

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



Doktorská disertační práce

Biologická aktivita alkaloidů *Narcissus pseudonarcissus* L. cv.

Dutch Master (Amaryllidaceae)

Biological activity of alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L.

cv. Dutch Master (Amaryllidaceae)

Školitel: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Studijní obor: Farmakognosie a toxikologie přírodních látek

Srpen 2018

Mgr. Daniela Hulcová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, Srpen 2018

Mgr. Daniela Hulcová

PODĚKOVÁNÍ

Disertační práce vznikla za podpory Specifického vědeckého výzkumu Univerzity Karlovy, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (SVV 260 292, SVV 260 412), byla spolufinancována Evropským projektem TEAB (registrační číslo: CZ.1.07/2.3.00/20.0235) a celofakultními výzkumnými programy PRVOUK a Q42 PROGRESS, které jsou řešeny v rámci Programů rozvoje výzkumných oblastí na Univerzitě Karlově. Zahraniční stáž byla financována z programu Erasmus+.

Poděkování patří všem členům z pracovní skupiny ADINACO, zejména mé školitelce doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za vedení v průběhu celého mého doktorského studia, prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. a dalším kolegům z katedry farmaceutické botaniky za rady a pomoc při řešení komplikací i běžných situací a za vytvoření příjemného a přátelského prostředí.

Za spolupráci při měření biologických aktivit a fyzikálně chemických vlastností alkaloidů bych chtěla poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. a Mgr. Janě Maříkové za měření a interpretaci NMR spekter alkaloidů, doc. Pharm.Dr. Lucii Novákové, Ph.D. za měření HRMS spekter nově izolovaných alkaloidů, doc. Pharm.Dr. Danielu Junovi, Ph.D. a Mgr. Martině Hrabínové za stanovení inhibiční POP aktivity, RNDr. Radimu Havelkovi Ph.D. a Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za měření cytotoxické aktivity a doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za měření antimikrobiální a antifungální aktivity.

V neposlední řadě chci poděkovat rodině a přátelům, kteří mě vždy podporovali.

SEZNAM ZKRATEK

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AKR1C3	Aldo-keto reduktasa 1C3
AD	Alzheimerova choroba
APP	Amyloidový prekurzorový protein
A β	β -amyloid
BACE 1	β -sekretasa 1
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CDK-5	cyklin-dependentní kinasa 5
ED ₅₀	Efektivní dávka (pro dosažení 50% max. účinku)
GSK	Glykogen syntasa kinasa
HEB	Hematoencefalická bariéra
HDAC (EC 3.5.1.98)	Histonované deacetylázy
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace (při 50% inhibici)
IACHÉ	Inhibitory acetylcholinesterasy
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartátové
POP	Prolyl oligopeptidasa
Wnt	Wingless/Int-1

Obsah

1. Úvod	6
2. Cíle disertační práce	9
3. Současný stav poznání.....	10
3.1 Alzheimerova choroba	10
3.1.1 Cholinergní hypotéza.....	11
3.1.2. Hypotéza amyloidní kaskády	11
3.1.3. Hypotéza mikrotubulární nestability.....	12
3.1.4. Teorie glutamátové neurotoxicity	13
3.1.5. Současné možnosti terapie AD.....	13
3.2 Nádorová onemocnění.....	21
3.3 Čeleď Amaryllidaceae	27
3.3.1 Rod <i>Narcissus</i>	27
3.3.2 Biosyntéza alkaloidů rodu <i>Narcissus</i> a jejich strukturní typy	29
3.3.3 Historické využití rodu <i>Narcissus</i>	33
3.3.4 <i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Dutch Master – vlastní studie.....	34
4. Abstrakt	42
5. Abstract	44
6. Přehled publikací autorky a odborné činnosti autorky	46
6.1 Tématické práce	46
6.2 Abstrakty z konferencí.....	47
6.3 Odborné stáže a kurzy	48
7. Literatura	49

1. Úvod

Rostliny člověk využívá již od nepaměti jako zdroj potravy, materiál pro stavbu, výrobu oděvů, zdroj látek pro různé technické využití a v neposlední řadě i jako léčiva. Již pravěcí lidé se potýkali s úrazy způsobenými při lovu a nemocemi, které byly vyvolány různými mikroorganismy a parazity. Podle poznatků z paleopatologie víme, že již pravěcí lidé mohli trpět i různými záněty kostí, degenerativními změnami na kloubech a zubními neduhy. První lidé získávali poznatky o léčivech empiricky pozorováním zvířat a metodou pokus omyl. Rostliny byly nejprve používány v čerstvé formě, kdy se přikládaly nebo konzumovaly a později se zpracovávaly jednoduše sušením nebo se z nich vyráběly různé extrakty, výluhy, prášky, placky nebo bochánky. S postupným rozvojem lékařských a farmaceutických věd se prohlubovaly znalosti o léčivých rostlinách a jejich účincích¹. Lidé začali přemýšlet o tom, co vlastně je nositelem účinku a začátkem 19. století se objevují první izolované látky z přírodního materiálu. Z farmaceutického hlediska patří mezi nejvýznamnější látky především produkty sekundárního metabolismu². Tyto látky jsou velice rozmanité jak po stránce chemické, tak po stránce biologického účinku. Mezi první obsahové složky izolované z rostlin, které se běžně užívaly při léčení různých onemocnění, patří například kyselina salicylová, digitoxin³ a celá řada alkaloidů jako morfin, chinin, emetin, brucin a strychnin^{4,5}.

Alkaloidy jsou látky převážně bazického charakteru, obsahující dusík, který je ve většině případů zabudovaný v heterocyklu. Tyto sloučeniny jsou v rostlinách syntetizovány většinou z aminokyselin nebo jejich derivátů⁵ a nacházejí se distribuovány v různých orgánech. Jedná se o charakteristické obsahové látky celé řady rostlinných čeledí a jsou často zodpovědné za biologické vlastnosti rostlin. Nejčastěji to bývá toxicita, která je zodpovědná za časté otravy či jiné farmaceuticky významné účinky. Alkaloidy se dělí podle základní chemické struktury do několika skupin⁶. Mezi nejvýznamnější z hlediska toxikologického a farmaceutického patří tropanové alkaloidy atropin, skopolamin, hyoscyamin a kokain, které mají výrazné parasymptolytické účinky. Tyto alkaloidy jsou obsaženy v čeledi Solanaceae například v *Atropa belladonna* L., *Hyoscyamus niger* L., *Datura stramonium* L. aj. a *Erythroxylon coca* L. z čeledi Erythroxylaceae. Hepatotoxickým účinkem se vyznačují některé pyrrolizidinové alkaloidy, které můžeme nalézt v rostlinách běžně rostoucích jako je *Symphytum officinale* L. z čeledi Boraginaceae a dále v celé řadě zástupců čeledi Asteraceae např. *Senecio jacobaea* L. nebo *Tussilago farfara* L.

Indolové alkaloidy jsou velmi významnou skupinou, do které patří námelové alkaloidy a alkaloidy rodů *Catharanthus* a *Vinca*⁷. Námelové alkaloidy ve středověku byly příčinou onemocnění nazývaného ergotismus, při němž docházelo k halucinacím a ke spazmu cév okrajových částí těla (nos, brada, uši, prsty), což mohlo vyústit až v jejich nekrózu. Tyto alkaloidy se využívaly v gynekologii a porodnictví k zástavě krvácení. Alkaloidy z rodů *Catharanthus* a *Vinca* se používají při léčbě různých druhů nádorových onemocnění^{7,8}.

Další velmi významnou a rozsáhlou skupinu tvoří isochinolinové alkaloidy, které nalezneme třeba v čeledi Papaveraceae například rodu *Papaver*, který obsahuje morfinové alkaloidy (morfin, kodein) nebo *Chelidonium majus* L. (chelidonin, sanguinarin). Morfin, kodein a látky od nich odvozené se dnes používají jako analgetika a antitusika. Alkaloidy izolované z *Chelidonium majus* mají účinky mírně podobné morfinu a dále účinek spasmolytický a cytostatický, který se využívá při léčbě bradavic⁷. Do čeledi Papaveraceae patří i rostlina *Macleaya cordata* Willd., jejíž extrakt vykázal antibakteriální aktivitu⁹. Další čeledí obsahující isochinolinové alkaloidy je čeleď Amaryllidaceae, která vytváří strukturně specifické typy. Rostliny této čeledi známe především jako okrasné a obecně jsou považovány za toxické. Na našem území se můžeme nejčastěji setkat s *Galanthus nivalis*, *Leucojum vernum* a *Narcissus spp.* Nejvýznamějším alkaloidem z této čeledi je galanthamin, užívaný při léčbě Alzheimerovy choroby (AD). Alkaloidy této čeledi jsou velice specifické, nevyskytují se v žádné jiné čeledi, a proto je řadíme zvlášť do podskupiny označované jako Amaryllidaceae (amaryllkovité) alkaloidy. V terapii se prozatím používá pouze galanthamin, u dalších alkaloidů produkovaných rostlinami čeledi Amaryllidaceae bylo prokázáno velké množství biologických aktivit a z těchto důvodů jsou intenzivně studovány jako potenciální léčiva pro terapii různých onemocnění. Mezi nejvýznamnější účinky, které jsou vědeckou komunitou intenzivně studovány, patří protinádorová, anticholinesterasová, antivirová, antibakteriální, antifungální a antimalarická aktivita¹⁰.

S rozvojem lidstva a civilizací nedochází jen ke zvyšování životní úrovně a prodlužování délky života, ale i rozšíření chronických (tzv. civilizačních) nemocí. V dřívějších dobách lidé umírali převážně na choroby spojené s infekčními agens, na úrazy, hlad či otravy. Dnes tyto problémy umíme dobře řešit, a proto se lidé dožívají vyššího věku. Tento fakt s sebou přináší celou řadu jiných potíží, které se sice objevovaly již dříve, ale nebyly tak časté. Nejčastěji se jedná o nemoci neinfekčního charakteru, jako je řada autoimunitních onemocnění. Mezi tyto nemoci patří například diabetes mellitus, některá onemocnění štítné žlázy, atopické ekzémy a další dermatologické potíže, nebo roztroušená skleróza. Dále jsou rozšířeny nejrůznější typy alergických reakcí, revmatoidní onemocnění, psychické choroby, cévní potíže, obezita, nádorová onemocnění či vrozené vady. Právě tyto nemoci jsou označovány jako civilizační choroby a souvisejí s odlišným způsobem života v dnešním moderním světě. Lidé moderních zemí již netrpí hladem, ale naopak se přejídají smaženými a sladkými jídly. S rozvojem průmyslu každý člověk přichází do každodenního styku s nejrůznějšími chemikáliemi, které mají špatný vliv na organismus. Doba je uspěchaná a lidé trpí více stresem, který se snaží snížit třeba kouřením anebo dochází až k psychickému zhroucení¹¹. Se stárnutím populace se objevují i různé stařecké nemoci jako je demence, Parkinsonova choroba nebo AD. Tato onemocnění se objevují nejčastěji v pokročilém věku a postihují jak fyzické, tak psychické funkce postiženého. Jsou to nemoci, které nelze vyléčit, a v současné době je používána pouze symptomatická léčba. Neléčí se příčina, ale řeší se příznaky, zmírňují následky, případně se oddaluje nástup pokročilejších stádií těchto nemocí.

Léčiva jsou dnes převážně syntetického charakteru, některé ale mají často předlohu v látkách rostlinného původu. Je velmi složité vytvořit sloučeninu, která bude fungovat tak, jak bychom chtěli. Z těchto důvodů je jednodušší obměňovat známé struktury, jejichž mechanismus účinku byl již podrobně popsán. V tomto směru mají velký potenciál právě obsahové látky různých rostlin, které by se daly využít jako zdroj pro vývoj nových léčiv pro terapii celé řady chronických a dalších onemocnění.

2. Cíle disertační práce

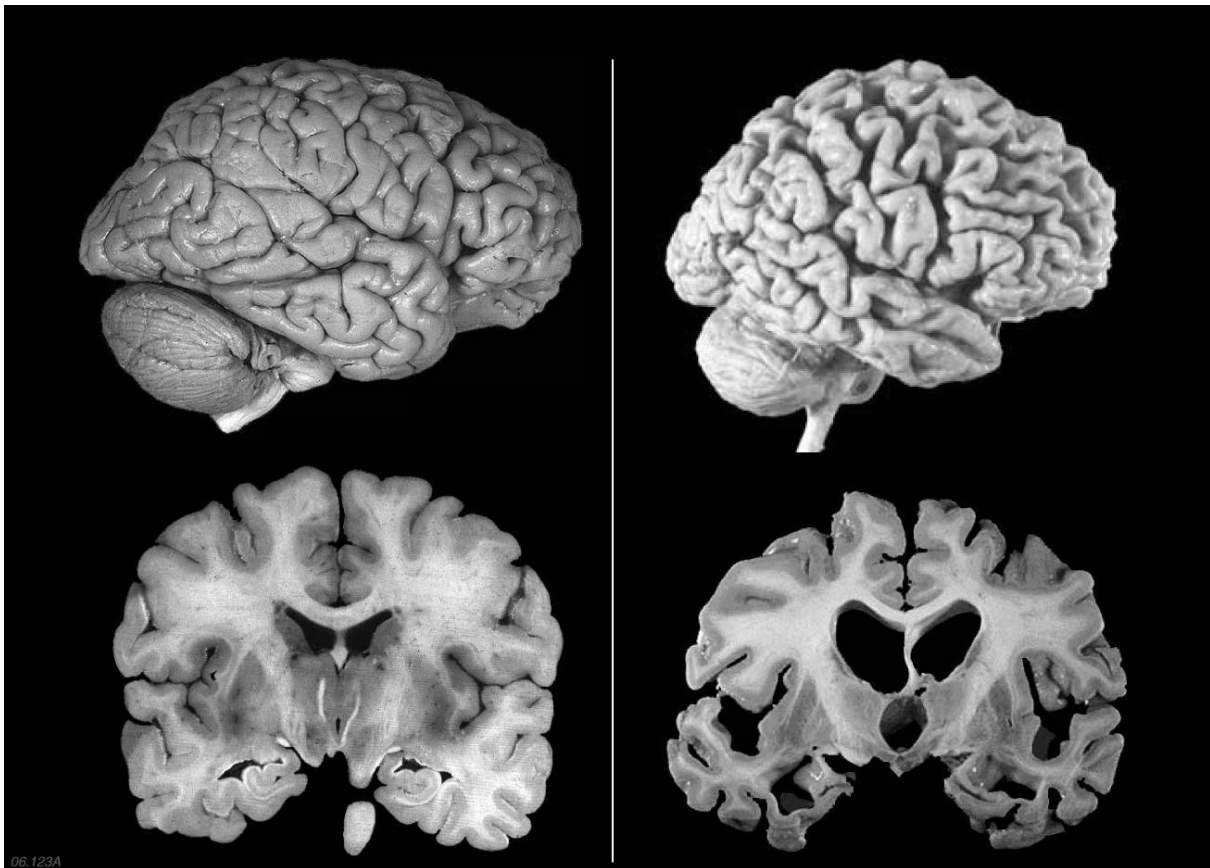
1. Podrobná literární rešerže na téma biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů s důrazem na rod *Narcissus*.
2. Příprava alkaloidního extraktu a izolace Amaryllidaceae alkaloidů v čistém stavu z množství cca 30 kg čerstvých cibulí rostliny *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master.
3. Kompletní identifikace izolovaných látek za využití fyzikálně-chemických metod (1D-, 2D- NMR, HRMS, MS, X-ray, optická otáčivost a další).
4. Stanovení biologických aktivit izolovaných alkaloidů s důrazem na terapii Alzheimerovy choroby a nádorových onemocnění.
5. Výběr nejúčinnějších látek pro detailní biologické studie a přípravu derivátů těchto alkaloidů za účelem studia vztahu struktura - aktivita.

3. Současný stav poznání

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je jednou z nejrozšířenějších civilizačních chorob ve vyspělé části světa a také jednou z nejčastějších příčin demence. Pacientů postižených tímto onemocněním přibývá s prodlužující se délkou života. V současné době pouze v České republice žije více než 140 tisíc lidí trpících touto nemocí¹². AD se nejčastěji objevuje kolem 60. roku života a v průběhu tohoto onemocnění dochází k poškození na úrovni orgánové, buněčné i biochemické. Z hlediska orgánového jde o posupný úbytek mozkové tkáně (obr. 1), v jehož důsledku se začínají rozvíjet příznaky nemoci¹³. Ztráta nervových buněk – neuronů, vede dále k poškození tvorby neuromediátorů, jako jsou acetylcholin (ACh), noradrenalin, dopamin, kyselina γ -aminomáselná a serotonin. Nedostatek těchto neuromediátorů se projevuje poruchou mozkových funkcí, zejména kognitivních a pohybových. Další změna, která nastává v mozku nemocných je tvorba lézí, které patrně vznikají patologickým působením některých enzymových systémů. Tyto léze poškozují neurony a způsobují ztrátu jejich funkce a smrt. Během tohoto procesu se uvolňují mediátory zánětu, jako jsou zánětlivé cytokiny, enzymy a volné radikály a vzniká tak sterilní zánět, který poškozuje další neurony¹⁴. Odumírání neuronů pozorujeme zejména v mozkové kůře a hippokampu. Všechny tyto procesy se podílejí na rozvoji onemocnění, ale přesnou příčinu, která spouští kaskádu dějů vedoucích k rozvoji AD, prozatím neznáme¹⁵. V dnešní době existuje několik teorií, které se snaží vnést alespoň částečné objasnění do dějů vzniku této nemoci. Mezi nejznámější a nejvíce diskutované patří cholinergní hypotéza a hypotéza amyloidní kaskády. Další méně známé teorie jsou: teorie glutamátové neurotoxicity, někdy označovaná jako kalciová hypotéza; hypotéza mikrotubulové nestability; koncepce mírných kognitivních poruch; hypotéza oxidativního stresu a oxidativní nerovnováhy; teorie oxidu dusnatého; koncepce regulace a ovlivňování původních molekul a další¹⁶. Tyto teorie jsou do různých detailů popsány v literatuře, v dalších kapitolách se ale zaměřím na podrobnější popis jen nejdůležitějších teorií. Neexistují jednoznačné důkazy pro přijetí té či oné hypotézy, ale je pravděpodobné, že na vzniku AD se více či méně podílí mnoho různých faktorů, které nakonec mohou vyústit v rozvoj tohoto onemocnění.

Prvními příznaky AD jsou poruchy krátkodobé paměti, postupně se přidávají poruchy řeči, logického myšlení, úsudku, sociálních dovedností a orientace. V pokročilých stádiích nemoci dochází ke ztrátě mobility, inkontinenci moči a stolice a pacient přestává reagovat na své okolí^{13,15}. V dnešní době je tato nemoc nevléčitelná. Základem terapie je zpomalení nástupu příznaků, jejich zmírnění a případně pozastavení progresu onemocnění a prodloužení doby samostatnosti pacienta.



Obr. 1: Úbytek mozkové tkáně při AD¹⁷

3.1.1 Cholinergní hypotéza

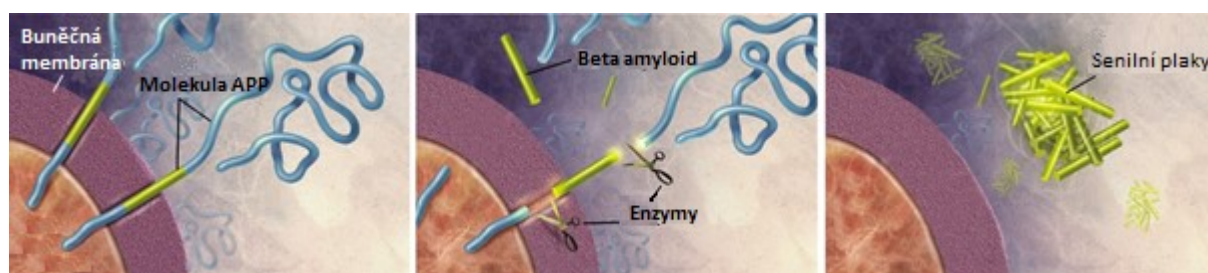
Acetylcholin je mediátor, který hraje velmi důležitou roli v CNS. Působí jako neurotransmitter ovlivňující paměť, učení, a další kognitivní funkce, dále jako neuromodulátor regulující vzdálenější neurotransmitterové systémy. ACh je syntetizován v neuronech z aminokyseliny cholinu a acetyl-CoA pomocí enzymu cholinacetyltransferasy. Při poškození neuronů se snižuje hladina tohoto enzymu a tak klesá i tvorba ACh. Naopak hladiny enzymů acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BuChE), kterými je ACh rozkládán, se během AD zvyšují a tím dochází k jeho rychlejšímu odbourávání¹⁸. Z těchto skutečností vyplývá příčina nedostatku ACh u pacientů trpící AD. Podle cholinergní hypotézy se nízká hladina ACh podílí nejen na poruše mozkových funkcí, ale i na chybném zpracování amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který má za následek tvorbu nerozpustného β -amyloidu ($A\beta$) a tím i senilních plaků¹⁹.

3.1.2. Hypotéza amyloidní kaskády

Dalšími znaky, které vznikají během AD, jsou v dnešní době dobře známé histopatologické léze. Jedná se především o senilní plaky a neuronální klubka.

Amyloidový prekurzorový protein je transmembránový protein, který se nachází ve stěnách nervových buněk. Tento protein je v těle štěpen třemi druhy enzymu α -, β - a γ -sekretasou.

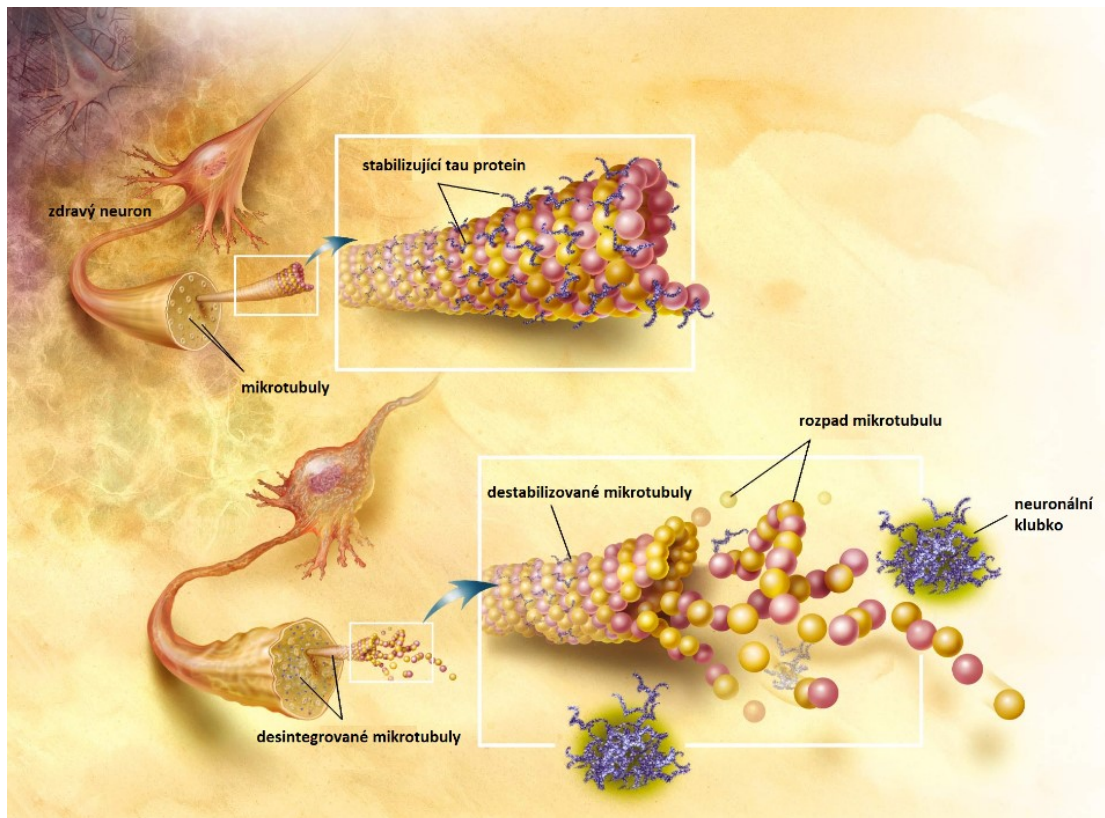
Po rozštěpení APP vzniká rozpustný produkt. Za patologických podmínek se tento APP štěpí za vzniku nerozpustného A β , přičemž následně dochází k jeho shlukování a tvorbě neurotoxických oligomerů, které poškozují neurony a dávají základ pro vznik masivního jádra senilních plaků (obr. 2). Na toto jádro se dále nabalují poškozené neurity, gliové buňky, části rozpadlých buněk, cév a další elementy¹⁴. Senilní plakuly se kumulují v extracelulární matrix a ve stěnách mozkových cév a způsobují destrukci dalších mozkových buněk²⁰. Podle některých prací je možno nalézt spojitost mezi působením AChE a tvorbou A β ²¹⁻²³. Enzym BuChE vliv na formování A β pravděpodobně nemá z důvodu odlišné molekulární stavby²⁴.



Obr. 2: Vznik senilních plaků²⁵

3.1.3. Hypotéza mikrotubulární nestability

Neuronální klubka se na rozdíl od plaků vytváří v cytoplasmě uvnitř neuronů. Ta jsou tvořena ubikvitinem a hyperfosforylovaným τ -proteinem²⁰. τ -Protein je strukturální fosfoprotein stabilizující celulární neurotubuly. Za běžných podmínek se τ -protein naváže na tubulin, kde je posléze defosforylován. Při AD je tento proces narušen jeho hyperfosforylací, protože dochází k polymerizaci na párově spirální vlákna¹⁴. Tyto změny vedou ke ztrátě funkce buněčného transportu a vznikající klubka zároveň působí toxicky, což má za následek poškození až destrukci postiženého neuronu²⁶ (obr. 3). Dle výzkumu se z velké části na tomto procesu podílí enzymy cyklin-dependentní kinasa 5 (CDK-5) a glykogen syntasa kinasa (GSK) 3 β ¹⁸.



Obr. 3: Vznik neuronálních klubek²⁷

3.1.4. Teorie glutamátové neurotoxicity

U AD a dalších neurodegenerativních onemocnění dochází k nadměrnému uvolňování tzv. excitačních aminokyselin, jako je glutamát nebo aspartát, což má za následek nadměrnou excitaci NMDA receptorů. NMDA receptory jsou *N*-methyl-D-aspartátové ionotropní receptory nacházející se v mozku, které otevírají iontové kanály pro Ca^{2+} . Tyto receptory hrají důležitou úlohu ve vývoji, plasticitě a přežití neuronů. Další velmi významnou rolí, kterou zastávají, je tvorba signálu důležitého pro dlouhodobou potenciaci, která je základem pro učení a paměť²⁸. Po otevření Ca^{2+} kanálů dochází k influxu iontů, což spouští kaskádovitý sled dějů, který vede až k expresi různých genů důležitých pro funkci buněk. Při nadměrném dráždění receptorů, jak je tomu u AD, dochází k excitotoxicitě, zvýšenému průniku Ca^{2+} iontů do buňky. Tento děj má za následek aktivaci různých enzymů a dějů, jako jsou změny proteinů a exprese genů, což ve finále vede k apoptóze buňky. Nadměrnou excitací těchto receptorů navíc dochází ke zvýšení tzv. přenosových šumů, které brání přenosu žádoucích potenciálů a tím ruší i mechanismus dlouhodobé potenciace²⁹.

3.1.5. Současné možnosti terapie AD

Jak již bylo uvedeno, AD je nevléčitelné onemocnění jehož léčba je v současné době založena pouze na kauzální terapii. Cílem této léčby je zpomalení progresu onemocnění a zmírnění jeho příznaků, zejména zvýšením hladiny Ach a zpomalením tvorby amyloidních plaků. Využívají se postupy, které

ovlivňují známé patologické řetězce, o kterých již byla zmínka výše. Ze skupin látek, které mají prokázanou účinnost, se jedná hlavně o léčbu inhibitory acetylcholinesterasy (IACHe) a inhibitory NMDA receptorů (tab. 1)³⁰. Jako podpůrná léčba se využívají postupy, jejichž efekt není zcela prokázán, tak jako u dvou předchozích skupin. Tato doplňková léčba není zdaleka tak efektivní a používá se především v počátečních stádiích AD, kde ještě pojišťovna nehradí léčbu IACHe. Mezi tyto prostředky patří nootropika, zhášedce volných kyslíkových radikálů a extrakty z *Ginkgo biloba*³¹ L. v různých formách léčivých přípravků³². Jako další medikace se využívají i psychofarmaka, nejčastěji se jedná o antidepresiva. Tato terapie se používá proto, neboť během nemoci se u pacientů rozvíjejí poruchy chování, úzkostné stavy, halucinace a bludy, deliria, agitovanost či apatie, deprese a další. V dnešní době se však od této léčby ustupuje, protože nežádoucí účinky převyšují benefit těchto léčiv. Velice důležitá je i nefarmakologická léčba. Jedná se o trénink kognitivních funkcí, psychoterapie a fyzické cvičení¹².

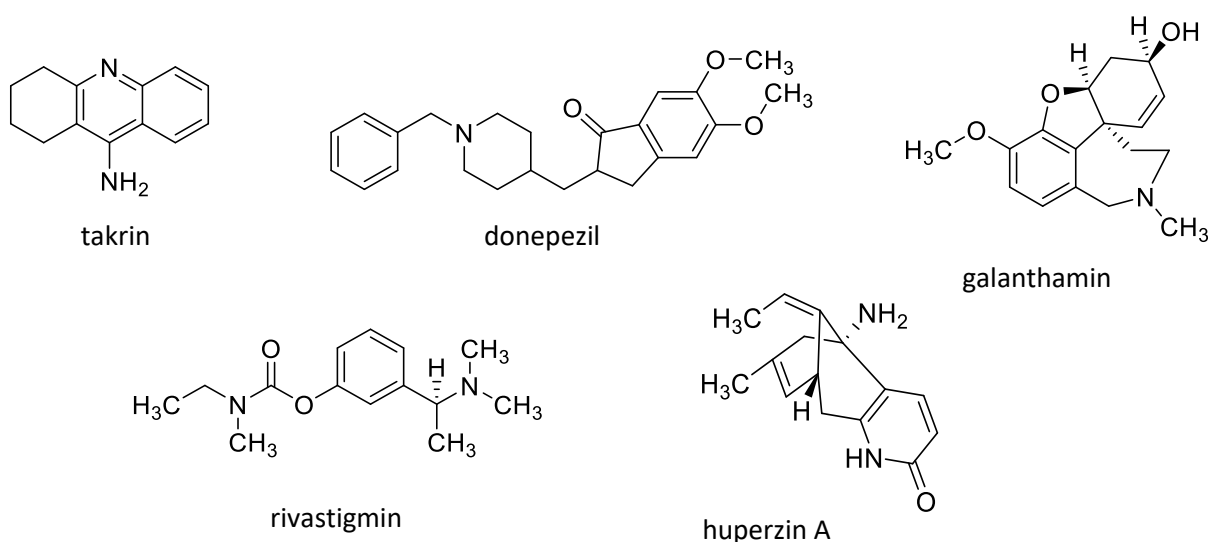
Tab. 1: Přehled terapeuticky používaných látek v terapii AD³³⁻³⁵

sloučenina	mechanismus působení	indikace	zavedení do praxe
takrin	inhibitor AChE	-	1993 - již se nepoužívá (hepatotoxicita, gastrointestinální toxicita)
donepezil	inhibitor AChE	lehká až střední stádia AD	1996
rivastigmin	inhibitor AChE a BuChE	lehká až střední stádia AD, těžká stádia	2000
galanthamin	inhibitor AChE, allosterický modulátor nikotinových receptorů	lehká až střední stádia AD	2001
memantin	inhibitor NMDA-ionotropních receptorů	střední až těžká stádia AD (nikoliv terminální)	2003
huperzin A	inhibitor AChE a NMDA-ionotropních receptorů	terapie AD pouze v Číně	1994

3.1.5.1 Inhibitory cholinesteras

Jak již bylo uvedeno, cholinesterasy se podílejí na poklesu hladiny ACh a uplatňují se i v rozvoji amyloidových plaků. Z těchto důvodů jsou cholinesterasy důležitým cílem zásahu léčiv, uplatňujících se při léčbě AD. Látky působící jako inhibitory těchto enzymů omezují jejich působení v organismu. Obecně má BuChE menší afinitu k ACh než AChE a její působení v lidském organismu je hlavně na periférii, kdy během AD dochází k mírnému snížení aktivity a koncentrace AChE v některých částech mozku a její roli přebírá BuChE. Z těchto důvodů je žádoucí hledat i terapeuticky využitelné inhibitory BuChE nebo inhibitory obou enzymů³⁶. První používanou látkou tohoto typu byl nekompetitivní inhibitor takrin, který však musel být stažen z důvodu hepatální a gastrointestinální toxicity³³. V dnešní době se v praxi zatím využívají především IACHe donepezil³⁷, rivastigmin³⁸ a alkaloid Amarylidaceae

galanthamin³⁹ (obr. 4). Donepezil je syntetický, selektivní, nekompetitivní AChE, který navíc podporuje správné štěpení APP, narušuje formování β -amyloidu a snižuje koncentraci glutamátu. Současně má i významné antioxidační účinky³³. Fysostigmin je alkaloid obsažený v tropické rostlině *Physostigma venenosum* Balf. z čeledi Fabaceae⁴⁰. Tato látka však nebyla z důvodu závažných nežádoucích účinků a nutnosti častého podávání pro terapii vhodná. Na druhou stranu tato struktura posloužila, jako „lead-structure“ ve vývoji látek s příznivějším biologickým profilem. Za využití několika chemických obměn byl připraven polosyntetický derivát, rivastigmin. Rivastigmin se vyznačuje delším biologickým poločasem a lepší snášenlivostí^{41,42}. Působí jako pseudo-irreversibilní (pomalu vratný), kompetitivní, duální inhibitor AChE i BuChE⁴³. Pomalá eliminace rivastigminu v důsledku kovalentní vazby v aktivním místě enzymu je výhodou oproti jiným léčivům. Účinek této látky může trvat tak dlouho, dokud se spontánně neoddělí od aktivního místa cholinesterasy⁴⁰. Jako jediné léčivo z uvedených inhibitorů má dvě různé lékové formy, tabletovou a transdermální. Druhá forma je výhodnější z důvodu lepší snášenlivosti, jednoduché aplikace a možností použití i v pozdějších stádiích nemoci⁴³. Galanthamin byl v padesátých letech 20. století izolován z *Galanthus woronowii* Losinsk. Tento alkaloid se pro farmaceutické účely získává částečně i izolací z rostlin a to zejména z *Leucojum aestivum*⁴⁴ L., *Lycoris radiata* Grey, *Ungernia victoris* Vved. a různých druhů rodu *Narcissus* spp. jako například *N. pseudonarcissus* L. cv. Carlton⁴⁵. Cibule zmíněné pěstované odrůdy se používají k izolaci galanthaminu pro farmaceutické účely i v České republice ve firmě TEVA. Tento alkaloid zvyšuje hladinu ACh díky kompetitivní inhibici AChE, ale zároveň působí jako allosterický modulátor nikotinových acetylcholinových receptorů, což vede k jejich zvýšené citlivosti na ACh. Díky těmto mechanismům dochází i k vyšší postsynaptické odezvě⁴⁶. Vedle galanthaminu byla i u dalších Amaryllidaceae alkaloidů zjištěna inhibiční aktivita nejen vůči AChE, ale i BuChE.



Obr. 4: Struktury terapeuticky používaných inhibitorů cholinesteras v terapii AD

Poslední látkou, která je používána v terapii AD je huperzin A. Terapie touto látkou je prozatím povolena pouze v Číně, ale ve světě již probíhá třetí fáze klinických studií⁴⁷. Jedná se o seskviterpenový alkaloid izolovaný z *Huperzia serrata* Thunb. ex Murr. z čeledi Huperziaceae. Tento silný, reverzibilní a selektivní inhibitor AChE byl původně navržen jako léčivo při otravě organofosfáty⁴⁸. Další výzkumy ukázaly, že tato látka také inhibuje i NMDA^{48,49} receptory a tak snižuje glutamátovou toxicitu, chrání buňky proti β -amyloidu, volným radikálům a hypoxii⁵⁰.

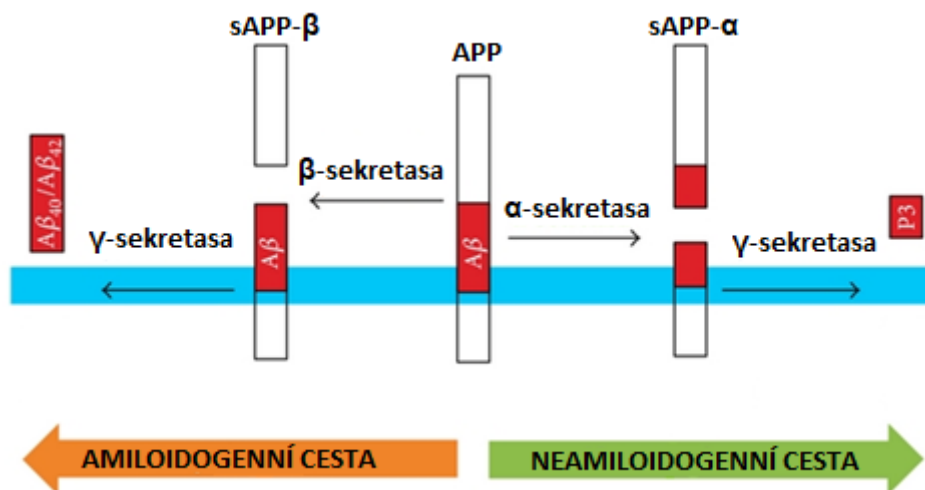
Inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám vykazují celá řada přírodních látek. Významnou aktivitu vykazují alkaloidy izolované z *Peumus boldus*⁵¹ Mol., *Fumaria officinalis*⁵² L., *Corydalis cava*⁵³ Schweigg. & Kort., *Chelidonium majus*⁵⁴ L., *Buxus hyrcana*⁵⁵ Pojark. a další⁵⁶. V následující tabulce jsou shrnuty nejzajímavější inhibitory AChE/BuChE přírodního původu (tab. 2). Jak lze vidět, přírodní inhibitory jsou typově nejednotné struktury, které je možno nalézt v různých čeledích.

Tab. 2: Významné inhibitory cholinesteras přírodního původu

sloučenina	typ látky	rostlina	čeleď	IC ₅₀ , AChE (μM)	IC ₅₀ , BuChE (μM)	citace
retikulin	benzylisochinolinový alkaloid	<i>Peumus boldus</i>	Monimiaceae	509,0	33,6	51
N-methylkolkaurin				220,2	15,0	
chelidonin	isochinolinový alkaloid	<i>Chelidonium majus</i>	Papaveraceae	26,8	31,9	54
(+)-kanadalin		<i>Corydalis cava</i>	Fumariaceae	20,1	85,2	53
(+)-kanadin				12,4	483,0	
(±)-korykavidin				223,0	46,2	
(-)-munitagin	pavinový alkaloid	<i>Argemone platyceras</i>	Papaveraceae	62,3	837,4	57
1,8-cineol	monoterpen	<i>Salvia lavandulaefolia</i>	Lamiaceae	0,67	-	58
α-pinen				0,63	-	
haloxysterol A	sterol	<i>Haloxylon recurvum</i>	Chenopodiaceae	8,3	4,7	59
haloxysterol B				0,9	2,3	
lawsaritol				15,2	3,9	
isomukronulatol	isoflavin	<i>Micromeria cilicica</i>	Lamiaceae	118,0	56,2	60
kyselina ursolová	kyselina hydroxytriterpenová			93,8	41,1	
brakteosin A	withanolid	<i>Ajuga Bracteosa</i>	Lamiaceae	25,2	38,4	61,62
withaferin A		<i>Withania somnifera</i>	Solanaceae	20,5	95,2	

3.1.3.2 β -Sekretasa 1

β -Sekretasa 1, Beta-site Amyloid precursor protein-Cleaving Enzyme 1 (BACE 1), se přirozeně vyskytuje v lidském organismu. Její fyziologická funkce ještě není zcela známa, ale předpokládá se, že se podílí na myelinizaci axonů periferních nervů⁶³. Další funkcí tohoto enzymu je štěpení transmembránového APP, což má za následek tvorbu amyloidových plaků. U zdravých jedinců převládá tzv. neamyloidogenní cesta štěpení APP, kdy dochází ke štěpení pomocí α - a γ -sekretas. Touto cestou vznikají fragmenty o délce 39 aminokyselin, které jsou v extracelulárním prostoru dobře rozpustné⁶⁴. Během rozvoje AD dochází ke změnám, štěpení APP probíhá tzv. amyloidogenní cestou. Funkci α -sekretasy přebírá BACE 1 a společně s γ -sekretasou štěpí APP. V rámci tohoto štěpení vznikají fragmenty o délce 40-42 aminokyselin⁶⁵ (obr. 5). Tyto fragmenty jsou nerozpustné a kumulují se v extracelulárním prostoru, kde se následně shlukují, polymerizují a dávají vznik jádru amyloidních senilních plaků, na která se následně nabalují další elementy⁶⁶. Tyto plaky jsou neurotoxické a vyvolávají sterilní zánět, což vede k poškození dalších neuronů⁶⁷.



Obr. 5: Schéma procesu zpracování amyloidního precursorového proteinu⁶⁸.

Některé práce uvádějí, že senilní plaky mohou být příčinou vzniku neuronálních klubek^{64,69}. Je zřejmé, že sekretasy jsou vedle cholinesteras dalším důležitým cílem při hledání nových léčiv uplatňujících se v léčbě AD. Celá řada výzkumných skupin se touto problematikou zabývá. Bylo zjištěno, že γ -sekretasa má v lidském těle velké množství důležitých funkcí a její blokáda vede k závažným nežádoucím účinkům. Z tohoto důvodu je vyvíjena snaha k nalezení látek, které inhibují pouze BACE 1. Jedná se především o syntetické malé molekuly nepeptidového charakteru aminohydantoiny, aminooxazoliny, aminothiazoliny, iminopyrimidinony, aminothiaziny, iminothiadiazinany dioxidy, iminohydantoiny aj⁷⁰. Mezi inhibitory BACE 1 můžeme nalézt i látky přírodního původu jako kurkuminoidy *Curcuma longa*⁷¹ L., furanokumariny z *Angelica dahurica*⁷² Fisch. ex Hoffm., tenuigenin extrahovaný z *Polygala tenuifolia*⁷³ Willd., stilbenoidy z kořenů *Smilax china*⁷⁴ L., deriváty resveratrolu z *Vitis vinifera*⁷⁵ L., katechiny obsažené v zeleném čaji⁷⁶, protoberberinové alkaloidy z *Coptis chinensis*⁷⁷

Franch., alkaloidy z listů *Murraya koenigii*⁷⁸ L., alkaloidní látky z mořské houby *Ianthella* sp.⁷⁹ či alkaloidy z *Corydalis cava*⁸⁰ Schweigg. & Kort. Některé zmíněné příklady jsou shrnuty v následující tabulce (tab. 3).

Tab. 3: Významné inhibitory BACE-1 přírodního původu

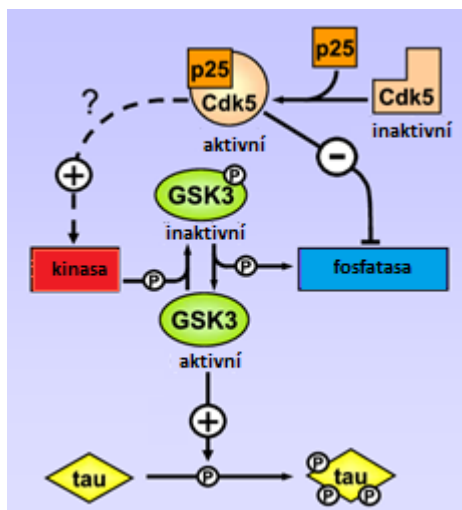
sloučenina	typ látky	zdroj	čeleď	IC _{50, BACE-1} (μM)	citace
bisdemethoxykurkumin	kurkuminoid	<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	17,0	71
imperatorin	furanokumarin	<i>Angelica dahurica</i>	Umbelliferae	91,8	72
(+)-byakangelikol				104,9	
cis/trans resveratrol	stilbenoidy	<i>Smilax china</i>	Smilacaceae	15,0	74
cis-scirpusin				10,0	
verafenol				4,2	74
oxyresveratrol				7,6	
diktyodendrin F	alkaloidy	<i>Ianthella</i> spp.	Ianthellidae	1,5	79
diktyodendrin H				1,0	
diktyodendrin J				2,0	
(-)-korykavamin	isochinolinový alkaloid	<i>Corydalis cava</i>	Fumariaceae	41,2	80
(+)-korynolin				33,6	

3.1.3.4 Glykogen synthasa kinasa 3β

Glykogen synthasa kinasa 3 je všudypřítomná pleiotropní serin/threonin kinasa, která hraje důležitou roli v celé řadě buněčných procesů⁸¹. GSK-3 byla nejprve popsána jako enzym ovlivňující metabolismus glykogenu a to regulací glykogen synthasy⁸², postupně byly zjištěny i další substráty (například β-katein, τ-protein, APP, presenilin 1 a jiné^{83,84}). Díky širokému působení na různé látky v těle, které tento enzym ovlivňuje, zasahuje GSK-3 do řady procesů jako jsou buněčná signalizace, zahrnující Wnt a Hedgehog cesty a neuronální vývoj, inzulinovou rovnováhu, transkripce, buněčné dělení, přežití a smrt^{85,86,87}. Z těchto důvodů také hraje důležitou roli v rozvoji různých onemocnění zahrnujících i AD^{88,89}, nádorová onemocnění^{90,91}, diabetes mellitus⁹², kardiovaskulární choroby^{93,94}, psychiatrické⁹⁵ a neurodegenerativní choroby⁹⁶.

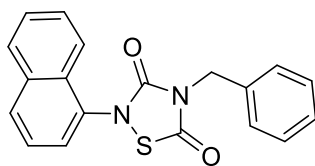
GSK-3β společně s GSK-3α tvoří dvojici isoform GSK-3, které jsou sice kódovány odlišnými geny, ale jejich stavba je velice podobná. Funkčně se téměř překrývají, některé studie však odhalily nezastupitelnou roli v některých biologických procesech^{81,97,98}. GSK-3β je doposud více prozkoumána a diskutuje se o ní v úzké souvislosti s AD. Aktivita GSK-3β a CDK-5 je spojena s fosforylací τ-proteinu, což za určitých podmínek může vést až k jeho hyperfosforylaci (obr. 6) a následně k tvorbě neuronálních klubek⁹⁹. Jak již bylo řečeno GSK-3 má vliv i na APP a presenilin 1, které mohou vést

k formování A β a senilních plaků. Z tohoto důvodu je GSK-3 β atraktivní cíl při hledání nových látek pro léčbu AD i jiných onemocnění.



Obr. 6: Role GSK 3 v hyperfosforylaci tau proteinu⁹⁹

V dnešní době je již jeden irreverzibilní inhibitor GSK-3 β testovaný v klinických studiích. Jedná se o synteticky připravený thiadiazolidinon tideglusib (obr. 7), který prokázal v testech velmi dobrou snášenlivost pacienty^{100,101}.



Obr. 7: Struktura tideglusibu

Několik prací popisuje vztah mezi strukturou látek a inhibiční aktivitou GSK-3 β . Inhibitory tohoto enzymu jsou však látky chemicky velmi rozdílné. Jedná se především o látky synteticky připravované pyridyloxadiazoly¹⁰², thiadiazolidindiony¹⁰³, pyrazolopyrimidiny¹⁰⁴, maleimidy¹⁰⁵ a paullony, což je skupina benzazepinonů¹⁰⁶. Mezi přírodními zdroji také nalezneme efektivní inhibitory GSK-3 β . Patří mezi ně zejména metabolity různých druhů mořských hub jako alkaloid hymenialdisin a jeho deriváty, alkaloid agelastin A, dibromocantarellin¹⁰⁷, manzamin¹⁰⁸, meridiamin¹⁰⁹, furanoseskviterpeny palinurin a trikanthin¹¹⁰. Z dalších látek přírodního původu jsou to indirubiny, bis-indolové deriváty z různých přírodních zdrojů¹¹¹, nebo murrayfolin A, karbazolový alkaloid izolovaný z *Glycosmis stenocarpa*¹¹² Drake., dále alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae¹¹³. Inhibiční aktivita těchto sloučenin se pohybuje v rozsahu jednotek nanomolů až desítek mikromolů (tab. 4).

Tab. 4: Významné inhibitory GSK-3 β přírodního původu

sloučenina	typ látky	zdroj	čeleď	IC ₅₀ , GSK-3 β (μ M)	citace
hymenialdisin	alkaloidy různých strukturních typů	různé druhy mořských hub	Agelasidae, Axinellidae, Halichondridae	0,01	107
agelastin A				12,0	
dibromokantarellin				3,0	
manzamin A	β -karbolinový	<i>Acanthostrongylophora</i> sp.	Petrosiidae	10,2	108
8-hydroxy-manzamin A	alkaloid			4,8	
palinurin	furanoseskviterpen	<i>Ircinia</i> sp.	Irciniidae	4,5	111
trikanthin				7,5	
masonin	isochinolinový alkaloid	různé druhy čeledi Amaryllidaceae	Amaryllidaceae	27,8	113
karanin				30,7	

3.1.3.3 Prolyl oligopeptidasa

Prolyl oligopeptidasa (POP) je serinová peptidasa, která se vyskytuje v cytosolu mozkových buněk¹¹⁴. Tento enzym štěpí malé biologicky aktivní peptidy obsahující prolinový zbytek^{115,116}. Substrátem pro tento enzym jsou především neuropeptidy a hormony jako substance P, vasopresin, oxytocin, gonadotropin release hormon, thyrotropin release hormon a další¹¹⁷. Tyto molekuly hrají důležitou roli v modulaci funkcí centrálního nervového systému. Ovlivňují buněčné dělení a diferenciaci, kognitivní funkce jako jsou učení a paměť, dále mají vliv na náladu, krevní tlak nebo stárnutí. Při narušení rovnováhy v těchto oblastech dochází k rozvoji různých onemocnění zahrnující neuropsychiatrická onemocnění (deprese, schizofrenie, bipolární afektivní poruchy) neurodegenerativní onemocnění jako AD, Parkinsonovu nemoc a choroby související s poškozením kognitivních funkcí¹¹⁶. Z tohoto hlediska se jeví inhibice POP jako zajímavý cíl v terapii těchto onemocnění. Některé práce dokonce uvádějí, že inhibitory POP potlačují tvorbu A β v buňkách¹¹⁸. V dnešní době je výzkum inhibitorů POP založen převážně na syntéze nových struktur, ale přesto jsou i skupiny, které se zabývají výzkumem přírodních látek. Mezi nejvýznamnější přírodní inhibitory patří berberin¹¹⁹ a baikalin¹²⁰, které se běžně používají jako standardy při stanovení inhibice POP. Inhibiční potenciál vůči POP byl nalezen i u obsahových látek *Hypericum brasiliense* Choisy a *H. connatum*¹²¹ Lam., *Leonurus sibiricus* L. z Brazílie¹²², *Syzygium aromaticum*¹²³ L., *Buddleja brasiliensis*¹²⁴ Jacq. ex Spreng. a řada alkaloidů izolovaných z *Peumus boldus*⁵¹ Mol., *Eschscholzia californica*¹²⁵ Cham., *Fumaria officinalis*⁵² L. a rostlin čeledi Amaryllidaceae jako jsou *Chlidanthus fragrans*¹²⁶ Herb., *Zephyranthes robusta*¹²⁷ Herb. ex Sweet, *Nerine bowdenii*¹²⁸

Watson a některých dalších druzích rodu *Narcissus* spp.¹²⁹⁻¹³¹. Příklady přírodních inhibitorů POP jsou shrnuty v následující tabulce (tab. 5).

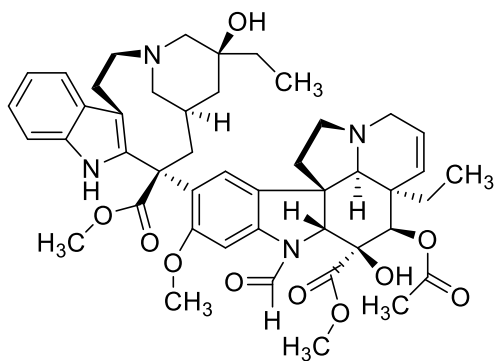
Tab. 5: Významné inhibitory POP přírodního původu

Sloučenina	Typ látky	rostlina	čeleď	IC _{50, POP} (μM)	citace
8-C-β-D-(6'-O-galloyl) glukosylnoreugenin	C-glukosid	<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtaceae	1,5	123
6-C-β-D-(6'-O-galloyl) glukosylnoreugenin				1,7	
[2-(3,4-dihydroxyfenylethyl)-1-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-β-D-(4-O-kafeoyl)-glukopyranosid]	fenylpropanový glykosid	<i>Buddleja brasiliensis</i>	Scrophulariaceae	1,3	124
<i>N</i> -methylaurotetanin	isochinolinový alkaloid	<i>Peumus boldus</i>	Monimiaceae	135,4	51
sinoakutin				143,1	
kalifornidin	pavinanový alkaloid	<i>Eschscholtzia californica</i>	Papaveraceae	55,6	125
parfumidin	isochinolinový alkaloid	<i>Fumaria officinalis</i>	Fumariaceae	99,0	52
sinaktin				53,0	
berberin	protoberberinový alkaloid	<i>Berberis vulgaris</i>	Berberidaceae	145,0	119
baikalin	flavonoid	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Lamiaceae	12,0	120
4'-O-demethylbelladin	isochinolinový alkaloid	<i>Nerine bowdenii</i>	Amaryllidaceae	370,0	128
homolykorin	isochinolinový alkaloid	<i>N. sp.</i>	Amaryllidaceae	173,0	129,131
9-O-demethylgalanthin	isochinolinový alkaloid	<i>Zephyranthes robusta</i>	Amaryllidaceae	150,0	127

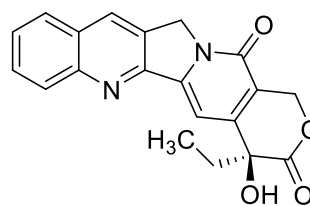
3.2 Nádorová onemocnění

Obavy, z onemocnění AD či nemoci způsobující demence, jsou mezi populací obrovské, ještě více se lidé obávají onkologických onemocnění. Onkologická onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v zemích celého světa. Většina postižených umírá v důsledku rozšíření metastáz, které zasahují životně důležité orgány, a ty následně selhávají. Standardní léčba se skládá z chirurgických zákroků, radio- a chemoterapie. Chemoterapeutická léčba však může poškodit i zdravé tkáně, což má za následek celou řadu vedlejších účinků. Závažnou komplikací léčby onkologických onemocnění je také rezistence nádorových buněk vůči použitému chemoterapeutiku¹³². Rezistence může dojít až tak daleko, že nádorové buňky jsou odolné na chemoterapeutika lišící se jak strukturně tak i mechanismem účinku. Vzniká takzvaná mnohočetná léková rezistence¹³³. Z těchto důvodů je velmi důležité neustále hledat nové látky pro terapii onkologických onemocnění, které by přednostně ničily nádorové buňky a zároveň nepoškozovaly buňky zdravé. Klasická cytostatika zpomalují či zastavují růst a množení nádorových buněk různými mechanismy ovlivňující procesy na molekulární úrovni. Mezi tyto mechanismy patří zásahy do tvorby a funkce nukleových kyselin, zásah do průběhu buněčného dělení

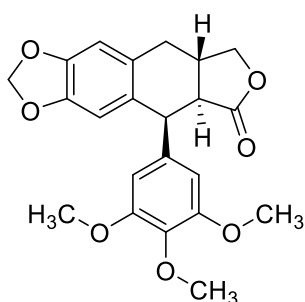
či zásah do syntézy proteinů¹³⁴. Jedná se převážně o látky syntetického charakteru, ale některé z nich jsou odvozeny od látek rostlinného původu, z nichž se několik stále používá¹³⁵ (obr. 8). Nejvýznamnější látky přírodního původu, které se využívají v terapii nádorových onemocnění, jsou shrnuty v následující tabulce (tab. 6). Tyto látky však nejsou příliš selektivní a jsou příčinou častých nežádoucích účinků¹³⁶.



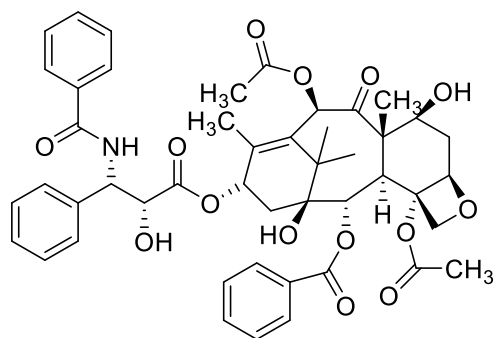
vinkristin



kamptotecin



podofylotoxin



paklitaxel

Obr. 8: Struktury vybraných rostlinných cytostatik

Tab. 6: Vybrané sloučeniny přírodního původu a jejich deriváty používané v terapii nádorových onemocnění^{6,135,137}

Sloučenina	Typ látky	rostlina	čeleď	mechanismus účinku	indikace
vinkristin	bisindolové (vinka) alkaloidy a jejich deriváty	<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	váží se na tubulin a zabraňuje jeho polymerizaci do mikrotubulů (inhibitory mitózy)	leukémie (zejména u dětí), lymfomy, karcinom prsu, malobuněčný karcinom plic
vinblastin					
vinorelbin					
paklitaxel	taxany (terpenoidy) a jejich dusíkaté deriváty	<i>Taxus brevifolia</i> , <i>Taxus baccata</i> , <i>Taxus canadensis</i> , aj.	Taxaceae	stabilizují polymery mikrotubulů a zabraňují separaci chromozomů při anafázi (inhibitory mitózy)	karcinom ovaria, prsu, nemalobuněčný karcinom plic, Kaposiho sarkom
docetaxel					
kamptotecin	chinolinový alkaloid a jeho deriváty	<i>Camptotheca acuminata</i>	Nyssaceae	inhibitor topoisomerasy I (stabilizuje její komplex s DNA) - jednovláknové zlomy v DNA vedou k apoptóze.	karcinom ovaria, malobuněčný karcinom plic, kolorektální karcinom
topotekan					
irinotekan					
podofylotoxin	lignan a jeho deriváty	<i>Podophyllum peltatum</i>	Berberidaceae	inhibitory topoisomerasy II (inhibice nebo porucha syntézy DNA a vznik zlomů)	leukémie, karcinom testes, ovaria, Hodgkinuv lymfom, karcinomy plic
etoposid					
teniposid					

S rozvojem molekulární biologie v posledních letech došlo k hlubšímu porozumění regulačních pochodů fyziologických i nádorových buněk a postupně je odhalován složitý proces kancerogeneze. Během tohoto procesu dochází k několikanásobným genetickým změnám buňky, což má za následek produkci odlišných molekul RNA a jimi kódovaných proteinů. Tak lze nádorové buňky odlišit od fyziologických. Rozdíl může být nejen v kvalitě produkovaných regulačních proteinů, ale někdy i jen v kvantitě. Po tomto zjištění se léčba nádorových onemocnění začala ubírat směrem cíleného zásahu do signálních cest maligních buněk. Tyto látky již nepoškozují genetickou informaci buňky, ale působí na proteiny s regulačními a signálními účinky¹³⁴. Tento typ léčby se nazývá cílená terapie a je zaměřena na odlišnosti mezi nádorovými a zdravými buňkami. Existuje celá řada různých druhů nádorů a nádorových linií s charakteristickou expresí znaků na povrchu i uvnitř buňky a dalších látek a mediátorů. Nejvhodnější cíle pro zásah jsou růstové faktory, receptory pro růstové faktory, signální dráhy (inhibitory enzymů), enzymy ovlivňující DNA a histony, regulační proteiny buněčného cyklu, angiogeneze a apoptózy. Všechny tyto cíle vedou v nádorové buňce k aktivaci proliferace nádorových buněk, inhibici apoptózy, tvorbě metastáz a novotvorbě cév, které je třeba zastavit¹³⁸. Ve skupině inhibitorů signálních drah se nabízí velmi široké spektrum cílových struktur, a to hlavně

klíčových enzymů v kaskádě nitrobuněčných dějů. Mezi možné cíle této skupiny patří i enzym GSK-3 β , o kterém již byla řeč výše, nebo enzym aldo-keto reduktasa 1C3 (AKR1C3). AKR1C3, známá také jako 17 β -hydroxysteroid dehydrogenasa typu 5, která je důležitým lidským enzymem, který katalyzujícím redukcí karbonylových skupin několika steroidů a prostaglandinů, což vede k předreceptorové regulaci jejich účinku a proliferační signalizaci. Nadměrná exprese AKR1C3 se vyskytuje například u nádorů prostaty^{139,140}. Snížení aktivity AKR1C3 významně snižuje hladinu testosteronu, 5 α -dihydroxytestosteronu a androgen dependentní genovou expresi, např. prostatický specifický antigen. *In vivo* inhibice AKR1C3 vede ke snížení růstu xenograftových modelů karcinomu prostaty^{140,141}. Tyto výsledky výzkumu učinily z AKR1C3 zajímavý cíl pro terapii rakoviny prostaty. Mezi látkami rostlinného původu byly nalezeny slibné inhibitory tohoto enzymu. Jedná se například o jasmonáty (kyselina jasmonová, methyl-jasmonát), což jsou rostlinné hormony regulující růst rostlin¹⁴², flavonoidy¹⁴³ (2'-hydroxyflavanon, kumestrol, kvercetin, biochanin), kyselinu skořicovou¹⁴⁴, protoberberinové alkaloidy stylopin a kanadin¹⁴⁵, látky flavonoidního charakteru apigenin, luteolin a 7-hydroxyflavanon¹⁴⁶ nebo Amaryllidaceae alkaloid tazettin¹⁴⁷.

Acetylace a deacetylace histonu jsou procesy, které modifikují chromatinové struktury a mají velký význam pro regulaci transkripce. Transkripčně aktivní oblasti chromatinu vykazují vysokou hodnotu stupně acetylace histonu, zatímco deacetylace histonu je spojena s transkripčním útlumem. Histon deacetylasy (HDAC) jsou skupinou enzymů, které odstraňují acetylové skupiny z histonu, čímž potlačují genovou expresi. V nádorových buňkách byla zjištěna hladina těchto enzymů, což HDAC ukazuje jako další cíl pro léčbu rakoviny¹⁴⁸. Inhibitory HDAC zastavují růst a způsobují apoptózu nádorových buněk a to díky schopnosti indukce genové exprese prostřednictvím zvýšené acetylace histonů¹⁴⁹. Tyto látky mají vysokou selektivitu pro rakovinné buňky a některé z nich již byly použity k léčbě onkologických onemocnění. Jako příklad lze uvést vorinostat a romidepsin používané v léčbě pacientů s kožním lymfomem z T-buněk a panobinostat při terapii melanomu¹⁵⁰. Dále bylo zjištěno, že tyto inhibitory dokáží zvýšit aktivitu jiných cytostatik a radioterapie¹⁵¹. Jedna práce, která popisuje tento efekt, se zabývala vlivem butyrátu sodného, inhibitoru HDAC, na schopnost alkaloidu haemanthaminu (Amaryllidaceae) ovlivňovat růst a úmrtí nádorových buněk¹⁵². Haemanthamin je znám pro svoji cytostatickou schopnost^{153,154} a tato práce potvrdila zvýšení účinku vlivem butyrátu sodného na nádorové buňky ovariálního karcinomu bez poškození buněk zdravých. Jedním z prvních popsaných inhibitorů HDAC je trichostatin A. Tato látka na bázi hydroxamové kyseliny je produktem metabolismu *Streptomyces hygroscopicus* a patří mezi nejefektivnější látky této skupiny¹⁵⁵. K dalším inhibitorům HDAC přírodního původu patří například depudecin a trapoxin A, látky izolované z hub, broadazol a azamamid nacházející se v mořských živočiších, allyl-deriváty z česneku, kvercetin z různých druhů ovoce či sulforafan izolovaný z brukvovité zeleniny¹⁵⁶.

Přes neustálý rozvoj nových léčebných směrů mají klasická cytostatika stále své místo v terapii onkologických onemocnění. Je to z důvodu velkého množství zkušeností s jejich podáváním. Dalším důvodem je skutečnost, že pro některé závažné diagnózy nejsou zatím látky z nových terapeutických struktur k dispozici. Kombinace obou skupin se pak výhodně využívá v konjugovaných molekulách, kdy se toxicky působící konvenční molekula díky vazbě na cílenou molekulu dopraví v těle přímo do nádorové buňky¹³⁶

Jak již bylo nastíněno, celá řada látek přírodního původu disponuje protinádorovou aktivitou. Vedle již popsaných jsou to dále isochinolinové alkaloidy skulerin, aromolin, berbamin a parfumin¹⁵⁷. Všechny tyto látky, kromě parfuminu, bohužel vykazaly i toxický efekt na nenádorové buňky. Další studie z roku 2018 byla věnována podrobnějšímu zkoumání cytotoxické aktivity zmíněného alkaloidu skulerinu. Tato studie odhalila, že skulerin snižuje aktivitu mitochondriálních dehydrogenas leukemických buněk, má silnou antiproliferační aktivitu vůči buněčným liniím karcinomu plic, vaječníků a prsu a dokáže aktivovat apoptózu¹⁵⁸. Další skupinou isochinolinových alkaloidů, které vykazují pronádorovou aktivitu, jsou boldinové alkaloidy. Jedná se o látky aporfinového charakteru vyskytující se v poměrně úzké skupině čeledí, například Monimiaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Lauraceae a některých dalších. Z hlediska cytotoxicity vykazují aktivitu (+)-boldin, (+)-glaucin, (+)-laurolitsin, (+)-laurotetanin a (+)-isoboldin. Nejúčinnější z nich je (+)-boldin, který silně a specificky působí na karcinom lidského hrtanu (HEp-2), má antiproliferativní účinek vůči buněčným liniím gliomu (U138-MG buňky) a zároveň je vůči zdravým buňkám netoxický¹⁵⁹. Podobné strukturní uspořádání má i alkaloid protoberberinového typu berberin, který se běžně izoluje z kořenů a kůry několika druhů rodu *Berberis* dále *Coptis* a *Phellodendron*. Tento alkaloid vykazuje protinádorový efekt inhibicí aktivačního proteinu 1, což je klíčový transkripční faktor karcinogeneze v nádorových buňkách, a DNA topoisomerasy II¹⁶⁰. Další isochinolinové alkaloidy z *Chelidonium majus* L., chelidonin a homochelidonin mají potenciál indukovat buněčnou smrt nádorových buněk leukemických linií¹⁶¹. V tabulce 7 je uveden přehled cytotoxické aktivity většiny zmíněných látek.

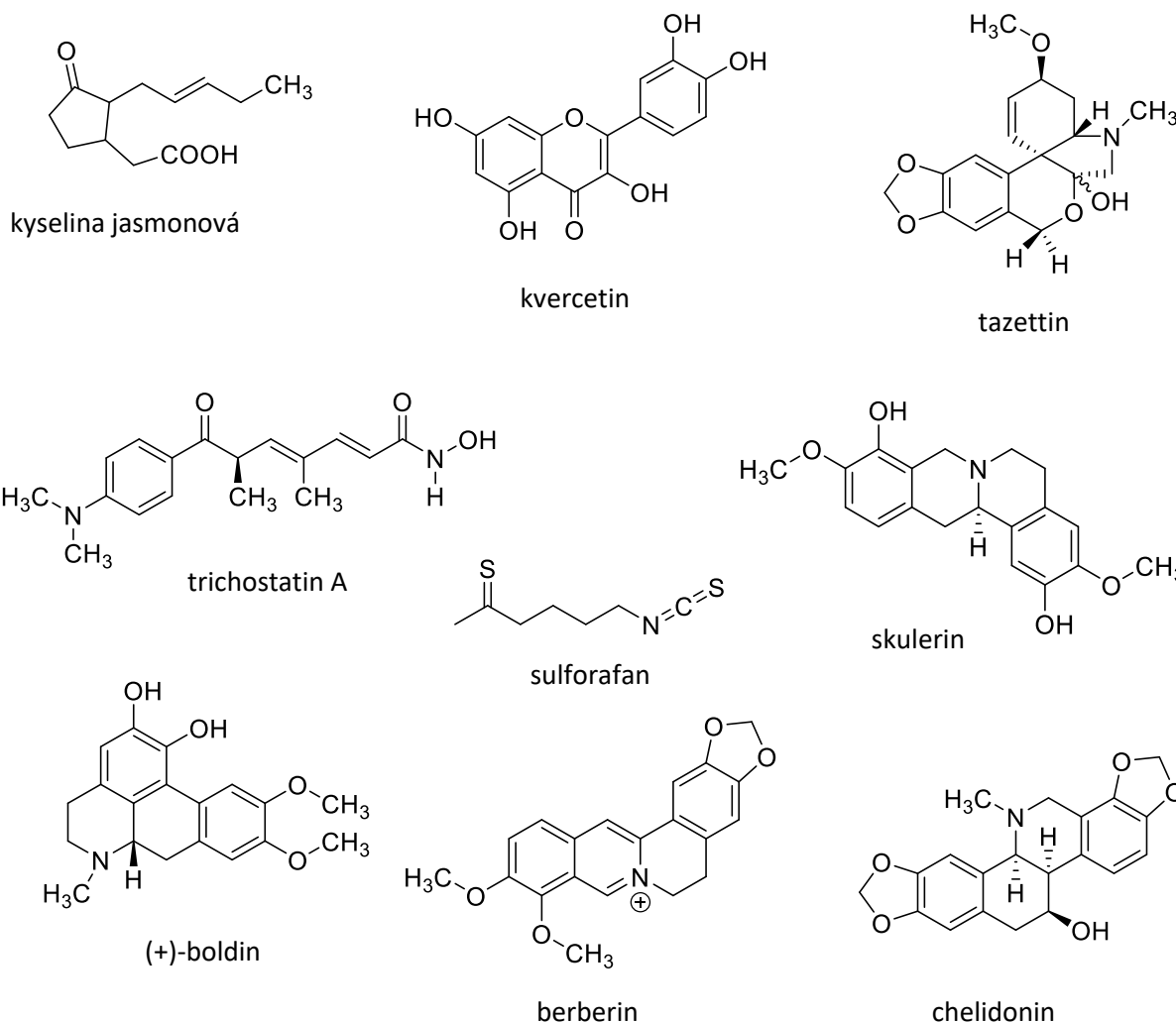
Tab. 7: Vybrané látky přírodního původu s potenciálem v terapii nádorových onemocnění

Sloučenina	citlivé buněčné linie								citace
	IC ₅₀ (μM)								
skulerin	Caco-2 6,4	Hep-G2 4,6	MOLT-4 4,7	Jurkat 2,7	Raji 6,5	HL-60 4,2	U-937 4,8	HEL 92.1.7 6,3	157, 158
aromolin	Caco-2 5,9								157
berbamin	Hep-G2 4,6								
parfumin	Hep-G2 8,7								
(+)-boldin	HEp-2 0,3 (mg/ml)		MDA-MB-231 46,5 (mg/ml)			MDA-MB-468 50,8 (mg/ml)			162
chelidonin	MOLT-4 4,6	Jurkat 2,2	Raji 3,2	HL-60 4,4	U-937 5,0	HEL 92.1.7 3,4		161	

Sloučenina	citlivé buněčné linie IC ₅₀ (μM)				citace
	MOLT-4 4,8	Jurkat 5,6	Raji 6,8	HL-60 8,3	
homochelidonin					
berberin	Hep-G2 3,5	HeLa 4,8 (μg/ml)		L1210 2,8(μg/ml)	163, 164

Buněčné nádorové linie: Caco-2- lidské tlusté střevo, Hep-G2- lidská játra, MOLT-4, Jurkat, Raji, HL-60, U-937, HEL 92.1.7 - lidská leukemie, HEp-2- lidský hrtan, MDA-MB- lidského prsu, HeLa - lidský děložní čípek, L1210 - myší leukemie

Problematika léčby nádorových onemocnění je velice široká a rozsáhlá a přesahuje rámec této práce. Z těchto důvodů je zde uvedeno pouze několik příkladů možných cílů zásahů v protinádorové terapii, kterými se ve spolupráci s dalšími pracovišti zabýváme a několik zajímavých přírodních látek, které mají potenciál v léčbě těchto onemocnění. U vybraných látek je uvedena jejich struktura (obr. 9), neboť látky s cytotoxickou aktivitou jsou velice rozmanité. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou významné látky s touto vlastností, o vybraných bude podrobněji pojednáno v následující kapitole.



Obr. 9: Strukturální vzorce vybraných protinádorově působících látek (kyselina jasmonová, kvercetin, tazettin, trichostatin A, sulforafan, skulerin, (+)-boldin, berberin, chelidonin)

3.3 Čeleď Amaryllidaceae

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou rozšířené po celém světě, především v oblastech tropů a subtropů. Některé rody je možno nalézt i v oblastech mírného pásma. Do této čeledi patří jednoděložné rostliny, které se rozmnožují především cibulemi. Taxa čítá zhruba 1 100 druhů rozdělených do 75 rodů¹⁶⁵. V našich podmínkách se nejčastěji setkáváme se zástupci kvetoucími brzy na jaře, jako jsou sněženky (*Galanthus*), bledule (*Leucojum*) nebo narcisy (*Narcissus*). V dnešní době se rostliny této čeledi hojně pěstují na zahradách jako okrasné nebo v bytě jako pokojové květiny. Příkladem mohou být různé kultivary rodů *Eucharis*, *Clivia*, *Amaryllis* nebo *Zephyrantes*. Již v historii se rostliny této čeledi využívaly v Africe, Asii a Americe k léčbě různých neduhů¹⁶⁶. Hlavními obsahovými látkami této čeledi jsou specifické sekundární metabolity, které jsou formálně řazeny mezi isochinolinové alkaloidy, tvoří však samostatnou skupinu tzv. amaryllkovitých alkaloidů. Tyto látky disponují celou řadou biologických účinků, z těchto důvodů jsou objektem intenzivního zájmu celé řady výzkumných skupin. Mezi nejvýznamnější biologické aktivity uvedené v literatuře patří aktivity: antivirová, antibakteriální, protinádorová, antimalarická, antiprotozoální a inhibiční potenciál vůči cholinesterasám^{10,165,167}.

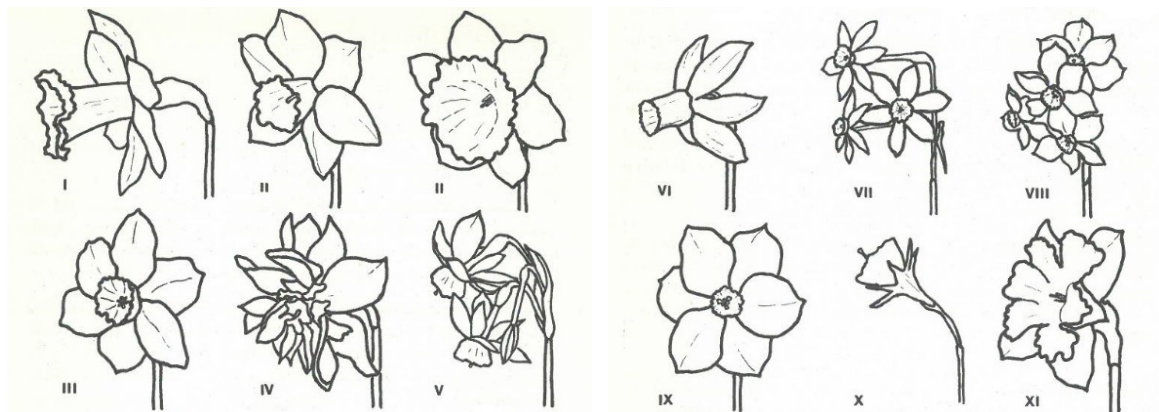
3.3.1 Rod *Narcissus*

Do rozsáhlé čeledi Amaryllidaceae patří i rod *Narcissus*. Taxonomie tohoto rodu je velice složitá z důvodu snadného mezidruhového křížení. Uvádí se, že čítá zhruba 50 – 180 druhů v závislosti na autorovi a tisíce vyšlechtěných zahradnických odrůd. Největší zastoupení populací botanických narcisů je možno nalézt na Pyrenejském poloostrově. Dalším místem výskytu těchto rostlin je hlavně Jižní Afrika. Některé druhy se vyskytují i v mírnějším pásmu Evropy, Asie, na Balkáně, v Číně nebo v Japonsku. Přirozené prostředí rodu *Narcissus* je velice rozmanité, od nížin až po hornaté území zahrnující pastviny, lesy, břehy řek, křoviny i skalní štěrby. Z botanického hlediska se jedná o jednoděložné, vytrvalé rostliny, rozmnožující se většinou cibulemi, které dorůstají výšky 20-40 cm. Listy bývají jednoduché, celokrajné, čárkovitého tvaru se souběžnou žilnatinou, přisedlé v přízemní růžici. Kvetou v pozdní zimě až časně z jara. Oboupohlavné květy vyrůstají terminálně na stonku a skládají se ze šesti okvětních lístků různých barev dle druhů, které jsou v dolní části srostlé. Uvnitř květu se obvykle nachází 6 tyčinek a gyneceum složené ze tří pestíků. Plodem je pouzdrosečná tobolka. Od ostatních zástupců z čeledi Amaryllidaceae je odlišuje přítomností tzv. pakorunky. Pakorunka bývá často zbarvená odlišně než okvěti¹⁶⁸. Nejvýznamnějšími obsahovými látkami jsou amaryllkovité alkaloidy různých strukturních typů, které se nacházejí především v cibulích. Listy a stonky obsahují krystalický šťavelan vápenatý ve formě rafidů. Tato látka je syntetizovaná ve většině rostlin a podílí se jednak na kontrole hladiny vápníku v pletivech a dále poskytuje rostlině ochranu. V literatuře jsou popsány ekzémové vyrážky až vředy jako následek potřísnění šťávou obsahující jehličky šťavelanu vápenatého. Podíl na podráždění pokožky mohou mít však i alkaloidy¹⁶⁹. Dalšími produkty

sekundárního metabolismu těchto rostlin jsou například karotenoidy (β -karoten, lutein nebo epoxy- β -karoteny), které se podílejí na zbarvení květů a flavonoidy s antioxidační aktivitou^{170,171}. Členění rostlin rodu *Narcissus* je velice obtížné, využívá se jak botanická klasifikace podle druhu^{17,168} (tab. 8), tak i zahradnické třídění podle stavby květu¹⁷ (obr. 10). V další části bude zmíněno pouze několik zástupců a hlavní pozornost bude věnovaná druhu *N. pseudonarcissus* a jeho pěstované odrůdě Dutch Master. Více informací a podrobností o těchto rostlinách je možno nalézt v následujícím literárním zdroji z roku 2002 *Narcissus and Daffodils*¹⁶⁸.

Tab. 8: Botanické třídění rodu *Narcissus*^{17,168}

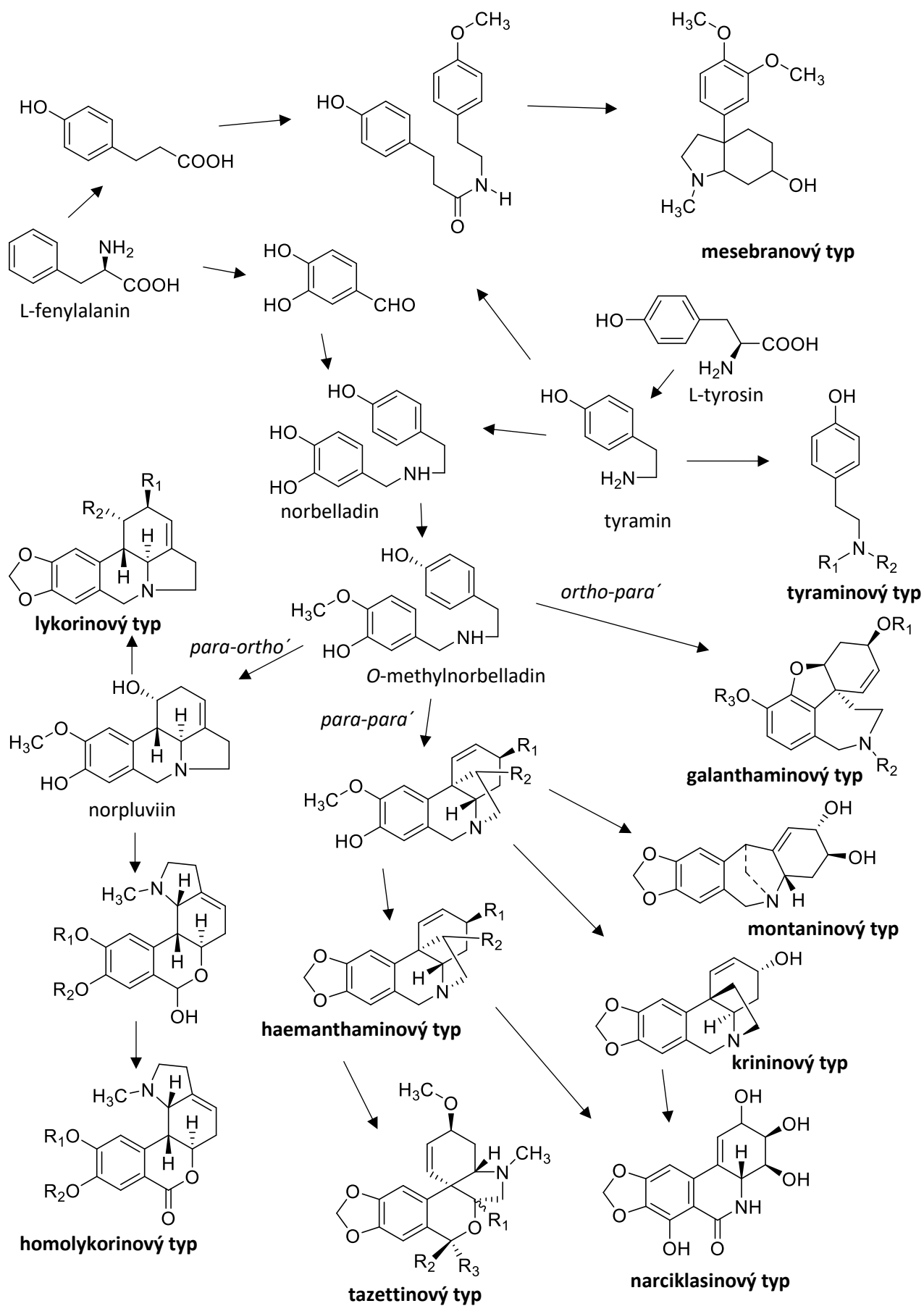
sekce	příklady druhů	výskyt
<i>Bulbocodium</i>	<i>N. bulbocodium</i> , <i>N. cantabrius</i>	Španělsko, Portugalsko, jižní Francie, Maroko, Alžírsko
<i>Triandrus</i>	<i>N. triandrus</i>	Španělsko, Portugalsko
<i>Cyclamineus</i>	<i>N. cyclamineus</i>	Severní Portugalsko
<i>Jonquilla</i>	<i>N. jonquilla</i> , <i>N. calcicola</i> , <i>N. juncifolius</i> , <i>N. rupicola</i> , <i>N. scaberulus</i> , <i>N. watieri</i> , <i>N. odorus</i>	Španělsko, Portugalsko, jižní Francie, Severní Afrika
<i>Tazetta</i>	<i>N. tazetta</i> var. <i>canalicullatus</i>	Španělsko, Portugalsko, evropské a africké pobřeží Středozemního moře, Malá Asie, Čína
<i>Poeticus</i>	<i>N. poeticus</i>	jižní a střední Evropa (Pyreneje, Alpy), Velká Británie
<i>Pseudonarcissus</i>	<i>N. asturiensis</i> , <i>N. minor</i> , <i>N. nanus</i> , <i>N. obvalaris</i>	Španělsko, Portugalsko, Anglie
narcisy kvetoucí na podzim	<i>N. elegans</i> , <i>N. serotinus</i> , <i>N. viridiflorus</i>	pobřeží Středozemního moře



Obr. 10: Základní typy květů narcisů podle zahradnického třídění¹⁷ (I-trubkovité, II-s velkou pakorunkou, III-s malou pakorunkou, IV-plnokvěté, V-triandrus, VI-cyclamineus, VII-jonquilla, VIII-tazetta, IX-poeticus, X-bulbocodium, XI-s členenou pakorunkou)

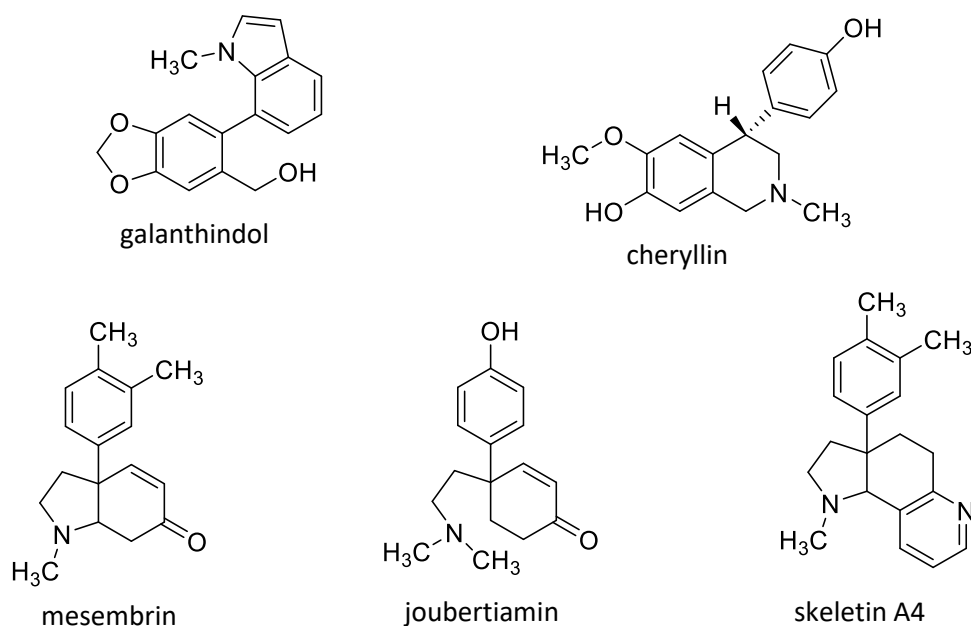
3.3.2 Biosyntéza alkaloidů rodu *Narcissus* a jejich strukturní typy

Alkaloidy tohoto rodu patří do skupiny specifických amarylkovitých alkaloidů. Biosyntéza vychází ze dvou aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu, které dávají vzniknout klíčovému meziprojektu norbelladinu, podle kterého se biosyntetická cesta těchto alkaloidů čeledi Amaryllidaceae nazývá norbelladinová. Norbelladin je v dalších krocích přeměňován na 4-O-methylnorbelladin, z něho se pak formují jednotlivé strukturní typy alkaloidů¹⁷³. Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení 4-O-methylnorbelladinu se rozlišuje 9 základních strukturních typů. Mezi hlavní typy patří norbelladinový (belladin), galanthaminový (galanthamin), haemanthaminový (haemanthamin), homolykorinový (homolykorin), krininový (krinin), lykorinový (lykorin), narciklasinový (narciklasin) a tazettinový (tazettin) (obr. 11)¹⁷⁴.



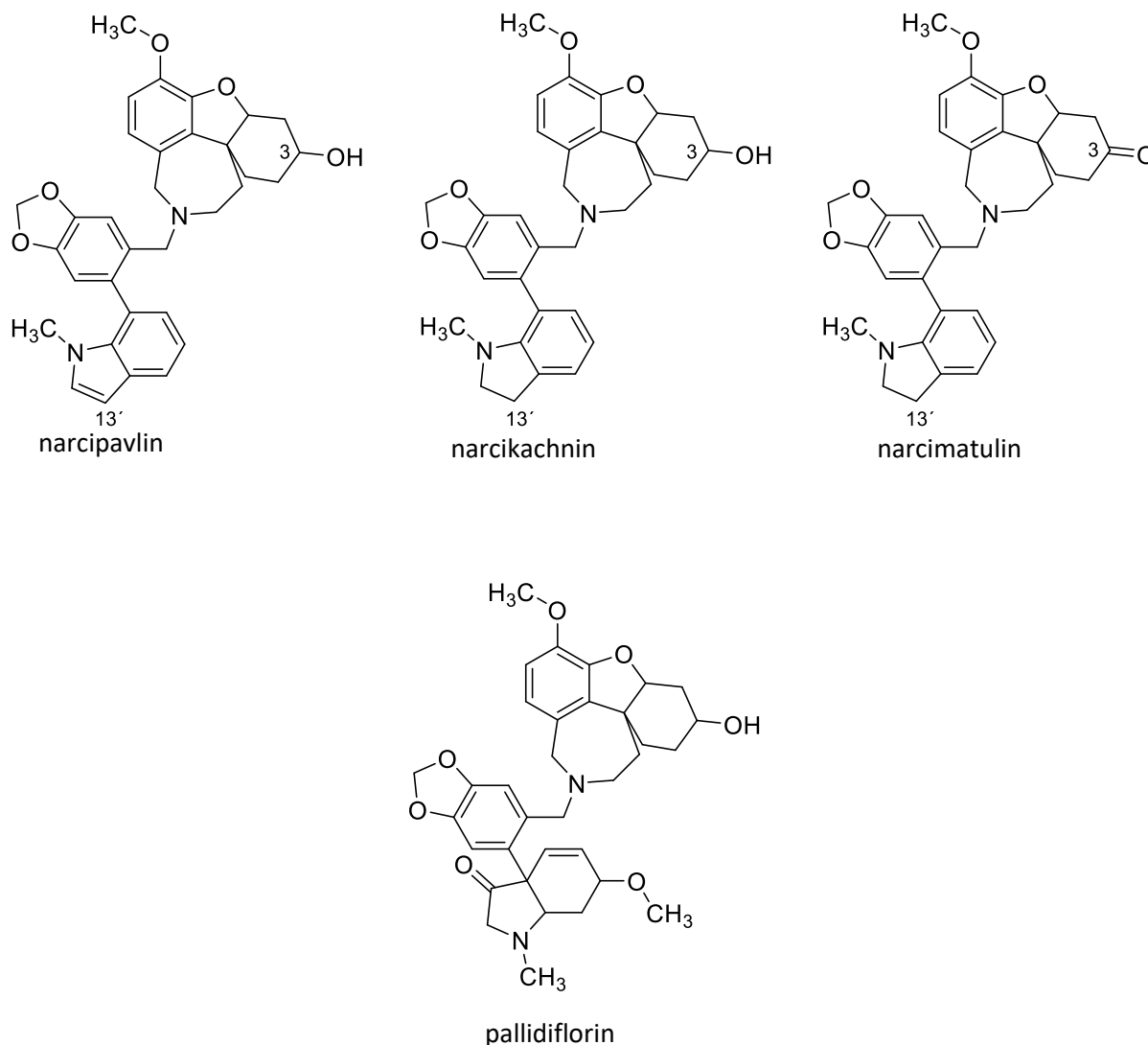
Obr. 11: Biosyntetická cesta hlavních strukturálních typů alkaloidů rodu *Narcissus*¹⁷⁴

Kromě těchto typů můžeme v rostlinách rodu *Narcissus* nálezt i další strukturní typy, které jsou v ostatních zástupcích čeledi Amaryllidaceae vzácné. Jedná se především o galanthindolový, cheryllinový a mesebranový typ (obr. 12.). Alkaloidy této struktury byly prozatím izolovány pouze ze dvou druhů narcisů a to z *N. triandrus* L. a *N. pallidulus* Graells. Tento typ se dále dělí podle strukturních detailů do tří podskupin, které jsou reprezentovány mesebrinem, joubertiaminem a skeletinem A4¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.



Obr. 12: Méně obvyklé strukturní typy alkaloidů rodu *Narcissus* a jejich hlavní zástupci

V nedávné době byl ze dvou zástupců tohoto rodu, *N. poeticus* cv. Pink Parasol a *N. pseudonarcissus* cv. Dutch Master, izolován nový typ amarylkovitých alkaloidů. Jedná se o látky, ve kterých je spojen galanthaminový a galanthindolový strukturní typ. Obě tyto izolace byly provedeny na našem pracovišti. Byly izolovány celkem tři látky narcipavlin, narcikachnin a narcimatulin (obr. 13). Z obrázku je patrné, že struktury narcipavlinu, narcikachninu a narcimatulinu jsou velice podobné. Struktura narcipavlinu a narcikachninu se liší pouze přítomností dvojnás vazby na uhlíku C-13'. Narcimatulin se liší od narcikachninu pouze substituentem v poloze C-3^{129,131}. V dostupné literatuře již látka podobného typu byla popsána. Jednalo se o heterodimer pallidiflorin (obr. 13) izolovaný z *N. pallidiflorus* Pugsley v roce 1990¹⁸². Kromě amarylkovitých alkaloidů se v rodě *Narcissus* nacházejí další látky alkaloidní povahy jako např. tyraminové protooalkaloidy, které jsou vedlejším produktem biosyntézy alkaloidů (*N. conspicus*, *N. subnivalis*, *N. bulbocodium* subsp. *bulbocodium*). Jedná se hlavně o metyltyramin¹⁷⁴.



Obr. 13: Strukturální vzorce nově izolovaných látek vzniklých spojením galanthaminového a galanthindolového strukturálního typu

Tab. 9: Vybrané alkaloidy izolované z rodu *Narcissus*

strukturální typ	izolované alkaloidy	rostlina	citace
galanthaminový	narwedín	<i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. pumilus</i> var. plenus hort., <i>Narcissus nanus</i> cv. Elka, <i>Narcissus jonquilla</i>	129,168,177, 178,179
	lykoramin	<i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. cyclamineus</i> cv. February Gold, <i>N. jonquilla</i> , <i>N. papyraceus</i>	
	galanthamin	<i>N. pseudonarcissus</i> cv. Carlton, <i>N. confusus</i> , <i>N. poeticus</i> subsp. <i>radiiflorus</i> , <i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. cv. Sundisc</i> , <i>N. cv. Waterperry</i>	
	norlykoramin	odrůdy <i>N. pseudonarcissus</i> , <i>N. cv. Van sion</i> , <i>N. cv. Inglescombe</i>	
	lykoraminon	<i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. sp.</i>	
haemanthaminový	seko-isopowellaminon	<i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol	129,168
	maritidin	<i>N. tazetta</i> var. <i>Chinensis</i> , <i>N. papyraceus</i>	
	haemanthamin	<i>N. asturiensis</i> , <i>N. bujei</i> , <i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. cv. Sealing</i> , <i>N. cv. Bridal Crown</i>	

strukturní typ	izolované alkaloidy	rostlina	citace
lykorinový	lykorin	<i>N. canaliculatus</i> , <i>N. cv. Folly</i> , <i>N. bicolor</i> , <i>N. × incomparabilis</i> spp.,	168,180,181
	pluviin	<i>N. cv. Insulinde</i> , <i>N. cyclamineus</i> cv. Peepin Tom, <i>N. × incomparabilis</i> spp., <i>N. poeticus</i> , <i>N. pseudonarcissus</i> spp.	
	galanthin	<i>N. cyclamineus</i> cv. Beryl, <i>N. cyclamineus</i> cv. Cairhays, <i>N. jonquilla</i> cv. Golden Sceptre, <i>N. pseudonarcissus</i> spp.	
	assoanin	<i>N. assoanus</i> , <i>Narcissus nanus</i> cv. Little Gem <i>Narcissus nanus</i> cv. Topolino, <i>N. jacetanus</i>	
	oxoassoanin	<i>N. assoanus</i> , <i>N. jacetanus</i>	
	karanin	<i>N. cv. Livia</i> , <i>N. cv. Ice Follies</i>	
hippeastrin	<i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. × incomparabilis</i> cv. Fortune, <i>N. × odor</i> var. <i>rugulosus</i>		
homolykorinový	homolykorin	<i>N. cyclamineus</i> cv. February Gold, <i>N. eugeniae</i> <i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. munozii-garmendiae</i> , <i>N. papyraceus</i>	129,168,182
	masonin	<i>N. jonquilla</i> cv. Golden Sceptre, <i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. pseudonarcissus</i> cv. Carlton	
	8-O-demethylhomolykorin	<i>N. cv. Inglescombe</i> , <i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. pallidiflorus</i> , <i>N. papyraceus</i> , <i>N. primigenius</i>	
	odulin	<i>N. × incomparabilis</i> cv. Fortune, <i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol, <i>N. jonquilla</i> cv. Golden Sceptre,	
	lykorenin	<i>N. poeticus</i> , <i>N. triandrus</i> cv. Thalia, <i>N. pseudonarcissus</i> cv. Unsurpassable, <i>N. cv. Inglescombe</i>	
tazetinový	tazettin	<i>N. tazetta</i> , <i>N. bulbocodium</i> var. <i>Conspicuus</i> , <i>N. cv. Sweetness</i>	168
	pretazettin	<i>N. confusus</i> , <i>N. panizzianus</i> , <i>N. obesus</i> , <i>N. pallidiflorus</i>	168, 177
narciklasinový	narciklasin	<i>N. canaliculus</i> , <i>N. cyclamineus</i> , <i>N. jonquilla</i> , <i>N. incomparabilis</i> , <i>N. cv. Verger</i>	168
mesebranový	mesembrin	<i>N. pallidulus</i> , <i>N. triandrus</i>	174-176
	joubertiamin		
	skeletin A4		
montaninový	pankracin	<i>N. angustifolius</i> subsp. <i>transcarpathicus</i>	183
galanthindolový	galanthindol	<i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol	129
Cheryllinový	cheryllin	<i>N. munozii-garmendiae</i>	174

3.3.3 Historické využití rodu *Narcissus*

Pěstovaná odrůda *N. pseudonarcissus* cv. Dutch Master se řadí do poddruhu *Pseudonarcissus*, který patří mezi nejoblíbenější a nejčastěji pěstované druhy¹⁸⁶. Samotná rostlina dorůstá do výšky až 40 cm, květ má průměr 11 cm a je žlutě zbarven s lehce sytější zbarvením pakorunky. Pakorunka se vyznačuje trubkovitým tvarem, délkou asi 4,5 cm a vroubkovaným okrajem (obr. 14)¹⁷. Jak bylo zmíněno, mezi nejvýznamnější biologické aktivity obsahových látek tohoto rodu patří inhibice cholinesteras, protinádorová aktivita, antivirová, antibakteriální, antifungální, antimalarická aktivita a některé další. Celá řada těchto účinků byla známa mnoho let před naším letopočtem. „Otec“ medicíny, Hippokrates z Kosu (cca 460-370 př. n. l.), doporučoval pesar připravený z oleje *N. poeticus* pro léčbu nádorů dělohy. Další řečtí lékaři Pedanius Dioscorides a Soranus z Efezu pokračovali

ve využívání této léčby v 1. a 2. století n. l. V 1. století n. l. začal proti nádorům používat extrakt z *N. pseudonarcissus* římský filozof Gaius Plinius Secundus. Dokonce i v Bibli můžeme nalézt několik odkazů na používání různých extraktů z *N. tazetta*. Aplikace oleje z narcisu při léčbě zhoubného bujení byla využívána i ve středověku v Číně, Severní Africe, Střední Americe a své místo měla i v arabské medicíně¹⁸⁷. V Turecku byl extrakt z *N. tazetta* používán jako antiflogistikum a analgetikum. Ve Francii se používaly květy jako spasmolytikum, arabská medicína využívala aplikaci oleje proti alopecii a jako afrodiziakum. V osmnáctém století se v Íránu doporučovalo rozetřít kořeny v medu pro použití na popáleniny, modřiny, dislokace kloubů a pihy. Cibule *N. tazetta* byly používány jako antikoncepce, květy byly doporučovány při hysterii a epilepsii. Homeopatický přípravek vyrobený z cibulí byl předepisován při bronchitidě a černém kašli¹⁸⁸. Je zřejmé, že různé extrakty a části narcisů byly široce oblíbené pro léčbu různých onemocnění. Z tohoto důvodu jim je vědeckou komunitou věnována značná pozornost.

3.3.4 *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master – vlastní studie

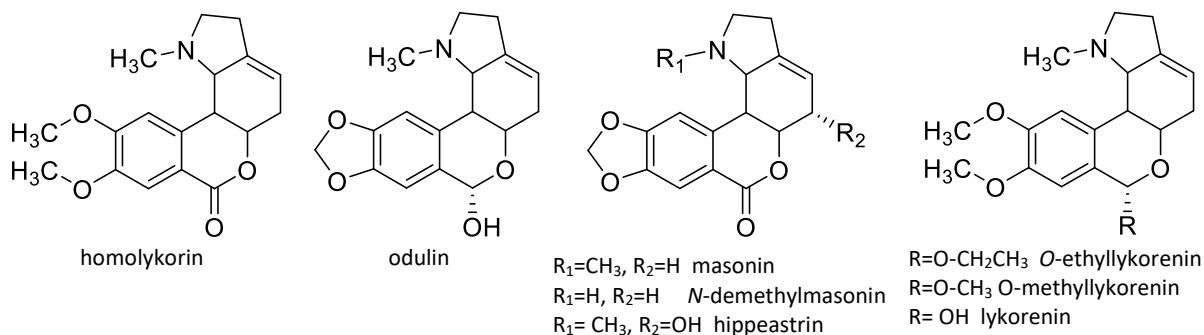
Doposud byly prozkoumány stovky druhů a poddruhů především výzkumnou skupinou prof. Bastidy z Univerzity v Barceloně. *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master byl prozatím studován velice omezeně. V roce 2010 Řezanka a kol. izoloval, z cibulí tohoto narcisu, čtyři glykosidy benzodioxol-indolových alkaloidů¹⁸⁹. Na základě screeningových studií, provedených na našem pracovišti v letech 2012-2014, byl *N. pseudonarcissus* cv. Dutch Master vybrán pro fytochemickou studii, která je předmětem předkládané disertační práce.



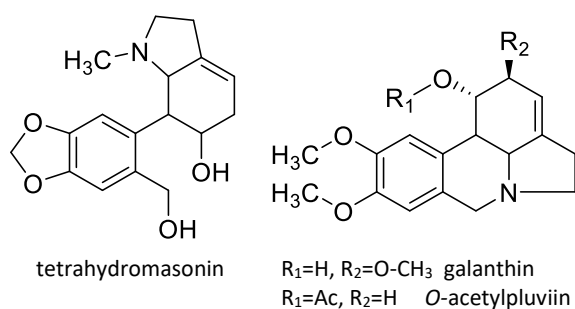
Obr. 14: Celá rostlina a květ *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master^{184,185}

Z asi 27 kg čerstvých cibulí bylo izolováno 21 alkaloidů, které patří do různých strukturních typů (obr. 15). Podařilo se také izolovat jeden doposud nepopsaný alkaloid pojmenovaný jako narcimatulin (obr. 13). Podrobný popis izolace jednotlivých alkaloidů je možno nalézt v referenci Hulcová et al. (2018)¹³¹. Alkaloidy izolované v dostatečném množství byly v rámci práce podrobeny řadě biologických testů ve vztahu k možné terapii AD. Výsledky těchto testů jsou shrnuty v následující tabulce (tab. 10)¹³¹.

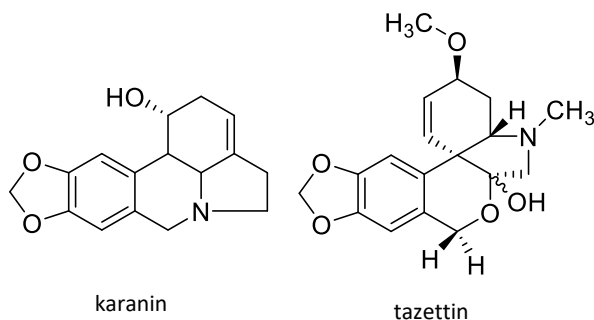
homolykorinový typ:



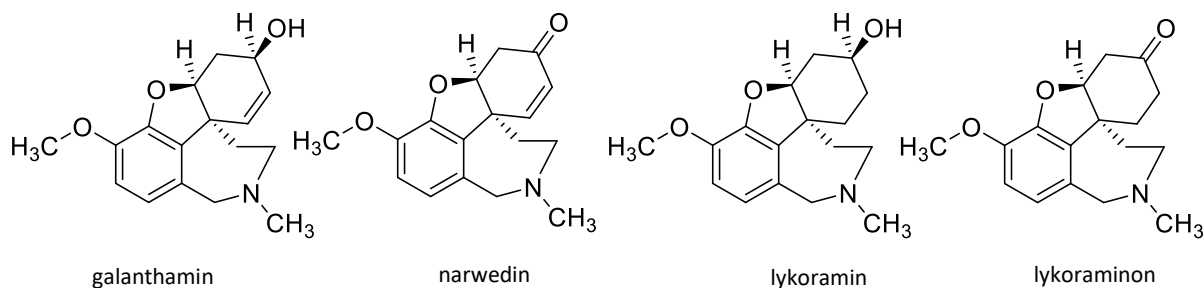
lykorinový typ:



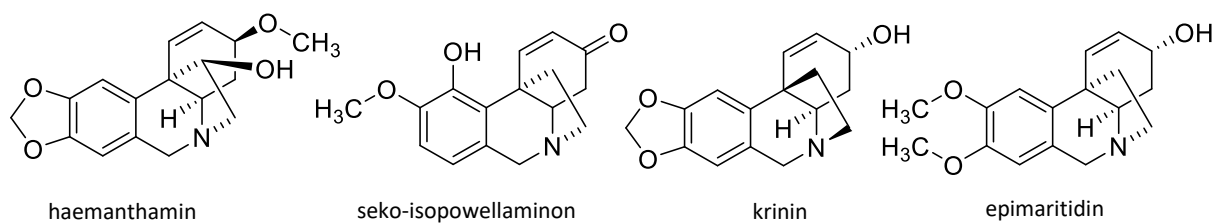
tazettinový typ:



galanthaminový typ:



haemanthaminový a krininový typ



Obr. 15: Alkaloidy izolované z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master

Tab. 10: Alkaloidy izolované z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master a jejich biologická aktivita ve vztahu k možné terapii Alzheimerovy choroby¹³¹

látka	AChE IC ₅₀ (μM)	BuChE IC ₅₀ (μM)	POP IC ₅₀ (μM)	GSK-3β (% inhibice)	GSK-3β IC ₅₀ (μM)
homolykorin	64 ± 4	151 ± 20	173 ± 41	54 ± 1	n.
masonin	305 ± 34	229 ± 24	314 ± 34	66 ± 4	27,9 ± 0,8
seko-isopowellaminon	294 ± 33	> 500	> 500	38 ± 1	n.
<i>O</i> -ethyllykorenin	> 500	> 500	> 500	58 ± 3	n.
<i>N</i> -demethylmasonin	> 500	474 ± 13	> 500	n.	n.
narcimatulin	489 ± 60	5,90 ± 0,23	29,2 ± 1,0	67 ± 3	20,7 ± 2,4
<i>O</i> -acetylpluviin	> 500	> 500	n.	n.	n.
tazettin	> 500	> 500	> 500	49 ± 0	n.
galanthin	606 ± 60	> 500	> 500	26 ± 7	n.
galanthamin	1,7 ± 0,1	42,3 ± 1,3	> 500	n.	n.
narwedín	281 ± 34	911 ± 69	907 ± 87	n.	n.
karanin	321 ± 42	487 ± 55	> 1000	58 ± 9	30,8 ± 0,3
lykoraminon	> 500	> 500	n.	39 ± 1	n.
lykoramin	456 ± 57	> 500	> 500	n.	n.
<i>O</i> -methyllykorenin	> 500	> 500	> 500	n.	n.
lykorenin	> 500	> 500	> 500	48 ± 3	n.
odulin	> 500	> 500	252 ± 27	58 ± 4	n.
haemanthamin	> 500	> 500	> 500	52 ± 0	n.
tetrahydromasonin	> 500	> 500	> 500	22 ± 0	n.
hippeastrin	> 500	> 500	> 500	11 ± 2	n.
krinin	> 500	> 500	> 500	40 ± 5	n.
epimaritidin	> 500	> 500	n.	n.	n.
standardy					
huperzin A	0,033 ± 0,001	> 500	n.	n.	n.
berberin	n.	n.	142 ± 21	n.	n.
Z-Pro-prolinal	n.	n.	2,75 × 10 ⁻³	n.	n.
SB-415286	n.	n.	n.	n.	70 nM

% inhibice měřeny při koncentraci 50 μM. Látky pod čarou použity jako standardy. n. - neměřeno

Homolykorinový strukturní typ je v rostlinách rodu *Narcissus* zastoupen celou řadou derivátů těchto alkaloidů. Alkaloidy jsou odvozeny od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu¹⁷³. Z *N.* cv. Dutch Master bylo izolováno 8 alkaloidů tohoto strukturního typu. Jedná se o homolykorin, masonin, *N*-demethylmasonin, lykorenin, *O*-methyllykorenin, odulin, tetrahydromasonin a hippeastrin. Přestože některé z těchto alkaloidů vykazují zajímavé biologické účinky, nebyly doposud v literatuře podrobněji popsány. Homolykorin disponuje střední inhibiční aktivitou vůči AChE a POP¹³¹. V rámci studia toxicity alkaloidů homolykorinového strukturního typu byla *in vitro* zjištěna zajímavá protinádorová aktivita hippeastrinu. Tato látka má podobnou schopnost inhibovat topoisomerasu I (IC₅₀ = 7,25 ± 0,20 μg × ml⁻¹) jako má kamptotecin, výrazně také inhibuje proliferaci buněk HT-29 (karcinomu lidského tlustého střeva) (IC₅₀ = 3,98 ± 0,29 μg × ml⁻¹) a Hep G2 (IC₅₀ = 11,85 ± 0,20 μg × ml⁻¹)¹⁹⁰. K dalším biologickým účinkům hippeastrinu patří antimykotický efekt vůči *Candida albicans* a antivirová aktivita vůči virům *Herpes simplex* a Zika¹⁹¹⁻¹⁹³. Starší literatura uvádí, že působí sedativně¹⁹⁴. Protinádorová aktivita, vůči Hep G2 buněčné linii, byla popsána také u lykoreninu (ED₅₀ = 1,2 μg × ml⁻¹). Na druhou

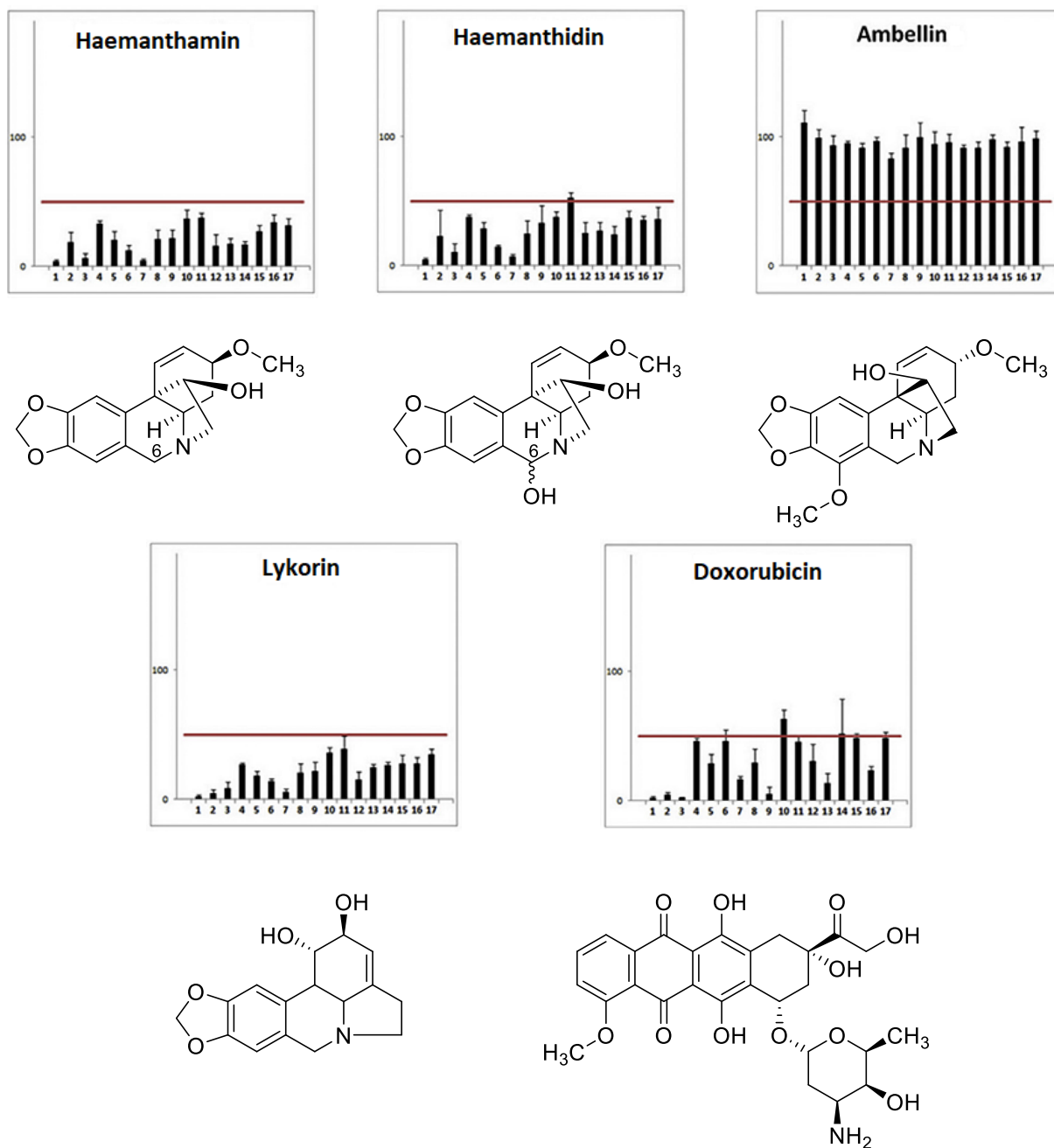
stranu tyto alkaloidy vykazaly toxicitu i vůči nenádorovým primárním buňkám myších fibroblastů LMTK¹⁹⁵, což je při hledání nových léčiv nežádoucí. Většina alkaloidů tohoto strukturního typu vykazala inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β , kde nejaktivnější z nich byl masonin ($IC_{50} = 27,9 \pm 0,8 \mu M$)¹¹³.

Skupina alkaloidů galanthaminového typu má jako základ struktury dibenzofuran¹⁷³. Nejvýznamnějším zástupcem je galanthamin, který se dnes využívá v terapii AD jako inhibitor AChE. Dalšími alkaloidy tohoto typu, izolovanými z *N. pseudonarcissus* cv. Duth Master, byly narwedín, lykoramin a lykoraminon. Tyto látky jsou z pohledu potenciálního využití v terapii AD, nebo nádorových onemocnění, prakticky nevýznamné až na narwedín, který je používán jako látka pro syntézu galanthaminu. V literatuře byly popsány různé metody této přípravy. Jedná se o několikastupňové postupy, z nichž některé podléhají patentové ochraně^{196,197}.

Haemanthaminový a krininový strukturní typy jsou si velice podobné, jejich základ tvoří ethanofenanthridin¹⁷³. Tyto dva strukturní typy se liší pouze prostorovou orientací 5,10*b*-ethanového můstku. V literatuře se někdy slučují do jedné skupiny, kde je haemanthaminový typ označován jako β -krininový a krininový jako α -krininový. Nejvýznamnějším alkaloidem ze skupiny haemanthaminového typu je haemanthamin, který působí cytotoxicky na široké spektrum nádorových linií (obr. 14) (tab. 11)¹⁹⁸. V literatuře byla v nedávné době popsána i farmakokinetika této látky na potkanech po intravenózním podání¹⁹⁹. Z pohledu protinádorové aktivity je zajímavý také jeho derivát haemanthidin, jehož cytotoxická aktivita je srovnatelná s haemanthaminem¹⁵⁴. Tyto dva alkaloidy se vzájemně liší přítomností hydroxyskupiny v poloze C-6 (obr. 14). Haemanthidin je z rostlinného materiálu obvykle izolován ve směsi dvou diastereoizomerů, většinou v poměru 1:1²⁰⁰. Jeho dostupnost je ve srovnání s haemanthaminem výrazně nižší. V literatuře se uvádí, že protinádorová aktivita alkaloidů s 5,10*b*-ethanovým můstkem je spojena s β -konfigurací¹⁵⁴. Z tohoto důvodu je v následující tabulce (tab. 11) uveden pro porovnání i cytotoxický potenciál ambellinu, v jehož struktuře je konfigurace zmíněného můstku v α -poloze (obr. 14). Z tabulky je patrné, že tato látka nevykazuje protinádorovou aktivitu na studované nádorové línii. Všechny tyto studie byly prováděny ve spolupráci s Lékařskou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové¹⁹⁸.

Haemanthamin sám o sobě nevykazuje inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám, ale na našem pracovišti byly připraveny jednoduché deriváty, především aromatické estery, které tuto vlastnost mají. Nejúčinnější deriváty byly prozatím 11-*O*-benzoylhaemanthamin ($IC_{50, BuChE} = 5,9 \pm 0,31 \mu M$), 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin ($IC_{50, AChE} = 18,2 \pm 1,3 \mu M$; $IC_{50, BuChE} = 6,6 \pm 1,2 \mu M$) a 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemanthamin ($IC_{50, AChE} = 14,7 \pm 1,8 \mu M$). Poslední uvedený derivát vykazuje i zajímavou inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β ($IC_{50} = 34,8 \pm 0,01 \mu M$)¹³¹. Jmenované deriváty byly studovány i z pohledu jejich možného prostupu přes hematoencefalickou bariéru (HEB), což je důležitý faktor při vývoji látek pro terapii neurodegenerativních onemocnění. Látky vykazaly schopnost procházet přes HEB prostřednictvím pasivního transportu. Podobný popis těchto experimentů je možno nalézt

v citaci Hulcová et al. (2018)¹³¹. Samotný haemanthamin vykázal ve studii z roku 2010 také antiprotozoální aktivitu vůči *Trypanosoma brucei rhodesiense* (IC₅₀ = 1,62 μM) a *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ = 2,29 μM)^{201,202}. Další izolovanou látkou této skupiny je alkaloid seko-isopowellaminon, který byl podle dostupných zdrojů prozatím izolovaný pouze ze tří rostlin čeledi Amaryllidaceae: *N. poeticus* cv. Pink Parasol¹²⁹, *Crinum asiaticum* L. var. *sinicum*²⁰⁴ a *N. pseudonarcissus* cv. Dutch Master¹³¹. Tato látka byla před vlastní izolací z rostlinného materiálu připravena polosyntetickou cestou z nornarwedinu²⁰³. Z pohledu biologické aktivity, byl tento alkaloid studován pouze v naší laboratoři, prozatím žádnou zajímavou aktivitu nevykázal.



Obr. 14: Graf proliferace buněčných linií po aplikaci haemanthaminu. Doxorubicin použit jako kontrolní látka¹⁹⁸. (1. HL-60, 2. Jurkat, 3. MOLT-4, 4. A549, 5. H1299, 6. COLO-201, 7. HT-29, 8. SW-480, 9. AGS, 10. PANC-1, 11. A2780, 12. HeLa, 13. BT-549, 14. MCF-7, 15. MDA-MB-231, 16. SAOS-2, 17. NHDF)

Tab. 11: Cytotoxické působení vybraných amarylkovitých alkaloidů (proliferace buněk po 72 hod, koncentrace 10 μM)¹⁹⁸

buněčné linie	haemanthamin	haemanthidin	ambellin	lykorin	doxorubicin
HL-60	4	4	111	2	2
Jurkat	18	23	99	5	4
MOLT-4	6	11	93	9	2
A549	33	38	95	27	46
H1299	20	28	91	18	28
COLO-201	12	14	97	14	46
HT-29	5	7	83	5	16
SW-480	21	25	92	20	29
AGS	21	33	100	22	5
PANC-1	37	38	94	36	63
A2780	38	52	96	39	45
HeLa	16	25	92	15	30
BT-549	17	27	92	25	14
MCF-7	17	24	98	27	52
MDA-M2B-231	27	37	92	27	48
SAOS-2	34	35	96	27	23
NHDF	32	36	99	34	48

Hodnoty představují buněčnou proliferaci po ovlivnění alkaloidy a jsou vyjádřeny jako procento proliferace neovlivněných kontrolních buněk.

Tab. 12: Popis zkratk buněčných linií z obr. 14 a tab. 11

zkratka buněčné linie	význam	zkratka buněčné linie	význam
HL-60	akutní promyelocytická leukémie	PANC-1	pankreatický epiteloidní karcinom
Jurkat	akutní T buněčná leukémie	A2780	karcinom vaječnicků
MOLT-4	akutní T buněčná leukémie	HeLa	karcinom děložního čípku
A549	karcinom plic	BT-549	karcinom prsu
H1299	nemalobuněčný karcinom plic	MCF-7	adenokarcinom prsu
COLO-201	kolorektální adenokarcinom	MDA-M2B-231	adenokarcinom prsu
HT-29	kolorektální adenokarcinom, p53 mutantní	SAOS-2	osteokarcinom
SW-480	kolorektální adenokarcinom	NHDF	lidské normální dermální fibroblasty
AGS	adenokarcinom žaludku		

Alkaloidy krininového typu jsou obecně široce rozšířeny mezi rostlinami čeledi Amaryllidaceae. Z *N. pseudonarcissus* cv. Dutch Master byly izolovány pouze dvě látky patřící do tohoto strukturního typu. Jedná se o krinin a epimaritidin, které se vyskytují v této rostlině jen ve velmi nízké koncentraci. Obě látky jsou z pohledu biologických aktivit nezajímavé. V mezinárodním patentu můžeme nalézt studie zabývající se přípravou derivátů krininu. Tyto deriváty byly studovány z pohledu protinádorové aktivity studované na různých nádorových liniích. Některé z nich vykazaly slibnou aktivitu, a proto jsou

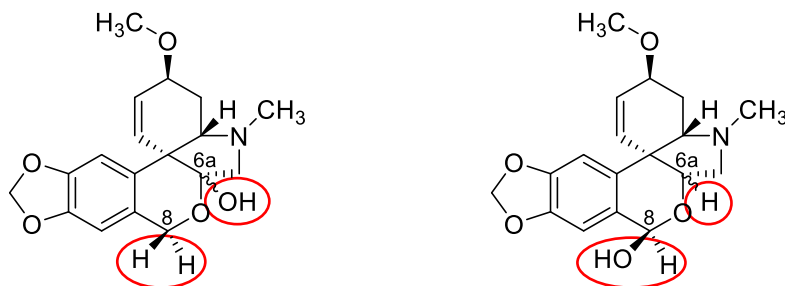
vhodné pro další výzkum²⁰⁵. Jediným zástupce tohoto strukturního typu s výraznou protinádorovou aktivitou je vzácný alkaloid distichamin, izolovaný z cibulí *Boophone disticha* Herb.²⁰⁶.

Lykorinový strukturní typ zahrnuje cyklické pyrrollofenanthridinové alkaloidy¹⁷³. Z hlediska biologické aktivity je nejvýznamnějším typem s cytotoxickými účinky. Hlavním zástupcem je lykorin, který byl vůbec prvním izolovaným alkaloidem z čeledi Amaryllidaceae. V roce 1877 byl získán z *N. pseudonarcissus*²⁰⁷. Přestože v *N. cv. Dutch Master* tento alkaloid nalezen nebyl, stojí za to se o něm zmínit z důvodu jeho širokého spektra biologických účinků. Nejvýznamnější a nejvíce zkoumanou vlastností je cytotoxické působení vůči řadě nádorových buněčných linií (obr. 14, tab. 11)^{198,208}. Lykorin inhibuje poslední krok syntézy kyseliny askorbové v mitochondriální membráně, a tak indukuje apoptózu, navíc má schopnost interagovat s mitochondriální DNA¹⁷³. Apoptóza zprostředkovaná lykorinem je dále podporována aktivací kaspas, produkcí kyslíkových radikálů nebo regulací Bcl-2 proteinů, které mají schopnost regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány a tak ovlivňovat proces buněčné smrti²⁰⁹. Studie ukázaly, že lykorin je účinný i vůči nádorovým liniím rezistentních k apoptóze jako jsou glioblastom, melanom, nemalobuněčný plicní karcinom a metastatické nádory²¹⁰. Protinádorová aktivita lykorinu byla prokázána jak *in vitro*, tak *in vivo* na myších^{211,212}. Velmi důležitá vlastnost je jeho nízká toxicita vůči zdravým a klidovým buňkám^{208,213}. Z dalších prozatím studovaných biologických jsou to aktivity antitivirová²¹⁴, antifungální²¹⁵, antimalarická²¹⁶ a protizánětlivá²¹⁷. Lykorin sám o sobě nevykazuje anticholinesterasovou aktivitu, neinhibuje POP¹²⁶ ani GSK-3 β ¹¹³, ale přesto má potenciál v léčbě AD. Derivatizací lykorinu byly připraveny látky inhibující AChE a BuChE²¹⁸. Lykorin dále disponuje neuroprotektivním potenciálem vůči excitotoxicitě vyvolané glutamátem²¹⁹.

Z cibulí *N. pseudonarcissus cv. Dutch Master* byly izolovány tři alkaloidy lykorinového typu: galanthin, *O*-acetylpluviin a karanin. Galanthin a *O*-acetylpluviin nevykazují žádné významné biologické účinky. Karanin opět nevykazuje významnou aktivitu vůči AChE, BuChE a POP, ale studie ukázaly poměrně dobrou inhibici GSK-3 β ($IC_{50} = 30.8 \pm 0,3 \mu M$)¹³¹. Karanin dále disponuje mírnou antifungální a antiproliferativní aktivitou^{198,220}.

Jediným alkaloidem tazettinového typu, který byl izolován z *N. cv. Dutch Master* je tazettin. Tento alkaloid je odvozen od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu¹⁷³. Z hlediska léčby AD nevykazuje významnou inhibiční aktivitu vůči AChE, BuChE a POP a jen mírnou vůči GSK-3 β . GSK-3 β byla v rámci provedené screeningové studie inhibována tímto alkaloidem ze 49 % při koncentraci 50 μM . Kromě tohoto, je v literatuře popsáno hypotenzivní a antimalarické působení této látky¹⁷³. Cytotoxické působení tazettinu je nevýznamné¹⁹⁸ na rozdíl od pretazettinu. Pretazettin je chemicky labilní prekurzor tazettinu, který má antivirové a protinádorové vlastnosti. Je zajímavé, že malá změna ve struktuře látky je spojena s dramatickou změnou biologické aktivity. Tyto deriváty se od sebe liší pozicí hydroxylové skupiny na uhlících C-6a a C-8 (obr. 16)²²¹. Studie ukázaly, že pretazettin vykazuje

cytotoxickou aktivitu proti fibroblastické LMTK buněčné linii, inhibuje buněčný růst HeLa buněk a je terapeuticky účinný proti Rauscherově leukémii, Ehrlichovu karcinomu, spontánní lymfoblastické leukémii a Lewisovu karcinomu plic (IC_{50} v rozmezí od 4,12 do 8,85 μM). Jedná se také o jeden z nejvíce aktivních amarylkovitých alkaloidů účinných proti MOLT-4 akutní lymfoblastické buněčné leukémii²²². Jeho nevýhodou je velmi nízká dostupnost z rostlinného materiálu.



Obr. 15: Strukturální odlišnosti tazettinu a pretazettinu

Poslední izolovanou látkou z *N. pseudonarcissus* cv. Dutch Master byl heterodimerní Amaryllidaceae alkaloid narcimatulin (obr. 13). Tento nový alkaloid byl izolován pouze v malém množství, které umožnilo jen jeho strukturální identifikaci a provedení studií ve spojení s terapií AD ($IC_{50, \text{BuChE}} = 5,90 \pm 0,23 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{POP}} = 29,2 \pm 1,0 \mu\text{M}$ a $IC_{50, \text{GSK-3}\beta} = 20,7 \pm 2,4 \mu\text{M}$)¹³¹. Izolované množství neumožnilo studium protinádorové aktivity. Z důvodu nízkého výtěžku je budoucí využití této látky problematické.

Závěrem lze říci, že alkaloidy čeledi Amaryllidaceae, ačkoli jsou předmětem mnohých výzkumů a byla na nich provedena celá řada testů, jsou stále atraktivní z hlediska získávání nových látek případně jejich derivátů se zajímavou biologickou aktivitou.

4. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: **Mgr. Daniela Hulcová**

Školitel: **Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

Název disertační práce: **Biologická aktivita alkaloidů *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae)**

Klíčková slova: *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master, Amaryllidaceae, alkaloidy, AChE, BuChE, POP, GSK-3 β , biologická aktivita.

Cibule z *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master z čeledi Amaryllidaceae byly spolu s dalšími druhy rodu *Narcissus* podrobeny bio-guided studii. Tato studie hodnotila sumární alkaloidní extrakty z pohledu jejich cholinesterasové inhibiční aktivity. Navíc byly provedeny podrobné GC-MS analýzy za účelem identifikace jednotlivých složek. Na základě získaných výsledků byl vybrán *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master jako vhodný zdroj širokého spektra amaryllkovitých alkaloidů. Čerstvé cibule tohoto narcisu byly extrahovány ethanolem a sumární extrakt byl separován na jednotlivé frakce pomocí sloupcové chromatografie za využití oxidu hlinitého a silikagelu jako stacionární fáze. Následně byla provedena stupňovitá eluce, kde mobilní fází byla směs různých poměrů benzín - chloroform a chloroform - ethanol. Některé frakce bylo nutno opakovaně rozdělit pomocí sloupcové chromatografie. Následovala preparativní TLC a krystalizace, pomocí nichž byly izolovány čisté látky. Chemická struktura získaných látek byla určena pomocí spektrometrických technik (MS, 1D- a 2D-NMR analýzy, optická otáčivost) a porovnáním získaných dat s literaturou. Z čerstvých cibulí bylo izolováno 21 již známých látek a jeden nový alkaloid (narcimatulin). Alkaloidy izolované v dostatečném množství byly podrobeny testování na různé biologické aktivity spojené s možnou terapií Alzheimerovy choroby a nádorových onemocnění (inhibice vůči AChE, BuChE, POP, GSK-3 β , AKR3C1, cytotoxicita).

Cholinesterasová inhibiční aktivita byla stanovena *in vitro* spektrofotometrickou modifikovanou Ellmanovou metodou. Inhibice POP byla stanovena za využití Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu jako substrátu. Pro stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 β byla použita *in vitro* luminiscenční metoda podle Baki et al. (2007).

Některé z izolovaných látek vykazovaly zajímavou biologickou aktivitu. Za zmínku z hlediska inhibice lidských cholinesteras stojí mimo galanthaminu, u kterého je tato vlastnost známá, i homolykorin s následujícími hodnotami inhibice AChE $IC_{50} = 64 \pm 4 \mu M$, BuChE $IC_{50} = 151 \pm 20 \mu M$. Velmi slibné výsledky prokázala i nově izolovaná látka narcimatulin, která má silný inhibiční potenciál vůči BuChE $IC_{50} = 5.90 \pm 0.23 \mu M$. Tato látka dále velice dobře inhibuje také POP $IC_{50} = 29,2 \pm 1,0 \mu M$

a GSK-3 β IC₅₀ = 20,7 \pm 2,4 μ M. Zajímavou inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β vykazaly i masonin IC₅₀ = 27,9 \pm 0,8 μ M a karantin IC₅₀ = 30,8 \pm 0,3 μ M. Rostlina *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master je na základě získaných výsledků zajímavým zdrojem Amaryllidaceae alkaloidů.

5. Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: **Mgr. Daniela Hulcová**

Supervisor: **Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

Title of Doctoral Thesis: **Biological activity of alkaloids *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae)**

Keywords: *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master, Amaryllidaceae, alkaloids, AChE, BuChE, POP, GSK-3 β , biological activity.

Bulbs of *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. the Dutch Master of the Amaryllidaceae family, along with other species of the genus *Narcissus*, was subjected to a bio-guided study. This study evaluated summary alkaloid extracts using spectrophotometric Ellmans method and GC-MS analysis as a possible source of biologically active Amaryllidaceae alkaloids. *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master was selected as a suitable source for isolation of alkaloids. The fresh bulbs of this daffodil were extracted with ethanol and the crude extract was separated into individual fractions by column chromatography using alumina and silica gel as a stationary phase. Subsequently a stepwise elution was performed, where the mobile phase was a mixture of different ratios of petrol - chloroform and chloroform - ethanol. Some fractions had to be repeatedly partitioned by column chromatography. This was followed by preparative TLC and crystallization by which pure compounds were isolated. The chemical structures of the obtained substances were determined by spectrometric techniques (MS, 1D- and 2D-NMR analysis, optical rotation) and by comparison of the obtained data with the literature. From the fresh bulbs, 21 already known substances and one new alkaloid (narcimatulin) were isolated. Alkaloids isolated in sufficient amount were tested for various biological activities associated with possible therapy of Alzheimer's disease and cancer (inhibition against AChE, BuChE, POP, GSK-3 β , AKR3C1, cytotoxicity).

Cholinesterase inhibitory activity was determined *in vitro* by the spectrophotometric modified Ellman method. POP inhibition was determined using Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilide as a substrate. To determine inhibitory activity against GSK-3 β , an *in vitro* luminescence method was used according Baki et al. (2007).

Some of the isolated compounds showed an interesting biological activity. Galanthamine is known for its anticholinesterase activity. It is worth to mention also homolycorine, where for AChE $IC_{50} = 64 \pm 4 \mu M$ and for BuChE $IC_{50} = 151 \pm 20 \mu M$. Very promising results have also been demonstrated by the newly isolated compound narcimatuline, which has a strong inhibitory potential against BuChE

$IC_{50} = 5.90 \pm 0.23 \mu\text{M}$. This compound also very well inhibits POP $IC_{50} = 29.2 \pm 1.0 \mu\text{M}$ and GSK-3 β $IC_{50} = 20.7 \pm 2.4 \mu\text{M}$. Interesting inhibitory activity against GSK-3 β was also shown by masonine $IC_{50} = 27.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$ and caranine $IC_{50} = 30.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$. Plant *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, based on the results, is an interesting source of alkaloids.

6. Přehled publikací autorky a odborné činnosti autorky

6.1 Tématické práce

- Cit. 9 Opletal L., Ločárek M., Fraňková A., Chlebek J., Šmíd J., Hošťálková A., Šafratová M., **Hulcová D.**, Klouček P., Rozkot M., Cahlíková L. Antimicrobial activity of extracts and isoquinoline alkaloids of selected Papaveraceae plants. *Nat. Prod. Commun.* 2014, 9, 1709-1712. (IF2017 = 0,809)
- Cit. 52 Chlebek J., Novák Z., Kassemová D., Šafratová M., Kostelník J., Malý L., Ločárek M., Opletal L., Hošťálková A., Hrabínová M., Kuneš J., Novotná P., Urbanová M., Nováková L., **Hulcová D.**, Solich P., Martín C. P., Jun D., Cahlíková L., Macáková K. Isoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and their biological activities related to Alzheimer's disease. *Chem. Biodivers.* 2016, 13, 91-99. (IF2017 = 1,617)
- Cit. 113 **Hulcová D.**, Breiterová K., Siatka T., Klímová K., Davani L., Šafratová M., Hošťálková A., De Simone A., Andrisano V., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Molecules.* 2018, 23, 1-9. (IF2017 = 3,098)
- Cit. 128 Vaněčková N., Hošťálková A., Šafratová M., Kuneš J., **Hulcová D.**, Hrabínová M., Doskočil I., Štěpánková Š., Opletal L., Nováková L., Jun D., Chlebek J., Cahlíková L. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances.* 2016, 6, 80114-80120. (IF2017 = 2,936)
- Cit. 129 Šafratová M., Hošťálková A., **Hulcová D.**, Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudêncio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L. Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Arch. Pharmacol Res.* 2018, 41, 208-218. (IF2017 = 2,33)
- Cit. 131 **Hulcová D.**, Maříková J., Korábečný J., Martinez-Gonzalez L., Hošťálková A., Kučera T., I. Perez D., Jun D., Kuneš J., Chlebek J., Hrabínová M., Opletal L., Havelek R., De Simone A., Vorčáková K., Nováková L., Andrisano V., Růžička, A., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master and their semisynthetic derivatives as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* submitted manuscript. 2018. Revision 2. (IF2017 = 4,122)
- Cit. 147 **Hulcová D.**, Breiterová K., Zemanová L., Siatka T., Šafratová M., Vaněčková N., Hošťálková A., Wsól V., Cahlíková L. AKR1C3 inhibitory potency of naturally occurring Amaryllidaceae

- alkaloids of different structural types. *Nat. Prod. Commun.* 2017, 12, 245-246. (IF2017 = 0,809)
- Cit. 152 Seifrtová M., Havelek R., Cahlíková L., **Hulcová D.**, Mazánková N., Řezáčová M. Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, p21WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells. *Phytomedicine.* 2017, 35, 1-10. (IF2017 = 3,61)
- Cit. 157 Chlebek J., Doskočil I., **Hulcová D.**, Breiterová K., Šafratová M., Havelek R., Habartová K., Hošťálková A., Volšťátová T., Cahlíková L. Cytotoxicity of naturally occurring isoquinoline alkaloids of different structural types. *Nat. Prod. Commun.* 2016, 11, 753-756. (IF2017 = 0,809)
- Cit. 178 Breiterová K., Ločárek M., Kohelová E., Talácková M., **Hulcová D.**, Opletal L., Cahlíková L. Daffodils as potential crops of biologically active compounds: Assessment of 40 ornamental taxa for their alkaloid profile and cholinesterases inhibition activity. *Nat. Prod. Commun.* 2018, 13, 419-422. (IF2017 = 0,809)
- Cit. 199 Hroch M., Havelek R., Cahlíková L., Hošťálková A., **Hulcová D.**, Cermanová J., Mičuda S. LC-MS/MS method for the determination of haemanthamine in rat plasma, bile and urine and its application to a pilot pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2016, 30, 1083-1091. (IF2017 = 1.688)

6.2 Abstrakty z konferencí

- 2015 5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference; Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Univerzita Karlova, krátká přednáška na téma: Isochinolinové alkaloidy z *Fumaria officinalis* a jejich biologická aktivita vztahující se k Alzheimerově chorobě. (3. 2. – 4. 2. 2015)
- 2016 6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference; Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Univerzita Karlova, krátká přednáška na téma: Isolation of alkaloids from *Narcissus Dutch Master* and their biological activities. (9. 2. – 10. 2. 2016)
45. konference Syntéza a analýza léčiv, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Univerzita Karlova, plakátové sdělení (22.6 – 24. 6. 2016)
- Trends in Natural Products Research: A Young Scientists Meeting of PSE and IUNG-PIB v Pulawy, Polsko, plakátové sdělení (30. 5. – 2. 6. 2016)

- 2017 3rd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf (ICNPU-2017), Bansko, Bulharsko, plákatové sdělení (18. 10. – 20. 10. 2017)
- 2018 8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference; Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Univerzita Karlova, krátká přednáška na téma: Amaryllidaceae alkaloids as potent GSK 3 β inhibitors. (24. 1. – 25. 1. 2018)
47. konference Syntéza a analýza léčiv, Farmaceutická fakulta VFU Brno, plakátové sdělení, krátká přednáška na téma: Amaryllidaceae alkaloids as potent GSK 3 β inhibitors. (12.9 – 14. 9. 2018)

6.3 Odborné stáže a kurzy

- 2017 Zahraniční stáž v rámci projektu Erasmus+ se zaměřením na měření biologických aktivit izolovaných látek (stanovení inhibice BACE 1 a GSK-3 β) - Facoltà di Farmacia, Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita Corso D'Augusto 237, Rimini, Università di Bologna (1/2017-6/2017)
18. Škola hmotnostní spektrometrie – 11. - 15. 9. 2017, Luhačovice

7. Literatura

- ¹ Dohnal F.: *Studijní texty k dějinám farmacie*. Karolinum, 2014.
- ² Opletal L. Prolegomenon české farmakognozie: 21. století. *Čes. slov. farm.* 2013, 62, 99-102.
- ³ Diefenbach W. C., Meneely Jr J. K. "Digitoxin, a critical review". *Yale. J. Biol. Med.* 1949, 21, 421-431.
- ⁴ Katiyar C., Gupta A., Kanjilal S., Katiyar S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *Ayu.* 2012, 33, 10-19.
- ⁵ Aniszewski T.: *Alkaloids - Secrets of Life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*. Elsevier, 2007.
- ⁶ Funayama S., Cordell G. A.: *Alkaloids: A treasury of poisons and medicines*. Elsevier, 2014.
- ⁷ Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier Publishing, 1999.
- ⁸ Hrdina V., Hrdina R., Jahodář L., Martinec Z., Měrka V.: *Přírodní toxiny a jedy*. Galén, Praha 2004.
- ⁹ Opletal L., Ločárek M., Fraňková A., Chlebek J., Šmíd J., Hošťálková A., Šafratová M., Hulcová D., Klouček P., Rozkot M., Cahlíková L. Antimicrobial activity of extracts and isoquinoline alkaloids of selected Papaveraceae plants. *Nat. Prod. Commun.* 2014, 9, 1709-1712.
- ¹⁰ He M., Qu Ch., Gao O., Hu X., Hong X. Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Adv.* 2015, 5, 16562-16574.
- ¹¹ Perni S., Calzuola I., Caprara A. G., Gianfranceschi L. G., Marsili, V. Natural antioxidants in wheat sprout extracts. *Curr. Org. Chem.* 2014, 18, 2950-2960.
- ¹² Holmerová I., Baumanová M., Jurašková B., Vaňková H., Jiráček R. Komplexní přístup v léčbě pacientů s Alzheimerovou nemocí. *Remedia.* 2014, 6, 474-478.
- ¹³ Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada, 1998.
- ¹⁴ Koukolík F., Jiráček R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence*. Grada, 1999.
- ¹⁵ Jiráček R., Koukolík F.: *Demence: Neurobiologie, klinická obraz, terapie*. Galén, 2004.
- ¹⁶ An Y., Zhang C., He S., Yao C., Zhang L., Zhang Q. Main hypotheses, concepts and theories in the study of Alzheimer's disease. *Life Sci. J.* 2008, 5, 1-5.
- ¹⁷ <https://aaom.org/health/alzheimers-disease/attachment/alzheimers-disease-a-brief-introduction-5/> (staženo 22. 5. 2018)
- ¹⁸ Cahlíková L., Macáková, K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L. Natural compounds (Small Molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: a critical review. In *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, 2014, 42, 153—194.
- ¹⁹ Hořejší J.: *Symposium 1: Alzheimerova choroba*. Galén, 1999.
- ²⁰ Takashima A., Noguchi K., Sato K., Hoshino T., Imahori K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993, 90, 7789-7793.
- ²¹ Alvarez A., Opazo C., Alarcón R., Garrido J., Inestrosa N. C. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid- β -peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* 1997, 272, 348-361.

- ²² Inestrosa N. C., Alvarez A., P´erez C. A., Moreno R. D., Vicente M., Linker C., Casanueva O. I., Soto C., Garrido J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*. 1996, 16, 881-891.
- ²³ Bartolini M., Bertucci C., Cavrini V., Andrisano V. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 407-416.
- ²⁴ Lane R. M., Potkin S. G., Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2006, 9, 101-124.
- ²⁵ <http://slideplayer.com/slide/4641360/> (staženo 23. 5. 2018)
- ²⁶ De Strooper B. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: A multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.* 2010, 90, 465-494.
- ²⁷ Ryan K. A., Pimplikar S. W. Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J. Cell Biol.* 2005, 171, 327-335.
- ²⁸ Leiva R., Phillips M. B., Turcu A. L., Gratacòs-Batlle E., León-García L., Sureda F. X., Soto D., Johnson J. W., Vazquez S. Pharmacological and electrophysiological characterization of novel NMDA receptor antagonists. *ACS Chem. Neurosci.* 2018, 1-32.
- ²⁹ Jiráček R. Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiat. pro Praxi.* 2006, 1, 8-11.
- ³⁰ Rashid U., Ansari F. L. Challenges in designing therapeutic agents for treating Alzheimer's disease- from serendipity to rationality. In *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*. Elsevier, 2015, 40-141.
- ³¹ Jiráček R. Exrtakt z *Ginkgo biloba* EGb 716 v léčbě organických psychických poruch. *Remedia.* 2014, 6, 479-482.
- ³² Jiráček R. Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencí. *Neurol. Prax.* 2009, 10, 367-372.
- ³³ Korabecny J., Zemek F., Soukup O., Spilovska K., Musilek K., Jun D., Nepovimova E., Kuca K. Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current state and future perspectives. In *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*. Elsevier, 2015, 3-39.
- ³⁴ Jiráček R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia.* 2009, 19, 342-345.
- ³⁵ Xing S. H., Zhu C. X., Zhang R., An L. Huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia: a meta-analysis. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* 2014, 2014, 1-10.
- ³⁶ Gupta S., Mohan C. G. Dual binding site and selective acetylcholinesterase inhibitors derived from integrated pharmacophore models and sequential virtual screening. *BioMed Res. Int.* 2014, 2014, 1-21.
- ³⁷ Knowles J. Donepezil in Alzheimer's disease: an evidence-based review of its impact on clinical and economic outcomes. *Core Evid.* 2006, 1, 195-219.
- ³⁸ Jann M. W. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy.* 2000, 20, 1-12.
- ³⁹ Darreh-Shori T., Hosseini S. M., Nordberg A. Pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors suggests add-on therapy with a low-dose carbamylating inhibitor in patients on long-term treatment with rapidly reversible inhibitors. *J. Alzheimer's Dis.* 2014, 39, 423-440.

- ⁴⁰ Pohanka M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 9809-9825.
- ⁴¹ Jain K. K. Rivastigmine. Neurology medlink. 2017, 1-8.
(http://www.medlink.com/scripts/mpdf/print_friendly.php?title=rivastigmine&action=print&channel=public_content&entryid=20139) (staženo 25. 5. 2018)
- ⁴² Kumar V. Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. *Phytother. Res.* 2006, 20, 1023-1035.
- ⁴³ Khoury R., Rajamanickam J., Grossberg G. T. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Ther. Adv. Drug. Saf.* 2018, 9, 171-178.
- ⁴⁴ Stanilova M. I., Molle E. D., Yanev S. G. Chapter 5 - Galanthamine Production by *Leucojum aestivum* Cultures In Vitro. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Elsevier, 2010, 68, 167 - 270.
- ⁴⁵ Berkov S., Georgieva L., Kondakova V., Atanassov A., Viladomat F., Bastida J., Codina C. Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 2009, 23, 1170-1176.
- ⁴⁶ Lilienfeld S. Galanthamine - a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* 2002, 8, 159-176.
- ⁴⁷ Zangara A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003, 75, 675-686.
- ⁴⁸ Gordon R. K., Nigam S. V., Weitz J. A., Dave J. R., Doctor B. P., Ved H. S. The NMDA receptor ion channel: a site for binding of huperzine A. *J. Appl. Toxicol.* 2001, 21, 47-51.
- ⁴⁹ Coleman B. R., Ratcliffe R. H., Oguntayo S. A., Shi X., Doctor, B. P., Gordon R. K., Nambiar M. P. [+-] Huperzine A treatment protects against N-methyl-D-aspartate-induced seizure/status epilepticus in rats. *Chem.-Biol. Interact.* 2008, 175, 387-395.
- ⁵⁰ Bai D. Development of huperzine A and B for treatment of Alzheimer's disease. *Pure Appl. Chem.* 2007, 79, 469-479.
- ⁵¹ Hošťálková A., Opletal L., Kuneš J., Novák Z., Hrabínová M., Chlebek J., Čegan L., Cahlíková L. Alkaloids from *Peumus boldus* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity. *Nat. Prod. Commun.* 2015, 10, 577-580.
- ⁵² Chlebek J., Novák Z., Kassemová D., Šafratová M., Kostelník J., Malý L., Ločárek M., Opletal L., Hošťálková A., Hrabínová M., Kuneš J., Novotná P., Urbanová M., Nováková L., Macáková K., Hulcová D., Solich P., Pérez Martín C., Jun D., Cahlíková L. Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and Their Biological Activities Related to Alzheimer's Disease. *Chem. Biodivers.* 2016, 13, 91-99.
- ⁵³ Chlebek J., Macáková K., Cahlíková L., Kurfürst M., Kuneš J., Opletal L. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.* 2011, 6, 607-610.
- ⁵⁴ Cahlíková L., Opletal L., Kurfürst M., Macáková K., Kulhánková A., Hošťálková A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* 2010, 5, 1751-1754.

- ⁵⁵ Ahmed F., Ghalib R. M., Sasikala P., Ahmed K. M. Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharmacogn. Rev.* 2013, 7, 121-130.
- ⁵⁶ Barbosa Filho J. M., Medeiros K. C. P., Diniz M. D. F. F., Batista L. M., Athayde-Filho P. F., Silva M. S., da-Cunha E. V. L., Silva Almedia J. R. G., Quintans-Júnior L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2006, 16, 258-285.
- ⁵⁷ Siatka T., Adamcová M., Opletal L., Cahlíková L., Jun D., Hrabínová M., Kuneš J., Chlebek J. Cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibitory activities of alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). *Molecules.* 2017, 22, 1181.
- ⁵⁸ Fu Z., Wang H., Hu X., Sun Z., Han Ch. The Pharmacological properties of *Salvia* essential oils. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2013, 3, 122-127.
- ⁵⁹ Ahmed E., Nawaz S. A., Malik A., Choudhary M. I. Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 573-580.
- ⁶⁰ Öztürk M., Kolak U., Topçu G., Öksüz S., Choudhary M. I. Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. *Food Chem.* 2011, 126, 31-38.
- ⁶¹ Misico R. I., Nicotra V. E., Oberti J. C., Barboza G., Gil R. R., Burton G. Withanolides and related steroids. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer, 2011, 94, 127-229.
- ⁶² Choudhary M. I., Nawaz S. A., Ul-Haq Z., Lodhi M. A., Ghayur M. N., Jalil S., Riaz N., Yousuf S., Malik A., Gilani A. H. Withanolides, a new class of natural cholinesterase inhibitors with calcium antagonistic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 334, 276-287.
- ⁶³ Willem M., Garratt A. N., Novak B., Citron M., Kaufmann S., Rittger A., DeStrooper B., Saftig P., Birchmeier C., Haass C. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science.* 2006, 314, 664-666.
- ⁶⁴ Cole S. L., Vassar R. The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Mol. Neurodegener.* 2007, 2, 1-22.
- ⁶⁵ Vassar R., Kovacs D. M., Yan R., Wong P. C. The β -secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function and therapeutic potential. *J. Neurosci.* 2009, 29, 12787-12794.
- ⁶⁶ Citron M. β -secretase as a target for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 2002, 70, 373-379.
- ⁶⁷ Hooper C., Killick R., Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2008, 104, 1433-1439.
- ⁶⁸ Pająk B., Kania E., Orzechowski A. Killing me softly: connotations to unfolded protein response and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 6, 1-17.
- ⁶⁹ Hanger D. P., Byers H. L., Wray S., Leung K. Y., Saxton M. J., Seereeram A., Reynolds C. H., Ward M. A., Anderton B. H. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 23645-23654.
- ⁷⁰ Prati F., Bottegoni G., Bolognesi M. L., Cavalli A. BACE-1 inhibitors: From recent single-target molecules to multitarget compounds for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 619-637.

- ⁷¹ Wang X., Kim J. R., Lee S. B., Kim Y. J., Jung M. Y., Kwon H. W., Ahn Y. J. 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.* 2014, 14, 1-14.
- ⁷² Marumoto S., Miyazawa M. beta-secretase inhibitory effects of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*. *Phytother. Res.* 2010, 24, 510-513.
- ⁷³ Jia H., Jiang Y., Ruan Y., Zhang Y., Ma X., Zhang J., Beyreuther K., Tu, P., Zhang D. Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein in cultured cells. *Neurosci. Lett.* 2004, 367, 123-128.
- ⁷⁴ Jeon S. Y., Kwon S. H., Seong Y. H., Bae K., Hur J. M., Lee Y. Y., Suh D. Y., Song K. S. Beta-secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from *Smilax rhizoma*. *Phytomedicine.* 2007, 14, 403-408.
- ⁷⁵ Choi Y. H., Yoo M. Y., Choi C. W., Cha M. R., Yon G. H., Kwon D. Y., Kim Y. S., Park W. K., Ryu S. Y. A new specific BACE-1 inhibitor from the stem bark extract of *Vitis vinifera*. *Planta Med.* 2009, 75, 537-40.
- ⁷⁶ Jeon S. Y., Bae K., Seong Y. H., Song K. S. Green tea catechins as a BACE1 (beta-secretase) inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 3905-3908.
- ⁷⁷ Jung H. A., Min B. S., Yokozawa T., Lee J. H., Kim Y. S., Choi J. S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis rhizoma* alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.* 2009, 32, 1433-1438
- ⁷⁸ Mani V., Ramasamy K., Ahmad A., Parle M., Shah S. A. A., Majeed A. B. A. Protective effects of total alkaloidal extract from *Murraya koenigii* leaves on experimentally induced dementia. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 1036-1044.
- ⁷⁹ Zhang H., Conte M. M., Khalil Z., Huang X. C., Capon R. New dictyodendrins as BACE inhibitors from a southern Australian marine sponge, *lanthella* sp. *RSC Adv.* 2012, 2, 4209-4214.
- ⁸⁰ Chlebek J., De Simone A., Hošťálková A., Opletal L., Pérez C., Pérez D., Havlíková L., Cahlíková L., Andrisano V. Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets. *Fitoterapia.* 2016, 109, 241-247.
- ⁸¹ Rayasam G. V., Tulasi V. K., Sodhi R., Davis J. A., Ray A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br. J. Pharmacol.* 2009, 156, 885-898.
- ⁸² Embi N., Rylatt D. B., Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* 1980, 107, 519-527
- ⁸³ Eldar-Finkelman H. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol. Med.* 2002, 8, 126-132.
- ⁸⁴ Jope R. S., Johnson G. V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 2004, 29, 95-102.
- ⁸⁵ Saraswati A. P., Ali Hussaini S. M., Krishna N. H., Babu B. N., Kamal A. Glycogen synthase kinase-3 and its inhibitors: Potential target for various therapeutics conditions. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 144, 843-858.
- ⁸⁶ Cohen P., Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2, 769-776.

- ⁸⁷ Phukan S., Babu V. S., Kannoji A., Hariharan R., Balaji V. N. GSK3: Role in therapeutic landscape and development of modulators. *Br. J. Pharmacol.* 2010, 160, 1-19.
- ⁸⁸ Hooper C., Killick R., Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2008, 104, 1433-1439.
- ⁸⁹ Maqbool M., Mobashir M., Hoda N. Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 107, 63-81.
- ⁹⁰ Manoukian A. S., Woodgett J. R. Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. *Adv. Cancer. Res.* 2002 84, 203-229.
- ⁹¹ Luo J. Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett.* 2009, 273, 194-200.
- ⁹² Henriksen E. J., Dokken B. B. Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr. Drug Targets.* 2006, 7, 1435-1441.
- ⁹³ Hardt S. E., Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3 β a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ. Res.* 2002, 90, 1055-1063.
- ⁹⁴ Lal H., Ahmad F., Woodgett J., Force T. The GSK-3 family as therapeutic target for myocardial diseases. *Circ. Res.* 2015, 116, 138-149.
- ⁹⁵ Jope R. S., Roh M. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr. Drug Targets.* 2006, 7, 1421-1434.
- ⁹⁶ Giese K. P. GSK-3: A key player in neurodegeneration and memory. *IUBMB Life.* 2009, 61, 516-521.
- ⁹⁷ Hoeflich K. P., Luo J., Rubie E. A., Tsao M. S., Jin O., Woodgett J. R. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature.* 2000, 406, 86-90.
- ⁹⁸ Lee H. C., Tsai J. N., Liao P. Y., Tsai W. Y., Lin K. Y., Chuang C. C., Sun CK, Chang W. C., Tsai H. J. Glycogen synthase kinase 3 alpha and 3 beta have distinct functions during cardiogenesis of zebrafish embryo. *BMC Dev. Biol.* 2007, 7, 1-15.
- ⁹⁹ Plattner F., Angelo M., Giese K. P. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 25457-25465.
- ¹⁰⁰ Dominguez J. M., Fuertes A., Orozco L., del Monte-Millan M., Deldago E., Medina M. Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by tideglusib. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 893-904.
- ¹⁰¹ Del Ser T., Steinwachs K. C., Gertz H. J., Andress M. V., Gomez-Carrillo B., Medina M., Vericat J. A., Redondo P., Fleet D., Leon T. Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: A pilot study. *J. Alzheimer's Dis.* 2013, 33, 205-215.
- ¹⁰² Naerum L., Nørskov-Lauritsen L., Olesen P. H. Scaffold hopping and optimization towards libraries of glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 1525-1528.
- ¹⁰³ Martinez A., Alonso M., Castro A., Perez C., Moreno F. J. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 β , (GSK-3 β) inhibitors: Thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 1292-1299.
- ¹⁰⁴ Witherington J., Bordas V., Garland S. L., Hickey D. M. B., Ife R. J., Liddle J., Saunders M., Smith D. G., Ward R. W. 5-Aryl-pyrazolo[3,4-b]pyridines: Potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 1577-1580.

- ¹⁰⁵ Coghlan M. P., Culbert A. A., Cross D. A. E., Corcoran S. L., Yates J. D., Pearce N. J., Rausch O. L., Murphy G. J., Carter P. S., Cox L. R., Mills D., Brown M. J., Haigh D., Ward R. W., Smith D. G., Murray K. J., Reith A. D., Holder J. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* 2000, 7, 793-803.
- ¹⁰⁶ Leost M., Schultz C., Link A., Wu Y. Z., Biernat J., Man-delkow E. M., Bibb J. A., Snyder G. L., Greengard P., Zaharevitz D. W., Gussio R., Senderowicz A. M., Sausville E. A., Kunick C., Meijer L. Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 5983-5994.
- ¹⁰⁷ Meijer L., Thunnissen A. M., White A. W., Garnier M., Nikolic M., Tsai L. H., Walter J., Cleverley K. E., Salinas P. C., Wu Y. Z., Biernat J., Mandelkow E. M., Kim S. H., Pettit G. R. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem. Biol.* 2000, 7, 51-63.
- ¹⁰⁸ Hamann M., Alonso D., Martín-Aparicio E., Fuertes A., Pérez-Puerto M. J., Castro A., Morales S., Navarro M. L., Del Monte-Millán M., Medina M., Pennaka H., Balaiah A., Peng J., Cook J., Wahyuono S., Martínez A. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitory activity and structure-activity relationship (SAR) studies of the manzamine alkaloids. Potential for Alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 1397-1405.
- ¹⁰⁹ Gompel M., Leost M., Bal De Kier J. E., Puricelli L., Hernandez F. L., Palermoc J., Meijera L. Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the Ascidian *Aplidium meridianum*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 1703-1707.
- ¹¹⁰ Eldar-Finkelman H., Martinez A. GSK-3inhibitors:preclinical and clinical focuson. *CNS Front. Mol. Neurosci.* 2011, 4, 1-18.
- ¹¹¹ Leclerc S, Garnier M., Hoessel R., Marko D., Bibb J. A., Snyder G. L., Greengard P., Biernat J., Wu Y. Z., Mandelkow E. M., Eisenbrand G., Meijer L. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 251-260.
- ¹¹² Choi H., Gwak J., Cho M., Ryu M. J., Lee J. H., Kim S. K, Kim Y. H., Lee G. W., Yun M. Y., Cuong N. M., Shin J. G., Song G. Y., Oh S. Murrayafoline A attenuates the Wnt/beta-catenin pathway by promoting the degradation of intracellular beta-catenin proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 391, 915-920.
- ¹¹³ Hulcová D., Breiterová K., Siatka T., Klímová K., Davani L., Šafratová M., Hošťálková A., De Simone A., Andrisano V., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Molecules.* 2018, 23, 1-9.
- ¹¹⁴ Babkova K., Korabecny J., Soukup, O., Nepovimova E., Jun D., Kuca K. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. *Future Med. Chem.* 2017, 9, 1015-1038.
- ¹¹⁵ Puttonen K. A., Lehtonen S., Raasmaja A., Männistö P. T. A prolyl oligopeptidase inhibitor Z-Pro-Prolinal, inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase translocation and production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Toxicol. In Vitro.* 2006, 20, 1446-1454.
- ¹¹⁶ Lawandi J., Gerber-Lemaire S., Juillerat-Jeanneret L., Moitessier N. Inhibitors of prolyl oligopeptidases for the therapy of human diseases: Defining diseases and inhibitors. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 3423-3438.

- ¹¹⁷ García-Horsman J. A., Mannisto P. T., Venalainen J. I. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*. 2007, 41, 1-24.
- ¹¹⁸ Shinoda M., Toide K., Ohsawa I., Kohsaka S. Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid β protein in NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 235, 641-645.
- ¹¹⁹ Tarragó T., Kichik N., Seguí J., Giralt E. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *Chem. Med. Chem.* 2007, 2, 354-359.
- ¹²⁰ Tarragó T., Kichik N., Claasen B., Prades R., Teixidó M., Giralt E. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 7516-7524.
- ¹²¹ Dos Santos M. Z., Dalcol I. I., Adolpho L., Teixidó M., Tarragó T., Morel A., Giralt E. Chemical Composition and inhibitory effects of *Hypericum brasiliense* and *H. connatum* on prolyl oligopeptidase and acetylcholinesterase activities. *Med. Chem.* 2016, 12, 457-463.
- ¹²² Zachow L. L., Ávila J. M., Saldanha G. A., Mostardeiro M. A., da Silva U. F., Morel A. F., Dalcol I. I. Chemical composition and evaluation of prolyl oligopeptidase and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Leonurus Sibiricus* L. from Brazil. *Nat. Prod. Res.* 2017, 31, 1459-1463.
- ¹²³ Han A. R., Paik, Y. S. Antioxidant and prolyl endopeptidase inhibitory capacities of chromone C-glucosides from the Clove Buds (*Syzygium aromaticum*). *J. Appl. Biol. Chem.* 2012, 55, 195-198.
- ¹²⁴ Filho A. G., Morel A. F., Adolpho L., Ilha V., Giralt E., Tarragó T., Dalcol I. I. Inhibitory effect of verbascoside isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. *Phytother. Res.* 2012, 26, 1472-1475.
- ¹²⁵ Cahlíková L., Hulová L., Hrabínová M., Chlebek J., Hošťálková A., Adamcová M., Šafratová M., Jun D., Opletal L., Ločárek M., Macáková K. Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*. 2015, 103, 192-196.
- ¹²⁶ Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Kůča K., Opletal L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Nat. Prod. Commun.* 2013, 8, 1541-1544.
- ¹²⁷ Šafratová M., Novák Z., Kulhánková A., Kuneš J., Hrabínová M., Jun D., Macáková K., Opletal L., Cahlíková L. Revised NMR data for 9-O-demethylgalanthine: an alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Nat. Prod. Commun.* 2014, 9, 787-788.
- ¹²⁸ Vaněčková N., Hošťálková A., Šafratová M., Kuneš, J., Hulcová D., Hrabínová M., Doskočil I., Štěpánková Š., Opletal L., Nováková L., Jun D., Chlebek J., Cahlíková L. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Adv.* 2016, 6, 80114-80120.
- ¹²⁹ Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudêncio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L. Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Arch. Pharm. Res.* 2018, 41, 208-218.
- ¹³⁰ Havlasová J., Šafratová M., Siatka T., Štěpánková S., Novák Z., Ločárek M., Opletal L., Hrabínová M., Jun D., Benešová N., Kuneš J., Cahlíková L. Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. *Nat. Prod. Commun.* 2014, 9, 1151-1155.

- ¹³¹ Hulcová D., Maříková J., Korábečný J., Martinez-Gonzalez L., Hošťálková L., Kučera T., I Perez D., Jun D., Kuneš J., Chlebek J., Hrabínová M., Opletal L., Havelk R., de Simone A., Vorčáková K., Nováková L., Andrisano V., Růžička A., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, and their semisynthetic derivatives as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* submitted manuscript. 2018. Revision 2.
- ¹³² Mellor H. R., Callaghan R. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology*. 2008, 8, 275-300.
- ¹³³ Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters*. 2006, 580, 2903-2909.
- ¹³⁴ Adam Z., Pour L., Vorlíček J., Hájek R., Koptíková J., Šmardová J. Cílená léčba v onkologii. *Remedia*. 2005, 4-5, 390-404.
- ¹³⁵ Greenwell M., Rahman P. K. S. M. Medicinal Plants: Their use in anticancer treatment. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2015, 6, 4103-4112.
- ¹³⁶ Goněc R., Kozáková Š. Cílená léčba versus klasická cytostatika. *Onkologie*. 2014, 8, 231-233.
- ¹³⁷ Evans W. C.: *Trease and Evans' Pharmacognosy*. Elsevier Health Sciences, 2009.
- ¹³⁸ Doležalová L. Cílená léčba v onkologii solidních nádorů. *Prakt. Lékáren*. 2015, 11, 194-196.
- ¹³⁹ Montgomery R. B., Mostaghel E. A., Vessella R., Hess D. L., Kalhorn T. F., Higano C. S., True L. D., Nelson P. S. Maintenance of intramolar androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res.* 2008, 68, 4447-4454.
- ¹⁴⁰ Hamid A. R., Pfeiffer M. J., Verhaegh G. W., Schaafsma E., Brandt A., Sweep F. C., Sedelaar J. P., Schalken J. A. Aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) is a biomarker and therapeutic target for castration-resistant prostate cancer. *Mol. Med.* 2012, 18, 1449-1455.
- ¹⁴¹ Yepuru M., Wu Z., Kulkarni A. Y. F., Barrett C. M., Kim J., Steiner M. S., Miller D. D., Dalton J. T., Narayanan R. Steroidogenic enzyme AKR1C3 is a novel androgen receptor-selective coactivator that promotes prostate cancer growth. *Clin. Cancer Res.* 2013, 19, 5613-5625.
- ¹⁴² Davies N. J., Hayden R. E., Simpson P. J., Birtwistle J., Mayer K., Ride J. P., Bunce C. M. AKR1C isoforms represent a novel cellular target for jasmonates alongside their mitochondrial-mediated effects. *Cancer Res.* 2009, 69, 4769-4775.
- ¹⁴³ Škarydová L., Živná L., Xiong G., Maser E., Wsól V. AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chem. Biol. Interact.* 2009, 178, 138-144.
- ¹⁴⁴ Brozic P., Golob B., Gomboc N., Rizner T. L., Gobec S. Cinnamic acids as new inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3). *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006, 248, 233-235.
- ¹⁴⁵ Skarydova L., Hofman J., Chlebek J., Havrankova J., Kosanova K., Skarka A., Hostalkova A., Plucha T., Cahlikova L., Wsol V. Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2014, 143, 250-258.
- ¹⁴⁶ Zemanova L., Hofman J., Novotna E., Musilek K., Lundova T., Havrankova J., Hostalkova A., Chlebek J., Cahlikova L., Wsol, V. Flavones inhibit the activity of AKR1B10, a promising therapeutic target for cancer treatment. *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 2666-2674.

- ¹⁴⁷ Hulcová D., Breiterová K., Zemanová L., Siatka T., Šafratová M., Vaněčková N., Hošťálková A., Wsól V., Cahlíková L. AKR1C3 inhibitory potency of naturally occurring Amaryllidaceae alkaloids of different structural types. *Nat. Prod. Commun.* 2017, 12, 245-246.
- ¹⁴⁸ Lee J. H., Choy M. L., Ngo L., Foster S. S., Marks P. A. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010, 107, 14639-14644.
- ¹⁴⁹ Marks P., Rifkind R. A., Richon V. M., Breslow R., Miller T., Kelly W. K. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer.* 2001, 1, 194-202.
- ¹⁵⁰ Liu J., Gu J., Feng Z., Yang Y., Zhu N., Lu W., Qi F. Both HDAC5 and HDAC6 are required for the proliferation and metastasis of melanoma cells. *J. Transl. Med.* 2016, 14, 1-13.
- ¹⁵¹ Kuribayashi T., Ohara M., Sora S., Kubota N. Scriptaid, a novel histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to radiation. *Int. J. Mol. Med.* 2010, 25, 25-29.
- ¹⁵² Seifrtová M., Havelek R., Cahlíková L., Hulcová D., Mazánková N., Řezáčová M. Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, p21WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells. *Phytomedicine.* 2017, 35, 1-10.
- ¹⁵³ Havelek R., Seifrtova M., Kralovec K., Bruckova L., Cahlikova L., Dalecka M., Vavrova J., Rezacova M., Opletal L., Bilkova Z. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine.* 2014, 21, 479-490.
- ¹⁵⁴ Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochem. Lett.* 2015, 13, 394-398.
- ¹⁵⁵ Wetzel M., Premkumar D. R., Arnold B., Pollack I. F. Effect of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, on glioma proliferation in vitro by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *J. Neurosurg.* 2005, 103, 549-556.
- ¹⁵⁶ Bassett S. A., Barnett M. P. The role of dietary histone deacetylases (HDACs) inhibitors in health and disease. *Nutrients.* 2014, 6, 4273-4301.
- ¹⁵⁷ Chlebek J., Doskočil I., Hulcová D., Breiterová K., Šafratová M., Havelek R., Habartová K., Hošťálková A., Volštatová T., Cahlíková L. Cytotoxicity of Naturally Occurring Isoquinoline Alkaloids of Different Structural Types. *Nat. Prod. Commun.* 2016, 11, 753-756.
- ¹⁵⁸ Habartova K., Havelek R., Seifrtova M., Kralovec K., Cahlikov L., Chlebek J., Cermakova, E., Mazankova N., Marikava J., Kunes J., Novakova L., Rezacova M. Scoulerine affects microtubule structure, inhibits proliferation, arrests cell cycle and thus culminates in the apoptotic death of cancer cells. *Sci. Rep.* 2018, 8, 4829.
- ¹⁵⁹ Hošťálková A., Siatka T., Chlebek J., Opletal L., Drašar P., Cahlíková L. Boldinové alkaloidy a perspektivy jejich využití. *Chem. Listy.* 2015, 109, 846-855.
- ¹⁶⁰ Cibíková P., Šturdíková M., Maruna M. Přírodní látky rostlinného povodu a ich využitie v terapii onkologických ochorení. *Chem. Listy.* 2010, 104, 12-20.
- ¹⁶¹ Havelek R., Seifrtova M., Kralovec K., Krocova E., Tejkalova V., Novotny I., Cahlikova L., Safratova M., Opletal L., Bilkova Z., Vavrova J., Rezacova M. Comparative cytotoxicity of chelidonine and

homochelidonine, the dimethoxy analogues isolated from *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae), against human leukemic and lung carcinoma cells. *Phytomedicine*. 2016, 23, 253-266.

¹⁶² Paydar M., Kamalidehghan B., Wong Y. L., Wong W. F., Looi C. Y., Mustafa M. R. Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using in vitro and in vivo models. *Drug Des. Devel. Ther.* 2014, 8, 719-733.

¹⁶³ Kettmann V., Košťálová D., Jantova S., Čerňáková M., Dřimal J. *In vitro* cytotoxicity of berberine against HeLa and L1210 cancer cell lines. *Pharmazie*. 2004, 59, 548-551.

¹⁶⁴ Tong N., Zhang J., Chen Y., Li Z., Luo Y., Zuo H., Zhao X. Berberine sensitizes multiple human cancer cells to the anticancer effects of doxorubicin in vitro. *Oncol. Lett.* 2012, 3, 1263-1267.

¹⁶⁵ Jin Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 2013, 30, 849-868.

¹⁶⁶ Torras Claveria L., Tallini L., Viladomat Meya F., Bastida Armengol J. Research in natural products: Amaryllidaceae ornamental plants as sources of bioactive compounds. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VII*. 2017, Chapter 5, 69-82.

¹⁶⁷ Nair J. J., Bastida, J., Viladomat F., van Staden J. Cytotoxic agents of the crinane series of Amaryllidaceae alkaloids. *Nat. Prod. Commun.* 2012, 7, 1677-168.

¹⁶⁸ Hanks G. R.: *Narcissus and Daffodils*. Medicinal and Aromatic Plants, Taylor and Francis, 2002.

¹⁶⁹ Jones M., Pulman J., Walker T. Drugs from Daffodils. *Chem. Ind.* 2011, 4, 18-20

¹⁷⁰ Valadon L. R. G., Mummery R. S. Carotenoids in floral parts of a narcissus, a daffodil and a tulip. *Biochem. J.* 1968, 106, 479-484.

¹⁷¹ Fu K. L., Li X., Ye J., Lu L., Xu X. K., Li H. L., Zhang W. D., Shen Y. H. Chemical constituents of *Narcissus tazetta* var. *Chinensis* and their antioxidant activities. *Fitoterapia*. 2016, 113, 110-116.

¹⁷² Vaněk V. a kolektiv.: *Tulipány, narcisy, hyacinty*. Státní zemědělské nakladatelství, 1974.

¹⁷³ Bastida J., Berkov S., Torras Claveria L., Pigni N. B., Andradre J. P. D., Martínez V., Viladomat Meya F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Science, 2011, Chapter 3, 65-100.

¹⁷⁴ Berkov S., Nartínez-Francés V., Bastida J., Codina C., Ríos S. Evolution of alkaloids biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*. 2014, 99, 95-106.

¹⁷⁵ Pigni N. B., Ríos-Ruiz S., Luque F. J., Viladomat F., Codina C., Bastida J. Wild daffodils of the section *Ganymedes* from the *Iberian Peninsula* as a source of mesembrane alkaloids. *Phytochemistry*. 2013, 95, 384-393.

¹⁷⁶ Bastida J., Viladomat F., Llabres J. M., Ramirez G., Codina C., Rubiralta M. *Narcissus* alkaloids, VIII. Mesembrenone: an unexpected alkaloid from *Narcissus pallidulus*. *J. Nat. Prod.* 1989, 52, 478-480.

¹⁷⁷ Bastida J., Viladomat F., Llabres J. M., Codina C., Feliz M., Rubiralta M. Alkaloids from *Narcissus confusus*. *Phytochemistry*. 1987, 26, 1519-1524.

¹⁷⁸ Breiterová K., Ločárek M., Kohelová E., Talácková M., Hulcová D., Opletal L., Cahlíková L. Daffodils as potential crops of biologically-active compounds: Assessment of 40 ornamental taxa for their alkaloid profile and cholinesterases inhibition activity. *Nat. Prod. Commun.* 2018, 13, 419-422.

- ¹⁷⁹ Torras-Claveria L., Berkov S., Codina C., Viladomat F., Bastida J. Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of *Narcissus* by GC-MS combined with k-means cluster analysis. *Ind. Crop. Prod.* 2014, 56, 211-222.
- ¹⁸⁰ Parnes J. S., Carter D. S., Kurz L. J., Flippin L. A. Concise synthesis of narcissus pyrrolophenanthridine alkaloids: Vasconine, Assoanine and Oxoassoanine. *J. Org. Chem.* 1994, 59, 3497-3499.
- ¹⁸¹ Viladomat F., Llabrés J. M., Bastida J., Cusidó R. M., Codina C. Ontogenic variations in the alkaloids of *Narcissus assoanus*. *Physiol. Plant.* 1986, 68, 657-661.
- ¹⁸² Codina C., Viladomat F., Bastida J., Rubiralta M., Quirion J. C. A heterodimer alkaloid from *Narcissus pallidiflorus*. *Phytochemistry.* 1990, 29, 2685-2687.
- ¹⁸³ Labraña J., Machocho A. K. O., Kricsfalusy V., Brun R., Codina C., Viladomat F., Bastida J. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry.* 2002, 60, 847-852.
- ¹⁸⁴ <https://www.tuinadvies.be/plantengids/3900/narcissus-dutch-master> (staženo 8. 6. 2018)
- ¹⁸⁵ <https://www.farmergracy.co.uk/products/narcissus-dutch-master-bulbs-uk> (staženo 8. 6. 2018)
- ¹⁸⁶ Veatch-Blohm M. E., Sawch D., Elia N., Pinciotti D. Salinity tolerance of three commonly planted *Narcissus* cultivars. *HortScience.* 2014, 49, 1158-1164.
- ¹⁸⁷ Kornienko A., Evidente A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem. Rev.* 2008, 108, 1982-2014.
- ¹⁸⁸ Bastida J., Lavilla R., Viladomat F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In *The alkaloids: chemistry and biology*. Elsevier, 2006, 63, 87-179.
- ¹⁸⁹ Řezanka T., Řezanka P., Sigler K. Glycosides of benzodioxole-indole alkaloids from *Narcissus* having axial chirality. *Phytochemistry.* 2010, 71, 301-306.
- ¹⁹⁰ Chen G. L., Tian Y. Q., Wu J. L., Li N., Guo M. Q. Antiproliferative activities of Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata* targeting DNA topoisomerase I. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1-10.
- ¹⁹¹ Evidente A., Andolfi A., Abou-Donia A. H., Touema S. M., Hammoda H. M., Shawky E., Motta A. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry.* 2004, 65, 2113-2118.
- ¹⁹² Renard-Nozaki J., Kim T., Imakura Y., Kihara M., Kobayashi S. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on *Herpes simplex* virus. *Res. virol.* 1989, 140, 115-128
- ¹⁹³ Zhou T., Tan L., Cederquist G. Y., Fan Y., Hartley B. J., Mukherjee S., Tomishima M., Brennan K. J., Zhang Q., Schwartz R. E., Evans T., Studer L., Chen S. High-content screening in hPSC-neural progenitors identifies drug candidates that inhibit Zika virus infection in fetal-like organoids and adult brain. *Cell stem cell.* 2017, 21, 274-283.
- ¹⁹⁴ Zakirov U. B., Abdumalikova N. V. Effect of the alkaloid hippeastrine on conditioned reflexes. *Meditinskii Zhurnal Uzbekistana.* 1967, 5, 32-34.
- ¹⁹⁵ Weniger B., Italiano L., Beck J. P., Bastida J., Bergonon S., Codina C., Lobstein A., Anton R. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta med.* 1995, 61, 77-79.

- ¹⁹⁶ Czollner L., Treu M., Froehlich J., Kueenburg B., Jordis U. Synthesis of galanthamine. *Arkivoc.* 2001, 1, 191-200.
- ¹⁹⁷ Lahiri S., Prasad M., Maheshwari N., Kumar Y. Processes for preparation of narwedine and its use in the synthesis of galanthamine. *PTC Int. Appl.* 2006, WO2006018703A2, 1-29.
- ¹⁹⁸ Havelek R., Muthna D., Tomsik P., Kralovec K., Seifrtova M., Cahlikova L., Hostalkova A., Safratova M., Perwein M., Cermakova E., Rezacova M. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chem.-Biol. Interact.* 2017, 275, 121-132.
- ¹⁹⁹ Hroch M., Havelek R., Cahlíková L., Hošťálková A., Hulcová D., Cermanová J., Mičuda S. LC-MS/MS method for the determination of haemanthamine in rat plasma, bile and urine and its application to a pilot pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2016, 30, 1083-1091.
- ²⁰⁰ Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chem. Biodivers.* 2013, 10, 1120-1127.
- ²⁰¹ Osorio E. J., Berkov S., Brun R., Codina C., Viladomat F., Cabezas F., Bastida J. In vitro antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochem. Lett.* 2010, 3, 161-163.
- ²⁰² Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo Á. G., Estévez-Braun A. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorgan. Med. Chem.* 2012, 20, 5464-5472.
- ²⁰³ Hirnschall M., Froehlich J., Jordis U., Mereiter K. Seco-isopowellaminone: A new heterocycle from nor narwedine. *J. Heterocycl. Chem.* 2002, 39, 1265-1270.
- ²⁰⁴ Kogure N., Katsuta N., Kitajima M., Takayama H. Two new alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *sinicum*. *Chem. Pharm. Bull.* 2011, 59, 1545-1548.
- ²⁰⁵ Rogelj S., Frolova L., Kornienko A., Henry S. Crinine analogs and derivatives for treatment of resistant cancer. *PCT Int. Appl.* 2017, WO2017189834A1, 1-77.
- ²⁰⁶ Nair J. J., Manning J. C., Staden J. Distichamine, a chemotaxonomic marker for the genus *Boophone* Herb. (Amaryllidaceae). *S. Afr. J. Bot.* 2012, 83, 89-91.
- ²⁰⁷ Evidente A., Kornienko A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochem. Rev.* 2009, 8, 449-459.
- ²⁰⁸ Nair J. J., Staden J. Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Nat. Prod. Commun.* 2014, 9, 1193-1210.
- ²⁰⁹ Liu Q., Hu S., Zhang Y., Zhang G., Liu S. Lycorine induces apoptosis in human pancreatic cancer cell line PANC-1 via ROS-mediated inactivation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2016, 9, 21048-21057.
- ²¹⁰ Van Goietsenoven G., Andolfi, A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., Abou-Donia A., Dubois J., Lefranc F., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 1223-1227.
- ²¹¹ Thi Ngoc Tram N., Titorenkova T. V., Bankova V., Handjieva N. V., Popov S. S. *Crinum* L. (Amaryllidaceae). *Fitoterapia.* 2002, 73, 183-208.

- ²¹² Ying X., Huang A., Xing Y., Lan L., Yi Z., He P. Lycorine inhibits breast cancer growth and metastasis via inducing apoptosis and blocking Src/FAK-involved pathway. *Sci. China. Life. Sci.* 2017, 60, 417-428.
- ²¹³ Sun Y., Wu P., Sharopov F. S., Yang Q., Chen F., Wang P., Liang Z. Lycorine possesses notable anticancer potentials in on-small cell lung carcinoma cells via blocking Wnt/ β -catenin signaling and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, 495, 911-921.
- ²¹⁴ Liu J., Yang Y., Xu Y., Ma C., Qin C., Zhang L. Lycorine reduces mortality of human enterovirus 71-infected mice by inhibiting virus replication. *Viol. J.* 2011, 8, 1-9.
- ²¹⁵ Shen J. W., Ruan Y., Ren W., Ma B. J., Wang X. L., Zheng C. F. Lycorine: a potential broad-spectrum agent against crop pathogenic fungi. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 24, 354-358.
- ²¹⁶ Şener B., Orhan I., Satayavivad J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytother. Res.* 2003, 17, 1220-1223.
- ²¹⁷ Çitoğlu G., Tanker M., Gümüşel B. Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. *Phytother. Res.* 1998, 12, 205-206.
- ²¹⁸ Wang Y. H., Wan Q. L., Gu C. D., Luo H. R., Long C. L. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chem. Cent. J.* 2012, 6, 1-6.
- ²¹⁹ Cortes N., Posada-Duque R. A., Alvarez R., Alzate F., Berkov S., Cardona-Gómez G. P., Osorio E. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sci.* 2015, 122, 42-50.
- ²²⁰ Ločárek M., Nováková J., Klouček, P., Hošťálková A., Kokoška L., Gábrová L., Šafratová M., Opletal L., Cahlíková L. Antifungal and antibacterial activity of extracts and alkaloids of selected Amaryllidaceae species. *Nat. Prod. Commun.* 2015, 10, 1537-1540.
- ²²¹ Cimmino A., Masi M., Evidente M., Superchi S., Evidente A. Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality.* 2017 29, 486-499.
- ²²² Habartová K., Cahlíková L., Řezáčová M., Havelek R. The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Nat. Prod. Commun.* 2016, 11, 1587-1594.

Přílohy

Separáty prací týkající se disertační práce

Antimicrobial activity of extracts and isoquinoline
alkaloids of selected Papaveraceae plants.

Opletal L., Ločárek M., Fraňková A., Chlebek J., Šmíd J., Hošťálková A.,
Šafratová M., **Hulcová D.**, Klouček P., Rozkot M., Cahlíková L.

Nat. Prod. Commun. 2014, 9, 1709-1712.

Cit. 9

Isoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and their biological activities related to Alzheimer's disease.

Chlebek J., Novák Z., Kassemová D., Šafratová M., Kostelník J., Malý L., Ločárek M., Opletal L., Hošťálková A., Hrabínová M., Kuneš J., Novotná P., Urbanová M., Nováková L., **Hulcová D.**, Solich P., Martín C. P., Jun D., Cahlíková L., Macáková K.

Chem. Biodivers. 2016, 13, 91-99.

Cit. 52

Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase
kinase-3 β inhibitors.

Hulcová D., Breiterová K., Siatka T., Klímová K., Davani L., Šafratová
M., Hošťálková A., De Simone A., Andrisano V., Cahlíková L.

Molecules. 2018,23, 1-9.

Cit. 113

Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities.

Vaněčková N., Hošťálková A., Šafratová M., Kuneš J., **Hulcová D.**,
Hrabínová M., Doskočil I., Štěpánková Š., Opletal L., Nováková L., Jun
D., Chlebek J., Cahlíková L.

RSC Advances. 2016, 6, 80114-80120.

Cit. 128

Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity.

Šafratová M., Hošťálková A., **Hulcová D.**, Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudêncio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L.

Arch. Pharm. Res. 2018, 41, 208-218.

Cit. 129

Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, and their semisynthetic derivatives as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease

Hulcová D., Maříková J., Korábečný J., Martinez-Gonzalez L., Hošťálková L., Kučera T., I Perez D., Jun D., Kuneš J., Chlebek J., Hrabínová M., Opletal L., Havelek R., de Simone A., Vorčáková K., Nováková L., Andrisano V., Růžička A., Cahlíková L.

Sci. Rep. submitted manuscript. 2018, revision 2.

Cit. 131

AKR1C3 inhibitory potency of naturally occurring
Amaryllidaceae alkaloids of different structural types.

Hulcová D., Breiterová K., Zemanová L., Siatka T., Šafratová M.,
Vaněčková N., Hošťálková A., Wsól V., Cahlíková L.

Nat. Prod. Commun. 2017, 12, 245-246.

Cit. 147

Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, p21WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells.

Seifrtová, M., Havelek R., Cahlíková L., **Hulcová D.**, Mazánková N.,
Řezáčová M.

Phytomedicine. 2017, 35, 1-10.

Cit. 152

Cytotoxicity of naturally occurring isoquinoline alkaloids of different structural types.

Chlebek J., Doskočil I., **Hulcová D.**, Breiterová K., Šafratová M.,
Havelek R., Habartová K., Hošťálková A., Volštátová T., Cahlíková L.

Nat. Prod. Commun. 2016, 11, 753-756.

Cit. 157

Daffodils as potential crops of biologically-active compounds: Assessment of 40 ornamental taxa for their alkaloid profile and cholinesterases inhibition activity.

Breiterová K., Ločárek M., Kohelová, E., Talácková, M., **Hulcová D.**, Opletal L., Cahlíková L.

Nat. Prod. Commun. 2018, 13, 419-422.

Cit. 178

LC-MS/MS method for the determination of haemanthamine in rat plasma, bile and urine and its application to a pilot pharmacokinetic study.

Hroch M., Havelek R., Cahlíková L., Hošťálková A., Hulcová D.,
Cermanová J., Mičuda S.

Biomed. Chromatogr. 2016, 30, 1083-1091.

Cit. 199