

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOSIE A FARMACEUTICKÉ
BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

POLOSYNTETICKÉ DERIVÁTY BULBOKAPNINU
A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA I

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Konzultant práce:

Negar Maafi, Ph.D.

Hradec Králové, 2025

Štěpán Novák

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND
PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

SEMISYNTHETIC DERIVATIVES OF BULBOCAPNINE
AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY I

Supervisor:

prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Consultant:

Negar Maafi, Ph.D.

Hradec Králové, 2025

Štěpán Novák

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mě během vypracování této diplomové práce podporovali. Velké díky patří mé vedoucí práce prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky, konzultantce Negar Maafi, Ph.D. za příjemné pracovní prostředí, bezpočet zodpovězených dotazů a pomoc při vypracování praktické části.

Děkuji celému kolektivu KFGFB, zejména PharmDr. Daniele Suchánkové, Ph.D. za stanovení inhibiční aktivity proti cholinesterázám, dále doc. RNDr. Radimovi Havelekovi, Ph.D. z ÚLB LFHK za stanovení cytotoxické aktivity, PharmDr. Ondřejovi Jandourkovi, Ph.D. z KBLV za stanovení antimikrobiální aktivity, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření NMR spekter a Mgr. Štefanovi Kosturkovi za změření HRMS spekter.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu, trpělivost a motivaci během celého studia.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením prof. Ing. Lucie Cahlíkové, Ph.D. a Negar Maafi, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Hradec Králové, 13/05/2025

Štěpán Novák

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie a farmaceutické botaniky

Kandidát: Štěpán Novák

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

Konzultant: Negar Maafi, Ph.D.

Název diplomové práce: Polosyntetické deriváty bulbokapninu a jejich biologická aktivita I

Bulbokapnin, biologicky aktivní alkaloid aporfinového typu, byl výchozím materiálem pro přípravu pilotní série deseti polosyntetických derivátů. Z důvodu nižší stability esterů proti degradaci sérovými hydrolázami byla připravena sada etherů. Byly použity dvě metody syntézy (NaH pod atmosférou argonu nebo K_2CO_3 v nadbytku) založené na S_N2 Williamsonově syntéze etherů, finální produkty byly purifikovány pomocí preparativní TLC. U všech produktů byla změřena a analyzována jejich 1H a ^{13}C NMR spektra, HRMS spektra a optická aktivita. Následně byla provedena řada screeningových testů jejich biologické aktivity: inhibiční aktivita proti humánním rekombinantním cholinesterázám (*hAChE*, *hBuChE*), stanovení cytotoxicity na panelu deseti humánních buněčných liniích, antimykobakteriální, antibakteriální a antimykotické účinky proti vybraným mykobakteriálním kmenům, G^- a G^+ bakteriím, kvasinkám a vláknitým houbám. Dále byl proveden *in silico* výpočet hodnoty BBB skóre připravených derivátů pro stanovení jejich schopnosti pronikat HEB a kumulovat se v mozku.

V rámci screeningu biologické aktivity tři syntetizované deriváty bulbokapninu (BLC-29, BLC-30, BLC-33) vykazaly zajímavou aktivitu proti *hBuChE* (IC_{50} 1.89 ± 0.19 , 1.35 ± 0.10 a 2.01 ± 0.38 $\mu\text{mol/L}$, v daném pořadí). Všechny tři deriváty jsou navíc schopné přestupu přes HEB (BBB skóre 3.94–4.09). V testech cytotoxicity při testovací koncentraci 10 $\mu\text{mol/L}$ žádná ze sloučenin nevykázala výraznou cytotoxicitu. Podobně většina molekul nevykázala ani výraznou antimikrobiální aktivitu.

Klíčová slova: bulbokapnin, polosyntetické deriváty, syntéza, biologická aktivita

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: Štěpán Novák

Supervisor: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Consultant: Negar Maafi, Ph.D.

Title of Diploma thesis: Semisynthetic derivatives of bulbocapnine and their biological activity I

Bulbocapnine, biologically active aporphine type alkaloid, was starting material for the preparation of the pilot series of ten semisynthetic derivatives. Due to the lower stability of esters against degradation by serum hydrolases, a set of ethers was prepared. Two methods (NaH under Ar atmosphere or K₂CO₃ in excess) based on S_N2 Williamson ether synthesis were used, final products were purified by preparative TLC. For all products were measured and analysed their ¹H and ¹³C NMR spectra, HRMS spectra and optical activity. Finally, a bunch of screening tests for biological activity were performed: inhibitory activity on humane recombinant cholinesterases (*h*AChE, *h*BuChE), cytotoxicity essay on ten humane cell lines panel, antimycobacterial, antibacterial and antifungal effects against chosen mycobacterial strains, G⁻ and G⁺ bacteria, yeast and filamentous fungi. For addition, *in silico* BBB-score computing of our derivatives was conducted, to clarify their potency of HEB penetration and brain cumulation.

Within the biological activity screening three of the synthesized bulbocapnine derivatives (BLC-29, BLC-30, BLC-33) showed promising inhibitory activity against *h*BuChE (IC₅₀ 1.89 ± 0.19, 1.35 ± 0.10 a 2.01 ± 0.38 μmol/L, respectively). All three derivatives also showed the ability to penetrate HEB (BBB score 3.94–4.09). In cytotoxic assay none of the compounds showed notable cytotoxicity in 10 μmol/L testing concentration. Similarly, most of the molecules did not show prominent antimicrobial activity.

Key words: bulbocapnine, semisynthetic derivatives, synthesis, biological activity

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD	11
2 CÍL PRÁCE	13
3 TEORETICKÁ ČÁST	14
3.1 Alkaloidy a jejich charakteristika	14
3.1.1 Alkaloidy isochinolinového typu	15
3.1.2 Alkaloidy aporfinového typu	15
3.1.2.1 Biosyntéza alkaloidů aporfinového typu	16
3.1.2.2 Zástupci alkaloidů aporfinového typu a jejich přírodní zdroje	18
3.1.2.3 Biologická aktivita alkaloidů aporfinového typu	19
3.1.2.3.1 Biologické účinky na receptory pro neurotransmitery	20
3.1.2.3.2 Působení aporfinových alkaloidů na cholinesterázy	22
3.1.2.3.3 Antioxidační aktivita aporfinových alkaloidů	23
3.1.2.3.4 Antimikrobiální aktivita aporfinových alkaloidů	24
3.1.2.3.5 Cytotoxické působení aporfinových alkaloidů	24
3.1.2.4 Charakteristika alkaloidu bulbokapninu	25
3.1.2.4.1 Biologická aktivita bulbokapninu	26
3.2 Alzheimerova choroba	27
3.2.1.1 Role cholinesteráz v lidském těle	28
3.2.1.2 Hypotéza cholinergní dysfunkce	28
3.2.1.3 Hypotéza amyloidu-beta	29
3.2.1.3.1 Patologie komplexů A β -AChE	30
3.2.1.4 Hypotéza tau-proteinu	30
3.2.1.5 Hypotéza neurozánětlivých procesů	31
3.2.2 Současné možnosti terapie Alzheimerovy demence	32
3.2.2.1 Úskalí současné terapie Alzheimerovy demence	33
3.3 Mikrobiální infekce	33
3.3.1 Infekce způsobené mykobakteriemi	34
3.3.2 Infekce způsobené bakteriálními a mykotickými agens	35
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1 Použité materiály a obecné postupy	37
4.1.1 Přechlazení bulbokapninu	37
4.1.2 Příprava polosyntetických derivátů bulbokapninu	38
4.1.3 Analytická a preparativní tenkovrstvá chromatografie	39
4.1.3.1 Složení použitých mobilních fází pro analytickou a preparativní TLC	39
4.1.4 Strukturní analýza připravených derivátů	40
4.1.4.1 ¹ H a ¹³ C NMR analýza	40
4.1.4.2 HRMS analýza	40
4.1.4.3 Optická otáčivost	40

4.1.5	Metody pro stanovení biologické aktivity	41
4.1.5.1	Stanovení aktivity proti lidským rekombinantním cholinesterázám	41
4.1.5.2	Stanovení <i>in vitro</i> antimykobakteriální aktivity	42
4.1.5.3	Stanovení <i>in vitro</i> antibakteriální aktivity	42
4.1.5.4	Stanovení <i>in vitro</i> antimykotické aktivity	43
4.1.5.5	Stanovení <i>in vitro</i> cytotoxické aktivity	43
4.2	Příprava polosyntetických derivátů a jejich strukturní identifikace	44
4.2.1	Výchozí látka bulbokapnin (BLC-S)	44
4.2.2	Příprava 11- <i>O</i> -(4'-isopropylbenzyl)bulbokapninu (BLC-22)	45
4.2.3	Příprava 11- <i>O</i> -(2'-brombenzyl)bulbokapninu (BLC-29)	46
4.2.4	Příprava 11- <i>O</i> -benzylbulbokapninu (BLC-30)	47
4.2.5	Příprava 11- <i>O</i> -(3',5'-dimethoxybenzyl)bulbokapninu (BLC-31)	48
4.2.6	Příprava 11- <i>O</i> -(<i>N</i> -piperidylethyl)bulbokapninu (BLC-32)	49
4.2.7	Příprava 11- <i>O</i> -(1'-naftylmethyl)bulbokapninu (BLC-33)	50
4.2.8	Příprava 11- <i>O</i> -(3'-methoxyfenylethyl)bulbokapninu (BLC-34)	51
4.2.9	Příprava 11- <i>O</i> -(3'-chlorbenzyl)bulbokapninu (BLC-35)	52
4.2.10	Příprava 11- <i>O</i> -(cyklohexylmethyl)bulbokapninu (BLC-36)	53
4.2.11	Příprava 11- <i>O</i> -fenylethylbulbokapninu (BLC-37)	54
5	VÝSLEDKY	55
5.1	Příprava polosyntetických derivátů bulbokapninu	55
5.2	Výsledky měření molekulové hmotnosti bulbokapninu a jeho derivátů	55
5.3	Výsledky biologické aktivity připravených derivátů	56
5.3.1	Inhibiční aktivita proti cholinesterázám (<i>hAChE</i> , <i>hBuChE</i>)	56
5.3.1.1	Schopnost připravených derivátů prostoupit HEB	57
5.3.2	Antibakteriální aktivita proti vybraným mykobakteriálním agens	57
5.3.3	Antibakteriální aktivita vybraných derivátů proti bakteriálním agens	58
5.3.4	Antimykotická aktivita vybraných derivátů proti mykotickým agens	59
5.3.5	Cytotoxická aktivita vybraných polosyntetických derivátů	60
6	DISKUSE A ZÁVĚR	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

τ P	tau-protein
A β	amyloid-beta
AD	Alzheimerova demence
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChEi	inhibitor acetylcholinesterázy
ASA	kyselina acetylsalicylová
BACE-1	beta-sekretáza 1
BuChE	butyrylcholinesteráza
BuChEi	inhibitor butyrylcholinesterázy
CDCl ₃	deuterovaný chloroform
CHCl ₃	chloroform
COX-1	cyklooxygenáza-1
DMF	dimethylformamid
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Evropská léková agentura
eq	molární ekvivalent
EtO	ethoxy
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
hAChE	lidská rekombinantní acetylcholinesteráza
hBuChE	lidská rekombinantní butyrylcholinesteráza
HEB	hematoencefalická bariéra
HRMS	vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrie
ChAT	cholin-acetyltransferáza
K ₂ CO ₃	uhličitan draselný
KBLV	Katedra biologických a lékařských věd
KFGFB	Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky
MDR	<i>multidrug-resistant</i> , mnohočetně antibioticky rezistentní
MeO	methoxy
MIC	minimální inhibiční koncentrace

MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>
NaH	hydrid sodný
NCS	(<i>S</i>)-norkoklaurin syntáza
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAS	<i>peripheral anionic site</i> , periferní aniontová oblast
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktivní formy kyslíku
RX	alkylační činidlo
THF	tetrahydrofuran
TLC	<i>thin-layer chromatography</i> , chromatografie na tenké vrstvě
ÚLB LFHK	Ústav lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové
VRE	vankomycin-rezistentní enterokoky
XDR	<i>extensively drug-resistant</i> , extenzivně antibioticky rezistentní

1 ÚVOD

Rostliny jsou díky svým léčivým nebo naopak toxickým účinkům od nepaměti nedílnou součástí lidového léčitelství. Mnoho komunit po celém světě je využívalo, či stále využívá pro terapii zánětů, infekcí, poruch centrální nervové soustavy a jiných obtíží [1]. Jejich účinek se odvíjí od farmakologicky aktivních látek, které produkují v rámci svého metabolismu. Obrovská variabilita biosyntetických cest a jejich optimalizace tlakem přirozeného výběru poskytuje molekuly, které jsou nositeli klíčových vlastností pro interakce s receptory a enzymy, průchod přes membrány nebo jejich stabilitu [2], [3]. V poslední době se tyto látky stále častěji dostávají do hledáčku mnoha výzkumných skupin. Některé z nich jsou studovány a strukturně modifikovány s cílem najít vůdčí molekuly pro nová léčiva. Význam přírodních látek je nesporný. Více než 400 schválených léčiv vychází ze struktury dvaceti v přírodě se vyskytujících molekul [4]. Odhaduje se, že přes 50 % v současnosti využívaných léčiv a bezmála 80 % léčiv cílících do centrální nervové soustavy je přímo odvozeno nebo alespoň inspirováno strukturou přírodních látek [5], [6]. Téměř 20 % všech nových, klinicky schválených léčiv posledních čtyř dekad je pak jejich polosyntetickými deriváty [7].

Alkaloidy jsou sekundární metabolity, které rostliny syntetizují s ohromnou strukturní variabilitou, která je často spojena se zajímavou farmakologickou aktivitou. Tyto dusíkaté sloučeniny jsou jednou z nejrozsáhlejších skupin přírodních látek. Sdílení strukturní podobnosti s neurotransmitery, které jsou rovněž svým původem odvozeny od základních aminokyselin, často stojí za širokým spektrem biologických účinků. Kromě přímého působení na buněčné receptory a jejich signální dráhy jsou schopny interagovat s klíčovými enzymy, a to nejen jako substráty, ale velmi podstatně jako jejich inhibitory nebo induktory [5]. Alkaloidy vykazují celou řadu biologických aktivit, například zajímavé protizánětlivé, analgetické, antioxidační, neuroprotektivní a protirakovinné účinky [1]. Jako jedny z mála jsou spojeny se schopností interakce s cholinesterázami, a to v relativně nízkých koncentracích. Nemalý podíl na tomto působení má právě podobnost s aktivními biomolekulami společně s atomem dusíku v jejich struktuře [3], [8].

Právě působení na cholinergní transmissi je jednou z cest současné terapie Alzheimerovy demence (AD). Toto komplexní chronické neurodegenerativní onemocnění je charakteristické postupným a nezvratným úbytkem neuronů v určitých oblastech

centrální nervové soustavy (CNS), který je spojen s úpadkem kognitivních funkcí a výrazným zhoršením kvality života [9]. I přes významný pokrok v chápání celého neuropatologického procesu nedošlo v oblasti terapie k výraznému posunu. Provázanost jednotlivých kaskád nasvědčuje, že je nutné přistupovat k onemocnění komplexně. Působení zprostředkované nejen schopností inhibice klíčových enzymů a receptorů, ale i současné protizánětlivé účinky modulací prozánětlivých signálních drah, jsou známkou, že isochinolinové alkaloidy, zvláště pak alkaloidy aporfinového, morfinanového a protoberberinového typu, mohou být atraktivním zdrojem nových strukturních předloh s potenciálem terapeutického využití v léčbě těchto komplexních onemocnění [1].

Dalším významným problémem dnešní doby je narůstající rezistence bakteriálních kmenů a náročná eradikace mykotických agens. V historii se mnohé přírodní látky staly předlohou pro nová antiinfektiva. Trend hledání nových vůdčích molekul mezi metabolity rostlin pokračuje nadále, a je rozšířen o strukturní obměny těchto látek [10].

Stěžejním bodem této diplomové práce je vliv strukturních modifikací alkaloidu bulbokapninu (aporfinový strukturní typ) na jeho biologické účinky. Série připravených derivátů (etherů) byla podrobena testům inhibiční aktivity proti lidským rekombinantním cholinesterázám, testům cytotoxicity na buněčných liniích a inhibičních účinků na mykobakteriální, bakteriální a mykotická agens.

2 CÍL PRÁCE

Hlavní cíle diplomové práce je možné shrnout následovně:

1. Rešerše literatury na téma bulbokapninu, aporfinových alkaloidů, a jejich biologické aktivity.
2. Příprava sady polosyntetických derivátů bulbokapninu.
3. Ověření struktury připravených derivátů.
4. Změření fyzikálně-chemických vlastností a biologické aktivity.
5. Vyhodnocení výsledků experimentální části a jejich prezentace v diplomové práci.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alkaloidy a jejich charakteristika

Alkaloidy bezesporu patří mezi nejrozšířenější a z pohledu biologické aktivity nejvýznamnější sekundární metabolity [11]. Společným znakem všech alkaloidů je ve struktuře zabudovaný minimálně jeden atom dusíku, který je díky svému volnému elektronovému páru zprostředkovatelem zásaditosti. Schopnost tvořit soli reakcí s kyselinami dává jméno celé skupině těchto převážně rostlinných sekundárních metabolitů [10], [12].

Tradičně se alkaloidy dělí podle struktury do celé řady strukturních typů. Pravé alkaloidy mají dusík, který pochází z prekursorové aminokyseliny, zabudovaný ve své heterocyklické struktuře. Protoalkaloidy nemají dusík vázán heterocyklicky, nachází se na postranním řetězci, ale stále je jeho zdrojem výchozí aminokyselina. Poslední podskupinou jsou pseudoalkaloidy, jejichž skelet je původem z jiné metabolické cesty (např. mevalonátové, acetátové). Dusík je následně inkorporován z některé z aminokyselin prostřednictvím transaminační reakce [10], [12].

Dusík je možné nalézt ve formě primárního (zejména u protoalkaloidů), sekundárního a terciárního aminu (pravé alkaloidy), ale i kvarterní amoniové soli [12]. S volným elektronovým párem, jako i s dalšími častými funkčními skupinami ve struktuře, se pojí schopnost alkaloidů interagovat s proteiny. Jejich výjimečné schopnosti ovlivňovat enzymy, receptory či iontové kanály stojí nejen za toxikologickými účinky, ale zejména za terapeutickým využitím [10]. Nejčastěji se jedná o pevné látky hořké chuti, jejichž rozpustnost ve formě volných bází je ve vodě velmi omezená, ochotně se však rozpouštějí v nepolárních rozpouštědlech. Pokud se vyskytují ve formě solí, tak je rozpustnost opačná. Těchto acidobazických vlastností se často využívá při jejich izolaci [11], [12].

Alkaloidy jsou ve velké míře produkovány zástupci dvouděložných rostlin řádu pryskyřníkotvarých (*Ranunculales*), kam řadíme botanicky i farmaceuticky významné rostliny čeledí makovitých (*Papaveraceae*), pryskyřníkovitých (*Ranunculaceae*), rourovitých (*Rutaceae*) či dřišťalovitých (*Berberidaceae*) [11]. Významně jsou zastoupeny i mezi jednoděložnými rostlinami, například v čeledích amarylkovitých (*Amaryllidaceae*)

nebo liliovitých (*Liliaceae*) [12]. Předpokládá se, že jejich funkce je spojena s jednou z nejstarších strategií přežití rostlin, chemickou obranou proti patogenům a požeru [1].

3.1.1 Alkaloidy isochinolinového typu

Isochinolinové alkaloidy jsou jednou z největších a nejrozmanitějších skupin dusíkatých sloučen rostlinné říše. Biosynteticky jsou odvozeny od aminokyseliny tyrosinu, a jsou dále prekurzorem mnoha jiných strukturních typů alkaloidů, zejména alkaloidů benzyloisochinolinových [11], [12]. Rostliny jsou schopny syntetizovat isochinolinové alkaloidy se značnou strukturní variabilitou, která je často spojena se zajímavou farmakologickou aktivitou. Vykazují zajímavé protizánětlivé, analgetické, antioxidační, neuroprotektivní a protirakovinné účinky [1].

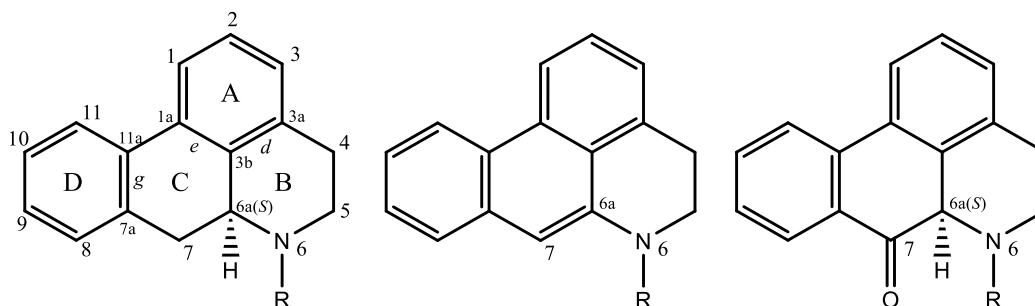
Ze zástupců isochinolinových alkaloidů stojí za zmínku spasmolyticky působící papaverin, složitější analgetické alkaloidy opia morfinanového typu (morfin, kodein) nebo svými účinky zajímavý protoberberinový alkaloid berberin [11].

3.1.2 Alkaloidy aporfinového typu

Vzhledem k zaměření této diplomové práce se dále podrobněji věnuji alkaloidům aporfinového typu a z nich především bulbokapninu. Aporfinové alkaloidy jsou se svými více než 500 identifikovanými zástupci jednou z nejrozšířenějších skupin isochinolinových alkaloidů [6].

Základní strukturou je tetracyklický systém čtyř kondenzovaných kruhů, triviálně nazývaný jako aporfin, podle mezinárodního systematického názvosloví IUPAC jako 5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[*d,e,g*]chinolin (Obr. 1). Jeho dvě aromatická benzenová jádra (A, B) v bifenylovém postavení jsou často dvou až šestinásobně substituovaná hydroxy (–OH), methoxy (–OCH₃) nebo methylenedioxy (–OCH₂O–) skupinami. Dusík prekurzorové aminokyseliny je ve struktuře zabudován v heterocyklickém kruhu B [13], [14]. Zpravidla bývá tento dusík terciární, ale existují také aporfinové alkaloidy sekundární, tzv. noraporfiny (norisoboldin, nornuciferin), a kvarterní (magnoflorin). Minoritně se v přírodě vyskytují *N*-formylované (*N*-formylkalycinin, *N*-formylanonain) a *N*-acetylované (*N*-acetylnornuciferin, *N*-acetylnonain) amidické deriváty, či *N*-oxidy (isolaurelin-*N*-oxid, *O*-methylbulbokapnin-β-*N*-oxid) [15]. Nejčastěji se aporfinové alkaloidy v rostlinách objevují v C6a(*S*) konfiguraci, minoritně pak v C6a(*R*). Díky

chirálnímu centru jsou opticky aktivními, jejich absolutní konfigurace je pak popisována jako *R*-(-) nebo *S*-(+). Kromě alkaloidů aporfinového typu odpovídající popisu výše existují i jejich nenasycené formy (6a,7-dehydroaporfiny), například dehydroglaucin a dehydroeroemerin, nebo oxidované formy (7-oxoaporfiny) liriodenin a lanuginosin [13], [15], [16].



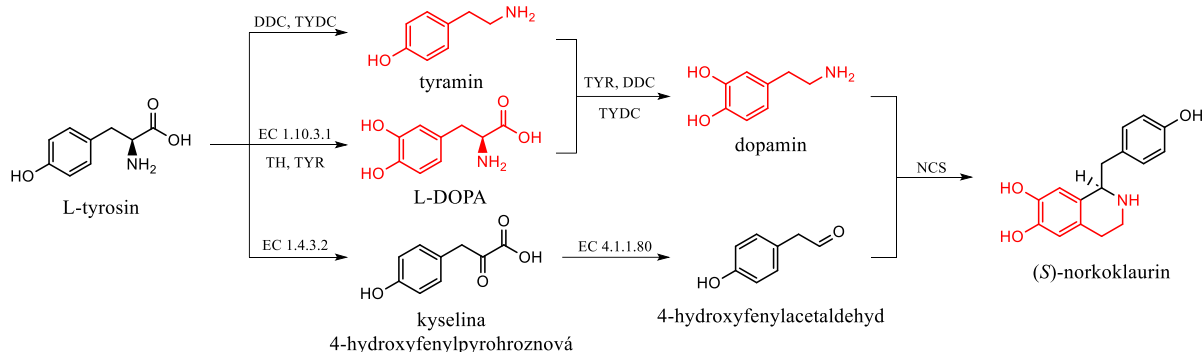
Obr. 1. Schématické znázornění skeletu aporfinového, dehydroaporfinového a oxoaporfinového typu

3.1.2.1 Biosyntéza alkaloidů aporfinového typu

Podobně jako ostatní sekundární metabolity jsou i alkaloidy navzdory své strukturální rozmanitosti odvozeny od základního stavebního kamene skrze nespočet enzymatických reakcí. Pro alkaloidy aporfinového typu, jakožto i pro ostatní podskupiny isochinolinových alkaloidů, je výchozí molekulou přirozeně se vyskytující aminokyselina L-tyrosin [11]. Jejich produkce je v mnoha případech orgánově specifická. Převážná část benzyloisochinolinových alkaloidů odvozených od (*S*)-retikulinu, kam řadíme i alkaloidy aporfinového typu, jsou produkovány podzemními částmi rostlin bez mléčnic. Naopak ty, jejichž prekurzorem je (*R*)-retikulin, například alkaloidy opia, jsou produkovány do lepkavé mléčné šťávy latexu vytékající z poraněných nadzemních částí rostliny [17].

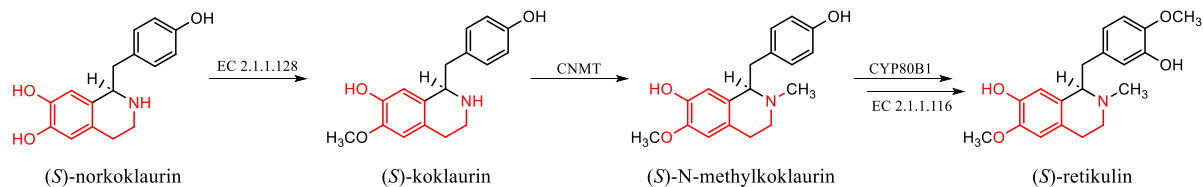
Biosyntézu komplexního aporfinového skeletu lze shrnout do čtyř základních fází. V první fázi je L-tyrosin syntetizován šikimátovou cestou [18]. V sedmi po sobě jdoucích krocích dochází k enzymatické přeměně základních energetických substrátů, fosfoenolpyruvátu a erythrosa-4-fosfátu, na chorismát, společný prekurzor aromatických aminokyselin, a dále na zmíněný L-tyrosin [19]. Ten je ve druhé fázi prekurzorem pro biosyntézu výchozí molekuly benzyloisochinolinových alkaloidů (*S*)-norkoklaurinu (Obr. 2). Biogenní katecholamin dopamin může vznikat dvěma metabolickými cestami, a to oxidací na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) a dekarboxylací, nebo v opačném sledu dekarboxylací na tyramin s následnou oxidací. Dvoukrokovou enzymatickou přeměnou rovněž vzniká 4-hydroxyfenylacetaldehyd, kdy tyrosin podstupuje oxidativní deaminaci

na 4-hydroxyfenylpyruvát a dekarboxylaci. Kondenzace a cyklizace obou výsledných produktů, tedy 4-hydroxyfenylacetaldehydu a dopaminu, je zprostředkována stereoselektivním enzymem (*S*)-norkoklaurin syntázou (NCS, EC 3.5.99.14) [1], [6].



Obr. 2. Schéma biosyntézy společného benzyloisochinolinového prekurzoru (*S*)-norkoklaurinu DDC (dopamin dekarboxyláza, EC 4.1.1.28), TYDC (tyrosin dekarboxyláza, EC 4.1.1.25), EC 1.10.3.1 (polyfenol oxidáza), TH (tyrosin 3-monooxygenáza, EC 1.14.16.2), TYR (tyrosináza 1.14.18.1), EC 1.4.3.2 (oxidáza L-aminokyselin), EC 4.1.1.80 (4-hydroxyfenylpyruvát dekarboxyláza), NCS ((*S*)-norkoklaurin syntáza, EC 3.5.99.14) [20], [21].

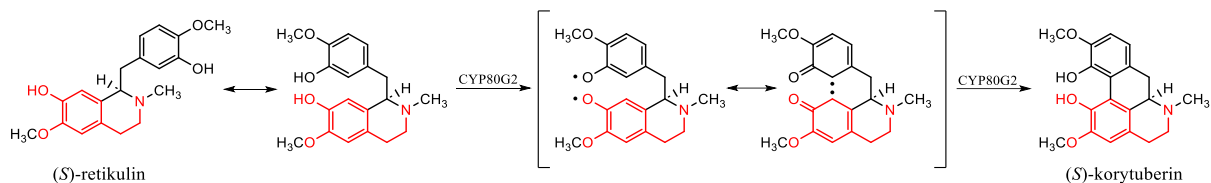
Třetí fáze zahrnuje přeměnu (*S*)-norkoklaurinu na velmi důležitý prekurzor mnoha podskupin isochinolinových alkaloidů (*S*)-retikulin (Obr. 3). První dva kroky zahrnují selektivní *O*-methylaci a *N*-methylaci na (*S*)-*N*-methylkoklaurin, který podléhá selektivní oxidaci na izoformě 80B1 cytochromu P450, a poslední *O*-methylaci, pro finální produkt (*S*)-retikulin [1], [22].



Obr. 3. Schéma biosyntézy společného benzyloisochinolinového prekurzoru (*S*)-retikulinu EC 2.1.1.128 ((*S*)-norkoklaurin 6-*O*-methyltransferáza), CNMT ((*S*)-koklaurin *N*-methyltransferáza, EC 2.1.1.140), CYP80B1 ((*S*)-*N*-methylkoklaurin 3'-monooxygenáza, EC 1.14.13.71), EC 2.1.1.116 (3'-hydroxy-*N*-methyl-(*S*)-koklaurin 4'-*O*-methyltransferáza) [20], [21].

Poslední fáze vychází z (*S*)-retikulinu, který je společným prekurzorem nejen aporfinových alkaloidů, ale i alkaloidů protoberberinových, protopinových či dimerních bisbenzyloisochinolinových. Při biosyntéze aporfinového skeletu izoforma 80G2 cytochromu P450 zprostředkovává tvorbu vazby C-C, čímž dochází k uzavření struktury benzyloisochinolinového prekurzoru a formaci (*S*)-korytuberinu (Obr. 4). Alternativně může (*S*)-retikulin podstoupit enzymatickou inverzi konfigurace přes 1,2-dehydretikulin na

(*R*)-retikulín, výchozí molekulu farmaceuticky velmi významných morfinanových alkaloidů [1], [17], [23].



Obr. 4. Schéma biosyntézy aporfinového skeletu (*S*)-korytuberínu

CYP80G2 (izoforma 80G2 cytochromu P450, (*S*)-korytuberín syntáza, EC 1.14.19.51) [20], [21].

Odlišnosti ve struktuře jednotlivých aporfinových alkaloidů zajišťují v literatuře blíže nespecifikované enzymy. Samotný (*S*)-bulbokapnin se od (*S*)-korytuberínu liší pouze v substituci kruhu A, na kterém první zmíněný nese $-OCH_2O-$ skupinu. Tato finální reakce je dozajista zprostředkována enzymaticky, pravděpodobně jednou z mnoha rostlinných methyltransferáz.

3.1.2.2 Zástupci alkaloidů aporfinového typu a jejich přírodní zdroje

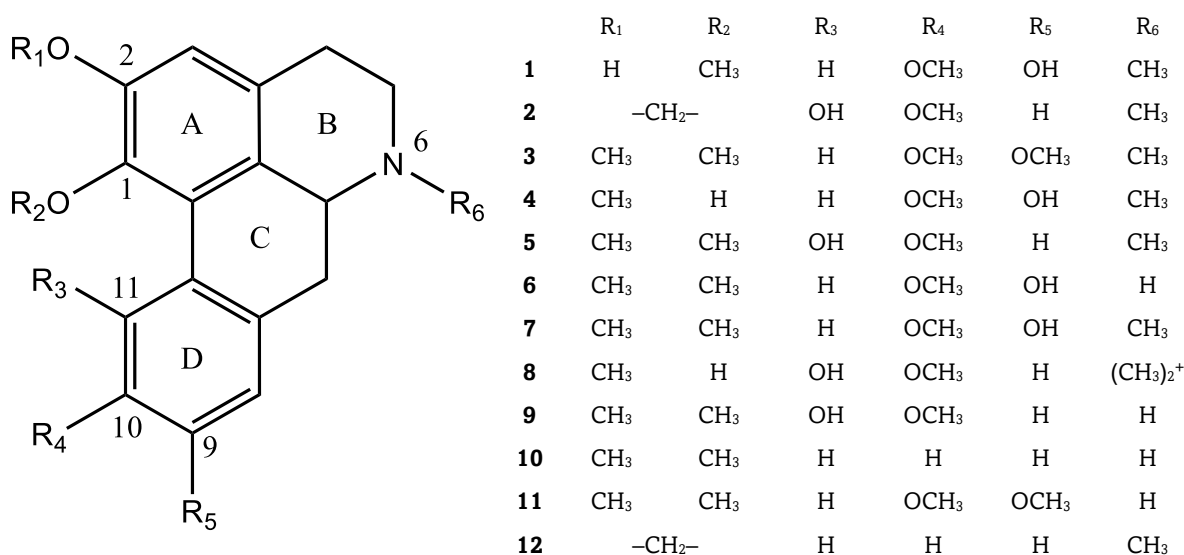
Mezi nejvýznamnější alkaloidy aporfinového typu patří boldin, glaucin, nuciferin, roemerin či bulbokapnin [24]. Přehled nejvíce studovaných alkaloidů je shrnutý v následující tabulce společně s příkladem rostlin, ze kterých byly izolovány (Tabulka 1).

Tabulka 1: Zástupci alkaloidů aporfinového typu a jejich přírodní zdroje

	Alkaloid	Rostlinný zdroj	Reference
1	boldin	<i>Lindera aggregata</i> (Lauraceae)	[25]
		<i>Peumus boldus</i> (Monimiaceae)	[26]
2	bulbokapnin	<i>Corydalis cava</i> (Papaveraceae)	[27], [28]
		<i>Cissampelos pareira</i> (Menispermaceae)	[29]
3	glaucin	<i>Dicranostigma franchetianum</i> (Papaveraceae)	[30]
		<i>Glaucium flavum</i> (Papaveraceae)	[31]
4	isoboldin	<i>Glaucium flavum</i> (Papaveraceae)	[31]
		<i>Lindera aggregata</i> (Lauraceae)	[25]
5	isocorydin	<i>Alseodaphne corneri</i> (Lauraceae)	[32]
		<i>Dicranostigma franchetianum</i> (Papaveraceae)	[30]
		<i>Peumus boldus</i> (Monimiaceae)	[26]
6	laurotetanin	<i>Lindera aggregata</i> (Lauraceae)	[25]
		<i>Peumus boldus</i> (Monimiaceae)	[26]

Tabulka 1: Zástupci alkaloidů aporfinového typu a jejich přírodní zdroje (pokračování)

Alkaloid	Rostlinný zdroj	Reference
7 <i>N</i> -methyllaurotetanin	<i>Corydalis cava</i> (<i>Papaveraceae</i>)	[27]
	<i>Lindera aggregata</i> (<i>Lauraceae</i>)	[25]
	<i>Peumus boldus</i> (<i>Monimiaceae</i>)	[26]
8 magnoflorin	<i>Corydalis taliensis</i> (<i>Papaveracea</i>)	[33]
	<i>Sinomenium acutum</i> (<i>Menispermaceae</i>)	[34]
9 norisocorydin	<i>Alseodaphne corneri</i> (<i>Lauraceae</i>)	[32]
	<i>Peumus boldus</i> (<i>Monimiaceae</i>)	[26]
10 nornuciferin	<i>Nelumbo nucifera</i> (<i>Nelumbonaceae</i>)	[35], [36]
11 norglaucin	<i>Glaucium flavum</i> (<i>Papaveraceae</i>)	[31]
12 roemerin	<i>Nelumbo nucifera</i> (<i>Nelumbonaceae</i>)	[35], [36]



Obr. 5. Chemické struktury alkaloidů aporfinového typu (**1-12**)

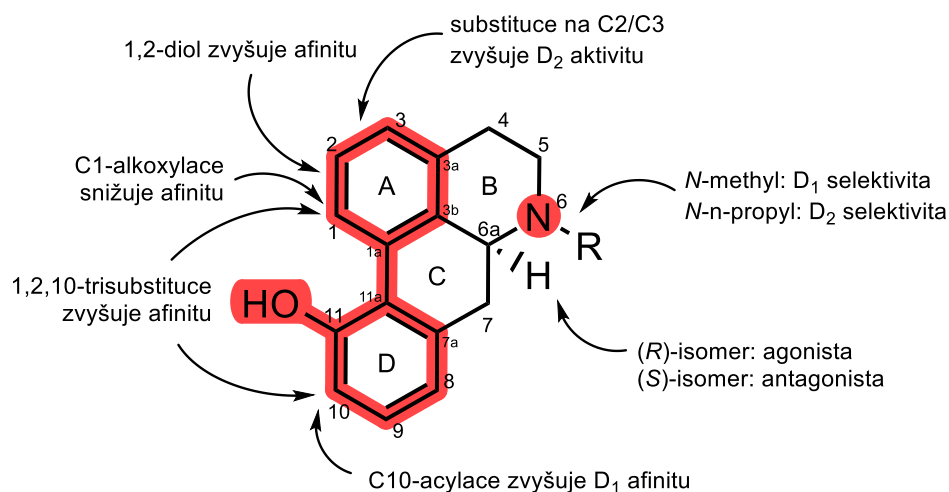
3.1.2.3 Biologická aktivita alkaloidů aporfinového typu

Aporfinové alkaloidy jsou stejně jako ostatní biosynteticky podobné molekuly schopny interagovat s enzymy nebo receptory pro biogenní neurotransmitery. Drobné odchylky v charakteru funkčních skupin a jejich pozici pak vedou k široké paletě farmakologických účinků, proto se aporfinový skelet jeví jako zajímavý výchozí bod pro hledání nových aktivních molekul [14], [37]. Z dostupné literatury vyplývá, že z rostlin izolované alkaloidy nebo jejich polosyntetické deriváty vykazují antiepileptickou, antiparkinsonickou, anthelmintickou, vazodilatační, antimalarickou, antioxidační a protirakovinnou aktivitu, jsou potenciálními kognitivu a antiagregancii [6], [23]. Právě

v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními se zajímavá inhibiční aktivita proti cholinesterázám a protizánětlivé působení prokázané v *in vitro* modelech ukazují jako slibná cesta v hledání nových látek pro možnou terapii AD [1]. Určitá míra afinity k dopaminergním (D_1 , D_2 a D_5), serotoninergním (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} a 5-HT₇) nebo adrenergním (α , β) receptorům zase otvírá možnosti jiného využití [14].

3.1.2.3.1 Biologické účinky na receptory pro neurotransmitery

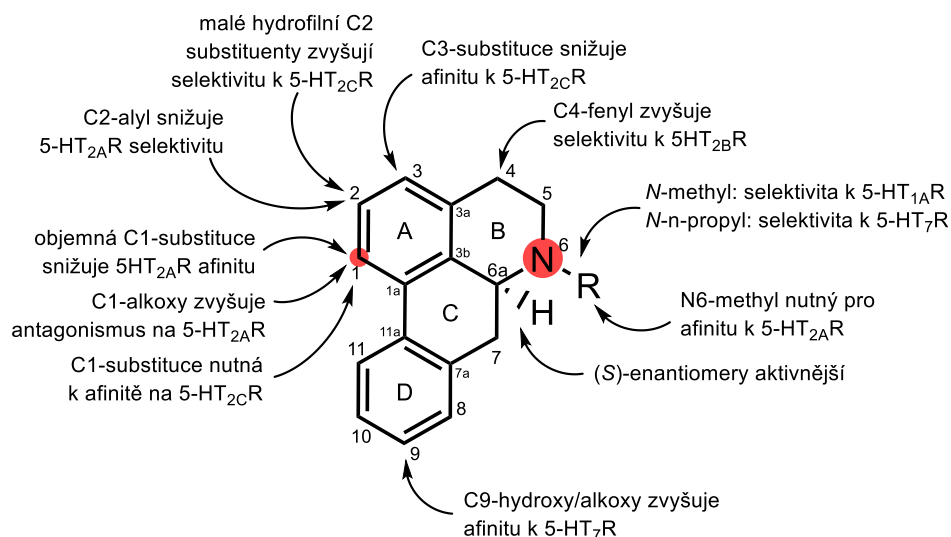
Dopaminergní aktivita aporfinových alkaloidů se odvíjí od biosyntetického prekursoru dopaminu, a je rozšířena o několik naprosto esenciálních strukturních motivů. Ve struktuře skrytý bifenyl, hydroxylová skupina na uhlíku C11 a *N*-substituce patří mezi hlavní z nich [6]. Agonismus na D_1 a D_2 receptorech je spojen s C6 α (*R*) izomerií, jak je tomu v případě terapeuticky využívaného syntetického alkaloidu apomorfinu. V přírodě se vyskytující (*S*)-izomery, například bulbokapnin a nuciferin, pak fungují jako antagonisté dopaminergních receptorů [38]. Selektivitu k jednotlivým podtypům receptorů ovlivňuje velikost substituentu vázaného na dusík, *N*-methylace je spojena s D_1 selektivitou, stericky objemnější *N*-*n*-propyl substituce naopak s D_2 -selektivitou [14]. Další strukturní obměny spojené se změnou afinity jsou shrnuty níže (Obr. 6).



Obr. 6. Vztah struktury k účinku na dopaminergní receptory; převzato z: Zhu et al. (2023)

Rigidita aporfinového skeletu se zdá vhodná pro antagonistické působení na receptory pro serotonin [14]. 5-HT_{2A} receptory jsou patofyziologicky zapojeny do několika neuropsychiatrických onemocnění. Účinná terapie schizofrenie a bipolární poruchy vyžaduje selektivní antagonisty těchto receptorů, neurodegenerativní Parkinsonova choroba, úzkosti a deprese naopak selektivní agonisty [39]. Vztah struktura-účinek je popsána níže (Obr. 7). Na rozdíl od afinity k receptorům pro dopamin není pro afinitu

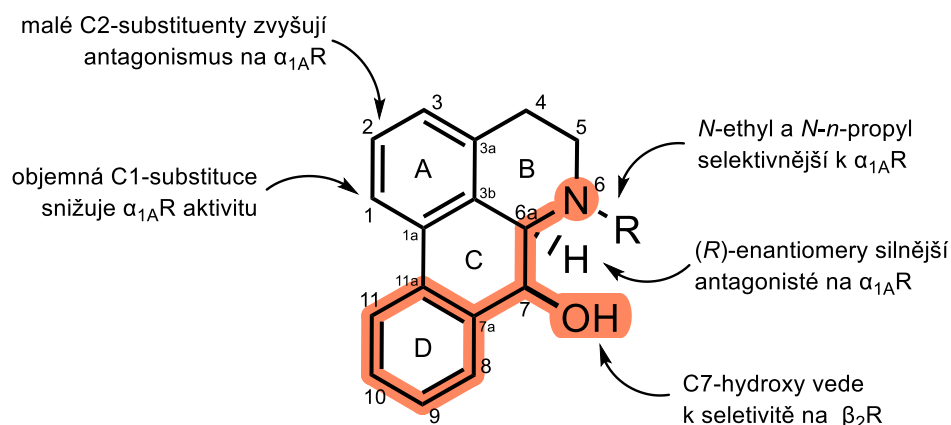
k receptorům pro serotonin nutná správná konformace na uhlíku C6a, (*S*)-enantiomery jsou pouze lehce aktivnější. Nicméně strukturní modifikace často vedou k vymizení takových účinků [14]. Antagonistickou aktivitu určuje především substituce na uhlíku C1, kdy se zdají účinnější alkoxy substituenty, a dusík N6 s navázanou methyl skupinou, jak vyplývá ze studie aporfinového alkaloidu nanteninu a jeho derivátů [40].



Obr. 7. Vztah struktury k účinku na serotoninerní receptory; převzato z: Zhu et al. (2023)

Kromě receptorů 5-HT_{2A} se preferenčně v CNS nachází receptory 5-HT_{2C}. Cílení na tyto receptory může rovněž přinést určitý benefit v terapii neuropsychiatrických poruch [41]. Pozice C2 se jeví jako možný donor vodíkové vazby pro silnější interakci s 5-HT_{2C} receptorem. Zavedení malých hydrofilních skupin na kruh A, dusík N6 bez substituentu a (*S*)-konformace se zdají výhodné pro selektivní účinek [14], [40].

Stejně jako pro serotoninerní, tak i pro adrenergní aktivitu je rigidita aporfinového skeletu výhodná, zejména pro afinitu k α_{1A} receptorům. Aporfinové alkaloidy isolaurelin, dicentrin a glaucin kromě účinků na různých podtypech receptorů pro serotonin vykazují i antagonistické působení na α_{1A} receptory [42], [43]. Tyto receptory jsou zapojeny do fungování oběhového systému, ale také periferního i centrálního nervového systému. Nantenin a jeho deriváty byly rovněž testovány na α_{1A} -adrenergní aktivitu [40]. Ze studie vyplynulo, že selektivitu k α_{1A} receptorům zvyšují malé alkoxy (MeO, EtO) substituenty v pozici C2 a N6 substituce krátkými uhlovodíky (*N*-ethyl nebo *N*-n-propyl). Uspořádání na chirálním centru aktivitu neovlivňuje. Zavedením hydroxylové skupiny do pozice C7 lze docílit strukturní podobnosti se zvýrazněným farmakoforem arylethanolaminem (Obr. 8), což s sebou přináší i selektivitu k β_2 -adrenergním receptorům [14], [40].



Obr. 8. Vztah struktury k účinku na adrenergní receptory; převzato z: Zhu et al. (2023)

3.1.2.3.2 Působení aporfinových alkaloidů na cholinesterázy

Inhibiční aktivita proti cholinesterázám je jednou z nejpodstatnějších aktivit aporfinových alkaloidů. Schopnost inhibice enzymů acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE) je spojena se zvýšením hladin, a tím i účinku neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) v neurodegeneraci poškozeném mozku při AD. Tento přístup je jednou z cest v terapii onemocnění [14].

Aporfinové alkaloidy bez substituentů na kruhu D vykazují nejvyšší inhibiční aktivitu proti oběma cholinesterázám [14]. Roemerin, který odpovídá tomuto popisu, inhibuje AChE s IC_{50} $8.32 \pm 0.12 \mu\text{mol/L}$, v případě BuChE je aktivita ještě vyšší (IC_{50} $2.85 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$). U stefaninu vede substituce kruhu D 8-methoxy skupinou k dalšímu zvýšení afinity k BuChE (IC_{50} $2.80 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$). Účinek zmíněných alkaloidů na AChE je prohlouben u jejich nenasycených analog (dehydroeroemerin, dehydrostefanin), jak je patrné z tabulky níže (Tabulka 2). Modifikace struktury na uhlíku C7 jsou spojeny se zvýšením selektivity k AChE. Například sukhodianin s hydroxylovou skupinou v této pozici inhibuje AChE s IC_{50} $4.30 \pm 0.28 \mu\text{mol/L}$, současně s tím však jeho inhibiční účinek na BuChE klesá (IC_{50} $22.47 \pm 0.10 \mu\text{mol/L}$) [14], [44].

Tabulka 2: Inhibiční aktivita vybraných aporfinových alkaloidů na cholinesterázy

Alkaloid	IC_{50} AChE ($\mu\text{mol/L}$)	IC_{50} BuChE ($\mu\text{mol/L}$)	Reference
aktinodafnin	47.74 ± 1.66	–	[45]
	31.7 ± 0.50	–	[46]
asimilobin	141.47 ± 0.82	10.08 ± 0.15	[44]
boldin	–	45.20 ± 1.90	[46]
bulbokapnin	>1000	67.00 ± 2.10	[27]

Tabulka 2: Inhibiční aktivita vybraných aporfinových alkaloidů na cholinesterázy (pokračování)

Alkaloid	IC ₅₀ AChE (μmol/L)	IC ₅₀ BuChE (μmol/L)	Reference
korydin	52.95 ± 4.11	–	[47]
dehydroroemerin	1.21 ± 0.09	3.34 ± 0.02	[44]
dehydrostefanin	2.85 ± 0.24	3.26 ± 0.05	[44]
dicentrin	6.11 ± 0.38	26.41 ± 0.43	[44]
hernagin	32.92 ± 0.99	–	[47]
magnoflorin	>100	18.14 ± 3.12	[48]
nordicentrin	40.28 ± 2.73	–	[45]
nornuciferin	–	5.60 ± 0.72	[49]
<i>N</i> -methyllaurotetanin	24.9 ± 1.80	–	[46]
roemerin	8.32 ± 0.12	2.85 ± 0.08	[44]
stefanin	11.34 ± 0.20	2.80 ± 0.07	[44]
stefalagin	39.80 ± 6.30	104.2 ± 20.6	[50]
sukhodianin	4.30 ± 0.28	22.47 ± 0.10	[44]

3.1.2.3.3 Antioxidační aktivita aporfinových alkaloidů

Volné radikály, charakteristické jedním či více nepárovými elektrony ve struktuře, jsou nedílnou součástí fyziologických buněčných procesů. K nejznámějším z radikálů patří reaktivní formy kyslíku (ROS), jejichž množství je kontrolováno antioxidačním systémem enzymů a molekul se schopností zhášet jejich aktivitu [51]. Zvýšená produkce volných radikálů je však spojena s patologickými procesy, dochází k rozvoji zánětu či rakovinotvorným pochodům. Naopak antioxidační působení je spojeno s protizánětlivou, antinociceptivní nebo antiprotozoální aktivitou [37], [52].

Aporfinové alkaloidy vystupují jako antioxidanty, tedy látky, které brání poškození tkání oxidačním stresem a dysfunkcí mitochondrií, nerovnováhou hladin železných iontů nebo porušením metabolických procesů [9]. Tato aktivita je velmi pravděpodobně spojena se schopností volných hydroxylových skupin, resp. fenolových skupin na aromatických kruzích A a D, tvořit termodynamicky stabilní fenoxylové radikály delokalizací nepárového elektronu v bifenylové části molekuly, a schopnosti aporfinového skeletu oxidovat se na 6a,7-didehydro a 7-oxoaporfiny. Roli hraje nejen počet hydroxylových skupin, kdy platí, že větší počet skupin je spojen s vyšší účinkem, ale i jejich pozice [53]. Vysokého antioxidačního účinku dosahují alkaloidy boldin a isoboldin, ještě účinněji

působí korytuberin a apomorfín, jejichž fenolové skupiny v pozicích C1 a C11 snadno podléhají oxidaci do konjugované keto formy [52]. Nicméně volné radikály zhášejí i alkaloidy bez hydroxylových skupin, například glaucin. V tomto případě je to pravděpodobně právě díky delokalizaci C6a radikálu zapojením bifenylové funkce a volného elektronového páru na dusíku [37], [52].

3.1.2.3.4 Antimikrobiální aktivita aporfinových alkaloidů

Antimikrobiální aktivitu určují zejména tři základní strukturní prvky aporfinového skeletu: saturace kruhů B a C, substituce na dusíku a fenolové skupiny. S nejvýraznější antibakteriální aktivitou jsou spojeny 7-oxoaporfiny, a to zřejmě díky zvýšené elektronové hustotě v oblasti volných elektronových párů karbonylové funkce a heterocyklického dusíku [16]. Alkaloid liriodenin, který do této skupiny patří, vykazuje široké spektrum antibakteriálních a antimykotických účinků proti G^+ bakteriím, kvasinkám i vláknitým houbám [54], [55]. Rozložení náboje v molekule často přímo souvisí s výslednou aktivitou, nevýhodná substituce aporfinového skeletu může vést k její ztrátě [56]. Kvarternizace dusíku tvorbou *N*-dimethylovaných analog vede k dalšímu zvýšení aktivity, jak je možné pozorovat u thailandinu [57]. Jiné substituenty, zejména *N*-amidy nebo objemnější uhlovodíky, jsou spojeny se snížením nebo úplnou ztrátou aktivity. Posledním kritériem jsou volné fenolové skupiny, které vykazují funkci donorů vodíkových vazeb. Jejich přímá antimikrobiální aktivita je však často snížena methylovací na methoxy nebo methyendioxy skupiny [16], [56].

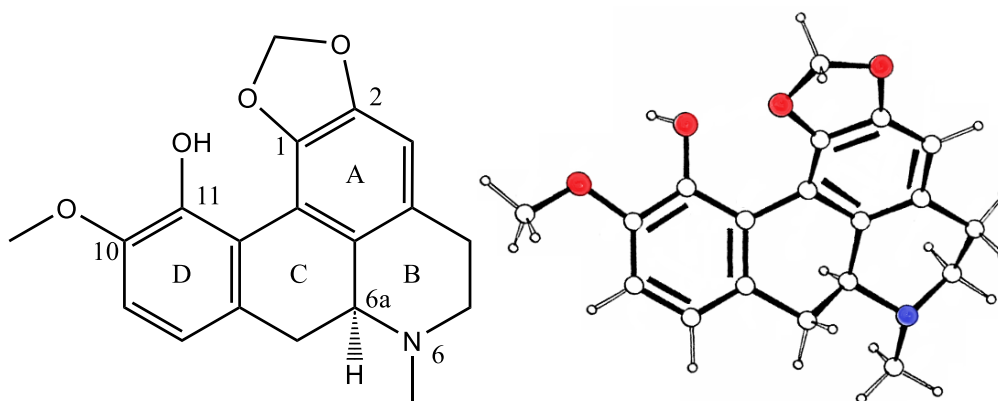
3.1.2.3.5 Cytotoxické působení aporfinových alkaloidů

Aporfinový skelet se společně s protoberberinovým a benzylochinolinovým řadí mezi struktury relativně cytotoxické [58]. Aporfinový alkaloid glaucin a jeho nenasycená analoga vykazují široké spektrum toxického působení na buněčné linie [58], [59]. Se zvýšenou aktivitou jsou spojeny strukturní motivy jako 1,2-methyendioxy substituce a *N*-methylace. Tuto aktivitu dále prohlubuje oxidace nebo dehydrogenace na uhlíku C7, vliv chiralit nebo další substituce zatím nebyl objasněn [60]. Přesné mechanismy účinku také nejsou jasné, nejčastěji bývá uváděna interakce s topoisomérázami a DNA polymerázami [13].

3.1.2.4 Charakteristika alkaloidu bulbokapninu

Bulbokapnin je alkaloidem aporfinového typu s nejvyšším kvantitativním zastoupením v hlízách *Corydalis cava* (*Papaveraceae*) [61]. První izolace se datuje do roku 1892 [62], během následujících let byl izolován z dalších zástupců rodu *Corydalis* (*C. solida*, *C. intermedia*, *C. erdelii*). Nalezen byl také v jiných zástupcích čeledi *Papaveraceae* (*Glaucium corniculatum*, *Hypecoum imberbe*) a *Menispermaceae* (*Cissampelos pareira*) [15], [63]. Do současnosti byl podroben velkému množství testů biologické aktivity, které jsou popsány v následující kapitole.

Podle systematického názvosloví IUPAC je bulbokapnin pojmenován jako 11-methoxy-7-methyl-6,7,7a,8-tetrahydro-5*H*-[1,3]benzodioxolo[6,5,4-*d,e*]benzo[*g*]chinolin-12-ol, se sumárním vzorcem $C_{19}H_{19}NO_4$. Jeho chemická struktura je zobrazena níže (Obr. 9). V čistém stavu je bílou, jemně krystalickou látkou s teplotou tání 202–203 °C [64] a specifickou optickou otáčivostí +237° ($CHCl_3$, 589.3 nm, 22 °C) [65].



Obr. 9. Struktura a prostorová orientace (*S*)-bulbokapninu; převzato z: Ribár et al. (1991)

Krystalografické studie ukázaly zajímavé vlastnosti jeho prostorového uspořádání. Kromě chirálního uhlíku C6a v (*S*)-konfiguraci bulbokapnin vykazuje silné prostorové interakce mezi jednotlivými kruhy a jejich substituenty. Molekula není planární, heterocyklický kruh B zaujímá položidličkovou konformaci s dusíkem v sp^3 hybridizaci, nenasycený kruh C pak konformaci zkřížené vaničky. Významně deformované je také bifenylové uspořádání aromatických jader A a D díky interakci sobě blízkých kyslíků hydroxylové a 1,2-methylendioxy skupiny. V prostoru jsou obě skupiny uspořádány tak, že leží nad a pod rovinou aromatických jader. Všechny tyto prostorové změny vedou ke snížení pnutí v molekule a tím k její vysoké stabilitě. Vodík hydroxylové skupiny je dále zapojen do vodíkové vazby s kyslíkem sousedící methoxylové skupiny [66].

3.1.2.4.1 Biologická aktivita bulbokapninu

V mnoha *in vitro* testech bulbokapnin prokázal široké spektrum účinků: ovlivňuje účinky dopaminu, a to od jeho syntézy inhibicí tyrosin hydroxylázy až po antagonistické působení na receptorech vedoucí ke snížení motorické aktivity a indukci katalepsie [38]; periferní vazodilatace je spojena s afinitou k α_1 -adrenergním receptorům [67] a periferním dopaminergním receptorům [68]; s methylenedioxy skupinou pak pravděpodobně souvisí antiagregační účinek na krevní destičky (IC_{50} $30.7 \pm 5.4 \mu\text{mol/L}$), který je srovnatelný s klinicky využívanou ASA (IC_{50} $23.8 \pm 10.4 \mu\text{mol/L}$), ale zřejmě účinkuje jiným mechanismem než inhibice COX-1, a to jako parciální agonista prostaglandinových receptorů pro tromboxan [58], [69]; zhasí reaktivní formy kyslíku, nejvíce hydroxylové radikály produkované Fentonovou reakcí [70]; chelatuje ionty přechodných kovů, zejména kationty mědi a železa [71]; předpokládána je také antiepileptická a analgetická aktivita přes inhibiční účinky na excitabilitu neuronů, v závislosti na dávce vykazuje v *in vitro* modelech snížení frekvence a amplitudy Ca^{2+} oscilací, tedy s Ca^{2+} ionty spojené aktivity [14]. Na rozdíl od jiných aporfinových alkaloidů bulbokapnin nevykazuje schopnost vázat se na topoisomerázy [69]. Interkalace do struktury DNA je podmíněna planaritou molekuly, sterická interakce C11 hydroxylové skupiny a kyslíku methylenedioxy cyklu toto postavení neumožňuje [72].

Antimikrobiální aktivita bulbokapninu je poměrně zajímavá. Alkaloidy jako celek vykazují vyšší potenciál proti gramnegativním bakteriím, stejně tak bulbokapnin, který nejvíce inhibuje růst u *K. pneumoniae* a *A. baumannii* (MIC $25 \mu\text{mol/L}$) [73]. I v případě mykotických agens je aktivním, vykazuje inhibiční účinky na kvasinky, zejména *C. albicans* (MIC $12.5\text{--}25 \mu\text{mol/L}$), slaběji pak ovlivňuje *C. parapsilosis* a *Cryptococcus neoformans* (MIC $>200 \mu\text{mol/L}$) [73], [74]. Stejně jako v jiných případech biologické aktivity je i tato antimikrobiální pravděpodobně spojena s methylenedioxy skupinou ve struktuře [56]. Překvapivé ale je, že v případě antivirotické aktivity je zjištění opačné. Zmíněná skupina snižuje nebo přímo souvisí se ztrátou účinku proti poliioviru nebo viru *Herpes simplex* [58], [74].

Bulbokapnin také interaguje s metabolicky aktivními enzymy. Skupina cytochromů P450 hraje zásadní roli v transformaci xenobiotik a výrazně zasahuje nejen do metabolismu léčiv [75]. Enzym CYP3A4 je nejvýznamnějším zástupcem, jehož schopnost

interagovat s mnoha substráty je zprostředkována větší velikostí aktivního místa. Substráty izoformy 2D6 jsou zpravidla lipofilní planární molekuly, velmi často složené z aromatických jader a s bazickým dusíkem ve struktuře [76]. Bulbokapnin, který tomuto popisu odpovídá, vykazuje středně silné inhibiční účinky na CYP2D6, ještě silněji pak inhibuje CYP3A4. Navíc jej lze označit za i středně silný inhibitor izoformy CYP1A2, která zodpovídá za přeměnu zejména malých, slabě kyselých molekul. Nejméně pak inhibuje CYP2C9 a CYP2B6 [5].

3.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba, známá také jako Alzheimerova demence (AD), je jedním ze zástupců skupiny neurodegenerativních onemocnění postihujících centra paměti, učení a emočního chování centrální nervové soustavy [3]. AD je charakteristická postupným úpadkem kognitivních funkcí v důsledku stárnutí a selektivní ztráty neuronů. Proces stárnutí je spojen s negativní remodelací mozku, která je z části podmíněna genetickými predispozicemi, životním stylem a faktory prostředí [9]. Snižování hustoty neuronální sítě je pak důsledkem zejména dvou neuropatologických procesů: ukládání abnormálního proteinu amyloidu-beta ($A\beta$) do senilních plaků v mezibuněčných prostorech, takzvané amyloidózy, a shlukování hyperfosforylovaného tau proteinu (τ P) do neurofibrilárních klubek uvnitř neuronů [9], [77]. Depozice $A\beta$ je spíše spojena s patologií onemocnění, neurofibrilární klubka τ P pak spíše s úpadkem kognitivních funkcí [9]. Přesný mechanismus vedoucí k nadměrné buněčné smrti neuronů však zůstává neznámý. Velmi pravděpodobně se jedná o souhru několika neuropatologických procesů, současně se zvýšenou agregací nesprávně prostorově uspořádaných proteinů $A\beta$ a τ P jsou popisovány chronické zánětlivé procesy, porušená homeostáza kalcia nebo dysfunkce energetického metabolismu mitochondrií a oxidační stres. Ve výsledku tato souhra vede k poškození funkce nejen podpůrných gliových buněk, ale i celého systému cholinergní transmise v zasažených oblastech [1], [8], [78].

Konečné stanovení diagnózy AD je možné pouze *post mortem* analýzou postiženého mozku [3]. Časný záchyt onemocnění je velmi obtížný. Existují biomarkery jako $A\beta$ 1-40 a $A\beta$ 1-42, které jsou vhodné pro predikci AD, nebo zobrazovací metody magnetické rezonance (MRI) a pozitronové emisní tomografie (PET) pro časnou diagnózu, jejich implementace do praxe je však velmi obtížná [8], [9].

3.2.1.1 Role cholinesteráz v lidském těle

Cholinesterázy patří do skupiny serinesteráz, tedy hydroláz se zbytkem aminokyseliny serinu v aktivním místě enzymu. V lidském těle se fyziologicky nachází dva zástupci, acetylcholinesteráza (AChE, EC 3.1.17) a butyrylcholinesteráza (BuChE, EC 3.1.1.8), která je označována také jako pseudocholinesteráza [3]. AChE katalyzuje hydrolýzu biogenního neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) na kyselinu octovou a cholin [79]. Nejčastěji se nachází na membránách neuronálních buněk ve formě tetramerů, čtyř jednotek seskupených pohromadě [8]. BuChE se svou širší substrátovou specifikou katalyzuje hydrolýzu větší skupiny esterů cholinu. Ve srovnání s AChE je její fyziologická exprese v mozku asi desetkrát menší, častěji se nachází v plazmě a jiných metabolicky aktivních tkáních jako játra, srdce a plíce [3].

Samotnému procesu hydrolýzy předchází vazba substrátu na periferní aniontovou oblast (PAS) v blízkosti vstupu do kavity aktivního místa. Tato oblast pomáhá s výběrem a prostorovou orientací molekul, které mohou být hydrolyzovány. Uvnitř enzymu je aktivní místo rozděleno na 4 domény: katalytická obsahuje enzymaticky aktivní triádu aminokyselin serin-histidin-glutamát, oxyaniontová donory vodíkové vazby pro prostorovou stabilizaci substrátu, aniontová pak hydrofobní aromatická jádra pro elektrostatické π -interakce tryptofanu s pozitivně nabitým dusíkem, a acylová kapsa. Substrátová specifita subtypů cholinesteráz se odvíjí od aminokyselin tvořících poslední zmíněnou strukturu [3]. Záměna prostorově objemnějších aromatických aminokyselin na PAS a v kavitě enzymu u AChE za menší alifatické u BuChE umožňuje interakce i větším molekulám [1].

3.2.1.2 Hypotéza cholinergní dysfunkce

Pro správné vedení nervových vzruchů je nutné dostatečné množství presynapticky uložených neurotransmiterů a také postsynaptických receptorů pro tyto molekuly [80]. V neuronech je za biosyntézu nových molekul ACh odpovědný cytoplazmatický enzym cholin-acetyltransferáza (ChAT, EC 2.3.1.6). Produkt kondenzace acetyl-CoA a cholinu je skladován v synaptických váčcích, při depolarizaci exocytózou vstupuje do synaptické štěrby, kde zprostředkovává přenos vzruchu vazbou na své nikotinové a muskarinové receptory. Vedení vzruchu ukončuje AChE hydrolýzou nebo vlastní presynaptický transportér zpětným vychytáváním [81], [82].

Cholinergní hypotéza vzniku AD se opírá o tři zjištění: v postižených oblastech mozkové kůry je podstatně snížená presynaptická koncentrace ACh [58]; pozitivní účinek na kognitivní funkce je spojen s agonisty cholinergních receptorů, jejich antagonisté naopak funkce paměti poškozují [83]; vlivem AD prokazatelně dochází k poškození cholinergní inervace vycházející z bazálních ganglií [84]. Cholinergní dysfunkci mozku ruku v ruce prohlubuje současná snížená biosyntéza nových molekul ACh a zvýšená ztráta dalších neuronů, čímž dochází k potenciaci neurodegenerativních procesů, snižování kognitivních funkcí a zrychlení progresu AD [8]. Navíc mezi funkcí ChAT a tvorbou senilních plaků existuje negativní korelace, s rostoucím poškozením neuronální sítě dále klesá tvorba ACh [84], a dysfunkce cholinergní transmise je spojena i s depozicí A β a τ P, vede k jejich zvýšenému ukládání, a tím opět k prohlubování deficitu a zhoršením kognitivních funkcí [85].

Zejména na základně prvních dvou zjištění cholinergní hypotézy byly do praxe uvedeny inhibitory cholinesteráz. Jejich užívání je spojeno s pozitivními účinky na kognitivní funkce zvýšením hladin ACh, a tím zlepšení symptomů AD [8], [58].

3.2.1.3 Hypotéza amyloidu-beta

Amyloidóza je neuropatologický proces, při kterém dochází k nesprávnému prostorovému skládání proteinu A β , jeho nadměrnému shlukování a tím k rozvoji AD [9]. Proteolyticky rezistentní fibrilární A β vzniká z neuronálního transmembránového proteinu APP aktivitou dvou enzymů. Nejprve podléhá degradaci β -sekretázou (BACE-1) a následně γ -sekretázou, stává se nerozpustným, nadměrně se hromadí v extracelulárním prostoru mozkové tkáně a agreguje. Shluky tvořené A β jsou neurotoxické a dávají vzniknout tzv. senilním plakům [8], [9]. Navíc je A β schopný tvořit i komplexy s ionty přechodných kovů, přičemž tyto komplexy stimulují tvorbu reaktivních forem kyslíku, které dále poškozují funkce mitochondrií, membránových lipidů a proteinů [86]. V rámci *in vitro* studií bylo zjištěno, že klasickou cestou aktivuje cytotoxicky působící složky komplementu [87], [88] a zvyšuje intracelulární hladiny kalcia [89].

V alternativní cestě, kde APP protein podléhá nejprve α -sekretáze za tvorby proteinu sAPP α s pravděpodobně neuroprotektivními účinky, a až posléze γ -sekretáze, dochází k produkci proteinu p3, který se nepodílí na tvorbě neurotoxických agregátů. [8], [9]. Lze tedy říct, že odbourávání APP proteinu ve směru formace A β je spojeno

s rozvojem AD [8]. První ložiska shluků A β se začínají kumulovat roky před prvními symptomy kognitivních poruch [90], některé studie nasvědčují dokonce 20–30 let [3].

3.2.1.3.1 Patologie komplexů A β –AChE

Na základě biochemických studií bylo prokázáno, že neurotoxicitu samotného A β zvyšuje tvorba komplexů s AChE [8], [91], [92]. Tyto velmi stabilní nerozpustné A β –AChE komplexy vznikají spojením obou složek zrychlují agregaci A β , v *in vitro* i *in vivo* modelech vykazují vyšší poškození neuronální sítě než samotný A β [93], [94], a to zejména skrze narušení intracelulární homeostázy zvýšením hladin kalcia vedoucí k poškození funkce mitochondrií [91], [95]. Formování komplexů je zprostředkováno interakcí mezi oběma složkami vazbou mezi pozitivně nabitými částmi vláken A β a záporně nabitou oblastí PAS AChE, respektive zbytkem aminokyseliny tryptofanu [8].

Lze tedy říct, že PAS je spojovníkem mezi A β a AChE, a vzniklé A β –AChE komplexy jsou přímo spojeny s rozvojem AD [3]. Navíc AChE tvoří vazby i s enzymem presenilin-1 (PS-1), který je přímo zapojen do procesu tvorby A β , a tyto interakce zvyšují jeho expresi [96]. Bylo však prokázáno, že samotná neurotoxicita a s ní spojené kognitivní změny velmi úzce souvisí s koncentrací AChE v senilních placích. Vhodnou interakcí inhibitorů acetylcholinesterázy (AChEi) s PAS může dojít k zamezení tvorby komplexů, což s sebou přináší možnost nového terapeutického cílení [93], [94]. Stejně tak se ukazuje, že stimulace cholinergních nikotinových receptorů pomocí AChEi, které samy o sobě vykazují neuroprotektivní charakter proti toxicitě zprostředkované A β , vede navíc k degradaci amyloidového prekursoru APP proteinu non-amyloidogenní cestou [84], [97].

3.2.1.4 Hypotéza tau-proteinu

Společným znakem pro hypotézy amyloidu-beta a tau-proteinu je nesprávné prostorové skládání dysfunkčních proteinů. Základem neurofibrilárních klubek jsou agregáty nerozpustných, proteolyticky rezistentních vláken defektního τ P [98]. Intracelulární shlukování usnadňuje jejich nadměrná fosforylace buněčnými proteinkinázami. Vláknata se spojují do dvoušroubovic, čímž dochází k ovlivnění správné funkce τ P, aktivaci mikroglií, elevaci hladin mediátorů zánětu a tím rozvoji neurodegenerativních procesů [87], [99].

Fyziologicky se τ P podílí na stabilizaci neuronálních mikrotubulů, elongaci dendritických buněk a správném fungování synapsí [98], [99]. Tyto funkce jsou řízeny jeho

reverzibilní fosforylací. Klíčové je udržování rovnováhy mezi proteinkinázami a fosfatázami, při upregulaci fosforylujících enzymů nebo narušení hladin kalcia dochází k hyperfosforylaci, ztrátě funkce a tím indukci apoptózy neuronů [78], [86]. Existuje i určité spojení mezi hyperfosforylací τ P, oxidačním stresem a $A\beta$. Tvorba reaktivních forem kyslíku $A\beta$ a také přímá interakce $A\beta$ s receptory na membránách neuronů pravděpodobně vedou k ovlivnění transdukčních kaskád a aktivaci spřažených enzymů, zejména pak zmíněných proteinkináz [86].

3.2.1.5 Hypotéza neurozánětlivých procesů

Tradičně byla CNS označována jako imunoprivilegovaná oblast chráněná vlastními bariérami. Tento koncept je víceméně překonaný, do fungování mozku zasahují nejen vlastní složky imunitního systému, ale i buňky a cytokiny pocházející z periferních tkání [99]. A ačkoliv by měly být zánětlivé pochody ochrannými, nepřiměřená imunitní odpověď se může podílet nebo být přímou příčinou poškození neuronální sítě vedoucí k rozvoji AD [87], [100]. Dokonce existuje přímá souvislost s kumulací $A\beta$ a τ P v mozku [99].

Neurozánětlivé procesy probíhají sekundárně na podkladě poškození v CNS [87]. Jsou souhrou několika patologických pochodů, rozvíjí se jako následek vnitřních a vnějších poškození [100], [101]. Za udržování homeostázy jsou odpovědné astrocyty a mikroglie. Mikroglie jsou typem makrofágů, tedy buněk imunitního systému se schopností fagocytózy cizorodých látek a odpadních metabolitů, prezence antigenů či produkce cytokinů. Hrají zásadní roli v modulaci prvotní imunitní odpovědi, podílí se na celkové plasticitě mozku, regeneraci a neurogenезi [87], [102]. Jejich dlouhodobá aktivace hraje význačnou roli v procesu neurodegenerace. Za fyziologického stavu jsou mikroglie neaktivní, jejich rozvětvená struktura umožňuje dohlížet na pochody ve tkáni bez interference s neurony. V případě poškození tkáně přechází do aktivního stavu, jsou mobilní, schopné migrovat na postižená místa a vylučovat cytokiny. Právě cytokiny jsou často spojovány s přímým neurotoxickým účinkem. Chronická aktivace složek imunitního systému vede k nadměrné produkci mediátorů zánětu a reaktivních forem kyslíku, navíc je spojena s přímým vlivem na ukládání $A\beta$ [87], [103].

Ve výsledku dochází k porušení integrity tkáňových bariér, zejména pak hematoencefalické bariéry (HEB) [87], [99], [104]. Mikrovaskulární poškození a dysfunkce HEB zrychlují odumírání neuronů a zvyšují hladiny prozánětlivých cytokinů [87], [105].

3.2.2 Současné možnosti terapie Alzheimerovy demence

Na základě předchozích hypotéz lze shrnout, že výskyt senilních plaků a neurofibrilárních klubek, tvorba A β -AChE komplexů a snížená syntéza ACh společně vedou ke snížené cholinergní transmisi a tím dalšímu úbytku neuronů [1], [8]. V současnosti neexistuje kauzální léčba, poškození neuronální sítě nelze zvrátit ani při cílení na popsané mechanismy neuropatologického pochodu. I přes významné pokroky v chápání AD bezpočet pokusů selhalo, z více než 400 klinických studií na více než 200 preparátech neuspělo 99.6 % z nich [9]. Terapie AD je stále pouze symptomatická, není ale spojena s uspokojivými a přetrvávajícími účinky na progresi onemocnění [106]. Z metaanalýz hodnotící dostupná terapeutika vyplývá, že sice nevykazují nijak závratný efekt, stále je však celkový pozitivní vliv na progresi onemocnění klinicky významný. Rovněž se terapie jeví jako nákladově efektivní, ne-li jako náklady zdravotnímu systému šetřící [107], [108], [109]. Díky pozitivnímu ovlivnění kognitivních funkcí oddalují nutnost odborné zdravotní péče nebo pobyt v domovech se zvláštním režimem [110].

Schváleny a registrovány jsou tři zástupci AChEi: donepezil, rivastigmin a galantamin. Užívání AChEi zvyšuje hladiny a prodlužuje účinek ACh na synapsích, čímž zlepšuje kognitivní funkce a zvyšuje aktivitu nervového přenosu, je však spojeno s mnoha nepříjemnými nežádoucími účinky a účinkuje pouze na lehké a středně těžké formy [3], [8], [111]. Úpadek kognitivních funkcí při terapii AChEi nastupuje mnohem pomaleji, ve srovnání s pacienty bez terapie dochází k oddálení nástupu klinických symptomů [84]. Čtvrtou terapeuticky využívanou látkou je antagonist NMDA receptoru memantin s rozdílným mechanismem účinku [8]. NMDA receptor je spřažený s iontovými kanály pro Ca²⁺ ionty. Při nadměrné aktivaci tohoto systému dochází k hromadění kationtů vápníku uvnitř neuronálních buněk, jejich chronické excitaci a postupné ztrátě synaptické funkce. Antagonismus tedy brání patologickému vstupu Ca²⁺ iontů do buněk, čímž brání i rozvoji neurodegenerace a snižování kognitivních funkcí [83], [97].

V současné době jsou u FDA registrovány i dva moderní přípravky biologické léčby, monoklonální protilátky lecanemab (Leqembi) [112] a aducanumab (Aduhelm) [113], které přímo cílí na agregáty A β . První z nich nedávno byl registrován i u EMA pro specifickou skupinu pacientů s AD [114]. Přestože registrační studie prokázaly, že benefit převyšuje riziko, z hlediska svého účinku jsou však poměrně kontroverzní [99].

3.2.2.1 Úskalí současné terapie Alzheimerovy demence

S relativně nízkým účinkem v terapii využívaných AChEi velmi pravděpodobně souvisí zjištění, že exprese a distribuce AChE je u pacientů trpících pokročilými formami značně snižena (deficit 10-67 %). V často zasažených oblastech senilními plaky a neurofibrilárními klubky, konkrétně v mozkové kůře, limbickém systému, amygdale, bazálních ganliích a hipokampu, je naopak významně zvýšená aktivita BuChE, a to až o 167 % [3], [8]. AChE je navíc inhibována vlastním substrátem ACh. K tomuto efektu však v případě BuChE nedochází, zvýšením koncentrace ACh zůstává neovlivněná. Její delší biologický poločas a vyšší míra exprese v zasažených oblastech přispívají k roli majoritního degradačního enzymu [3].

Do klinických studií se dostalo i několik látek s rozdílným mechanismem účinku. Kromě agonismu a antagonismu na receptorech pro neurotransmitery se terapeutické možnosti hledají v prevenci neuropatologických kaskád spojených s agregací A β a τ P. Vyvíjí se poměrně moderní preparáty založené na inhibici enzymů beta a gama sekretázy, formování neurofibrilárních klubek modulací fosforylace τ P, zvýšení clearance obou defektních proteinů proteolýzou a fagocytózou nebo cílenou imunoterapií. Nejvíce studovanými jsou pak inhibitory BACE-1, které jsou pravděpodobně spojené se zlepšením kognitivních funkcí snížením produkce A β [9], a imunizace proteinem A β -42, a to pasivní pomocí připravených protilátek nebo aktivní vlastním proteinem. Na myších modelech obě imunizační metody významně snížily hladiny neurotoxického A β [115].

Studie zaměřené nejen na eliminaci A β u postižených pacientů jsou však často spojeny se špatnými výsledky, protože nástup kognitivních symptomů je odrazem již silně zasažené mozkové tkáně. Existuje shoda, že odstraňování senilních plaků A β a neurofibrilárních klubek τ P nedokáže kompenzovat dysfunkci neuronální sítě, pravděpodobně dokáže pouze zpomalit její progresi [87], [116]. Jediným možným terapeutickým cílem je tedy snaha o co nejúčinnější stabilizaci stávajícího stavu [9]. Strategie a cíle terapie by se měly zakládat zejména na zpomalení neurodegenerace, a to co nejdříve, nejlépe před prvními symptomy AD [9].

3.3 Mikrobiální infekce

Narůstající rezistence mikrobiálních agens je ožehavým tématem dnešní doby. Antimikrobiální aktivita, respektive bakteriocidní aktivita, je schopnost látky snížit

viabilitu bakterií $\geq 99.9\%$ v koncentracích menších než čtyřnásobek jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC). Alkaloidy takovými účinky disponují, pravděpodobně souvisí s jejich lipofilitou, společně s heterocyklicky vázaným atomem dusíku a aromatickými jádry [23], [117]. Některé alkaloidy se dokonce staly strukturální předlohou terapeuticky využívaných látek, například metronidazolu, linezolidu, trimetoprimu nebo chinolonových antibiotik [10].

3.3.1 Infekce způsobené mykobakteriemi

Tuberkulóza je primárně plicním infekčním onemocněním vyšších obratlovců způsobené bakteriemi skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex, kam patří zástupci jako *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* či *M. africanum* [118]. Tyto aerobní intracelulární patogeny jsou charakteristické svým tyčinkovitým tvarem, velmi pomalým růstem a buněčnou stěnou s vysokým podílem lipidů. Právě kombinace dlouhého životního cyklu bakterie a obsah mykolových kyselin na povrchu přináší zvýšené nároky na vedení racionální terapie a hledání nových účinných molekul [2].

V současnosti je možné onemocnění léčit kombinací léčiv v závislosti na citlivosti jednotlivých kmenů. Na citlivé mykobakterie působí u 85 % pacientů standardní šestiměsíční terapie. Po intenzivní dvoutříměsíční kombinaci rifampicinu (RIF), isoniazidu (INH), pyrazinamidu (PZA) a ethambutolu (ETM) následuje čtyřměsíční udržovací terapie RIF s INH [50]. Tato dlouhodobá terapie je však spojená s významnými nežádoucími účinky, vedoucími ke snížené adherenci až selhání terapie, a tím k rozvoji bakteriální rezistence [120]. U rezistentních kmenů se účinnost specifických režimů pohybuje kolem 57 % [119].

S ohledem na nárůst rezistence je nezbytné hledat nová a účinnější léčiva schopná zvrátit tento trend, zvýšit adherenci, zjednodušit a zkrátit léčbu. Mezi tradiční cíle patří inhibice syntézy mykolových kyselin buněčné stěny, nukleových kyselin nebo proteinů [120], [121]. Studium aktivity přírodních sloučenin s sebou již přineslo zajímavé molekuly jako aminoglykosid streptomycin a jemu podobný kanamycin. Zástupce skupiny isochinolinových alkaloidů berberin rovněž vykazuje aktivitu proti mykobakteriím [121]. Ze studia jeho struktury vyplývá, že alkoxy substituce (methoxy, methyldioxy) je spojena s antimykobakteriálními účinky [2]. Tento strukturální motiv ve své struktuře nese

velké množství dalších přírodních látek, například i alkaloid bulbokapnin, proto se zdá racionální hledat nové účinné látky v řadách sekundárních metabolitů rostlin.

3.3.2 Infekce způsobené bakteriálními a mykotickými agens

Významná část nozokomiálních infekcí, tedy infekcí spojených s pobytem ve zdravotnickém zařízení, je způsobena vysoce rezistentními kmeny G^+ (MRSA, VRE) a G^- bakterií (MDR-GNB), které jsou odolné proti mnoha konvenčním typům antibiotik [122]. Mnohočetně rezistentní (MDR) a extenzivně rezistentní (XDR) kmeny bakterií jsou jednou z největších světových výzev současné doby, zesílení jejich mechanismů virulence a schopnosti vytvářet biofilm vyžadují nové efektivní preparáty [123], [124].

Rozdílná stavba membrány G^+ a G^- bakterií stojí za zvýšenou rezistencí G^- agens proti účinku antibiotik [125]. Tyto bakterie patří mezi nefermentující oportunistické patogeny, které jsou často příčinou zmíněných nozokomiálních infekcí. *P. aeruginosa*, *A. baumannii* a *E. coli* se navíc čím dál častěji stávají rezistentními, což ve výsledku vede ke komplikacím u nemocničních i komunitních infekcí [126].

Mykotické infekce jsou rovněž vážným celosvětovým problémem. Počet infekcí způsobených mykotickými agens v posledních letech dramaticky narůstá [127]. Kromě povrchových infekcí kůže, nehtů a sliznic způsobují závažné systémové invazivní infekce hlubokých tkání, zejména u imunokompromitovaných pacientů [128], [129]. Ve výsledku vedou tyto převážně nozokomiální infekce ke zdravotním komplikacím, vysoké mortalitě, prodloužení hospitalizací a zvýšeným nákladům na léčbu [130].

Lokální mykózy jsou nejčastěji způsobeny zástupci rodů *Microsporium*, *Trichophyton* (*T. interdigitale*), a *Epidermophyton*, přičemž za těmi systémovými stojí rody *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*), *Cryptococcus*, *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*) a *Pneumocystis* [128]. *C. albicans* patří k nejčastějším původcům, stojí za více než 90 % všech závažných případů, majoritou vulvo-vaginálních kandidóz a hlubokých tkáňových mykóz [131]. Společně s *C. parapsilosis* se z velké míry podílí na tvorbě mikrobiálního biofilmu [132]. *Cryptococcus neoformans* je druhým nejčastějším původcem oportunních infekcí u pacientů s AIDS [130].

Terapie mykotických infekcí je postavena na azolových, polyenových, echinokandinových a pyrimidinových antimykoticích [133]. Jejich účinek je však

limitovaný úzkým spektrem účinku, nežádoucí toxicitou, lékovými interakcemi, nevýhodnou farmakokinetikou a fungistatickým charakterem některých látek [134]. V průběhu posledních dekád navíc došlo nadměrným užíváním antimykotik k rozvoji rezistence mezi nejčastějšími zástupci vláknitých hub a kvasinek [127], [135].

Antibiotická a antimykotická rezistence se stala jednou z hlavních oblastí zájmu moderní medicíny, jelikož se stále častěji stává důvodem selhání terapie infekčních onemocnění a tím i nárůstu mortality na dříve léčitelná onemocnění [136]. Nejčastěji jsou chronické infekce nereagující na konvenční antibiotickou léčbu důsledkem vytvoření mikrobiálního biofilmu. Eradikace agens, které tvoří tyto velmi kompaktní struktury, je velmi náročná [132].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité materiály a obecné postupy

Reagencia, rozpouštědla, zkoumadla a kultivační média pro potřeby přípravy polosyntetických derivátů, strukturní analýzy a stanovení biologické aktivity byla zakoupena u Sigma-Aldrich, spol. s r.o. (Praha, Česká republika), a použita bez dalšího čištění. Pro potřeby analytické a preparativní TLC byl použitý materiál zakoupen u společnosti Merck spol s r.o. (Praha, Česká republika).

4.1.1 Přečištění bulbokapninu

Výchozí látka pro derivatizační reakce byla izolována z hlíz *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. (*Papavaraceae*) v rámci hledání nových inhibitorů enzymů AChE a BuChE pocházejících z této rostliny. Výzkum byl prováděn na nynější Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky doc. Jakubem Chlebkem v roce 2011. Proces izolace je podrobně popsán v následující literatuře [53].

Pro vyšší vstupní čistotu bylo nutné nejprve izolovaný alkaloid přečistit. Ve směsi ethanolu (EtOH), ethyl-acetátu (EtOAc) a chloroformu (CHCl₃) bez přesného poměru byl rozpuštěn izolovaný bulbokapnin, roztok byl ponechán několik minut v sonikátoru. Následně pomocí chromatografického pera byl rovnoměrně nanesen na 10 preparativních chromatografických desek připravených v laboratoři (tloušťka vrstvy 1 mm) 1 cm od jejich spodní hrany. Po odpaření rozpouštědel proudem horkého vzduchu byly desky vloženy do mobilní fáze MF₁ vysycených komor, eluce probíhala do chvíle, než čelo dosáhlo úrovně 1 cm od horní hrany desky. Pro dosažení lepší separace byl proces vyvíjení opakovan dvakrát, mezi elucemi byly desky zbaveny rozpouštědel mobilní fáze proudem horkého vzduchu. Pod UV lampou byla zhodnocena kvalita separace od nečistot a vyznačena eluční zóna bulbokapninu, která byla následně z desek vyškrábnuta do kolony utěsněné vatovým smotkem. V koloně byl bulbokapnin extrahován ze silikagelu promýváním směsí CHCl₃ a EtOAc (1:1), jímáný roztok byl poté odpařen na vakuové odparce do sucha. Přečištěný bulbokapnin byl následně využit pro vlastní přípravu derivátů.

4.1.2 Příprava polosyntetických derivátů bulbokapninu

Příprava polosyntetických derivátů – etherů bulbokapninu, je založena na dvoukrokové S_N2 nukleofilní substituci, známé také jako Williamsonova syntéza etherů. V prvním kroku byl připraven nukleofilní alkoksid, konjugovaná báze bulbokapninu, který následně reagoval s primárním alkyhalogenidem za tvorby kýženého derivátu [138]. V průběhu přípravy sady derivátů byly využity dvě níže popsané metody.

Metoda A: alkylace v bazickém prostředí NaH [139]; do vysušené vialky bylo naváženo 60 mg přečištěného bulbokapninu (0.18 mmol), rozpuštěno se ve směsi 1 mL suchého tetrahydrofuranu (THF) a 1.5 mL suchého *N,N*-dimethylformamidu (DMF). Pod atmosférou argonu bylo přidáno 1.2 molárního ekvivalentu (eq) 60 % hydridu sodného v minerálním oleji (NaH; 0.22 mmol, 9 mg) a mícháno 30-45 minut v ledové lázni při 0 °C. Následně bylo přidáno 1.1 eq alkylačního činidla (RX; 0.20 mmol) a za stálého míchání při pokojové teplotě byla reakční směs míchána přes noc.

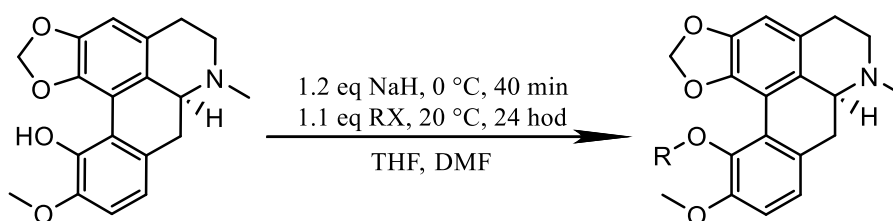


Schéma 1. Metoda A: alkylace v bazickém prostředí NaH

Metoda B: alkylace bazickém prostředí K_2CO_3 [140]; ve vialce byla rozpuštěna navážka 60 mg přečištěného bulbokapninu (0.18 mmol) ve 3 mL DMF, přidáno 3.5 eq bazického uhličitánu draselného (K_2CO_3 ; 0.63 mmol, 87 mg) a reakční směs míchána při pokojové teplotě po dobu 25 minut. Posléze bylo přidáno 1.2 eq alkylačního činidla (RX; 0.22 mmol), vialka přemístěna do olejové lázně a při 70 °C míchána přes noc.

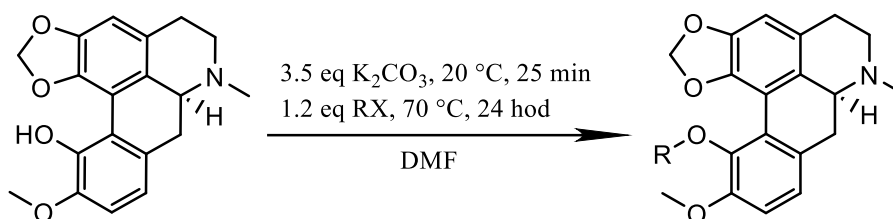


Schéma 2. Metoda B: alkylace bazickém prostředí K_2CO_3

Reakce byla v průběhu monitorována pomocí analytické TLC. Následné zpracování reakční směsi pro účely preparativní TLC bylo shodné pro obě metody. Po

ukončení reakce byl obsah vialky odpařen do sucha na olejové lázni. Odparek byl rozpuštěn v CHCl_3 a zfiltrován přes křemelinu Celite® 535 za účelem odstranění nerozpustných zbytků. Takto přečištěný roztok byl na vakuové odparce odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v malém množství CHCl_3 pro ověření přítomnosti produktu, nežádoucích reziduí DMF a vhodnosti mobilní fáze MF_2 pomocí analytické TLC. Nakonec byl roztok vhodně upraven pro potřeby preparativní TLC.

4.1.3 Analytická a preparativní tenkovrstvá chromatografie

Na přípravu chromatografických desek pro preparativní chromatografii byl použit Silikagel 60 s přídavkem fluorescenčního indikátoru F_{254} (Merck, Praha), pro analytickou chromatografii pak komerční hliníkové desky s vrstvou Silikagelu 60 a fluorescenčním indikátorem F_{254} 20 cm × 20 cm (Merck, Praha). Vizualizace probíhala s využitím ultrafialového světla (254 a 366 nm), případně Dragendorffova činidla.

Pro proces preparativní TLC bylo potřeba nejprve připravit desky. 6.5 g silikagelu bylo suspendováno ve 20 mL vody, nalito na skleněnou desku 15 cm × 15 cm a ponecháno zaschnout. Na takto připravenou desku byl 1 cm od její spodní hrany nanesen chromatografickým perem chloroformový roztok reakční směsi a po odpaření rozpouštědla byla deska vložena do mobilní fázi MF_2 vysycené komory a ponechána vyvíjet. Jakmile mobilní fáze dosáhla čela, deska byla vyjmuta a vysušena proudem horkého vzduchu, míra eluce byla prověřena pod UV lampou. V případě potřeby byl proces vyvíjení opakován pro dosažení kvalitnější separace. Separované zóny byly vizualizovány UV světlem ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Poté byla separovaná zóna s produktem promyta v koloně směsí EtOAc a CHCl_3 bez přesného poměru. Čistota připraveného derivátu byla zhodnocena analytickou TLC. Jímaný roztok byl na vakuové odparce odpařen do sucha, odparek rozpuštěn v malém množství CHCl_3 , přenesen do vialky, finálně odpařen do sucha na olejové lázni a dosušen v exsikátoru.

4.1.3.1 Složení použitých mobilních fází pro analytickou a preparativní TLC

MF_1 : cyklohexan : ethyl-acetát : diethylamin, 50 : 50 : 5

MF_2 : cyklohexan : toluen : diethylamin, 45 : 45 : 5

4.1.4 Strukturní analýza připravených derivátů

4.1.4.1 ^1H a ^{13}C NMR analýza

NMR spektra bulbokapninu a jeho derivátů byla měřena za standartní teploty v deuterovaném chloroformu (CDCl_3) pomocí spektrometru Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, Kalifornie, USA) při 500 MHz pro ^1H spektra a 126 MHz pro ^{13}C spektra. Chemické posuny jednotlivých látek byly změřeny jako hodnoty δ v parts per milion (ppm) a nepřímě vztaheny k tetramethylsilanu (TMS) jako standardu pomocí signálu zbytkového rozpouštědla CDCl_3 (7.26 ppm pro ^1H a 77.0 ppm pro ^{13}C). Data jsou zapsána v pořadí: chemický posun (δ), multiplicita (s: singlet, bs: broad singlet, d: dublet, dd: dublet dubletů, t: triplet, m: multiplet), interakční konstanta (J , v Hz) a integrální intenzita signálu (pro protonové spektrum).

4.1.4.2 HRMS analýza

Spektra pro ESI-HRMS analýzu byla měřena na přístroji Waters Synapt G2-Si, hybridním vysokorozlišujícím kvadrupólovém hmotnostním spektrometru doby letu (HRMS Q-TOF) se systémem ionizace elektrosprejem (ESI), spojeném s vysokoúčinným kapalinovým chromatografem (UHPLC) Waters Acquity I-Class (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA). Data jsou prezentována jako hodnota poměru hmotnosti částice a náboje fragmentu m/z teoretická $[\text{M}+\text{H}]^+$ a experimentální $[\text{M}+\text{H}]^+$ průměrná ze dvou měření.

4.1.4.3 Optická otáčivost

Optická otáčivost α , neboli schopnost opticky aktivních látek stáčet rovinu polarizovaného světla, byla měřena v prostředí CHCl_3 na automatickém polarimetru P3000 (Krüs Optronic, Hamburk, Německo) při teplotě t ($25.5\text{ °C} \pm 1.0\text{ °C}$) a vlnové délce sodíkového světla D (589.3 nm), s délkou kyvety l (0.5 dm) a koncentrací vzorků c (g/100 mL) pro jednotlivé látky. Specifická optická otáčivost $[\alpha]_D^t$ byla spočtena podle následujícího vzorce:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \cdot \alpha}{c \cdot l}$$

4.1.5 Metody pro stanovení biologické aktivity

Výchozí látka bulbokapnin a jeho polosyntetické deriváty byly podrobeny sérii několika testů pro stanovení biologické aktivity. Ke zhodnocení byly využity testy prováděné na pracovištích v rámci Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, a to inhibiční aktivita proti rekombinantním humánním cholinesterázám (*hAChE*, *hBuChE*) na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky (KFGFB) v gesci PharmDr. Daniely Suchánkové, Ph.D., a dále *in vitro* antibakteriální, antimykobakteriální a antimykotická aktivita proti vybraným agens na Katedře biologických a lékařských věd (KBLV) v gesci PharmDr. Ondřeje Jandourka, Ph.D. a RNDr. Kláry Konečné, Ph.D. Stanovení cytotoxické aktivity bylo provedeno ve spolupráci s doc. RNDr. Radimem Havelekem, Ph.D. na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (ÚLB LFHK).

4.1.5.1 Stanovení aktivity proti lidským rekombinantním cholinesterázám

Stanovení inhibiční aktivity proti lidským cholinesterázám je založeno na upravené Ellmanově metodě [141]. Toto kolorimetrické stanovení aktivity se opírá o reakci thiocholinu, produktu enzymatické přeměny acetylthiocholinu rekombinantní AChE (*hAChE*, EC 3.1.1.7), respektive butyrylthiocholinu rekombinantní BuChE (*hBuChE*, EC 3.1.1.8), s Ellmanovým činidlem (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoovou) kyselinou, DTNB), vedoucí ke žlutému zbarvení.

Testování aktivity připravených derivátů bylo provedeno v 96jamkových destičkách podle postupu pečlivě popsaného v následující literatuře [142]. Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm na mikrodestičkovém spektrofotometru Multimode microplate reader Synergy 2 (BioTek Inc., Winooski, VT, USA). Procentuální stanovení inhibice bylo spočteno pomocí následujícího vzorce:

$$I = \left(1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_0}\right) \cdot 100$$

Pozitivním výsledkem je změna zbarvení, tj. nárůst absorbance ΔA_i . Slepým roztokem s absorbančí pozadí ΔA_0 je médium s fosfátovým pufrům místo roztoku odpovídajících substrátů. Měření bylo provedeno na třech nezávislých sadách.

4.1.5.2 Stanovení *in vitro* antimykobakteriální aktivity

Testované kmeny mykobakterií, rychle rostoucí *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 607, DSM 43465), *Mycobacterium aurum* (ATCC 23366, DSM 43999), dále *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478), *Mycobacterium avium subsp. avium* (ATCC 15769) a avirulentní kmen *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* (ATCC 9431), byly zakoupeny od České národní sbírky typových kultur (CNCTC, Praha, Česká republika), německého Leibnizova Institutu DSMZ (DSM, Braunschweig, Německo) a belgické sbírky Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM, Antverpy, Belgie).

Kultivace byla provedena staticky v temnu v 96jamkových destičkách mikrodiluční bujónovou metodou za standartních podmínek společně s pozitivní (bujón, suspenze inokula, DMSO) a negativní (bujón, DMSO) kontrolou. Výsledky kultivace byly zhodnoceny vizuálně s využitím změny barvy indikátoru. Metoda je podrobně popsána v následující literatuře [143].

Polosyntetické deriváty, které vykazaly zajímavou antimykobakteriální aktivitu byly následně podrobeny sérii testů proti vybraným bakteriálním a mykotickým agens.

4.1.5.3 Stanovení *in vitro* antibakteriální aktivity

Ke screeningu aktivity bylo využito osm bakteriálních kmenů: *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (SA; ATCC 29213, CCM 4223), meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (MRSA; ATCC 43300, CCM 4750), *Staphylococcus epidermidis* (SE; ATCC 12228, CCM 4418), *Enterococcus faecalis* (EF; ATCC 29212, CCM 4224), *Escherichia coli* (EC; ATCC 25922, CCM 3954), *Klebsiella pneumoniae* (KP; ATCC 10031, CCM 4415), *Acinetobacter baumannii* (ACI; ATCC 19606, DSM 30007) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA; ATCC 27853, CCM 3955). Kmeny byly zakoupeny u České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, Česká republika) a německého Leibnizova Institutu DSMZ (DSM, Braunschweig, Německo).

Vybrané kmeny byly společně s pozitivní a negativní kontrolou kultivovány za standartních podmínek mikrodiluční bujónovou metodou v 96jamkových destičkách podle postupu uvedeného v následující literatuře [144]. Antimikrobiální aktivita byla po ukončení kultivace vyhodnocena vizuálně.

4.1.5.4 Stanovení *in vitro* antimykotické aktivity

Čtyři testované kmeny kvasinek, *Candida albicans* (CA1; ATCC 24433, CCM 8320), *Candida krusei* (CK; ATCC 6258, CCM 8271), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019, CCM 8260), *Candida tropicalis* (CT; ATCC 750, CCM 8264), a čtyři testované kmeny vláknitých hub, *Aspergillus fumigatus* (AF; ATCC 204305), *Aspergillus flavus* (AFla; CCM 8363), *Absidia corymbifera* (AC; CCM 8077) a *Trichophyton interdigitale* (TI; ATCC 9533, CCM 8377), byly zakoupeny u České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, Česká republika) a americké sbírky American Type Collection Cultures (ATCC, Manassas, VA, USA).

Testování bylo provedeno mikrodiluční bujónovou metodou v 96jamkových společně s pozitivní a negativní kontrolou za standartních podmínek, které jsou uvedeny v následující literatuře [144]. Specificky pro *T. interdigitale* probíhala při teplotě 25-28 °C 120 a 168 hodin (5 a 7 dní). Na konci kultivace byla antifungální aktivita vizuálně zhodnocena.

4.1.5.5 Stanovení *in vitro* cytotoxické aktivity

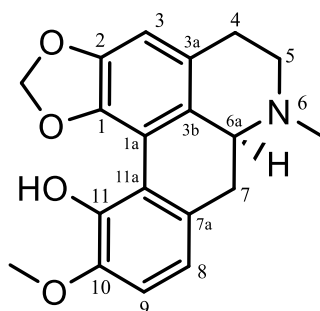
Cytotoxická aktivita vybraných derivátů, respektive jejich vliv na proliferaci a viabilitu testovaných buněčných linií, se stanovuje upravenou kolorimetrickou metodou podle Mosmanna, kdy činidlo WTS-1 (4-[3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát) žluté barvy podléhá enzymatické redukci mitochondriálními sukcinát dehydrogenázami (SDH, EC 1.3.5.1) vitálních buněk za vzniku nerozpustného fialového formazanového barviva [145].

Pro stanovení aktivity byl použit panel deseti humánních buněčných linií: leukemické T-lymfocytární Jurkat, leukemické lymfoblastové linie MOLT-4, linie A549 plicního adenokarcinomu, HT-29 kolorektálního karcinomu, PANC-1 pankreatického adenokarcinomu, A2780 ovariálního karcinomu, linie SH-SY5Y neuroblastomu, MCF-7 hormonálně dependentního karcinomu prsu, linie SAOS-2 osteosarkomu a linie MRC-5 lidských fibroblastů [146].

Inkubace vybraných buněčných linií společně s kontrolními vzorky byla provedena v 96jamkových destičkách s plochým dnem v CO₂ inkubátoru za podmínek popsanych v následující literatuře [147]. Měření bylo provedeno na třech sadách vzorků ve třech nezávislých měřeních. Výsledná data jsou vztažena k viabilitě kontrolních vzorků.

4.2 Příprava polosyntetických derivátů a jejich strukturní identifikace

4.2.1 Výchozí látka bulbokapnin (BLC-S)



Sumární vzorec: $C_{19}H_{19}NO_4$

Molární hmotnost: 325,36

Obr. 10. Výchozí látka pro derivatizační reakce bulbokapnin

ESI-HRMS (m/z): teoretická hodnota $[M+H]^+$ 326.1387, experimentální hodnota $[M+H]^+$ 326.1390

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.99 (bs, 1H), 6.86 – 6.78 (m, 2H), 6.63 (s, 1H), 6.09 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 5.94 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.17 – 3.09 (m, 1H), 3.06 (dd, $J = 13.7, 3.6$ Hz, 1H), 3.03 – 2.93 (m, 2H), 2.67 – 2.61 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.52 – 2.42 (m, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 148.4, 146.1, 143.0, 140.6, 129.8, 130.0, 127.5, 119.4, 118.5, 114.4, 111.0, 107.8, 100.4, 62.8, 56.3, 53.1, 44.0, 35.4, 29.4.

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{25} = + 242.86^\circ$ ($c = 0.14$ g/100 mL, $CHCl_3$)

4.2.2 Příprava 11-*O*-(4'-isopropylbenzyl)bulbokapninu (BLC-22)

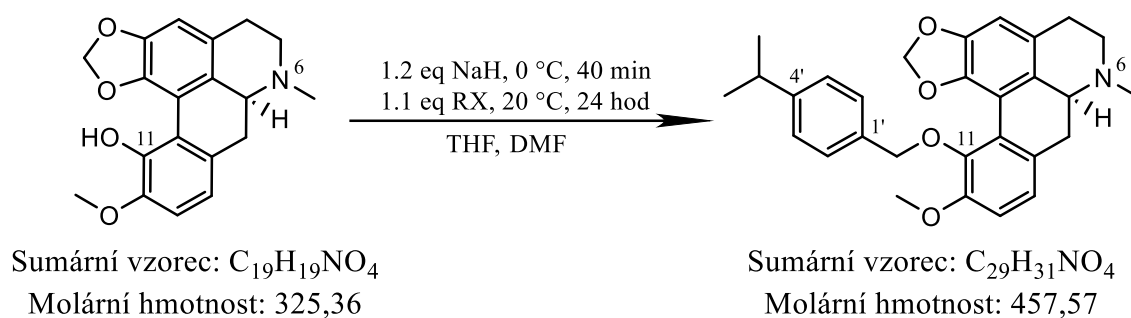


Schéma 3. Syntéza 11-*O*-(4'-isopropylbenzyl)bulbokapninu

Příprava: Metoda A; RX: 4-isopropylbenzyl bromid (45 mg, resp. 35 μ L)

Výtěžek: 30 mg, tj. 35.6 %

ESI-HRMS (m/z): teoretická hodnota $[M+H]^+$ 458.2326, experimentální hodnota $[M+H]^+$ 458.2326

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.16 – 7.11 (m, 2H, AA'BB'), 7.10 – 7.04 (m, 2H, AA'BB'), 6.96 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.74 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 5.59 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.93 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.70 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.15 – 3.06 (m, 1H), 3.05 – 2.99 (m, 2H), 2.91 – 2.78 (m, 2H), 2.66 – 2.60 (m, 1H), 2.56 – 2.49 (m, překryv, 1H), 2.53 (s, překryv, 3H), 2.41 (t, $J = 13.3$ Hz, 1H), 1.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 152.5, 148.3, 147.0, 145.4, 143.2, 135.3, 128.4, 128.2, 126.1, 125.3, 122.7, 114.1, 111.4, 107.2, 100.4, 74.9, 63.1, 56.0, 53.1, 44.1, 35.3, 33.9, 29.1, 24.1, 24.1.

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = +163.94^\circ$ ($c = 0.24$ g/100 mL, $CHCl_3$)

4.2.3 Příprava 11-O-(2'-brombenzyl)bulbokapninu (BLC-29)

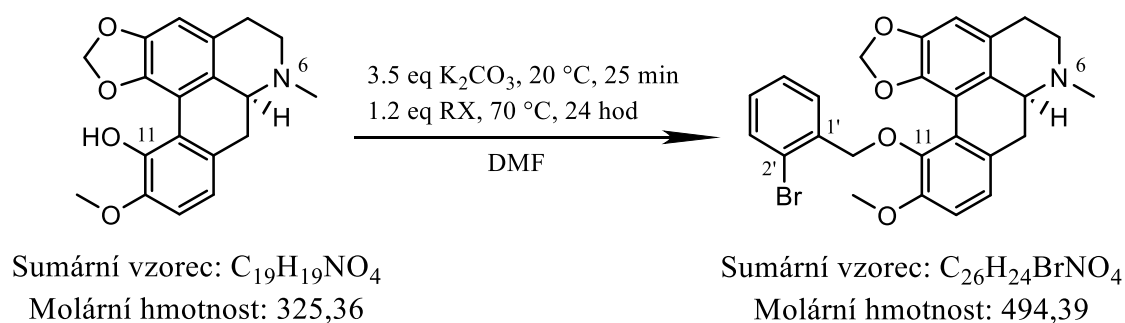


Schéma 4. Syntéza 11-O-(2'-brombenzyl)bulbokapninu

Příprava: Metoda B; RX: 2-brombenzyl bromid (57 mg)

Výtěžek: 31 mg, tj. 34.0 %

ESI-HRMS (m/z): teoretická hodnota $[M+H]^+$ 494.0961, experimentální hodnota $[M+H]^+$ 494.0967

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.43 – 7.38 (m, 2H), 7.20 – 7.15 (m, 1H), 7.05 – 7.01 (m, 1H), 6.99 (dd, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.76 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.66 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.14 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 4.96 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.10 – 3.03 (m, 1H), 3.02 – 2.95 (m, 2H), 2.83 – 2.76 (m, 1H), 2.61 – 2.56 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.49 – 2.43 (m, 1H), 2.37 (t, $J = 13.3$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 152.4, 146.9, 144.7, 143.2, 137.7, 132.2, 130.2, 129.8, 128.9, 128.7, 127.2, 125.5, 123.0, 122.7, 113.9, 111.5, 107.2, 100.6, 73.9, 63.0, 56.1, 53.1, 44.2, 35.4, 29.2.

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = +186.67^\circ$ ($c = 0.21$ g/100 mL, $CHCl_3$)

4.2.4 Příprava 11-O-benzylbulbokapninu (BLC-30)

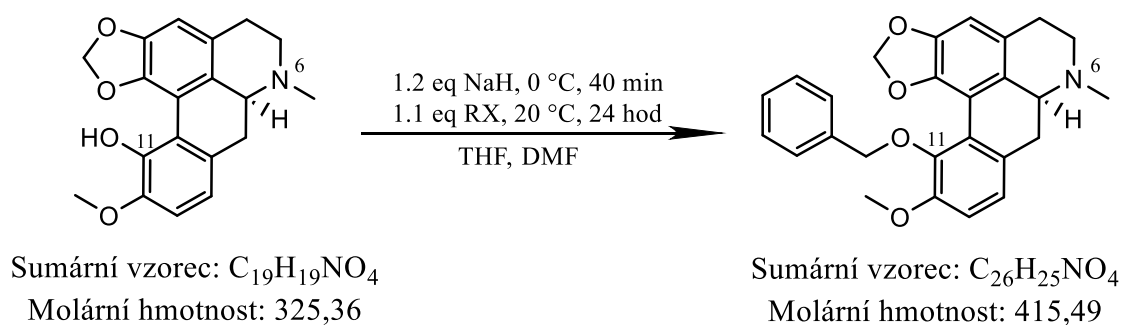


Schéma 5. Syntéza 11-O-benzylbulbokapninu

Příprava: Metoda A; RX: benzyl bromid (39 mg, resp. 27 μ L)

Výtěžek: 21 mg, tj. 27.4 %

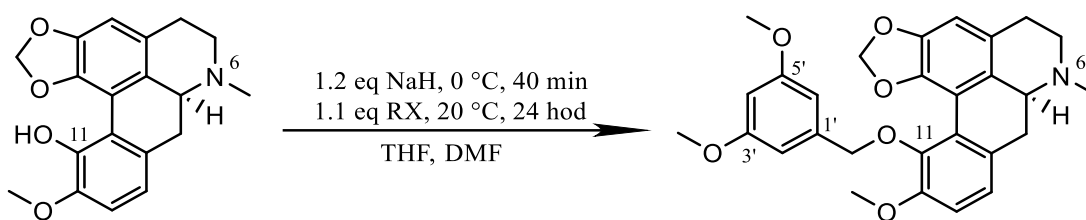
ESI-HRMS (m/z): teoretická hodnota $[M+H]^+$ 416.1856, experimentální hodnota $[M+H]^+$ 416.1861

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.24 – 7.14 (m, 5H), 6.97 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.74 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.59 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 4.97 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.77 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.18 – 3.10 (m, 1H), 3.08 – 2.99 (m, 2H), 2.96 – 2.81 (m, 1H), 2.68 – 2.61 (m, 1H), 2.57 – 2.49 (m, překryv, 1H), 2.55 (s, překryv, 3H), 2.45 (t, $J = 13.4$ Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 152.5, 147.1, 145.1, 143.3, 137.8, 129.7, 128.5, 128.3, 128.0, 127.7, 127.6, 125.3, 122.8, 114.1, 111.5, 107.2, 100.5, 74.9, 62.9, 56.0, 53.0, 43.9, 35.0, 28.8.

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{25} = + 169.06^\circ$ ($c = 0.27$ g/100 mL, CHCl₃)

4.2.5 Příprava 11-*O*-(3',5'-dimethoxybenzyl)bulbokapninu (BLC-31)



Sumární vzorec: C₁₉H₁₉NO₄

Molární hmotnost: 325,36

Sumární vzorec: C₂₈H₂₉NO₆

Molární hmotnost: 475,54

Schéma 6. Syntéza 11-*O*-(3',5'-dimethoxybenzyl)bulbokapninu

Příprava: Metoda A; RX 3,5-dimethoxybenzyl bromid (54 mg)

Výtěžek: 26 mg, tj. 29.6 %

ESI-HRMS (*m/z*): teoretická hodnota [M+H]⁺ 476.2068, experimentální hodnota [M+H]⁺ 476.2070

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 6.95 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.31 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.27 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.76 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.73 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.67 (s, 6H), 3.14 – 3.06 (m, 1H), 3.04 – 2.97 (m, 2H), 2.81 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 2.64 – 2.57 (m, 1H), 2.54 – 2.46 (m, překryv, 1H), 2.52 (s, překryv, 3H), 2.39 (t, *J* = 13.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 160.5, 152.3, 146.9, 144.9, 143.2, 140.0, 129.9, 128.4, 125.4, 125.4, 122.8, 114.2, 111.5, 107.2, 106.0, 100.5, 100.2, 74.9, 62.9, 56.0, 55.3, 53.0, 44.0, 35.2, 29.0.

Optická otáčivost: [α]_D²⁵ = + 132.31° (c = 0.13 g/100 mL, CHCl₃)

4.2.6 Příprava 11-*O*-(*N*-piperidylethyl)bulbokapninu (BLC-32)



Schéma 7. Syntéza 11-*O*-(*N*-piperidylethyl)bulbokapninu

Příprava: Metoda A; RX: 1-(2-chlorethyl)piperidin hydrochlorid (33 mg)

Výtěžek: 18 mg, tj. 22.4 %

ESI-HRMS (*m/z*): teoretická hodnota [M+H]⁺ 437.2435, experimentální hodnota [M+H]⁺ 437.2435

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 6.95 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.04 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.84 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.15 – 4.03 (m, 1H), 3.88 – 3.79 (m, překryv, 1H), 3.84 (s, překryv, 3H), 3.16 – 3.06 (m, 1H), 3.02 (dd, *J* = 13.8, 3.5 Hz, 1H), 3.01 – 2.96 (m, 1H), 2.94 – 2.88 (m, 1H), 2.74 – 2.57 (m, překryv, 2H), 2.64 – 2.58 (m, překryv, 1H), 2.52 – 2.34 (m, překryv, 6H), 2.51 (s, překryv, 3H), 1.62 – 1.51 (m, 4H), 1.41 – 1.38 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 152.1, 146.9, 145.7, 143.1, 130.1, 128.7, 125.8, 124.7, 122.5, 119.4, 114.0, 111.3, 107.4, 100.5, 70.3, 63.1, 58.8, 55.9, 54.8, 53.1, 44.2, 35.4, 29.2, 25.6, 24.1.

Optická otáčivost: [α]_D²⁴ = + 234.78° (c = 0.23 g/100 mL, CHCl₃)

4.2.7 Příprava 11-O-(1'-naftylmethyl)bulbokapninu (BLC-33)

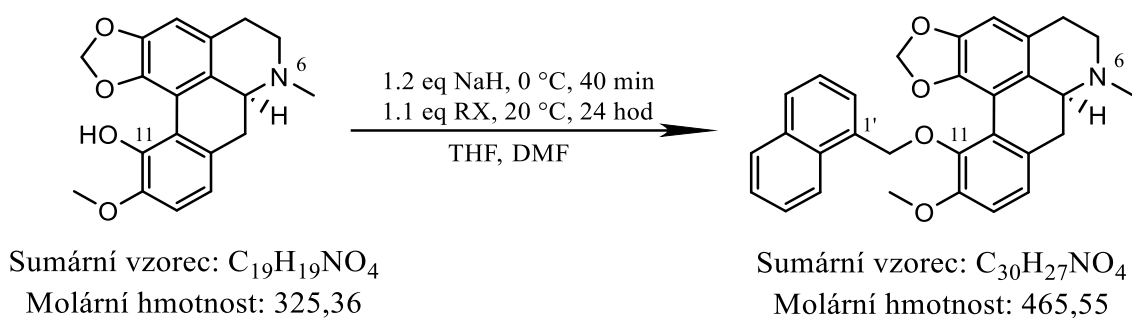


Schéma 8. Syntéza 11-O-(1'-naftylmethyl)bulbokapninu

Příprava: Metoda A; RX: 1-(chlormethyl)naftalen (51 mg)

Výtěžek: 22 mg, tj. 25.6 %

ESI-HRMS (m/z): teoretická hodnota $[M+H]^+$ 466.2013, experimentální hodnota $[M+H]^+$ 466.2017

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.11 – 8.04 (m, 1H), 7.75 – 7.69 (m, 1H), 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.43 – 7.35 (m, 2H), 7.30 – 7.23 (m, 1H), 7.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.95 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.62 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 5.56 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 5.50 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.06 – 2.95 (m, 2H), 2.93 (dd, $J = 13.8, 3.5$ Hz, 1H), 2.61 – 2.54 (m, 1H), 2.52 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.47 – 2.41 (m, 1H), 2.29 (t, $J = 13.3$ Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 152.4, 146.6, 144.8, 143.0, 133.5, 133.2, 132.0, 129.7, 128.9, 128.1, 127.6, 126.1, 126.0, 125.6, 125.0, 124.0, 122.9, 113.7, 111.2, 106.9, 100.4, 73.0, 62.8, 56.0, 53.0, 44.0, 35.1, 28.8.

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{25} = +70.00^\circ$ ($c = 0.08$ g/100 mL, CHCl₃)

4.2.8 Příprava 11-*O*-(3'-methoxyfenylethyl)bulbokapninu (BLC-34)

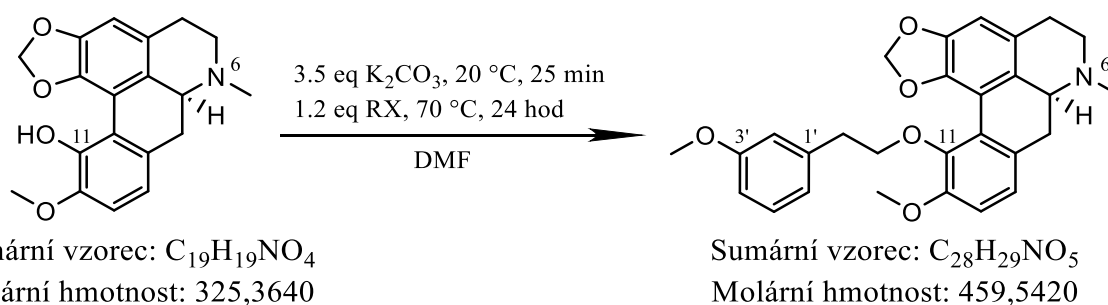


Schéma 9. Syntéza 11-*O*-(3'-methoxyfenylethyl)bulbokapninu

Příprava: Metoda B; RX: 3-methoxyfenylethyl bromid (45 mg, resp. 32 μL)

Výtěžek: 37 mg, tj. 45.0 %

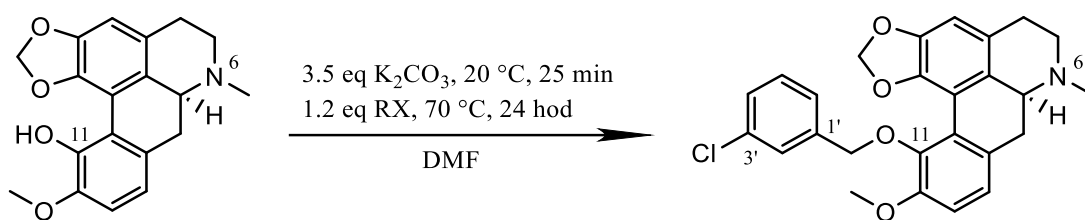
ESI-HRMS (*m/z*): teoretická hodnota [M+H]⁺ 460.2119, experimentální hodnota [M+H]⁺ 460.2121

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.12 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.95 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.72 – 6.67 (m, 2H), 6.67 – 6.64 (m, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.79 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.78 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.18 – 4.13 (m, 1H), 3.96 – 3.90 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.15 – 3.08 (m, 1H), 3.07 – 2.99 (m, 2H), 2.98 – 2.92 (m, 1H), 2.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.67 – 2.61 (m, 1H), 2.58 – 2.48 (m, překryv, 1H), 2.54 (s, překryv, 3H), 2.42 (t, *J* = 13.3 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 159.6, 152.2, 146.9, 145.7, 143.2, 140.2, 130.0, 129.3, 128.4, 125.5, 124.8, 122.5, 121.2, 114.5, 113.9, 111.5, 111.3, 107.3, 100.5, 73.5, 63.0, 55.9, 55.2, 53.1, 44.1, 36.7, 35.3, 29.1.

Optická otáčivost: [α]_D²⁵ = + 182.50° (c = 0.16 g/100 mL, CHCl₃)

4.2.9 Příprava 11-O-(3'-chlorbenzyl)bulbokapninu (BLC-35)



Sumární vzorec: C₁₉H₁₉NO₄

Molární hmotnost: 325,36

Sumární vzorec: C₂₆H₂₄ClNO₄

Molární hmotnost: 449,93

Schéma 10. Syntéza 11-O-(3'-chlorbenzyl)bulbokapninu

Příprava: Metoda B; RX: 3-chlorbenzyl bromid (42 mg, resp. 27 µL)

Výtěžek: 28 mg, tj. 33.7 %

ESI-HRMS (*m/z*): teoretická hodnota [M+H]⁺ 450.1467, hodnota experimentální [M+H]⁺ 450.1467

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.22 – 7.18 (m, 1H), 7.18 – 7.13 (m, 1H) 7.11 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.04 – 7.01 (m, 1H), 6.97 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.77 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.76 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.96 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.14 – 3.05 (m, 1H), 3.03 – 2.97 (m, 2H), 2.80 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 2.65 – 2.59 (m, 1H), 2.55 – 2.48 (m, překryv, 1H), 2.52 (s, překryv, 3H), 2.39 (t, *J* = 13.4 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 152.2, 146.9, 144.6, 143.1, 139.8, 133.9, 130.0, 129.2, 128.4, 127.8, 126.2, 125.6, 125.4, 123.0, 113.9, 111.4, 107.5, 100.5, 74.0, 62.9, 56.0, 53.0, 44.0, 35.2, 29.0.

Optická otáčivost: [α]_D²⁵ = + 157.78° (c = 0.18 g/100 mL, CHCl₃)

4.2.10 Příprava 11-O-(cyklohexylmethyl)bulbokapninu (BLC-36)

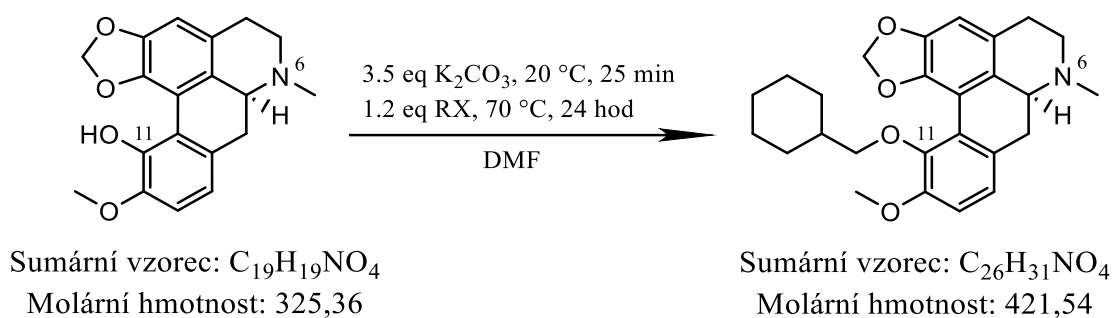


Schéma 11. Syntéza 11-O-(cyklohexylmethyl)bulbokapninu

Příprava: Metoda B; RX: (brommethyl)cyklohexan (36 mg, resp. 29 μ L)

Výtěžek: 19 mg, tj. 24.4 %

ESI-HRMS (m/z): teoretická hodnota $[M+H]^+$ 422.2326, experimentální hodnota $[M+H]^+$ 422.2326

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.94 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.01 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 5.85 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.68 (dd, $J = 9.2, 6.3$ Hz, 1H), 3.37 (dd, $J = 9.2, 6.3$ Hz, 1H), 3.14 – 3.07 (m, 1H), 3.06 – 2.98 (m, 2H), 2.97 – 2.92 (m, 1H), 2.67 – 2.61 (m, 1H), 2.57 – 2.48 (m, překryv, 1H), 2.53 (s, překryv, 3H), 2.40 (t, $J = 13.0$ Hz, 1H), 1.82 – 1.74 (m, 1H), 1.74 – 1.67 (m, 1H), 1.67 – 1.55 (m, 4H), 1.26 – 1.04 (m, 3H), 0.96 – 0.83 (m, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 152.2, 146.9, 146.4, 143.2, 130.0, 128.6, 125.5, 124.8, 122.2, 114.1, 111.4, 107.2, 100.6, 79.3, 63.1, 55.9, 53.1, 44.1, 38.8, 35.4, 29.9, 29.8, 29.2, 26.6, 26.0, 25.9.

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{25} = +155.00^\circ$ ($c = 0.16$ g/100 mL, $CHCl_3$)

4.2.11 Příprava 11-O-fenylethylbulbokapninu (BLC-37)

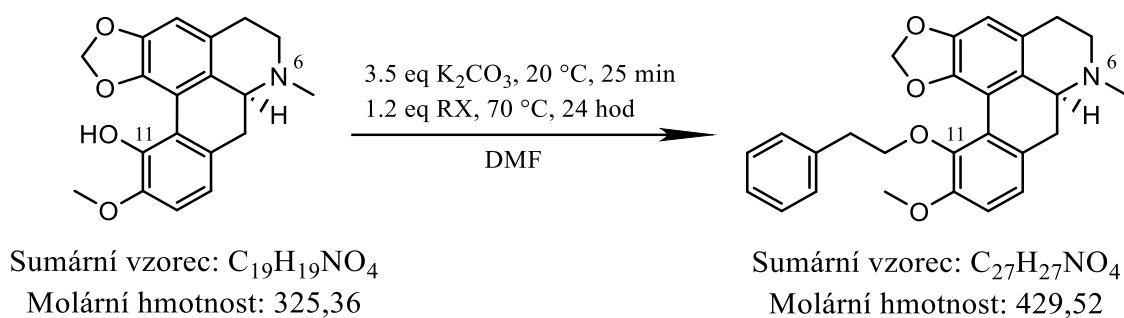


Schéma 12. Syntéza 11-O-fenylethylbulbokapninu

Příprava: Metoda B; RX: (2-bromethyl)benzen (38 mg, resp. 29 μ L)

Výtěžek: 25 mg, tj. 31.6 %

ESI-HRMS (m/z): teoretická hodnota $[M+H]^+$ 430.2013, experimentální hodnota $[M+H]^+$ 430.2014

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.25 – 7.16 (m, 2H), 7.19 – 7.12 (m, 1H), 7.15 – 7.09 (m, 2H), 6.95 (dd, $J = 8.2, 1.2$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.78 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.76 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 4.18 – 4.13 (m, 1H), 3.97 – 3.91 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.15 – 3.07 (m, 1H), 3.06 – 2.98 (m, 2H), 2.99 – 2.93 (m, překryv, 1H), 2.92 (t, $J = 7.3$ Hz, překryv, 2H), 2.69 – 2.60 (m, 1H), 2.54 – 2.49 (m, překryv, 1H), 2.53 (s, překryv, 3H), 2.40 (t, $J = 13.2$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 152.2, 146.9, 145.8, 143.2, 138.6, 130.0, 128.8, 128.7, 128.3, 126.2, 125.6, 124.8, 122.5, 114.0, 111.3, 107.3, 100.5, 73.7, 63.0, 55.9, 53.1, 44.1, 36.8, 35.4, 29.2.

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{25} = +184.62^\circ$ ($c = 0.24$ g/100 mL, $CHCl_3$)

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava polosyntetických derivátů bulbokapninu

Tabulka 3: Souhrn připravených derivátů a jejich procentuálních výtěžků

OZNAČENÍ	CHEMICKÝ NÁZEV	METODA	VÝTĚŽEK [%]
BLC-22	11- <i>O</i> -(4'-isopropylbenzyl)bulbokapnin	A	35.6
BLC-29	11- <i>O</i> -(2'-bromobenzyl)bulbokapnin	B	34.0
BLC-30	11- <i>O</i> -benzylbulbokapnin	A	27.4
BLC-31	11- <i>O</i> -(3',5'-dimethoxybenzyl)bulbokapnin	A	29.6
BLC-32	11- <i>O</i> -(<i>N</i> -piperidylethyl)bulbokapnin	A	22.4
BLC-33	11- <i>O</i> -(1'-naftylmethyl)bulbokapnin	B	25.6
BLC-34	11- <i>O</i> -(3'-methoxybenzyl)bulbokapnin	B	45.0
BLC-35	11- <i>O</i> -(3'-chlorbenzyl)bulbokapnin	B	33.7
BLC-36	11- <i>O</i> -(cyklohexylmethyl)bulbokapnin	B	24.4
BLC-37	11- <i>O</i> -fenylethylbulbokapnin	B	31.6

5.2 Výsledky měření molekulové hmotnosti bulbokapninu a jeho derivátů

Tabulka 4: Molekulová hmotnost bulbokapninu a připravených derivátů

OZNAČENÍ	molární hmotnost [Da]	teoretická [M+H] ⁺ [Da]	experimentální [M+H] ⁺ [Da]	přesná hmota [M+H] ⁺ [ppm]
BLC-22 A	457.2253	458.2326	458.2327	0.22
BLC-22 B	457.2253	458.2326	458.2325	-0.22
BLC-29 A	493.0889	494.0962	494.0969	1.42
BLC-29 B	493.0889	494.0962	494.0965	0.61
BLC-30 A	415.1784	416.1857	416.1863	1.44
BLC-30 B	415.1784	416.1857	416.1859	0.48
BLC-31 A	475.1995	476.2068	476.2068	0.00
BLC-31 B	475.1995	476.2068	476.2071	0.63
BLC-32 A	436.2362	437.2435	437.2437	0.46
BLC-32 B	436.2362	437.2435	437.2433	-0.46
BLC-33 A	465.1940	466.2013	466.2018	1.07
BLC-33 B	465.1940	466.2013	466.2016	0.64
BLC-34 A	459.2046	460.2119	460.2123	0.87
BLC-34 B	459.2046	460.2119	460.2118	-0.22

Tabulka 4: Molekulová hmotnost bulbokapninu a připravených derivátů (pokračování)

OZNAČENÍ	molární hmotnost [Da]	teoretická [M+H] ⁺ [Da]	experimentální [M+H] ⁺ [Da]	přesná hmota [M+H] ⁺ [ppm]
BLC-35 A	449.1394	450.1467	450.1467	0.00
BLC-36 B	449.1394	450.1467	450.1467	0.00
BLC-37 A	421.2253	422.2326	422.2326	0.00
BLC-37 B	421.2253	422.2326	422.2325	-0.24
BLC-S A	429.1940	430.2013	430.2014	0.23
BLC-S B	429.1940	430.2013	430.2014	0.23

5.3 Výsledky biologické aktivity připravených derivátů

5.3.1 Inhibiční aktivita proti cholinesterázám (*hAChE*, *hBuChE*)

V následující tabulce (Tabulka 5) jsou shrnuty výsledky studie inhibiční aktivity připravených derivátů proti rekombinantním cholinesterázám (*hAChE*, *hBuChE*). Měření bylo provedeno při koncentraci látek 10 $\mu\text{mol/L}$. Pro látky, které vykázaly inhibici $\geq 50\%$, byla stanovena hodnota IC_{50} . Hodnoty inhibice cholinesteráz jsou uvedeny v procentech [%], jejich IC_{50} pak v $\mu\text{mol/L}$. Referenčním standardem jsou galantamin-hydrobromid (GAL-HBr) a eserin (ESE). Testování bylo provedeno v laboratořích KFGFB na podzim roku 2024. Účinné deriváty jsou zvýrazněny tučně.

Tabulka 5: Inhibiční aktivita připravených derivátů proti *hAChE* a *hBuChE*

OZNAČENÍ	inhibice <i>hAChE</i> [%]	IC_{50} <i>hAChE</i>	inhibice <i>hBuChE</i> [%]	IC_{50} <i>hBuChE</i>
BLC-22	0	> 10	31.17 \pm 0.72	> 10
BLC-29	11.43 \pm 1.07	> 10	72.85 \pm 2.03	1.89 \pm 0.19
BLC-30	0	> 10	80.50 \pm 0.54	1.35 \pm 0.10
BLC-31	0	> 10	19.95 \pm 2.66	> 10
BLC-32	3.97 \pm 0.77	> 10	35.48 \pm 0.55	> 10
BLC-33	0	> 10	72.91 \pm 0.88	2.01 \pm 0.38
BLC-34	0	> 10	10.38 \pm 0.17	> 10
BLC-35	0	> 10	30.67 \pm 4.56	> 10
BLC-36	0	> 10	4.37 \pm 0.73	> 10
BLC-37	0	> 10	2.41 \pm 0.95	> 10
GAL-HBr	79.96 \pm 1.40	2.01 \pm 0.14	29.31 \pm 3.49	33.69 \pm 2.66
ESE	96.59 \pm 0.55	0.20 \pm 0.01	95.96 \pm 0.31	0.30 \pm 0.01

Gal-HBr (galantamin-hydrobromid), ESE (eserin); koncentrace připravených derivátů 10 $\mu\text{mol/L}$

5.3.1.1 Schopnost připravených derivátů prostoupit HEB

Za účelem zhodnocení schopnosti připravených derivátů přestupovat přes HEB byla stanovena jejich hodnota tzv. BBB skóre (Tabulka 6). Hodnoty byly spočítány *in silico* pomocí software ChemAxon. Účinné deriváty jsou zvýrazněny tučně.

Tabulka 6: Schopnost připravených derivátů prostoupit hematoencefalickou bariérou

OZNAČENÍ	AroR	HA	MW	HBA	HBD	MWHBN	TPSA	pKa	BBB skóre
BLC-22	3	34	457.56	5	0	0.23	40.16	8.551	3.98
BLC-29	3	32	498.38	5	0	0.22	40.16	8.550	4.08
BLC-30	3	31	415.48	5	0	0.25	40.16	8.552	4.09
BLC-31	3	35	475.53	7	0	0.32	58.62	8.551	3.36
BLC-32	2	32	436.54	6	0	0.29	43.40	9.010	4.87
BLC-33	4	35	465.19	5	0	0.28	40.16	8.550	3.94
BLC-34	3	33	445.51	6	0	0.28	49.39	8.551	3.75
BLC-35	3	32	449.93	5	0	0.24	40.16	8.551	4.07
BLC-36	2	31	421.53	5	0	0.24	40.16	8.562	5.10
BLC-37	3	32	429.51	5	0	0.24	40.16	8.562	4.06
BLC-S	2	24	325.36	5	1	0.33	51.16	9.452	4.82

AroR (počet aromatických jader), HA (počet těžkých atomů), MW (molární hmotnost), HBA (počet akceptorů vodíkové vazby), HBD (počet donorů vodíkové vazby), operátor MWHBN (podíl součtu donorů a akceptorů vodíkové vazby a odmocniny molární hmotnost), TPSA (polární plocha molekuly), pKa (záporný dekadický logaritmus disociační konstanty)

5.3.2 Antibakteriální aktivita proti vybraným mykobakteriálním agens

Připravené deriváty bulbokapninu byly studovány i z pohledu jejich antimykobateriální aktivity. Výsledky těchto testů jsou shrnuty níže (Tabulka 7). Data jsou prezentována jako minimální inhibiční koncentrace MIC v $\mu\text{g/mL}$, pro *M. tbc* H37Ra je hodnota přepočtena i na $\mu\text{mol/L}$ (μM). Referenčními standardy jsou antibiotika isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacín (CIP). Deriváty zvýrazněné tučně byly vybrány pro další studium antibakteriální a antimykotické aktivity. Testování bylo provedeno v laboratořích KBLV na jaře roku 2024. Účinné deriváty jsou zvýrazněny tučně.

Tabulka 7: Antimykobakteriální aktivita derivátů bulbokapninu

OZNAČENÍ	<i>M. tbc</i> H37Ra		<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. smegmatis</i>
	(MIC µg/mL)	(MIC µM)	(MIC µg/mL)	(MIC µg/mL)	(MIC µg/mL)	(MIC µg/mL)
BLC-22	3.91	8.55	7.81	15.625	1.95	15.625
BLC-29	15.625	31.69	15.625	31.25	3.91	31.25
BLC-30	15.625	37.63	31.25	62.5	15.625	62.5
BLC-31	62.5	131.52	62.5	125	15.625	125.0
BLC-32	250	573.08	250	250	125	250
BLC-33	31.25	67.18	31.25	62.5	7.81	31.25
BLC-34	7.81	17.01	62.5	62.5	31.25	62.5
BLC-35	31.25	69.58	31.25	250	7.81	31.25
BLC-36	7.81	18.54	7.81	15.625	3.91	15.625
BLC-37	15.625	36.41	31.25	≥ 500	7.81	31.25
INH	0.25	1.82	3.91	≥ 500	3.125	31.25
RIF	0.003	0.006	0.39	1.56	0.025	12.5
CIP	0.25	0.75	0.0156	1.56	0.25	0.125

INH (isoniazid), RIF (rifampicin), CIP (ciprofloxacín)

5.3.3 Antibakteriální aktivita vybraných derivátů proti bakteriálním agens

Aktivita vybraných derivátů je rozdělena do tabulky pro vybraná bakteriální G⁺ agens (Tabulka 8) a tabulky pro vybraná G⁻ agens (Tabulka 9). Data jsou prezentována jako hodnota MIC v µmol/L. Jako referenční standardy slouží antibiotika ciprofloxacín (CIP), gentamicin (GEN) a vankomycin (VAN). Testování bylo provedeno v laboratořích KBLV na konci roku 2024.

Tabulka 8: Antibakteriální aktivita derivátů bulbokapninu proti vybraným G⁺ agens

OZNAČENÍ	<i>S. aureus</i>		<i>MRSA</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>E. faecalis</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
DĚLKA KULTIVACE								
BLC-22	125	250	>250	>250	250	>250	>250	>250
BLC-36	15.62	31.25	31.25	31.25	15.62	31.25	62.5	62.5
CIP	1.55	3.09	0.77	1.55	0.77	0.39	6.18	3.09
GEN	0.97	0.97	>30.91	>30.91	0.24	0.24	>30.97	>30.97
VAN	0.67	0.67	1.35	0.67	0.67	0.67	2.69	2.69

MRSA (metilicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*), CIP (ciprofloxacín), GEN (gentamicin), VAN (vankomycin)

Tabulka 9: Antibakteriální aktivita derivátů bulbokapninu proti vybraným G⁻ agens

OZNAČENÍ	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>		
	DÉLKA KULTIVACE	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
BLC-22		>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
BLC-36		>125	>125	62.5	125	>125	>125	>125	>125
CIP		0.05	0.10	0.02	0.02	1.55	1.55	1.55	1.55
GEN		1.94	1.94	0.48	0.97	7.74	3.87	0.97	0.97
VAN		>21.5	>21.5	>21.5	>21.5	>21.5	>21.5	>21.5	>21.5

CIP (ciprofloxacin), GEN (gentamicin), VAN (vankomycin)

5.3.4 Antimykotická aktivita vybraných derivátů proti mykotickým agens

Antimykotické působení vybraných derivátů na kvasinky a plísně je shrnuto v níže uvedených tabulkách (Tabulka 10, Tabulka 11). Hodnoty MIC jsou uvedeny v $\mu\text{mol/L}$. Referenčními standardy jsou antimykotika amfotericin B (AmB) a vorikonazol (VOR). Testování bylo prováděno v laboratořích KBLV na konci roku 2024.

Tabulka 10: Antimykotická aktivita derivátů bulbokapninu proti vybraným kvasinkám

OZNAČENÍ	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		
	DÉLKA KULTIVACE	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
BLC-22		>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
BLC-36		125	>125	62.5	62.5	62.5	62.5	125	>125
AmB		1.08	1.08	1.08	1.08	0.54	1.08	1.08	1.08
VOR		0.36	>45.8	2.86	45.8	0.09	>45.8	2.86	>45.8

AmB (amfotericin B), VOR (vorikonazol)

Tabulka 11: Antimykotická aktivita derivátů bulbokapninu proti vybraným plísním

OZNAČENÍ	<i>A. fumigatus</i>		<i>A. flavus</i>		<i>A. corymbifera</i>		<i>T. interdigitale</i>		
	DÉLKA KULTIVACE	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	120 h	168 h
BLC-22		>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
BLC-36		>125	>125	>125	>125	>125	>125	31.25	62.5
AmB		4.33	4.33	4.33	4.33	4.33	4.33	8.66	8.66
VOR		0.72	1.43	1.43	5.73	11.45	>45.8	0.09	>45.8

AmB (amfotericin B), VOR (vorikonazol)

5.3.5 Cytotoxická aktivita vybraných polosyntetických derivátů

Výsledky stanovení cytotoxické aktivity pro jednotlivé linie jsou shrnuty níže (Tabulka 12). Hodnoty viability buněčných linií jsou uvedeny v procentech [%]. Měření bylo provedeno při koncentraci látek 10 $\mu\text{mol/L}$. Referenčním standardem je chemoterapeutikum doxorubicin (DOX) v koncentraci 1 $\mu\text{mol/L}$. Testování bylo provedeno ve spolupráci s ÚLB LFHK v lednu roku 2025.

Tabulka 12: Vliv vybraných derivátů na viabilitu buněčných linií

OZNAČENÍ	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC-1
BLC-22	114 \pm 12	100 \pm 18	92 \pm 13	59 \pm 6	101 \pm 8
BLC-29	70 \pm 1	78 \pm 3	89 \pm 8	47 \pm 3	91 \pm 9
BLC-30	98 \pm 11	90 \pm 12	97 \pm 11	78 \pm 2	95 \pm 9
BLC-33	77 \pm 6	81 \pm 6	104 \pm 8	35 \pm 3	112 \pm 7
BLC-34	95 \pm 5	92 \pm 16	108 \pm 8	54 \pm 4	101 \pm 5
BLC-36	113 \pm 11	92 \pm 6	106 \pm 4	41 \pm 8	106 \pm 3
DOX	3 \pm 0	1 \pm 0	28 \pm 22	64 \pm 12	72 \pm 2

koncentrace připravených derivátů 10 $\mu\text{mol/L}$, doxorubicin (DOX) 1 $\mu\text{mol/L}$

Tabulka 12: Vliv vybraných derivátů na viabilitu buněčných linií (pokračování)

OZNAČENÍ	A2780	SHSY5Y	MCF-7	SAOS-2	MRC-5
BLC-22	134 \pm 4	113 \pm 3	77 \pm 17	91 \pm 8	113 \pm 7
BLC-29	90 \pm 2	96 \pm 9	91 \pm 7	94 \pm 6	77 \pm 11
BLC-30	110 \pm 2	114 \pm 2	86 \pm 10	98 \pm 3	88 \pm 4
BLC-33	123 \pm 7	111 \pm 10	82 \pm 9	102 \pm 3	82 \pm 7
BLC-34	106 \pm 1	109 \pm 6	98 \pm 4	103 \pm 2	98 \pm 1
BLC-36	87 \pm 5	82 \pm 3	66 \pm 20	74 \pm 11	101 \pm 3
DOX	53 \pm 6	17 \pm 10	26 \pm 4	21 \pm 7	55 \pm 18

koncentrace připravených derivátů 10 $\mu\text{mol/L}$, DOX (doxorubicin) 1 $\mu\text{mol/L}$

6 DISKUSE A ZÁVĚR

Bulbokapnin patří mezi nerozšířenější alkaloidy biosynteticky odvozené od tyrosinu, který je prekursorem velké skupiny isochinolinových alkaloidů. Tyto alkaloidy jsou dále klasifikovány do celé řady strukturních typů, přičemž bulbokapnin patří společně s mnoha dalšími zástupci do skupiny alkaloidů aporfinového strukturního typu [17].

Bulbokapnin ve své struktuře nese volnou hydroxylovou skupinu, kterou je možné strukturně modifikovat. V rámci předložené diplomové práce byla připravena série 10 polosyntetických derivátů–etherů. Syntéza etherů byla vybrána s ohledem na jejich vyšší odolnost proti účinku sérových hydroláz, ve srovnání s estery [148]. Pro samotnou přípravu byly využity dvě metody, které přinesly srovnatelné výtěžky (Tabulka 3), a jsou v diplomové práci podrobně popsány. V průběhu práce byla pro přípravu většiny derivátů zvolena metoda B (K_2CO_3 v nadbytku, DMF) jako metoda primární. Práce s NaH při metodě A vyžadovala předsušení laboratorního skla, inertní atmosféru argonu, minimum vzdušné vlhkosti a ledovou lázeň. Reakce s K_2CO_3 naopak nevyžadovala žádná podobná opatření, jejím největším benefitem bylo zejména zjednodušení celého procesu přípravy. Záměnou NaH za slabší bázi K_2CO_3 došlo navíc k omezení tvorby nežádoucího vedlejšího produktu kvarterní amoniové soli.

Všechny připravené deriváty byly následně podrobeny metodám strukturní analýzy (1H , ^{13}C NMR, HRMS) a měření optické otáčivosti. Po prokázání struktury a čistoty byly všechny připravené sloučeniny testovány na aktivitu proti *hAChE*, *hBuChE* a proti vybraným kmenům mykobakterií. Deriváty, které vykazaly účinek proti jakémukoli kmeni mykobakterií (kritériem hodnota $MIC \leq 3.91 \mu g/mL$), byly dále testovány na jejich antibakteriální (vybraná G^+ a G^- agens) a antimykotickou (kvasinky a vláknité houby) aktivitu. Nakonec byly všechny aktivní deriváty, tedy inhibitory cholinesteráz (BLC-29, BLC-30, BLC-33) a antimykobakteriálně působící látky (BLC-22, BLC-29, BLC-36), podrobeny stanovení cytotoxické aktivity na panelu deseti buněčných linií.

Ze sledování inhibiční aktivity připravených derivátů proti cholinesterázám vyplývá, že žádný z nich nevykazuje slibnou aktivitu proti *hAChE* (Tabulka 5). Je však zřejmý posun od výchozího alkaloidu bulbokapninu, který aktivitu proti *hAChE* nevykazuje prakticky žádnou [27]. Pro deriváty, které inhibovaly *hBuChE* z více než 50 % při standardní testovací koncentraci $10 \mu mol/L$ byla stanovena jejich hodnota IC_{50}

(Tabulka 5). Jednalo se o deriváty BLC-29, BLC-30 a BLC-33 s hodnotami IC_{50} 1.89 ± 0.19 , 1.35 ± 0.10 a 2.01 ± 0.38 , v daném pořadí. Uvedené deriváty současně vykazují vhodné hodnoty BBB skóre (4.08, 4.09, 3.94, v daném pořadí), které předurčuje jejich schopnost dobře pronikat HEB a kumulovat se v CNS (Tabulka 6). Ostatní z připravených derivátů byly pouze slabě aktivní.

BBB skóre je modifikací Lipinského pravidla pěti, které není pro výběr molekul cílících do CNS dostačující. HEB chrání mozek před nežádoucími účinky tělu cizích látek, proto schopnost léčiv proniknout touto bariérou do CNS v terapeutických dávkách je jejich nezbytnou vlastností. Penetrace přes HEB je závislá na několika parametrech: léčiva lépe přecházející jsou taková, která mají ve struktuře dvě a méně aromatických jader, jsou při fyziologickém pH neionizovaná, tj. slabě kyselá/zásaditá, a schopná prostoupit bariérami pasivní difuzí. Existuje tedy preference ve směru menších molekul s méně polárním povrchem, které vykazují BBB skóre 4–6 [149]. Z výše uvedeného lze vyvodit trendy, které se objevují i v sérii připravených derivátů (Tabulka 6). Nejvyšší BBB skóre, vykazují molekuly s nižším počtem lipofilních aromatických jader a současně nižší molární hmotností (BLC-32, BLC-36). Naopak deriváty nesoucí více aromatických jader nebo s větší molární hmotností mají BBB skóre výrazně nižší (BLC-31).

Mezi vybranými zástupci mykobakterií se deriváty ukázaly jako ne příliš aktivní (Tabulka 7). U avirulentního kmene *Mtb* H37Ra, který slouží jako náhrada vysoce patogenního kmene H37Rv, byla aktivita na stanovené hranici pouze u BLC-22 (MIC 3.91 $\mu\text{g/mL}$, resp. 8.55 $\mu\text{mol/L}$). Nejvyšší aktivitu deriváty vykazaly proti pomalu rostoucímu oportunnímu patogenu *M. kansasii*, referenční antibiotika rifampicin a ciprofloxacin jsou však o 1–2 řády účinnější. Dva deriváty (BLC-22, BLC-36) byly podrobeny dalším testům antibiotické a antimykotické aktivity. Za aktivní derivát lze označit BLC-36, který poměrně překvapivě působil na G^+ agens. Bulbokapnin vykazuje vyšší potenciál proti G^- bakteriím [73]. Je tedy zřejmé, že strukturní obměny vedly ke snížení aktivity u G^- agens (Tabulka 9), výhodná substituce BLC-36 k rozšíření na G^+ (Tabulka 8). I v případě mykotických agens je bulbokapnin aktivním, inhibičně působí zejména na kvasinky [74]. Z výsledků tedy vyplývá, že strukturní obměny opět vedly ke snížení antimykotické aktivity (Tabulka 10, Tabulka 11). V testech cytotoxického působení žádný z testovaných derivátů při testovací koncentraci 10 $\mu\text{mol/L}$ nevykazoval významnou toxicitu (Tabulka 12).

Ze studie vztahů struktura–účinek lze vyvodit, že substitucí hydroxylové skupiny se zřejmě aktivita na dopaminergních receptorech sníží [14]. Ostatní farmakodynamická aktivita připravených derivátů bude pravděpodobně velmi podobná bulbokapninu, jelikož prováděné změny nevedly ke vnesení nových strukturních motivů na aporfinový skelet.

Další případné možnosti substituce volné hydroxylové skupiny bulbokapninu jsou široké, připravená sada derivátů je první z plánovaných. Z obdobných výzkumů katedry je však zřejmé, že její esterifikace není vhodná. Krátký plazmatický poločas je důsledkem působení mnoha plazmatických esteráz, příprava etherů je v tomto ohledu racionálnější [143]. Společně s konzultantkou Dr. Maafi jsme na konci naší práce řešili i variantu substituce dusíku, která je také spojena s modulací aktivity derivátů. Výhledově je možné rozšířit připravené *O*-substituované aktivní deriváty o jejich *N*-demethylovaná a následně *N*-substituovaná analoga, a určit, zda jsou tyto změny ve struktuře spojeny s pozitivním ovlivněním biologické aktivity.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] E. Plazas, M. C. Avila M, D. R. Muñoz, a L. E. Cuca S, „Natural isoquinoline alkaloids: Pharmacological features and multi-target potential for complex diseases“, *Pharmacol Res*, roč. 177, bře. 2022, doi: 10.1016/j.phrs.2022.106126.
- [2] N. Kishore, B. B. Mishra, V. Tripathi, a V. K. Tiwari, „Alkaloids as potential anti-tubercular agents“, duben 2009, *Fitoterapia*. doi: 10.1016/j.fitote.2009.01.002.
- [3] B. R. Pinho, F. Ferreres, P. Valentão, a P. B. Andrade, „Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: An approach to Alzheimer’s disease treatment“, prosinec 2013, *J Pharm Pharmacol*. doi: 10.1111/jphp.12081.
- [4] S. S. Bharate, S. Mignani, a R. A. Vishwakarma, „Why Are the Majority of Active Compounds in the CNS Domain Natural Products? A Critical Analysis“, *J Med Chem*, roč. 61, č. 23, s. 10345–10374, pro. 2018, doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01922.
- [5] K. A. Salminen, A. Meyer, L. Jerabkova, L. E. Korhonen, a M. Rahnasto, „Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids“, *Phytomedicine*, roč. 18, č. 6, s. 533–538, dub. 2011, doi: 10.1016/j.phymed.2010.08.012.
- [6] M. Dorogan, H. K. Namballa, a W. W. Harding, „Natural Product-Inspired Dopamine Receptor Ligands“, 8. srpen 2024, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c00537.
- [7] D. J. Newman a G. M. Cragg, „Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019“, *J Nat Prod*, roč. 83, č. 3, s. 770–803, bře. 2020, doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- [8] K. Gajendra, G. K. Pratap, D. V. Poornima, M. Shantaram, a G. Ranjita, „Natural acetylcholinesterase inhibitors: A multi-targeted therapeutic potential in Alzheimer’s disease“, *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, roč. 11, srp. 2024, doi: 10.1016/j.ejmcr.2024.100154.
- [9] D. R. Elmaleh, M. R. Farlow, P. S. Conti, R. G. Tompkins, L. Kundakovic, a R. E. Tanzi, „Developing Effective Alzheimer’s Disease Therapies: Clinical Experience and Future Directions“, *Journal of Alzheimer’s Disease*, roč. 71, č. 3, s. 715–732, srp. 2019, doi: 10.3233/JAD-190507.
- [10] T. P. T. Cushnie, B. Cushnie, a A. J. Lamb, „Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities“, *Int J Antimicrob Agents*, roč. 44, č. 5, s. 377–386, lis. 2014, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001.
- [11] E. P. Gutiérrez-Grijalva, L. X. López-Martínez, L. A. Contreras-Angulo, C. A. Elizalde-Romero, a J. B. Heredia, „Plant Alkaloids: Structures and Bioactive Properties“, *Plant-derived Bioactives*, s. 85–117, čer. 2020, doi: 10.1007/978-981-15-2361-8_5.

- [12] J. Spilková, J. Martin, a T. Siatka, „Farmakognozie". Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016.
- [13] C. Stevigny, C. Bailly, a J. Quetin-Leclercq, „Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids", *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, roč. 5, č. 2, s. 173–182, bře. 2005, doi: 10.2174/1568011053174864.
- [14] R. Zhu, G. Jiang, W. Tang, X. Zhao, a F. Chen, „Aporphines: A privileged scaffold in CNS drug discovery", *Eur J Med Chem*, roč. 256, srp. 2023, doi: 10.1016/j.ejmech.2023.115414.
- [15] H. Guinaudeau, M. Lebœuf, a A. Cavé, „Aporphinoid Alkaloids, V", *J Nat Prod*, roč. 57, č. 8, s. 1033–1135, srp. 1994, doi: 10.1021/np50110a001.
- [16] A. Udvardy, A. Miskovics, a A. Sipos, „Antibacterial aporphinoids - Progress and perspectives based on Structure-Activity analysis", *International Bulletin of Drug Research*, roč. 4, č. 6, s. 1–34, kvě. 2014.
- [17] X. Zhao, Y. Pan, J. Tan, H. Lv, Y. Wang, a D. xia Chen, „Metabolomics and transcriptomics reveal the mechanism of alkaloid synthesis in *Corydalis yanhusuo* bulbs", *PLoS One*, roč. 19, č. 5, kvě. 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0304258.
- [18] C. A. Schenck a H. A. Maeda, „Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants", *Phytochemistry*, roč. 149, s. 82–102, kvě. 2018, doi: 10.1016/j.phytochem.2018.02.003.
- [19] K. M. Herrmann a L. M. Weaver, „The Shikimate pathway", *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, roč. 50, č. 1, s. 473–503, čer. 1999, doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473.
- [20] M. Kanehisa, M. Furumichi, Y. Sato, Y. Matsuura, a M. Ishiguro-Watanabe, „KEGG: biological systems database as a model of the real world", *Nucleic Acids Res*, roč. 53, č. D1, s. D672–D677, led. 2025, doi: 10.1093/nar/gkae909.
- [21] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, a A. Bairoch, „ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis.", *Nucleic Acids Res*, roč. 31, č. 13, s. 3784–8, čvc. 2003, doi: 10.1093/nar/gkg563.
- [22] J. S. Morris a P. J. Facchini, „Isolation and characterization of reticuline *N*-methyltransferase involved in biosynthesis of the aporphine alkaloid magnoflorine in opium poppy", *Journal of Biological Chemistry*, roč. 291, č. 45, s. 23416–23427, lis. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.750893.
- [23] A. P. Deng, Y. Zhang, L. Zhou, C. Z. Kang, a C. G. Lv, „Systematic review of the alkaloid constituents in several important medicinal plants of the Genus *Corydalis*", *Phytochemistry*, roč. 183, bře. 2021, doi: 10.1016/j.phytochem.2020.112644.

- [24] J. Sun, X. Zhan, W. Wang, X. Yang, a Y. Liu, „Natural aporphine alkaloids: A comprehensive review of phytochemistry, pharmacokinetics, anticancer activities, and clinical application", *J Adv Res*, roč. 63, s. 231–253, zář. 2024, doi: 10.1016/j.jare.2023.11.003.
- [25] J.-J. Yang, Y. Chen, M.-L. Guo, a G.-X. Chou, „Chemical constituents from the roots of *Lindera aggregata* and their biological activities", *J Nat Med*, roč. 74, č. 2, s. 441–447, bře. 2020, doi: 10.1007/s11418-019-01385-6.
- [26] A. Hošťálková, L. Opletal, J. Kuneš, Z. Novák, a M. Hrabínová, „Alkaloids from *Peumus boldus* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibition Activity", *Nat Prod Commun*, roč. 10, č. 4, dub. 2015, doi: 10.1177/1934578X1501000410.
- [27] J. Chlebek, K. Macáková, L. Cahlíková, M. Kurfürst, J. Kuneš, a L. Opletal, „Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Corydalis Cava* (Fumariaceae)", *Nat Prod Commun*, roč. 6, č. 5, kvě. 2011, doi: 10.1177/1934578X1100600507.
- [28] A. Adsersen, A. Kjølbye, O. Dall, a A. K. Jäger, „Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort", *J Ethnopharmacol*, roč. 113, č. 1, s. 179–182, srp. 2007, doi: 10.1016/j.jep.2007.05.006.
- [29] D. K. Semwal, R. B. Semwal, I. Vermaak, a A. Viljoen, „From arrow poison to herbal medicine - The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological significance of *Cissampelos* (*Menispermaceae*)", *J Ethnopharmacol*, roč. 155, č. 2, s. 1011–1028, zář. 2014, doi: 10.1016/j.jep.2014.06.054.
- [30] V. Wijaya, O. Jandourek, J. Křoustková, K. Hradiská-Breiterová, a J. Korábečný, „Alkaloids of *Dicranostigma franchetianum* (*Papaveraceae*) and Berberine Derivatives as a New Class of Antimycobacterial Agents", *Biomolecules*, roč. 12, č. 6, s. 844, čer. 2022, doi: 10.3390/biom12060844.
- [31] T. Doncheva, I. Doycheva, a S. Philipov, „Alkaloid chemotypes of *Glaucium flavum* (*Papaveraceae*) from Bulgaria", *Biochem Syst Ecol*, roč. 68, s. 1–5, říj. 2016, doi: 10.1016/j.bse.2016.06.014.
- [32] A. Zahari, A. Ablat, N. Omer, M. A. Nafiah, a Y. Sivasothy, „Ultraviolet-visible study on acid-base equilibria of aporphine alkaloids with antiplasmodial and antioxidant activities from *Alseodaphne corneri* and *Dehaasia longipedicellata*", *Sci Rep*, roč. 6, č. 1, s. 21517, úno. 2016, doi: 10.1038/srep21517.
- [33] Y.-R. Wu, Y.-X. Zhao, Y.-Q. Liu, a J. Zhou, „Isoquinoline Alkaloids from *Corydalis taliensis*", *Zeitschrift für Naturforschung B*, roč. 62, č. 9, s. 1199–1202, zář. 2007, doi: 10.1515/znb-2007-0915.

- [34] H. Sakumoto, Y. Yokota, G. Ishibashi, S. Maeda, a C. Hoshi, „Sinomenine and magnoflorine, major constituents of *Sinomeni Caulis et Rhizoma*, show potent protective effects against membrane damage induced by lysophosphatidylcholine in rat erythrocytes", *J Nat Med*, roč. 69, č. 3, s. 441–448, čvc. 2015, doi: 10.1007/s11418-015-0907-7.
- [35] R.-J. Lin, M.-H. Wu, Y.-H. Ma, L.-Y. Chung, C.-Y. Chen, a C.-M. Yen, „Anthelmintic Activities of Aporphine from *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Rosa-plena against *Hymenolepis nana*", *Int J Mol Sci*, roč. 15, č. 3, s. 3624–3639, úno. 2014, doi: 10.3390/ijms15033624.
- [36] N. Wu, H. Xie, Y. Fang, Y. Liu, a X. Xi, „Isolation and purification of alkaloids from lotus leaves by ionic-liquid-modified high-speed countercurrent chromatography", *J Sep Sci*, roč. 41, č. 2, s. 571–577, led. 2018, doi: 10.1002/jssc.201700851.
- [37] Q. Zhao, Y. Zhao, a K. Wang, „Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* Chen", *J Ethnopharmacol*, roč. 106, č. 3, s. 408–413, čvc. 2006, doi: 10.1016/j.jep.2006.01.019.
- [38] A. Zhang, Y. Zhang, A. R. Branfman, R. J. Baldessarini, a J. L. Neumeyer, „Advances in development of dopaminergic aporphinoids", *J Med Chem*, roč. 50, č. 2, s. 171–181, led. 2007, doi: 10.1021/jm060959i.
- [39] A. B. Casey, M. Cui, R. G. Booth, a C. E. Canal, „“Selective” serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonists", *Biochem Pharmacol*, roč. 200, s. 115028, čer. 2022, doi: 10.1016/j.bcp.2022.115028.
- [40] S. Ponnala, N. Kapadia, S. Madapa, I. L. Alberts, a W. W. Harding, „Synthesis and evaluation of aporphine analogs containing C1 allyl isosteres at the h5-HT_{2A} receptor", *Bioorg Med Chem Lett*, roč. 25, č. 22, s. 5102–5106, lis. 2015, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.10.012.
- [41] A. Chagraoui, F. Thibaut, M. Skiba, C. Thuillez, a M. Bourin, „5-HT_{2C} receptors in psychiatric disorders: A review", *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, roč. 66, s. 120–135, dub. 2016, doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.12.006.
- [42] C. Teng, S. Yu, F. Ko, C. Chen, Y. Huang, a T. Huang, „Dicentrine, a natural vascular α ₁-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*", *Br J Pharmacol*, roč. 104, č. 3, s. 651–656, lis. 1991, doi: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb12484.x.
- [43] H. L. Heng *et al.*, „In vitro functional evaluation of isolaureline, dicentrine and glaucine enantiomers at 5-HT₂ and α ₁ receptors", *Chem Biol Drug Des*, roč. 93, č. 2, s. 132–138, úno. 2019, doi: 10.1111/cbdd.13390.

- [44] W. Chaichompoo, P. Rojsitthisak, W. Pabuprapap, Y. Siriwattanasathien, a P. Yotmanee, „Stephapierrines A–H, new tetrahydroprotoberberine and aporphine alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei* Diels and their anti-cholinesterase activities", *RSC Adv*, roč. 11, č. 34, s. 21153–21169, 2021, doi: 10.1039/D1RA03276C.
- [45] J. W. Dong, L. Cai, X. J. Li, J. P. Wang, R. F. Mei, a Z. T. Ding, „Monoterpene esters and aporphine alkaloids from *Illigera aromatica* with inhibitory effects against cholinesterase and NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages", *Arch Pharm Res*, roč. 40, č. 12, s. 1394–1402, pro. 2017, doi: 10.1007/s12272-016-0860-3.
- [46] X. Li, J. Dong, D. Gan, D. Zhou, a X. Cai, „(-)-Grandiflorimine, a new dibenzopyrrocoline alkaloid with cholinesterase inhibitory activity from *Illigera grandiflora*", *Nat Prod Res*, roč. 35, č. 5, s. 763–769, kvě. 2019, doi: 10.1080/14786419.2019.1608542.
- [47] M. H. Husna Hasnan, Y. Sivasothy, K. Y. Khaw, M. A. Nafiah, a H. Hazni, „*N*-Methyl Costaricine and Costaricine, Two Potent Butyrylcholinesterase Inhibitors from *Alseodaphne pendulifolia* Gamb.", *Int J Mol Sci*, roč. 24, č. 13, čvc. 2023, doi: 10.3390/ijms241310699.
- [48] H. A. Jung, B.-S. Min, T. Yokozawa, J.-H. Lee, Y. S. Kim, a J. S. Choi, „Anti-Alzheimer and Antioxidant Activities of Coptidis Rhizoma Alkaloids", *Biol Pharm Bull*, roč. 32, č. 8, s. 1433–1438, srp. 2009, doi: 10.1248/bpb.32.1433.
- [49] M. F. Cometa, S. Fortuna, G. Palazzino, M. T. Volpe, a E. Rengifo Salgado, „New cholinesterase inhibiting bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*", *Fitoterapia*, roč. 83, č. 3, s. 476–480, dub. 2012, doi: 10.1016/j.fitote.2011.12.015.
- [50] M. Fontes Barbosa, A. Benatti Justino, M. Machado Martins, K. Roberta Anacleto Belaz, a F. Barbosa Ferreira, „Cholinesterase inhibitors assessment of aporphine alkaloids from *Annona crassiflora* and molecular docking studies", *Bioorg Chem*, roč. 120, s. 105593, bře. 2022, doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105593.
- [51] A. P. Kourounakis, D. Galanakis, K. Tsiakitzis, E. A. Rekkas, a P. N. Kourounakis, „Synthesis and pharmacological evaluation of novel derivatives of anti-inflammatory drugs with increased antioxidant and anti-inflammatory activities", *Drug Dev Res*, roč. 47, č. 1, s. 9–16, kvě. 1999, doi: 10.1002/(SICI)1098-2299(199905)47:1<9::AID-DDR2>3.0.CO;2-9.
- [52] L. A. Martínez, J. L. Rios, M. Paya, a M. J. Alcaraz, „Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzylisoquinoline alkaloids", *Free Radic Biol Med*, roč. 12, č. 4, s. 287–292, lis. 1992, doi: 10.1016/0891-5849(92)90116-X.
- [53] B. K. Casselst, M. Asenciot, P. Congets, H. Speisky, L. A. Videlas, a E. A. Lissiii, „Structure-antioxidative activity relationships in benzylisoquinoline alkaloids", *Pharmacol Res*, roč. 31, č. 2, s. 103–107, 1995, doi: 10.1016/1043-6618(95)80054-9.

- [54] C. D. Hufford, A. S. Sharma, a B. O. Oguntimein, „Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids", *J Pharm Sci*, roč. 69, č. 10, s. 1180–1183, říj. 1980, doi: 10.1002/jps.2600691016.
- [55] I. D. la Cruz-Chacón, A. R. González-Esquinca, P. G. Fefer, a L. F. J. Garcia, „Liriodenine, Early Antimicrobial Defence in *Annona diversifolia*", *Zeitschrift für Naturforschung C*, roč. 66, č. 7–8, s. 377–384, srp. 2011, doi: 10.1515/znc-2011-7-809.
- [56] F. G. Avci, N. A. Sayar, a B. Sariyar Akbulut, „An OMIC approach to elaborate the antibacterial mechanisms of different alkaloids", *Phytochemistry*, roč. 149, s. 123–131, kvě. 2018, doi: 10.1016/j.phytochem.2017.12.023.
- [57] A. Makarasen, W. Sirithana, S. Mogkhuntod, N. Khunnawutmanotham, N. Chimnoi, a S. Techasakul, „Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Aporphine Alkaloids Isolated from *Stephania venosa* (Blume) Spreng", *Planta Med*, roč. 77, č. 13, s. 1519–1524, zář. 2011, doi: 10.1055/s-0030-1270743.
- [58] M. Iranshahy, R. J. Quinn, a M. Iranshahi, „Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*", *RSC Adv*, roč. 4, č. 31, s. 15900–15913, dub. 2014, doi: 10.1039/c3ra47944g.
- [59] S. Hoet, C. Stévigny, S. Block, F. Opperdoes, a P. Colson, „Alkaloids from *Cassytha filiformis* and Related Aporphines: Antitrypanosomal Activity, Cytotoxicity, and Interaction with DNA and Topoisomerases", *Planta Med*, roč. 70, č. 5, s. 407–413, kvě. 2004, doi: 10.1055/s-2004-818967.
- [60] Y. Liu, J. Liu, D. Di, M. Li, a Y. Fen, „Structural and Mechanistic Bases of the Anticancer Activity of Natural Aporphinoid Alkaloids", *Curr Top Med Chem*, roč. 13, č. 17, s. 2116–2126, zář. 2013, doi: 10.2174/15680266113139990147.
- [61] V. Preininger, R. S. Thakur, a F. Šantav, „Isolation and chemistry of alkaloids from plants of the family *Papaveraceae* LXVII: *Corydalis cava* (L.) Sch. et K. (*C. tuberosa* DC)", *J Pharm Sci*, roč. 65, č. 2, s. 294–296, úno. 1976, doi: 10.1002/jps.2600650230.
- [62] M. Freund a W. Josephy, „Ueber die Alkaloide, welche in der Wurzel von *Corydalis cava* (Schwgg.) enthalten sind", *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, roč. 25, č. 2, s. 2411–2415, čvc. 1892, doi: 10.1002/cber.18920250237.
- [63] H. Guinaudeau, M. Leboeuf, a A. Cavé, „Aporphinoid Alkaloids, IV", *J Nat Prod*, roč. 51, č. 3, s. 389–474, kvě. 1988, doi: 10.1021/np50057a001.
- [64] I. Kikkawa, „Synthesis of Bulbocapnine", *Yakugaku Zasshi*, roč. 79, č. 10, s. 1244–1248, 1959, doi: 10.1248/yakushi1947.79.10_1244.

- [65] E. Giorgio, R. G. Viglione, a C. Rosini, „Assignment of the absolute configuration of large molecules by ab initio calculation of the rotatory power within a small basis set scheme: the case of some biologically active natural products", *Tetrahedron Asymmetry*, roč. 15, č. 13, s. 1979–1986, čvc. 2004, doi: 10.1016/j.tetasy.2004.05.023.
- [66] B. Ribár, C. Mészáros, O. Gašić, I. Kanyó, a P. Engel, „Structure of bulbocapnine", *Acta Crystallogr C*, roč. 47, č. 12, s. 2612–2614, pro. 1991, doi: 10.1107/S0108270191006480.
- [67] T. Fakouhi, T. D. Darby, a R. S. McCutcheon, „Cardiovascular Effects of Bulbocapnine", *J Pharm Sci*, roč. 60, č. 7, s. 1045–1048, čvc. 1971, doi: 10.1002/jps.2600600709.
- [68] R. G. Pendleton, E. Finlay, a S. Sherman, „Effect of bulbocapnine as a peripheral dopamine receptor antagonists in the anesthetized cat", *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, roč. 289, č. 2, s. 171–178, čer. 1975, doi: 10.1007/BF00501304.
- [69] M. S. Parvin, M. Hrubša, J. Fadraersada, A. Carazo, a J. Karličková, „Can Isoquinoline Alkaloids Affect Platelet Aggregation in Whole Human Blood?", *Toxins (Basel)*, roč. 14, č. 7, čvc. 2022, doi: 10.3390/toxins14070491.
- [70] A. Ubeda, C. Montesinos, M. Payh, a M. J. Alcaraz, „Iron-reducing and free-radical-scavenging properties of apomorphine and some related benzyloisoquinolines", *Free Radic Biol Med*, roč. 15, č. 2, s. 159–167, 1993, doi: 10.1016/0891-5849(93)90055-Y.
- [71] M. S. Parvin, J. Chlebek, A. Hošťálková, M. C. Catapano, a Z. Lomozová, „Interactions of Isoquinoline Alkaloids with Transition Metals Iron and Copper", *Molecules*, roč. 27, č. 19, říj. 2022, doi: 10.3390/molecules27196429.
- [72] S. H. Woo, N.-J. Sun, J. M. Cassady, a R. M. Snapka, „Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids", *Biochem Pharmacol*, roč. 57, č. 10, s. 1141–1145, kvě. 1999, doi: 10.1016/S0006-2952(99)00018-0.
- [73] I. Orhan, B. Özçelik, T. Karaoğlu, a B. Şener, „Antiviral and Antimicrobial Profiles of Selected Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* Species", *Zeitschrift für Naturforschung C*, roč. 62, č. 1–2, s. 19–26, led. 2007, doi: 10.1515/znc-2007-1-204.
- [74] Z.-X. Qing, P. Yang, Q. Tang, P. Cheng, a X.-B. Liu, „Isoquinoline Alkaloids and Their Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Activities and Structure-activity Relationship", *Curr Org Chem*, roč. 21, č. 18, říj. 2017, doi: 10.2174/1385272821666170207114214.
- [75] S. Zhou, Y. Gao, W. Jiang, M. Huang, A. Xu, a J. W. Paxton, „Interactions of Herbs with Cytochrome P450", *Drug Metab Rev*, roč. 35, č. 1, s. 35–98, led. 2003, doi: 10.1081/DMR-120018248.

- [76] D. F. Lewis, „57 Varieties: The Human Cytochromes P450", *Pharmacogenomics*, roč. 5, č. 3, s. 305–318, dub. 2004, doi: 10.1517/phgs.5.3.305.29827.
- [77] J. Hardy a D. J. Selkoe, „The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics", *Science (1979)*, roč. 297, č. 5580, s. 353–356, čvc. 2002, doi: 10.1126/science.1072994.
- [78] R. B. Maccioni, G. Farias, I. Morales, a L. Navarrete, „The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease", *Arch Med Res*, roč. 41, č. 3, s. 226–231, dub. 2010, doi: 10.1016/j.arcmed.2010.03.007.
- [79] S. F. McHardy, H.-Y. L. Wang, S. V. McCowen, a M. C. Valdez, „Recent advances in acetylcholinesterase Inhibitors and Reactivators: an update on the patent literature (2012-2015)", *Expert Opin Ther Pat*, roč. 27, č. 4, s. 455–476, dub. 2017, doi: 10.1080/13543776.2017.1272571.
- [80] M. R. Picciotto, M. J. Higley, a Y. S. Mineur, „Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior", *Neuron*, roč. 76, č. 1, s. 116–129, říj. 2012, doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.036.
- [81] T. H. Ferreira-Vieira, I. M. Guimaraes, F. R. Silva, a F. M. Ribeiro, „Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System", *Curr Neuropharmacol*, roč. 14, č. 1, s. 101–115, led. 2016, doi: 10.2174/1570159X13666150716165726.
- [82] Z.-R. Chen, J.-B. Huang, S.-L. Yang, a F.-F. Hong, „Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease", *Molecules*, roč. 27, č. 6, s. 1816, bře. 2022, doi: 10.3390/molecules27061816.
- [83] G. Marucci, M. Buccioni, D. D. Ben, C. Lambertucci, R. Volpini, a F. Amenta, „Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease", *Neuropharmacology*, roč. 190, s. 108352, čer. 2021, doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108352.
- [84] H. Hampel, M.-M. Mesulam, A. C. Cuello, M. R. Farlow, a E. Giacobini, „The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease", *Brain*, roč. 141, č. 7, s. 1917–1933, čvc. 2018, doi: 10.1093/brain/awy132.
- [85] J. J. Ramos-Rodriguez, M. Pacheco-Herrero, D. Thyssen, M. I. Murillo-Carretero, a E. Berrocoso, „Rapid β -Amyloid Deposition and Cognitive Impairment After Cholinergic Denervation in APP/PS1 Mice", *J Neuropathol Exp Neurol*, roč. 72, č. 4, s. 272–285, dub. 2013, doi: 10.1097/NEN.0b013e318288a8dd.
- [86] H.-C. Huang a Z.-F. Jiang, „Accumulated Amyloid- β Peptide and Hyperphosphorylated Tau Protein: Relationship and Links in Alzheimer's Disease", *Journal of Alzheimer's Disease*, roč. 16, č. 1, s. 15–27, led. 2009, doi: 10.3233/JAD-2009-0960.

- [87] V. Calsolaro a P. Edison, „Neuroinflammation in Alzheimer’s disease: Current evidence and future directions“, *Alzheimer’s & Dementia*, roč. 12, č. 6, s. 719–732, čer. 2016, doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.010.
- [88] H. Akiyama, „Inflammation and Alzheimer’s disease“, *Neurobiol Aging*, roč. 21, č. 3, s. 383–421, čer. 2000, doi: 10.1016/S0197-4580(00)00124-X.
- [89] A. Deshpande, E. Mina, C. Glabe, a J. Busciglio, „Different Conformations of Amyloid β Induce Neurotoxicity by Distinct Mechanisms in Human Cortical Neurons“, *The Journal of Neuroscience*, roč. 26, č. 22, s. 6011–6018, kvě. 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1189-06.2006.
- [90] W. J. Jansen, R. Ossenkoppele, D. L. Knol, B. M. Tijms, a P. Scheltens, „Prevalence of Cerebral Amyloid Pathology in Persons Without Dementia“, *JAMA*, roč. 313, č. 19, s. 1924, kvě. 2015, doi: 10.1001/jama.2015.4668.
- [91] M. C. Dinamarca, J. P. Sagal, R. A. Quintanilla, J. A. Godoy, M. S. Arrázola, a N. C. Inestrosa, „Amyloid- β -Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the A β peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer’s disease“, *Mol Neurodegener*, roč. 5, č. 1, s. 4, pro. 2010, doi: 10.1186/1750-1326-5-4.
- [92] A. Alvarez, R. Alarcón, C. Opazo, E. O. Campos, a F. J. Muñoz, „Stable Complexes Involving Acetylcholinesterase and Amyloid- β Peptide Change the Biochemical Properties of the Enzyme and Increase the Neurotoxicity of Alzheimer’s Fibrils“, *The Journal of Neuroscience*, roč. 18, č. 9, s. 3213–3223, kvě. 1998, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-09-03213.1998.
- [93] N. C. Inestrosa, J. P. Sagal, a M. Colombres, „Acetylcholinesterase Interaction with Alzheimer Amyloid β “, in *Alzheimer’s Disease*, Springer US, s. 299–317. doi: 10.1007/0-387-23226-5_15.
- [94] N. C. Inestrosa, M. C. Dinamarca, a A. Alvarez, „Amyloid–cholinesterase interactions“, *FEBS J*, roč. 275, č. 4, s. 625–632, úno. 2008, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06238.x.
- [95] A. Alvarez, C. Opazo, R. Alarcón, J. Garrido, a N. C. Inestrosa, „Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid- β -peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils“, *J Mol Biol*, roč. 272, č. 3, s. 348–361, zář. 1997, doi: 10.1006/jmbi.1997.1245.
- [96] M.-L. Campanari, M.-S. García-Ayllón, O. Belbin, J. Galcerán, A. Lleó, a J. Sáez-Valero, „Acetylcholinesterase Modulates Presenilin-1 Levels and γ -Secretase Activity“, *Journal of Alzheimer’s Disease*, roč. 41, č. 3, s. 911–924, čvc. 2014, doi: 10.3233/JAD-140426.

- [97] A. Martorana, Z. Esposito, a G. Koch, „Beyond the Cholinergic Hypothesis: Do Current Drugs Work in Alzheimer’s Disease?”, *CNS Neurosci Ther*, roč. 16, č. 4, s. 235–245, srp. 2010, doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00175.x.
- [98] J.-P. Brion, „Neurofibrillary Tangles and Alzheimer’s Disease”, *Eur Neurol*, roč. 40, č. 3, s. 130–140, říj. 1998, doi: 10.1159/000007969.
- [99] M. Wong-Guerra, C. Calfio, R. B. Maccioni, a L. E. Rojo, „Revisiting the neuroinflammation hypothesis in Alzheimer’s disease: a focus on the druggability of current targets”, *Front Pharmacol*, roč. 14, čer. 2023, doi: 10.3389/fphar.2023.1161850.
- [100] M. T. Heneka, W. M. van der Flier, F. Jessen, J. Hoozemans, a D. R. Thal, „Neuroinflammation in Alzheimer disease”, *Nat Rev Immunol*, pro. 2024, doi: 10.1038/s41577-024-01104-7.
- [101] J. A. Fernández, L. Rojo, R. O. Kuljis, a R. B. Maccioni, „The Damage Signals Hypothesis of Alzheimer’s Disease Pathogenesis”, *Journal of Alzheimer’s Disease*, roč. 14, č. 3, s. 329–333, čer. 2008, doi: 10.3233/JAD-2008-14307.
- [102] I. Morales, L. Guzmán-Martínez, C. Cerda-Troncoso, G. A. Farías, a R. B. Maccioni, „Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches”, *Front Cell Neurosci*, roč. 8, dub. 2014, doi: 10.3389/fncel.2014.00112.
- [103] J. Guo, J. Yu, D. Grass, F. C. de Beer, a M. S. Kindy, „Inflammation-Dependent Cerebral Deposition of Serum Amyloid A Protein in a Mouse Model of Amyloidosis”, *The Journal of Neuroscience*, roč. 22, č. 14, s. 5900–5909, čvc. 2002, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-14-05900.2002.
- [104] D. J. DiSabato, N. Quan, a J. P. Godbout, „Neuroinflammation: the devil is in the details”, *J Neurochem*, roč. 139, č. S2, s. 136–153, říj. 2016, doi: 10.1111/jnc.13607.
- [105] B. V. Zlokovic, „Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer’s disease and other disorders”, *Nat Rev Neurosci*, roč. 12, č. 12, s. 723–738, pro. 2011, doi: 10.1038/nrn3114.
- [106] I. Orhan, B. Şener, M. I. Choudhary, a A. Khalid, „Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants”, *J Ethnopharmacol*, roč. 91, č. 1, s. 57–60, bře. 2004, doi: 10.1016/j.jep.2003.11.016.
- [107] L. Pouryamout, J. Dams, J. Wasem, R. Dodel, a A. Neumann, „Economic Evaluation of Treatment Options in Patients with Alzheimer’s Disease”, *Drugs*, roč. 72, č. 6, s. 789–802, dub. 2012, doi: 10.2165/11631830-000000000-00000.
- [108] R. A. Hansen, G. Gartlehner, A. P. Webb, a L. C. Morgan, „Clinical Interventions in Aging Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer’s disease: A systematic review and meta-analysis”, *Clin Interv Aging*, roč. 3, č. 2, s. 211–225, říj. 2008, doi: 10.2147/cia.S12159936.

- [109] Z. Huo, J. Lin, B. K. K. Bat, T. K. Chan, B. H. K. Yip, a K. K. F. Tsoi, „Cost-effectiveness of pharmacological therapies for people with Alzheimer’s disease and other dementias: a systematic review and meta-analysis“, *Cost Effectiveness and Resource Allocation*, roč. 20, č. 1, s. 19, pro. 2022, doi: 10.1186/s12962-022-00354-3.
- [110] V. Jelic a B. Winblad, „Donepezil and nursing home placement – benefits and costs“, *Nat Rev Neurol*, roč. 12, č. 1, s. 11–13, led. 2016, doi: 10.1038/nrneuro.2015.237.
- [111] D. A. Greenberg a K. Jin, „From angiogenesis to neuropathology“, *Nature*, roč. 438, č. 7070, s. 954–959, pro. 2005, doi: 10.1038/nature04481.
- [112] H. D. Larkin, „Lecanemab Gains FDA Approval for Early Alzheimer Disease“, *JAMA*, roč. 329, č. 5, s. 363, úno. 2023, doi: 10.1001/jama.2022.24490.
- [113] B. Dunn, P. Stein, a P. Cavazzoni, „Approval of Aducanumab for Alzheimer Disease – The FDA’s Perspective“, *JAMA Intern Med*, roč. 181, č. 10, s. 1276, říj. 2021, doi: 10.1001/jamainternmed.2021.4607.
- [114] I. Yakushev, A. Verger, M. Brendel, D. Cecchin, a P. A. Fernandez, „Lecanemab approval in EU: what should we be ready for?– the EANM perspective“, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, roč. 52, č. 5, s. 1607–1610, dub. 2025, doi: 10.1007/s00259-025-07066-9.
- [115] S. A. Small a K. Duff, „Linking A β and Tau in Late-Onset Alzheimer’s Disease: A Dual Pathway Hypothesis“, *Neuron*, roč. 60, č. 4, s. 534–542, lis. 2008, doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.007.
- [116] M. M. Varnum a T. Ikezu, „The Classification of Microglial Activation Phenotypes on Neurodegeneration and Regeneration in Alzheimer’s Disease Brain“, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, roč. 60, č. 4, s. 251–266, srp. 2012, doi: 10.1007/s00005-012-0181-2.
- [117] A. García, V. Bocanegra-García, J. P. Palma-Nicolás, a G. Rivera, „Recent advances in antitubercular natural products“, *Eur J Med Chem*, roč. 49, s. 1–23, bře. 2012, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.12.029.
- [118] T. Wirth, F. Hildebrand, C. Allix-Béguet, F. Wölbeling, a T. Kubica, „Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium tuberculosis Complex“, *PLoS Pathog*, roč. 4, č. 9, s. e1000160, zář. 2008, doi: 10.1371/journal.ppat.1000160.
- [119] C. M. Gill, L. Dolan, L. M. Piggott, a A. M. McLaughlin, „New developments in tuberculosis diagnosis and treatment“, *Breathe*, roč. 18, č. 1, s. 210149, bře. 2022, doi: 10.1183/20734735.0149-2021.
- [120] J. Han, X. Liu, L. Zhang, R. J. Quinn, a Y. Feng, „Anti-mycobacterial natural products and mechanisms of action“, *Nat Prod Rep*, roč. 39, č. 1, s. 77–89, led. 2022, doi: 10.1039/d1np00011j.

- [121] S. K. Mishra, G. Tripathi, N. Kishore, R. K. Singh, A. Singh, a V. K. Tiwari, „Drug development against tuberculosis: Impact of alkaloids", *Eur J Med Chem*, roč. 137, s. 504–544, zář. 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.06.005.
- [122] F. Barbosa, E. Pinto, A. Kijjoa, M. Pinto, a E. Sousa, „Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products", *Int J Antimicrob Agents*, roč. 56, č. 1, s. 106005, čvc. 2020, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106005.
- [123] H. J. Jafaar, O. Isbilen, E. Volkan, a G. Sariyar, „Alkaloid profiling and antimicrobial activities of *Papaver glaucum* and *P. decaisnei*", *BMC Res Notes*, roč. 14, č. 1, s. 348, pro. 2021, doi: 10.1186/s13104-021-05762-x.
- [124] S. A. Senobar Tahaei, A. Stájer, I. Barrak, E. Ostorházi, D. Szabó, a M. Gajdács, „Correlation Between Biofilm-Formation and the Antibiotic Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus* Isolates: A Laboratory-Based Study in Hungary and a Review of the Literature", *Infect Drug Resist*, roč. Volume 14, s. 1155–1168, bře. 2021, doi: 10.2147/IDR.S303992.
- [125] F. Nourbakhsh, M. Lotfalizadeh, M. Badpeyma, A. Shakeri, a V. Soheili, „From plants to antimicrobials: Natural products against bacterial membranes", *Phytotherapy Research*, roč. 36, č. 1, s. 33–52, led. 2022, doi: 10.1002/ptr.7275.
- [126] F. Nourbakhsh, M. E. Kashi, a A. Shakeri, „Natural products against gram-negative bacteria: promising antimicrobials in future complementary medicine", *Phytochemistry Reviews*, zář. 2024, doi: 10.1007/s11101-024-10012-6.
- [127] N. Long a F. Li, „Antifungal Mechanism of Natural Products Derived from Plants: A Review", *Nat Prod Commun*, roč. 19, č. 8, srp. 2024, doi: 10.1177/1934578X241271747.
- [128] K. Pianalto a J. Alspaugh, „New Horizons in Antifungal Therapy", *Journal of Fungi*, roč. 2, č. 4, s. 26, říj. 2016, doi: 10.3390/jof2040026.
- [129] G. Suleyman a G. J. Alangaden, „Nosocomial Fungal Infections", *Infect Dis Clin North Am*, roč. 35, č. 4, s. 1027–1053, pro. 2021, doi: 10.1016/j.idc.2021.08.002.
- [130] L. Scorzoni, T. Benaducci, A. M. F. Almeida, D. H. S. Silva, V. da S. Bolzani, a M. J. S. M. Gianinni, „The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp", *Brazilian Journal of Microbiology*, roč. 38, č. 3, s. 391–397, zář. 2007, doi: 10.1590/S1517-83822007000300001.
- [131] A. Zida, S. Bamba, A. Yacouba, R. Ouedraogo-Traore, a R. T. Guiguemdé, „Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review", *J Mycol Med*, roč. 27, č. 1, s. 1–19, bře. 2017, doi: 10.1016/j.mycmed.2016.10.002.

- [132] S. A. Zacchino, E. Butassi, E. Cordisco, a L. A. Svetaz, „Hybrid combinations containing natural products and antimicrobial drugs that interfere with bacterial and fungal biofilms", *Phytomedicine*, roč. 37, s. 14–26, pro. 2017, doi: 10.1016/j.phymed.2017.10.021.
- [133] J. R. Perfect, „The antifungal pipeline: a reality check", *Nat Rev Drug Discov*, roč. 16, č. 9, s. 603–616, zář. 2017, doi: 10.1038/nrd.2017.46.
- [134] M. Aldholmi, P. Marchand, I. Ourliac-Garnier, P. Le Pape, a A. Ganesan, „A Decade of Antifungal Leads from Natural Products: 2010–2019", *Pharmaceuticals*, roč. 12, č. 4, s. 182, pro. 2019, doi: 10.3390/ph12040182.
- [135] F. Barbosa, E. Pinto, A. Kijjoo, M. Pinto, a E. Sousa, „Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products", *Int J Antimicrob Agents*, roč. 56, č. 1, s. 106005, čvc. 2020, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106005.
- [136] D. Jakubczyk a F. Dussart, „Selected Fungal Natural Products with Antimicrobial Properties", *Molecules*, roč. 25, č. 4, s. 911, úno. 2020, doi: 10.3390/molecules25040911.
- [137] J. Chlebek, K. Macáková, L. Cahlíková, M. Kurfürst, J. Kuneš, a L. Opletal, „Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Corydalis cava* (*Fumariaceae*)".
- [138] J. McMurry, „Organic Chemistry, 8th Edition", *Belmont, CA : Brooks Cole/Cengage Learning, 2012.*, s. 1376, 2012.
- [139] F. Pidany, J. Kroustkova, J. Jenco, K. H. Breiterova, a L. Muckova, „Carltonine-derived compounds for targeted butyrylcholinesterase inhibition", *RSC Med Chem*, roč. 15, č. 5, s. 1601–1625, bře. 2024, doi: 10.1039/D4MD00060A.
- [140] R. Dasari, L. M. Y. Banuls, M. Masi, S. C. Pelly, a V. Mathieu, „C1,C2-ether derivatives of the Amaryllidaceae alkaloid lycorine: Retention of activity of highly lipophilic analogues against cancer cells", *Bioorg Med Chem Lett*, roč. 24, č. 3, s. 923–927, úno. 2014, doi: 10.1016/j.bmcl.2013.12.073.
- [141] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, a R. M. Featherstone, „A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochem Pharmacol*, roč. 7, č. 2, s. 88–95, čvc. 1961, doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- [142] A. Al Mamun, F. Pidany, D. Hulcová, J. Maříková, a T. Kučera, „Amaryllidaceae Alkaloids of Norbelladine-Type as Inspiration for Development of Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Biological Activity Evaluation, and Docking Studies", *Int J Mol Sci*, roč. 22, č. 15, s. 8308, srp. 2021, doi: 10.3390/ijms22158308.

- [143] N. Maafi, A. Al Mamun, O. Jand'ourek, J. Maříková, a K. Breiterová, „Semisynthetic Derivatives of Selected Amaryllidaceae Alkaloids as a New Class of Antimycobacterial Agents", *Molecules*, roč. 26, č. 19, s. 6023, říj. 2021, doi: 10.3390/molecules26196023.
- [144] D. E. Nawrot, G. Bouz, O. Jand'ourek, K. Konečná, a P. Paterová, „Antimycobacterial pyridine carboxamides: From design to in vivo activity", *Eur J Med Chem*, roč. 258, s. 115617, říj. 2023, doi: 10.1016/j.ejmech.2023.115617.
- [145] T. Mosmann, „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods*, roč. 65, č. 1–2, s. 55–63, pro. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [146] A. Bairoch, „The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource", *J Biomol Tech*, roč. 29, č. 2, s. 25–38, čvc. 2018, doi: 10.7171/jbt.18-2902-002.
- [147] D. Koutova, N. Maafi, D. Muthna, K. Kralovec, a J. Kroustkova, „Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Amaryllidaceae alkaloid montanine on A549 and MOLT-4 human cancer cells", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, roč. 166, s. 115295, říj. 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.115295.
- [148] R. Raghuvanshi, A. Jamwal, U. Nandi, a S. B. Bharate, „Multitargeted C9-substituted ester and ether derivatives of berberrubine for Alzheimer's disease: Design, synthesis, biological evaluation, metabolic stability, and pharmacokinetics", *Drug Dev Res*, roč. 84, č. 1, s. 121–140, úno. 2023, doi: 10.1002/ddr.22017.
- [149] M. Gupta, H. J. Lee, C. J. Barden, a D. F. Weaver, „The Blood-Brain Barrier (BBB) Score", *J Med Chem*, roč. 62, č. 21, s. 9824–9836, lis. 2019, doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01220.