

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

# HABILITAČNÍ PRÁCE

PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

2021

Hradec Králové

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

**ISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY JAKO  
POTENCIÁLNÍ LÉČIVA**

**Habilitační práce**

(souhrn publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

Hradec Králové 2021

PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Děkuji především spolupracovníkům, rigorosantům a diplomantům z katedry farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, kteří se podíleli na vzniku této práce při řešení série grantů, diplomových, rigorózních a doktorských prací.

Moje poděkování patří také spolupracovníkům z katedry organické a bioorganické chemie a katedry analytické chemie, se kterými dlouhodobě spolupracuji na určování struktur izolovaných alkaloidů a kteří se, stejně jako kolegové z katedry farmaceutické botaniky, podíleli na vzniku kvalitních prací publikovaných v impaktovaných časopisech, které jsou součástí této práce.

Dík patří rovněž spolupracovníkům z Univerzity obrany v Hradci Králové a ze spolupracujících zahraničních pracovišť a kolegům, kteří jsou jmenovitě uvedeni jako spoluautoři na přiložených publikacích.

V neposlední řadě bych rád poděkoval za psychickou podporu a trpělivost partnerce, rodině a přátelům.

### ***Prohlášení***

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

V Hradci Králové

Jakub Chlebek

## OBSAH

|   |    |
|---|----|
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A VYSVĚTLIVEK .....  | 7  |
| 1 ÚVOD .....  | 11 |
| 2 PŘÍRODNÍ LÁTKY JAKO LÉČIVA .....  | 13 |
| 2.1 Výhody využití přírodních látek .....   | 13 |
| 2.2 Fenomén léčiva .....  | 16 |
| 3 ALKALOIDY VYUŽITELNÉ K OVLIVNĚNÍ ALZHEIMEROVY CHOROBY<br>A NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ .....    | 19 |
| 3.1 Alzheimerova choroba .....  | 19 |
| 3.1.1 Patofyziologie AD .....   | 19 |
| 3.1.2 Současná terapie AD .....   | 20 |
| 3.1.3 Alkaloidy potenciálně využitelné v terapii AD .....                                   | 21 |
| 3.2 Nádorová onemocnění .....   | 22 |
| 3.2.1 Patofyziologie nádorových onemocnění .....  | 23 |
| 3.2.2 Současná terapie nádorových onemocnění .....  | 24 |
| 3.2.3 Alkaloidy potenciálně využitelné v terapii nádorových onemocnění .....                | 25 |
| 4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA ISOCHINOLINOVÝCH ALKALOIDŮ<br>A ALKALOIDŮ ČELEDI AMARYLLIDACEAE ..... | 28 |
| 4.1 Studované taxony .....  | 32 |
| 4.2 Cholinesterasová inhibiční aktivita alkaloidů .....                                     | 32 |
| 4.2.1 Isochinolinové alkaloidy .....  | 33 |
| 4.2.1.1 Protoberberinové alkaloidy .....  | 34 |
| 4.2.1.2 Aporfinové alkaloidy .....  | 36 |
| 4.2.1.3 Pavinanové alkaloidy .....  | 37 |
| 4.2.1.4 Benzyltetrahydroisochinolinové alkaloidy .....                                      | 37 |
| 4.2.1.5 Další strukturní typy .....   | 38 |
| 4.2.2 Alkaloidy amarylkovitých rostlin .....  | 39 |
| 4.2.2.1 Galanthaminový typ .....  | 40 |
| 4.2.2.2 Lykorinový typ .....  | 42 |
| 4.2.2.3 Belladinový typ .....   | 42 |
| 4.2.2.4 Galanthamin-galanthindolový (narcikachninový) typ .....                             | 43 |
| 4.2.2.5 Další strukturní typy .....   | 45 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 4.3       | Vliv alkaloidů na BACE1 .....  | 46 |
| 4.4       | Vliv alkaloidů na GSK-3 $\beta$ .....                                    | 47 |
| 4.5       | Vliv alkaloidů na POP .....  | 48 |
| 4.6       | Antineoplastická aktivita alkaloidů.....                                 | 50 |
| 4.6.1     | Vliv alkaloidů na AKR1C3 a AKR1B10.....                                  | 50 |
| 4.6.2     | Vliv alkaloidů na růst a vývoj vybraných typů nádorových linií buněk.... | 52 |
| 4.6.2.1   | Isochinolinové alkaloidy .....   | 52 |
| 4.6.2.1.1 | Aporfinové alkaloidy <i>s.l.</i> .....                                   | 52 |
| 4.6.2.1.2 | Benzofenanthridinové alkaloidy .....                                     | 55 |
| 4.6.2.1.3 | Protoberberinové alkaloidy.....  | 56 |
| 4.6.2.1.4 | Bisbenzylisochinolinové alkaloidy .....                                  | 58 |
| 4.6.2.1.5 | Spirobenzylisochinolinové alkaloidy.....                                 | 59 |
| 4.6.2.1.6 | Ftalidisochinolinové alkaloidy.....                                      | 59 |
| 4.6.2.1.7 | Protopinové alkaloidy .....  | 60 |
| 4.6.2.1.8 | Další strukturní typy .....  | 60 |
| 4.6.2.2   | Alkaloidy amarylkovitých rostlin .....                                   | 61 |
| 4.6.2.2.1 | Lykorinové alkaloidy .....   | 61 |
| 4.6.2.2.2 | Montaninové alkaloidy .....  | 63 |
| 4.6.2.2.3 | Krinanové alkaloidy.....   | 63 |
| 4.6.2.2.4 | Tazettinové alkaloidy.....   | 65 |
| 4.6.2.2.5 | Homolykorinové alkaloidy .....   | 65 |
| 4.6.2.2.6 | Pankratistatinové alkaloidy.....   | 66 |
| 5         | ZÁVĚR A VÝHLED DO BUDOUCNA .....   | 67 |
| 6         | LITERATURA .....   | 70 |
| 7         | TÉMATICKÉ PRÁCE PŘEDKLADATELE.....                                       | 93 |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A VYSVĚTLIVEK

|           |   |
|-----------|---|
| A2780     | linie karcinomu vaječníku                           |
| A431      | linie epidermálních buněk                           |
| A549      | linie karcinomu plic                                |
| AA        | Amaryllidaceae alkaloidy (alkaloidy amarylkovitých) |
| AD        | Alzheimerova choroba                                |
| AGEs      | koncové produkty pokročilé glykace                  |
| ACh       | acetylcholin  |
| AChE      | acetylcholinesterasa                                |
| AKR       | aldo-ketoreduktasa                                  |
| AKR1B10   | aldo-ketoreduktasa z rodiny AKR1B                   |
| AKR1C3    | aldo-ketoreduktasa z rodiny AKR1C                   |
| APOE4     | apolipoprotein E4                                   |
| APP       | amyloidní prekurzorový protein                      |
| A $\beta$ | $\beta$ -amyloid                                    |
| B16       | linie myšího melanomu                               |
| BACE1     | $\beta$ -sekretasa 1                                |
| BChE      | butyrylcholinesterasa                               |
| BJ        | linie fibroblastů                                   |
| BMI       | index tělesné hmotnosti                             |
| CaCo-2    | linie kolorektálního karcinomu                      |
| CADD      | computer-aided drug design                          |
| CAT       | cholinacetyltransferasa                             |
| CDK5      | cyklin-dependentní kinasa 5                         |
| CNS       | centrální nervová soustava                          |
| CYP3A4    | isoforma cytochromu P450                            |
| CYP450    | cytochrom P450                                      |
| DTNB      | 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina             |
| DU-145    | linie karcinomu prostaty                            |
| DYRK1A    | kinasa regulující fosforylaci tyrosinu              |
| EBM       | medicína založená na důkazech                       |
| eeAChE    | acetylcholinesterasa z elektrického úhoře           |

|                  |  |
|------------------|--|
| <i>egAChE</i>    | acetylcholinesterasa z lidských erytrocytárních pouzder  |
| <i>elAChE</i>    | acetylcholinesterasa z lidského erytrocytárního lyzátu   |
| <i>eqBChE</i>    | koňská sérová butyrylcholinesterasa  |
| FHs 74 Int       | linie nenádorových buněk epitelu tlustého střeva   |
| first pass       | prvotní průchod  |
| GIT              | gastrointestinální trakt   |
| GSK-3 $\beta$    | glykogensynthasa-kinasa 3 $\beta$  |
| GST              | gluthation-S-transferasa   |
| H1299            | linie karcinomu plic   |
| <i>hAChE</i>     | lidská acetylcholinesterasa  |
| <i>hBChE</i>     | lidská butyrylcholinesterasa   |
| HCT-15           | linie kolorektálního adenokarcinomu  |
| HCT-8            | linie kolorektálního adenokarcinomu  |
| HEB              | hematoencefalická bariéra  |
| Hel 92.1.7       | linie leukemických erytroblastů  |
| HeLa             | linie cervikálního karcinomu   |
| Hep-G2           | linie nádorových buněk jater   |
| Hey1B            | linie nádorových buněk vaječníku   |
| HL-60            | linie leukemických buněk   |
| HPLC             | vysokoúčinná kapalinová chromatografie   |
| <i>hrAChE</i>    | lidská rekombinantní acetylcholinesterasa  |
| <i>hrBChE</i>    | lidská rekombinantní butyrylcholinesterasa   |
| HT-29            | linie kolorektálního adenokarcinomu  |
| Chk1             | checkpoint kinasa 1  |
| Chk2             | checkpoint kinasa 2  |
| CHO              | chronická onemocnění   |
| IA               | isochinolinové alkaloidy   |
| IC <sub>50</sub> | koncentrace inhibitoru, která způsobí pokles růstu linie buněk o 50 % nebo pokles aktivity enzymu o 50 % |
| iChEs            | inhibitory cholinesteras   |
| Jurkat           | linie T-lymfocytů  |
| K562             | linie leukemických buněk kostní dřeně  |
| KB               | linie karcinomu úst KB   |



|                          |  |
|--------------------------|--|
| K <sub>i</sub>           | inhibiční konstanta  |
| K <sub>m</sub>           | Michaelisova konstanta   |
| L1210                    | linie myší leukémie  |
| lead structure           | vůdčí struktura  |
| MAO                      | monoaminoxidasa  |
| mcAChE                   | acetylcholinesterasa z homogenátu myšího kortexu   |
| MCF-7                    | linie adenokarcinomu prsu  |
| MDA-MB-231               | linie epitelových buněk prsu   |
| MDR                      | mnohočetná léková rezistence   |
| MOLT-3                   | linie akutní lymfoblastické leukémie   |
| MOLT-4                   | linie akutní lymfoblastické leukémie   |
| MRC-5                    | nenádorové linie embryonálních plicních fibroblastů  |
| MS                       | hmotnostní spektrometrie   |
| MT-4                     | linie lymfoblastické leukemie  |
| NDA review               | proces posouzení účinnosti a bezpečnosti zamýšleného užití nového léčiva   |
| NFT                      | neurofibrilární klubka   |
| NF-κB                    | transkripční nukleární faktor kappa B  |
| NGF                      | nervový růstový faktor   |
| NIH                      | Národní institut zdraví, USA   |
| NK                       | NK buňky (subpopulace lymfocytů)   |
| NMDAR                    | <i>N</i> -methyl-D-aspartátový receptor  |
| NMR                      | nukleární magnetická rezonance   |
| OVACR-3                  | linie nádorových buněk vaječníku   |
| p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> | protein působící jako cyklin-dependentní inhibitor kinas   |
| P-388                    | linie myších leukemických lymfocytů  |
| P-388-D1                 | linie myšího lymfomu   |
| P53                      | protein p53  |
| PAMPA                    | <i>in vitro</i> model pro testování sloučeniny procházet pasivní difuzí přes umě-<br>lou membránu napodobující HEB |
| PANC-1                   | linie pankreatických nádorových buněk  |
| PD                       | Parkinsonova choroba   |
| PDE-10                   | fosfodiesterasa 10   |

|              |   |
|--------------|---|
| P-gp         | efluxní glykoprotein intestinálních buněk                         |
| POP          | prolyloligopeptidasa  |
| PPR $\gamma$ | jaderné receptory, které jsou aktivované proliferátory peroxizomů |
| RAGEs        | receptory pro koncové produkty pokročilé glykace                  |
| Raji         | linie B-lymfoblastických buněk                                    |
| RNS          | reaktivní formy dusíku  |
| ROS          | reaktivní formy kyslíku   |
| <i>s.l.</i>  | <i>sensu lato</i> (v širším slova smyslu)                         |
| <i>s.s.</i>  | <i>sensu stricto</i> (v užším slova smyslu)                       |
| SAOS-2       | linie osteokarcinomu  |
| siRNAs       | dvouvláknové ribonukleové kyseliny o délce 20 až 25 nukleotidů    |
| SK-BR-3      | linie adenokarcinomu prsu   |
| SKMEL 28     | linie melanomu  |
| SK-MEL-2     | linie maligního melanomu  |
| SK-OV-3      | linie karcinomu prsu  |
| SMMC-7721    | linie jaterního karcinomu   |
| SW480        | linie kolorektálního karcinomu                                    |
| TČM          | tradiční čínská medicína  |
| Th1          | Th1 lymfocyty   |
| Th2          | Th2 lymfocyty   |
| U373         | linie glioblastomu  |
| U937         | linie myeloidní leukémie  |
| WHO          | Světová zdravotnická organizace                                   |
| YES-3        | linie esofagálních buněk  |
| YES-4        | linie esofagálních buněk  |

# 1 ÚVOD

Chronická onemocnění (CHO), dříve označovaná nepřesně jako nepřenosná nebo civilizační onemocnění, jsou spojovaná s životním stylem, mají obvykle protražovaný nástup a průběh, komplexní etiologii a jsou následkem kombinace chování, genetických, fyziologických, environmentálních a ostatních vnějších faktorů [1,2]. Mezi hlavní rizikové faktory podporující rozvoj těchto nemocí patří hypertenze, nedostatek fyzického pohybu, vysoká hodnota BMI, kouření, nadměrná konzumace alkoholu a nevyvážená strava [3]. Bylo prokázáno, že CHO mohou být vyvolána i patogenními organismy [4,5]. Ročně CHO zabíjí zhruba 40 milionů lidí, což odpovídá přibližně 71 % všech úmrtí [6]. Do skupiny nejvýznamnějších CHO je nutné zařadit kardiovaskulární nemoci, nádorová onemocnění, chronické respirační nemoci a diabetes mellitus [6]. K CHO lze začlenit i další onemocnění, jejichž incidence vzrůstá se zvyšováním industrializace zemí a prodlužováním délky lidského života – zánětlivé procesy, alergie, autoimunitní onemocnění, psychická onemocnění (deprese), cévní mozkové příhody, chronickou bolest, chronické selhávání ledvin, obezitu, osteoporózu, Alzheimerovu chorobu (AD) aj. [7].

Tato habilitační práce zahrnuje pohled na izolaci, identifikaci a sledování biologické aktivity zaměřené na nalezení perspektivních isochinolinových alkaloidů využitelných pro další studium u AD a nádorových onemocnění. Jak už bylo naznačeno výše, oba typy onemocnění představují významný celosvětový problém současnosti a způsobují úmrtí milionů lidí každý rok. Nádorová onemocnění jsou v současnosti v USA a mnoha dalších zemích druhou nejčastější příčinou úmrtí a očekává se, že v několika příštích letech překonají i kardiovaskulární choroby a stanou se příčinou hlavní [8]. Podobně nelichotivá situace je u AD, protože demografické předpoklady naznačují, že výskyt tohoto onemocnění se bude zvyšovat, pokud se neobjeví nové preventivní nebo neuroprotektivní terapeutické zásahy [9].

Problematikou zkoumání přírodních látek, které by mohly potenciálně ovlivnit neurodegenerativní procesy u AD nebo nádorová onemocnění se zabývá velká skupina vědeckých pracovníků, včetně pracovní skupiny ADINACO na katedře farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty, Univerzity Karlovy v Hradci Králové, která byla založena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. v roce 2005 [10]. Jak bude uvedeno dále, isochinolinové alkaloidy vykazují široké spektrum biologických aktivit, které se mohou terapeuticky uplatnit u obou typů onemocnění. Například studium možných terapeutických zásahů u AD nemůže být zacíleno jen na inhibici lidských cholinesteras, jednoho ze dvou současných

terapeutických přístupů podle EBM, ale je nezbytné studovat i další biologické aktivity nadějných látek, aby bylo možné z farmakoterapeutického hlediska komplexněji ovlivňovat neurodegenerativní procesy v průběhu AD, např. inhibicí enzymových systémů BACE1, POP, GSK-3 $\beta$  a dalších.

Protinádorová aktivita isochinolinových alkaloidů, o které se v tomto přehledu také zmiňuji, sice na první pohled s AD vůbec nesouvisí, ale nedávno publikované výsledky naznačují, že klinicky používaná cytostatika ve velice nízkých koncentracích mohou mít neuroprotektivní účinek [11]. Hlavní náplní činnosti pracovní skupiny ADINACO je „sdružené studium“ aktivity alkaloidů na oba typy chronických onemocnění; v rámci našich studií bylo totiž zjištěno, že isochinolinové alkaloidy mají nejen zajímavou cholinesterasovou inhibiční aktivitu [12–18], ale i slibnou aktivitu cytotoxickou. Významně perspektivními látkami se jeví amarylkovité alkaloidy, které vykazují selektivní cytotoxicitu vůči nádorovým buněčným liniím [19].

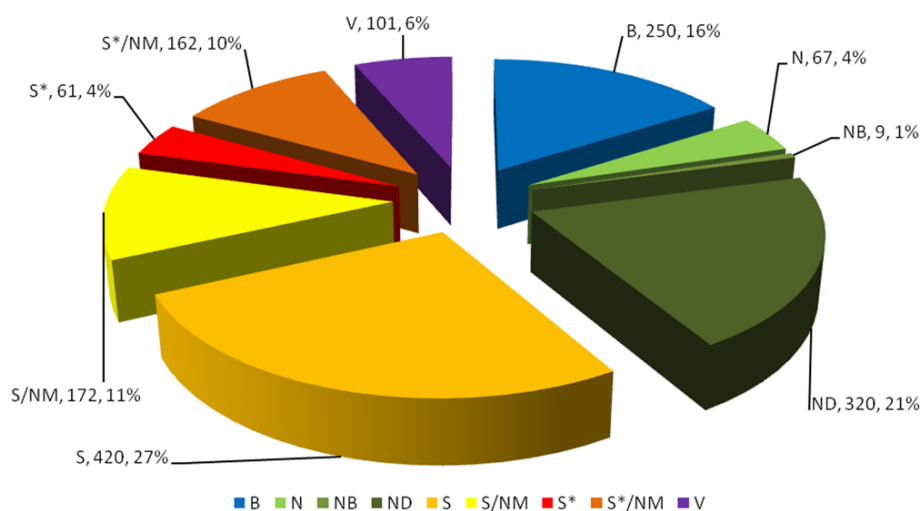
## 2 PŘÍRODNÍ LÁTKY JAKO LÉČIVA

### 2.1 Výhody využití přírodních látek

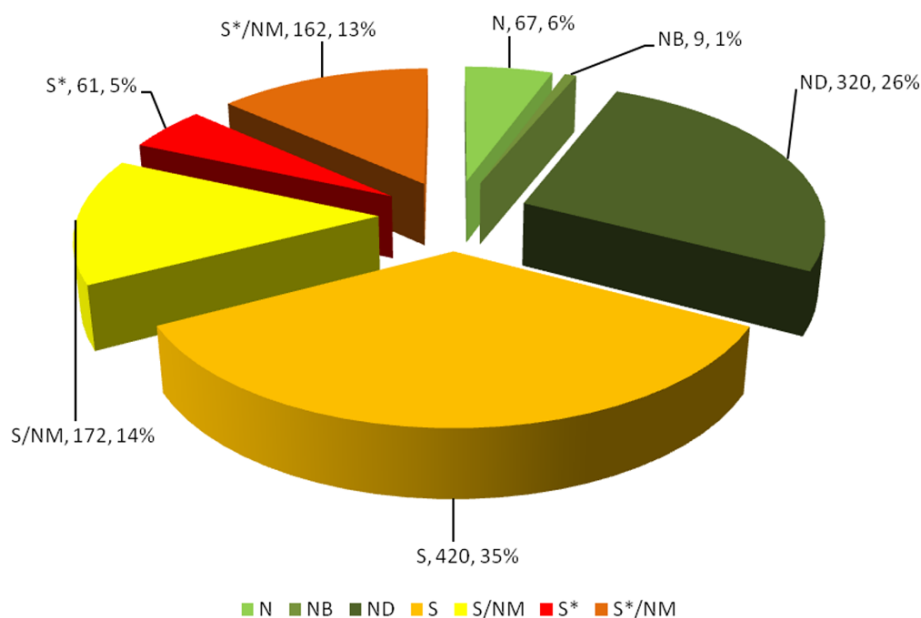
Léčiva pocházející z přírodních zdrojů, zvláště léčiva rostlinného původu, jsou užívána lidstvem už od nepaměti, o čemž svědčí i jejich detailní vyobrazení obsažená ve starověkých textech v Číně, Severní Africe a Indii [20]. Velký pokrok ve farmaceutickém průmyslu od počátku 20. století umožnil vyrábět syntetická léčiva, která dovolila léčit dříve neléčitelné a/nebo život ohrožující nemoci. Přesto však rostliny zůstávají důležitým zdrojem terapeuticky aktivních substancí pro 80 % světové populace, hlavně v rozvojových zemích [21]. Jsou-li však probírány přírodní látky, je nutné vzít v úvahu i další živé metabolizující subjekty jako jsou houby různého stupně fylogenetického vývoje, bakterie, izolované buňky nejen rostlinné, ale i živočišné nebo hmyzí, nebo rekombinantní enzymové systémy (které jsou do jisté míry také „živým“ subjektem).

Příroda představuje cenný zdroj biologicky aktivních látek. Z celkového počtu přibližně 250 000 známých rostlinných druhů bylo do roku 1997 podrobně studováno zatím 5 % těchto taxonů [22]. Vědní obor, který se zabývá hledáním léčiv přírodního původu, je farmakognosie. Tato profilová vědní disciplína oboru farmacie neztratila nic na svém významu i přes 200 let starou historii a rychlý rozvoj léčiv syntetického původu [23]. V současné době však stále existují názory, že přírodní látky jsou záležitostí překonanou, protože smysluplná cesta k získání efektivních léčiv typu malých molekul povede v nejbližší době jen přes totální syntézu. Tento názor je extrémní, povážlivý a nepravdivý a vychází z neinformovanosti, resp. zaujatosti vůči léčivým rostlinám jako takovým. Pohled na využití přírodních látek je totiž zcela jiný.

V roce 2106 publikovali Newman a Cragg, pracovníci NIH, studii s názvem Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 [24]. Jednalo se o zcela aktualizovanou přehledovou práci, která vzešla ze 4 předchozích studií (1997, 2003, 2007 a 2012) publikovaných v časopise *Journal of Natural Products* a která se týkala generálního konceptu nových léčiv v letech 1981–2014. Zhodnocení tohoto vývoje po dobu 33 let představuje dost dlouhou dobu na to, aby výsledky mohly být pokládány za reprezentativní. Tyto výsledky jsou graficky shrnuty na následujících obrázcích (Obr. 1, Obr. 2).



Obr. 1 Všechna nově schválená léčiva 1981–2014; n = 1562 [24].



Obr. 2 Všechna léčiva původu malých molekul schválená 1981–2014; n = 1211 [24].

Vysvětlivky:

- B makromolekulární látky biologického původu (biological macromolecules)
- N nezměněné přírodní produkty (unaltered natural products)
- NB léčiva přírodního původu (botanical drugs, defined mixture)
- ND deriváty přírodních látek (natural product derivatives)
- S syntetická léčiva (synthetic drugs)
- S\* syntetická léčiva s farmakoforem z přírodních látek (NP pharmacophores)
- V vakcíny (vaccines)
- NM mimika přírodních produktů (mimics of NP)

Z této publikace vyplývá, že 51 % všech schválených léčiv mezi roky 1981–2014 byly látkami přírodního původu a 65 % veškerých léčiv povahy malých molekul má určitý vztah k přírodním látkám – jsou to sloučeniny izolované z rostlinného materiálu (paklitaxel, galanthamin) nebo synteticky připravené podle přírodní předlohy (vinkamin) [24]. Za účelem zlepšení dostupnosti, vyšší účinnosti nebo snížení nežádoucích účinků jsou připravovány polosyntetické deriváty přírodních látek (vinpocetin, docetaxel). Řada léčiv zcela syntetického původu byla inspirována strukturou přírodních látek (rivastigmin, alfentanil, metadon).

Antineoplastika představují skupinu léčiv, ve které si přírodní sloučeniny udržují mimořádný potenciál: v období mezi roky 1940–2010 bylo zavedeno do klinické praxe 175 léčiv pro léčbu nádorových onemocnění a téměř 50 % tohoto počtu byly sloučeniny přírodního původu nebo odvozené od přírodních předloh [25]. Kromě onkologických indikací plní přírodní sloučeniny nezastupitelnou roli jako imunosupresiva, jsou využívány v terapii metabolických onemocnění a indikaci našly i u dalších chorob, včetně AD [25–27].

Navzdory pokrokům v moderních technikách (NMR, krystalografická rentgenová analýza, racionální design léčiv a kombinatorní chemie) existuje stále nedostatek „lead structures“ procházejících úspěšně fázemi zkoušek na nová léčiva. Výskyt nových onemocnění, nárůst CHO a rezistence patogenních mikroorganismů na antiinvazní léčiva podnítil zájem k hledání nových zdrojů potenciálních léčiv [26–28]. U běžné veřejnosti také neustále narůstá zájem o fytofarmaka [23]. Existuje zde však určitý rozpor: u řady onemocnění nemůže být tento zájem naplněn.

Hlavní výhody přírodních látek z hlediska vývoje nových potenciálních léčiv jsou:

- 1) *chemická a strukturní diverzita přírodních sloučenin* – přírodní sloučeniny mají v poznatelné míře povahu léčiv; jejich struktury umožňují pokročilé vazebné interakce [25]. Strukturní pestrost přírodních látek umožňuje rovněž navrhnout nové sloučeniny na základě molekulárního modelování *in silico* [21],
- 2) *sekundární metabolity jsou produkty evolučního procesu*, který jim často uděluje jedinečnost a předpoklad pro biologickou aktivitu [25],
- 3) *syntéza přírodních látek de novo*, je v současnosti v řadě případů možná, ale finanční náklady na tento proces bývají podstatně vyšší než při izolaci z rostlin [21,29],

- 4) *přírodní zdroje jsou prověřeny užíváním po staletí v lidovém léčitelství* – až 80 % léčiv rostlinného původu vychází z původního etnofarmakologického (resp. etnofarmaceutického) použití, a právě tato zkušenost je cenným zdrojem pro vědecký postup, který může vést k získání potenciálního (a reálného) léčiva [25],
- 5) *rostliny jsou obnovitelnými zdroji* – v příslušných zeměpisných oblastech je možné pěstovat je prakticky neomezeně a vytvořit dostatečné (a relativně levné) zdroje pro izolaci účinných látek [30].

## 2.2 Fenomén léčiva

S ohledem na údaje uvedené v kapitole 2.1 by bylo velmi paradoxní uměle vytvářet rozdíl mezi léčivem – chemickým individuem přírodního původu a látkou zcela syntetickou. Odporovalo by to pravdě o vývoji nejstarší farmaceutické disciplíny – farmakognosie. Její současný vývojový trend je na stejné úrovni jako farmaceutická chemie. Tato disciplína se oddělila z *Materia medica* na začátku 19. století, kdy se začala rozvíjet syntetická chemie (později chemie analytická), aby se v 70. letech minulého století s farmakognosií k sobě přiblížily a vytvořily jeden funkční celek: rezervoár pro výzkum nových léčiv a je zcela lhostejné, odkud toto léčivo pochází [31]. Protože do vývoje nových léčiv zasahují odborníci různého vzdělání a představ, dochází někdy k ne zcela přesnému používání základních farmaceutických pojmů a jsem přesvědčen, že tomuto problému je potřeba věnovat pár slov.

*Léčivo* je archetypální entitou. Je to pravzor, tradicí posvěcený, zahrnující v sobě ideu, vzorec věcí nebo postupů. Takovou ideou je schopnost navrátit zdraví anebo život; v reakci s živým organismem má schopnost chránit, upevňovat, nebo vracet organismu zdraví rozpoznávat poruchu zdraví, projevy poruch mírnit, potlačovat, odstraňovat, případně příznivě ovlivňovat fyziologické funkce organismu [32]. Ve smyslu mnou předložené práce je to jednotná, přesně definovaná chemická sloučenina, která musí být podrobena dalším dvěma procesům.

*Léčivý přípravek* vzniká z léčiva příslušnými technologickými procesy s využitím dalších (pomocných) látek jednotné nebo nejednotné chemické povahy; výsledkem tohoto procesu je léková forma, která je určena k přímému použití [32,33].

*Lék* je léčivý přípravek podaný do racionálně určeného organismu s cílem ovlivnit v něm především příznivě zdravotní stav (nebo podílet se na rozpoznání poruchy zdraví). Lékem se v organismu stává léčivo prostřednictvím léčivého přípravku v okamžiku jeho



podání až do okamžiku doznění jeho interakce s organismem. Lék v tomto pojetí nelze vyrábět, skladovat, vydávat – vzniká až po cíleném podání do organismu. A právě zde se vyskytuje fatální chyba: obecně se tvrdí, že je prováděn vývoj nových léků [33] a následně vyrábíme léky [32].

Vývoj nového léčiva, resp. léčivého přípravku je až na výjimky velmi zdlouhavý. Tento proces má *de facto* 4 fáze [34]: výzkum a vývoj s preklinickým testováním, klinické testování, NDA review a postmarketingové sledování. V rámci tohoto procesu se operuje s několika pojmy, které je vhodné zde v základní zkratce uvést.

*Potenciální léčivo* je pojem patřící zásadně do oblasti výzkumu a vývoje, resp. preklinického testování. Definované sloučeniny (nebo u fytofarmak definované směsi látek), u kterých byla nalezena vhodná biologická aktivita, většinou *in vitro* (ať už na enzymových systémech, izolovaných buňkách nebo tkáních), vytvářejí *sensu lato* (*s.l.*) zdroj pro výběr optimálních chemických struktur, které vstupují do dalšího testování v rámci preklinického výzkumu. Zde lze hovořit o dvou typech chemických struktur [35]:

- 1) „*hit-structures*“, které jsou představovány biologicky aktivními látkami, vyvolávajícími ve specifickém testu pozitivní odpověď a které jsou podrobeny optimalizačnímu výběru vedoucím k vytvoření
- 2) „*lead-structures*“ (vůdčích struktur), což jsou selektované sloučeniny nadále vykazující pozitivní odpověď v závislosti na dávce i ve složitějších testovacích modelech, nebo vyhovujících předpovědi farmakokinetických a farmakodynamických vlastností látek.

Převážná většina těchto zdánlivě perspektivních látek se však v dalším studiu neuplatní, protože nevyhoví požadavkům na optimální léčivo. Velmi často však provedou dobrou službu v tom smyslu, že na základě vztahu struktura-účinek vytvoří povědomí farmakoforu.

*Farmakofor* je soubor sterických a elektronických vlastností, které jsou nezbytné k zajištění optimálních supramolekulárních interakcí se specifickým biologickým cílem a k ovlivnění jeho biologické odpovědi. Současná vize farmakoforu nevychází pouze z experimentálního zjištění v laboratoři, ale je většinou kombinací experimentálního zjištění a využití CADD (computer-aided drug design) technologií, které sehrávají významnou roli v prvních fázích výzkumu při charakterizaci aktivního místa, validaci biologického cíle, prohledávání databází a identifikací [35].

*Kandidátní léčivo* (kandidátní struktura) vychází ze znalosti „kandidátního farmakoforu“ a jeho interakce s receptorem (vazebnými strukturami). Různé matematické modely

pak umožní přibližovat se k optimální chemické struktuře a jít cíleně ke struktuře žádaného léčiva [35].

*Reálné léčivo* – tento pojem není dosud v terapeutické praxi běžný, ale je opodstatněný; jedná se o léčivo, které úspěšně prošlo klinickými testy a vstoupilo do fáze NDA review, ve formě léčivého přípravku je schváleno národními (nadnárodními) autoritami a je určeno k běžnému terapeutickému využití. Reálné léčivo však může reálně skončit, pokud se ve fázi postmarketingového sledování zjistí neakceptovatelné vedlejší (nežádoucí) účinky.

Mohlo by se zdát, že tato terminologie bude plně vyhovovat pouze látkám připraveným synteticky, ale není tomu tak: vyhovuje plně i látkám přírodního původu. U tohoto typu potenciálních léčiv mohou být některé fáze zkráceny (protože se vychází z etnobotanických znalostí), nebo naopak prodlouženy, pokud je prováděn screening na biologické účinky látek zcela neznámé struktury (metabolity mikroorganismů).

Velmi jednoduchým příkladem přírodního terapeutického zdroje, na kterém lze tuto terminologickou šíři ukázat, je opium. Tento zaschlý latex z nezralých makovic *Papaver somniferum* L. byl po staletí používán především jako analgetikum-anodynum. Poměrně jednoduchým izolačním postupem se z něho podařilo v 19. století izolovat nejenom morfin jako hlavní látku, ale i několik dalších isochinolinových alkaloidů (IA). Morfin přešel okamžitě do kategorie reálného léčiva – byla zde historická zkušenost. Návykovost na tuto látku (psychickou i fyzickou závislost) z něho však vytvořily nové potenciální léčivo, které prošlo výše uvedenými fázemi: po objevení farmakoforu a opioidních receptorů byly dokonale rozpracovány parciální syntézy s cílem získat látky analgeticky vysoce účinné bez výrazné psychické a fyzické závislosti. Vznikla nová reálná léčiva morfinanového typu (butorfanol), deriváty 6,7-benzomorfanu (pentazocin), deriváty 4-fenylpiperidinu (pethidin), deriváty 3-fenylpropylaminu (methadon, tramadon, tapentadol, piritramid difenoxylát, loperamid) a anodyna anilidového typu (fentanyl aj.) [36]. Každá z uvedených látek má svoje terapeutická specifika v souvislosti se zásahem do farmakoforu, některé z nich mají užší použití, nicméně je zde patrné, že morfin jako kandidátní struktura se významně uplatnil v přípravě nových reálných léčiv.

## 3 ALKALOIDY VYUŽITELNÉ K OVLIVNĚNÍ ALZHEIMEROVY CHOROBY A NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

### 3.1 Alzheimerova choroba

AD je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které obvykle postihuje lidi nad 65 let. Tato nemoc je charakterizována zhoršením kognitivních schopností, různými behaviorálními poruchami a omezením aktivit denního života. AD reprezentuje nejčastější formu demence, její prevalence se exponenciálně zvyšuje mezi 65. – 85. rokem, přičemž každých 5 let se zdvojnásobuje. Demografické předpoklady naznačují, že výskyt onemocnění se bude zvyšovat, pokud se neobjeví preventivní neuroprotektivní nebo terapeutické možnosti [9], zvláště v zemích s horší kvalitou stravy, nekvalitním hygienickým stavem a nízkou kupní silou obyvatel, ve kterých narůstá výskyt kardiovaskulárních onemocnění a diabetu [37]. V současnosti není známa přesná etiopatogeneze nemoci, nicméně jsou známy hlavní rizikové faktory: věk, genetické dispozice, tj. porucha metabolismu APP, polymorfismus APOE4, mutace presenilinu 1 a 2. Dále hraje roli pohlaví (u žen existuje vyšší incidence), vzdělání, úrazy hlavy, případný iktus, životní styl a další faktory [38–40].

#### 3.1.1 Patofyziologie AD

V mozku pacientů s AD jsou nalézány dva charakteristické patologické znaky – extracelulární ukládání  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ) do amyloidních plaků a intraneuronální tvorba hyperfosforylovaných vláken  $\tau$ -proteinu v neurofibrilárních klubkách (NFT), které způsobují progresivní ztrátu neuronů a rozpad nervových drah, zvláště v mozkové kůře [41,42]. Deficit cholinergních funkcí a snížená hladina acetylcholinu (ACh) v mozkové kůře jsou zodpovědné za zhoršení paměti u lidí s touto chorobou [43]. Celá patofyziologie AD je však mnohem komplexnější a zahrnuje širokou kaskádu různých patologických procesů, jak je zmíněno v přehledovém článku naší pracovní skupiny [44], ale i dalších publikacích [45–47]. Existuje rovněž názor, že spouštěčem geneticky nepodmíněné AD není  $A\beta$ , ale že se jedná o vaskulární onemocnění s neurodegenerativními konsekvencemi [48].

Jak bylo naznačeno výše, je AD komplexním onemocněním s dosud neobjasněným vznikem. Na základě neuropatologických změn jsou nejčastěji zmiňované dvě základní teorie – amyloidní a cholinergní. Podle amyloidní teorie vede porucha metabolismu APP při štěpení prostřednictvím BACE1 a následně působením  $\gamma$ -sekreasy ke vzniku a ukládání

patologického proteinu A $\beta$  (zvláště A $\beta$ <sub>1-42</sub>) do vytvářejících se senilních plaků. Následně dochází k degeneraci neuronálního  $\tau$ -proteinu (zřejmě i zde hraje významnou roli A $\beta$ ), což je způsobeno zvýšenou fosforylací tohoto proteinu enzymem GSK-3 $\beta$ . Následkem celého procesu je porucha tvorby mikrotubulů a agregace  $\tau$ -proteinu do NFT. V případě tzv. cholinergní teorie je tvorba a distribuce ACh patologicky snížena. ACh hraje důležitou roli v procesu učení, paměti, pozornosti a motoriky. Je syntetizován v cholinergních neuronech enzymem CAT. V mozku zdravých lidí je ACh odbouráván v neuronech a synapsích majoritně AChE, v mnohem menším rozsahu prostřednictvím BChE, jejíž hladina a aktivita se u AD postupně zvyšuje a v pokročilé fázi choroby může BChE nahradit AChE v její funkci. BChE se nalézá i v neuritických placích, neuroglii a NFT. U AD hrají důležitou patologickou roli také ROS a RNS, které jsou tvořeny ve větší míře v senilních placích, dochází k aktivaci mikroglie, což má za následek tvorbu neuritických plaků, které mohou produkovat potenciální neurotoxické cytokiny. Fibrily A $\beta$  reagují na povrchu buněk s RAGEs. Tato reakce vede k depolarizaci buněčné membrány, aktivaci NMDA receptorů a zvýšení intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup>, které způsobí sterilní zánět a následně smrt neuronů. Zánik neuronů je podporován také nedostatkem NGF a jeho receptorů, poklesem koncentrací CAT, noradrenalinu, neuropeptidů (negativní roli zde hraje POP, která štěpí peptidové hormony a neuropeptidy a nepříznivě ovlivňuje proces učení), zvýšením aktivity kaspas způsobené oxidačním stresem v mitochondriích a dalšími patologickými procesy [44].

### 3.1.2 Současná terapie AD

Spektrum používaných léčiv u AD je velice omezené, navíc působí jen symptomaticky, protože v současnosti neexistuje kauzální terapie. Za posledních 10 let stoupl významně počet studií zabývajících se potenciální léčivou z oblasti malých molekul a sloučenin přírodního původu. K ovlivnění produkce A $\beta$  byly testovány inhibitory BACE1 (např. E2609, AZD3293, CNP520, JNJ-54861911J), které dosáhly v probíhajících studiích povzbudivých klinických výsledků [49]. Dále jsou zkoumány monoklonální protilátky (solanezumab, crenezumab a gantenerumab) působící přímo proti toxickému A $\beta$ , sloučeniny snižující toxicitu hyperfosforylace  $\tau$ -proteinu (např. inhibitory GSK-3 $\beta$ ), inhibitory POP snižující degradaci neuropeptidů aj. Praktické používání těchto potenciálních léčiv bude zhodnoceno až po ukončení klinických studií [49–51]. Podle EBM existují v současnosti pouze dva terapeutické přístupy: jsou aplikovány inhibitory cholinesteras (iChEs; galanthamin, rivastigmin

a donepezil) a antagonisté NMDAR (memantin) ovlivňující glutamátergní systém [9]. Z důvodu komplexnosti AD jsou užívány kromě iChEs a blokátorů NMDAR i antioxidanty (DL- $\alpha$ -tokoferol), inhibitory MAO (selegilin), látky zlepšující metabolismus v mozku a průtok krve mozem (extrakty z *Ginkgo biloba* L., vinpocetin), případně estrogeny u postmenopauzálních žen. Užívání nootropik (piracetamu) a cerebrolysinu nepřineslo v terapii AD žádoucí účinky [52]. Souběžně jsou v terapii AD často efektivně užívána léčiva ovlivňující psychické poruchy – depresi a strach (antidepresiva a anxiolytika). Protože se v pozdějších stádiích AD mohou rozvinout agrese, agitovanost nebo psychóza, je dáována přednost atypickým antipsychotikům [37].

### 3.1.3 Alkaloidy potenciálně využitelné v terapii AD

Látky přírodního původu, jako zdroje potenciální léčiv AD, jsou intenzivně zkoumány už delší dobu, o čemž svědčí velké množství přehledových článků např. [41,44,53–56]. Mezi početnou skupinu metabolitů, vykazujících perspektivní terapeutickou aktivitu, patří nesporně alkaloidy [41,45,54,57,58]. Některé z nich jsou už klinicky využívány (galanthamin, huperzin A) jako selektivní inhibitory AChE, jiné se zdají být pro terapii této nemoci perspektivní, nebo představují „lead structures“ ve vývoji nových léčiv, jak je uvedeno níže u vybraných zástupců. Ve větším rozsahu je vhodné zmínit se o alkaloidu huperzinu A, který se jeví jako velice perspektivní pro terapii AD. Jde o alkaloid izolovaný z čínské rostliny vrance pilovitého *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis., který se v Číně nachází ve fázi IV klinického testování u pacientů s AD a vaskulární demencí. Látka je účinným selektivním a reverzibilním inhibitorem AChE s lepšími farmakologickými vlastnostmi než v případě takrinu. Ve srovnání s donepezilem a rivastigminem vykazuje huperzin A lepší přechod přes HEB, lepší biodostupnost po *p.o.* podání, déletrvající inhibici AChE s minimálními nežádoucími periferními cholinergními účinky a nevykazuje v terapeutických dávkách významnou toxicitu. Na zvířecích modelech bylo objasněno, že látka zlepšuje kognitivní funkce, chrání buňky před indukovanou cytotoxicitou a apoptózou (zmírňuje oxidační stres, reguluje expresi apoptických proteinů, má protektivní účinek na mitochondrie, zlepšuje regulaci NGF a jeho receptorů a interferuje s metabolismem APP). Dále bylo zjištěno, že za neuroprotektivními účinky huperzinu A stojí i jeho schopnost antagonizovat NMDAR a tok  $K^+$  iontů [59]. Z huperzinu A byly připraveny deriváty s výraznou inhibicí AChE tzv. „hupriny“ (konjugáty molekul huperzinu A a takrinu) [60] i hybridní molekuly alkaloidu, které jsou schopné modulovat více potenciálních cílů u AD současně [55].

Berberin, kvarterní isochinolinový alkaloid ze zástupců rodu *Berberis* L. (především *Berberis vulgaris* L.), *Coptis chinensis* Franch. a *Hydrastis canadensis* L., vykazuje celé spektrum biologických aktivit potenciálně využitelných v terapii AD: má antioxidační, protizánětlivé a neuroprotektivní účinky – inhibuje oxidační stres, AChE, BChE a POP, působí jako antagonist NMDAR, blokuje napětově řízené K<sup>+</sup> kanály, snižuje tvorbu A $\beta$  ovlivněním metabolismu APP a hyperfosforylaci  $\tau$ -proteinu. Účinně ovlivňuje i některé další rizikové faktory pro vznik a rozvoj AD. Omezujícím faktorem pro jeho užití v terapii AD je jeho dosud jednoznačně neuzavřená toxicita a nízká biodostupnost (špatná vstřebatelnost z intestina je způsobena hlavně P-gp a first pass metabolismem CYP450) [61,62].

Harmin, indolový alkaloid izolovaný např. z *Peganum harmala* L. a *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) Morton má široké spektrum biologických účinků, např. antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé a neuroprotektivní (inhibice AChE, MAO, a DYRK1A) [58]. Pro zlepšení biologických vlastností byly připraveny jeho polosyntetické deriváty [53].

Manzamin A, alkaloid izolovaný z mořských hub rodu *Haliclona* Grant, je silným inhibitorem GSK-3 $\beta$  a CDK5; oba enzymy jsou zapojeny do hyperfosforylace  $\tau$ -proteinu a látka tak představuje perspektivní strukturu pro další studium, možná i využití. Alkaloid rovněž efektivně snižuje tvorbu NFT [54].

Oxoisoaporfinové a oxoaporfinové alkaloidy izolované z *Menispermum dauricum* DC. a z nich připravené deriváty inhibovaly AChE a agregaci A $\beta$ , vykazovaly antioxidační aktivitu [53]. Mají údajně také schopnost zasahovat do imunoreaktivity, jak bylo ukázáno na příkladu apomorfinu, kdy po jeho aplikaci došlo u transgenních myší téměř k úplnému vymizení intraneuronální imunoreaktivity A $\beta$  u hemizygotních jedinců a výraznému poklesu intraneuronální imunoreaktivity A $\beta$  u homozygotů [63].

Korynoxein, hirsutin a hirsutein, oxindolové a indolové alkaloidy, které jsou hlavními účinnými alkaloidy *Uncaria rhynchophylla* Miq, destabilizují tvorbu agregátů A $\beta$ , mají rovněž neuroprotektivní účinek a inhibují glutamátem indukovanou neurotoxicitu [44].

### 3.2 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou velkou komplexní skupinou onemocnění, která jsou charakterizována nekontrolovaným růstem buněk, které se zpravidla šíří (metastázuje) do ostatních přilehlých tkání nebo jiných částí těla. Po jejich vaskularizaci (solidní tumory) dochází k tvorbě dalších nádorů. Tato onemocnění představují druhou nejčastější příčinu úmrtí ve

světě. V roce 2018 bylo zaznamenáno 18,1 milionů nových případů a následkem tohoto typu onemocnění zemřelo 9,6 milionů lidí, přičemž 70 % všech úmrtí pochází z málo až středně rozvinutých zemí. Celosvětově má prevalence nádorových onemocnění vzrůstající tendenci a pro jednotlivce, rodiny a zdravotnické systémy představuje velké břímě z hlediska psychického, fyzického i ekonomického. Mezi hlavní rizikové faktory těchto onemocnění patří nejen behaviorální a stravovací návyky (metabolický syndrom, vysoká hodnota BMI, nevhodné složení potravy, nikotinismus, nedostatek fyzické aktivity a konzumace alkoholu) [64], ale karcinogenezi mohou ovlivňovat kromě genetických změn v buňkách [65] i zevní faktory biologické (některé infekce jako příčina maligní transformace buňky způsobená onkogenními viry, bakteriemi, parazity), fyzikální (UV a ionizující záření) a chemické (karcinogenní sloučeniny přítomné v potravním řetězci) [4,5,66].

### **3.2.1 Patofyziologie nádorových onemocnění**

Mezi nejčastěji přijímaný názor z hlediska původu a patogeneze nádorů patří poškození genetické výbavy buněk, po které dochází k mutacím, poruše genové exprese, aktivaci nádorového promotorového genu, inaktivaci genů tlumící nádor apod. [67,68]. Běžný mechanismus patofyziologie nádorových onemocnění je ve zkratce popisován takto: za fyziologických podmínek je vždy pozorováno dočasné lokální potlačení antitumorové aktivity imunitního systému při reparativních procesech v poškozené tkáni organismu, které je způsobeno následkem chemického, fyzického nebo biologického působení [69,70]. Význam tohoto lokálního potlačení antitumorové imunity spočívá v zajištění úspěšné obnovy poškozené tkáně [71]. Kromě této suprese dochází v místě poškození k aktivaci imunitních reakcí podporujících reparační a zánětlivé procesy [72,73]. Opětovná aktivace protinádorové imunity chrání organismus před maligně pozměněnými buňkami, které se prakticky vždy objeví po dokončení reparačních procesů a potlačení zánětu v tkáni [74]. Normální fyziologický průběh těchto reakcí probíhá díky rovnováze vegetativního nervového systému – sympatiku a parasympatiku. Fyziologické mechanismy obnovy tkáně se mohou stát patofyziologickými při výskytu lokálního mnohočetného „mikropoškození“ organismu způsobené vnějšími faktory (biologickými, chemickými, fyzikálními), ale také přítomnou nerovnováhou vegetativního nervového systému. Důsledkem této nerovnováhy dochází k místnímu poškozování tkáně chronickým zánětem s neustálou tvorbou nádorových buněk [74]. Stálý průběh mikrotraumatizace tkáně a chronický zánět v organismu může být způsoben endogenními karcinogeny (ROS a RNS) a následkem psychoemočního stresu

[46,47], který představuje u člověka jiný typ karcinogeneze – tzv. psychogenní karcinogenezi [77]. Po shrnutí těchto skutečností lze říci, že mnohonásobné a dlouhotrvající mikro-poškození tkáně v kombinaci s nerovnováhou vegetativního nervového systému vede k permanentnímu udržování proliferace buněk se systematickou inhibicí protinádorové imunity. Tyto patologické podmínky v organismu přispívají k výskytu, vývoji a generalizaci neoplazmat [66].

Nádorové buňky způsobují celou řadu patofyziologických procesů v organismu – zánět (buňky produkují prozánětlivé cytokiny, růstové faktory a další látky) [74], dochází k poruše imunitního systému (negativně jsou ovlivněny funkce a působení NK buněk, lymfocytů, makrofágů, je ovlivněn výskyt T-regulačních buněk, vzniká nerovnováha Th1/Th2 a další nežádoucí procesy) [78]. Nastává únik nádorových buněk před imunitním systémem [79,80] a neustálá tvorba nádorových buněk pod vlivem autokrinní a parakrinní stimulace buněčného dělení [81]. Dalšími významnými faktory tohoto procesu jsou angiogeneze (produkce růstových faktorů cévními buňkami, endoteliální buněčná proliferace aj.) [82], oxidační stres (produkce ROS a RNS) [82–84] a procesy metastázy (šíření nádorových buněk do okolních tkání nebo orgánů, které je podporováno produkcí invazních faktorů, protože nastává zhoršení mezibuněčných interakcí) [85]. Za uzavření tohoto procesu lze pokládat zjištění, že metastázy u solidních tumorů představují hlavní příčinu morbiditu a mortality nádorových onemocnění [86]; v případě krevní složky je situace poněkud odlišná – vytváří se extrémní nerovnováha mezi buňkami zdravými a patologickými, snižuje se významně imunita a krevní složka přestává plnit svoji funkci [87].

### **3.2.2 Současná terapie nádorových onemocnění**

Podle protokolů současné medicíny pro terapii nádorových onemocnění (guidelines) představují radioterapie, chirurgické zákroky a chemoterapie hlavní terapeutické přístupy. I přes značné pokroky ve znalostech a terapii těchto chorob je největší úskalím v klinické praxi výskyt lékové rezistence, zvláště MDR. Bohužel, tento fenomén se u nádorových buněk objevuje velmi často a je zodpovědný za snížení účinnosti klinicky používaných chemoterapeutik [88]. O MDR se hovoří, když se nádorové buňky stanou rezistentními k rozdílně působícím nebo strukturně odlišným chemoterapeutikům, dokonce i když u pacienta nedošlo k expozici daného léčiva [89]. Nadměrná exprese P-gp je velmi dobře známým mechanismem vzniku MDR. P-gp působí jako efluxní pumpa redukující intracelulární koncentrace chemoterapeutik. Mezi další běžné mechanismy rezistence nádorových



buněk patří zvýšená regulace vnímání poškození DNA a reparační kapacita buněk [90,91], vyvolání zástavy buněčného cyklu, které je následováno časovým úsekem pro obnovu poškozené DNA [92,93] a defekty v kaskádě signalizace apoptózy [94]. Je proto zřejmé, že častá komplikovanost terapie nádorových chorob vede k hledání nových a účinnějších léčiv i terapeutických cílů.

Terapeutická schémata musí vzít také v úvahu, o jaký typ nádoru jde: zda se jedná o solidní tumory (pevné nádory, které metastazují, vaskularizují a dále rostou) nebo nádory krevní tkáně, které ve vlastním slova smyslu nemetastazují. Některá antineoplastika je možné použít u obou strukturních typů neoplazmat, ale existují zde i specifické přístupy.

Mezi chemoterapeutiky (alkylačními sloučeninami, antimetabolity, antibiotiky, hormony a ostatními typy) našly uplatnění také alkaloidy přírodního původu: vinkristin [95], vinblastin [96], kamptotecin [97], případně jejich polosyntetické deriváty vinorelbin, vindesin a omacetaxin-mepesukcinát (derivát alkaloidu homoharringtoninu izolovaný ze stromu *Cephalotaxus harringtonii* (Knight ex J.Forbes) K.Koch), které jsou používány pro léčbu různých typů nádorů [95,98,99]. Tato alkaloidní cytostatika přírodního původu významně snížila za posledních 20 let úmrtnost pacientů na nádorová onemocnění.

Onkologická onemocnění jsou složitá a zahrnují komplexní faktory a z těchto důvodů je potřebné hledat kromě cytostatik nové možnosti terapeutických strategií, např. terapii cytokiny, použití upravených buněk, u solidních tumorů zajistit blokování angiogeneze v rostoucích metastázách a využívat principů genové terapie – biologické léčby – ovlivnění exprese genů spouštějících apoptózu, zaměření na onkogeny, cílené tlumení nádorů zprostředkované aplikací RNA k „umlčování genů“ (siRNAs) a další. Velký význam mají genetické screeningové sekvenční metody, aplikace magnetické a tepelné terapie (lokalizované a přesné), imunoterapie, virová a nanočásticová terapie, inovace v radiometrii, zobrazování a další [66,100,101]. Mezi perspektivní potenciální terapeutické ovlivnění nádorových onemocnění lze zařadit i použití antioxidační terapie (použití přírodních antioxidantů samotných [102–104] nebo v kombinaci s chemoterapií [105]), inhibici enzymů aldo-keto reductas, které hrají výraznou roli v karcinogenezi nebo v aktivaci prokarcinogenů aj. [106,107].

### **3.2.3 Alkaloidy potenciálně využitelné v terapii nádorových onemocnění**

Intenzivní zkoumání sloučenin přírodního původu včetně alkaloidů představuje cenný zdroj potenciálních léčiv a vůdčích struktur pro vývoj nových chemoterapeutik. Kromě

výše uvedených alkaloidů úspěšně používaných v klinické praxi, jsou v současnosti zkoumány alkaloidy různých strukturních typů, včetně isochinolinových, z nichž některé se nacházejí v preklinických fázích testování a část z nich se dostala do klinických studií [98,108,109]. Níže jsou uvedeni vybraní zástupci alkaloidů jako potenciální léčiva pro terapii těchto chorob.

Berberin, protoberberinový alkaloid, vykazoval v preklinických studiích antineoplastickou aktivitu vůči četným nádorovým liniím. V současnosti probíhá randomizovaná, dvojité zaslepená a placebem kontrolovaná klinická studie ( fáze II/III), která má určit účinnost této látky v prevenci relapsu kolorektálního adenokarcimu u 1000 pacientů, u kterých bylo toto onemocnění diagnostikováno a léčeno [98].

Pankratistatin, alkaloid pankratistatinového strukturního typu, působil cytotoxicky vůči leukemickým buňkám a proti řadě dalších typů nádorů. Jeho výhodou je vysoká selektivita vůči nádorovým buňkám. Alkaloid indukoval apoptózu v nádorových buňkách poklesem mitochondriálního membránového potenciálu a nezpůsobil zlomy ve vláknech DNA [108]. Další výhodou jeho cytotoxického účinku je zlepšení autofagie v nádorových buňkách [110]. V současnosti se pankratistatin nachází v klinickém testování [111].

U narciklasinu, rovněž pankratistatinového strukturního typu, byla nalezena v testech *in vitro/in vivo* výrazná cytotoxická/antitumorová aktivita, navozená různými mechanismy (indukcí apoptózy, tvorbou komplexů s DNA, inhibicí peptidyltransferasy v ribozomální podjednotce 60S a některými dalšími procesy) [112]. Látka byla postoupena klinickému testování [111].

Lykorin, lykorinový typ, patří k nejznámějším a nejvíce prozkoumaným sloučeninám s cytotoxickou aktivitou z alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Bylo u něj zjištěno, že selektivně inhibuje proliferaci lidských nádorových buněk SK-BR-3, SK-OV-3 a Hey1B, indukuje apoptózu u vybraných nádorových linií (např. HepG2, K562, U937 a HL-60) a vykazuje cytotoxickou aktivitu vůči velkému spektru nádorových linií. Látka se stala předlohou strukturou pro přípravu derivátů s výraznou cytotoxickou aktivitou [19,112,113].

Matrin, chinolizidinový alkaloid, vykazuje slibné biologické účinky k potenciálnímu využití v terapii nádorových onemocnění – inhibuje proliferaci, tvorbu metastáz a rozsev nádorových buněk, zastavuje buněčný cyklus a indukuje apoptózu. Dále u něj bylo zjištěno, že alkaloid působí na nádorové buňky rezistentní vůči antineoplastikům a snižuje toxicitu používaných chemoterapeutik. Sloučenina vykazuje i další biologické aktivity využitelné v terapii jiných onemocnění [114].

Tetrandrin, bisbenzylisochinolinový alkaloid, vykazuje široké antitumorové účinky vůči různým typům nádorů. Inhibuje proliferaci nádorových buněk a indukuje apoptózu [19]. V pokusech *in vitro/in vivo* je silně cytotoxicky/antitumorově aktivní a synergizuje účinek některých současně podávaných antineoplastik [115,116].

Chelidonin, terciární benzofenanthridinový alkaloid, vykazuje velice slibné účinky jako potenciální léčivo u nádorů, u nichž se projevuje MDR. Chelidonin inhibuje P-gp a rezistenci nádorových buněčných linií vůči doxorubicinu, indukuje apoptózu, inhibuje CYP3A4 a GST. Alkaloid synergizuje cytotoxický účinek dalších chemoterapeutik [19,117].

Noskapiin, ftalidisochoinolinový alkaloid, inhibuje progresi různých nádorových buněk a indukuje v nich apoptózu. Mechanismus působení je založen na zastavení dělení buněk v metafázi – váže se na tubulin v jiném místě než paklitaxel, tudíž lze tento alkaloid potenciálně použít u paklitaxel-rezistentních nádorů. U alkaloidu bylo zjištěno, že může ovlivnit nádorovou rezistenci a zesilovat účinek dalších chemoterapeutik (např. vinkristinu, doxorubicinu). Jeho velkou výhodou je fakt, že se už delší dobu klinicky používá jako antitusikum, které vykazuje velice nízkou toxicitu. Velice slibné antineoplastické účinky vykazují i jeho deriváty [118,119].

Spektrum nových potenciálních perspektivních cytotoxicky/antitumorově působících alkaloidů je mnohem širší, o čemž svědčí i celá řada přehledových článků např. [19,98,108-110].

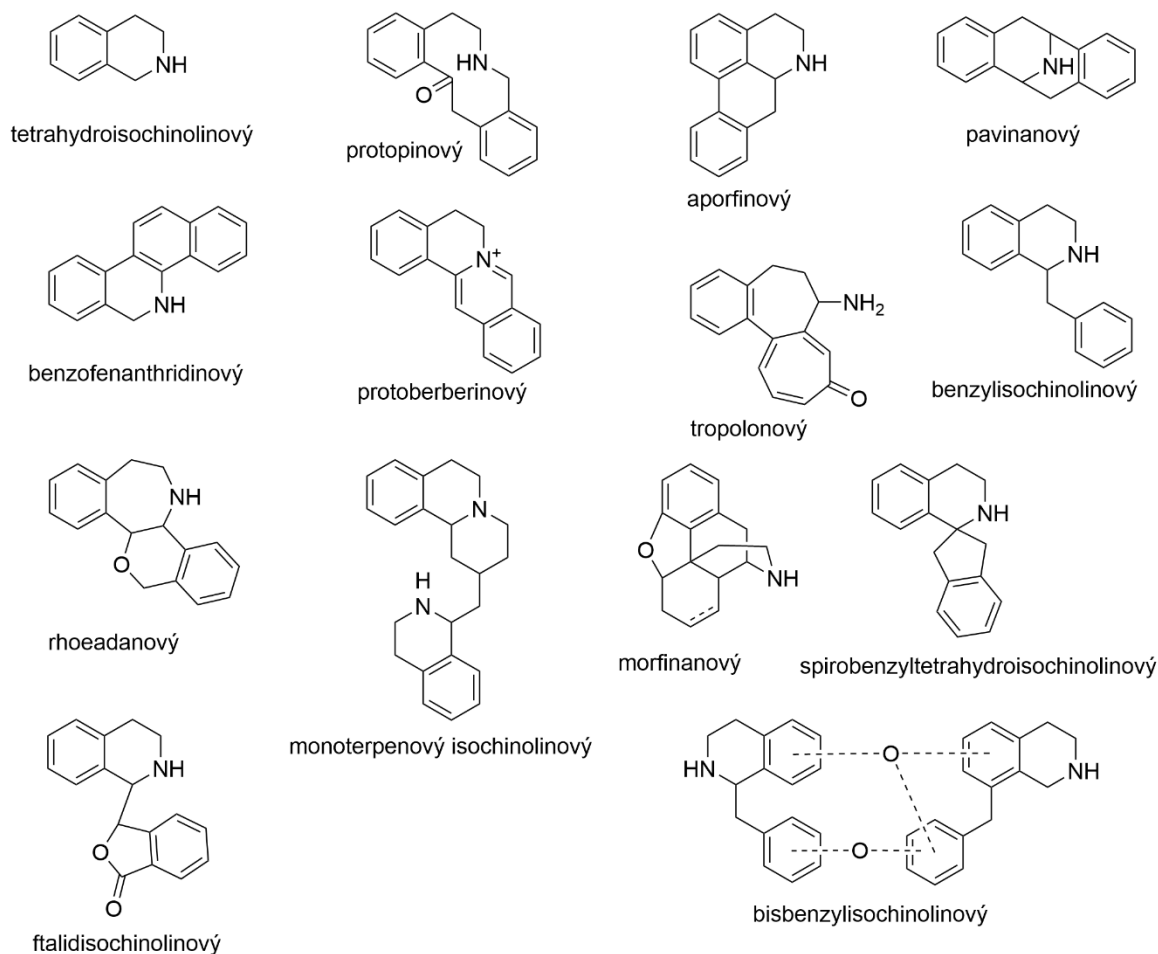
## 4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA ISOCHINOLINOVÝCH ALKALOIDŮ A ALKALOIDŮ ČELEDI AMARYLLIDACEAE

Isochinolinové alkaloidy (IA) a amarylkovité alkaloidy (AA) představují v přírodě jednu z nejširších skupin alkaloidů s významnými biologickými účinky a při jejich studiu lze vycházet z mnoha chemických struktur. IA jsou v rostlinách poměrně široce rozšířeny – jsou charakteristickými sekundárními metabolity v čeledích řádů Ranunculales (Papaveraceae, Ranunculaceae, Menispermaceae a Berberidaceae), Laurales (Lauraceae a Monimiaceae), Magnoliales (Magnoliaceae a Annonaceae), Liliales (Colchicaceae), Sapindales (Rutaceae), a Caryophyllales (Cactaceae), sporadicky se vyskytují např. v čeledích Rubiaceae a Fabaceae [120,121]. Naopak, výskyt AA je výrazně úzký, tyto alkaloidy jsou přítomny jen v čeledi Amaryllidaceae, zejména v rodech *Galanthus* L., *Lycoris* Herb., *Amaryllis* L., *Lecojum* L., *Boophone* Herb., *Haemanthus* L., *Hippeastrum* Herb., *Hymenocallis* Salisb., *Chlidanthus* Herb., *Clivia* Lindl., *Zephyranthes* Herb., *Nerine* Herb., a dalších [13,17,18,122–126].

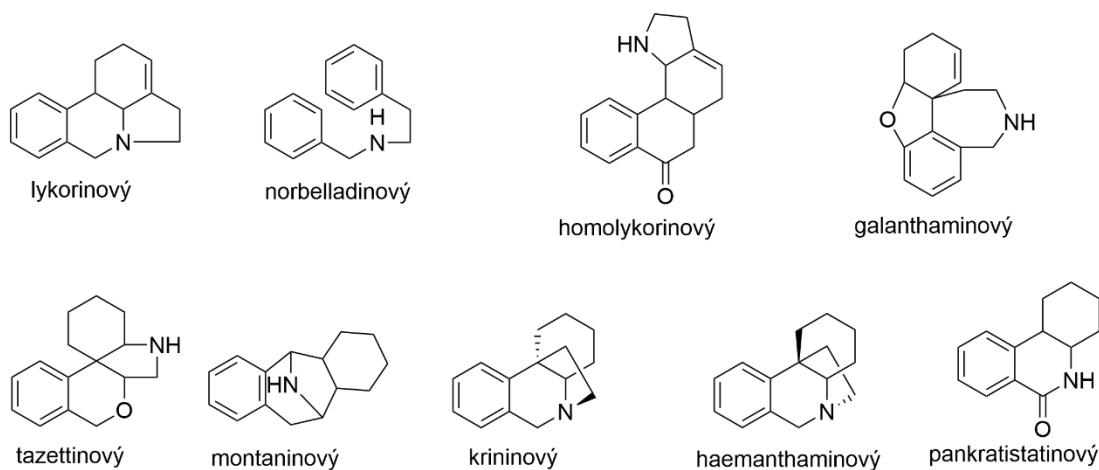
Je nutné připomenout, že oba typy alkaloidů spolu úzce souvisejí, obecně jsou řazeny mezi isochinolinové alkaloidy, protože vycházejí biogeneticky z L-fenylalaninu a L-tyrosinu [120]. Nicméně mnozí autoři zařazují AA do samostatné skupiny, protože vznikají z výše uvedených aminokyselin specifickou biosyntézou, tzv. norbelladinovou cestou [127]. Vzácně mohou být AA syntetizovány i jinou biosyntetickou cestou jak je vidět u alkaloidů mesembranového typu, které jsou hojně zastoupené v rodu *Sceletium* (L.) N.E. Brown (Aizoaceae) [122]. Nejdůležitější strukturní typy IA a AA jsou uvedeny níže (Obr. 3) [112,120,122].

Biologické účinky obou typů alkaloidů mají určité odlišnosti, ale některé účinky jsou velmi blízké. Je to dáno počtem zástupců, resp. strukturou alkaloidních typů. U IA byla zjištěná aktivita analgetická, cytotoxická, antibakteriální, antifungální, antiflogistická, spasmolytická, antimitotická, cholagogní, sympatomimetická, antihypertenzní, halucinogenní a antitusická, dále je známa inhibice MAO, AChE a BChE a další [14,120,16,128]. Mezi hlavní biologické účinky AA patří inhibice AChE a BChE a protinádorová aktivita, dále antivirotická, antifungální, antibakteriální, analgetická, antiflogistická a antimalarická aktivita aj [112,122]. Přehled hlavních a významných IA a AA, společně s biologickými účinky a jejich praktickou využitelností jsou uvedeny v Tab. 1.

## IA



## AA



Obr. 3 Základní skelety hlavních strukturálních typů IA a AA; upraveno [112,120].

V rámci tohoto přehledu je nutné uvést poznámku k uvedeným základním typům IA a AA. Mezi IA jsou obvykle řazeny i tropolonové alkaloidy např. kolchicin, jehož biosyntéza vychází z L-fenylalaninu a L-tyrosinu, z kterých vzniká v několika krocích intermediát

*O*-methylandrocymbin s isochinolinovým skeletem, který dalšími reakcemi přechází na kolchicin [129].

**Tab. 1** Přehled významných IA a AA, jejich biologické účinky a využití.

| Alkaloid     | Biologický účinek   | Praktické použití  |
|--------------|---|--|
| berbamin     | cytotoxický [130], imunosupresivní [131], protizánětlivý [132] a antihypertenzní [133]  | potenciální antineoplastikum [119]; terapie psoriázy [134]   |
| berberin     | antibakteriální ( <i>in vitro Staphylococcus, Streptococcus, Salmonella, Proteus, Vibrio</i> aj.), fungicidní, antiprotozoální ( <i>Leshmania, Plasmodium</i> ) [120], inhibice AChE, BChE [128] a MAO [61]; cytotoxický, antiflogistický, antihyperlipidemický, antidiabetický (diabetes mellitus typ 2) aj. [135,136] | potenciální léčivo u AD [61] a dalších nemocí [136]  |
| boldin       | choleretický [120]; hepatoprotektivní, protizánětlivý [137], antiprotozoální efekt a cytotoxický [138], antioxidantní a antiradikálový [140]  | cholagogum [120]; potenciálně využitelný externě v dermatologii, při léčbě mozkové, srdeční a enteropatické ischemie a chorob souvisejících s metabolickým syndromem [140] |
| galanthamin  | selektivní, reversibilní, kompetitivní inhibitor AChE; alosterický modulátor nikotinových receptorů [140]   | terapie AD [141]   |
| glaucin      | antitumorový [142]; antiprotozoální, antiagregační [143], antibakteriální ( <i>Helicobacter pylori</i> ), antioxidantní a scavengerový [140]  | antitusikum [144]  |
| haemanthamin | antiproliferační a cytotoxický, antiprotozoální ( <i>Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei rhodesiense, T. cruzi, Entamoeba histolytica, Leshmania donovani</i> ) [146]   | potenciální antineoplastikum a antiprotozoikum [146]   |
| chelerythrin | antitumorový [146], antibakteriální (zabránění tvorby biofilmu <i>S. aureus, S. epidermidis</i> ) [147,148], protizánětlivý ( <i>p.o.</i> aplikace) [149]   | potenciální antineoplastikum [150]   |
| kodein       | analgetický, antitusický [120]  | antitusikum [120]  |
| kolchicin    | cytotoxický, protizánětlivý, ovlivnění hyperurikemie (dny) [120];   | dříve antiuratum, centrálně působící myorelaxans (derivát thiokolchikosid) [95]  |

**Tab. 1 Přehled významných IA a AA, jejich biologické účinky a využití (pokračování).**

| Alkaloid         | Biologický účinek  | Praktické použití  |
|------------------|--|--|
| lykorin          | cytotoxický, antivirotický (poliovirus, virus pravých neštovic a SARS-asociovaný koronavirus), antifungální ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ), antiprotozoální ( <i>Trypanosoma brucei</i> ) [112]   | dříve jako potenciální antineoplastikum [113]  |
| morfin           | analgetický (agonista opioidních $\mu$ receptorů), euforický (vznik psychické a somatické závislosti), útlum dechového centra, zvýšení tonu hladkého svalstva GIT, svalstva urogenitálního traktu, snížení tonu dělohy aj. [95]  | anodynum [95]  |
| narciklasin      | cytotoxický (indukce apoptózy, tvorba komplexů s DNA, inhibice peptidyltransferasy v ribozomální podjednotce 60S), baktericidní ( <i>Corynebacterium fascians</i> ), antifungální ( <i>Candida albicans</i> ) a antivirotický (RNA viry hemoragické horečky reprezentované flaviviry a bunyaviry) [112]  | potenciální antineoplastikum [112]   |
| noskapin         | antitusický (slabší než kodein, působí centrálním mechanismem, nikoliv přes klasické opioidní receptory) a slabý bronchodilatační, [120]; antitumorový [119,151]   | antitusikum [120], potenciální antineoplastikum [119,151]                                |
| pankratistatin   | významný cytotoxický (leukemické buňky), rovněž účinný proti celé řadě dalších typů nádorů [112]   | potenciální antineoplastikum [112]   |
| papaverin        | spasmolytický na hladké svalstvo [95]; selektivní inhibitor PDE-10 (protizánětlivá a neuroprotektivní aktivita) [152]  | spasmolytikum [95]   |
| protopin         | spasmolytický, antivirotický, antiprotozoální ( <i>L. donovani</i> , <i>P. flaciparum</i> ); nematocidní ( <i>Strongyloides ratti</i> , <i>S. venezuelensis</i> ); chemoprotektivní a antioxidantní (hepatoprotektivní, antioxidantní – snížení peroxidace lipidů a poškození buněk), antiagregační, neuroprotektivní, protizánětlivý, cytotoxický [153] | spasmolytikum hladkého svalstva GIT [120]; nematocidum (živočišná výroba) [154]          |
| sanguinarin      | antitumorový, protizánětlivý ( <i>p.o.</i> ) [146,149], antibakteriální (methicilin rezistentní <i>S. aureus</i> ) [155]   | potenciální adjuvantní antineoplastikum [146], dříve v přípravcích k ústní hygieně [149] |
| tetrahydropalmin | analgetický, sedativní, a anxiolytický [120]   | v TČM jako analgetikum ( <i>Corydalis turtshaninovi</i> Besser) [120]                    |

**Tab. 1 Přehled významných IA a AA, jejich biologické účinky a využití (pokračování).**

| Alkaloid   | Biologický účinek   | Praktické použití   |
|------------|---|---|
| tetrandrin | antihypertenzní a koronárně vazodilatační (blokátor Ca <sup>2+</sup> kanálů) [120], antiprotozoální [156], antineoplastický, protizánětlivý a imunosupresivní [131] | potenciální antineoplastikum [157], antihypertenzivum [158] a antimalarikum [156] |
| thebain    | analgetický a narkotický [120], stimulační a konvulzivní aktivita na CNS (antagonista glycinových receptorů) [159], způsobuje kongenitální malformace [160]         | prekurzor pro syntézu morfinu [161]   |

#### 4.1 Studované taxony

V rámci výzkumné činnosti skupiny ADINACO, zabývající se isochinolinovými alkaloidy *s.l.*, spočívalo moje zaměření v izolaci alkaloidů a studiu jejich biologické aktivity u vybraných taxonů z čeledi Papaveraceae: *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte [12,16,162,163], *Fumaria officinalis* L. [164], *Eschscholzia californica* Cham. [165], *Argemone platyceras* Link & Otto [166]; Monimiaceae: *Peumus boldus* Molina [167]; a Amaryllidaceae: *Nerine bowdenii* W. Watson [123], *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master [18], *Narcissus* L. cv. Sir W. Churchill [168], *Narcissus poeticus* L. cv. Pink Parasol [17], *Chlidanthus fragrans* Herb. [125] a *Zephyrantes citrina* Baker [169].

#### 4.2 Cholinesterasová inhibiční aktivita alkaloidů

Hledání nových potenciálních inhibitorů AChE a BChE z přírodních zdrojů je stále věnována značná pozornost, neboť spektrum používaných léčiv je úzké a navíc bylo zjištěno, že inhibitory cholinesteras vykazují i další neuroprotektivní účinky. Inhibice cholinesteras se měří nejčastěji Ellmanovou spektrofotometrickou metodou [170]. Porovnání inhibičních aktivit sloučenin uvedených v literatuře, které jsou nejčastěji vyjádřené jako hodnoty inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>), je velice nesnadné. Tato obtížnost je dána jinými podmínkami měření ve studiích (koncentrace substrátů, teplota měření, doba reakčního času) a zejména použitím různých zdrojů cholinesteras [171]. Nejčastěji jsou v testech používány *ee*AChE [172], *hr*AChE [12], *eg*AChE [16] nebo *el*AChE [166], jako zdroj BChE přichází v úvahu *h*BChE [16], *hr*BChE [173] nebo *eq*BChE [174]. Použití různých zdrojů enzymů vede u některých sloučenin k rozdílným hodnotám IC<sub>50</sub>, které se mohou významně lišit (v desítkách až stovkách μM) [153,166].



Obvykle nebývá v publikovaných pracích blíže definována cholinesterasová inhibiční aktivita sloučenin vyjádřená inhibiční konstantou ( $K_i$ ), případně konstantou podle Michaelise-Mentenové ( $K_m$ ), a tak porovnání získaných dat je spíše obrysovou záležitostí.

#### 4.2.1 Isochinolinové alkaloidy

Taxony *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte, *Fumaria officinalis* L., *Eschscholzia californica* Cham., *Argemone platyceras* Link & Otto a *Peumus boldus* Molina obsahující jako hlavní sekundární metabolity IA, byly vybrány ke studiu inhibiční aktivit alkaloidů vůči lidským cholinesterasám (*hAChE*, *hBChE*) na základě obvyklého postupu v pracovní skupině ADINACO: po provedení literární rešerše byly z vybraných taxonů připraveny alkaloidní extrakty, které byly podrobeny screeningu na inhibiční aktivitu vůči *hAChE* a *hBChE* za použití modifikované Ellmanovy metody a referenčních sloučenin (galanthaminu, huperzinu A a fysostigminu) s provedením kvantifikace biologické aktivity těchto extraktů [123,168,175]. Dříve používaná bioautografická metoda pro screening cholinesterasové inhibiční aktivity na TLC kvantifikaci neumožňovala [176]. Současně byla u alkaloidních extraktů provedena GC-MS analýza pro predikci přítomnosti alkaloidů v extraktech např. [168,175]. Z výše uvedených studovaných taxonů vykazujících zajímavou inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám (s hodnotami  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ ; Tab. 2), byly izolovány alkaloidy různých strukturních typů a byla stanovena jejich inhibiční aktivita vůči *hAChE* a *hBChE*.

**Tab. 2 Inhibiční aktivita alkaloidních extraktů ze studovaných taxonů vůči *hAChE* a *hBChE***

| Dokončené studie taxonů                      | $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )    |                               | Cit.  |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|-------|
|  | <i>hAChE</i> ( $\mu\text{g/ml}$ ) | <i>hBChE</i>                  |       |
| <i>Corydalis cava</i> (L.) Schweigg. & Körte | $91,5 \pm 4,6$                    | $26,5 \pm 1,4$                | [171] |
| <i>Fumaria officinalis</i> L.                | $39,2 \pm 2,0$                    | $40,3 \pm 1,1$                | [164] |
| <i>Eschscholzia californica</i> Cham.        | - <sup>a</sup>                    | - <sup>a</sup>                | [177] |
| <i>Argemone platyceras</i> Link & Otto       | $15,7 \pm 2,9$                    | $25,5 \pm 1,8$                | [166] |
| <i>Peumus boldus</i> Molina                  | $69,7 \pm 11,2$                   | $46,9 \pm 7,1$                | [167] |
| galanthamin <sup>b</sup>                     | $0,49 \pm 0,02$                   | $12,2 \pm 0,4$                | [166] |
| huperzin A <sup>b</sup>                      | $8,0 \pm 0,24 \times 10^{-3}$     | >242                          | [166] |
| fysostigmin <sup>b</sup>                     | $17,3 \pm 0,28 \times 10^{-3}$    | $35,8 \pm 1,1 \times 10^{-3}$ | [166] |

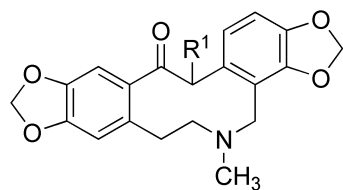
<sup>a</sup> aktivita extraktu byla sledována autobiografickou metodou na TLC bez kvantitativního vyjádření; <sup>b</sup> referenční sloučenina

Na základě literárních údajů byla cholinesterasová inhibiční aktivita isochinolinových alkaloidů prokázána u těchto strukturních typů: jednoduché isochinoliny, protoberberiny, protopiny, pavinany, (pro)aporfíny, benzofenanthridiny, benzyloisochinoliny a bisbenzyloisochinoliny [14,54,128,153,165,178–183].

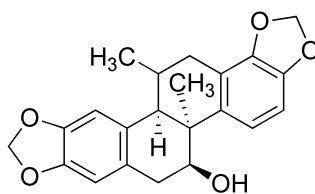
#### 4.2.1.1 Protoberberinové alkaloidy

Vzhledem ke kladnému náboji na atomu dusíku, planaritě a rigiditě molekul jsou *in vitro* kvarterní protoberberinové alkaloidy silnými inhibitory cholinesteras s aktivitou lepší než jejich terciární analoga (berberin, Obr. 4; palmatin, koptisin, epiberberin) [128,184], na které byly studie pracovní skupiny ADINACO zaměřeny. Je zde ovšem dosud ne zcela vyřešený problém, týkající se přechodu kvartérních alkaloidů přes HEB, který bude v případě těchto alkaloidů určitě obtížnější než u terciárních bazí [185]. Pro terciární i kvarterní protoberberinové alkaloidy je typické, že výrazněji inhibují AChE než BChE [128]. Tato selektivita vůči AChE koreluje s výsledky izolovaných terciárních alkaloidů ze studovaných taxonů, které lze z hlediska inhibice *h*BChE pokládat za neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) [16,163,164], vůči *h*AChE byla zjištěna výrazná inhibice u (+)-thaliktrikavinu, (+)-kanadinu a (+)-korydalinu (Obr. 4) [12,16]. Při stanovení selektivity a typu inhibice (+)-kanadinu a (+)-thaliktrikavinu vůči *hr*AChE byly pro oba alkaloidy vypočteny hodnoty  $IC_{50}$  a  $K_i$  ve stovkách nM: (+)-kanadin vykazoval hodnoty  $IC_{50} = 0,70 \pm 0,07 \mu M$  a  $K_i = 128,9 \pm 44,0 \text{ nM}$ , zatímco (+)-thaliktrikavin měl stanovené hodnoty  $IC_{50} = 0,38 \pm 0,05 \mu M$  a  $K_i = 174,3 \pm 56,9 \text{ nM}$ . Ze zjištěných dat se ukázalo, že oba alkaloidy jsou silnými a selektivními kompetitivními inhibitory *h*AChE s podobnou aktivitou jako galanthamin a na základě predikce mají schopnost procházet pasivní difuzí přes HEB [12]. Následně provedená *in silico* výpočetní studie ukázala, že (+)-kanadin a (+)-thaliktrikavin se váží do aktivního centra *h*AChE na stejnou podjednotku jako se váže ACh (Obr. 5) [12].

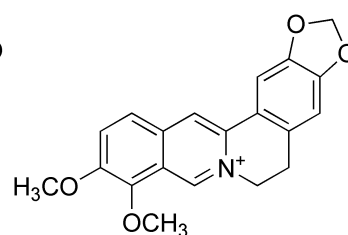
Ze vztahu struktura-účinek vyplývá, že pro zachování signifikantní inhibice AChE je zásadní, aby protoberberinové alkaloidy obsahovaly v pozici C-2 a C-3 methylenedioxykupinu, její otevření vede následně k poklesu aktivity [12,16,128]. Přítomnost methylové skupiny v poloze C-13 naopak mírně zvyšuje inhibiční aktivitu [12]. V případě terciárních derivátů je zároveň nutné pro zachování inhibice AChE skutečnost, že se musí jednat o (+)-isomery: např. (–)-kanadin, izolovaný z *Hydrastis canadensis* L., byl shledán vůči AChE jako neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) [186].



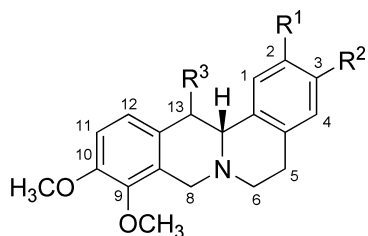
$R^1 = -CH_3$  ( $\pm$ )-korykavidin  
 $R^1 = -H$  protopin



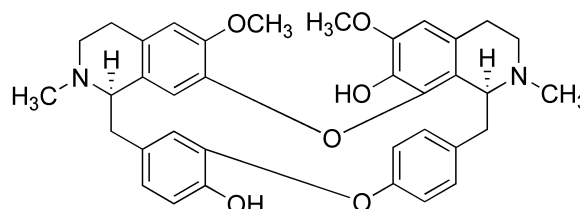
(+)-korynolin



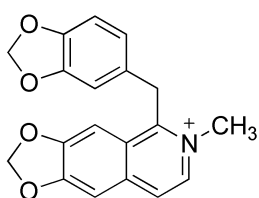
berberin



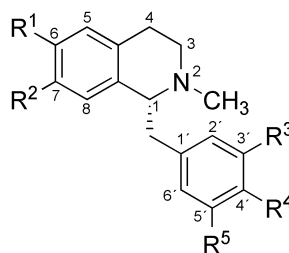
(+)-thaliktrikavin  $R^1 + R^2 = -O-CH_2-O-$ ;  $R^3 = \dots\dots\dots CH_3$   
 (+)-korydalin  $R^1 = R^2 = -OCH_3$ ;  $R^3 = \dots\dots\dots CH_3$   
 (+)-kanadin  $R^1 + R^2 = -O-CH_2-O-$ ;  $R^3 = -H$



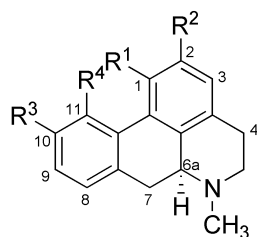
(+)-aromolin



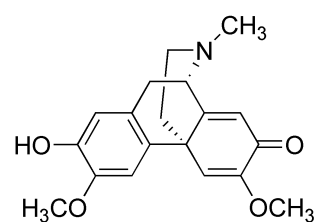
escholamin



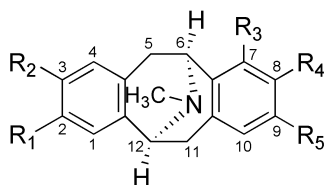
(+)-retikulin  $R^1 = R^4 = -OCH_3$ ;  $R^2 = R^3 = -OH$ ;  $R^5 = -H$   
 (+)-methylkoklaurin  $R^1 = -OCH_3$ ;  $R^2 = R^4 = -OH$ ;  $R^3 = R^5 = -H$   
 (+)-kanadalin  $R^1 + R^2 = -O-CH_2-O-$ ;  $R^3 = R^4 = -OCH_3$ ;  $R^5 = -CHO$   
 (+)-1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)-2-methyl-6,7-methylenedioxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin  $R^1 + R^2 = -O-CH_2-O-$ ;  $R^3 = -OH$ ;  $R^4 = -OCH_3$



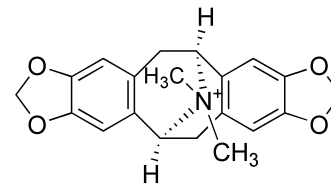
(+)-bulbokapnin  $R^1 + R^2 = -OCH_2O-$ ;  $R^3 = -OCH_3$ ;  $R^4 = -OH$   
 (+)-korydin  $R^1 = -OH$ ;  $R^2 = -OCH_3$ ;  $R^3 = R^4 = -OCH_3$ ;



(-)-pallidin



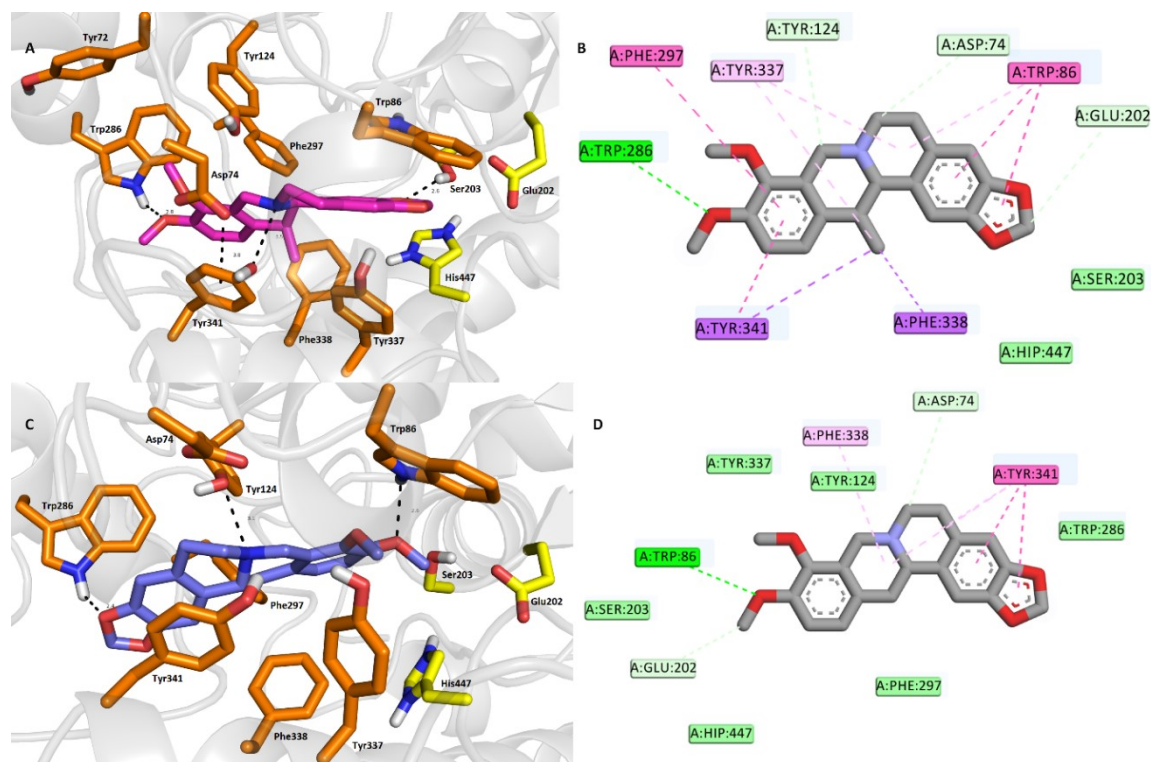
(-)-munitagin  $R^1 = R^3 = -OH$ ;  $R^2 = R^4 = -OCH_3$ ;  $R^5 = -H$   
 (-)-karyachin  $R^1 + R^2 = -OCH_2O-$ ;  $R^3 = -H$ ;  $R^4 = -OCH_3$ ;  $R^5 = -OH$



(-)-kalifornidin

Obr. 4 Vybrané IA s inhibiční aktivitou vůči cholinesterasám ( $IC_{50} < 100 \mu M$ ).

Závěrem je možné konstatovat, že (+)-kanadin a (+)-thaliktrikavin se jeví jako perspektivní látky pro další studium, které vykazují minimální akutní toxicitu a také byly shledány jako cytotoxicky neaktivní vůči vybraným buněčným nádorovým liniím [187,188].



Obr. 5 Docking (+)-thaliktrikavinu (A, B) a (+)-kanadinu (C, D) v aktivním místě *hAChE* [12].

#### 4.2.1.2 Aporfinové alkaloidy

Aporfinové alkaloidy představují do určité míry široce probádanou skupinu IA, mezi kterými byly nalezeny sloučeniny s výraznou inhibiční aktivitou vůči cholinesterasám (epigamin, dehydrodecentrin, roemerin, dicentrin, liriodenin aj.) [179,189–192]. Z výsledků našich studií vyplynulo, že aporfinové alkaloidy izolované z *Corydalis cava* (L.) Scheigg. & Koerte a *P. boldus* Mol. byly shledány z hlediska inhibice *hAChE* jako neperspektivní pro další studium ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) [167]. *hBChE* byla inhibována pouze (+)-bulbokapninem (Obr. 4), který vykazoval středně silnou aktivitu s hodnotami  $IC_{50} = 67,0 \pm 2,1 \mu M$  [16]. Tento alkaloid nepředstavuje potenciální látku pro vývoj selektivního silného inhibitoru *hBChE*, zvláště když je řazen mezi toxické sloučeniny (navozuje katatonii) [193].

Při porovnání výsledků inhibice cholinesteras působením aporfinových alkaloidů izolovaných v pracovní skupině ADINACO, lze nalézt u alkaloidu (+)-boldinu shodu s literaturou [194,195]. V případě cholinesterasových aktivit (+)-bulbokapninu a (+)-korydinu (Obr. 4), uvádí Adersen a spol., že (+)-bulbokapnin inhiboval AChE i BChE ( $IC_{50} \text{ eeAChE}$

=  $40 \pm 2 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50} \text{ eqBChE} = 83 \pm 3\text{M}$ ), zatímco (+)-korydin *eqBChE* ( $\text{IC}_{50} = 52 \pm 4 \mu\text{M}$ ) a vůči *eeAChE* byl neaktivní ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) [181]. V této publikaci nebyly použity lidské cholinesterasy a z výsledků je znova patrné, že zdroj enzymů je jedním z faktorů, které hrají důležitou roli při stanovení cholinesterasové aktivity těchto alkaloidů.

Ze vztahu struktura-účinek je patrné, že pro zachování cholinesterasové inhibiční aktivity aporfinových alkaloidů je nezbytná přítomnost 5čtetného cyklu (bulbokapnin) [16], tvořeného methylenedioxykupinou v poloze C-1/C-2, případné otevření tohoto kruhu vede ke ztrátě aktivity (korydin, boldin, norisoboldin, *N*-methyllaurotetanin, laurotetanin) [16,167]. Tyto poznatky z pracovní skupiny ADINACO korelují s daty publikovanými ve studii Donga a spol. [179], kteří udávají, že silnými inhibitory jsou aporfinové alkaloidy, které mají ve struktuře navíc přítomnou dvojnou vazbu v poloze C-6a a C-7. Zvýšení cholinesterasové inhibiční aktivity u aporfinových alkaloidů zvyšuje přítomnost kvarterního dusíku [128].

#### 4.2.1.3 *Pavinanové alkaloidy*

Z hlediska inhibice AChE a BChE představují pavinanové alkaloidy skupinu velice málo studovaných IA. Mimo studií z našeho pracoviště byla publikována jen jedna práce (Stejskal a spol.) před 35 roky [180]. Mezi pavinanovými alkaloidy byly ve studiích skupiny ADINACO izolovány 3 alkaloidy s inhibiční *hAChE* aktivitou: (–)-kalifornidin ( $\text{IC}_{50} = 36,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ), (–)-karyachin ( $\text{IC}_{50} = 19,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ) a (–)-munitagin ( $\text{IC}_{50} = 62,3 \pm 5,8 \mu\text{M}$ ; Obr. 4), ostatní alkaloidy byly vůči *hAChE* shledány jako neaktivní ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ).

Z našich studií také vyplynulo, že izolované pavinanové alkaloidy nevykazovaly významnou inhibiční aktivitu *hBChE* ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). V uvedené publikaci Stejskala a kol. bylo popsáno, že pavinanové alkaloidy jsou jen slabými inhibitory cholinesteras. Nicméně, ze vztahu struktura-účinek vyplývá, že nejsilnější inhibice byla dosažena, jestliže na pavinanovém skeletu byla v poloze C-2/C-3 methylenedioxykupina (kalifornidin, karyachin). Otevření 5čtetného kruhu v poloze C-2/C-3 vedlo k poklesu inhibiční aktivity a bylo prokázáno, že přítomnost kvarterního dusíku inhibici *hAChE* nezvyšuje [165,166].

#### 4.2.1.4 *Benzyltetrahydroisochinolinové alkaloidy*

Alkaloidy tohoto strukturního typu představují zdroj potenciálně zajímavých iChEs (např. escholamin; Obr. 4) [171]. Velice slibných výsledků bylo dosaženo i v případě synteticky

připravených derivátů benzyltetrahydroisochinolinových alkaloidů [196,197]. Ve studiích provedených skupinou ADINACO byla detekována nezanedbatelná inhibiční aktivita alkaloidů tohoto strukturního typu vůči *hBChE* u (+)-retikulinu ( $IC_{50} = 33,6 \pm 3,0 \mu M$ ), (+)-methylkoklaurinu ( $IC_{50} = 15,0 \pm 1,4 \mu M$ ) [167] a (+)-1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)-2-methyl-6,7-methylendioxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolinu ( $IC_{50} = 27,8 \pm 0,4 \mu M$ ), nově izolovaného alkaloidu z *Eschscholzia californica* Cham. [165]. Vůči *hAChE* byly tyto alkaloidy neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Naopak (+)-kanadalin (Obr. 4), izolovaný z *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Koerte, vykazoval duální účinek na cholinesterasy: výrazněji inhiboval *hAChE* ( $IC_{50} hAChE = 20,1 \pm 1,1 \mu M$ ) než *hBChE* ( $IC_{50} = 85,2 \pm 2,2 \mu M$ ) [16]. Přestože studované alkaloidy vykazovaly zajímavou inhibiční cholinesterasovou aktivitu, nedosahovaly účinků srovnatelných se standardy (Tab. 2). Lze říci, že z hlediska inhibice cholinesteras nepředstavují tyto látky potenciální struktury pro další studium.

Ze vztahu struktura-účinek izolovaných sloučenin vyplývá, že pro zachování významné inhibice *hBChE* u C-6, C-7 substituovaných benzyltetrahydroisochinolinových alkaloidů (+)-retikulinu, (+)-*N*-methylkoklaurinu a (+)-1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)-2-methyl-6,7-methylendioxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolinu je nutné, aby v poloze C-3' nebo C-4' na benzylovém substituentu byla přítomna hydroxylová skupina. V případě přítomnosti pouze methoxyskupin inhibiční aktivita vůči *hBChE* výrazně klesá, jak bylo zjištěno např. u (+)-kanadalinu [16] nebo (+)-laudanosu izolovaného z *Argemone platyceras* Link & Otto [166]). Pro vystupňování inhibiční aktivity vůči *hAChE* je nezbytná přítomnost methyldioxyskupiny v poloze C-6/C-7 na isochinolinovém skeletu, společně s přítomností methoxyskupin v poloze C-3' a C-4' (Obr. 4).

Inhibiční *hAChE* aktivita (+)-kanadalinu ( $IC_{50} = 20 \mu M$ , [16]), který je někdy označován jako alkaloid sekoberberinového strukturního typu [198], nedosahovala intenzity inhibovat cholinesterasy v takové míře jako kvarterní protoberberinové alkaloidy. Důvodem je, že (+)-kanadalinu chybí planární, rigidní struktura [128].

#### 4.2.1.5 Další strukturní typy

Ze studovaných taxonů ve skupině ADINACO byly v dostatečném množství pro biologické testy izolovány alkaloidy i dalších strukturních typů: protopiny (allokryptopin, protopin, (±)-korykavidin, kryptopin a (-)-korykavamin), benzofenanthridinový alkaloid (+)-korynolin, morfinanové alkaloidy (-)-sinoakutin a (-)-pallidin, spirobenzylisochino-

liny (+)-fumaritin, (-)-fumarofycin, (+)-parfumin a ftalidisochinolinový alkaloid (+)-bikukulin [164,165,167]. Z výše uvedených alkaloidů vykazoval inhibiční cholinesterasovou aktivitu jen alkaloid (±)-korykavidin (Obr. 4) se střední intenzitou inhibice *hBChE* ( $IC_{50} = 46,2 \pm 2,4 \mu M$ ), vůči *hAChE* byl neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ; [16]). Lze tedy říci, že (±)-korykavidin se nejvíce jeví jako potenciálně perspektivní farmakofor pro další podrobnější výzkum z hlediska inhibice cholinesteras.

Srovnáme-li publikované výsledky skupiny ADINACO s údaji v literatuře, narazíme u několika uvedených alkaloidů na rozdílné údaje o aktivitě vůči cholinesterasám. U propin (Obr. 4) byla dříve publikována nezanedbatelná inhibice vůči *eeAChE* a *mcAChE* ( $IC_{50} \sim 16 \mu M$ ) [199,200]. Také u (+)-korynolinu byla zjištěna výrazná inhibiční aktivita vůči *mcAChE* (Obr. 4). Látka byla shledána nekompetitivním a reverzibilním inhibitorem ( $IC_{50} = 30,6 \mu M$ ) [183]. V roce 2019 byl publikován článek, ve kterém vykazoval (-)-pallidin (Obr. 4) středně silnou inhibici *eeAChE* ( $IC_{50} = 63,4 \mu M$ ) [201]. Opět je možné konstatovat, že nejvýznamnější roli při stanovení inhibičního potenciálu hraje zdroj použitého enzymu.

Bisbenzylisochinolinové alkaloidy nebyly v rámci mých studií izolovány, nicméně představují alkaloidy s významnou cholinesterasovou inhibiční aktivitou. [14,202,203]. Jako příklad lze uvést (+)-aromolin (Obr. 4), izolovaný z *Berberis vulgaris* L. Dr. Annou Hošťálkovou, který významně a selektivně inhiboval *hBChE* ( $IC_{50} = 0,8 \pm 0,1 \mu M$ ) [14].

#### 4.2.2 Alkaloidy amarylkovitých rostlin

Přestože by se mohlo zdát, že výzkum z pohledu izolací AA je už překonán (první významný inhibitor AChE a v současnosti terapeuticky užívaný alkaloid u AD – galanthamin byl izolován už v 50. letech z *Galanthus woronowii* Losinsk. [204]), opak je pravdou. Svědčí o tom četné publikace z posledních let nejen z našeho pracoviště, ale i ze zahraničí. Z amarylkovitých rostlin jsou stále izolovány nové sloučeniny [17,18,122,205–208], dochází k revizím struktur dříve publikovaných sloučenin [209] a jsou připravovány deriváty s výraznou biologickou aktivitou [146,210–212].

V rámci screeningu nových potenciálních inhibitorů cholinesteras byly ve skupině ADINACO testovány desítky alkaloidních extraktů z vybraných botanických druhů a pěstovaných odrůd rostlin z čeledi Amaryllidaceae [168,175,213,214]. Vybrané extrakty s výraznou inhibicí *hAChE* a *hBChE* jsou uvedeny níže (Tab. 3). Taxon *Nerine bowdenii* Wat-

son byl vybrán pro bližší studium biologických aktivit díky významnému obsahu krinanových alkaloidů [215], *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master a *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol byly selektovány na základě přítomnosti homolykorinových alkaloidů [168], které patří z hlediska izolace i biologických aktivit k málo probádané skupině AA. *Chlidanthus fragrans* Herb. byl vybrán pro izolační práci na základě GC-MS analýzy alkaloidního extraktu, která potvrdila přítomnost 15 alkaloidů patřících do 5 strukturních typů (byly detekovány galanthaminové, krinanové, belladinové, tazettinové a lykorinové alkaloidy). Taxon *Zephyrantes citrina* Baker byl vybrán pro bližší studium biologických aktivit na základě obsahu krinanových a lykorinových alkaloidů [216] a slibné cholinesterasové inhibiční aktivitě sumárního alkaloidního extraktu vůči hAChE a hBChE (Tab. 3).

**Tab. 3** Inhibiční aktivita alkaloidních extraktů u vybraných studovaných taxonů a pěstovaných odrůd rostlin z čeledi Amaryllidaceae vůči hAChE a hBChE.

| Studované taxony                                  | IC <sub>50</sub> hAChE (μg/ml) | IC <sub>50</sub> hBChE (μg/ml) | Cit.           |
|---|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
| <i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Dutch Master | 25,5 ± 0,8                     | 62,9 ± 1,9                     | [175]          |
| <i>Narcissus poeticus</i> cv. Pink Parasol        | 191,3 ± 20,2                   | 3,3 ± 0,5                      | [168]          |
| <i>Narcissus</i> L. cv. Sir Winston Churchill     | 23,0 ± 5,2                     | 41,3 ± 6,4                     | [168]          |
| <i>Chlidanthus fragrans</i> Herb.                 | 20,1 ± 2,9                     | 136,8 ± 6,9                    | [217]          |
| <i>Nerine bowdenii</i> W. Watson                  | 87,9 ± 3,5                     | 14,8 ± 1,1                     | [215]          |
| <i>Zephyrantes citrina</i> Baker                  | 6,02 ± 0,6                     | 23,0 ± 2,5                     | - <sup>a</sup> |
| galanthamin <sup>b</sup>                          | 0,49 ± 0,02                    | 12,2 ± 0,4                     | [166]          |
| huperzin A <sup>b</sup>                           | 8,0 ± 0,24 × 10 <sup>-3</sup>  | >242                           | [166]          |
| fysostigmin <sup>b</sup>                          | 17,3 ± 0,28 × 10 <sup>-3</sup> | 35,8 ± 1,1 × 10 <sup>-3</sup>  | [166]          |

<sup>a</sup> nepublikované výsledky skupiny ADINACO; <sup>b</sup> referenční látka

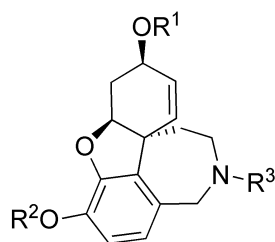
Z údajů v literatuře je známo, že silnými inhibitory AChE jsou alkaloidy galanthaminového typu, slabší inhibiční aktivita vůči AChE byla nalezena u alkaloidů lykorinového typu [178,218]. Z hlediska inhibice hBChE se jeví jako velice perspektivní sloučeniny norbelladinového a galanthamin-galanthindolového (narcikachninového) strukturního typu izolované na našem pracovišti [13,17,18,169].

#### 4.2.2.1 Galanthaminový typ

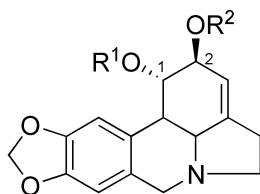
Nejznámějším alkaloidem tohoto strukturního typu je galanthamin, který byl zaveden do klinické praxe pro terapii AD v roce 2001 a působí jako selektivní, reversibilní a kompetitivní inhibitor AChE s alosterickou modulací nikotinových receptorů [140]. Galanthamin je hojně zastoupen ve většině taxonů této čeledi [178,219]. Pro zachování vysoké aktivity



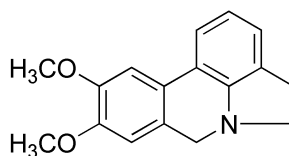
alkaloidů tohoto strukturního typu je nezbytné, aby obsahovaly cyklohexenový kruh s hydroxylovou skupinou, terciární atom dusíku s navázaným alkylovým substituentem a methoxyskupinu na aromatickém jádře. Sanguinin vykazuje desetinásobně vyšší inhibiční aktivitu AChE ( $IC_{50} = 0,10 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ) než galanthamin ( $IC_{50} = 1,07 \pm 0,18 \mu\text{M}$  [218]), která je vysvětlována přítomností hydroxyskupiny na aromatickém jádře. K zlepšení inhibiční aktivity vůči AChE dochází i v případě substituce atomu dusíku (*N*-allylnorgalanthamin;  $IC_{50} = 0,18 \mu\text{M}$  a *N*-(14-methyl)allylnorgalanthamin;  $IC_{50} = 0,16 \mu\text{M}$ ; Obr. 6) [220].



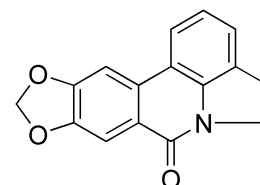
|  |  |
|--|--|
| galanthamin                              | $R^1 = -\text{H}; R^2 = R^3 = -\text{CH}_3$  |
| sanguinin                                | $R^1 = R^2 = -\text{H}; R^3 = -\text{CH}_3$  |
| chlidanthin                              | $R^1 = R^3 = -\text{CH}_3; R^2 = -\text{H}$  |
| <i>N</i> -allylnorgalanthamin            | $R^1 = -\text{H}; R^2 = -\text{CH}_3; R^3 = -\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$             |
| <i>N</i> -(14-methyl)allylnorgalanthamin | $R^1 = -\text{H}; R^2 = -\text{CH}_3; R^3 = -\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ |



|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| lykorin                         | $R^1 = R^2 = -\text{H}$                  |
| 1- <i>O</i> -acetyllykorin      | $R^1 = -\text{COOCH}_3; R^2 = -\text{H}$ |
| 1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorin | $R^1 = R^2 = -\text{COOCH}_3;$           |



assoanin



oxoassoanin

**Obr. 6 AA s výraznou inhibiční aktivitou vůči AChE ( $IC_{50} < 100 \mu\text{M}$ ).**

Přestože sanguinin a *N*-alkylované deriváty galanthaminu vykazují výraznou inhibiční aktivitu vůči AChE, jejich klinickému využití brání vyšší polarita (sanguinin), která limituje přechod přes HEB a obecně i nízký obsah v rostlinách oproti galanthaminu. Z izolačního hlediska jsou látky obtížně získatelné, a pokud nebude nalezen zdroj anebo způsob jejich přípravy, jsou tyto alkaloidy neperspektivní pro podrobnější studie.

U chlidanthinu (polohového izomeru galanthaminu, Obr. 6) jsou polohy methoxyskupiny a hydroxyskupiny obrácené, což má za následek výrazné snížení aktivity v porovnání

s galanthaminem ( $IC_{50} = 147,0 \pm 6,0$ ) [221]. Tento nález byl potvrzen i ve studii pracovní skupiny ADINACO [125].

Absence methylové skupiny na atomu dusíku (např. u epinorgalanthaminu) vede také k výraznému poklesu inhibiční aktivity. V případě nasycení dvojné vazby cyklohexenového kruhu (epinorlykoramin, lykoramin) je výsledkem úplná ztráta inhibice AChE [218]. Z hlediska inhibice BChE lze galanthaminový typ alkaloidů považovat za neperspektivní, mírnou aktivitu vykazoval pouze galanthamin ( $IC_{50} = 43,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ) [218].

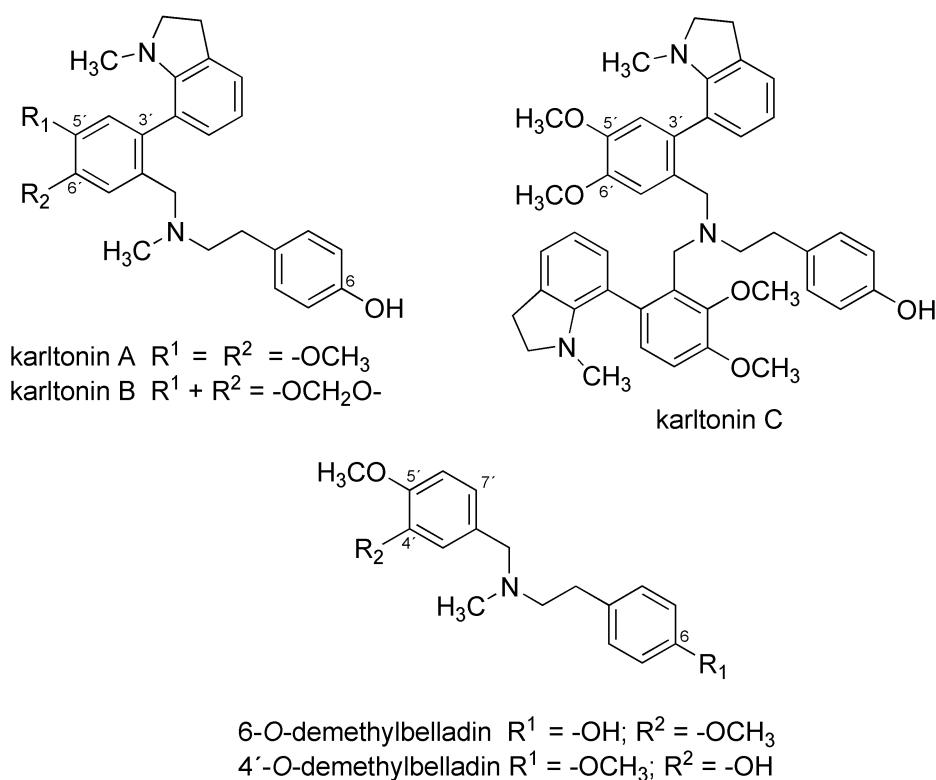
#### **4.2.2.2 Lykorinový typ**

Aktivní lykorinové alkaloidy s inhibiční aktivitou vůči AChE jsou spojovány s deriváty v poloze C-1, samotný lykorin není aktivní. 1-*O*-Acetyllykorin vykazoval dokonce lepší aktivitu než galanthamin ( $IC_{50} = 0,96 \mu\text{M}$ ), zatímco 2-*O*-acetyllykorin a 1,2-*O*-diacetyllykorin byly neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) [222,223]. Zdá se, že zajímavá AChE inhibiční aktivita 1-*O*-acetyllykorinu je závislá na zdroji AChE. V naší studii, ve které byla *ee*AChE nahrazena *h*AChE, byl 1-*O*-acetyllykorin neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) [123]. U alkaloidů asoaninu ( $IC_{50} = 3,87 \pm 0,24$ ) a oxoasoaninu ( $IC_{50} = 47,21 \pm 1,13 \mu\text{M}$ ) je jejich inhibiční aktivita vůči AChE zdůvodňována přítomností planárního aromatického kruhu C (Obr. 6) [218].

#### **4.2.2.3 Belladinový typ**

Publikované výsledky inhibice cholinesteras alkaloidy belladinového strukturního typu pocházejí výhradně z naší laboratoře. Tyto látky vykazují selektivní inhibiční aktivitu vůči *h*BChE ( $IC_{50 \text{ hAChE}} > 100 \mu\text{M}$ ). Z *Nerine bowdenii* Watson byly izolovány 3 alkaloidy belladinového typu, nejaktivnějšími inhibitory byly 4'-*O*-demethylbelladin ( $IC_{50} = 30,7 \pm 4,0 \mu\text{M}$ ), zatímco 6-*O*-demethylbelladin vykazoval výrazně nižší inhibiční potenciál ( $IC_{50} = 115 \pm 10,1 \mu\text{M}$ ) [123]. Belladinové alkaloidy s velmi silnou *h*BChE inhibiční aktivitou byly izolovány z *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Carlton. V případě přítomnosti *N*-methylindolinového substituentu v poloze C-3' byly detekovány hodnoty  $IC_{50}$  v nanomolárních koncentracích u karltoninů A a B. Tyto sloučeniny se vzájemně liší substitucí na C-5' a C-6'. V případě substituce těchto poloh methyldioxykupinou (karltonin B), byla *h*BChE inhibiční aktivita až 30× vyšší ( $IC_{50} = 30,1 \pm 1,0 \text{ nM}$ ) oproti karltoninu A ( $IC_{50} = 910 \pm 20 \text{ nM}$ ), který má ve své struktuře v těchto polohách 2 methoxyskupiny.

V případě alkylace atomu dusíku objemným substituentem (karltonin C) dochází k výraznému poklesu *h*BChE inhibiční aktivity ( $IC_{50} = 14,8 \pm 1,1 \mu M$ ; Obr. 7) [13]. Lze říci, že alkaloidy belladinového strukturního typu mohou představovat farmakofor ve vývoji léčiva pro terapii AD jako selektivní inhibitory BChE. Alkaloidy belladinového strukturního typu jsou zajímavé i z hlediska přípravy *de novo*, protože neobsahují ve své struktuře chirální centra.

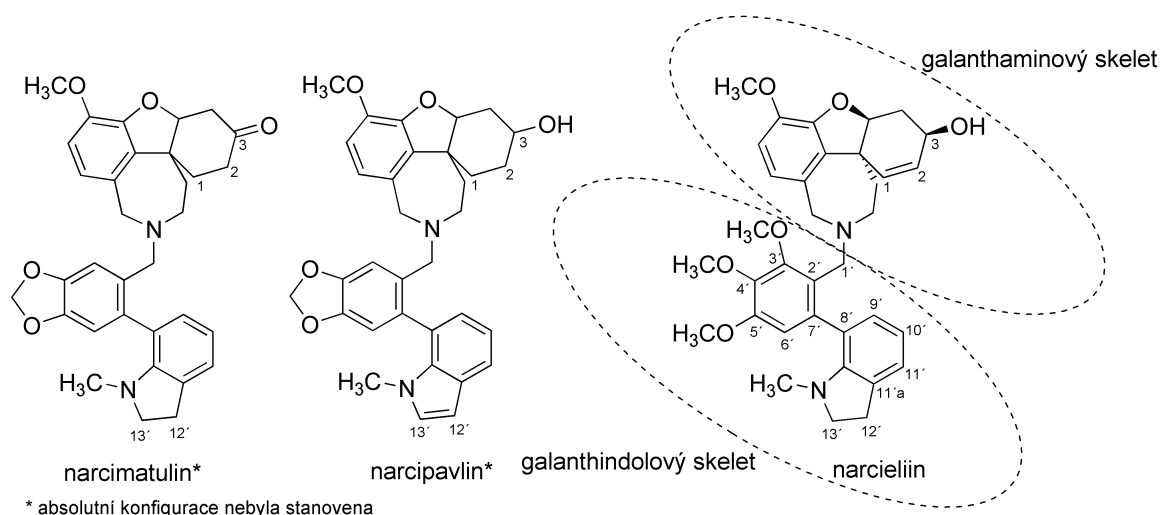


Obr. 7 Belladinové alkaloidy s výraznou inhibiční aktivitou vůči *h*BChE.

#### 4.2.2.4 Galanthamin-galanthindolový (narcikachninový) typ

Galanthamin-galanthindolový strukturní typ, který byl nedávno pojmenován Berkovem a kol. jako narcikachninový typ [224], představuje konjugát dvou běžně se vyskytujících alkaloidů v taxonech čeledi Amaryllidaceae – galanthaminu (nebo alkaloidu galanthaminového strukturního typu) a galanthindolu (Obr. 8). Galanthindol byl dříve izolován z *Galanthus plicatus* M. Bieb. ssp. *byzantinus* (Baker) D.A. Webb. [225] a detekován GC-MS i v dalších druzích [206,226]. Výskyt heterodimerních alkaloidů v čeledi Amaryllidaceae je vzácný, dříve byl izolován jen dimer galanthaminu a tazettinu (pallidiflorin) [227]. V nedávno publikované práci Šafratové a kol. byly z *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol izolovány dva alkaloidy tohoto strukturního typu. Narcipavlin inhiboval selektivně *h*BChE

( $IC_{50} = 24,4 \pm 1,2 \mu M$ ) a vůči *hAChE* byl neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ), další alkaloid narcikachnin se nepodařilo izolovat v dostatečném množství pro biologické testy [17]. Výraznou selektivní inhibicí *hBChE* vykazoval rovněž narcimatulin ( $IC_{50} = 5,9 \pm 0,2 \mu M$ ), izolovaný z *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master [18] a narcieliin ( $IC_{50} = 1,34 \pm 0,31 \mu M$ ), který byl izolován ze *Zephyranthes citrina* Baker. Narcieliin inhiboval nezanedbatelnou mírou i *hAChE* ( $IC_{50} = 18,7 \pm 2,3 \mu M$ ) [169].

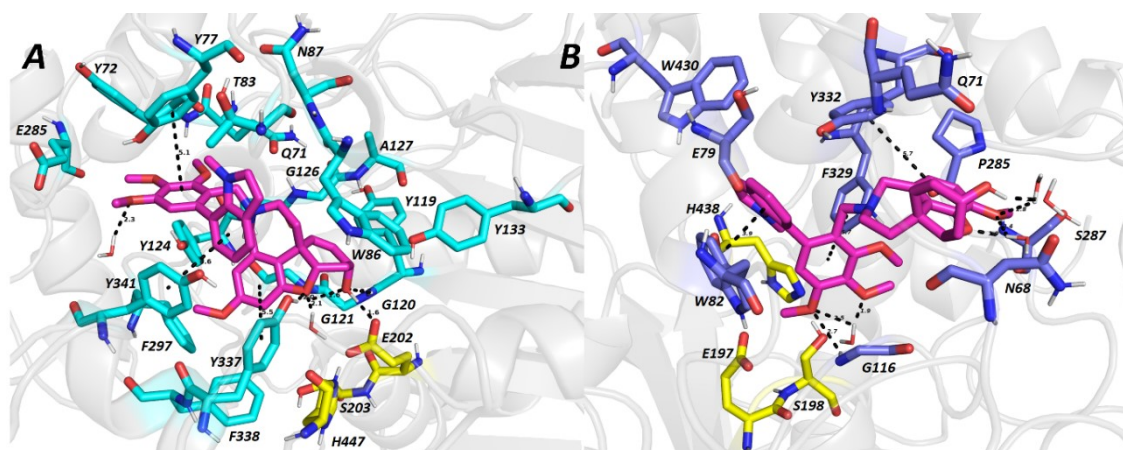


**Obr. 8 Galanthamin-galanthindolové alkaloidy s výraznou inhibiční aktivitou vůči *hBChE*.**

Narcimatulin, narcipavlin a narcieliin jsou strukturně velice podobné sloučeniny. Ze vztahu struktura-účinek vyplývá, že pokud heterodimer má v molekule zabudovaný galanthamin, dochází k výrazné inhibici *hAChE* (narcieliin). Pokud dojde k hydrogenaci dvojné vazby cyklohexenového kruhu v poloze C-1/C-2 v galanthaminové části alkaloidu (narcimatulin a narcipavlin), látky byly shledány vůči *hAChE* neaktivními ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) [17,18]. Naopak, ze vztahu struktura-účinek je možné dedukovat, že za inhibici *hBChE* bude odpovídat galanthindolová část heterodimerů, neboť je známo, že galanthaminové alkaloidy nejsou považovány za sloučeniny s výraznou inhibiční aktivitou vůči *BChE* (kapitola 4.2.2.1). Vystupňovaná inhibiční aktivita narcieliinu vůči *hBChE* je zřejmě spojena s přítomností 3 methoxyskupin v polohách C-3', C-4' a C-5' fenylového substituentu galanthindolového skeletu (narcipavlin a narcimatulin mají na fenyly galanthindolového skeletu navázanou methylenedioxykupinu v polohách C-4' a C-5'; Obr. 8) [169].

K objasnění interakcí narcieliinu s *hAChE* a *hBChE* byly využity kinetická studie a *in silico* modelování. Z hlediska kinetiky tento alkaloid inhibuje *hAChE* kompetitivním způsobem ( $K_i = 10,3 \pm 1,8 \mu M$ ) a sloučenina se váže do aktivního místa enzymu reverzibilně. V případě *hBChE* inhibuje alkaloid enzym také reverzibilně, ale smíšeným typem inhibice

s větší afinitou k volnému enzymu než komplexu substrát-enzym ( $K_i < K_i'$ ;  $K_i = 1,43 \pm 0,73 \mu\text{M}$  a  $K_i' = 9,2 \pm 3,0 \mu\text{M}$ ) [169]. *In silico* studie objasnila, že galanthaminová část narcieliinu se dostává do katalytického anionického místa *hAChE* a působí zde interakcemi, mírně odlišnými v porovnání s galanthaminem. Pro interakce galanthaminové části alkaloidu narcieliinu v anionickém místě je důležitá přítomnost atomu kyslíku dihydrofuranové části molekuly, hydroxylové skupiny na cyklohexenovém kruhu a aromatický kruh. Galanthindolová část je zakotvena mimo hrdlo kavity enzymu. Alkaloid dále neovlivňuje periferní anionické místo *hAChE* a jeho nižší schopnost inhibovat *hAChE* můžeme vysvětlit vyšší molekulovou hmotností ( $M_r = 584$ ; Obr. 9, A). Chceme-li vysvětlit vliv narcieliinu na *hBChE*, musíme se zaměřit na galanthindolovou část molekuly, která se váže do blízkosti katalytické triády *hBChE*, ale není v přímém kontaktu s touto částí enzymu. Galanthaminová část alkaloidu je posunuta vně hrdla kavity *hBChE*. Pro interakce galanthindolové části alkaloidu s enzymem je důležitá přítomnost dihydroindolového jádra s trimethoxyfenylem. Na výraznější inhibici *hBChE* se podílí i komplexní struktura narcieliinu skládající se z galanthaminového a galanthindolové jádra (Obr. 9, B) [169].



Obr. 9 Možné interakce narcieliinu v aktivních místech *hAChE* (A) and *hBChE* (B).

Závěrem lze říct, že alkaloid narceiin se jeví jako velice perspektivní molekula pro další studie, neboť vykazuje duální inhibici *hAChE* a *hBChE* s vystupňovaným účinkem vůči *hBChE*. Z výsledků PAMPA testu navíc vyplynulo, že narceiin může procházet pasivní difuzí přes HEB [169].

#### 4.2.2.5 Další strukturní typy

Krnanové alkaloidy byly obecně považovány za slabé inhibitory cholinesteras. Ve studii Vaněčkové a spol. vykazoval undulatin střední inhibiční aktivitu vůči *hAChE*

( $IC_{50} = 23,5 \pm 1,2 \mu M$ ), ale silně inhiboval *eeAChE* ( $IC_{50} = 7,4 \pm 0,03 \mu M$ ) [15]. 8-*O*-Demethylmaritidin, izolovaný ze *Zephyranthes robusta* Baker, demonstroval podobnou inhibiční aktivitu vůči *hAChE* jako undulatin ( $IC_{50} = 28 \pm 0,9 \mu M$ ) [228]. Z hlediska inhibice humánních cholinesteras jsou oba uvedené alkaloidy pro další studium spíše neperspektivní.

V rámci syntézy derivátů haemanthaminu pro screening cytotoxické aktivity byly připraveny aromatické estery, z nichž některé výrazně inhibovaly *hAChE* a *hBChE* ( $IC_{50}$  nejaktivnější derivátů se pohybovala mezi 3–18  $\mu M$ ). Vzhledem k tomu, že výchozí sloučenina – haemanthamin – je však vůči cholinesterasám neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) [211,229], byly tyto výsledky poměrně překvapující. Selektivní a výraznou inhibici *hBChE* v nanomolárních a mikromolárních koncentracích vykazovaly také aromatické estery ambellinu, který je v nederivatizované formě vůči lidským cholinesterasám také neaktivní [212]. Zdá se, že deriváty krinanového typu mohou představovat perspektivní molekuly z hlediska vývoje nového léčiva pro terapii AD, zvláště pokud budou připraveny deriváty se stabilnější vazbou než esterovou, která zpravidla podléhá rychlé hydrolyze v živém organismu [230].

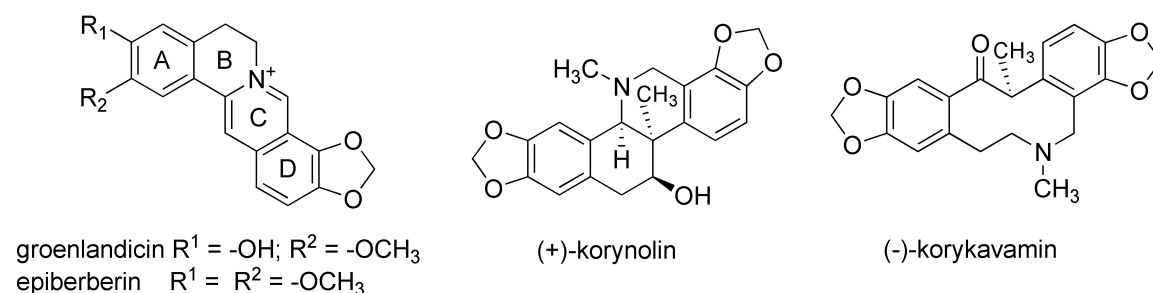
Ostatní testované AA různých strukturních typů nevykazovaly významnou cholinesterasovou aktivitu, aby byly potenciálně zajímavé jako „lead structures“ pro léčbu AD.

### 4.3 Vliv alkaloidů na BACE1

Přestože sekundární metabolity rostlin byly poměrně intenzívně testovány na inhibici BACE1 [231–235], IA představují málo probádanou skupinu těchto látek rostlinného původu. V současnosti existují jen dvě publikace, přičemž jedna pochází z naší pracovní skupiny [128,162]. Ve studii Junga a spol. byly kvarterní protoberberinové alkaloidy epiberberin a groenlandicin identifikovány jako výrazné inhibitory BACE1 ( $IC_{50} = 8,55 \pm 1,29 \mu M$  a  $19,68 \pm 1,42 \mu M$ ). Ve studii zaměřené na terciární IA (Chlebek a spol.) byla nalezena střední BACE1 inhibiční aktivita u (–)-korykavaminu ( $IC_{50} = 41,16 \pm 7,82 \mu M$ ) a (+)-korynolinu ( $IC_{50} = 33,59 \pm 0,23 \mu M$ ). Z publikovaných studií vyplývá, že u kvarterních protoberberinových alkaloidů souvisí jejich výrazná inhibice BACE1 se substitucí methylen-dioxyskupiny na kruhu D a dvěma methoxyskupinami, případně methoxyskupinou a hydroxyskupinou na aromatickém kruhu A. Pokud je na kruh A navázána methylen-dioxyskupina, sloučeniny jsou neaktivní [128]. Zdá se, že přítomnost methylen-dioxyskupiny je pro

inhibici BACE1 nezbytná i v případě terciárních IA patřících do jiných strukturních typů (Obr. 10).

Dříve zajímavá oblast výzkumu inhibitorů BACE1 je v současnosti nejspíše uzavřena. Vývoj léčiv tohoto typu byl u farmaceutických společností ukončen z důvodů selhání kandidátních molekul v klinických zkouškách (ve fázi II a III) u pacientů s prodromální, mírnou až střední formou AD a také z obav ohledně bezpečnosti používání léčiv tohoto typu (nežádoucí vedlejší účinky) [236,237].



**Obr. 10 IA s inhibiční aktivitou vůči BACE1.**

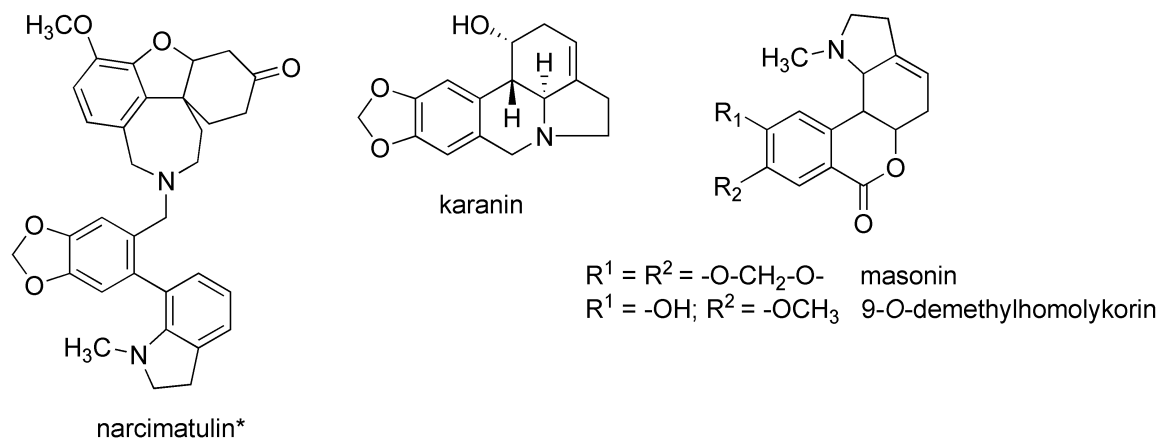
#### 4.4 Vliv alkaloidů na GSK-3 $\beta$

Hledáním potenciálních inhibitorů GSK-3 $\beta$ , zaměřených na studium IA a AA, se zabývá pouze pracovní skupina ADINACO. GSK-3 $\beta$  inhibitory přírodního původu byly poprvé objeveny u alkaloidů manzaminového strukturního typu, izolovaných z mořských hub [238,239].

V rámci testování IA různých strukturních typů, izolovaných z *Fumaria officinalis* L. [164] a *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte (nepublikované výsledky), bylo zjištěno, že IA nevykazují inhibiční aktivitu vůči GSK-3 $\beta$  (procenta inhibice se pohybovala při screeningové koncentraci 10  $\mu$ M maximálně jen okolo 10 %), a proto se IA nejeví vhodným zdrojem pro hledání významných inhibitorů této kinasy.

V pilotní studii inhibičních aktivit AA byla zjištěna střední inhibiční aktivita vůči GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50} \sim 20\text{--}30 \mu$ M) u sloučenin lykorinového (karanin), homolykorinového (9-O-demethylhomolykorin a masonin) a galanthamin-galanthindolového strukturního typu (narcimatulin; Obr. 11) [18,240]. Narcimatulin, vykazoval poměrně slibnou inhibiční aktivitu ( $IC_{50} = 20,7 \pm 2,4 \mu$ M), která je způsobena zřejmě přítomností N-methylindolového skeletu. Z dosud publikovaných výsledků vyplývá, že inhibice GSK-3 $\beta$  souvisí s přítomností indolového skeletu (manzaminové alkaloidy) [238]. Tato strukturní závislost byla

potvrzena i v dosud nepublikovaných výsledcích skupiny ADINACO na barvínkových alkaloidech (*Vinca minor* L.), které vykazují výraznou inhibici GSK-3 $\beta$  v mikromolárních koncentracích.



\*absolutní konfigurace nebyla doposud stanovena

Obr. 11 AA s inhibiční aktivitou vůči GSK-3 $\beta$ .

#### 4.5 Vliv alkaloidů na POP

POP, někdy označovaná jako prolylendopeptidasa, je cytosolová serinová peptidasa nacházející se v mozku (hlavně v kortexu) a dalších tělních orgánech, která se stala potenciálním terapeutickým cílem v terapii psychických poruch (schizofrenie a bipolární afektivní porucha) a neurodegenerativních onemocnění (PA, AD). Důvodem je skutečnost, že tento enzym hraje důležitou roli v modulaci hladin neuronálních hormonů a peptidů a rovněž v signálních drahách buněk [241]. Účinné inhibitory POP byly nalezeny nejen mezi přírodními látkami nealkaloidního charakteru [242–245], ale i alkaloidy [246], včetně IA a AA izolovaných na našem pracovišti. POP inhibiční aktivita byla studována ve spolupráci s Univerzitou obrany, Fakultou vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Ze studovaných taxonů vykazovaly slibnou inhibiční aktivitu IA (–)-kalifornidin, dihydrosanguinarin, (–)-sinaktin, (+)-*N*-methyllaurotetanin, (+)-parfumidin a (+)-korypalmin. Ze zjištěných dat je patrné, že přítomnost kvarterního dusíku u pavinanových alkaloidů inhibici POP zvyšuje [166,247], v případě terciárních protoberberinových alkaloidů je inhibiční schopnost zvýrazněna u (–)-isomerů. (–)-Sinaktin vykazoval více než 2 $\times$  silnější inhibici POP než (+)-isomery protoberberinových alkaloidů [247]. V rámci studie zaměřené na aktivitu IA z *Berberis vulgaris* L. byly nalezeny inhibitory POP i mezi bisbenzylisochinolinovými alkaloidy (Tab. 4).

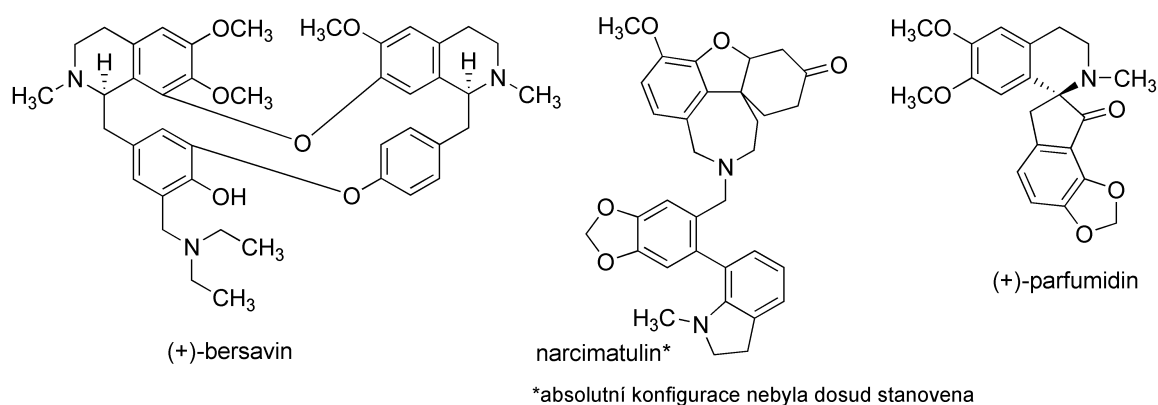


**Tab. 4 IA a AA s inhibiční aktivitou vůči POP (IC<sub>50</sub> <200 μM).**

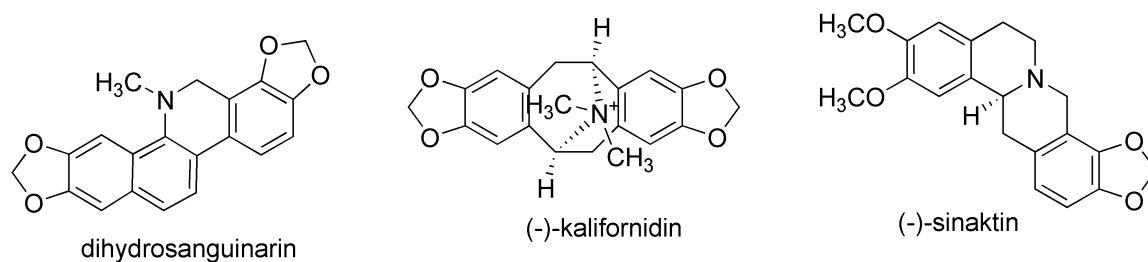
| Alkaloid                         | Strukturní typ              | IC <sub>50</sub> POP (μM) <sup>a</sup> | Cit.     |
|----------------------------------|-----------------------------|--|----------|
| (+)-aromolin                     | bisbenzylisochinolinový     | 189 ± 32                               | [14]     |
| (+)-bersavin                     | bisbenzylisochinolinový     | 67 ± 6,0                               | [14]     |
| (+)-bikukullin                   | ftalidisochinolinový        | 190 ± 50                               | [164]    |
| (+)-parfumidin                   | spirobenzylisochinolinový   | 99 ± 5,0                               | [164]    |
| (-)-sinoakutin                   | morfinanový                 | 143,1 ± 25,4                           | [16,167] |
| (+)- <i>N</i> -methylaurotetanin | aporfinový                  | 135 ± 11,7                             | [16,167] |
| (+)-kanadin                      | protoberberinový            | 152 ± 12,5                             | [16]     |
| (+)-korypalmin                   | protoberberinový            | 128 ± 10,5                             | [16]     |
| (-)-sinaktin                     | protoberberinový            | 53,0 ± 2,0                             | [164]    |
| (-)-kalifornidin                 | pavinanový                  | 55,6 ± 3,5                             | [165]    |
| dihydrosanguinarin               | benzofenanthridinový        | 99,1 ± 7,6                             | [248]    |
| karltonin A                      | belladinový                 | 143 ± 12                               | [13]     |
| homolykorin                      | homolykorinový              | 173 ± 41                               | [18]     |
| narcimatulin                     | galanthamin-galanthindolový | 29,2 ± 1,0                             | [18]     |
| narcieliin                       | galanthamin-galanthindolový | 163 ± 13                               | [169]    |
| norlykoramin                     | galanthaminový              | 210 ± 10                               | [17]     |
| 9- <i>O</i> -demethylgalanthin   | lykorinový                  | 150 ± 20                               | [209]    |
| berberin                         | protoberberinový (standard) | 142 ± 21,5                             | [247]    |
| Z-pro-prolinal                   | standard                    | 2,75 × 10 <sup>-3</sup>                | [247]    |

<sup>a</sup> výsledky jsou vyjádřeny jako průměr se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých měření

Mezi AA byly identifikovány jako POP inhibitory homolykorin, norlykoramin a narcimatulin; poslední jmenovaný alkaloid vykazoval výraznou inhibici tohoto enzymu (Tab. 4). V uvedené tabulce jsou shrnuty IA a AA s inhibiční aktivitou srovnatelnou se standardem berberinem a látky aktivnější. Struktury alkaloidů s inhibiční aktivitou IC<sub>50</sub> <100 μM vůči POP jsou znázorněny níže (Obr. 12). Narcimatulin se jeví jako zajímavá struktura pro další studium, zvláště když inhibuje i další enzymy (*h*BChE a GSK-3β) [18].



**Obr. 12 Vybrané alkaloidy s inhibiční aktivitou vůči POP s hodnotami IC<sub>50</sub> <100 μM.**

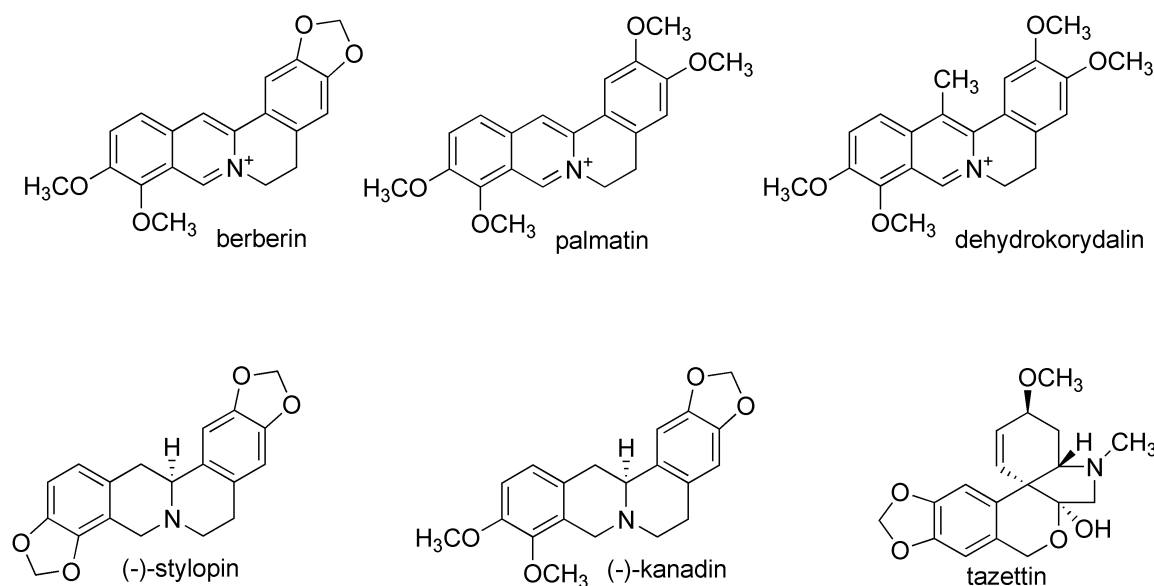


Obr. 12 Vybrané alkaloidy s inhibiční aktivitou vůči POP s hodnotami  $IC_{50} < 100 \mu M$  (pokračování).

## 4.6 Antineoplastická aktivita alkaloidů

### 4.6.1 Vliv alkaloidů na AKR1C3 a AKR1B10

Nadrodina AKR zahrnuje skupinu různých enzymů, které katalyzují redoxní přeměny při důležitých fyziologických reakcích, intermediárním metabolismu a detoxikaci organismu [249,250]. Inhibitory AKR přírodního původu byly nalezeny mezi fenolovými, terpenovými, steroidními, kumarinovými sloučeninami a také u kvarterních protoberberinových alkaloidů berberinu, palmatinu a dehydrokorydalinu (Obr. 13) [250–253].

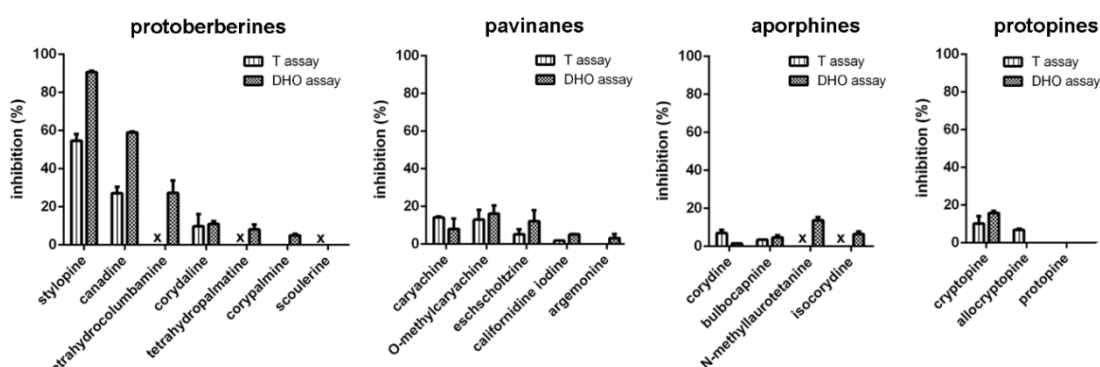


Obr. 13 IA a AA s inhibiční aktivitou vůči AKR.

V rámci spolupráce s výzkumnou skupinou prof. Wsola na katedře biochemických věd na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové byla zkoumána inhibiční aktivita IA vůči AKR1C3 a AKR1B10. AA byly testovány pouze na inhibici AKR1C3. Tento enzymový systém se podílí v lidském těle na redukci steroidů a prostagladinů hrajících roli v buněčné proliferaci [254–257], AKR1B10 se podílí na konverzi retinalu na retinol a redukci

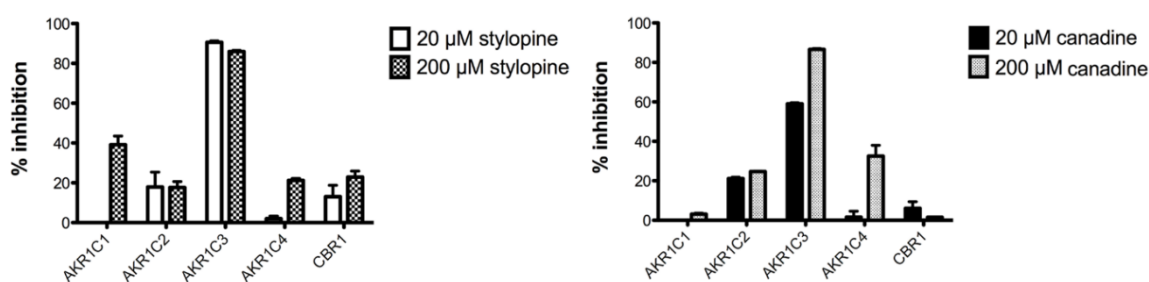
isoprenylových aldehydů [258]. Oba typy studovaných AKR se podílí na transformaci xenobiotik (léčiv a prokancerogenních látek) a hrají významnou roli ve vývoji některých nádorových onemocnění [258–260]. Jelikož jsou AKR1C3 a AKR1B10 výrazně exprimovány v různých neoplastických útvarech [258,261], představují potenciální terapeutický cíl vůči nádorovým onemocněním.

Ve studii Škarydové a spol. vykazovaly z testovaných IA různých strukturních typů nejvyšší inhibiční aktivitu vůči AKR1C3 protoberberinové alkaloidy, ostatní strukturní typy (aporphiny, protopiny a pavinany) se ukázaly jako neaktivní (Obr. 14).



Obr. 14 Inhibiční aktivita IA různých strukturních typů vůči AKR1C3 [107].

Významný inhibiční účinek byl zjištěn u protoberberinových alkaloidů (–)-kanadinu a zejména u (–)-stylopinu (Obr. 13). Stylopin se ukázal ve dvou testech jako silný a středně silný selektivní inhibitor AKR1C3 (Obr. 15) s inhibiční aktivitou srovnatelnou se standardy [107].



Obr. 15 Inhibiční selektivita (–)-kanadinu a (–)-stylopinu vůči vybraným podtypům AKR [107].

Pro zachování inhibiční aktivity vůči AKR1C3 je nezbytná přítomnost dvou methylen-dioxyskupin na aromatických jádrech protoberberinového skeletu, v případě otevření těchto skupin dochází k poklesu aktivity: (–)-stylopin > (–)-kanadin > (–)-tetrahydrocolumbamin > (+)-korydalin > (+)-tetrahydropalmatin > (–)-korypalmin > (–)-skoulerin (Obr. 14) [107].

Závěrem lze říci, že (-)-stylopin má potenciál se stát vůdčí strukturou pro vývoj účinných inhibitorů AKR1C3 potenciálně využitelných v terapii nádorových onemocnění.

V rámci testování inhibiční aktivity IA vůči AKR1B10 bylo zjištěno, že IA jsou slabými inhibitory této AKR, pro další studium se jeví jako neperspektivní [106]. Hulcová a spol. testovali 28 AA různých strukturních typů na inhibici AKR1C3. Z testovaných alkaloidů byl aktivní pouze tazettin (Obr. 13), který byl shledán jako středně účinný inhibitor ( $IC_{50} = 15,8 \pm 1,2 \mu M$ ) [262]. Tato pilotní studie AA zaměřená na inhibici AKR1C3, může podnítit další výzkum k nalezení účinnějších inhibitorů AKR.

## 4.6.2 Vliv alkaloidů na růst a vývoj vybraných typů nádorových linií buněk

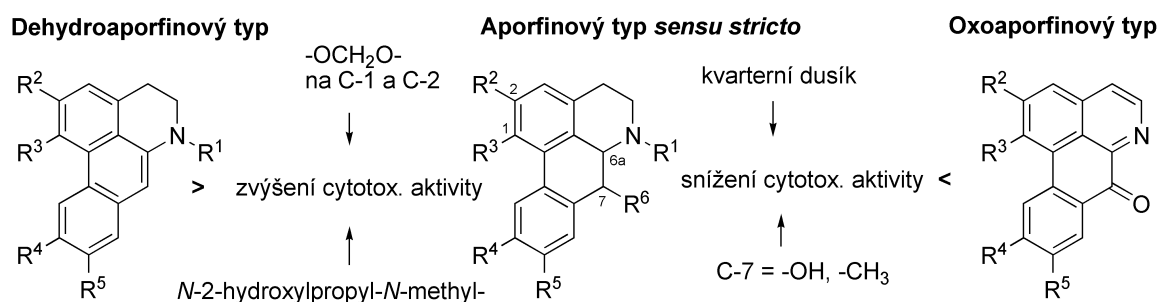
### 4.6.2.1 Isochinolinové alkaloidy

IA, podobně jako AA, patří možná k nejvíce studovaným alkaloidům z hlediska antitumorové a cytotoxické aktivity [88]. Vzhledem k enormnímu počtu publikací o cytotoxické aktivitě IA, patřících do různých strukturních podtypů, je tato habilitační práce zaměřena na komentář k cytotoxické aktivitě alkaloidů náležících do vybraných strukturních typů IA, tj. protoberberinového, benzyliisochinolinového, bisbenzyliisochinolinového, spirobenzyliisochinolinového, aporfinového, ftalidisochinolinového, morfinanového a indenoazepinového, které byly podrobeny cytotoxickému testování ve spolupráci s katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky z Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze, s katedrou biologických a biochemických věd z Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice a s Ústavem lékařské biochemie, Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

#### 4.6.2.1.1 Aporfinové alkaloidy *s.l.*

Aporfinové alkaloidy *s.l.*, zahrnující dehydroaporfinový, aporfinový *sensu stricto* (*s.s.*) a oxoaporfinový strukturní podtyp, jsou sloučeninami vykazujícími cytotoxickou aktivitu. Z dosažených literárních údajů vyplývá, že dehydroaporfinové alkaloidy mají mnohem vyšší cytotoxickou aktivitu než aporfinový strukturní typ – roli zde hraje konjugace dvojných vazeb a planárnost molekul tohoto podtypu alkaloidů, která umožňuje lepší vmezeření jejich molekuly do vláken DNA a inhibici topoisomerasy II [263]. Také oxoaporfinové alkaloidy vykazují vyšší cytotoxickou aktivitu než strukturní podtyp aporfinových alkaloidů *s.s.* díky přítomnosti oxoskupiny, která rozšiřuje aporfinový kruhový systém. Jestliže

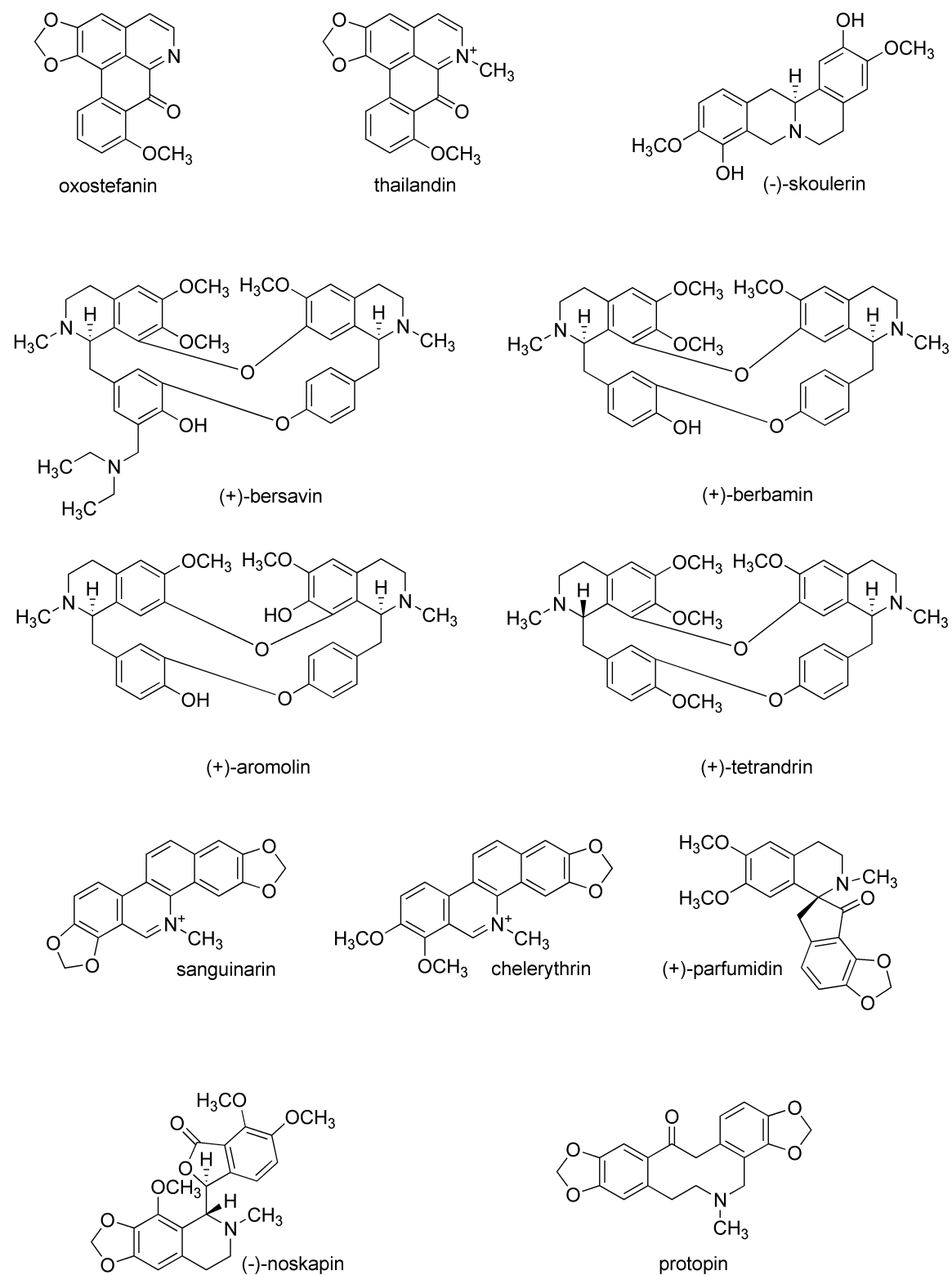
je oxoskupina ze skeletu odstraněna, cytotoxická aktivita klesá. Tento jev lze vysvětlit planární konformací molekuly, která se může lépe vmezeřit do RNA, DNA a proteinů v nádorových buněčných liniích [264]. Ze vztahu struktura-cytotoxická aktivita u 3 uvedených podtypů aporfinových alkaloidů vyplývá, že pro zvýšení cytotoxické aktivity aporfinového s.s. strukturního podtypu je žádoucí přítomnost methyldioxykupiny v poloze C-1/C-2 a substituentů na atomu dusíku. V případě existence kvarterního dusíku a substituentu v poloze C-7 cytotoxická aktivita klesá (Obr. 16) [19].



Obr. 16 Strukturní cytotoxická závislost u alkaloidů 3 aporfinových podtypů.

V rámci spolupráce s katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky z Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze byl proveden screening 7 alkaloidů aporfinového s.s. strukturního podtypu na cytotoxicitu vůči nádorovým buněčným liniím Caco-2 a Hep-G2. Bylo zjištěno, že alkaloidy izolované na našem pracovišti nevykazovaly žádnou významnou cytotoxickou aktivitu vůči vybraným buněčným liniím ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) [187]. Dosažené výsledky korelují se studií, v rámci které byly testovány alkaloidy (+)-boldin a (+)-*N*-methyllaurotetanin na cytotoxicitu vůči lidským nádorovým buněčným liniím HT29, SKMEL 28 a primárním keratinocytům. Testované alkaloidy (+)-boldin a (+)-*N*-methyllaurotetanin nevykazovaly žádnou významnou cytotoxicitu [263]. V rámci dalších studií vykazoval (+)-boldin nízkou cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým liniím A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 a HCT-15 ( $IC_{50} \sim 18\text{--}26 \mu M$ ) [265].

Na závěr je vhodné uvést jako poznámku k aporfinovým alkaloidům příklad dvou sloučenin, které mají potenciál stát se léčivem s antineoplastickou aktivitou, nebo molekulami pro vývoj nového antineoplastika. Jedná se o alkaloidy oxostefanin a thailandin (Obr. 17) izolované ze *Stephania venosa* Spreng. Oxostefanin vykazoval slibnou aktivitu vůči liniím BC ( $IC_{50} = 0,24 \mu g/ml$ ) a MOLT-3 ( $IC_{50} = 0,71 \mu g/ml$ ) a zároveň vykazoval velmi nízkou cytotoxicitu vůči MRC-5. Thailandin demonstroval slibnou cytotoxickou aktivitu vůči A549 ( $IC_{50} = 0,30 \mu g/ml$ ), která byla vyšší než pozitivní standard doxorubicin ( $IC_{50} = 0,36 \mu g/ml$ ) [266].



**Obr. 17 Vybrané IA různých strukturních typů s cytotoxickou aktivitou.**

#### 4.6.2.1.2 Benzofenanthridinové alkaloidy

Dihydrobenzofenanthridinové (obsahující ve své struktuře terciární dusík) a benzofenanthridinové (obsahující ve skeletu kvarterní dusík) alkaloidy zahrnují sloučeniny s vysoce cytotoxickou aktivitou. Mezi nejvíce studované alkaloidy tohoto strukturního typu patří dihydrosanguinarin, dihydrochelerythrin, sanguinarin, chelerythrin, chelirubin a chelidonin, které byly aktivní vůči celé řadě nádorových buněčných linií [19]. Jako příklad širokospektré cytotoxické aktivity je zde uveden vliv sanguinarinu a chelerythrinu (Obr. 17) na vybrané nádorové buněčné linie (Tab. 5).

**Tab. 5** Cytotoxická aktivita sanguinarinu a chelerythrinu vůči vybraným nádorovým buněčným liniím.

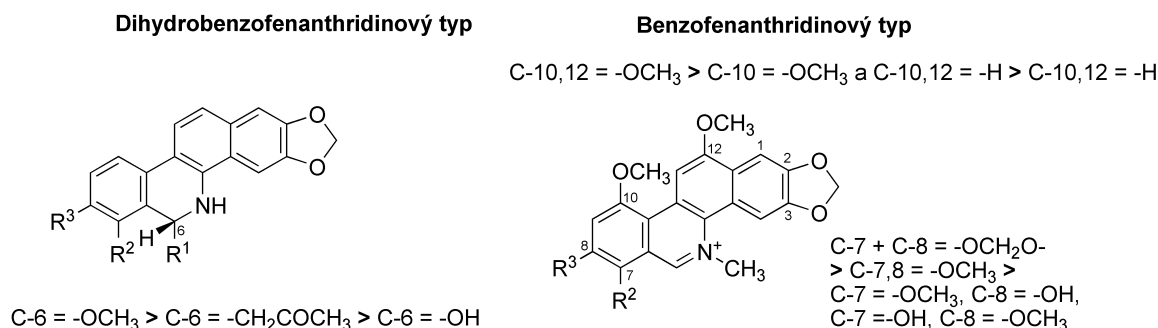
| Nádorová linie | IC <sub>50</sub> (μg/ml) |              | Cit.  |
|----------------|--------------------------|--------------|-------|
|                | sanguinarin              | chelerythrin |       |
| MT-4           | 1,08                     | 2,0          | [267] |
| OVACR-3        | 0,66                     | 2,5          | [268] |
| MDA-MB-231     | 0,59                     | 2,6          | [268] |
| SW480          | 0,59                     | 2,5          | [268] |
| DU-145         | 0.85                     | 2.0          | [269] |
| A431           | 0,7                      | 1,44         | [270] |
| L1210          | 2                        | 4.6          | [271] |
| MCF-7          | 4 <sup>a</sup>           | -            | [272] |

<sup>a</sup> (IC<sub>50</sub> μM)

V rámci screeningu cytotoxicity IA vůči Caco-2 a Hep-G2 nevykazoval benzofenanthridinový alkaloid (+)-korynolin v naší studii významnou aktivitu (IC<sub>50</sub> >10 μM). Nicméně, podle literárních údajů měla tato látka izolovaná z *Corydalis incisa* (Thunb.) Pers. zajímavou cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým liniím A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 a HCT-15 (IC<sub>50</sub> 5–6 μM) [273].

Na základě shrnutí získaných dat lze konstatovat, že benzofenanthridinové alkaloidy představují velice nosnou skupinu IA pro studium cytotoxické aktivity. Vztah struktura-cytotoxický účinek je u těchto alkaloidů vyobrazen níže. Pro zachování signifikantního cytotoxického účinku u terciárních benzofenanthridinových alkaloidů (dihydrobenzofenanthridinů) je nezbytná přítomnost methylenedioxykupiny, dále musí být vodík navázán v β-poloze na uhlíku C-6. Cytotoxickou aktivitu zvyšuje methoxykupina navázaná v poloze na C-6, v případě přítomnosti acetoxy-, nebo hydroxykupiny aktivita klesá. U kvarterních benzofenanthridinů hraje roli pro zachování vysoké cytotoxické aktivity přítomnost

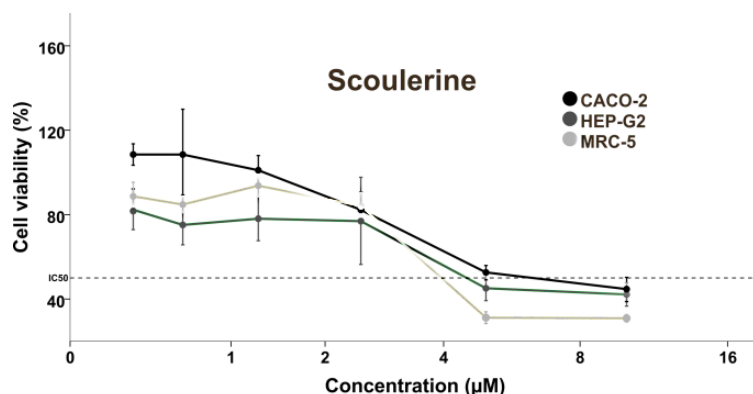
methyldioxy skupiny v poloze C-2/C-3, methoxy skupin v polohách C-10 a C-12. Otevřením methyldioxy skupiny v poloze C-7/C-8 cytotoxická aktivita kvarterních benzo-fenanthridinů klesá (Obr. 18) [19].



**Obr. 18** Závislost cytotoxické aktivity na struktuře benzofenanthridinových alkaloidů.

#### 4.6.2.1.3 Protoberberinové alkaloidy

Během screeningu 11 tetrahydroprotoberberinových a 1 protoberberinového alkaloidu na cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím Caco-2 a Hep-G2, vykazoval pouze (-)-skoulerin významnou aktivitu vůči Caco-2 ( $IC_{50} = 6,44 \pm 0,87 \mu M$ ) a Hep-G2 ( $IC_{50} = 4,57 \pm 0,42 \mu M$ ). Tato látka však vykazovala toxicitu i vůči kontrolní nenádorové linii MRC-5 ( $IC_{50} = 3,21 \pm 0,43 \mu M$ ; Obr. 19). Ostatní studované alkaloidy byly považovány za neaktivní ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) [187].

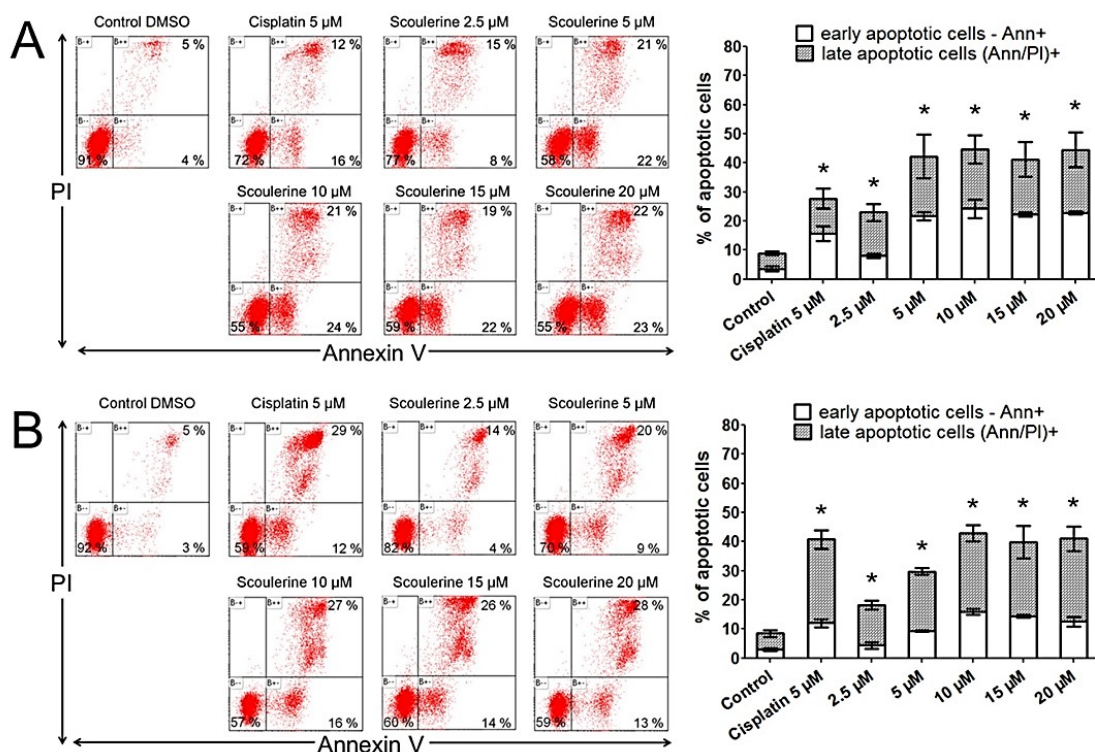


**Obr. 19** Cytotoxická aktivita (-)-skoulerinu na dávce vůči Caco-2, Hep-G2 a MRC-5 [187].

(-)-Skoulerin, cytotoxicky aktivní alkaloid z předchozí studie provedené ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie, Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, byl podroben testování k objasnění mechanismu jeho cytotoxicity. Alkaloid vykazoval výraznou cytotoxickou aktivitu vůči leukemickým buněčným liniím (MOLT-4, Jurkat, Raji, HL-60, U-937 a HEL 92.1.7; hodnoty  $IC_{50}$  se pohybovaly v rozmezí 2,7–6,5  $\mu M$ ). Dále bylo



zjištěno, že v nízkých koncentracích výrazně snižoval viabilitu a proliferaci buněk u MOLT-4 a Jurkat. V případě nádorových linií A549, A2780, SK-BR-3 a MCF-7 neovlivnily nízké koncentrace skoulerinu (1 a 5  $\mu\text{M}$ ) proliferaci buněk. Podařilo se také zjistit, že skoulerin indukuje apoptózu v nádorových buňkách MOLT-4 a Jurkat prostřednictvím aktivace kaspas-3/7, -8 a -9, inhibuje proliferaci vyvoláním zástavy buněčného cyklu v G2 a M fázi, ale nezpůsobuje zlomy vláken DNA. U nádorové linie MOLT-4 a Jurkat se ukázalo, že působením látky dochází ke změně hladin proteinů spojených s apoptózou a kontrolou buněčného cyklu. Dalším mechanismem antiproliferační aktivity skoulerinu je skutečnost, že alkaloid narušoval v buňkách nádorové linie A549 strukturu mikrotubulů (docházelo k výrazné agregaci mikrotubulů v okolí buněčného jádra, naopak hustota mikrotubulů v okrajových částech buňky byla nižší) [274].



**Obr. 20** Účinek skoulerinu na indukci apoptózy u leukemických buněk linií Jurkat (A) a MOLT-4 (B). Apoptóza byla sledována barvením annexinem V a PI 24 hodin po aplikaci skoulerinu. Jsou zde uváděny reprezentativní histogramy jednoho ze tří nezávislých měření. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky ošetřené cisplatinou (5  $\mu\text{M}$ ). Grafy představují procenta časných a pozdních apoptotických buněk detekované průtokovým cytometrem (hodnoty jsou uváděny jako průměr se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých měření). \*Významně se liší od kontroly pro časné a pozdní apoptotické buňky ( $P \leq 0,05$ ).

Výsledky pracovní skupiny ADINACO korelují s publikovanými daty v literatuře, přestože mezi tetrahydroprotoberberinovými alkaloidy bylo nalezeno několik sloučenin s výraznou cytotoxickou aktivitou (koryntenchin, 13-methoxytetrahydropseudoberberin,

13-methyltetrahydropseudoberberin, demethylkorypalmin a thaikanin). Obecně platí, že kvarterní protoberberinové alkaloidy (berberin, oxyberberin, korysamin) vykazují mnohem vyšší cytotoxickou aktivitu [19]. Vysoce perspektivním se jeví alkaloid berberin, který demonstroval velice slibnou cytotoxicitu vůči několika nádorovým buněčným liniím B16, U937, L1210, YES-3, YES-4, Ehrlich-Lettreovu karcinomu, A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 a HCT-15 [275–277].

#### 4.6.2.1.4 Bisbenzylisochinolinové alkaloidy

Bisbenzylisochinolinové alkaloidy zahrnují velký počet alkaloidů s výraznou cytotoxickou aktivitou [278–282]. V kapitole 3.2.3 byla zmíněna jako perspektivní sloučenina alkaloid tetrandrin (Obr. 17), izolovaný z *Stephania tetrandra* S. Moore, který vykazuje silnou cytotoxickou aktivitu inhibicí proliferace a vyvoláním apoptózy vůči různým nádorovým liniím [89,122,127]. Tetrandrin působil synergicky *in vitro* i *in vivo* při současné kombinaci s dalšími chemoterapeutiky [115,116,283].

V rámci screeningu IA na cytotoxicitu vůči nádorovým buněčným liniím Caco-2 a Hep-G2, působil bisbenzylisochinolinový alkaloid (+)-aromolin cytotoxicky na Caco-2, zatímco (+)-berbamin na Hep-G2. Oba alkaloidy (Obr. 17) působil cytotoxicky i na nenádorovou kontrolní linii MRC-5 (Tab. 6). V navazující práci bylo zjištěno, že (+)-berbamin vykázal cytotoxický účinek i na další nádorové linie (Jurkat, HT-29, HeLa a MCF-7), přičemž hodnoty  $IC_{50}$  se pohybovaly ~ 6–10  $\mu\text{M}$  [131].

**Tab. 6 Cytotoxická aktivita (+)-aromolinu a (+)-berbaminu.**

| Sloučenina              | Nádorové b. linie                               |   | Nenádorová b. linie                            |
|-------------------------|---|---|--|
|                         | Caco-2 ( $IC_{50}$ $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup> | Hep-G2 ( $IC_{50}$ $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup> | MRC-5 ( $IC_{50}$ $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup> |
| (+)-aromolin            | 5,58 ± 0,14                                     | >10   | 7,64 ± 2,23                                    |
| (+)-berbamin            | >10   | 4,56 ± 0,32                                     | 4,91 ± 0,49                                    |
| vinorelbin <sup>b</sup> | 0,08 ± 0,00                                     | 0,014 ± 0,03                                    | 0,01 ± 0,00                                    |

<sup>a</sup> výsledky vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka z 3 nezávislých měření; <sup>b</sup> standard

Ve spolupráci s katedrou biologických a biochemických věd z Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice a s Ústavem lékařské biochemie, Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové bylo zjištěno, že nově izolovaný bisbenzylisochinolinový alkaloid (+)-bersavin (Obr. 17) z *Berberis vulgaris* L., inhiboval v pilotním testu cytotoxicity po 48hodinové inkubaci proliferaci a viabilitu buněk linií Jurkat, MOLT-4, HT-29, HeLa a MCF-7. Hodnoty  $IC_{50}$  se pohybovaly v rozmezí 8,1 až 11  $\mu\text{M}$ . 24hodinové

působení (+)-bersavinu o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  způsobilo zástavu buněčného cyklu v G1 fázi a indukovalo apoptózu buněk MOLT-4 [131]. Z publikovaných výsledků je zřejmé, že tento strukturní typ IA může představovat zdroj sloučenin pro vývoj nových antineoplastik.

#### 4.6.2.1.5 Spirobenzylisochinolinové alkaloidy

Spirobenzylisochinolinové alkaloidy představují strukturní typ alkaloidů, které byly ojediněle testovány na cytotoxicitu. Yang-Chang a spol. studovali 53 IA na lidských nádorových buněčných liniích A-549, HCT-8, KB, P-388 a L-1210. Jediná testovaná sloučenina tohoto typu (dihydroochotensimin-*N*-oxid) vykazovala výraznou a selektivní cytotoxickou aktivitu vůči KB ( $\text{ED}_{50} = 2,50 \mu\text{g/ml}$ ) [284].

Ve studii Aljofana a spol. byly testovány v rámci screeningu 2 spirobenzylisochinolinové alkaloidy vůči HepG2; ani jedna ze sloučenin však signifikantní cytotoxicitu nevykázala [285].

Ve studii pracovní skupiny ADINACO, zaměřené na screening cytotoxicity vůči nádorovým liniím Caco-2 a Hep-G2, vykazoval selektivní cytotoxicitu (+)-parfumidin (Obr. 17) na Hep-G2 ( $\text{IC}_{50} = 8,74 \pm 0,29 \mu\text{M}$ ), který neovlivňoval viabilitu buněk kontrolní nenádorové linie MRC-5 ( $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ ). Ostatní testované spirobenzylisochinolinové alkaloidy nevykazovaly významnou cytotoxicitu [187].

Z dosavadních studií vyplývá, že spirobenzylisochinolinové alkaloidy představují zajímavou skupinu alkaloidů se selektivní cytotoxickou aktivitou, která by si zasloužila větší pozornost při hledání cytotoxicky aktivních sloučenin přírodního původu.

#### 4.6.2.1.6 Ftalidisochoinolinové alkaloidy

Ftalidisochoinolinové alkaloidy patří také mezi alkaloidy málo testované na cytotoxickou aktivitu, a tudíž další zkoumání je žádoucí, zvláště když u nejvýznamnějšího zástupce tohoto strukturního typu noskapinu (Obr. 17), byla objevena významná cytotoxická aktivita vůči různým nádorovým buněčným liniím [286,287]. V případě tohoto alkaloidu jsou jeho dalšími výhodami malá cytotoxicita k nenádorovým buňkám [288], regulace buněčného cyklu a aktivace metabolických drah apoptózy; látka zvyšuje citlivost rezistentních nádorových buněk na působení cisplatin [289]. Noskapin byl už klinicky testován v terapii mnohočetného myelomu (fáze I a II). Bylo zjištěno, že jeho případnému terapeutickému využití alkaloidu brání nízká biodostupnost a vysoká hodnota  $\text{ED}_{50}$ . Některé připravené

deriváty noskapinu vykazovaly ještě výraznější cytotoxickou aktivitu než výchozí alkaloid [286,290].

Ve studii pracovní skupiny ADINACO, zaměřené na screening cytotoxické aktivity IA různých strukturních typů vůči Caco-2 a Hep-G2, byly zahrnuty izolované ftalidisochinolinové alkaloidy hydrastin a (+)-bikukullin, které se však ukázaly jako cytotoxicky neaktivní ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) [187] a jsou pro další bližší studie tohoto druhu neperspektivní.

#### 4.6.2.1.7 Protopinové alkaloidy

Protopin (Obr. 17) náleží mezi hojně zastoupené alkaloidy v rostlinách čeledi Papaveraceae, který ve studiích vykazoval střední cytotoxicitu vůči nádorovým buněčným liniím HeLa, MCF-7, U2OS a HL-60 (hodnoty  $IC_{50}$  se pohybovaly mezi 27 až 162  $\mu M$ ) [153,291,292]. Zajímavý je mechanismus jeho cytotoxického působení – působí jako stabilizátor mikrotubulů, zastavuje mitózu a způsobuje apoptickou smrt buňky [293]. Cytotoxická aktivita protopinu byla testována i na dalších nádorových buňkách (H1299, MCF-7 a SMMC-7721) včetně Caco-2 a Hep-G2, nicméně vybrané nádorové linie nebyly citlivé vůči jeho působení [294], jak ukázala studie skupiny ADINACO [187]. Cytotoxickou aktivitu na vybrané nádorové linie nevykázaly ani další protopinové alkaloidy allokryptopin, kryptopin, (-)-korykavamin a ( $\pm$ )-korykavidin [187]. Tyto alkaloidy se tudíž jeví jako neperspektivní pro další studium.

#### 4.6.2.1.8 Další strukturní typy

Benzyltetrahydroisochinolinové a pavinanové alkaloidy patří k méně studovaným strukturním typům alkaloidů. Doposud u nich nebyly nalezeny sloučeniny s významnou cytotoxickou aktivitou [19,295]. Zjištěná data korelují s výsledky naší studie: alkaloidy z uvedených strukturních typů nebyly cytotoxicky aktivní vůči nádorovým buněčným liniím Caco-2 a Hep-G2, rovněž indenobenzazepinový alkaloid *O*-methylyfumarofin a morfinanové alkaloidy (-)-sinuakutin a (-)-pallidin nevykazovaly cytotoxický účinek [187]. Morfinanové alkaloidy jsou považovány za látky bez cytotoxicity [295]. Benzazepinové alkaloidy, které byly izolovány z *Papaver rhoeas* L., jsou také cytotoxicky neaktivními sloučeninami (Tab. 7; nepublikované výsledky skupiny ADINACO), což je výhodné pro použití léčivé drogy *Papaveris rhoeados flos*, která je považována za bezpečnou i pro pediatrické použití [120].

**Tab. 7 Screening cytotoxicity rhoageninu, roeadinu a isorhoeageninu vůči vybraným nádorovým buněčným liniím při koncentraci 10  $\mu$ M (nepublikované výsledky).**

| Buněčná nádorová linie | % buněčné viability po 48hodinové inkubaci |               |              |                          |
|------------------------|--|---------------|--------------|--------------------------|
|                        | rhoeadin                                   | isorhoeagenin | rhoagenin    | doxorubicin <sup>a</sup> |
| Jurkat                 | 94 $\pm$ 13                                | 84 $\pm$ 14   | 95 $\pm$ 13  | 0 $\pm$ 3                |
| MOLT-4                 | 88 $\pm$ 8                                 | 91 $\pm$ 11   | 94 $\pm$ 1   | 0 $\pm$ 1                |
| A549                   | 103 $\pm$ 9                                | 94 $\pm$ 5    | 93 $\pm$ 6   | 66 $\pm$ 16              |
| HT-29                  | 105 $\pm$ 5                                | 108 $\pm$ 6   | 109 $\pm$ 7  | 77 $\pm$ 12              |
| PANC-1                 | 89 $\pm$ 7                                 | 88 $\pm$ 2    | 107 $\pm$ 4  | 59 $\pm$ 9               |
| A2780                  | 90 $\pm$ 15                                | 84 $\pm$ 5    | 98 $\pm$ 3   | 5 $\pm$ 1                |
| HeLa                   | 93 $\pm$ 18                                | 104 $\pm$ 19  | 117 $\pm$ 27 | 7 $\pm$ 10               |
| MCF-7                  | 94 $\pm$ 18                                | 96 $\pm$ 9    | 105 $\pm$ 9  | 41 $\pm$ 7               |
| SAOS-2                 | 80 $\pm$ 2                                 | 84 $\pm$ 3    | 98 $\pm$ 3   | 73 $\pm$ 8               |
| MRC-5 <sup>b</sup>     | 99 $\pm$ 6                                 | 92 $\pm$ 12   | 105 $\pm$ 9  | 40 $\pm$ 4               |

<sup>a</sup> standard (1  $\mu$ M); <sup>b</sup> kontrolní nenádorová buněčná linie

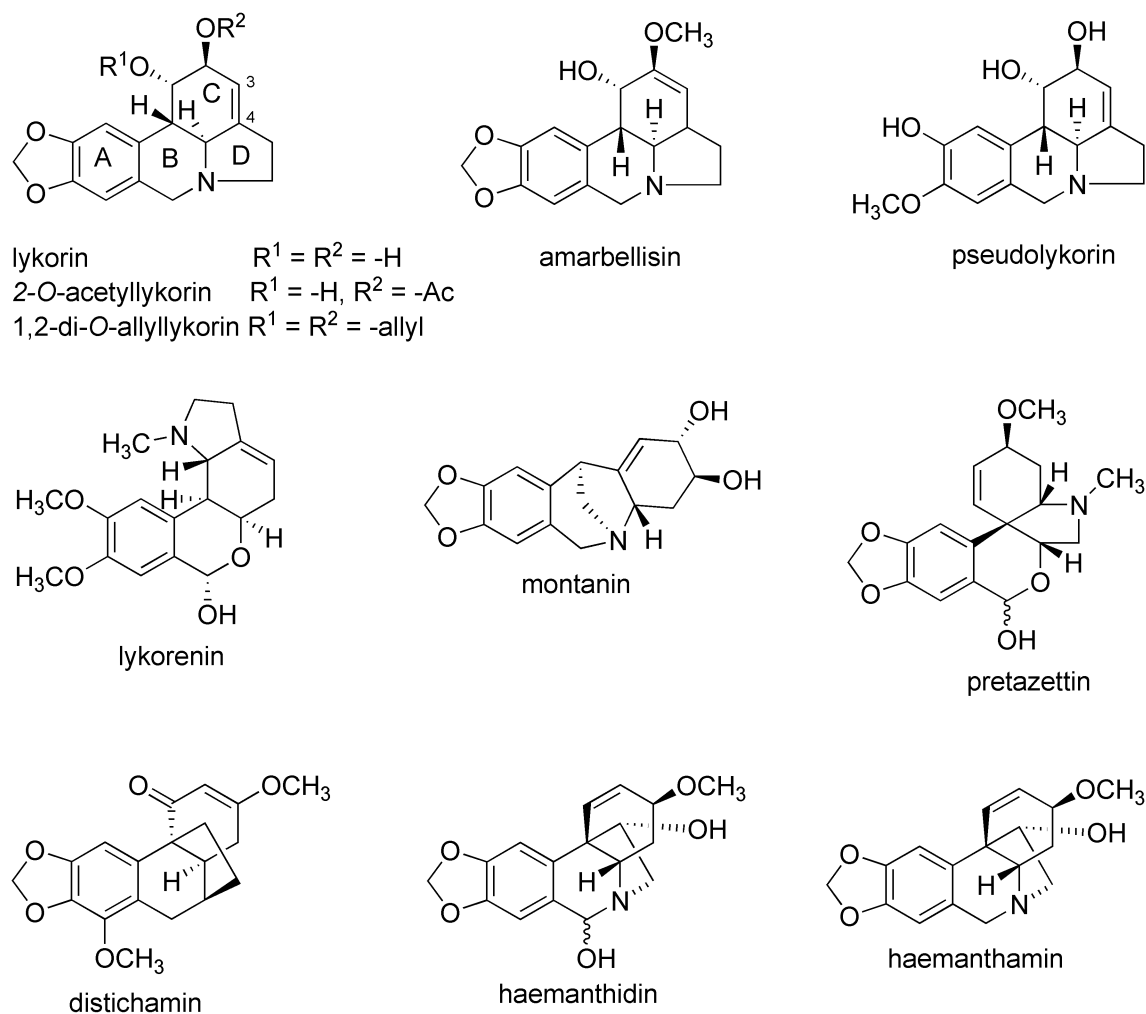
#### 4.6.2.2 Alkaloidy amarylkovitých rostlin

Rostliny z čeledi Amaryllidaceae byly odpradávná používány v tradiční medicíně domorodými obyvateli napříč světem, některé z nich byly indikovány pro léčbu neoplastických onemocnění v oblasti jejich výskytu – v Andách, Středozeří a Jižní Africe [296]. Cytotoxická aktivita AA je závislá na jejich struktuře, mezi nejdéle studované sloučeniny patří alkaloidy lykorinového typu, dále byla tato aktivita objevena u alkaloidů montaninového, haemanthaminového, krininového, tazettinového a pankratistatinového typu [19,112]. Společným mechanismem cytotoxického působení AA je indukce apoptózy v nádorových buňkách [108]. Cytotoxickou aktivitou AA se intenzivně zabývá i skupina ADINACO.

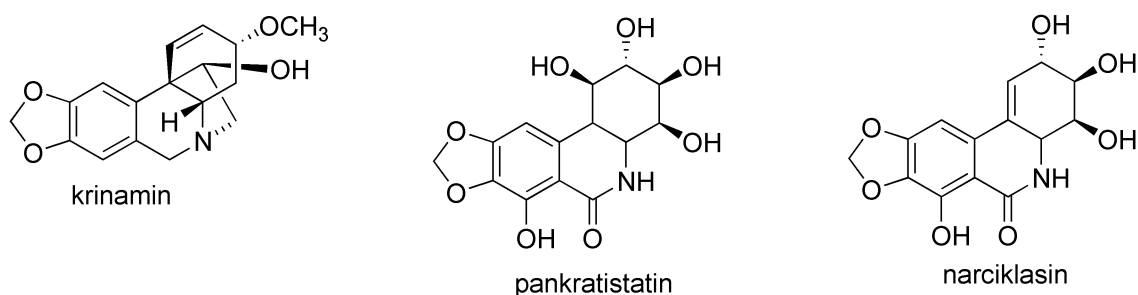
##### 4.6.2.2.1 Lykorinové alkaloidy

Nejvíce studovaným alkaloidem tohoto strukturního typu z pohledu cytotoxicity je lykorin (Obr. 21), který byl poprvé izolován z *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. v roce 1877. Shromážděná data ukazují, že lykorin vykazoval výraznou a selektivní cytotoxicitu inhibicí proliferace u nádorové buněčné linie Hey1B [297], indukoval apoptózu zástavou buněčného cyklu v G0/G1 fázi u HL-60 a KM3 [298]. Dále inhiboval proliferaci MCF [299] a působil cytotoxicky na další nádorové linie [300]. Ve spolupráci s katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky z Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze a s katedrou biologických a biochemických věd z Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice byl zjištěn významný cytotoxický účinek této látky na

p53 mutovanou nádorovou linií Caco-2 a HT-29, přičemž lykorin působil vysoce selektivně na nádorové buňky a kontrolní nenádorovou buněčnou linií FHs 74 Int inhiboval mnohem méně (Obr. 22). Ostatní studované alkaloidy lykorinového typu galanthin a 9-*O*-demethyl-galanthin byly neaktivní [301]. Výzkum cytotoxických vlastností lykorinu byl směřován i k přípravě derivátů a vyústil v syntézu 1,2-di-*O*-allyllykorinu (Obr. 21), který byl 100× účinnější vůči humánní nádorové linii U373 než výchozí sloučenina [302]. Mezi další lykorinové alkaloidy se silnou cytotoxickou aktivitou vůči různým nádorovým liniím patří pseudolykorin, 2-*O*-acetyllykorin a amarbellisin (Obr. 21). Celkově bylo na cytotoxicitu testováno více než 150 lykorinových alkaloidů nebo jejich polosyntetických derivátů [19,111]. Pro zachování cytotoxické aktivity tohoto typu alkaloidů je nezbytná přítomnost terciárního atomu dusíku, konfigurace 2 hydroxylových skupin na kruhu C s volnou konformací a přítomností dvojné vazby v poloze C-3/C-4 (Obr. 21) [19].



Obr. 21 AA a jejich deriváty s významnou cytotoxickou aktivitou.



**Obr. 21 AA a jejich deriváty s významnou cytotoxickou aktivitou (pokračování).**

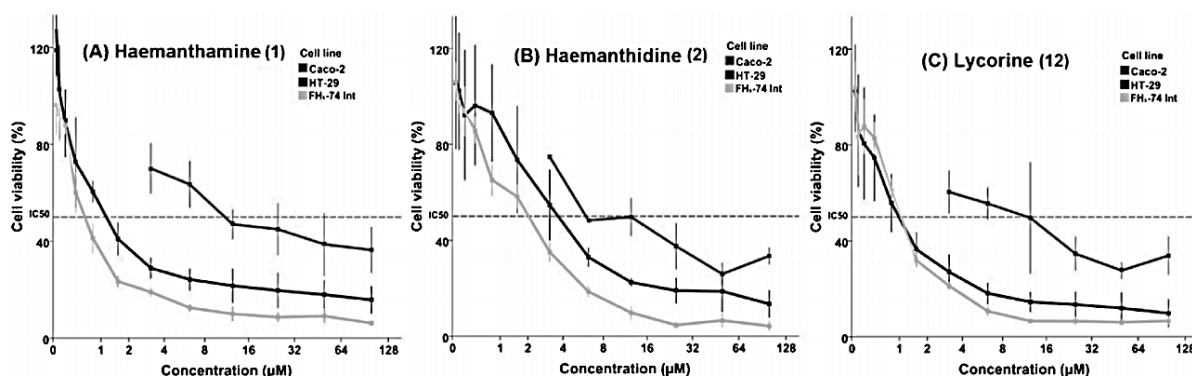
#### 4.6.2.2.2 Montaninové alkaloidy

Cytotoxicita alkaloidů montaninového strukturního typu byla zjištěna teprve nedávno. První zmínka o cytotoxické aktivitě montaninu byla publikována v roce 2008, kdy byl izolován z cibulí *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herb. Montanin (Obr. 21) díky slibné cytotoxické aktivitě představuje potenciální antineoplastikum nebo „lead structure“ pro vývoj nového antineoplastika. Významná cytotoxická aktivita byla zjištěná i u dalších alkaloidů montaninového typu vůči různým nádorovým buněčným liniím (pankracin, kokcinin a manthin) [303].

#### 4.6.2.2.3 Krinanové alkaloidy

Krinanové alkaloidy jsou děleny na 2 strukturní podtypy – krininové a haemanthaminové. Dříve byly tyto sloučeniny označovány jako alkaloidy  $\alpha$ - a  $\beta$ -krinanové [227]. Mezi krininovými alkaloidy se jeví jako perspektivní sloučenina distichamin (Obr. 21), vyskytující se pouze v rodu *Boophone* Herb. [304], který vykazoval silný antiproliferační účinek vůči linii HeLa ( $IC_{50} = 2,2 \mu M$ ). Ostatní krininové alkaloidy byly neaktivní. Mechanismus cytotoxického působení distichaminu spočívá v ovlivnění buněčného cyklu a indukci apoptózy prostřednictvím aktivací kaspas [305]. Distichamin byl cytotoxicky aktivní i vůči dalším nádorovým liniím CEM, MCF-7, K562 a G-361 ( $IC_{50} = 1,6\text{--}10,6 \mu M$ ), ale bohužel i k nenádorové linii BJ [306]. Nicméně tuto látku můžeme označit za perspektivní pro vývoj potenciálního antineoplastika. Pro další studie cytotoxicity alkaloidu je omezující jeho dostupnost z přírodních zdrojů, v nichž se nachází v minoritním množství. Bufanisin, krininový alkaloid izolovaný ve skupině ADINACO z *Nerine bowdenii* W. Watson, vykazoval zajímavou a selektivní cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím p53 mutované Caco-2 ( $IC_{50} = 8,6 \pm 0,2 \mu M$ ) a HT-29 ( $IC_{50} = 5,3 \pm 1,7 \mu M$ ). Vůči nenádorové linii FHs 74 Int vykazoval nízkou cytotoxicitu ( $IC_{50} > 20 \mu M$ ) [123].

Haemanthaminové alkaloidy představují zdroj vysoce aktivních sloučenin s cytotoxickým účinkem. Mezi nejúčinnější zástupce tohoto typu patří haemanthamin, haemanthidin, a krinamin (Obr. 21) [19]. Ve skupině ADINACO byly haemanthamin a haemanthidin nejprve izolovány ze *Zephyranthes robusta* Baker [228], haemanthamin později také z *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol [17]. Ve spolupráci s katedrou biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice byl objasněn mechanismus jejich cytotoxického působení – alkaloidy indukují apoptózu v buňkách p53 negativní nádorové linie Jurkat, ve kterých tyto alkaloidy zastavují buněčný cyklus v G1 a G2 fázi a zvyšují expresi P16 a fosforylaci Chk1 Ser 345 [307]. Ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie, Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové bylo zjištěno, že při společné aplikaci haemanthaminu s butyrátem sodným (na rozdíl od samostatného podání obou látek), dochází k synergismu inhibice růstu a smrti v buňkách nádorové linie vaječníku (A2780), ve kterých došlo ke změně acetylace histonů, exprese p21<sup>WAF1/Cip1</sup> a aktivaci Chk1 a Chk2. Při současném podání obou sloučenin nebyla zjištěna zvýšená toxicita vůči nenádorové buněčné linii MRC-5 [308]. V další spolupráci s katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky z Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze byly testovány haemanthamin a haemanthidin spolu s dalšími 11 alkaloidy vůči nádorovým liniím Caco-2 a HT-29. Oba jmenované alkaloidy působily signifikantně cytotoxicky na obě nádorové linie a zároveň neovlivňovaly negativně nenádorovou kontrolní linii FHs 74 Int [301]. Krinamin, který nebyl dosud izolován na našem pracovišti, vykazoval slibnou cytotoxickou aktivitu indukci apoptózy u nádorové linie Jurkat [309] a byl shledán výrazně cytotoxicky aktivní i vůči dalším nádorovým liniím [310].



Obr. 22 Křivka závislosti cytotoxicity haemanthaminu (1), (B) haemanthidinu (2) a (C) lykorinu (12) na dávce [301].

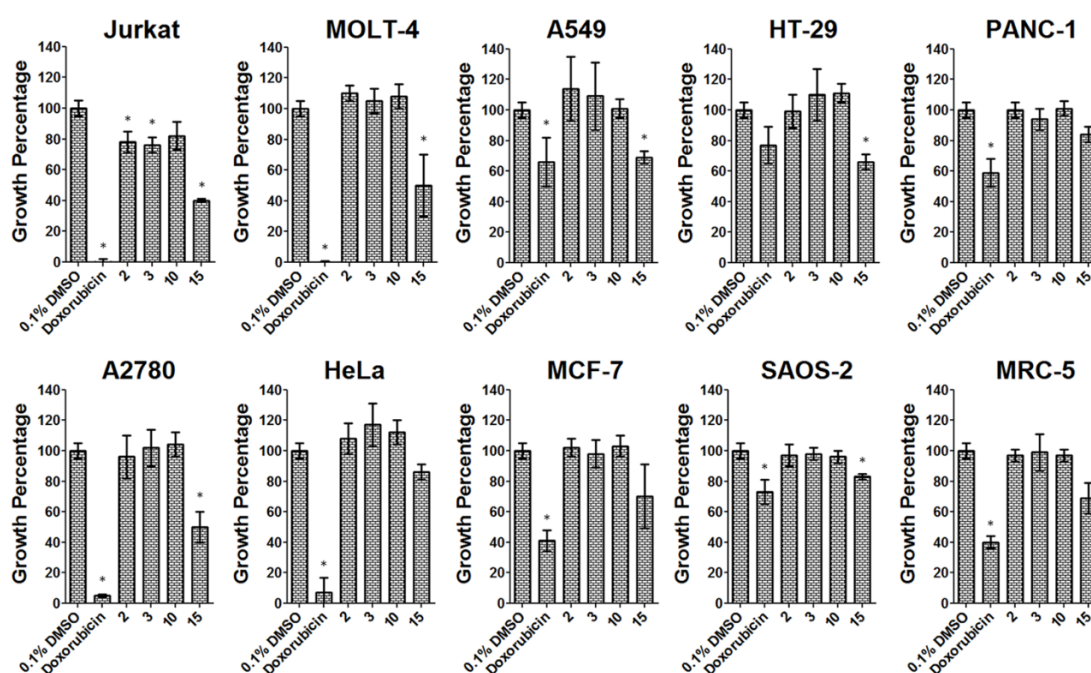


#### 4.6.2.2.4 Tazettinové alkaloidy

Do tohoto strukturního typu patří alkaloidy odvozené od 2-benzo[3,4-c]indolu. Většina alkaloidů této skupiny vykazuje jen mírnou (nebo střední) cytotoxickou aktivitu [311]. Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky publikovanými pracovní skupinou ADINACO, které byly získány z testování tazettinu na nádorových liniích Caco-2 a HT-29 [123,301]. Cytotoxicky mnohem účinnějším alkaloidem je pretazettin (Obr. 21), který patří mezi neaktivnější alkaloidy působící na linii MOLT-4. V testech *in vitro* vykazoval signifikantní cytotoxickou aktivitu na Rauscher leukemické buňky, buňky Lewisova karcinomu a buňky spontánní AKR lymfocytární leukemie [312]. Pretazettin rovněž inhiboval růst HeLa buněk, snižoval aktivitu P-gp a zesiloval účinek doxorubicinu u rezistentních forem myších leukemií [112]. Je zřejmé, že mechanismus cytotoxicity tazettinových alkaloidů spočívá v inhibici proteosyntézy, indukci apoptózy a ovlivnění efluxních pump [311].

#### 4.6.2.2.5 Homolykorinové alkaloidy

Homolykorinové alkaloidy nejsou obvyklým zdrojem vysoce aktivních cytotoxických sloučenin. Mezi neaktivnější alkaloidy patří lykorenin (Obr. 21), u kterého byla nalezena slibná aktivita vůči Hep-G2 ( $ED_{50} = 1,2 \mu\text{g/ml}$ ). Dubiusin ( $ED_{50} = 4,4 \mu\text{g/ml}$ ) a 9-*O*-demethyl-2 $\alpha$ -hydroxyhomolykorin ( $ED_{50} = 2,5 \mu\text{g/ml}$ ) působily cytotoxicky vůči MOLT-4. Mechanismus účinku homolykorinových alkaloidů vychází z inhibice topoisomerasy [313].



Obr. 23 Cytotoxická aktivita homolykorinu (2), massoninu (3), hippeastrinu (10) a odulinu (15) sledovaná po jednorázovém podání alkaloidů (10  $\mu\text{M}$ ). Doxorubicin (1  $\mu\text{M}$ ) byl použit jako pozitivní standard. \*  $P < 0,05$  vs. 0,1% DMSO (negativní kontrola).

Ve studii pocházející z naší laboratoře (Šafratová a spol.) byly testovány na cytotoxickou aktivitu homolykorinové alkaloidy homolykorin, massonin, hippeastrin a odulin vůči nádorovým liniím Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2. Jako kontrolní nenádorová buněčná linie byla použita MRC-5. Testované alkaloidy nevykazovaly při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  v porovnání se standardem doxorubicinem (1  $\mu\text{M}$ ) výraznou cytotoxickou aktivitu (Obr. 23) [17]. Tyto izolované homolykorinové alkaloidy se jeví pro další studium jako cytotoxicky neperspektivní sloučeniny.

#### 4.6.2.2.6 Pankratistatinové alkaloidy

Na závěr je potřebné zmínit se krátce o alkaloidech pankratistatinového strukturního typu, zahrnujících sloučeniny odvozené od fenanthridinu, které sice nebyly dosud izolovány ze studovaných taxonů v naší laboratoři, ale představují velice zajímavý zdroj potenciálních antineoplastik s perspektivou klinického použití. Nejvýznamnější zástupci toho strukturního typu jsou alkaloidy narciklasin a pankratistatin (Obr. 21), které vykazují silnou a selektivní antiproliferační aktivitu vůči různým nádorovým liniím *in vitro* [19,112]. Rovněž *in vivo* testování na zvířatech prokázalo výraznou antitumorovou aktivitu [314–316]. Limitujícím faktorem pro případné klinické použití obou alkaloidů je jejich nízká rozpustnost ve vodě (zvýšení rozpustnosti pro preklinické použití bylo dosaženo přípravou esteru s kyselinou fosforečnou za tvorby pankratistatin-7-*O*-fosfátu) [314]. Z obou základních alkaloidů bylo připraveno velké množství derivátů, některé z nich vykazovaly slibnou aktivitu, která byla až několikanásobně vyšší než v případě výchozích molekul. Jako zajímavá látka pro podrobnější studie se jeví derivát 1-*O*-benzoylpankratistatin [317].

Z cibulí rostlin rodu *Hymenocallis* Salisb. byly kromě pankratistatinu a narciklasinu izolovány i 7-deoxy-*trans*-dihydronarciklasin a 7-deoxynarciklasin, které vykazovaly výraznou cytotoxickou aktivitu [318]. Podobně byly získány z cibulí *Zephyranthes carinata* Herb. deriváty pankratistatinu: 1-*O*-(3-hydroxybutyryl)pankratistatin a 1-*O*-(3-*O*- $\beta$ -D-glukopyranosylbutyryl)pankratistatin. Sloučeniny vykazovaly významnou cytotoxicitu na lidské nádorové linie (HeLa, KB a P388-DI) srovnatelnou s pankratistatinem [319]. Nevýhodou izolovaných derivátů narciklasinu a pankratistatinu pro podrobnější studie je jejich obtížná získatelnost z přírodních zdrojů – z kvantitativního hlediska představují minoritně zastoupené alkaloidy.

## 5 ZÁVĚR A VÝHLED DO BUDOUCNA

Terapeutické účinky IA a AA využívá lidstvo po staletí, proto nepřekvapí, že první izolovanou sloučeninou přírodního původu byl morfin, IA pocházející z *Papaver somniferum* L., který v roce 1804 izoloval z opia lékárník Friedrich Sertürner. Díky jedinečným vlastnostem se morfin jako opioidní analgetikum-anodynum používá do současnosti, přestože jsou v klinické praxi často používána i synteticky připravená opioidní analgetika. S rozvojem chromatografických a spektrálních metod od poloviny 20. století bylo izolováno a identifikováno velké množství přírodních látek, včetně IA a AA, a mohlo by se zdát, že výzkum isochinolinových alkaloidů *s.l.* je už překonán a nemůže přinášet nové poznatky. Opak je ale pravdou, protože fytochemický výzkum obou typů alkaloidů vede k izolacím nových sloučenin a díky pokroku ve spektrálních metodách jsou revidovány struktury dříve popsanych sloučenin. Současně jsou s rozvojem nových farmakologických a biochemických modelů objevovány nové biologické účinky dříve izolovaných alkaloidů a možnosti nových indikací u léčiv v praxi už používaných. Jako příklad lze uvést noskapiin, alkaloid izolovaný z *Papaver somniferum* L., který byl v této práci několikrát zmíněn (dlouhodobě je používán jako antitusikum) a který představuje v současnosti potenciální antineoplastikum s nízkou cytotoxicitou vůči nenádorovým buňkám.

K nalezení nových potenciálních léčiv přírodního původu lze použít nové přístupy, které vycházejí nejen z poznatků používání rostlin v lidovém léčitelství, ale i díky stále populárnějším *in silico* metodám. Na základě těchto *in silico* studií byly objeveny mimo jiné i silné alkaloidní inhibitory cholinesteras různých strukturních typů, případně díky dockingu byly navrženy selektivnější inhibitory AChE nebo BChE [126,320–323].

Jako příklad osobního rázu lze zmínit výsledky studia IA izolovaných na našem pracovišti z dymnivky duté, *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte, která se používala v dánském lidovém léčitelství mimo jiné i v terapii paměťové dysfunkce [324]. Screening cholinesterasové inhibiční aktivity extraktu vedl k izolaci alkaloidů, z nichž (+)-thaliktrikavin a (+)-kanadin vykazovaly výraznou a selektivní inhibici *hAChE*, která je srovnatelná s používaným léčivem galanthaminem. Pomocí *in silico* modelování bylo zjištěno, že oba alkaloidy se váží do aktivního centra enzymu na podjednotku stejnou jako substrát ACh. Izolované alkaloidy z dymnivky duté inhibují i další enzymy, které představují potenciální terapeutické cíle u AD (POP). Na základě moderních přístupů lze říci, že používání hlíz

dymnivky duté v lidovém léčitelství při terapii paměťových dysfunkcí můžeme považovat z pohledu získaných dat za opodstatněné.

Z obecného pohledu terapie neurodegenerativních onemocnění a neoplastických procesů představují IA a AA zdroj potenciálních a později snad i nových léčiv, z nichž některé jsou už klinicky používány, nebo se nacházející v klinických fázích zkoušek. Jako příklad týkající se této práce lze uvést současnou terapii AD, která vychází z EBM a která je založena na používání inhibitorů cholinesteras a blokátorů NMDAR. Galanthamin, izolovaný poprvé z cibulí *Galanthus woronowii* Losinsk. v roce 1952 [204], je selektivním inhibitorem AChE a do klinické praxe pro terapii AD byl zaveden v 2001. Inhibitory cholinesteras jsou stále nosným tématem pro hledáním nových potenciálních léčiv, bylo totiž zjištěno, že mohou mít další neuroprotektivní účinky [56,140], které nejsou založeny jen na inhibici cholinesteras, zvláště pokud další možné terapeutické cíle v klinických fázích zkoušek selhaly [45]. Z prací, které byly publikovány v rámci skupiny ADINACO vyplývá, že perspektivními sloučeninami pro další studium se jeví alkaloidy galanthamin-galanthindolového (narcikachninového) typu. Tyto nové alkaloidy mohou ovlivňovat více terapeutických cílů u AD např. narcimatulin (inhibitor hBChE, POP a GSK-3 $\beta$ ; [18]) a narcieliin (inhibitor hAChE, hBChE a POP; [169]), což je žádoucí díky komplexnosti patofyziologie této nemoci. Perspektivní pro hledání potenciálních léčiv se zdají být i alkaloidy belladinového strukturního typu, které selektivně inhibují hBChE [13]. Další slibný přístup k nalezení potenciálních léčiv představuje i příprava semisyntetických derivátů.

Zájem o antineoplastika přírodního původu mezi alkaloidy byl vyvolán úspěchem alkaloidů vinkristinu a vinblastinu, izolovaných z *Catharanthus roseus* (L.) G. Don a dalších přírodních sloučenin (viz kapitola 3.2.2), které znamenaly velký pokrok v terapii nádorových onemocnění. Významná cytotoxicita byla objevena u různých strukturních typů IA a AA. Z AA představují lykorinové, montaninové, krinanové a zejména pankratistatinové alkaloidy perspektivní sloučeniny. V současnosti probíhá intenzivní klinické testování alkaloidů posledně jmenovaného strukturního typu (pankratistatin a narciklasin). Výhodou AA je jejich selektivní cytotoxicita vůči nádorovým buňkám. Z IA s.s. jsou slibnými alkaloidy s cytotoxickým účinkem už zmíněný ftalidisochinolinový alkaloid noskapin, dále byly identifikovány alkaloidy se slibnou cytotoxickou aktivitou u protoberberinových, aporfinových, benzofenanthridinových a bisbenzylisochinolinových alkaloidů [19].

Po shrnutí získaných poznatků o IA a AA, které jsou v současnosti k dispozici, lze konstatovat, že tyto látky představují stále perspektivnější oblast výzkumu pro nalezení potenciálních (nových) léčiv nebo nových indikací použití už známých molekul.

Moje představa – výhled do budoucna – která by měla vést k naplnění výše uvedeného přehledu, může působit do určité míry jako vize, protože práce s rostlinným materiálem je fyzicky náročná, podstatně náročnější než čistá totální syntéza. V nejbližší budoucnosti je hlavním úkolem:

- 1) Podílet se na optimalizaci separace biologicky aktivních látek v pracovní skupině ADINACO za použití preparativní chromatografie. Zvláště efektivní se jeví spojení frakcionace extraktů/frakcí flash chromatografií a následné izolování čistých látek preparativní HPLC,
- 2) Doplnování knihovny alkaloidů (MS spektra) s využitím údajů z vlastní práce i relevantních údajů z literatury,
- 3) Kromě IA rozšířit svoji práci do oblasti indolových alkaloidů (izolaci alkaloidů z nati *Vinca minor* L. jsem už začal provádět), nejen monomerních, ale zejména binárních indolových alkaloidů, které se podle zkušeností v pracovní skupině ADINACO ukazují jako velmi zajímavý zdroj „hit-structures“ pro inhibici BChE, GSK-3 $\beta$  a neoplastických procesů. V současnosti patří mezi mnou studované látky i chinolizidinové alkaloidy obsažené v *Nuphar lutea* (L.) Smith. Připravený sumární alkaloidní extrakt z kořenů a oddenků této rostliny vykazoval ve screeningu výraznou cytotoxickou aktivitu vůči několika vybraným nádorovým liniím a také selektivně inhiboval *h*BChE,
- 4) Využít ve větší míře spolupráci v oblasti CADD, především chemického dockingu s cílem nalezení farmakoforu v oblasti neuroprotektivní aktivity (inhibice AChE BChE, GSK-3 $\beta$ , studium IA a AA jako potenciálních agonistů PPR $\gamma$ ),
- 5) Zaměřit větší pozornost na taxony rostlin s obsahem IA a indolových alkaloidů z jiných geografických oblastí především těch, které nebyly z fytochemicko-farmakologického pohledu studovány, anebo byly studovány jen omezeně.

Je velmi pozitivní, že pracovní skupina ADINACO se pohybuje z vědeckého pohledu v poměrně úzkém koridoru, návaznost práce jednotlivých členů je vysoká a skupina je svázána s řadou mimofakultních spoluprací, což jí umožňuje soustředit se na hloubku problému obou témat, jimiž se zabývá. Nicméně převažující pracovní zainteresovanost je logicky spojena s prací invenčních studentů doktorského studia. Právě v této oblasti bohužel existují dosud určitá prázdná místa: Česká republika není zemí s výrazným profilem farmaceutického průmyslu, natož části, zabývající se vegetabilním materiálem a jeho výzkumem. Ačkoliv se v posledních letech začíná zájem o tuto oblast rozšiřovat produkcí nutraceutik, bude trvat ještě řadu let, než bude situace konsolidována na úroveň západoevropských zemí, v nichž má použití (léčivých) rostlin tradici (Německo, Švýcarsko, Francie).

## 6 LITERATURA

- [1] S.A. Tabish, Lifestyle diseases: Consequences, characteristics, causes and control, *J. Cardiol. Curr. Res.* 9 (2017). 00326. <https://doi.org/10.15406/jccr.2017.09.00326>.
- [2] <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43314> (staženo 26. 8. 2020).
- [3] U.E. Bauer, P.A. Briss, R.A. Goodman, B.A. Bowman, Prevention of chronic disease in the 21st century: elimination of the leading preventable causes of premature death and disability in the USA, *The Lancet.* 384 (2014) 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60648-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60648-6).
- [4] L.E. Wroblewski, R.M. Peek, K.T. Wilson, *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk, *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (2010) 713–739. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-10>.
- [5] M. Agassandian, G.V. Shurin, Bacterial infections and cancer development, in: M.R. Shurin, Y. Thanavala, N. Ismail (eds.), *Infection and cancer: bi-directional interactions*, Springer International Publishing, Cham, 2015, 49–74. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20669-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20669-1_4).
- [6] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (staženo 2. 4. 2019).
- [7] <https://www.healthline.com/health/non-communicable-diseases-list> (staženo 26. 8. 2020).
- [8] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2015, *CA Cancer J. Clin.* 65 (2015) 5–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>.
- [9] A. Lleó, Current therapeutic options for Alzheimer’s disease, *Curr. Genom.* 8 (2007) 550–558. <https://doi.org/10.2174/138920207783769549>.
- [10] <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/> (staženo 26. 9. 2020).
- [11] C. Ballatore, K.R. Brunden, D.M. Huryn, J.Q. Trojanowski, V.M.-Y. Lee, A.B. Smith, Microtubule stabilizing agents as potential treatment for Alzheimer’s disease and related neurodegenerative tauopathies, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 8979–8996. <https://doi.org/10.1021/jm301079z>.
- [12] J. Chlebek, J. Korábečný, R. Doležal, Š. Štěpánková, D.I. Pérez, A. Hošťálková, L. Opletal, L. Cahlíková, K. Macáková, T. Kučera, M. Hrabínová, D. Jun, *In vitro* and *in silico* acetylcholinesterase inhibitory activity of thalictricavine and canadine and their predicted penetration across the blood-brain barrier, *Molecules.* 24 (2019) 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules24071340>.
- [13] A. Al Mamun, J. Maříková, D. Hulcová, J. Janoušek, M. Šafratová, L. Nováková, T. Kučera, M. Hrabínová, J. Kuneš, J. Korábečný, L. Cahlíková, Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase, *Biomolecules.* 10 (2020) 800. <https://doi.org/10.3390/biom10050800>.
- [14] A. Hošťálková, J. Maříková, L. Opletal, J. Korábečný, D. Hulcová, J. Kuneš, L. Nováková, D.I. Pérez, D. Jun, T. Kučera, V. Andrisano, T. Siatka, L. Cahlíková, Isoquinoline alkaloids from *Berberis vulgaris* as potential lead compounds for the treatment of Alzheimer’s disease, *J. Nat. Prod.* 82 (2019) 239–248. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00592>.
- [15] L. Cahlíková, D.I. Pérez, Š. Štěpánková, J. Chlebek, M. Šafratová, A. Hošťálková, L. Opletal, *In vitro* inhibitory effects of 8-*O*-demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across the blood–brain barrier, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1189–1192. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00191>.

- [16] J. Chlebek, K. Macáková, L. Cahlíková, M. Kurfürst, J. Kuneš, L. Opletal, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae), *Nat. Prod. Commun.* 6 (2011) 607–610. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600507>.
- [17] M. Šafratová, A. Hošťálková, D. Hulcová, K. Breiterová, V. Hrabcová, M. Machado, D. Fontinha, M. Prudêncio, J. Kuneš, J. Chlebek, D. Jun, M. Hrabínová, L. Nováková, R. Havelk, M. Seifrtová, L. Opletal, L. Cahlíková, Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity, *Arch. Pharm. Res.* 41 (2018) 208–218. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-1000-4>.
- [18] D. Hulcová, J. Maříková, J. Korábečný, A. Hošťálková, D. Jun, J. Kuneš, J. Chlebek, L. Opletal, A. De Simone, L. Nováková, V. Andrisano, A. Růžička, L. Cahlíková, Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease, *Phytochemistry*. 165 (2019) 112055. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112055>.
- [19] Z.X. Qing, J.L. Huang, X.Y. Yang, J.H. Liu, H.L. Cao, F. Xiang, P. Cheng, J.G. Zeng, Anticancer and reversing multidrug resistance activities of natural isoquinoline alkaloids and their structure-activity relationship, *Curr. Med. Chem.* 25 (2018) 5088–5114. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920125135>.
- [20] J.D. Phillipson, Phytochemistry and medicinal plants, *Phytochemistry*. 56 (2001) 237–243. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00456-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00456-8).
- [21] D.A. Dias, S. Urban, U. Roessner, A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites*. 2 (2012) 303–336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.
- [22] G.M. Cragg, D.J. Newman, K.M. Snader, Natural products in drug discovery and development, *J. Nat. Prod.* 60 (1997) 52–60. <https://doi.org/10.1021/np9604893>.
- [23] <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2013-2-8/prolegomenon-ceske-farmakognozie-21-stoleti-40914> (staženo 29. 1. 2021).
- [24] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- [25] S. Mushtaq, B.H. Abbasi, B. Uzair, R. Abbasi, Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents, *EXCLI J.* 17 (2018). 420–451. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2018-1174>.
- [26] M.S. Butler, Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials, *Nat. Prod. Rep.* 22 (2005) 162–195. <https://doi.org/10.1039/b402985m>.
- [27] P. Monciardini, M. Iorio, S. Maffioli, M. Sosio, S. Donadio, Discovering new bioactive molecules from microbial sources, *Microb. Biotechnol.* 7 (2014) 209–220. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12123>.
- [28] I. Ahmad, F. Aqil, M. Owais (eds.), *Modern phytomedicine: turning medical plants into drugs*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006. <https://doi.org/10.1002/9783527609987>.
- [29] M. Lahlou, The success of natural products in drug discovery, *Pharmacol. Pharm.* 4 (2013) 17–31. <https://doi.org/10.4236/pp.2013.43A003>.
- [30] R. Verpoorte, Medicinal Plants: A renewable resource for novel leads and drugs, in: K.G. Ramawat (ed.), *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine*, Springer, Berlin, Heidelberg (2009) 1–5. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79116-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79116-4_1).
- [31] L. Cahlíková, M. Šafratová, A. Hošťálková, J. Chlebek, D. Hulcová, K. Breiterová, L. Opletal, Pharmacognosy and its role in the system of profile disciplines in pharmacy, *Nat. Prod. Commun.* 15 (2020) 1–7. <https://doi.org/10.1177/1934578X20945450>.
- [32] L. Opletal, V. Opletalová, *Lék a jeho vývoj v dějinách*, 1. vyd., Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha, 1999. ISBN: 80-7184-772-0.

- [33] D. Suchý, M. Hora, J. Fínek, Vývoj a klinické hodnocení nových léčiv, *Česká Urologie*. 13 (2009) 141–148.
- [34] L. Součková, H. Kostková, R. Demlová, Jak se vyvíjí nový lék, *Prakt. Lékáren*. 11 (2015) 144–147.
- [35] P. Koščová, I. Provazník, Racionální návrh léčiv s využitím farmakoforového modelování, *Chem. Listy*. 110 (2016) 575–580.
- [36] M. Doležal, *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*, Karolinum, Praha, 2013. ISBN 9788024624075.
- [37] C.A. Lane, J. Hardy, J.M. Schott, Alzheimer's disease, *Eur. J. Neurol*. 25 (2018) 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>.
- [38] F. Koukolík, R. Jiráček, *Alzheimerova nemoc a další demence*, Grada Publishing, Praha, 1998. ISBN 8071696153.
- [39] R. Jiráček, I. Holmerová, C. Borzová, *Demence a jiné poruchy paměti: komunikace a každodenní péče*, Grada Publishing, Praha, 2011. ISBN 978-80-247-6629-4.
- [40] M. Herrera-Rivero, Chapter 2 - Late-onset Alzheimer's disease: risk factors, clinical diagnosis and the search for biomarkers, *Neurodeg. Dis.* (2013). <https://doi.org/10.5772/53775>.
- [41] S.Y. Park, Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources, *Arch. Pharmacol. Res.* 33 (2010) 1589–1609. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-1010-y>.
- [42] M. Rasool, A. Malik, M.S. Qureshi, A. Manan, P.N. Pushparaj, M. Asif, M.H. Qazi, A.M. Qazi, M.A. Kamal, S.H. Gan, I.A. Sheikh, Recent updates in the treatment of neurodegenerative disorders using natural compounds, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014 (2014) 979730. <https://doi.org/10.1155/2014/979730>.
- [43] D.K. Lahiri, M.R. Farlow, N.H. Greig, K. Sambamurti, Current drug targets for Alzheimer's disease treatment, *Drug Develop. Res.* 56 (2002) 267–281. <https://doi.org/10.1002/ddr.10081>.
- [44] L. Cahlíková, K. Macáková, N. Benešová, J. Chlebek, A. Hošťálková, L. Opletal, Chapter 6 - Natural compounds (small molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: a critical review, in: Atta-ur-Rahman (ed.), *Studies in natural products chemistry*, Elsevier, 2014, 153–194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63281-4.00006-9>.
- [45] R. Anand, K.D. Gill, A.A. Mahdi, Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future, *Neuropharmacol.* 76 (2014) 27–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.004>.
- [46] S. Ogishima, S. Mizuno, M. Kikuchi, A. Miyashita, R. Kuwano, H. Tanaka, J. Nakaya, A map of Alzheimer's disease–signaling pathways: a hope for drug target discovery, *Clin. Pharmacol. Ther.* 93 (2013) 399–401. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.37>.
- [47] S. Mizuno, R. Iijima, S. Ogishima, M. Kikuchi, Y. Matsuoka, S. Ghosh, T. Miyamoto, A. Miyashita, R. Kuwano, H. Tanaka, *AlzPathway*: a comprehensive map of signaling pathways of Alzheimer's disease, *BMC Syst. Biol.* 6 (2012) 52. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-52>.
- [48] J.C. de la Torre, Alzheimer's disease: How does it start?, *J. Alzheimer's Dis.* 4 (2002) 497–512. <https://doi.org/10.3233/JAD-2002-4606>.
- [49] S.Y. Hung, W.M. Fu, Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease, *J. Biomed. Sci.* 24 (2017) 47. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0355-7>.
- [50] E. Lauretti, O. Dincer, D. Praticò, Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 1867 (2020) 118664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118664>.



- [51] P.T. Männistö, J. Venäläinen, A. Jalkanen, J.A. García-Horsman, Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders, *Drug News Perspect.* 20 (2007) 293–305. <https://doi.org/10.1358/dnp.2007.20.5.1120216>.
- [52] R. Jiráček, Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby, *Neurol. pro Praxi.* 2 (2002) 101–105.
- [53] P. Patil, A. Thakur, A. Sharma, S.J.S. Flora, Natural products and their derivatives as multifunctional ligands against Alzheimer’s disease, *Drug Develop. Res.* 81 (2020) 165–183. <https://doi.org/10.1002/ddr.21587>.
- [54] P. Williams, A. Sorribas, M.J.R. Howes, Natural products as a source of Alzheimer’s drug leads, *Nat. Prod. Rep.* 28 (2011) 48–77. <https://doi.org/10.1039/C0NP00027B>.
- [55] P.P.N. Rao, A.T. Pham, A. Shakeri, Chapter 11 - Discovery of small molecules for the treatment of Alzheimer’s disease, in: A. Trabocchi, E. Lenci (eds.), *Small Molecule Drug Discovery*, Elsevier, 2020, 289–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818349-6.00011-X>.
- [56] H. Zhang, New insights into huperzine A for the treatment of Alzheimer’s disease, *Acta Pharmacol. Sin.* 33 (2012) 1170–1175. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.128>.
- [57] P.J. Houghton, Y. Ren, M.J. Howes, Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi, *Nat. Prod. Rep.* 23 (2006) 181–199. <https://doi.org/10.1039/b508966m>.
- [58] G. Hussain, A. Rasul, H. Anwar, N. Aziz, A. Razzaq, W. Wei, M. Ali, J. Li, X. Li, Role of plant derived alkaloids and their mechanism in neurodegenerative disorders, *Int. J. Biol. Sci.* 14 (2018) 341–357. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23247>.
- [59] R. Wang, H. Yan, X. Tang, Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine, *Acta Pharmacol. Sin.* 27 (2006) 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00255.x>.
- [60] P. Camps, R. El Achab, J. Morral, D. Muñoz-Torrero, A. Badia, J.E. Baños, N.M. Vivas, X. Barril, M. Orozco, F.J. Luque, New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer’s disease, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 4657–4666. <https://doi.org/10.1021/jm000980y>.
- [61] H.F. Ji, L. Shen, Berberine: a potential multipotent natural product to combat Alzheimer’s disease, *Molecules.* 16 (2011) 6732–6740. <https://doi.org/10.3390/molecules16086732>.
- [62] A.K. Singh, S.K. Singh, M.K. Nandi, G. Mishra, A. Maurya, A. Rai, G.K. Rai, R. Awasthi, B. Sharma, G.T. Kulkarni, Berberine: a plant-derived alkaloid with therapeutic potential to combat Alzheimer’s disease, *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 19 (2019) 154–170. <https://doi.org/10.2174/1871524919666190820160053>.
- [63] E. Himeno, Y. Ohyagi, L. Ma, N. Nakamura, K. Miyoshi, N. Sakae, K. Motomura, N. Soejima, R. Yamasaki, T. Hashimoto, T. Tabira, F.M. LaFerla, J. Kira, Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid- $\beta$  degradation, *Ann. Neurol.* 69 (2011) 248–256. <https://doi.org/10.1002/ana.22319>.
- [64] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
- [65] S.H. Hassanpour, M. Dehghani, Review of cancer from perspective of molecular, *J. Cancer Res. Pract.* 4 (2017) 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>.
- [66] O.V. Bukhtoyarov, D.M. Samarin, Pathogenesis of cancer: cancer reparative trap, *J. Cancer Ther.* 06 (2015) 399–412. <https://doi.org/10.4236/jct.2015.65043>.

- [67] E.A. Collisson, R.J. Cho, J.W. Gray, What are we learning from the cancer genome?, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9 (2012) 621–630. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.159>.
- [68] T.D. Halazonetis, V.G. Gorgoulis, J. Bartek, An oncogene-induced DNA damage model for cancer development, *Science*. 319 (2008) 1352–1355. <https://doi.org/10.1126/science.1140735>.
- [69] F.O. Martinez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *F1000Prime Rep.* 6 (2014). <https://doi.org/10.12703/P6-13>.
- [70] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- [71] A. Barbul, R.J. Breslin, J.P. Woodyard, H.L. Wasserkrug, G. Efron, The effect of *in vivo* T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing, *Ann. Surg.* 209 (1989) 479–483. doi: 10.1097/00000658-198904000-00015.
- [72] S.A. Eming, T. Krieg, J.M. Davidson, Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 514–525. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>.
- [73] J.S. Duffield, The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde, *Clin. Sci.* 104 (2003) 27–38. <https://doi.org/10.1042/>.
- [74] H. Lu, Inflammation, a key event in cancer development, *Mol. Cancer Res.* 4 (2006) 221–233. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0261>.
- [75] A. Jørgensen, Oxidatively generated DNA/RNA damage in psychological stress states, *Dan. Med. J.* 60 (2013) B4685.
- [76] K. Aschbacher, A. O'Donovan, O.M. Wolkowitz, F.S. Dhabhar, Y. Su, E. Epel, Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity, *Psychoneuroendocrinology.* 38 (2013) 1698–1708. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.02.004>.
- [77] O.V. Bukhtoyarov, D.M. Samarin, Psychogenic carcinogenesis: carcinogenesis is without exogenic carcinogens, *Med. Hypotheses.* 73 (2009) 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.06.004>.
- [78] G.C. Prendergast, E.M. Jaffee, Cancer immunologists and cancer biologists: why we didn't talk then but need to now, *Cancer Res.* 67 (2007) 3500–3504. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4626>.
- [79] A. Poggi, M.R. Zocchi, Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 54 (2006) 323–333. <https://doi.org/10.1007/s00005-006-0038-7>.
- [80] B. Burkholder, R.Y. Huang, R. Burgess, S. Luo, V.S. Jones, W. Zhang, Z.Q. Lv, C.Y. Gao, B.L. Wang, Y.M. Zhang, R.P. Huang, Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 1845 (2014) 182–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.01.004>.
- [81] L. Vona-Davis, D.P. Rose, Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression, *Endocr. Relat. Cancer.* 14 (2007) 189–206. <https://doi.org/10.1677/ERC-06-0068>.
- [82] C. Ferretti, L. Bruni, V. Dangles-Marie, A.P. Pecking, D. Bellet, Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts, *Hum. Reprod. Update.* 13 (2007) 121–141. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml048>.
- [83] S. Reuter, S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, B.B. Aggarwal, Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.

- [84] S. Toyokuni, K. Okamoto, J. Yodoi, H. Hiai, Persistent oxidative stress in cancer, *FEBS Lett.* 358 (1995) 1–3. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01368-B](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01368-B).
- [85] I. Baccelli, A. Trumpp, The evolving concept of cancer and metastasis stem cells, *J. Cell. Biol.* 198 (2012) 281–293. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202014>.
- [86] T.N. Seyfried, L.C. Huysentruyt, On the origin of cancer metastasis, *Crit. Rev. Oncog.* 18 (2013) 43–73.
- [87] M. Pecka, *Laboratorní hematologie v přehledu*, 2. díl, FINIDR, Český Těšín (2006). ISBN: 80-86682-02-1.
- [88] K.L. Vine, L. Belfiore, L. Jones, J.M. Locke, S. Wade, E. Minaei, M. Ranson, *N*-alkylated isatins evade P-gp mediated efflux and retain potency in MDR cancer cell lines, *Heliyon.* 2 (2016) e00060. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00060>.
- [89] V. Gouazé, J.Y. Yu, R.J. Bleicher, T.Y. Han, Y.Y. Liu, H. Wang, M.M. Gottesman, A. Bitterman, A.E. Giuliano, M.C. Cabot, Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy, *Mol. Cancer Ther.* 3 (2004) 633–639.
- [90] C. Beskow, J. Skikuniene, Å. Holgersson, B. Nilsson, R. Lewensohn, L. Kanter, K. Viktorsson, Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86, *Brit. J. Cancer.* 101 (2009) 816–821. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605201>.
- [91] I. Ader, C. Toulas, F. Dalenc, C. Delmas, J. Bonnet, E. Cohen-Jonathan, G. Favre, RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death, *Oncogene.* 21 (2002) 5998–6006. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205746>.
- [92] V.R. Gogineni, A.K. Nalla, R. Gupta, D.H. Dinh, J.D. Klopfenstein, J.S. Rao, Chk2-mediated G2/M cell cycle arrest maintains radiation resistance in malignant meningioma cells, *Cancer Lett.* 313 (2011) 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.08.022>.
- [93] J. Vávrová, M. Rezáčová, D. Vokurková, J. Psutka, Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate, *Physiol. Res.* 53 (2004) 335–342.
- [94] A.R. Snyder, W.F. Morgan, Gene expression profiling after irradiation: clues to understanding acute and persistent responses?, *Cancer Metastasis Rev.* 23 (2004) 259–268. <https://doi.org/10.1023/B:CANC.0000031765.17886.fa>.
- [95] D. Lincová, H. Farghali, *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén-Karolinum, 1. vyd., Praha, 2002. ISBN: 8072621688.
- [96] R. Silvestri, New prospects for vinblastine analogues as anticancer agents, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 625–627. <https://doi.org/10.1021/jm400002j>.
- [97] B.T. Ramesha, H.K. Suma, U. Senthilkumar, V. Priti, G. Ravikanth, R. Vasudeva, T.R.S. Kumar, K.N. Ganeshaiyah, R.U. Shaanker, New plant sources of the anti-cancer alkaloid, camptothecin from the Icacinaceae taxa, India, *Phytomedicine.* 20 (2013) 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.12.003>.
- [98] A.S. Choudhari, P.C. Mandave, M. Deshpande, P. Ranjekar, O. Prakash, Phytochemicals in cancer treatment: from preclinical studies to clinical practice, *Front. Pharmacol.* 10 (2020) 1614. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01614>.
- [99] O.A. Ustwani, E.A. Griffiths, E.S. Wang, M. Wetzler, Omacetaxine mepesuccinate in chronic myeloid leukemia, *Expert Opin. Pharmacother.* 15 (2014) 2397–2405. <https://doi.org/10.1517/14656566.2014.964642>.
- [100] J. Zugazagoitia, C. Guedes, S. Ponce, I. Ferrer, S. Molina-Pinelo, L. Paz-Ares, Current challenges in cancer treatment, *Clin. Ther.* 38 (2016) 1551–1566. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>.

- [101] C. Pucci, C. Martinelli, G. Ciofani, Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges, *Ecancermedicallscience*. 13 (2019) 961. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>.
- [102] L. Katz, R.H. Baltz, Natural product discovery: past, present, and future, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43 (2016) 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>.
- [103] S. Bernardini, A. Tiezzi, V.L. Masci, E. Ovidi, Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches, *Nat. Prod. Res.* 32 (2018) 1926–1950. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1356838>.
- [104] K. Macáková, V. Kolečkář, L. Cahlíková, A. Hošťálková, K. Kuča, D. Jun, L. Opletal, Chapter 6 – Tannins and their influence on health, in: Atta-Ur-Rahman, M.I. Choudhary, G. Perry (eds.), *Recent advances in medicinal chemistry*, Bentham Science Publisher 1, 2014, 159–208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803961-8.50006-3>.
- [105] A.F. Brito, M. Ribeiro, A.M. Abrantes, A.S. Pires, R.J. Teixo, J.G. Tralhão, M.F. Botelho, Quercetin in cancer treatment, alone or in combination with conventional therapeutics?, *Curr. Med. Chem.* 22 (2015) 3025–3039. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150812145435>.
- [106] L. Zemanová, J. Hofman, E. Novotná, K. Musílek, T. Lundová, J. Havránková, A. Hošťálková, J. Chlebek, L. Cahlíková, V. Wsól, Flavones inhibit the activity of AKR1B10, a promising therapeutic target for cancer treatment, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 2666–2674. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00616>.
- [107] L. Škarydová, J. Hofman, J. Chlebek, J. Havránková, K. Kosanová, A. Skarka, A. Hošťálková, T. Plucha, L. Cahlíková, V. Wsól, Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.005>.
- [108] J.J. Nair, J. van Staden, J. Bastida, Apoptosis-inducing effects of Amaryllidaceae alkaloids, *Curr. Med. Chem.* 23 (2016) 161–185. <https://doi.org/10.2174/0929867323666151118121124>.
- [109] T. Isah, Anticancer alkaloids from trees: development into drugs, *Pharmacogn. Rev.* 10 (2016) 90–99. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194047>.
- [110] X. Liang, L. Zhang, F. Li, S. Luan, C. He, L. Yin, Z. Yin, Y. Zou, G. Yue, L. Li, X. Song, C. Lv, W. Zhang, B. Jing, Autophagy-regulating *N*-heterocycles derivatives as potential anticancer agents, *Future Med. Chem.* 12 (2019) 223–242. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0294>.
- [111] J.J. Nair, J. Bastida, J. van Staden, *In vivo* cytotoxicity studies of Amaryllidaceae alkaloids, *Nat. Prod. Commun.* 11 (2016) 121–132. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100134>.
- [112] M. Dalecká, R. Havelek, K. Královec, L. Brůčková, L. Cahlíková, Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění, *Chem. Listy.* 107 (2013) 701–708.
- [113] M. Roy, L. Liang, X. Xiao, P. Feng, M. Ye, J. Liu, Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery, *Biomed. Pharmacother.* 107 (2018) 615–624. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.147>.
- [114] H. Zhang, L. Chen, X. Sun, Q. Yang, L. Wan, C. Guo, Matrine: a promising natural product with various pharmacological activities, *Front. Pharmacol.* 11 (2020) 588. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00588>.
- [115] C. Liu, K. Gong, X. Mao, W. Li, Tetrandrine induces apoptosis by activating reactive oxygen species and repressing Akt activity in human hepatocellular carcinoma, *Int. J. Cancer.* 129 (2011) 1519–1531. <https://doi.org/10.1002/ijc.25817>.

- [116] J. Wei, B. Liu, L. Wang, X. Qian, Y. Ding, L. Yu, Synergistic interaction between tetrandrine and chemotherapeutic agents and influence of tetrandrine on chemotherapeutic agent-associated genes in human gastric cancer cell lines, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60 (2007) 703–711. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0416-9>.
- [117] M.Z. El-Readi, S. Eid, M.L. Ashour, A. Tahrani, M. Wink, Modulation of multidrug resistance in cancer cells by chelidonine and *Chelidonium majus* alkaloids, *Phyto-medicine*. 20 (2013) 282–294. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.11.005>.
- [118] M. Mahmoudian, P. Rahimi-Moghaddam, The anti-cancer activity of noscapine: a review, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 4 (2009) 92–97. <https://doi.org/10.2174/157489209787002524>.
- [119] A. DeBono, B. Capuano, P.J. Scammells, Progress toward the development of noscapine and derivatives as anticancer agents, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 5699–5727. <https://doi.org/10.1021/jm501180v>.
- [120] J. Bruneton, *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*, 2nd ed., Intercept (1999). ISBN: 1898298637.
- [121] <http://www.theplantlist.org/> (staženo 28. 7. 2020).
- [122] Z. Jin, G. Yao, Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids, *Nat. Prod. Rep.* 36 (2019) 1462–1488. <https://doi.org/10.1039/C8NP00055G>.
- [123] N. Vaněčková, A. Hošťálková, M. Šafratová, J. Kuneš, D. Hulcová, M. Hrabínová, I. Doskočil, Š. Štěpánková, L. Opletal, L. Nováková, D. Jun, J. Chlebek, L. Cahlíková, Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities, *RSC Adv.* 6 (2016) 80114–80120. <https://doi.org/10.1039/C6RA20205E>.
- [124] K. Breiterová, D. Koutová, J. Maříková, R. Havelek, J. Kuneš, M. Majorošová, L. Opletal, A. Hošťálková, J. Jenčo, M. Řezáčová, L. Cahlíková, Amaryllidaceae alkaloids of different structural types from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and their cytotoxic activity, *Plants (Basel)*. 9 (2020) 137. <https://doi.org/10.3390/plants9020137>.
- [125] L. Cahlíková, M. Hrabínová, A. Kulhánková, N. Benešová, J. Chlebek, D. Jun, Z. Novák, K. Macáková, J. Kuneš, K. Kuča, L. Opletal, Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 1541–1544. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300801110>.
- [126] J.E. Ortiz, N.B. Pigni, S.A. Andujar, G. Roitman, F.D. Suvire, R.D. Enriz, A. Tapia, J. Bastida, G.E. Feresin, Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and their cholinesterase-inhibitory activities: an *in vitro* and *in silico* study, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 1241–1248. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00785>.
- [127] S. Berkov, A. Pavlov, V. Georgiev, J. Weber, T. Bley, F. Viladomat, J. Bastida, C. Codina, Changes in apolar metabolites during *in vitro* organogenesis of *Pancreatium maritimum*, *Plant Physiol. Biochem.* 48 (2010) 827–835. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.07.002>.
- [128] H.A. Jung, B.S. Min, T. Yokozawa, J.H. Lee, Y.S. Kim, J.S. Choi, Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis rhizoma* alkaloids, *Biol. Pharm. Bull.* 32 (2009) 1433–1438. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1433>.
- [129] T. Robinson, *The biochemistry of alkaloids*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1981. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-61830-7>.
- [130] D. Koutová, M. Kulhavá, R. Havelek, M. Majorošová, K. Královec, K. Habartová, A. Hošťálková, L. Opletal, L. Cahlíková, M. Řezáčová, Bersavine: a novel bisbenzylisoquinoline alkaloid with cytotoxic, antiproliferative and apoptosis-inducing

- effects on human leukemic cells, *Molecules*. 25 (2020) 964.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25040964>.
- [131] S.Y. Li, L.H. Ling, B.S. Teh, W.K. Seow, Y.H. Thong, Anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the bis-benzylisoquinolines: *in vitro* comparisons of tetrandrine and berbamine, *Int. J. Immunopharmacol.* 11 (1989) 395–401.  
[https://doi.org/10.1016/0192-0561\(89\)90086-6](https://doi.org/10.1016/0192-0561(89)90086-6).
- [132] X.J. Jia, X. Li, F. Wang, H.Q. Liu, D.J. Zhang, Berbamine exerts anti-inflammatory effects via inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways, *Cell. Physiol. Biochem.* 41 (2017) 2307–2318. <https://doi.org/10.1159/000475650>.
- [133] I. Khan, A. Qayum, Z. Qureshi, Study of the hypotensive action of berbamine, an alkaloid isolated from *berberis lycium*, *Life Sci.* 8 (1969) 993–1001.  
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(69\)90432-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(69)90432-9).
- [134] S. Hemalatha, P. Srikanth, K.B. Reddy, A review on herbs used to treat psoriasis, *Int. J. Innov. Pharm. Sci. Res.* 5 (2017) 77–89.  
 doi: 10.21276/IJIPSR.2017.05.09.213.
- [135] H. Wang, C. Zhu, Y. Ying, L. Luo, D. Huang, Z. Luo, Metformin and berberine, two versatile drugs in treatment of common metabolic diseases, *Oncotarget.* 9 (2017) 10135–10146. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20807>.
- [136] X. Feng, A. Sureda, S. Jafari, Z. Memariani, D. Tewari, G. Annunziata, L. Barrea, S.T.S. Hassan, K. Šmejkal, M. Malaník, A. Sychrová, D. Barreca, L. Ziberna, M.F. Mahomoodally, G. Zengin, S. Xu, S.M. Nabavi, A.Z. Shen, Berberine in cardiovascular and metabolic diseases: from mechanisms to therapeutics, *theranostics.* 9 (2019) 1923–1951. <https://doi.org/10.7150/thno.30787>.
- [137] M.C. Lanhers, M. Joyeux, R. Soulimani, J. Fleurentin, M. Sayag, F. Mortier, C. Younos, J.M. Pelt, Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*, *Planta Med.* 57 (1991) 110–115.  
<https://doi.org/10.1055/s-2006-960043>.
- [138] S. Hoet, C. Stévigny, S. Block, F. Opperdoes, P. Colson, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, C. Bailly, J. Quetin-Leclercq, Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases, *Planta Med.* 70 (2004) 407–413. <https://doi.org/10.1055/s-2004-818967>.
- [139] A. Hošťálková, T. Siatka, J. Chlebek, L. Opletal, P. Drašar, L. Cahlíková, Boldinové alkaloidy a perspektivy jejich využití, *Chem. Listy.* 109 (2015) 846–855.
- [140] J.T. Olin, L. Schneider, Galantamine for Alzheimer’s disease, *Cochrane Database Syst. Rev.* 3 (2002) CD001747. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001747>.
- [141] A. Kumar, A. Singh, Ekavali, A review on Alzheimer’s disease pathophysiology and its management: an update, *Pharmacol. Rep.* 67 (2015) 195–203.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>.
- [142] C. Ito, M. Itoigawa, H. Tokuda, M. Kuchide, H. Nishino, H. Furukawa, Chemopreventive activity of isoquinoline alkaloids from *Corydalis* plants, *Planta Med.* 67 (2001) 473–475. <https://doi.org/10.1055/s-2001-15815>.
- [143] H. Matsuda, H. Shiimoto, S. Naruto, K. Namba, M. Kubo, Anti-thrombic action of methanol extract and alkaloidal components from *Corydalis* tuber, *Planta Med.* 54 (1988) 27–33. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962324>.
- [144] H. Gastpar, D. Criscuolo, H.A. Dieterich, Efficacy and tolerability of glaucine as an antitussive agent, *Curr. Med. Res. Opin.* 9 (1984) 21–27.  
<https://doi.org/10.1185/03007998409109554>.
- [145] L. Cahlíková, I. Kawano, M. Řezáčová, G. Blunden, D. Hulcová, R. Havelek, The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic

- derivatives as potential drugs, *Phytochem. Rev.* (2020).  
<https://doi.org/10.1007/s11101-020-09675-8>.
- [146] J. Malíková, A. Zdařilová, A. Hlobilková, Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 150 (2006) 5–12. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.001>.
- [147] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, H.O. Sintim, Agents that inhibit bacterial biofilm formation, *Future Med. Chem.* 7 (2015) 647–671.  
<https://doi.org/10.4155/fmc.15.7>.
- [148] N. He, P. Wang, P. Wang, C. Ma, W. Kang, Antibacterial mechanism of chelerythrine isolated from root of *Toddalia asiatica* (Linn) Lam, *BMC Complement. Altern. Med.* 18 (2018) 261. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2317-3>.
- [149] R. Gaziano, G. Moroni, C. Buè, M.T. Miele, P. Sinibaldi-Vallebona, F. Pica, Antitumor effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine: evidence and perspectives, *World J. Gastrointest. Oncol.* 8 (2016) 30–39.  
<https://doi.org/10.4251/wjgo.v8.i1.30>.
- [150] D. Medvetz, Y. Sun, C. Li, D. Khabibullin, M. Balan, A. Parkhitko, C. Priolo, J. Asara, S. Pal, J. Yu, E.P. Henske, High-throughput drug screen identifies chelerythrine as a selective inducer of death in a TSC2-null setting, *Mol. Cancer Res.* 13 (2015) 50–62. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0440>.
- [151] M.B. Chougule, A.R. Patel, T. Jackson, M. Singh, Antitumor activity of noscapine in combination with doxorubicin in triple negative breast cancer, *PLoS One.* 6 (2011) e17733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017733>.
- [152] Y.Y. Lee, J.S. Park, Y.H. Leem, J.E. Park, D.Y. Kim, Y.H. Choi, E.M. Park, J.L. Kang, H.-S. Kim, The phosphodiesterase 10 inhibitor papaverine exerts anti-inflammatory and neuroprotective effects via the PKA signaling pathway in neuroinflammation and Parkinson's disease mouse models, *J. Neuroinflammation.* 16 (2019) 246. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1649-3>.
- [153] J. Vacek, D. Walterová, E. Vrublová, V. Šimánek, The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine, *Heterocycles.* 81 (2010) 1773. <https://doi.org/10.3987/REV-10-673>.
- [154] T. Satou, M. Koga, R. Matsushashi, K. Koike, I. Tada, T. Nikaido, Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*, *Vet. Parasitol.* 104 (2002) 131–138.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00619-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00619-7).
- [155] B.W. Obiang-Obounou, O.H. Kang, J.G. Choi, J.H. Keum, S.B. Kim, S.H. Mun, D.W. Shin, K. Woo Kim, C.B. Park, Y.G. Kim, S.H. Han, D.Y. Kwon, The mechanism of action of sanguinarine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Toxicol. Sci.* 36 (2011) 277–283. <https://doi.org/10.2131/jts.36.277>.
- [156] Z. Ye, K. Van Dyke, Selective antimalarial activity of tetrandrine against chloroquine resistant *plasmodium falciparum*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 (1989) 242–248. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92429-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92429-7).
- [157] T. Liu, X. Liu, W. Li, Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy, *Oncotarget.* 7 (2016) 40800–40815.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8315>.
- [158] Q.Y. Liu, E. Karpinski, M.R. Rao, P.K.T. Pang, Tetrandrine: a novel calcium channel antagonist inhibits type I calcium channels in neuroblastoma cells, *Neuropharmacol.* 30 (1991) 1325–1331. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(91\)90030-F](https://doi.org/10.1016/0028-3908(91)90030-F).
- [159] A. Eisenreich, B. Sachse, R. Gürtler, B. Dusemund, O. Lindtner, B. Schäfer, What do we know about health risks related to thebaine in food?, *Food Chem.* 309 (2020) 125564. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125564>.

- [160] H.K. Knutsen, J. Alexander, L. Barregård, M. Bignami, B. Brüschweiler, S. Ceccatelli, B. Cottrill, M. Dinovi, L. Edler, B. Grasl-Kraupp, C. Hogstrand, L. Hoogenboom, C.S. Nebbia, I.P. Oswald, A. Petersen, M. Rose, A.-C. Roudot, T. Schwerdtle, G. Vollmer, H. Wallace, D. Benford, G. Calò, A. Dahan, B. Dusemund, P. Mulder, É. Németh-Zámboriné, D. Arcella, K. Baert, C. Cascio, S. Levorato, M. Schutte, C. Vleminckx, Update of the scientific opinion on opium alkaloids in poppy seeds, *EFSA J.* 16 (2018) e05243. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5243>.
- [161] E. Fossati, L. Narcross, A. Ekins, J.P. Falguyret, V.J.J. Martin, Synthesis of morphinan alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS One.* 10 (2015) e0124459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124459>.
- [162] J. Chlebek, A. De Simone, A. Hošťálková, L. Opletal, C. Pérez, D.I. Pérez, L. Havlíková, L. Cahlíková, V. Andrisano, Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets, *Fitoterapia.* 109 (2016) 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.01.008>.
- [163] Z. Novák, J. Chlebek, L. Opletal, P. Jiroš, K. Macáková, J. Kuneš, L. Cahlíková, Corylucinine, a new alkaloid from *Corydalis cava* (Fumariaceae), and its cholinesterase activity, *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012) 859–860. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700712>.
- [164] J. Chlebek, Z. Novák, D. Kassemová, M. Šafratová, J. Kostelník, L. Malý, M. Ločárek, L. Opletal, A. Hošťálková, M. Hrabínová, J. Kuneš, P. Novotná, M. Urbanová, L. Nováková, K. Macáková, D. Hulcová, P. Solich, C. Pérez-Martín, D. Jun, L. Cahlíková, Isoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and their biological activities related to Alzheimer's disease, *Chem. Biodivers.* 13 (2016) 91–99. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500033>.
- [165] L. Cahlíková, K. Macáková, J. Kunes, M. Kurfürst, L. Opletal, J. Cvačka, J. Chlebek, G. Blundene, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae), *Nat. Prod. Commun.* 5 (2010) 1035–1038. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500710>.
- [166] T. Siatka, M. Adamcová, L. Opletal, L. Cahlíková, D. Jun, M. Hrabínová, J. Kuneš, J. Chlebek, Cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibitory activities of alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae), *Molecules.* 22 (2017) 1181. <https://doi.org/10.3390/molecules22071181>.
- [167] A. Hošťálková, L. Opletal, J. Kuneš, Z. Novák, M. Hrabínová, J. Chlebek, L. Čegan, L. Cahlíková, Alkaloids from *Peumus boldus* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity, *Nat. Prod. Commun.* 10 (2015) 577–580. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000410>.
- [168] L. Cahlíková, M. Ločárek, N. Benešová, R. Kučera, J. Chlebek, Z. Novák, L. Opletal, Isolation and cholinesterase inhibitory activity of *Narcissus* extracts and Amaryllidaceae alkaloid, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 781–785. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800625>.
- [169] E. Kohelová, J. Maříková, J. Korábečný, D. Hulcová, T. Kučera, D. Jun, J. Chlebek, J. Jenčo, M. Šafratová, M. Hrabínová, A. Ritomská, M. Malaník, R. Peřinová, K. Breiterová, J. Kuneš, L. Nováková, L. Opletal, L. Cahlíková, Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: isolation, structural elucidation and biological activity, *Bioorg. Chem.* 107 (2021) 104567. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104567>.
- [170] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).



- [171] J. Chlebek, Studium biologické aktivity alkaloidů izolovaných z *Corydalis cava* (Fumariaceae), Disertační práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova (2012).
- [172] A. Brossi, B. Schönerberger, O.E. Clark, R. Ray, Inhibition of acetylcholinesterase from electric eel by (-)-and (+)-physostigmine and related compounds, *FEBS Lett.* 201 (1986) 190–192. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80606-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80606-8).
- [173] M. Bartolini, N.H. Greig, Q.S. Yu, V. Andrisano, Immobilized butyrylcholinesterase in the characterization of new inhibitors that could ease Alzheimer's disease, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2730–2738. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.100>.
- [174] R. Tundis, F. Menichini, F. Conforti, M.R. Loizzo, M. Bonesi, G. Statti, F. Menichini, A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (Chenopodiaceae) in the treatment of Alzheimer's disease, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24 (2009) 818–824. <https://doi.org/10.1080/14756360802399662>.
- [175] K. Breiterová, M. Ločárek, E. Kohelová, M. Talácková, D. Hulcová, L. Opletal, L. Cahlíková, Daffodils as potential crops of biologically-active compounds: assessment of 40 ornamental taxa for their alkaloid profile and cholinesterases inhibition activity, *Nat. Prod. Commun.* 13 (2018) 419–422. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300410>.
- [176] A. Marston, J. Kissling, K. Hostettmann, A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants, *Phytochem. Anal.* 13 (2002) 51–54. <https://doi.org/10.1002/pca.623>.
- [177] J. Nováková, Biologická aktivita obsahových látek rostlin VII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu, Diplomová práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova (2007).
- [178] K. Hostettmann, A. Borloz, A. Urbain, A. Marston, Natural product inhibitors of acetylcholinesterase, 10 (2006) 825–847. <https://doi.org/info:doi/10.2174/138527206776894410>.
- [179] J.W. Dong, L. Cai, Y.S. Fang, H. Xiao, Z.J. Li, Z.T. Ding, Proaporphine and aporphine alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Stephania epigaea*, *Fitoterapia.* 104 (2015) 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.019>.
- [180] J. Stejskal, J. Kovář, J. Slavík, Inhibition of acetylcholine esterase and butyrylcholine esterase with isoquinoline alkaloids, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 50 (1985) 2471–2479. <https://doi.org/10.1135/cccc19852471>.
- [181] A. Adsersen, A. Kjølbye, O. Dall, A.K. Jäger, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort, *J. Ethnopharmacol.* 113 (2007) 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.006>.
- [182] L. Cahlíková, L. Opletal, M. Kurfürst, K. Macáková, A. Kulhánková, A. Hošťálková, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae), *Nat. Prod. Commun.* 5 (2010) 1751–1754. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501110>.
- [183] D.K. Kim, Inhibitory effect of corynoline isolated from the aerial parts of *Corydalis incisa* on the acetylcholinesterase, *Arch. Pharm. Res.* 25 (2002) 817–819. <https://doi.org/10.1007/BF02976997>.
- [184] K. Ingkaninan, P. Phengpa, S. Yuenyongsawad, N. Khorana, Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber, *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 695–700. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.5.0015>.
- [185] N. Khorana, S. Markmee, K. Ingkaninan, S. Ruchirawat, R. Kitbunnadaj, M.R. Pullagurla, Evaluation of a new lead for acetylcholinesterase inhibition, *Med. Chem. Res.* 18 (2009) 231–241. doi: 10.1007/s00044-008-9122-3.

- [186] A. Hošťálková, J. Kuneš, K. Macáková, M. Hrabínová, L. Opletal, Alkaloids from *hydrastidis canadensis* and their cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibitory, *Česká Slov. Farm.* 64 (2015) 41–43.
- [187] J. Chlebek, I. Doskočil, D. Hulcová, K. Breiterová, M. Šafratová, R. Havelek, K. Habartová, A. Hošťálková, T. Volšátová, L. Cahlíková, Cytotoxicity of naturally occurring isoquinoline alkaloids of different structural types, *Nat. Prod. Commun.* 11 (2016) 753–756. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100614>.
- [188] G.M. Subaiea, M. Aljofan, V.R. Devadasu, T.M. Alshammari, Acute toxicity testing of newly discovered potential antihepatitis B virus agents of plant origin, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 10 (2017) 210–213. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i11.20717>.
- [189] V. Cavallaro, A.P. Murray, C.R. Pungitore, L.J. Gutiérrez, Aporphinoid alkaloids derivatives as selective cholinesterases inhibitors: biological evaluation and docking study, *Mol. Inf.* 39 (2020) 1900125. <https://doi.org/10.1002/minf.201900125>.
- [190] X. Zhang, M. Oh, S. Kim, J. Kim, H. Kim, S. Kim, P.J. Houghton, W. Whang, Epimediphine, a novel alkaloid from *Epimedium koreanum* inhibits acetylcholinesterase, *Nat. Prod. Res.* 27 (2013) 1067–1074. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.708660>.
- [191] S. Pecic, M.A. McAnuff, W.W. Harding, Nantenine as an acetylcholinesterase inhibitor: SAR, enzyme kinetics and molecular modeling investigations, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 26 (2011) 46–55. <https://doi.org/10.3109/14756361003671078>.
- [192] A.P. Murray, M.B. Faraoni, M.J. Castro, N.P. Alza, V. Cavallaro, Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy, *Curr. Neuropharmacol.* 11 (2013) 388–413. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311040004>.
- [193] L.F. Tseng, E. Wei, H.H. Loh, Brain areas associated with bulbocapnine catalepsy, *Eur. J. Pharmacol.* 22 (1973) 363–366. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(73\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(73)90040-X).
- [194] A. Kostelník, M. Pohanka, Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by a plant secondary metabolite boldine, *Biomed. Res. Int.* 2018 (2018) 9634349. <https://doi.org/10.1155/2018/9634349>.
- [195] X. Li, J. Dong, D. Gan, D. Zhou, X. Cai, L. Cai, Z. Ding, (-)-Grandiflorimine, a new dibenzopyrrocoline alkaloid with cholinesterase inhibitory activity from *Illigera grandiflora*, *Nat. Prod. Res.* (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1608542>.
- [196] Z.C. Xu, X.B. Wang, W.Y. Yu, S.S. Xie, S.Y. Li, L.Y. Kong, Design, synthesis and biological evaluation of benzylisoquinoline derivatives as multifunctional agents against Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 2368–2373. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.058>.
- [197] S. Markmee, S. Ruchirawat, V. Prachyawarakorn, K. Ingkaninan, N. Khorana, Isoquinoline derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2170–2172. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.01.067>.
- [198] C. Galeffi, M.F. Cometa, L. Tomassini, M. Nicoletti, Canadinic acid: an alkaloid from *Hydrastis canadensis*, *Planta Med.* 63 (1997) 194. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957649>.
- [199] D.K. Kim, K.T. Lee, S.H. Kim, H.W. Park, J.P. Lim, T.Y. Shin, D.O. Eom, J.H. Yang, J.S. Eun, N.I. Baek, Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*, *Arch. Pharm. Res.* 27 (2004) 1127–1131. doi: 10.1007/BF02975117.

- [200] T.M. Hung, M. Na, N.T. Dat, T.M. Ngoc, U. Youn, H.J. Kim, B.-S. Min, J. Lee, K. Bae, Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*, *J. Ethnopharmacol.* 119 (2008) 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.041>.
- [201] H.N. Yao, Z.T. Peng, Y.F. Zhang, D.F. Liu, B.F. Huang, P.F. Tu, Y.F. Zhao, H.X. Huo, J. Li, Alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Corydalis racemosa* (Thunb.) Pers, *Nat. Prod. Res.* (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1696796>.
- [202] Atta-Ur-Rahman, Atia-Tul-Wahab, S.A. Nawaz, I.M. Choudhary, New cholinesterase inhibiting bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cocculus pendulus*, *Chem. Pharm. Bull.* 52 (2004) 802–806. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.802>.
- [203] M.F. Cometa, S. Fortuna, G. Palazzino, M.T. Volpe, E. Rengifo Salgado, M. Nicoletti, L. Tomassini, New cholinesterase inhibiting bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*, *Fitoterapia.* 83 (2012) 476–480. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.015>.
- [204] M. Heinrich, H. Lee Teoh, Galanthamine from snowdrop - the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge, *J. Ethnopharmacol.* 92 (2004) 147–162. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.012>.
- [205] L.H. Pham, E. Gründemann, J. Wagner, M. Bartoszek, W. Döpke, Two novel Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum equestre* herb.: 3-*O*-demethyltazettine and egonine, *Phytochemistry.* 51 (1999) 327–332. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00743-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00743-2).
- [206] L.R. Tallini, J. Bastida, N. Cortes, E.H. Osorio, C. Theoduloz, G. Schmeda-Hirschmann, Cholinesterase inhibition activity, alkaloid profiling and molecular docking of Chilean *Rhodophiala* (Amaryllidaceae), *Molecules.* 23 (2018) 1532. <https://doi.org/10.3390/molecules23071532>.
- [207] M.X. Chen, J.M. Huo, J. Hu, Z.P. Xu, X. Zhang, Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum latifolium* with cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities, *Fitoterapia.* 130 (2018) 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.08.003>.
- [208] Y. Guo, J.P. de Andrade, N.B. Pigni, L. Torras-Claveria, L.R. Tallini, W. de S. Borges, F. Viladomat, J.J. Nair, J.A.S. Zuanazzi, J. Bastida, New alkaloids from *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen, *Hel. Chim. Acta.* 99 (2016) 143–147. <https://doi.org/10.1002/hlca.201500188>.
- [209] M. Šafratová, Z. Novák, A. Kulhánková, J. Kuneš, M. Hrabínová, D. Jun, K. Macáková, L. Opletal, L. Cahlíková, Revised NMR data for 9-*O*-demethylgalanthine: an alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity, *Nat. Prod. Commun.* 9 (2014) 787–788. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900614>.
- [210] G. Stavrakov, I. Philipova, D. Zheleva-Dimitrova, I. Valkova, E. Salamanova, S. Konstantinov, I. Doytchinova, Docking-based design and synthesis of galantamine–camphane hybrids as inhibitors of acetylcholinesterase, *Chem. Biol. Drug Design.* 90 (2017) 709–718. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12991>.
- [211] E. Kohelová, R. Peřinová, N. Maafi, J. Korábečný, D. Hulcová, J. Maříková, T. Kučera, L. Martínez González, M. Hrabínová, K. Vorčáková, L. Nováková, A. De Simone, R. Havelek, L. Cahlíková, Derivatives of the  $\beta$ -crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multi-target directed ligands for Alzheimer's Disease, *Molecules.* 24 (2019) 1307. <https://doi.org/10.3390/molecules24071307>.
- [212] J. Maříková, A. Ritomská, J. Korábečný, R. Peřinová, A. Al Mamun, T. Kučera, E. Kohelová, D. Hulcová, T. Koblrová, J. Kuneš, L. Nováková, L. Cahlíková, Aromatic

- esters of the crinane Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase, *J. Nat. Prod.* 83 (2020) 1359–1367. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00561>.
- [213] J. Havlasová, M. Šafratová, T. Siatka, Š. Štěpánková, Z. Novák, M. Ločárek, L. Opletal, M. Hrabínová, D. Jun, N. Benešová, J. Kuneš, L. Cahlíková, Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity, *Nat. Prod. Commun.* 9 (2014) 1151–1155. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900823>.
- [214] L. Cahlíková, N. Benešová, K. Macáková, R. Kučera, V. Hrstka, J. Klimeš, L. Jahodář, L. Opletal, Alkaloids from some amaryllidaceae species and their cholinesterase activity, *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012) 571–574. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100601210>.
- [215] L. Cahlíková, S. Zavadil, K. Macáková, I. Valterová, A. Kulhánková, A. Hošťálková, J. Kuneš, L. Opletal, Isolation and cholinesterase activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii*, *Nat. Prod. Commun.* 6 (2011) 1827–1830. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100601210>.
- [216] M.R. Herrera, A.K. Machocho, R. Brun, F. Viladomat, C. Codina, J. Bastida, Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*, *Planta Med.* 67 (2001) 191–193. <https://doi.org/10.1055/s-2001-11495>.
- [217] L. Cahlíková, K. Macáková, S. Zavadil, P. Jiroš, L. Opletal, K. Urbanová, L. Jahodář, Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity, *Nat. Prod. Commun.* 6 (2011) 603–606. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600506>.
- [218] S. López, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts, *Life Sci.* 71 (2002) 2521–2529. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02034-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02034-9).
- [219] D. Tewari, A.M. Stankiewicz, A. Mocan, A.N. Sah, N.T. Tzvetkov, L. Huminiecki, J.O. Horbańczuk, A.G. Atanasov, Ethnopharmacological approaches for dementia therapy and significance of natural products and herbal drugs, *Front. Aging Neurosci.* 10 (2018). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00003>.
- [220] S. Berkov, C. Codina, F. Viladomat, J. Bastida, *N*-Alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 2263–2266. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.008>.
- [221] R. Reyes-Chilpa, S. Berkov, S. Hernández-Ortega, C.K. Jankowski, S. Arseneau, I. Clotet-Codina, J.A. Esté, C. Codina, F. Viladomat, J. Bastida, Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*, *Molecules.* 16 (2011) 9520–9533. <https://doi.org/10.3390/molecules16119520>.
- [222] E.E. Elgorashi, G.I. Stafford, J. Van Staden, Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of amaryllidaceae alkaloids, *Planta Med.* 70 (2004) 260–262. <https://doi.org/10.1055/s-2004-818919>.
- [223] N. Cortes, R.A. Posada-Duque, R. Alvarez, F. Alzate, S. Berkov, G.P. Cardona-Gómez, E. Osorio, Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: a comparative study, *Life Sci.* 122 (2015) 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.011>.
- [224] S. Berkov, E. Osorio, F. Viladomat, J. Bastida, Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids, *Alkaloids Chem. Biol.* 83 (2020) 113–185. <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2019.10.002>.
- [225] N. Unver, G.I. Kaya, C. Werner, R. Verpoorte, B. Gözler, Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*, *Planta Med.* 69 (2003) 869–871. <https://doi.org/10.1055/s-2003-43206>.

- [226] B. Bozkurt, G. Coban, G.I. Kaya, M.A. Onur, N. Unver-Somer, Alkaloid profiling, anticholinesterase activity and molecular modeling study of *Galanthus elwesii*, *S. Afr. J. Bot.* 113 (2017) 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.08.004>.
- [227] Y. Ding, D. Qu, K.M. Zhang, X.X. Cang, Z.N. Kou, W. Xiao, J.B. Zhu, Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review, *J. Asian Nat. Prod. Res.* 19 (2017) 53–100. <https://doi.org/10.1080/10286020.2016.1198332>.
- [228] A. Kulhánková, L. Cahlíková, Z. Novák, K. Macáková, J. Kuneš, L. Opletal, Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity, *Chem. Biodivers.* 10 (2013) 1120–1127. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200144>.
- [229] R. Peřinová, N. Maafi, J. Korábečný, E. Kohelová, A. De Simone, A. Al Mamun, D. Hulcová, J. Marková, T. Kučera, D. Jun, M. Šafratová, J. Maříková, V. Andrisano, J. Jenčo, J. Kuneš, A. Martinez, L. Nováková, L. Cahlíková, Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their *in vitro* and *in silico* biological activity connected to Alzheimer's disease, *Bioorg. Chem.* 100 (2021) 103928. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103928>.
- [230] F.M. Williams, Clinical significance of esterases in man, *Clin. Pharmacokinet.* 10 (1985) 392–403. <https://doi.org/10.2165/00003088-198510050-00002>.
- [231] J.K. Cho, Y.B. Ryu, M.J. Curtis-Long, J.Y. Kim, D. Kim, S. Lee, W.S. Lee, K.H. Park, Inhibition and structural reliability of prenylated flavones from the stem bark of *Morus lhou* on  $\beta$ -secretase (BACE-1), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 2945–2948. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.03.060>.
- [232] Y.H. Choi, G.H. Yon, K.S. Hong, D.S. Yoo, C.W. Choi, W.K. Park, J.Y. Kong, Y.S. Kim, S.Y. Ryu, *In vitro* BACE-1 inhibitory phenolic components from the seeds of *Psoralea corylifolia*, *Planta Med.* 74 (2008) 1405–1408. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1081301>.
- [233] S.H. Choi, J.M. Hur, E.J. Yang, M. Jun, H.J. Park, K.B. Lee, E. Moon, K.-S. Song,  $\beta$ -secretase (BACE1) inhibitors from *Perilla frutescens* var. *acuta*, *Arch. Pharm. Res.* 31 (2008) 183–187. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1139-9>.
- [234] Y.H. Choi, M.Y. Yoo, C.W. Choi, M.R. Cha, G.H. Yon, D.Y. Kwon, Y.S. Kim, W.K. Park, S.Y. Ryu, A new specific BACE-1 inhibitor from the stem bark extract of *Vitis vinifera*, *Planta Med.* 75 (2009) 537–540. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185311>.
- [235] S.Y. Jeon, S.H. Kwon, Y.H. Seong, K. Bae, J.M. Hur, Y.Y. Lee, D.Y. Suh, K.S. Song,  $\beta$ -secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from *Smilax Rhizoma*, *Phytomedicine.* 14 (2007) 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.09.003>.
- [236] <https://www.fiercebiotech.com/biotech/merck-bace1-drug-fails-prodromal-alzheimer-s-phase-3> (staženo 28. 9. 2020).
- [237] <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/77751/bace-clinical-trials/> (staženo 28. 9. 2020).
- [238] M. Hamann, D. Alonso, E. Martín-Aparicio, A. Fuertes, M.J. Pérez-Puerto, A. Castro, S. Morales, M.L. Navarro, M. Del Monte-Millán, M. Medina, H. Pennaka, A. Balaiah, J. Peng, J. Cook, S. Wahyuono, A. Martínez, 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.* 70 (2007) 1397–1405. <https://doi.org/10.1021/np060092r>.
- [239] K.V. Rao, M.S. Donia, J. Peng, E. Garcia-Palomero, D. Alonso, A. Martinez, M. Medina, S.G. Franzblau, B.L. Tekwani, S.I. Khan, S. Wahyuono, K.L. Willett, M.T. Hamann, Manzamine B and E and ircinal A related alkaloids from an Indonesian

- Acanthostrongylophora* sponge and their activity against infectious, tropical parasitic, and Alzheimer's diseases, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 1034–1040.  
<https://doi.org/10.1021/np0601399>.
- [240] D. Hulcová, K. Breiterová, T. Siatka, K. Klímová, L. Davani, M. Šafratová, A. Hošťálková, A. De Simone, V. Andrisano, L. Cahlíková, Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors, *Molecules*. 23 (2018).  
<https://doi.org/10.3390/molecules23040719>.
- [241] K. Babková, J. Korábečný, O. Soukup, E. Nepovimova, D. Jun, K. Kuča, Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors, *Future Med. Chem.* 9 (2017) 1015–1038.  
<https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0030>.
- [242] S.H. Lee, M. Jun, J.Y. Choi, E.J. Yang, J.M. Hur, K. Bae, Y.H. Seong, T.L. Huh, K.S. Song, Plant phenolics as prolyl endopeptidase inhibitors, *Arch. Pharm. Res.* 30 (2007) 827–833. <https://doi.org/10.1007/BF02978832>.
- [243] I. Orhan, G. Orhan, B. Sener, Prolyl endopeptidase enzyme inhibitors of plant origin, *FABAD J. Pharm. Sci.* 27 (2002), 231–237.
- [244] K.H. Lee, J.H. Kwak, K.B. Lee, K.S. Song, Prolyl endopeptidase inhibitors from *caryophylli flos*, *Arch. Pharm. Res.* 21 (1998) 207–211.  
<https://doi.org/10.1007/BF02974029>.
- [245] T. Tarragó, N. Kichik, B. Claasen, R. Prades, M. Teixidó, E. Giralt, Baicalin, a pro-drug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 7516–7524. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.067>.
- [246] T. Tarragó, N. Kichik, J. Seguí, E. Giralt, The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor, *ChemMedChem*. 2 (2007) 354–359.  
<https://doi.org/10.1002/cmdc.200600303>.
- [247] L. Cahlíková, L. Hulová, M. Hrabínová, J. Chlebek, A. Hošťálková, M. Adamcová, M. Šafratová, D. Jun, L. Opletal, M. Ločárek, K. Macáková, Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors, *Fitoterapia*. 103 (2015) 192–196.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.04.004>.
- [248] J. Matějka, Biologicky aktivní metabolity rostlin. 8. Alkaloidy *Macleaya cordata* a jejich biologická aktivita, Diplomová práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova (2012).
- [249] O.A. Barski, S.M. Tipparaju, A. Bhatnagar, The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification, *Drug. Metab. Rev.* 40 (2008) 553–624.  
<https://doi.org/10.1080/03602530802431439>.
- [250] C. Veeresham, A.R. Rao, K. Asres, Aldose reductase inhibitors of plant origin, *Phytother. Res.* 28 (2014) 317–333. <https://doi.org/10.1002/ptr.5000>.
- [251] M. Kubo, H. Matsuda, K. Tokuoka, Y. Kobayashi, S. Ma, T. Tanaka, Studies of anti-cataract drugs from natural sources. I. Effects of a methanolic extract and the alkaloidal components from *Corydalis tuber* on *in vitro* aldose reductase activity, *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1994) 458–459. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.458>.
- [252] H.S. Lee, Rat lens aldose reductase inhibitory activities of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 7013–7016.  
<https://doi.org/10.1021/jf020674o>.
- [253] I.E. Orhan, Current concepts on selected plant secondary metabolites with promising inhibitory effects against enzymes linked to Alzheimer's disease, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 2252–2261. <https://doi.org/10.2174/092986712800229032>.
- [254] D.R. Bauman, S. Steckelbroeck, T.M. Penning, The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action, *Drug News Perspect.* 17 (2004) 563–578.  
<https://doi.org/10.1358/dnp.2004.17.9.872570>.

- [255] T.M. Penning, Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action, *Hum. Reprod. Update.* 9 (2003) 193–205. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg022>.
- [256] T.L. Rižner, T.M. Penning, Role of aldo–keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism, *Steroids.* 79 (2014) 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.10.012>.
- [257] M.C. Byrns, S. Steckelbroeck, T.M. Penning, An Indomethacin analogue, *N*-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective inhibitor of aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3 $\alpha$ -HSD, type 5 17 $\beta$ -HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.09.008>.
- [258] Y.T. Chung, K.A. Matkowskyj, H. Li, H. Bai, W. Zhang, M.S. Tsao, J. Liao, G.Y. Yang, Overexpression and oncogenic function of aldo-keto reductase family 1B10 (AKR1B10) in pancreatic carcinoma, *Mod. Pathol.* 25 (2012) 758–766. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.191>.
- [259] T.M. Penning, M.C. Byrns, Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1155 (2009) 33–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03700.x>.
- [260] A.O. Adeniji, M. Chen, T.M. Penning, AKR1C3 as a target in castrate resistant prostate cancer, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 137 (2013) 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.05.012>.
- [261] J. Hofman, B. Malčeková, A. Skarka, E. Novotn, V. Wsól, Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278 (2014) 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.027>.
- [262] D. Hulcová, K. Breiterová, L. Zemanová, T. Siatka, M. Šafratová, N. Vaněčková, A. Hošťálková, V. Wsól, L. Cahlíková, AKR1C3 inhibitory potency of naturally-occurring Amaryllidaceae alkaloids of different structural types, *Nat. Prod. Commun.* 12 (2017) 245–246. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200226>.
- [263] C.P. Ndi, M.J. Sykes, D.J. Claudie, R.A. McKinnon, S.J. Semple, B.S. Simpson, Antiproliferative aporphine alkaloids from *Litsea glutinosa* and ethnopharmacological relevance to Kuuku I'yu traditional medicine, *Aust. J. Chem.* 69 (2016) 145–151. <https://doi.org/10.1071/CH15456>.
- [264] C. Stévigny, C. Bailly, J. Quetin-Leclercq, Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 5 (2005) 173–182. <https://doi.org/10.2174/1568011053174864>.
- [265] K.H. Kim, C.J. Piao, S.U. Choi, M.W. Son, K.R. Lee, New cytotoxic tetrahydropyprotoberberine-aporphine dimeric and aporphine alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*, *Planta Med.* 76 (2010) 1732–1738. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249972>.
- [266] A. Makarasen, W. Sirithana, S. Mogkhuntod, N. Khunnawutmanotham, N. Chimnoi, S. Techasakul, Cytotoxic and antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from *Stephania venosa* (Blume) Spreng, *Planta Med.* 77 (2011) 1519–1524. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270743>.
- [267] A. Philchenkov, V. Kaminsky, M. Zavelevich, R. Stoika, Apoptogenic activity of two benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* L. does not correlate with their DNA damaging effects, *Toxicol. In Vitro.* 22 (2008) 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.08.023>.

- [268] S.S. Matkar, L.A. Wrischnik, U. Hellmann-Blumberg, Production of hydrogen peroxide and redox cycling can explain how sanguinarine and chelerythrine induce rapid apoptosis, *Arch. Biochem. Biophys.* 477 (2008) 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.05.019>.
- [269] J. Malíková, A. Zdařilová, A. Hlobílková, J. Ulrichová, The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine, *Cell Biol. Toxicol.* 22 (2006) 439–453. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0109-x>.
- [270] I. De Stefano, G. Raspaglio, G.F. Zannoni, D. Travaglia, M.G. Prisco, M. Mosca, C. Ferlini, G. Scambia, D. Gallo, Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma, *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 1374–1381. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.07.011>.
- [271] V. Kaminsky, K.W. Lin, Y. Filyak, R. Stoika, Differential effect of sanguinarine, chelerythrine and chelidonine on DNA damage and cell viability in primary mouse spleen cells and mouse leukemic cells, *Cell. Biol. Int.* 32 (2008) 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.09.004>.
- [272] X. Dong, M. Zhang, K. Wang, P. Liu, D. Guo, X. Zheng, X. Ge, Sanguinarine inhibits vascular endothelial growth factor release by generation of reactive oxygen species in MCF-7 human mammary adenocarcinoma cells, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) 517698. <https://doi.org/10.1155/2013/517698>.
- [273] S.U. Choi, N. Baek, S.-H. Kim, J.H. Yang, J.S. Eun, T.Y. Shin, J.P. Lim, J.H. Lee, H. Jeon, M.-Y. Yun, K.-H. Leem, H.W. Park, D.K. Kim, Cytotoxic isoquinoline alkaloids from the aerial parts of *Corydalis incisa*, *Arch. Pharm. Res.* 30 (2007) 151–154. <https://doi.org/10.1007/BF02977687>.
- [274] K. Habartová, R. Havelek, M. Seifrtová, K. Královec, L. Cahlíková, J. Chlebek, E. Čermáková, N. Mazanková, J. Maříková, J. Kuneš, L. Nováková, M. Rezáčová, Scoulerine affects microtubule structure, inhibits proliferation, arrests cell cycle and thus culminates in the apoptotic death of cancer cells, *Sci. Rep.* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22862-0>.
- [275] K.H. Kim, I.K. Lee, C.J. Piao, S.U. Choi, J.H. Lee, Y.S. Kim, K.R. Lee, Benzylisoquinoline alkaloids from the tubers of *Corydalis ternata* and their cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 4487–4490. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.06.035>.
- [276] S. Letasiová, S. Jantová, M. Miko, R. Ovádeková, M. Horváthová, Effect of berberine on proliferation, biosynthesis of macromolecules, cell cycle and induction of intercalation with DNA, dsDNA damage and apoptosis in Ehrlich ascites carcinoma cells, *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 263–270. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.2.0015>.
- [277] N. Iizuka, K. Miyamoto, K. Okita, A. Tangoku, H. Hayashi, S. Yosino, T. Abe, T. Morioka, S. Hazama, M. Oka, Inhibitory effect of *Coptidis rhizoma* and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines, *Cancer Lett.* 148 (2000) 19–25. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(99\)00264-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(99)00264-5).
- [278] J.Z. Wang, Q.H. Chen, F.P. Wang, Cytotoxic bisbenzylisoquinoline alkaloids from the roots of *Cyclea racemosa*, *J. Nat. Prod.* 73 (2010) 1288–1293. <https://doi.org/10.1021/np1001863>.
- [279] J. Wang, J. Liao, W. Xu, X. Chen, Bisbenzylisoquinoline alkaloids from the roots of *Cyclea tonkinensis*, *Planta Med.* 81 (2015) 600–605. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545882>.



- [280] J.Z. Wang, X.Y. Liu, F.P. Wang, Two new curine-type bisbenzylisoquinoline alkaloids from the roots of *Cyclea watti* with cytotoxic activities, *Chem. Pharm. Bull.* 58 (2010) 986–988. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.986>.
- [281] J.J. Lv, M. Xu, D. Wang, H.T. Zhu, C.R. Yang, Y.F. Wang, Y. Li, Y.J. Zhang, Cytotoxic bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania epigaea*, *J. Nat. Prod.* 76 (2013) 926–932. <https://doi.org/10.1021/np400084t>.
- [282] F.R. Chang, Y.C. Wu, New bisbenzylisoquinolines, fatty acid amidic aporphines, and a protoberberine from Formosan *Cocculus orbiculatus*, *J. Nat. Prod.* 68 (2005) 1056–1060. <https://doi.org/10.1021/np050082a>.
- [283] Z.L. Liu, T. Hirano, S. Tanaka, K. Onda, K. Oka, Persistent reversal of P-glycoprotein-mediated daunorubicin resistance by tetrandrine in multidrug-resistant human T lymphoblastoid leukemia MOLT-4 cells, *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003) 1531–1537. <https://doi.org/10.1211/0022357022115>.
- [284] Y.C. Wu, Y.F. Liou, S.T. Lu, C.H. Chen, J.J. Chang, K.H. Lee, Cytotoxicity of isoquinoline alkaloids and their *N*-oxides, *Planta Med.* 55 (1989) 163–165. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961913>.
- [285] M. Aljofan, H.J. Netter, A.N. Aljarbou, T.B. Hadda, I.E. Orhan, B. Sener, B.A. Mungall, Anti-hepatitis B activity of isoquinoline alkaloids of plant origin, *Arch. Virol.* 159 (2014) 1119–1128. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1937-7>.
- [286] X. Chen, T.T.T. Dang, P.J. Facchini, Noscaphine comes of age, *Phytochemistry*. 111 (2015) 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.008>.
- [287] B. Sung, K.S. Ahn, B.B. Aggarwal, Noscaphine, a benzylisoquinoline alkaloid, sensitizes leukemic cells to chemotherapeutic agents and cytokines by modulating the NF- $\kappa$ B signaling pathway, *Cancer Res.* 70 (2010) 3259–3268. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4230>.
- [288] L. Alisaraie, J.A. Tuszynski, Determination of noscaphine's localization and interaction with the tubulin- $\alpha/\beta$  heterodimer, *Chem. Biol. Drug. Des.* 78 (2011) 535–546. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01189.x>.
- [289] W. Shen, B. Liang, J. Yin, X. Li, J. Cheng, Noscaphine increases the sensitivity of drug-resistant ovarian cancer cell line SKOV3/DDP to cisplatin by regulating cell cycle and activating apoptotic pathways, *Cell. Biochem. Biophys.* 72 (2015) 203–213. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0438-y>.
- [290] A.J. DeBono, J.H. Xie, S. Ventura, C.W. Pouton, B. Capuano, P.J. Scammells, Synthesis and biological evaluation of *N*-substituted noscaphine analogues, *ChemMedChem*. 7 (2012) 2122–2133. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200365>.
- [291] K. He, J.-L. Gao, Protopine inhibits heterotypic cell adhesion in MDA-MB-231 cells through down-regulation of multi-adhesive factors, *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 11 (2014) 415–424. doi: 10.4314/ajtcam.v11i2.28.
- [292] X. Wang, M. Tanaka, S. Krstin, H.S. Peixoto, M. Wink, The interference of selected cytotoxic alkaloids with the cytoskeleton: an insight into their modes of action, *Molecules*. 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/molecules21070906>.
- [293] C.H. Chen, C.H. Liao, Y.L. Chang, J.H. Guh, S.L. Pan, C.M. Teng, Protopine, a novel microtubule-stabilizing agent, causes mitotic arrest and apoptotic cell death in human hormone-refractory prostate cancer cell lines, *Cancer Lett.* 315 (2012) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.042>.
- [294] R. Sun, H. Jiang, W. Zhang, K. Yang, C. Wang, L. Fan, Q. He, J. Feng, S. Du, Z. Deng, Z. Geng, Cytotoxicity of aporphine, protoberberine, and protopine alkaloids from *Dicranostigma leptopodium* (Maxim.) Fedde, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2014 (2014) 580483. <https://doi.org/10.1155/2014/580483>.

- [295] A. Nawawi, C. Ma, N. Nakamura, M. Hattori, M. Kurokawa, K. Shiraki, N. Kashiwaba, M. Ono, Anti-herpes simplex virus activity of alkaloids isolated from *Stephania cepharantha*, *Biol. Pharm. Bull.* 22 (1999) 268–274. <https://doi.org/10.1248/bpb.22.268>.
- [296] J.J. Nair, J. van Staden, Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae, *Nat. Prod. Commun.* 9 (2014) 1193–1210. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900834>.
- [297] Z. Cao, D. Yu, S. Fu, G. Zhang, Y. Pan, M. Bao, J. Tu, B. Shang, P. Guo, P. Yang, Q. Zhou, Lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity, *Toxicol. Lett.* 218 (2013) 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.01.018>.
- [298] L. Li, H.J. Dai, M. Ye, S.L. Wang, X.J. Xiao, J. Zheng, H.Y. Chen, Y. Luo, J. Liu, Lycorine induces cell-cycle arrest in the G0/G1 phase in K562 cells via HDAC inhibition, *Cancer Cell. Int.* 12 (2012) 49. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-12-49>.
- [299] R. Liu, Z. Cao, J. Tu, Y. Pan, B. Shang, G. Zhang, M. Bao, S. Zhang, P. Yang, Q. Zhou, Lycorine hydrochloride inhibits metastatic melanoma cell-dominant vasculogenic mimicry, *Pigment Cell Melanoma Res.* 25 (2012) 630–638. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2012.01036.x>.
- [300] Z. Cao, P. Yang, Q. Zhou, Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine, *Sci. China Chem.* 56 (2013) 1382–1391. <https://doi.org/10.1007/s11426-013-4967-9>.
- [301] I. Doskočil, A. Hošťálková, M. Šafratová, N. Benešová, J. Havlík, R. Havelek, J. Kuneš, K. Královec, J. Chlebek, L. Cahlíková, Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells, *Phytochem. Lett.* 13 (2015) 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.08.004>.
- [302] R. Dasari, L.M.Y. Banuls, M. Masi, S.C. Pelly, V. Mathieu, I.R. Green, W.A.L. van Otterlo, A. Evidente, R. Kiss, A. Kornienko, C1,C2-ether derivatives of the Amaryllidaceae alkaloid lycorine: retention of activity of highly lipophilic analogues against cancer cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 923–927. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.073>.
- [303] D. Koutová, N. Maafi, R. Havelek, L. Opletal, G. Blunden, M. Řezáčová, L. Cahlíková, Chemical and biological aspects of montanine-type alkaloids isolated from plants of the Amaryllidaceae family, *Molecules.* 25 (2020) 2337. <https://doi.org/10.3390/molecules25102337>.
- [304] J.J. Nair, J.C. Manning, J. Van Staden, Distichamine, a chemotaxonomic marker for the genus *Boophone* Herb. (Amaryllidaceae), *S. Afr. J. Bot.* 83 (2012) 89–91. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.07.024>.
- [305] J.J. Nair, L. Rárová, M. Strnad, J. Bastida, L. Cheesman, J. van Staden, Crinane alkaloids of the Amaryllidaceae with cytotoxic effects in human cervical adenocarcinoma (HeLa) cells, *Nat. Prod. Commun.* 9 (2014) 461–466. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900406>.
- [306] J.J. Nair, L. Rárová, M. Strnad, J. Bastida, J. van Staden, Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 6195–6199. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.005>.
- [307] R. Havelek, M. Seifrtová, K. Královec, L. Brůčková, L. Cahlíková, M. Dalecká, J. Vávrová, M. Řezáčová, L. Opletal, Z. Bílková, The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells, *Phytomedicine.* 21 (2014) 479–490. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.005>.

- [308] M. Seifrtová, R. Havelek, L. Cahlíková, D. Hulcová, N. Mazánková, M. Řezáčová, 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*. 35 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.019>.
- [309] J. McNulty, J.J. Nair, J. Bastida, S. Pandey, C. Griffin, Structure activity studies on the crinine alkaloid apoptosis-inducing pharmacophore, *Nat. Prod. Commun.* 4 (2009) 483–488. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400408>.
- [310] K. Likhitwitayawuid, C.K. Angerhofer, H. Chai, J.M. Pezzuto, G.A. Cordell, N. Ru-angrungsi, Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*, *J. Nat. Prod.* 56 (1993) 1331–1338. <https://doi.org/10.1021/np50098a017>.
- [311] J.J. Nair, J. Van Staden, Cytotoxic tazettine alkaloids of the plant family Amaryllidaceae, *S. Afr. J. Bot.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.002>.
- [312] E. Furusawa, H. Irie, D. Combs, W.C. Wildman, Therapeutic activity of pretazettine on Rauscher leukemia: comparison with the related Amaryllidaceae alkaloids, *Chemotherapy*. 26 (1980) 36–45. <https://doi.org/10.1159/000237881>.
- [313] J.J. Nair, J. van Staden, The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles, *S. Afr. J. Bot.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.013>.
- [314] A. Kornienko, A. Evidente, Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners, *Chem. Rev.* 108 (2008) 1982–2014. <https://doi.org/10.1021/cr078198u>.
- [315] K. Habartová, L. Cahlíková, M. Řezáčová, R. Havelek, The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity, *Nat. Prod. Commun.* 11 (2016) 1587–1594. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101038>.
- [316] S.E. Kintzios, M.G. Barberaki, M.G. Barberaki, *Plants that fight cancer*, 2nd ed., CRC Press, 2019. <https://doi.org/10.1201/9780429056925>.
- [317] L. Ingrassia, F. Lefranc, V. Mathieu, F. Darro, R. Kiss, Amaryllidaceae isocarbostryril alkaloids and their derivatives as promising antitumor agents, *Transl Oncol.* 1 (2008) 1–13. doi: 10.1593/tlo.08100.
- [318] G.R. Pettit, G.R. Pettit, R.A. Backhaus, M.R. Boyd, A.W. Meerow, Antineoplastic agents, 256. Cell growth inhibitory isocarbostryrils from *Hymenocallis*, *J. Nat. Prod.* 56 (1993) 1682–1687. <https://doi.org/10.1021/np50100a004>.
- [319] K. Kojima, M. Mutsuga, M. Inoue, Y. Ogihara, Two alkaloids from *Zephyranthes carinata*, *Phytochemistry*. 48 (1998) 1199–1202. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00797-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00797-8).
- [320] B. Wang, Y.C. Mai, Y. Li, J.Q. Hou, S.L. Huang, T.M. Ou, J.H. Tan, L.K. An, D. Li, L.Q. Gu, Z.S. Huang, Synthesis and evaluation of novel rutaecarpine derivatives and related alkaloids derivatives as selective acetylcholinesterase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1415–1423. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.044>.
- [321] J. Sichaem, T. Rojpitikul, P. Sawasdee, K. Lugsanangarm, S. Tip-Pyang, Furoquinoline alkaloids from the leaves of *Evodia lepta* as potential cholinesterase inhibitors and their molecular docking, *Nat. Prod. Commun.* 10 (2015) 1359–1362. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000811>.
- [322] J. Sichaem, S. Tip-pyang, K. Lugsanangarm, Bioactive aporphine alkaloids from the roots of *Artabotrys spinosus*: cholinesterase inhibitory activity and molecular docking studies, *Nat. Prod. Commun.* 13 (2018) 1279–1282. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801301011>.

- [323] I.E. Orhan, F.S. Senol Deniz, G. Eren, B. Sener, Molecular approach to promising cholinesterase inhibitory effect of several amaryllidaceae alkaloids: further re-investigation, *S. Afr. J. Bot.* 136 (2021) 175–181.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.017>.
- [324] A. Adersen, B. Gauguin, L. Gudiksen, A.K. Jäger, Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity, *J. Ethnopharmacol.* 104 (2006) 418–422.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.032>.

## 7 TĚMATICKÉ PRÁCE PŘEDKLADATELE

- [12] **J. Chlebek**, J. Korábečný, R. Doležal, Š. Štěpánková, D.I. Pérez, A. Hošťálková, L. Opletal, L. Cahlíková, K. Macáková, T. Kučera, M. Hrabínová, D. Jun, *In vitro* and *in silico* acetylcholinesterase inhibitory activity of thalictricavine and canadine and their predicted penetration across the blood-brain barrier, *Molecules*. 24 (2019) 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules24071340>.
- [15] L. Cahlíková, D.I. Pérez, Š. Štěpánková, **J. Chlebek**, M. Šafratová, A. Hošťálková, L. Opletal, *In vitro* inhibitory effects of 8-*O*-demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across the blood-brain barrier, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1189–1192. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00191>.
- [16] **J. Chlebek**, K. Macáková, L. Cahlíková, M. Kurfürst, J. Kuneš, L. Opletal, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae), *Nat. Prod. Commun.* 6 (2011) 607–610. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600507>.
- [17] M. Šafratová, A. Hošťálková, D. Hulcová, K. Breiterová, V. Hrabcová, M. Machado, D. Fontinha, M. Prudêncio, J. Kuneš, **J. Chlebek**, D. Jun, M. Hrabínová, L. Nováková, R. Havelek, M. Seifrtová, L. Opletal, L. Cahlíková, Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity, *Arch. Pharm. Res.* 41 (2018) 208–218. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-1000-4>.
- [18] D. Hulcová, J. Maříková, J. Korábečný, A. Hošťálková, D. Jun, J. Kuneš, **J. Chlebek**, L. Opletal, A. De Simone, L. Nováková, V. Andrisano, A. Růžička, L. Cahlíková, Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease, *Phytochemistry*. 165 (2019) 112055. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112055>.
- [31] L. Cahlíková, M. Šafratová, A. Hošťálková, **J. Chlebek**, D. Hulcová, K. Breiterová, L. Opletal, Pharmacognosy and its role in the system of profile disciplines in pharmacy, *Nat. Prod. Commun.* 15 (2020) 1–7. <https://doi.org/10.1177/1934578X20945450>.
- [44] L. Cahlíková, K. Macáková, N. Benešová, **J. Chlebek**, A. Hošťálková, L. Opletal, Chapter 6 - Natural compounds (small molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: a critical review, in: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in natural products chemistry*, Elsevier, 2014, 153–194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63281-4.00006-9>.
- [106] L. Zemanová, J. Hofman, E. Novotná, K. Musílek, T. Lundová, J. Havránková, A. Hošťálková, **J. Chlebek**, L. Cahlíková, V. Wsól, Flavones inhibit the activity of AKR1B10, a promising therapeutic target for cancer treatment, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 2666–2674. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00616>.
- [107] L. Škarydová, J. Hofman, **J. Chlebek**, J. Havránková, K. Košanová, A. Skarka, A. Hošťálková, T. Plucha, L. Cahlíková, V. Wsól, Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.005>.
- [123] N. Vaněčková, A. Hošťálková, M. Šafratová, J. Kuneš, D. Hulcová, M. Hrabínová, I. Doskočil, Š. Štěpánková, L. Opletal, L. Nováková, D. Jun, **J. Chlebek**, L. Cahlíková, Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities, *RSC Adv.* 6 (2016) 80114–80120. <https://doi.org/10.1039/C6RA20205E>.
- [125] L. Cahlíková, M. Hrabínová, A. Kulhánková, N. Benešová, **J. Chlebek**, D. Jun, Z. Novák, K. Macáková, J. Kuneš, K. Kuča, L. Opletal, Alkaloids from *Chlidanthus*

- fragens* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 1541–1544.  
<https://doi.org/10.1177/1934578X1300801110>.
- [139] A. Hošťálková, T. Siatka, **J. Chlebek**, L. Opletal, P. Drašar, L. Cahlíková, Boldinové alkaloidy a perspektivy jejich využití, *Chem. Listy.* 109 (2015) 846–855.
- [162] **J. Chlebek**, A. De Simone, A. Hošťálková, L. Opletal, C. Pérez, D.I. Pérez, L. Havlíková, L. Cahlíková, V. Andrisano, Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from *Corydalis cava* (Fumariaceae) as Alzheimer’s disease targets, *Fitoterapia.* 109 (2016) 241–247.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.01.008>.
- [163] Z. Novák, **J. Chlebek**, L. Opletal, P. Jiroš, K. Macáková, J. Kuneš, L. Cahlíková, Corylucinine, a new alkaloid from *Corydalis cava* (Fumariaceae), and its cholinesterase activity, *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012) 859–860.  
<https://doi.org/10.1177/1934578X1200700712>.
- [164] **J. Chlebek**, Z. Novák, D. Kassemová, M. Šafratová, J. Kostelník, L. Malý, M. Ločárek, L. Opletal, A. Hošťálková, M. Hrabínová, J. Kuneš, P. Novotná, M. Urbanová, L. Nováková, K. Macáková, D. Hulcová, P. Solich, C. Pérez-Martín, D. Jun, L. Cahlíková, Isoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and their biological activities related to Alzheimer’s disease, *Chem. Biodivers.* 13 (2016) 91–99.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201500033>.
- [165] L. Cahlíková, K. Macáková, J. Kunes, M. Kurfürst, L. Opletal, J. Cvačka, **J. Chlebek**, G. Blundene, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae), *Nat. Prod. Commun.* 5 (2010) 1035–1038. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500710>.
- [166] T. Siatka, M. Adamcová, L. Opletal, L. Cahlíková, D. Jun, M. Hrabínová, J. Kuneš, **J. Chlebek**, Cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibitory activities of alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae), *Molecules.* 22 (2017) 1181.  
<https://doi.org/10.3390/molecules22071181>.
- [167] A. Hošťálková, L. Opletal, J. Kuneš, Z. Novák, M. Hrabínová, **J. Chlebek**, L. Čegan, L. Cahlíková, Alkaloids from *Peumus boldus* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity, *Nat. Prod. Commun.* 10 (2015) 577–580. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000410>
- [168] L. Cahlíková, M. Ločárek, N. Benešová, R. Kučera, **J. Chlebek**, Z. Novák, L. Opletal, Isolation and cholinesterase inhibitory activity of *Narcissus* extracts and Amaryllidaceae alkaloid, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 781–785.  
<https://doi.org/10.1177/1934578X1300800625>.
- [169] E. Kohelová, J. Maříková, J. Korábečný, D. Hulcová, T. Kučera, D. Jun, **J. Chlebek**, J. Jenčo, M. Šafratová, M. Hrabínová, A. Ritomská, M. Malaník, R. Peřinová, K. Breiterová, J. Kuneš, L. Nováková, L. Opletal, L. Cahlíková, Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer’s disease: isolation, structural elucidation and biological activity, *Bioorg. Chem.* 107 (2021) 104567. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104567>.
- [187] **J. Chlebek**, I. Doskočil, D. Hulcová, K. Breiterová, M. Šafratová, R. Havelek, K. Habartová, A. Hošťálková, T. Volštátová, L. Cahlíková, Cytotoxicity of naturally occurring isoquinoline alkaloids of different structural types, *Nat. Prod. Commun.* 11 (2016) 753–756. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100614>.
- [247] L. Cahlíková, L. Hulová, M. Hrabínová, **J. Chlebek**, A. Hošťálková, M. Adamcová, M. Šafratová, D. Jun, L. Opletal, M. Ločárek, K. Macáková, Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors, *Fitoterapia.* 103 (2015) 192–196.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.04.004>.

- [274] K. Habartová, R. Havelek, M. Seifrtová, K. Královec, L. Cahlíková, **J. Chlebek**, E. Čermáková, N. Mazánková, J. Maříková, J. Kuneš, L. Nováková, M. Řezáčová, Scoulerine affects microtubule structure, inhibits proliferation, arrests cell cycle and thus culminates in the apoptotic death of cancer cells, *Sci. Rep.* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22862-0>.
- [301] I. Doskočil, A. Hošťálková, M. Šafratová, N. Benešová, J. Havlík, R. Havelek, J. Kuneš, K. Královec, **J. Chlebek**, L. Cahlíková, Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells, *Phytochem. Lett.* 13 (2015) 394-398. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.08.004>.