{50} = 3,3 \mu M$), izolované ze *Sophora flavescens* a 7,8-dihydro-8-(4-hydrofenyl)-2,2-dimethyl-2 H,6 H-[1,2- B:5,4- B']dipyran-6-on ($IC_{50} = 1,6 \pm 0,1 \mu M$) z extraktu *Psoralea corylifolia*. Z řady chalkonů měl nejlepší betasekretasovou inhibiční aktivitu THCH ($IC_{50} = 2,45 \mu M$) izolovaný z *Glycyrrhiza glabra*, z flavonolů to byly desmethylanhydroikaritin ($IC_{50} = 1,86 \mu M$) ze *Sophora flavescens* a kvercetin ($IC_{50} = 2,1 \mu M$) z *Petasites japonicus*. Zdroj [135] uvádí, že podání kvercetinu je omezené kvůli jeho špatné rozpustnosti, nízké BD a nestabilitě. Z isoflavonů měl nejnižší hodnotu IC_{50} neokorylin ($IC_{50} = 0,7 \pm 0,1 \mu M$) z *Psoralea corylifolia*. Flavonoidy obecně dosahovaly velmi nízkých hodnot IC_{50} . Viz. kapitola 5.2.2. Flavonoidy.

Terpeny splňují kritéria pro vstup HEB, jsou lipofilní a mají nízkou molekulovou hmotnost. Dosahovaly však většinou pouze nevýznamných hodnot IC_{50} . Za zmínku stojí pouze ginsenosid Rg1 izolovaný z *Panax notoginseng* s $IC_{50} = 6,18 \mu M$. Některé studie potvrdily velmi nízkou BD ginsenosidu Rg1 pohybující se v rozmezí hodnot 0,1 % až 2 %, jiné 4 % až 18 % [110; 136].

Karbazolové alkaloidy jsou substráty P-glykoproteinu, což s největší pravděpodobností zapříčiní, že skrze HEB nebudou schopny projít. Zmíněné alkaloidy isochinolinové – groenlandicin a epiberberin budou také velmi těžce procházet přes HEB, protože mají kvarterní dusík. Bisbenzylisochinolinové alkaloidy izolované z embrya ze semen rostliny *Nelumbo nucifera* HEB prostupují velmi těžce [137; 138].

Použití přírodních sloučenin s BACE 1 inhibiční aktivitou v terapii AD je limitováno buď jejich přílišnou polaritou, velkou molekulovou hmotností, vysokými hodnotami IC_{50} nebo nízkou BD. Tyto sloučeniny však mohou posloužit jako strukturní předlohy pro design nových nepeptidových inhibitorů nebo mohou být přínosnými při detailnějších studiích BACE 1. Sekundární metabolity, které se zdají být nadějnými kandidáty, se musí podrobit podrobnějšímu výzkumu. Jedná se zejména o sloučeniny, které mají nízké hodnoty IC_{50} , prostupují membránami a mají komplexní účinek – kupříkladu inhibují zároveň také cholinesterasy, ovlivňují expresi APP, inhibují neuronální apoptózu či mají antioxidační účinky.

7. Použitá literatura

1. Honjo K., Black S. E., Verhoeff N. P. L. G.: Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and the β -amyloid cascade. *Can. J. Neurol. Sci.* 39, 712 (2012).
2. Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurol. prax.* 4, 224 (2008).
3. Singh S., Kushwah A. S., Singh R., a kol.: Current therapeutic strategy in Alzheimer's disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16, 1651 (2012).
4. Ozarowski M., Mikolajczak P. L., Bogacz A. a kol.: Plants and their chemical compounds affecting β -amyloid and secretase activity as potential sources of neuroprotective herbal medicinal products. Part 1. *Herba Polonica.* 56, 91 (2010).
5. Rössner P.: Alzheimerova choroba - diagnostika a léčba. *Neurol. pro praxi* 1, 11 (2004).
6. Alzheimerovo onemocnění. Alzheimercentrum.cz. [Online] [Citace: 16.7.2014] <http://www.alzheimercentrum.cz/alzheimerovo-onemocneni/alzheimerova-choroba>.
7. Pimentel-Coelho P. M., Rivest S.: The early contribution of cerebrovascular factors to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1917 (2012).
8. Choi B. W., Lee H. S., Shin H.-C. a kol.: Multifunctional activity of polyphenolic compounds associated with a potential for Alzheimer's disease therapy from *Ecklonia cava*. *Phytother. Res.* 2015, 1.
9. Citron M.: Secretase as a target for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 70, 373 (2002).
10. Panza F., Frisardi V., Imbimbo B. P. a kol.: γ -secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: The current state. *CNS Neurosci. Ther.* 16, 272 (2010).
11. Gamma secretase. Edinformatics.com. [Online] [Citace: 18.7.2014] http://www.edinformatics.com/news/gamma_secretase.htm.
12. Schneider L. S., Mangialasche F., Andreasen N., Feldman H., Giacobini E. R. a kol.: Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J. Intern. Med.* 275, 251 (2014).
13. Braak H., Braak E.: Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging.* 18, 351 (1997).
14. Huang T. H. J., Yang D. S., Fraser P. E.: Alternate aggregation pathways of the Alzheimer β -amyloid peptide. An in vitro model of preamyloid. *J. Biol. Chem.* 275, 36436 (2000).
15. Lue L. F., Kuo Y. M., Roher A. E. a kol.: Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 155, 853 (1999).

16. Klein W. L., Stine W. B., Teplow D. B.: Small assemblies of unmodified amyloid β -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 25, 569 (2004).
17. Serpell L. C.: Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim. Biophys. Acta*. 1502, 16 (2000).
18. Brunovský M.: Inhibitory cholinesteras v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurol. pro praxi*. 2, 112 (2007).
19. Alonso A. del C., Zaidi T., Novak M. a kol.: Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6923 (2001).
20. Goedert M., Spillantini M. G., Jakes R., a kol.: Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: Sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 3, 519 (1989).
21. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*. 2009, 342.
22. Sheardová K., Hort J., Rusina R., a kol.: Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Cesk. Slov. Neurol. N.* 5, 589 (2007).
23. Yang G., Wang Y., Tian J. a kol.: Huperzine A for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLOS ONE*. 8, 1 (2013).
24. Xing S-H., Zhu C.-X., Zhang R. a kol.: Huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia: A meta-analysis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014, 1.
25. Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L. a kol.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *NPC*. 6, 607 (2011).
26. Jiráček R.: Nové postupy v biologické terapii demencí. *Psychiat. pro praxi*. 11, 143 (2010).
27. Gold M., Alderton C., Sawchak S.: Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 30, 131 (2010).
28. Kandalepas P. C., Sadleir K. R., Eimer W. A. a kol.: The Alzheimer's β secretase BACE 1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol.* 126, 329 (2013).
29. Dislich B., Lichtenthaler S. F.: The membrane-bound aspartyl protease BACE 1: molecular and functional properties in Alzheimer's disease and beyond. *Front Physiol.* 3, 1 (2012).

30. Vassar R., Kuhn P. H., Haass C. a kol.: Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J. Neurochem.* *130*, 4 (2014).
31. Mancini F., De Simone A., Andrisano V.: Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors. *Anal. Bioanal. Chem.* *400*, 1979 (2011).
32. Southan C., Hancock J. M.: A tale of two drug targets: the evolutionary history of BACE 1 and BACE 2. *Front Genet.* *4*, 1 (2013).
33. Azkona G., Amador-Arjona A., Obradors-Tarrag C. a kol.: Characterization of a mouse model overexpressing beta-site APP-cleaving enzyme 2 reveals a new role for BACE 2. *Genes Brain Behav.* *9*, 160 (2010).
34. Rochin L., Hurbain I., Serneels L. a kol.: BACE 2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 10658 (2013).
35. Esterházy D., Stutzer I., Wang H. a kol.: BACE 2 is a beta cell-enriched protease that regulates pancreatic beta cell function and mass. *Cell Press.* *14*, 365 (2011).
36. Lin X., Koelsch G., Wu S. a kol.: Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *PNAS.* *97*, 1456 (2000).
37. Wu P., Brand L.: Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal Biochem.* *218*, 1 (1994).
38. Turner R. T. III, Koelsch G., Hong L. a kol.: Subsite specificity of memapsin 2 (beta-secretase): implications for inhibitor design. *Biochemistry.* *40*, 10001 (2001).
39. Gorfe A. A., Caflich A.: Functional plasticity in the substrate binding site of beta-secretase. *Cell Press.* *13*, 1487 (2005).
40. Sauder J. M., Arthur J. W., Dunbrack R. L. Jr.: Modeling of substrate specificity of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein beta-secretase. *J. Mol. Biol.* *300*, 241 (2000).
41. Neumann U., Kubota H., Frei K. a kol.: Characterization of Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂, a fluorogenic substrate with increased specificity constants for collagenases and tumor necrosis factor converting enzyme. *Anal. Biochem.* *328*, 166 (2005).
42. Rahuel J., Rasetti V., Maibaum J. a kol.: Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. *Chem. Biol.* *7*, 493 (2000).
43. Paschalidou K., Neumann U., Gerhartz B.: Highly sensitive intramolecularly quenched fluorogenic substrates for renin based on the combination of L-2-amino-3-(7-methoxy-4-coumaryl)propionic acid with 2,4-dinitrophenyl groups at various positions. *Biochem. J.* *382*, 1031 (2004).

44. Gershkovich A. A., Kholodovych V. V.: Fluorogenic substrates for proteases based on intramolecular fluorescence energy transfer (IFETS). *J Biochem Biophys Methods*. *33*, 135 (1996).
45. Porcari V., Magnoni L., Terstappen G. C.: A continuous time-resolved fluorescence assay for identification of BACE 1 inhibitors. *Assay Drug Dev Technol*. *3*, 287 (2005).
46. Kennedy M. E., Wang W., Song L. a kol.: Measuring human β -secretase (BACE 1) activity using homogeneous time-resolved fluorescence. *Anal. Biochem*. *319*, 49 (2003).
47. Kornacker M. G., Lai Z., Witmer M. a kol.: An inhibitor binding pocket distinct from the catalytic active site on human beta-APP cleaving enzyme. *Biochemistry*. *44*, 11567 (2003).
48. Mancini F., Naldi M., Cavrini V. a kol.: Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors. *Anal. Bioanal. Chem*. *388*, 1175 (2007).
49. Mancini F., Andrisano V.: Development of a liquid chromatographic system with fluorescent detection for β -secretase immobilized enzyme reactor on-line enzymatic studies. *J Pharm Biomed Anal*. *52*, 49 (2010).
50. Šafařík I.: Enzymologie. [nh.cas.cz](http://www.nh.cas.cz). [Online] [Citace: 28.7.2014] <http://www.nh.cas.cz/people/safarik/Enzymologie.html>.
51. De Simone A., Seidl C., Santos C. A. M. a kol.: Liquid chromatographic enzymatic studies with on-line Beta-secretase immobilized enzyme reactor and 4-(4-dimethylaminophenylazo) benzoic acid/5-[(2-aminoethyl) amino] naphthalene-1-sulfonic acid peptide as fluorogenic substrate. *J. Chromatogr. B*. *953*, 108 (2014).
52. Šigutová R., Lesňák M., Kušnierová P. a kol.: Využití metody Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) v praxi. *FONS*. *2*, 7 (2013).
53. Congreve M., Aharony D., Albert J. a kol.: Application of fragment screening by X-ray crystallography to the discovery of aminopyridines as inhibitors of beta-secretase. *J Med Chem*. *50*, 1124 (2007).
54. Ladbury J. E.: Calorimetry as a tool for understanding biomolecular interactions and an aid to drug design. *Biochem Soc Trans*. *38*, 888 (2010).
55. Zhu Z., Li C., Wang X. a kol.: 2,2', 4'- Trihydroxychalcone from *Glycyrrhiza glabra* as a new specific BACE 1 inhibitor efficiently ameliorates memory impairment in mice. *J. Neurochem*. *114*, 374 (2010).
56. Semighini E. P.: In silico design of Beta-secretase inhibitors in Alzheimer's disease. *Chem. Biol. Drug Des*. *2014*, 1.
57. Ozarowski M., Mikolajczak P. L., Bogacz A. a kol.: Plants and their chemical compounds affecting β -amyloid and secretase activity as potential sources of neuroprotective herbal medicinal products. Part 2. *Herba polonica*. *58*, 47 (2012).

58. Lee D.-H., Lee D.-H., Lee J.-S.: Characterization of a new antimentia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **42**, 83 (2007).
59. Okello E. J., Savelev S. U., Perry E. K.: In vitro anti- β -secretase and dual anti-cholinesterase activities of *Camellia sinensis* L. (tea) relevant to treatment of dementia. *Phytother. Res.* **18**, 624 (2004).
60. Zhang L., Cao H., Wen J. a kol.: Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate enhances the inhibitory effect of huperzine A on acetylcholinesterase by increasing the affinity with serum albumin. *Nutr. Neurosci.* **12**, 142 (2009).
61. Reznichenko L., Amit T., Youdim M. B. H. a kol.: Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate induces neurorescue of long-term serum-deprived PC12 cells and promotes neurite out growth. *J. Neurochem.* **93**, 1157 (2005).
62. Lin C. L., Chen T. F., Chiu M. J. a kol.: Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses β -amyloid induced neurotoxicity through inhibiting c-Abl/FE65 nuclear translocation and GSK 3 β activation. *Neurobiol Aging.* **30**, 81 (2009).
63. Lee Y. K., Yuk D. Y., Lee J. W. a kol.: (-)-Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of beta-amyloid generation and memory deficiency. *Brain Res.* **1250**, 164 (2009).
64. Jeon S. Y., Bae K. H., Seong Y. H. a kol.: Green tea catechins as a BACE 1 (β -secretase) inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3905 (2003).
65. Giunta B., Hou H., Zhu Y. a kol.: Fish oil enhances anti-amyloidogenic properties of green tea EGCG in Tg2576 mice. *Neurosci. Lett.* **471**, 134 (2010).
66. Youn K., Jun M.: Inhibitory effects of key compounds isolated from *Corni fructus* on BACE 1 activity. *Phytother. Res.* **26**, 1714 (2012).
67. Wang W., Xu J., Li L. a kol.: Neuroprotective effect of morroniside on focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res. Bull.* **83**, 196 (2010).
68. *Cornus officinalis*. Treeflower.la.coocan.jp. [Online] [Citace: 12.3.2014] <http://treeflower.la.coocan.jp/Cornaceae/Cornus%20officinalis/Cornus%20officinalis.htm>.
69. Tian X.-Y., Zhao Y., Yu S.-S. a kol.: BACE 1 (Beta-Secretase) inhibitory phenolic acids and a novel sesquiterpenoid from *homalomena occulta*. *Chemistry & Biodiversity.* **7**, 984 (2010).
70. Lee H.-J., Seong Y.-H., Bae K.-H. a kol.: β -Secretase (BACE 1) inhibitors from *Sanguisorbae radix*. *Arch. Pharmacol Res.* **28**, 799 (2005).
71. Kwak H. M., Jeon S. Y., Sohng B. H. a kol.: β -secretase (BACE 1) inhibitors from Pomegranate (*Punica granatum*) Husk. *Arch. Pharmacol Res.* **28**, 1328 (2005).
72. Choi S.-H., Hur J.-M., Yang E.-J. a kol.: β -Secretase (BACE 1) inhibitors from *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Arch. Pharmacol Res.* **31**, 183 (2008).

73. Iuvone T., Filippis de D., Esposito G. a kol.: The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid- β peptide-induced neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *317*, 1143 (2006).
74. Park S. H., Yang E. J., Kim S. I. a kol.: β -Secretase (BACE 1)-inhibiting C-methylrottenoids from *Abronia nana* suspension cultures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *24*, 2945 (2014).
75. Jung H. A., Oh S. H., Choi J. S.: Molecular docking studies of phlorotannins from *Eisenia bicyclis* with BACE 1 inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *20*, 3211 (2010).
76. Lee J. W., Lee Y. K., Lee B. J. a kol.: Inhibitory effect of ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-O-methylhonokiol on memory impairment and neuronal toxicity induced by beta-amyloid. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *95*, 31 (2010).
77. Lee Y.-J., Choi D.-Y., Han S. B. a kol.: Inhibitory effect of ethanol extract of *magnolia officinalis* on memory impairment and amyloidogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via regulating β -secretase activity. *Phytother. Res.* *26*, 1884 (2012).
78. Marumoto S., Miyazawa M.: β -Secretase inhibitory effects of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*. *Phytother. Res.* *24*, 510 (2010).
79. Jeon S. Y., Kwon S. H., Seong Y. H. a kol.: β -secretase (BACE 1)-inhibiting stilbenoids from *Smilax Rhizoma*. *Phytomedicine.* *14*, 403 (2007).
80. Anekonda T. S.: Resveratrol—A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res.* *52*, 316 (2006).
81. Hu J., Lin T., Gao Y. a kol.: The resveratrol trimer miyabenol C inhibits β -secretase activity and β -amyloid generation. *PLOS ONE.* *2015*, 1.
82. Choi Y. H., Yoo M. Y., Choi C. W. a kol.: A new specific BACE-1 inhibitor from the stem bark extract of *Vitis vinifera*. *Planta Med.* *75*, 537 (2009).
83. Choi C. W., Choi Y. H., Cha M. R. a kol.: In vitro BACE-1 inhibitory activity of resveratrol oligomers from the seed extract of *Paeonia lactiflora*. *Planta Med.* *77*, 374 (2011).
84. Youn K., Jun M.: In vitro BACE 1 inhibitory activity of geraniin and corilagin from *Geranium thunbergii*. *Planta Med.* *79*, 1038 (2013).
85. Park. I. H., Jeon S. Y. Lee, H. J. a kol.: A beta-secretase (BACE 1) inhibitor hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Planta. Med.* *70*, 143 (2004).
86. Zhu T., Kim S. H., Chen C. Y.: A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*. *Curr Med Chem.* *15*, 1330 (2008).
87. Bennett L., Sheean P., Zabarás D. a kol.: Heat-stable components of wood ear mushroom, *Auricularia polytricha* (higher Basidiomycetes), inhibit in vitro activity of beta secretase (BACE 1). *Int J Med Mushrooms.* *15*, 233 (2013).

88. Murata K., Matsumura S., Yoshioka Y. a kol.: Screening of β -secretase and acetylcholinesterase inhibitors from plant resources. *J. Nat. Med.* *69*, 123 (2015).
89. Liu H., Li Z., Qui D. a kol.: The inhibitory effects of different curcuminoids on β -amyloid protein, β -amyloid precursor protein and β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in swAPP HEK293 cells. *Neuroscience Letters.* *485*, 83 (2010).
90. Wang X., Kim J. R., Lee S. B. a kol.: Effects of curcuminoids identified in rhizomes of *Curcuma longa* on BACE-1 inhibitory and behavioral activity and lifespan of Alzheimer's disease *Drosophila* models. *BMC Complement Altern Med.* *88*, 1472 (2014).
91. Huang H. C., Tang D., Xu K. a kol.: Curcumin attenuates amyloid- β -induced tau hyperphosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells involving PTEN/Akt/GSK-3 β signaling pathway. *J Recept Signal Transduct Res.* *34*, 26 (2014).
92. Ringman J. M., Frautschy S. A., Teng E. a kol.: Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. *Alzheimers Res Ther.* *4*, 43 (2012).
93. Jung H. A., Karki S., Kim J. H. a kol.: BACE 1 and cholinesterase inhibitory activities of *Nelumbo*. *Arch. Pharm. Res.* *2014*, 1.
94. Cho J. K., Ryu Y. B., Curtis-Long M. J. a kol.: Inhibition and structural reliability of prenylated flavones from the stem bark of *Morus lhou* on β -secretase (BACE-1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *21*, 2945 (2011).
95. Liu R., Meng F., Zhang L. a kol.: Luteolin isolated from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* (Labiatae) prevents copper-mediated toxicity in β -amyloid precursor protein Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells. *Molecules.* *16*, 2084 (2011).
96. Liu R., Gao M., Qiang G.-F. a kol.: The anti-amnesic effects of luteolin against amyloid β_{23-25} peptide-induced toxicity in mice involve the protection of neurovascular unit. *Neuroscience.* *162*, 1232 (2009).
97. Sultan B., Anwar F.: Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem.* *108*, 879 (2008).
98. Shimmyo Y., Kihara T., Akaike A. a kol.: Multifunction of myricetin on A β : neuroprotection via a conformational change of A β and reduction of A β via the interference of secretases. *J Neurosci. Res.* *86*, 368 (2008).
99. Tao J., Zhao J., Zhao Y. a kol.: BACE inhibitory flavanones from *Balanophora involucrata* Hook. f. *Fitoterapia.* *83*, 1386 (2012).
100. Hwang E. M., Ryu Y. B., Kim H. Y. a kol.: BACE 1 inhibitory effects of lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens*. *Bioorg. Med. Chem.* *16*, 6669 (2008).

101. Jung H. A., Jin S. E., Park J. S. a kol.: Antidiabetic complications and anti-Alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structure–activity relationship. *Phytother. Res.* **25**, 709 (2011).
102. Wild Plants in and around Shimane. [Wildplantsshimane.jp](http://wildplantsshimane.jp). [Online] [Citace: 22.8.2014] http://wildplantsshimane.jp/Plates/Sophora_flavescens.htm.
103. Jung H. A., Yokozawa T., Kim B. W. a kol.: Selective inhibition of prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* against BACE 1 and cholinesterases. *Am. J. Chin. Med.* **38**, 415 (2010).
104. Choi Y. H., Yon G. H., Hong K. S. a kol.: In vitro BACE-1 inhibitory phenolic components from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Planta Med.* **74**, 1405 (2008).
105. Song K.-S., Choi S.-H., Hur J.-M. a kol.: Inhibitory Effects of Flavonoids Isolated from Leaves of *Petasites japonicus* on β -Secretase (BACE 1). *Food Science and Biotechnology.* **17**, 1165 (2008).
106. Dai J., Shen D., Yoshida W. Y. a kol.: Isoflavonoids from *Ficus benjamina* and their inhibitory activity on BACE 1. *Planta. Med.* **78**, 1357 (2012).
107. Sasaki H., Miki K., Kinoshita K. a kol.: β -secretase (BACE-1) inhibitory effect of biflavonoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 4558 (2010).
108. Shrestha S., Park J.-H., Lee D.-Y. a kol.: Cytotoxic and neuroprotective biflavonoids from the fruit of *Rhus parviflora*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **55**, 557 (2012).
109. Lv L., Yang Q. Y., Zhao Y. a kol.: BACE 1 (beta-secretase) inhibitory chromone glycosides from *Aloe vera* and *Aloe nobilis*. *Planta Med.* **74**, 540 (2008).
110. Videira R., Castanheira P., Graos M. a kol.: A necrodane monoterpene from *Lavandula luisieri* essential oil as a cell-permeable inhibitor of BACE-1, the β -secretase in Alzheimer's disease. *Flavour Fragr. J.* **28**, 380 (2013).
111. García-Vallejo M. I., García-Vallejo M. C., Sanz J. a kol.: Necrodane (1,2,2,3,4-pentamethylcyclopentane) derivatives in *Lavandula luisieri*, new compounds to the plant kingdom. *Phytochemistry.* **36**, 43 (1994).
112. *Lavandula luisieri*. [Bibliotecabiologia.usal.es](http://bibliotecabiologia.usal.es). [Online] [Citace: 12.8.2014] <http://bibliotecabiologia.usal.es/imagenes/picture.php?/250/tags/200-lamiaceae>.
113. Youn K., Jeonq W. S., Jun M.: β -Secretase (BACE 1) inhibitory property of loganin isolated from *Corni fructus*. *Nat Prod Res.* **27**, 1471 (2013).
114. Lee K. Y., Sung S. H., Kim S. H. a kol.: Cognitive-enhancing activity of loganin isolated from *cornus officinalis* in scopolamine-induced amnesic mice. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 677 (2009).
115. Junh H. A., Lee E. J., Kim J. S. a kol.: Cholinesterase and BACE 1 Inhibitory Diterpenoids from *Aralia cordata*. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 1399 (2009).

116. Wang Y.-H., Du G.-H.: Ginsenoside Rg1 inhibits β -secretase activity in vitro and protects against A β -induced cytotoxicity in PC12 cells. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **11**, 604 (2009).
117. Jia H., Jiang Y., Ruan Y. a kol.: Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid β -protein in cultured cells. *Neurosci. Lett.* **367**, 123 (2004).
118. Lv J., Jia H., Jiang Y. a kol.: Tenuifolin, an extract derived from tenuigenin, inhibits amyloid- β secretion in vitro. *Acta Physiologica.* **196**, 419 (2009).
119. Yoo K.-Y., Park S.-Y.: Terpenoids as potential anti-Alzheimer's disease therapeutics. *Molecules.* **17**, 3524 (2012).
120. Sorribas A., Jiménez J. I., Yoshida W. Y. a kol.: Daedalols A-C, fungal-derived BACE 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* **19**, 6581 (2011).
121. Mani V., Ramasany K., Ahmad A. a kol.: Protective effects of total alkaloidal extract from *Murraya koenigii* leaves. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 1036 (2012).
122. *Murraya koenigii* (L.) Spreng. *Botany.cz.* [Online] [Citace: 22.8.2014] <http://botany.cz/cs/murraya-koenigii>.
123. Zhang H., Conte M. M., Khalil Z. a kol.: New dictyodendrins as BACE inhibitors from a southern Australian marine sponge, *lanthella* sp. *RSC Adv.* **2**, 4209 (2012).
124. Jung H. A., Min B. S., Yokozawa T. a kol.: Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis rhizoma* alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 1433 (2009).
125. Harun A., James R. M. J., Lim S. M. a kol.: BACE 1 inhibitory activity of fungal endophytic extracts from Malaysian medicinal plants. *BMC Complement Altern Med.* **11**, 1 (2011).
126. Kim J., Lee H. J., Lee K. W.: Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimers disease. *J. Neurochem.* **112**, 1415 (2010).
127. Mandel S., Weinreb O., Reznichenko L. a kol.: Green tea catechins as brain-permeable, non toxic iron chelators to "iron out iron" from the brain. *J Neural Transm Suppl.* **71**, 241 (2006).
128. Wu L., Zhanq Q. L., Zhanq X. Y. a kol.: Pharmacokinetics and blood-brain barrier penetration of (+)-catechin and (-)-epicatechin in rats by microdialysis sampling coupled to high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J Agric Food Chem.* **60**, 9377 (2012).
129. Henning S. M., Niu Y., Liu Y. a kol.: Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 610 (2005).
130. Wang Q., Xu J., Rottinghaus G. E. a kol.: Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res.* **958**, 439 (2002).

131. Walle T.: Bioavailability of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1215*, 9 (2011).
132. Yang F., Lim G. P., Begum A. a kol.: Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* *280*, 5892 (2005).
133. Jäger A. K., Saaby L.: Flavonoids and the CNS. *Molecules.* *16*, 1471 (2011).
134. Dang Y., Lin G., Xie Y. a kol.: Quantitative determination of myricetin in rat plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its absolute bioavailability. *Drug. Res. (Stuttg).* *64*, 516 (2014).
135. Cai X., Fang Z., Dou J. a kol.: Bioavailability of quercetin: problems and promises. *Curr Med Chem.* *20*, 2572 (2013).
136. Liu H., Yang J., Du F. a kol.: Absorption and Disposition of Ginsenosides after Oral Administration of Panax notoginseng Extract to Rats. *Drug metabolism disposition.* *37*, 2290 (2009).
137. Huang Y., Bai Y., Zhao L. a kol.: Pharmacokinetics and metabolism of neferine in rats after a single oral administration. *Biopharm. Drug Dispos.* *28*, 361 (2007).
138. Saengkhaea C., Salerno M., Adès D.: Ability of carbazole salts, inhibitors of Alzheimer β -amyloid fibril formation, to cross cellular membranes. *European Journal of Pharmacology.* *559*, 124 (2007).

Abstrakt

Kočová, K.: Přírodní látky a jejich β -sekretasová inhibiční aktivita, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2015, 83 s.

Tato rešeršní diplomová práce, čerpající zejména ze zahraniční odborné literatury, podává ucelený přehled přírodních látek s β -sekretasovou inhibiční aktivitou.

V úvodní kapitole Alzheimerova choroba je stručně uvedena definice, rizikové faktory a symptomatologie onemocnění. Větší část kapitoly popisuje etiopatogenezi onemocnění se zaměřením na amyloidovou teorii. Nakonec jsou zde zmíněny také současné přístupy terapie Alzheimerovy choroby a přístupy, které zůstávají v klinických zkoušeních. Další oddíly práce se věnují enzymu β -sekretase z hlediska jejich fyziologických funkcí a substrátů. Dále je zhodnocen současný stav výzkumu syntetických inhibitorů β -sekretázy, popsány nejdůležitější metody testování inhibice a aktivity β -sekretázy *in vitro* a nastíněna problematika vývoje nových inhibitorů pomocí metody *in silico*.

Stěžejní část práce tvoří výčet přírodních látek s β -sekretázovou inhibiční aktivitou. Tato část je strukturovaná dle jednotlivých typů primárních a sekundárních metabolitů. Jednotlivé sloučeniny jsou porovnávány dle hodnot inhibiční koncentrace IC_{50} a pro přehlednost uvedeny v tabulce.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, BACE 1, inhibice, přírodní látky

Abstract

Kočová, K.: Natural compounds and their β -secretase inhibitory activity, Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2015, 83 p.

Data used in this Diploma Thesis have been taken from foreigner scientific literature. It provides the whole summary of natural compounds with β -secretase inhibitory activity.

First chapter Alzheimer's disease briefly describes a definition, risk factors and symptomatology of the disease. Most of this chapter characterizes an etiopathology of the disease focused on amyloid theory. Finally there are also mentioned current approaches to therapy of Alzheimer's disease and those, which stay in clinical trials. Next part is dedicated to physiological functions and substrates of the β -secretase. This diploma thesis evaluates the current state of scientific research of synthetic inhibitors of β -secretase, describes the most important methods of testing inhibition and activity of β -secretase *in vitro* and outlines the issue of development of new inhibitors using *in silico* method.

Main part of this work consists of the list of natural compounds with β -secretase inhibitory activity. This part is structured according to particular types of primary and secondary metabolites. Compounds are compared using values of inhibitory concentration IC_{50} and included in the table.

Key words: Alzheimer's disease, BACE 1, inhibition, natural compounds