

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Aneta Šnejdarová

Vliv rostlinných alkaloidů na virovou infekci

Impact of plant alkaloids on viral infection

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lenka Horníková, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 06.05.2021

Aneta Šnejdarová

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Lence Horníkové, Ph.D. za velkou trpělivost a ochotu, se kterou mi byla nápomocna při vypracování bakalářské práce.

Abstrakt

Rostlinné produkty jsou již odpradáвна využívány k léčení různých chorob díky mnohým aktivním látkám, které obsahují. Jednou takovou skupinou látek jsou alkaloidy. Alkaloidy jsou látky biologicky aktivní, které kromě antimikrobiálních, anti-inflamatorních, antioxidačních a mnohých dalších vlastností vykazují také vlastnosti antivirotické. Díky tomu mohou pomoci léčit virové infekce, které jsou i v dnešní době velkým medicínálním problémem. Alkaloidy působí na všechny kroky replikace viru, a to jak na komponenty virové, tak především procesy buněčné, bez kterých není možný úspěšný průběh virového cyklu. V souvislosti s léčbou virových infekcí byly nejlépe prozkoumány alkaloidy tropanové, troponolové, purinové a isochinolinové, kterými se také zabývá tato práce. Tropanový alkaloid atropin působí především na obalené viry díky schopnosti měnit vlastnosti biologických membrán. Purinový alkaloid kofein díky schopnosti inhibovat buněčný enzym fosfodiesterasu, způsobuje nárůst intracelulární hladiny cAMP a to má dopad na virovou replikaci. Pro léčbu jsou přínosné i jeho vlastnosti antioxidační a imunomodulační. Protizánětlivé účinky tropanového alkaloidu kolchicinu pramení ze schopnosti inhibovat dynamiku buněčných mikrotubulů. Díky tomu nejen že brání sekreci prozánětlivých cytokinů prostřednictvím inhibice skládání a aktivaci inflamasomu a intracelulárního transportu váčků, ale také ovlivňuje motilitu a chemotaxi leukocytů. Díky těmto protizánětlivým vlastnostem by se mohl uplatnit v léčbě nového onemocnění COVID-19. Isochinolinový alkaloid papaverin má stejně jako kofein schopnost inhibovat buněčnou fosfodiesterasu. Kromě toho inhibuje transkripci a fosforylaci virových proteinů. Navíc snižuje fosforylaci komponent buněčné signalizační MAPK/ERK dráhy, čímž narušuje jaderný export virového ribonukleoproteinu a tím i množení viru chřipky. Další isochinolinový alkaloid berberin též neinteraguje přímo s komponentami viru, ale redukuje virem indukovanou signalisaci. Jeho působením dochází ke snížení fosforylace MAP kinasových drah. Všechny tyto mechanismy mohou nalézt uplatnění v léčbě virových nemocí, a to především těch, proti jejichž původcům dosud neexistují účinné léky nebo očkování, či kde hrozí rozvoj rezistence. Proto má výzkum rostlinných alkaloidů velký potenciál ve zlepšení léčby virových onemocnění.

Klíčová slova: berberin, papaverin, kolchicin, kofein, atropin, rostlinné produkty, alkaloidy, viry, antivirotika

Abstract

Plant products have been used to treat various diseases since ancient times thanks to the many active substances they contain. One such group of substances are alkaloids. Alkaloids are biologically active substances which, in addition to antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and many other properties, also possess antiviral properties. As a result, they can help treat viral infections, which are still a major medical problem today. Alkaloids affect all steps of virus replication, both viral components but especially cellular processes, without which a successful progress of viral cycle is not possible. In connection with the treatment of viral infections, the tropane, troponol, purine and isoquinoline alkaloids have been best investigated, which are also the subject of this work. The tropane alkaloid atropine acts mainly on enveloped viruses due to its ability to change the properties of biological membranes. Purine alkaloid caffeine, thanks to its ability to inhibit the cellular enzyme phosphodiesterase, causes an increase in intracellular cAMP levels and it has an impact on viral replication. Its antioxidant and immunomodulatory properties are also beneficial for the treatment. The anti-inflammatory effects of the tropane alkaloid colchicine stem from its ability to inhibit the dynamics of cellular microtubules. As a result, it not only prevents the secretion of proinflammatory cytokines by inhibiting the folding and activation of the inflammasome and the intracellular transport of vesicles, but also affects the motility and chemotaxis of leukocytes. Because of these anti-inflammatory properties, it could be used for the treatment of the new COVID-19 disease. Like caffeine, the isoquinoline alkaloid papaverine has the ability to inhibit cellular phosphodiesterase. In addition, it inhibits the transcription and phosphorylation of viral proteins. It also reduces the phosphorylation of components of the cellular signaling MAPK/ERK pathway, thereby disrupting the nuclear export of viral ribonucleoprotein and thus the replication of the influenza virus. Another isoquinoline alkaloid, berberine, also does not interact directly with virus components, but suppresses virus-induced signaling. It reduces the phosphorylation of MAP kinase pathways. All of these mechanisms may find application in the treatment of viral diseases, especially those for which we do not yet have effective drugs or vaccinations, or where there is a risk of developing resistance. Therefore, research on plant alkaloids has great potential in improving the treatment of viral diseases.

Key words: berberine, papaverine, colchicine, caffeine, atropine, plant products, alkaloids, viruses, antivirals

Seznam zkratek

ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
BMDM	murine bone marrow derived macrophages / myši makrofágy odvozené z kostní dřeně
<i>BZLF1</i>	transkripční aktivátor EBV (BamHI Z fragment leftward open reading frame 1)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNS	central nervous system / centrální nervová soustava
COVID-19	coronavirus disease 2019
COX-2	cyklooxygenasa-2
CTGF	connective tissue growth factor / růstový faktor pojivové tkáně
CVB3	coxsackievirus B3 (<i>Picornaviridae</i>)
E2F	eukaryotický transkripční faktor
E6, E7	proteiny HPV
EBNA 1	Epstein-Barr nuclear antigen 1
EBV	virus Epstein-Barrové (<i>Herpesviridae</i>)
ERK	extracellular signal-regulated kinase
gB, gE, gD	glykoprotein B, E, D (HSV)
HA	hemagglutinin
HAV	virus hepatitidy A (<i>Picornaviridae</i>)
HCC	hepatocellular carcinoma / hepatocelulární karcinom
HCMV	lidský cytomegalovirus (<i>Herpesviridae</i>)
HCV	virus hepatitidy C (<i>Flaviviridae</i>)
HIV	human immunodeficiency virus / virus lidské imunitní nedostatečnosti (<i>Retroviridae</i>)
HN a F0	glykoproteiny (viru Sendai)
HPV	lidský papillomavirus (<i>Papillomaviridae</i>)
HSV	herpes simplex virus (<i>Herpesviridae</i>)
CHIKV	Chikungunya virus (<i>Togaviridae</i>)
IFN- α	interferon α
IFN- β 1	interferon β 1
IFN- γ	interferon γ
IgG	immunoglobulin G
IL-1...IL-18	interleukin 1 ... interleukin 18
I κ B	inhibitor NF- κ B
JAK-STAT	Janus kinase (JAK) + signal transducer and activator of transcription proteins (STAT)
JEV	virus Japonské encefalitidy (<i>Flaviviridae</i>)
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LMP	latent membrane proteins / latentní membránové proteiny EBV
M	matrixový protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAVS	Mitochondrial Antiviral Signaling Protein
MCMV	myši cytomegalovirus (<i>Herpesviridae</i>)
MCP-1	monocyte-specific chemoattractant / specifický chemoatraktant pro monocyty
MDCK	Madin–Darby canine kidney cells / Madin–Darby psí ledvinné buňky
MEK	MAPK/ERK kinase
MERS-CoV	Middle east respiratory syndrome coronavirus (<i>Coronaviridae</i>)
MOI	multiplicity of infection / multiplicita infekce
NA	neuraminidasa
NCP	nasopharyngeal carcinoma / rakovinu nosohltanu
NF- κ B	nuclear factor κ -lightchain enhancer of activated B-cells
NLRP3	Nucleotide-binding oligomerization domain Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing
NOD/SCID	non-obese diabetic/severe-combined immunodeficient mouse
NP	nukleokapsidový protein
NS1, NS2	nestruturní proteiny RSV
NS3	nestruturní protein JEV
NS5A, NS5B	nestruturní proteiny HCV
P	polymerasa
p.i.	po infekci

p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
pRb	retinoblastomový protein
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I
RNP	ribonukleoprotein
RSV	respirační syncytiální virus (<i>Paramyxoviridae</i>)
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (<i>Coronaviridae</i>)
SSPE	subacute sclerosing panencephalitis / subakutní sklerózující panencefalitida
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TGF- β	transforming growth factor β / transformující růstový faktor β
TLR-3	Toll-like receptor-3
TLR-4	Toll-like receptor 4
TLR-7	Toll-like receptor 7
TNF- α	tumor necrosis factor- α / faktor nádorové nekrosy α
U0126	inhibitor MAPK/ERK dráhy
ZIKV	Zika virus (<i>Flaviviridae</i>)

Obsah

Seznam zkratek.....	6
1 Úvod.....	1
2 Alkaloidy.....	2
3 Tropanové alkaloidy.....	3
3.1 Atropin.....	3
4 Purinové alkaloidy.....	5
4.1 Kofein.....	6
5 Troponolové alkaloidy.....	10
5.1 Kolchicin.....	10
6 Isochinolinové alkaloidy.....	17
6.1 Papaverin.....	18
6.2 Berberin.....	24
7 Závěr.....	34
8 Seznam literatury.....	35

1 Úvod

Rostliny jsou pro lidstvo již od pradávna nejen zdrojem potravy, ale i prostředkem k léčení chorob a zdrojem různých aktivních látek. Rostlinná léčba provází lidskou rasu od počátků civilizace. Ačkoli lidé v dávných dobách netušili, jaké konkrétní účinné látky se v daných rostlinách nachází, jejich použití bylo vyzkoušeno a ověřeno generacemi. Dodnes jsou na využití léčivých látek pocházejících z rostlin postaveny čínská, ayurvédská a další tradiční medicíny. I když by se mohlo zdát, že západní medicína od využití léčivých látek pocházejících z rostlin zdánlivě ustoupila, není tomu tak. Většina léků vychází z původně přírodních látek, ačkoli dnes často uměle vyráběných. Například 60 % látek užívaných k léčbě nádorových onemocnění jsou přírodního původu. Zároveň 34 % léků schválených FDA (US Food and Drug Administration) mezi roky 1981 a 2014 bylo založeno na malých molekulách přírodního původu (shrnuje Harvey et al., 2015). Tradičně používané rostlinné extrakty byly ve 20. století analyzovány a podrobeny bližšímu vědeckému zkoumání. Byly z nich získány účinné látky a ty následně identifikovány a podrobeny dalšímu výzkumu. Pokud se látka ukázala být účinnou, stala se předmětem masové produkce farmaceutického průmyslu. Tím však její dráha nekončí. Ze známých látek lze za pomoci chemických úprav vyvinout látky ještě mnohokrát účinnější, s menšími vedlejšími účinky, nebo lépe použitelné (např. rozpustné). V neposlední řadě lze poté u známých látek, jejichž používání proti jisté chorobě je dobře zavedeno, hledat použití proti chorobám jiným nebo novým.

Nemoci, jejichž původci jsou viry, představovaly a stále představují i v dnešní době velké postrachy lidstva, a to i přes velké úspěchy, které za posledních 100 let medicína zaznamenala. Přestože existují léky proti mnohým nemocem, u virových infekcí je léčba často zaměřena pouze proti příznakům virového onemocnění a nikoli přímo proti jejímu původci. Také často vznikají nové virové mutace a rezistence proti používaným lékům nebo se dokonce objevují nové nebezpečné viry. Například aktuálně probíhající pandemie nového koronaviru SARS-CoV2, která začala v prosinci roku 2019 v Číně v Wu-chanu a do května roku 2021 se rozšířila do 219 zemí světa. Onemocněním Covid-19 se k 1.5.2021 nakazilo 150 milionů lidí a více než 3 miliony nálezů podlely*. Proto je zcela nezbytné pokračovat v identifikaci látek s antivirovými účinky.

Viry jsou vnitrobuněční parazité, kteří ke své replikaci bezpodmínečně potřebují syntetický aparát hostitelské buňky, bez kterého se rozmnožovat nemohou. Proto mohou antivirové látky cílit nejen na virové struktury, jako virové proteiny (strukturní i enzymy) a nukleové kyseliny, ale též mohou interagovat s buněčným syntetickým (translačním a transkripčním) aparátem, s buněčnou signalizací, a navíc modulovat imunitní odpověď hostitele. Neměly by však způsobovat větší újmu vlastní buňce nebo buňkám okolním. A právě přírodní látky mají velký potenciál v oblasti výzkumu nových antivirových látek.

Cílem této práce je představit nejvýznamnější rostlinné alkaloidy, u nichž byly prokázány antivirové vlastnosti. Konkrétně se tato práce zabývá antivirovým působením vybraných isochinolinových, purinových, tropanových a troponolových alkaloidů na významné lidské a zvířecí patogeny.

* <https://news.google.com/covid19/map?hl=cs&gl=CZ&ceid=CZ%3Acs>

2 Alkaloidy

Alkaloidy jsou jednou ze 4 hlavních skupin rostlinných sekundárních metabolitů, kam mimo ně patří ještě terpeny, fenylypropanoidy a polyketidy.

Původně byly alkaloidy definovány jako „**fyziologicky aktivní alkalické heterocyklické sloučeniny z rostlin obsahující dusík**“. Později však vyvstala potřeba definici upravit, jelikož ji některé stávající i nově objevené látky nesplňovaly. Platí, že alkaloidy jsou dusíkaté látky, skládající se především z prvků C, H, N, ale některé obsahují ve své struktuře další prvky jako O, S, Cl, Br nebo P. Většina z nich jsou slabé báze, ale některé jsou i amfoterní (theobromin, theofilin), neutrální (kolchicin, piperin) nebo i slabě kyselé. V rostlinách se zpravidla vyskytují ve formě solí karboxylových kyselin. Kromě rostlin se však vyskytují i v živočišné tkáni a tkáni hub. Většinou se jedná o látky tuhé, krystalické a opticky aktivní. Jsou obvykle špatně rozpustné ve vodě a dobře v nepolárních rozpouštědlech. Ne všechny z nich však jsou heterocykly, třebaže obsahují dusík (meskalin, efedrin), a některé nejsou farmakologicky aktivní. Lépe je tedy vystihnout definice, která zní: „**Alkaloidy jsou cyklické organické sloučeniny obsahující dusík v redukované formě a produkované omezenou skupinou organismů.**“

Alkaloidy jsou sice produkovány nejen rostlinami, ale i houbami a živočichy, tato práce se však zaměří na ty rostlinné. Alkaloidy obsahuje asi 10-25 % zástupců vyšších rostlin (Nawrot et al., 2021), přičemž jeden alkaloid se přitom může nacházet ve více rostlinných druzích (často příbuzných) a zároveň jedna rostlina často obsahuje více alkaloidů (často z jedné skupiny). Alkaloidy se nachází v různých koncentracích v jednotlivých částech rostliny. Jejich koncentrace se také mění v závislosti na různých podmínkách jako je např. fáze dne, období roku, místo a podnebí růstu rostliny nebo dostupnost živin (Nawrot et al., 2021).

Rostlinné alkaloidy vykazují celou řadu biologických aktivit, mezi nejzajímavější z hlediska medicíny patří aktivity antivirotické, antimikrobiální, anti-inflamatorní, antioxidační, protinádorové nebo imunostimulační (Nawrot et al., 2021). Také mají rozličné chemické struktury, různé mechanismy účinku a interferují s různými molekulárními drahami.

Alkaloidy jako skupina látek nejsou jasně vymezené, mají neostré hranice. V porovnání s ostatními sekundárními metabolity rostlin jsou charakterizovány velkou strukturální diverzitou. Z toho důvodu také není zavedena jejich jednotná klasifikace. Lze je dělit hned podle několika kritérií, například podle biochemického prekurzoru (ornitin, lysin, tyrosin, tryptofan, histidin) nebo též podle uhlíkatého skeletu (pyrolidinové, piperidinové, tropanové, chinolinové, isochinolinové, aporphinové, indolové, piperidinové, purinové, diazocinové, steroidní, diterpenové, amino alkaloidy) (Nawrot et al., 2021). Největší skupinou jsou alkaloidy isochinolinové s více jak 2500 doposud izolovaných různých látek, z nichž mnoho má význam ve formě extraktů tradičně používaných v (nejen lidové) medicíně (Ruff, 2012).

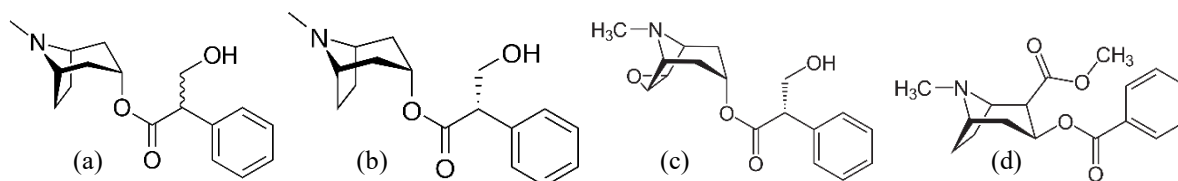
Následující kapitoly budou věnovány bližší charakterizaci a popisu antivirových účinků vybraných zástupců ze skupiny isochinolinových, purinových, tropanových a troponolových alkaloidů.

3 Tropanové alkaloidy

Tropanové alkaloidy jsou skupinou dusíkatých bicyklických organických látek odvozených od tropanu, N-methyl-8-azabicyklo[3.2.1]oktanu. Tyto alkaloidy se nacházejí především v rostlinách z čeledi lilkovité (*Solanaceae*), jako rulík zlomocný (*Atropa belladonna*), blín černý (*Hyoscyamus niger*), durman obecný (*Datura stramonium*), a mandragora lékařská (*Mandragora officinarum*).

Patří mezi ně například anticholinergika **atropin**, **hyoscyamin** a **skopolamin**. Ta mají schopnost blokovat muskarinové acetylcholinové receptory a tím bránit přenosu parasymptických nervových vzruchů, které jsou vůlí neovládané. Důsledkem je mimo jiné rozšíření zorniček – pro tento efekt se v minulosti používaly ke kosmetickým účelům, dnes v očním lékařství. Dále útlum sekrece žláz včetně slinných a potních – toho se využívá během některých operací, a také zrychlení srdečního tepu a snížení krevního tlaku. Atropin se také používá jako lék při otravě organofosfáty.

Atropin (Obr.1a) je racemickou směsí dvou enantiomerů. Samotný levotočivý izomer se pak nazývá **hyoscyamin (Obr.1b)**. Třetím alkaloidem, který se nachází v jejich společnosti je **skopolamin (Obr.1c)**. Všechny tři látky jsou registrovanými léčivými preparáty. Těmto alkaloidům je strukturně příbuzný další derivát tropanu – **kokain (Obr.1d)**. Ten se nachází v rostlině jménem rudodřev koka (*Erythroxylum coca*) z čeledi rudodřevovité (*Erythroxylaceae*) a je zneužíván jako rekreační droga. Antivirové vlastnosti byly prozkoumány hlavně u **atropinu** a okrajově též u **skopolaminu**.



Obr.1 atropin (a), hyoscyamin (b), skopolamin (c), kokain (d)

3.1 Atropin

Atropin je antagonistou acetylcholinových muskarinových receptorů, které blokuje a působí mimo jiné jako mydriatikum. Jeho celý chemický název zní (1R,3r,5S)-8-methyl-8-azabicyklo[3.2.1]oktan-3-yl-(2RS)-2-fenyl-3-hydroxypropanoát. Jedná se o racemickou směs enantiomerů (d-hyoscyaminu a l-hyoscyaminu).

Pilotní práce, již vedli Yamazaki & Tagaya (1980), zabývající se antivirovým účinkem atropinu ukázala, že atropin selektivně potlačuje množení obalených virů, a to bez ohledu na typ nukleové kyseliny tvořící genom viru nebo typ hostitelské buňky. Toto antivirové působení bylo reversibilní, po odstranění látky došlo k opětovnému nárůstu množství viru. Studie zkoumala antivirové účinky na celé spektrum virů z různých čeledí. Konkrétně se jednalo o obalené viry s RNA genomy – virus chřipky A (*Orthomyxoviridae*), virus Japonské encefalitidy (*Flaviviridae*), virus Newcastleské nemoci (*Paramyxoviridae*) a Sindbis virus (*Togaviridae*). Antivirové účinky byly také prokázány u obalených virů s DNA genomy, konkrétně u viru vakcinie (*Poxviridae*), a herpes simplex viru 1 (HSV-1, *Herpesviridae*). Autoři této studie se domnívali, že atropin stejně jako chemicky příbuzný kokain působí na buněčné membrány, a proto má efekt jen na obalené viry. Další možný mechanismus účinku atropinu

byl později navržen při studiu antivirových vlastností této látky na replikaci herpesvirů. Bylo potvrzeno, že atropin působí na HSV-1 a jeho množení tím, že narušuje proces glykosylace proteinů. Po ošetření buněk atropinem nebyla ovlivněna virová replikace, transkripce ani translace buněčných nebo virových proteinů. Navíc nebylo zabráněno ani formování nových virionů HSV-1, ale tyto viriony byly neinfekční právě v důsledku nedostatečné glykosylace proteinů (Alarcon et al., 1984). Atropin byl dále efektivní v potlačení růstu viru afrického moru prasat z čeledi DNA obalených virů *Iridoviridae* (Sola et al., 1986).

Kromě obalených virů, bylo pozorováno i antivirové působení na neobalený virus, a to virus žloutenky typu A (HAV, *Picornaviridae*). Zde bylo působení atropinu ireversibilní a efekt se dostavil jak při ošetření buněk před infekcí, tak 2 hodiny po infekci virem (Biziagos et al., 1990). Navíc bylo v této studii zjištěno synergistické působení s protaminem, což je kladně nabitý peptid bohatý na arginin a potvrzený potentní inhibitor virové RNA polymerasy nepříbuzného viru vesikulární stomatitidy (*Rhabdoviridae*) (Talib & Banerjee, 1981). Na základě toho, že bylo pozorované působení synergické a nikoli aditivní, lze soudit, že každá látka působí na jinou část virového životního cyklu. Možným mechanismem působení atropinu by v tomto případě mohla být změna vlastností buněčné membrány bránící přichycení a vstupu viru, nebo také kompetice o buněčné receptory potřebné pro přichycení HAV. Tuto možnost podporuje i skutečnost, že působení atropinu bylo ireversibilní, což by odpovídalo obsazení receptorů následované změnou vlastností membrány znemožňující vstup viru (Biziagos et al., 1990).

Působením atropinu na membrány dochází ke zvýšení fluidity kyselých fosfolipidů, inhibice efluxu K^+ iontů a permeability pro Na^+ ionty, změna rozmístění Ca^{2+} iontů a depolarizace membrány (Chakraborty et al., 2020; Yamazaki & Tagaya, 1980). Tento efekt by mohl být zodpovědný za antivirové působení atropinu, ať už na virové membrány, v případě obalených virů, nebo na membrány hostitelské buňky v případě virů neobalených.

Detailní mechanismus účinku atropinu byl demonstrován v recentních studiích zkoumajících antivirové působení atropinu na RNA obalený virus Japonské encefalitidy (JEV) z čeledi *Flaviviridae*. V infikovaných kuřecích embryích ošetřených atropinem byl na rozdíl od neošetřených pozorován nárůst hladin mRNA pro interferon alfa ($IFN-\alpha$) a Toll-like receptor-3 (TLR-3). Tyto proteiny jsou důležitými negativními regulátory replikace JEV (Ye et al., 2017). Tento nárůst koreloval s poklesem množství viru v mozku, chorioalantoidní membráně a amniotické tekutině kuřecího embrya a také s nižším výskytem nekros a zánětů. Toto působení lze opět přisuzovat výše zmíněnému vlivu atropinu na buněčné membrány (Chakraborty et al., 2020). Kumar et al. (2020) efekt atropinu na JEV potvrdili a navrhli mechanismus jeho působení. Pro experimenty použili extrakt z rulíku zlomocného obsahující směs atropinu a skopolaminu. Pomocí metody „molecular docking“ zjistili, že atropin a skopolamin interagují s His288 zbytkem NS3 proteinu (virová proteasa, helikasa a nukleosid 5'-trifosfatasa), který je nezbytný pro rozvolnění virové RNA a ATPasovou aktivitu NS3 proteinu. Právě helikasová a proteasová doména NS3 jsou esenciální pro navození apoptosy prostřednictvím indukce

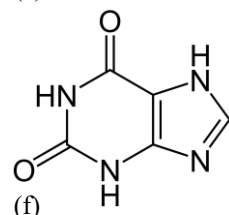
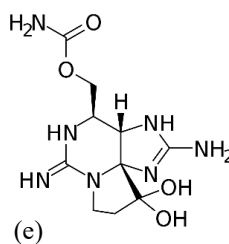
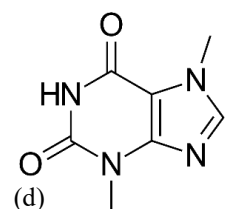
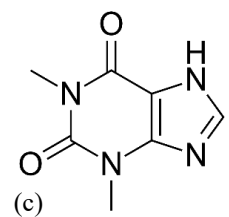
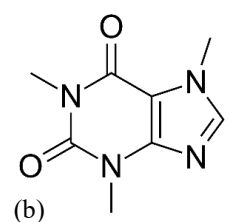
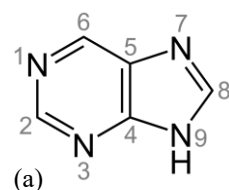
exprese kaspas. Tento fakt potvrzuje snížená exprese NS3 provázená nižším výskytem virem indukované apoptosy pozorovaná v ošetřených infikovaných buňkách. Testované látky chrání neurony před buněčnou smrtí nejen snížením exprese proapoptotických kaspas, ale také supresí prozánětlivých drah, a navíc v buňkách inhibují replikaci viru. Dále bylo zjištěno, že obě látky mohou překonávat hematoencefalickou bariéru, což je podstatné pro léčbu japonské encefalidity, napadající právě mozek. Léčba úspěšně snižovala intracelulární množství viru jak v neuronech, tak v mikroglíích (Kumar et al., 2020)

4 Purinové alkaloidy

Jak jejich název napovídá, odvozují se **purinové alkaloidy** od heterocyklické sloučeniny **purinu (Obr.2a)**, který se skládá ze 2 kruhů, jednoho šestičlenného a jednoho pětičlenného. Devět atomů (5 atomů uhlíku a 4 atomy dusíku v polohách 1,3,7 a 9) molekuly ležících v rovině propojuje konjugovaný systém dvojných vazeb, tudíž lze purin označit za molekulu aromatickou. Lze ho vyjádřit sumárním vzorcem $C_5H_4N_4$. Jeho deriváty jsou nejčastěji se v přírodě nacházejícími heterocykly obsahujícími dusík. Samotný se však purin v přírodě nevyskytuje (Rosemeyer, 2004).

Nejznámějšími deriváty purinu jsou dusíkaté báze, tvořící součást ribonukleotidů a deoxy-ribonukleotidů, stavebních kamenů RNA a DNA. Mezi purinové base patří adenin a guanin. Kromě toho je od purinu odvozeno mnoho dalších důležitých molekul: univerzální energetické plavidlo adenosintrifosfát (ATP), sekundární posel cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), přenašeč acetylu v metabolických drahách acetyl-koenzym A (acetyl-CoA) a přenašeče redukčních ekvivalentů v elektrontransportních řetězcích nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) a flavin-adenin-dinukleotid (FAD) (Rosemeyer, 2004).

Do skupiny purinových alkaloidů náleží **kofein (Obr.2b)**, **theofilin (Obr.2c)**, **theobromin (Obr.2d)** a **saxitoxin (Obr.2e)**. Tyto látky jsou deriváty **xanthinu (Obr.2f)**, neboli 3,7-dihydropurin-2,6-dionu, který je produktem degradace purinu. Kofein, theofilin a theobromin se nachází v různých zastoupeních v kávě, čaji, yerba mate, kakau, kolových ořechích nebo semenech guarana. V čaji je kofein doprovázen především theofilinem, v kakau naopak theobrominem (Rosemeyer, 2004). Theofilin a theobromin jsou též metabolickými produkty rozkladu kofeinu v játrech, při němž vzniká 12 % theobrominu, 4 % theofilinu, 84 % paraxanthinu (Safranow & Machoy, 2005). Saxitoxin produkují mořské sinice a obrněnky, s nimiž se při filtraci dostává do mušlí následně konzumovaných lidmi. Tento neurotoxin reversibilně blokuje napětově řízené sodné kanály a tím působí paralýzu a smrt udušením. Jedná se



Obr.2 purin (a), kofein(b), theofilin(c), theobromin (d), saxitoxin(e),xanthin(f)

o jednu z nejtoxičtějších neproteinových látek, (Rosemeyer, 2004). Z těchto 4 jmenovaných látek byly antivirové vlastnosti prokázány především u **kofeinu** a v menší míře též u **theofilinu**, který předcházел vzniku imunosuprese způsobené virem myši leukemie LP-BM5 tím, že pomáhal navracet rovnováhu cytokinů rozvrácenou myším retrovirem, který je vzdáleně příbuzný viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV, *Retroviridae*). Tento objev otevírá též možnost léčby pacientů s HIV (Liang et al., 2001).

4.1 Kofein

Kofein je purinový methylxantinový alkaloid a nejčastěji konzumovaný stimulant centrálního nervového systému (CNS) (Rosemeyer, 2004). Lze se setkat i s alternativním názvem thein, chemicky se ale jedná o tu samou látku - 1,3,7-trimethylxanthin. Nachází se v nápojích jako káva, čaj, yerba mate, nealkoholických a energetických nápojích, dále také v semenech guarana a čokoládě.

Kofein je především kompetitivním inhibitorem cAMP-specifické fosfodiesterasy štěpící cAMP na AMP. Touto inhibicí kofein přispívá ke zvýšení hladiny cAMP v buňce. Nejlépe bylo jeho působení popsáno na neuronech. Účinky kofeinu na CNS jsou trojího mechanismu (Nehlig et al., 1992). Díky zmíněné schopnosti inhibovat cAMP-specifickou fosfodiesterasu a zpomalovat přeměnu cAMP na AMP prodlužuje tento alkaloid působení cAMP zprostředkovaného adrenalinem (Rosemeyer, 2004). To však, stejně jako nejstarší uvažovaný mechanismus, mobilizace intracelulárního vápníku, nastává jen při vysokých nefyziologických koncentracích kofeinu, a tudíž se na hlavním efektu zřejmě nepodílí (Nehlig et al., 1992). Kofein je však také antagonistou adenosinových receptorů, čímž předchází nástupu ospalosti vyvolané adenosinem (Rosemeyer, 2004). Dále se váže na benzodiazepinové receptory, aktivuje noradrenalinové neurony a stimuluje lokální vylučování dopaminu. Z toho plynou známé a vyhledávané účinky kofeinu: snížení únavy, zvýšení bdělosti a koncentrace, zlepšení učení, paměti, koordinace, výkonu a fyzické vytrvalosti. Stimuluje srdeční činnost, dýchání a metabolismus, zvyšuje krevní tlak a tělesnou teplotu. Ve střevech podporuje zúžení krevních cév, v mozku naopak vazodilataci, což zlepšuje jeho prokrvení a funguje proti ospalosti (Rosemeyer, 2004).

Nejznámější rostlinou, z níž je získáván a podle níž dostal i jméno je kávovník arabský (*Coffea arabica*) z čeledi mořenovité (*Rubiaceae*). Nachází se však i v listech, bobulích a semenech jiných rostlin, jimiž jsou: čajovník čínský (*Camellia sinensis*) z čeledi čajovníkovité (*Theaceae* syn. *Camelliaceae*), cesmína paraguayská (*Ilex paraguariensis*) z čeledi cesmínovité (*Aquifoliaceae*), z jejichž listů se připravuje nápoj maté, kolovník zašpičatělý (*Cola acuminata*) z čeledi slézovité (*Malvaceae*), jehož kolové ořechy jsou součástí energetických nápojů, paulinie nápojná (*Paullinia cupana*) z čeledi mýdelníkovité (*Sapindaceae*), z níž se získávají semena guarana nebo kakaovník pravý (*Theobroma cacao*) z čeledi slézovité (*Malvaceae*).

V pilotní studii se Yamazaki & Tagaya (1980) zabývali otázkou, zda kofein působí na růst virů. Ukázali, že kofein selektivně inhibuje růst některých virů, a to konkrétně: polioviru (*Picornaviridae*), viru chřipky A (*Orthomyxoviridae*), herpes simplex viru 1 (HSV-1, *Herpesviridae*) a viru vakcinie (*Poxviridae*). Naopak u viru Japonské encefalitidy (*Flaviviridae*), viru Newcastleké nemoci (*Paramyxoviridae*) a adenoviru typu 2 (*Adenoviridae*) působení kofeinu na růst nebylo prokázáno.

Inhibiční efekt kofeinu byl reversibilní, po odebrání látky došlo k opětovnému nárůstu množství viru. Autoři studie však nevěděli, kterému z efektů methylxanthinů antivirový účinek přisoudit. Zda je to, co inhibuje růst viru, nárůst intracelulární hladiny cAMP, způsobený inhibicí fosfodiesterasové aktivity, či inhibice postreplikačních úprav, nebo zabránění transportu nukleosidů do buňky (Yamazaki & Tagaya, 1980)

Uvedená pozorování nejsou v souladu s výsledky veterinárního výzkumu, ve kterém Olson & Consigli (1979) pozorovali antivirotickou aktivitu kofeinu u viru Newcastleské nemoci, zřejmě způsobenou inhibicí syntesy virové RNA v infikovaných buňkách. Na základě těchto výsledků se obecně uznává, že kofein na růst viru Newcastleské nemoci inhibičně působí (Koyama et al., 2008).

Koyama et al. (2008) pozorovali vliv kofeinu na virus chřipky, poliovirus, a HSV-1. Díky výběru těchto virů posuzovali vliv látky na množení virů s DNA i RNA genomy, obalených i neobalených a virů jejichž genom se replikuje a transkribuje jak v jádře (chřipka, HSV) tak v cytoplasmě (poliovirus). Nejcitlivější k působení kofeinu byl HSV-1, při vyšších koncentracích byl ovlivněn i poliovirus. Množství virového potomstva obou těchto virů klesalo úměrně s rostoucí koncentrací kofeinu. (Koyama et al., 2008).

Jelikož přidání kofeinu 10 hodin po infekci HSV-1 výrazně ovlivnilo množství vznikajícího viru, usoudili Koyama et al. (2008), že jsou ovlivněny kroky následující po replikaci DNA a formování kapsidy, tedy pravděpodobně krok formování nového infekčního virového potomstva. Také si všimli výrazné převahy cytopatického efektu (zakulacování buněk a jejich odlučování od povrchu) a buněčné smrti v infikovaných buňkách oproti neinfikovaným, což napovídá, že antivirové působení kofeinu na HSV-1 je mimo jiné způsobeno zvýšeným úmrtím nakažených buněk. V jádrech infikovaných buněk v přítomnosti kofeinu byla jasně pozorovatelná kondenzace a fragmentace chromatinu, což je klasickým znakem apoptosy. To ovšem platilo jen u HSV-1, u polioviru a viru chřipky tento fenomén pozorován nebyl. Tyto viry způsobují cytopatický efekt a buněčnou smrt již brzy po infekci, na rozdíl od HSV-1, u kterého cytopatický efekt můžeme pozorovat až v pozdních fázích infekce. To by mohlo vést k zamaskování akcelerace selektivní apoptosy vyvolané kofeinem u buněk infikovaných poliovirem nebo virem chřipky i kdyby k ní docházelo (Koyama et al., 2008).

Stejně působení kofeinu na virus HSV-1 bylo popsáno i ve starší studii, kde bylo zjištěno, že v přítomnosti kofeinu dochází k inhibici tvorby plaků. I tato studie potvrzuje, že kofein inhibuje množení viru. Vzhledem k tomu, že se virus lokalizovaný uvnitř buněk, jevil nedotčený, za inhibici tvorby plaků může zřejmě i potlačení šíření viru mezi buňkami. Ošetření buněk kofeinem 18 hodin před infekcí nemělo žádný vliv na adsorpci viru, ani jeho replikaci, a zároveň se nejevilo toxické pro buňky. Pokud však byl kofein přidán přímo během adsorpce, snížila se její efektivita. Autoři této studie se tedy domnívají, že kofein snižuje také šíření HSV-1 mezi buňkami (Shiraki & Rapp, 1988).

V inhibici replikace HSV-1 může také hrát roli také efekt kofeinu na buněčný metabolismus. Pozorované zvýšení intracelulární koncentrace cAMP je jedním z možných mechanismů, který by se mohl podílet na inhibičním účinku kofeinu (Yamazaki & Tagaya, 1980). Dalším možným cílem kofeinu

je specifický reparační enzym uracil-DNA glykosylasa. Inhibice tohoto enzymu kofeinem by mohla mít za následek snížení replikace virové DNA a tím pádem také nižší množství nově formovaných virionů. Rozdíl v obsahu guanin-cytosinových párů mezi DNA viru HSV-1 a savčí buňky je v souladu s tímto pozorováním (Shiraki & Rapp, 1988).

Dalším studovaným virem byl virus chřipky, avšak názory na působení kofeinu na tento virus jsou sporné. Ve studii, kterou vedli Koyama et al. (2008), nebyl při použitých koncentracích žádný efekt kofeinu prokázán. To je v rozporu s tím, co dříve pozorovali Yamazaki & Tagaya (1980) Avšak výsledky další studie, která zkoumala účinky kofeinu na virus chřipky potvrdila zjištění, že kofein na replikaci viru chřipky působí (Liu et al., 2009). Možnou příčinou rozdílných výsledků těchto studií by mohlo být použití jiného kmenu viru (H1N1 vs. H3N2) nebo jiného buněčného typu (kuřecí embryonální buňky vs. psí levinné buňky) (Koyama et al., 2008).

Liu et al. (2009) hodnotili účinnost a bezpečnost působení kombinace kofeinu a statinu proti chřipkovým kmenům H5N1, H3N2 a H1N1 na BALB/c myších. Statiny jsou jedněmi ze světově nejrozšířenějších a nejčastěji předepisovaných léků na snížení cholesterolu. Inhibují enzym 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzym-A (HMG-CoA) reduktasu, která katalyzuje rychlost omezující krok biosyntesy cholesterolu. Nicméně tato studie měla za cíl potvrdit jejich údajnou schopnost usnadnit léčbu chřipky, omezit zánět, zlepšit funkci plicního epitelu.

Výsledky byly porovnány s působením léčebných možností používaných k léčbě chřipky v současnosti: oseltamivir, ribavirin a pasivní imunoterapie pomocí koňského anti-H5N1 immunoglobulinu G (IgG). Konkrétně byly srovnávány symptomy u myší, počet případných úmrtí, patologické změny na plicích a srdci a množství viru v plicích. Výsledky studie ukázaly, že kombinace 50 µg statin/200 µg kofein při preventivním podání efektivně předcházela poškození plic a zároveň bránila replikaci viru H5N1, H3N2 i H1N1 v plicích, přičemž byla přinejmenším stejně efektivní jako oseltamivir, ribavirin a koňský anti-H5N1 IgG (Liu et al., 2009). Antivirový vliv kofeinu proti viru chřipky lze dle názoru autorů přičítat jeho schopnosti zvyšovat intracelulární hladinu cAMP, které je účinným imunomodulátorem s protizánětlivými vlastnostmi. Výsledky studie potvrzují, že léky založené na kombinaci statin/kofein nabízí do budoucna efektivní alternativu ke stávajícím lékům pro prevenci a léčbu chřipkových virů H5N1, H3N2 a H1N1. V myším modelu došlo ke zmírnění symptomů infekce, inhibici poškození plic a snížení množství viru. Lepší výsledky se dostavily, pokud byl poměr statin/kofein větší ve prospěch statinu a pokud byla látka podána preventivně, spíše než postinfekčně (Liu et al., 2009).

Působení kofeinu na respirační synytiální virus (RSV, *Paramyxoviridae*) zkoumali Kunzmann et al. (2018). Ve svém výzkumu vycházeli z poznatku, že H441 buňky (lidské plicní epitelální buňky) infikované RSV exprimují více mRNA pro růstový faktor pojivové tkáně (CTGF), který je klíčovým faktorem remodelace dýchacích cest a je aktivován transformujícím růstovým faktorem β (TGF- β). Kofein dle výsledků studie omezuje zvýšení exprese CTGF mRNA v důsledku infekce RSV, brání tak remodelaci a fibrotisaci plic a tím pomáhá udržet jejich homeostasu (Kunzmann et al., 2018).

V neposlední řadě byl pozorován vliv kofeinu na množení viru žloutenky typu C (HCV, *Flaviviridae*) a rozvoj hepatocelulárního karcinomu (HCC). Dopad zvýšeného příjmu kofeinu na snížené riziko rozvoje HCC u pacientů infikovaných HCV se stal předmětem zájmu hned několika meta-analýz. Jejich cílem bylo analyzovat data z co nejvíce studií, zabývajících se právě výskytem HCC u pacientů s HCV a dát je do souvislostí s konzumací kofeinu. Výsledky překvapivě potvrzují, že zvýšení konzumace kávy o 2 šálky denně snižuje riziko rozvoje HCC (Kennedy et al., 2017; Wijarnpreecha et al., 2017). Uvažovaným mechanismem je hepatoprotektivní antifibrotický efekt kofeinu. Možný podíl by mohl mít i antioxidační účinek kofeinu, který by mohl pomáhat redukovat oxidativní stres a zánět v játrech (Wijarnpreecha et al., 2017).

I když bylo publikováno mnoho studií zabývajících se vlivem kofeinu na HCC, přímou souvislostí mezi příjmem kofeinu a replikací viru HCV se zabývala pouze jedna (Batista et al., 2015). Ta potvrdila, že kofein efektivně inhibuje replikaci HCV *in vitro* v závislosti na čase, velikosti dávky a v koncentracích, které nejsou pro samotné buňky toxické. Nejvyšší netoxická koncentrace snížila replikaci viru HCV o 80 % oproti kontrole po 48 hodinách inkubace (Batista et al., 2015).

Avšak mechanismus inhibice virové replikace zůstává stále nejasný. Kofein velmi pravděpodobně interferuje s drahami, které jsou důležité pro replikaci viru HCV. Kofein snižuje expresi celé řady buněčných proteinů, mezi nimi i cyklooxygenasy-2 (COX-2) (Kang et al., 2012), u níž bylo prokázáno, že podporuje replikaci viru HCV (Lin et al., 2013). Právě změna exprese COX-2 v kofeinem ošetřených buňkách je považována za nejpravděpodobnější příčinu inhibice replikace HCV (Batista et al., 2015). Na inhibici virové replikace by se také mohla podílet snížená exprese dalších buněčných proteinů, např. buněčného chaperonu HSP90, který interaguje přímo s virovým proteinem NS5A, nebo Ras-ERK, interagující s virovým proteinem NS5B a 5' koncem -ssRNA HCV (Nakagawa et al., 2007; Yi et al., 2011). Vedle působení kofeinu na buněčné proteiny však nelze vyloučit ani interakci kofeinu přímo s některým z virových proteinů (Batista et al., 2015). Navíc bylo ukázáno, že kofeinem ošetřené buňky se dělily se stejnou frekvencí jako buňky neošetřené, a také procento apoptotických buněk se mezi těmito dvěma populacemi nelišilo. To dokazuje, že účinek kofeinu pravděpodobně přímo souvisí se schopností této látky inhibovat replikaci viru. (Batista et al., 2015).

I když názory na působení kofeinu nejsou jednotné, lze s jistotou říci, že tento alkaloid inhibuje růst širokého spektra virů – viru herpes simplex 1 a také zřejmě polioviru, viru vakcinie, respiračního syncytiálního viru a viru žloutenky typu C. Vliv na viry chřipky a Newcastleké nemoci je však sporný. Dalo by se říci, že za určitých podmínek na tyto viry nějaké působení má, ale záleží na typu viru a použité koncentraci látky. Další možností vysvětlení různých výsledků je, že antivirové působení kofeinu mohou ovlivňovat i další složky kávového extraktu použitého v některých studiích, či jiná látka (např. statin), proto by působení kofeinu na tyto viry zasloužilo další zkoumání.

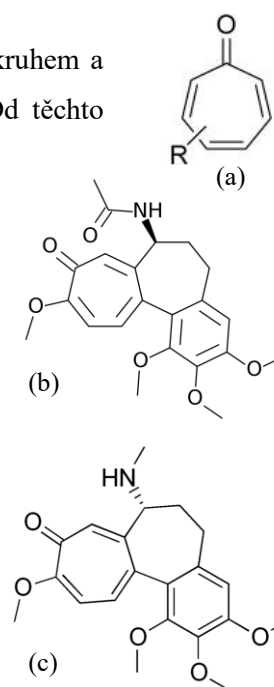
5 Troponolové alkaloidy

Tropony (Obr.3a) a troponoly jsou sloučeniny se sedmičlenným kruhem a karbonylovou skupinou, nazývají se též troponoidy nebo troponoloidy. Od těchto sloučenin se odvozují troponolové alkaloidy. Mezi ně patří mimo jiné grandirubrin, imerubrin, isoimerubrin, pareirubrin A, pareirubrin B a pareitropon (Liu et al., 2014). V medicíně používanými zástupci jsou **kolchicin (Obr.3b)**, který je používán jako lék na dnu, a jeho derivát **demekolcin (Obr.3c)**, neboli **kolcemid** používaný při chemoterapii nádorů.

5.1 Kolchicin

Kolchicin pochází z rostliny ocún jesenní (*Colchicum autumnale*) z čeledi ocúnovité (*Colchicaceae*) a jedná se o tricyklický troponolový derivát s chemickým názvem (5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10, tetramethoxy-9 oxobenzo[a] heptain-7-yl) acetamid. Kolchicin je jedním z nejúčinnějších buněčných jedů. Řadí se mezi mitotické jedy – ve vysoké koncentraci destabilizuje mikrotubuly, v nižších koncentracích především ovlivňuje jejich dynamiku, aniž by snižoval množství jejich hmoty. Váže se na specifické místo tubulinových $\alpha\beta$ -heterodimerů a tvoří s nimi komplexy, které po zabudování do konců mikrotubulů sice přímo nezastaví jejich růst, ale výrazně potlačí jejich dynamiku. Stabilizace dynamiky dělicího vřeténka narušuje správný rozchod chromosomů při mitose. To vede k zastavení buněčného cyklu v metafázi mitosy (Jordan & Wilson, 2004). Jelikož brání rozchodu chromosomů, může jeho působením dojít ke zvyšování ploidie. Díky tomu našel kolchicin významné využití v rostlinné genetice pro navození genomových mutací. (Touchell et al., 2020). U citlivých buněk, kterými jsou buňky nádorové, potom vede zastavení buněčného cyklu v metafázi mitosy k indukci apoptosy. Z toho plynou jeho cytostatické účinky bránící nekontrolovatelnému dělení buněk, které mají potenciál v léčbě rakovinného bujení, avšak v medicíně praxi se nevyužívá kvůli jeho vysoké toxicitě a nízkému terapeutickému indexu (rozdíl mezi léčebnou a toxickou dávkou) (Jordan & Wilson, 2004). Místo něj však v medicíně našel uplatnění jeho derivát, demekolcin. Strukturální rozdíl mezi kolchicinem a demekolcinem je v přítomnosti methylové skupiny místo acetylové (Obr.3). Mechanismus působení demekolcinu je stejný jako u kolchicinu, ale je méně toxický a tím pádem se používá jako chemoterapeutikum při léčbě nádorů. U demekolcinu byly pozorovány i účinky na virovou infekci, a to u virů vakcinie, hepatitidy, spalniček a polioviru (Katsilabros, 1964), avšak antivirové účinky byly více prozkoumány u kolchicinu.

I přes vysokou toxicitu se kolchicin již dlouhou dobu využívá i v medicíně. Je od pradávna znám jako lék na dnu. Pravděpodobně již od 6.století našeho letopočtu byl podáván orálně a od 50. let 20. století se rozšířilo intravenosní podání, které nemá tak časté vedlejší, gastrointestinální efekty. Kolchicin pro intravenosní podání ale v současné době není schválen k použití kvůli vysokému riziku náhodného (i úmyslného) předávkování (Roberts et al., 1987). Kolchicin se používá i v léčbě dalších



Obr.3 tropon (a), kolchicin (b), demekolcin (c)

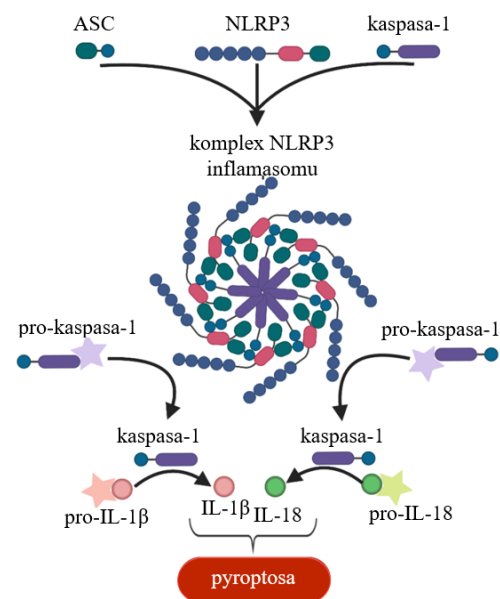
revmatických i nerevmatických onemocnění: familiární středomořské horečky, Behçetovy nemoci a cirhosis (Ben-Chetrit & Levy, 1998).

Schopnost kolchicinu léčit dnu a další zánětlivá onemocnění postihující klouby spočívá v jeho protizánětlivých vlastnostech, které přímo souvisí s jeho efektem na mikrotubuly. Kolchicin má vliv nejenom na pohyblivost leukocytů, která je na cytoskeletu závislá, ale i na intracelulární transport granulí a jejich následné uvolnění z buňky (Ben-Chetrit & Levy, 1998). Dále ovlivňuje tvorbu leukotrienů a cytokinů, skládání inflammasomu a fagocytosu, což jsou procesy, které se účastní rozvoje chronického zánětu a jsou také závislé na funkčních mikrotubulech (Dalbeth et al., 2014). Při dně se v kloubech ukládají krystaly soli kyseliny močové, které indukují tvorbu inflammasomu. Inflammasom je multiproteinový oligomer, skládající se z molekul NLRP3, ASC a kaspasy-1 (Obr.4). Po složení inflammasomu dojde k aktivaci kaspasy-1, která konvertuje pro-IL-1 β na aktivní IL-1 β a pro-IL-18 na aktivní IL-18. Pokud kolchicin zabrání vzniku inflammasomu, potlačí se i výlev prozánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-18 a tím pádem dojde k celkové supresi zánětlivé reakce (Deftereos, Siasos, et al., 2020). Kromě potlačování prozánětlivých drah kolchicin také zvyšuje produkci protizánětlivých mediátorů (Dalbeth et al., 2014).

Léčebné účinky kolchicinu působící na otoky kloubů mohou nalézt uplatnění i při zmírňování následků virových infekcí, např. infekcí vyvolaných virem chikungunya (CHIKV). CHIKV, zástupce čeledi *Togaviridae*, je obalený virus s genomem tvořeným +ssRNA molekulou, který je přenášen hmyzem. V následku infekce tímto virem pacienti trpí otoky a bolestmi kloubů, jejich ranní ztuhlostí a dalšími revmatologickými problémy. Bez vhodné léčby mohou tyto potíže přetrvávat i mnoho let (Javelle et al., 2015)

Přestože souvislost mezi léčbou dny a následků infekce CHIKV byly zaznamenány už dříve (Javelle et al., 2015), zatím byl popsán pouze jeden případ cílené léčby následků infekce CHIKV kolchicinem. Užívání kolchicinu vedlo již po 2 dnech k výraznému zmenšení otoku a snížení bolestivosti kloubu způsobené infekcí CHIKV. Následující užívání po dobu 6 měsíců bylo bez nežádoucích účinků a trvale odstranilo příznaky nemoci. Na základě této zkušenosti lze tedy uvažovat o použití kolchicinu k léčbě bolesti kloubů způsobené CHIKV v případech, kde se nesteroidní antirevmatické léky ukázaly jako neúčinné (Redel, 2016).

Využití protizánětlivých a antifibrotických schopností kolchicinu, které souvisejí s potlačením



Obr.4 Skládání NLRP3 inflammasomu.

Při aktivaci NLRP3 inflammasomu dochází k seskupení molekul NLRP3, ASC a kaspasy-1 za vzniku úplného multiproteinového komplexu NLRP3 inflammasomu. Tento komplex umožňuje štěpení pro-kaspasy-1 na její aktivní izomer, kaspasu-1, který následně štěpí pro-IL-1 β a pro-IL-18 na jejich aktivní izomery IL-1 β a IL-18. Zvýšení hladiny těchto prozánětlivých cytokinů nakonec vede k buněčné smrti, pyroptose.

Převzato a upraveno z O'Brien et al. (2020).

syntesy a akumulace kolagenu (Rodriguez et al., 1998), bylo zkoumáno–v souvislosti s ovlivněním vývoje hepatocelulárního karcinomu (HCC) způsobeného virem hepatitidy C (HCV, *Flaviviridae*).

Výsledky studie ukázaly, že léčba kolchicinem předchází a zpomaluje vývoj HCC u pacientů s cirhózou indukovanou virem hepatitidy C (Arrieta et al., 2006). Přestože mechanismus vzniku HCC u pacientů s HCV není dosud plně objasněn, předpokládá se, že se nejedná o přímý následek infekce virem. Poškození hepatocytů a fibrosa jsou indukovány dlouhotrvající zánětlivou odpovědí vlastního organismu, který tak reaguje na virovou infekci (Kershenovich et al., 1990). A zde se právě může uplatnit působení kolchicinu potlačující chronický zánět a tím pádem i zpomalující fibrotizaci jater.

Klinická studie, sledující pacienty po dobu 3 let, zjistila pouze zanedbatelný rozdíl mezi pacienty léčenými kolchicinem a kontrolní skupinou, v podílu těch, u nichž došlo ke zlepšení stavu, nebo alespoň nedošlo k jeho zhoršení. I když dopad podávání kolchicinu na zlepšení stavu pacientů s HCC nebyl vysoký, jeho hlavním přínosem v léčbě HCC by mohlo být oddálení vzniku a rozvoje HCC. Kolchicin výrazně zvýšil dobu dožití pacientů, což podporuje jeho využitelnost v prevenci rozvoje a v léčbě HCC způsobeného HCV (Arrieta et al., 2006).

Dále byl také zkoumán potenciál této látky při léčbě nádorových onemocnění způsobených viry. Jednou takovou virovou skupinou byly lidské papilomaviry (HPV, *Papillomaviridae*). Tyto malé neobalené viry s dsDNA genomem jsou přítomny téměř ve 100 % případů nádorů děložního čípku, a to především vysoce rizikové typy HPV16 a HPV18. Kromě anogenitálních malignancí jsou spojeny i s nádory hlavy a krku (Yan et al., 2020). Nádorové buňky vykazují vysokou citlivost ke kolchicinu, který u nich způsobuje inhibici růstu, zatímco pro nenádorové lidské epidermální keratinocyty je kolchicin jen málo toxický. U lidských buněk, odvozených z nádorů děložního čípku, CaSki (HPV16-positivní) a HeLa (HPV18-positivní) indukoval kolchicin apoptosu (Yan et al., 2020).

Detailní analýza odhalila, že u kolchicinem ošetřených nádorových buněk docházelo v porovnání s neošetřenými k redukci množství jak mRNA pro virové proteiny E6 a E7, tak i samotných virových proteinů. To bylo vyhodnoceno jako příčina protinádorového působení kolchicinu na CaSki a HeLa buňky. Dalšími proteiny, jejichž exprese byla v nádorových buňkách kolchicinem ovlivněna, byly tumorsupresor p53 a retinoblastomový protein (pRb) (Yan et al., 2020). V nádorových buňkách je hladina těchto proteinů přirozeně snížena v porovnání s buňkami kontrolními (nenádorovými). Avšak v nádorových buňkách ošetřených kolchicinem docházelo ke zvyšování množství proteinů p53 a pRb přímo úměrně s dávkou kolchicinu, v porovnání s neošetřenými nádorovými buňkami. U kontrolních (nenádorových) buněk k žádné změně v hladině proteinů p53 a pRb po ošetření kolchicinem nedošlo. Toto pozorování lze zřejmě vysvětlit právě snížením množství virových proteinů E6 a E7 v nádorových buňkách. Hlavní rolí těchto proteinů v životním cyklu viru je deregulace a interference s funkcemi buněčných proteinů pRb and p53 (Obr.4) Tyto buněčné proteiny regulují buněčný cyklus a chrání integritu genomu (Yan et al., 2020). Protein pRb tvoří komplexy s transkripčním faktorem E2F, který aktivuje transkripci genů regulujících buněčné dělení a tím pádem reguluje buněčnou proliferaci. Virový

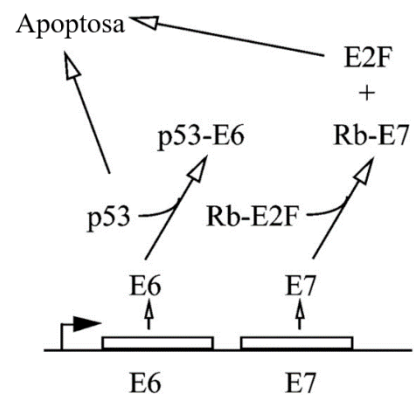
protein E7 narušuje komplex pRb/E2F tím, že z tohoto komplexu vyvazuje pRb. To má za následek uvolnění transkripčního faktoru E2F, který se stává aktivním a může aktivovat transkripci a v důsledku toho také buněčnou proliferaci (Nevins, 2001). Virový protein E6 váže buněčný protein p53 a stimuluje jeho ubiquitinylation a následnou degradaci proteolytickým systémem. Buněčný protein p53 se váže na specifické DNA sekvence a funguje jako transkripční aktivátor. V případě poškození DNA zastaví buněčný cyklus v G1 fázi a tento blok buněčného cyklu může vést až k apoptose. Pokud je však p53 vyvázaný proteinem E6, k zastavení buněčného cyklu při poškození DNA nedojde, a to může vést ke genomové nestabilitě (Li et al., 2019)

U buněk ošetřených kolchicinem byla navíc odhalena snížená hladina antiapoptotického proteinu Bcl-2. Naopak, množství cytosolických pro-apoptotických proteinů Bax, štěpené kaspasy 3 a cytochromu bylo v ošetřených buňkách zvýšeno. Tyto molekuly jsou součástí signální kaskády, která je regulována právě proteinem p53 a vede k zástavě buněčného cyklu a k apoptose (Yan et al., 2020). Právě proto je působení kolchicinu, vedoucí ke snížení množství virových proteinů E6 a E7 v buňce a následném omezení nekontrolované proliferace ve spojení s nárůstem apoptosy, slibným kandidátem pro léčbu nádorových onemocnění vyvolaných infekcí HPV.

Avšak kolchicin se jeví i jako nadějně antivirotikum. Pozitivní působení kolchicinu bylo potvrzeno při léčbě infekce respiračním syncytiálním virem (RSV). Tento virus je řazen do čeledi *Paramyxoviridae* a způsobuje závažné respirační nemoci u dětí (Lu et al., 2019). Infekce virem RSV má za následek poškození epiteliálních buněk, zvýšenou produkci cytokinů, zvýšenou produkci hlenu vedoucí k dýchacím problémům jako bronchitida, pneumonie, astma nebo chronická obstrukční plicní nemoc (Rudd et al., 2005).

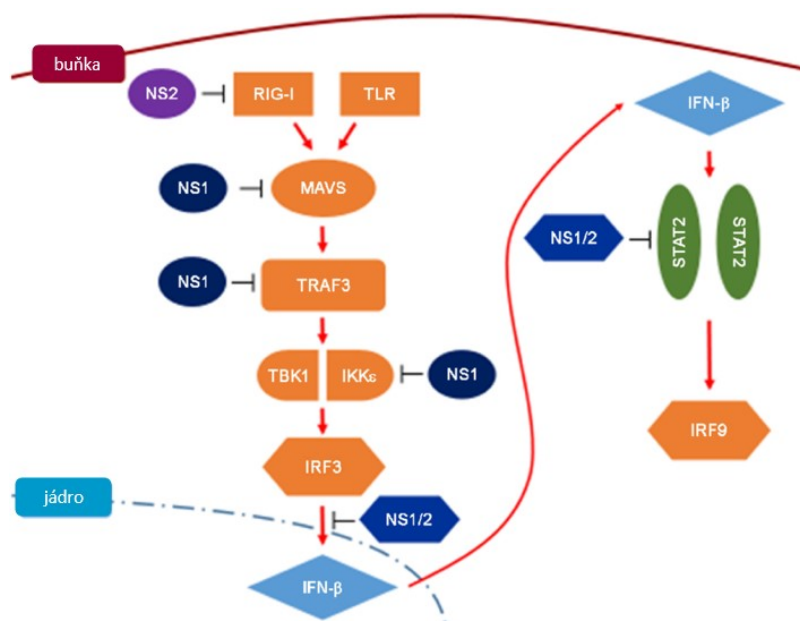
Antivirotické účinky kolchicinu byly pozorovány jak *in vitro*, tak *in vivo*. Kolchicin výrazně inhiboval množení viru v BEAS-2B buňkách (lidské plicní epiteliální buňky), stejně jako v plicích novorozenech krys, zřejmě prostřednictvím regulace produkce antioxidantních faktorů, aktivace exprese interferonu β 1 (IFN- β 1), a potlačení produkce prozánětlivých cytokinů (Lu et al., 2019).

V infikovaných buňkách ošetřených kolchicinem byla detekována zvýšená exprese genů pro IFN- β 1 a protein RIG-I v porovnání s infikovanými neošetřenými buňkami (Lu et al., 2019). Produkce IFN- β 1 je odpovědí vrozené imunity na virovou infekci. Virem kódované proteiny však přispívají ke snížení produkce interferonu a k potlačení buněčné antivirové odpovědi (Zhang et al., 2009).



Obr.5 Protein E7 vyvazuje buněčný protein pRb z komplexu pRb/E2F a tím dochází k uvolnění transkripčního faktoru E2F, který může aktivovat transkripci a buněčnou proliferaci. Protein E6 váže buněčný protein p53 a stimuluje jeho ubiquitinylation a degradaci v proteosomu. Tím pádem nedojde k indukci apoptosy při poškození DNA a to může vést ke genomové nestabilitě a vzniku nádoru. Převzato a upraveno z Webster et al. (2000).

K indukcii produkce IFN- β 1 může dojít prostřednictvím aktivace dvou signálních kaskád. Jedna z nich zahrnuje protein RIG-I, který patří do skupiny proteinů označovaných jako „patern recognition receptors“. Virový NS1 protein RSV se váže na mitochondriální protein MAVS (Mitochondrial Antiviral Signaling Protein) a tím brání jeho interakci s RIG-I (Obr.5), následované aktivací signální kaskády vedoucí k produkci interferonu a navození antivirového stavu (Zhang et al., 2009). Zvýšená produkce IFN- β 1 a RIG-I v infikovaných buňkách ošetřených kolchicinem naznačuje, že v těchto buňkách dochází k aktivaci zmíněných signálních kaskád a spuštění buněčné antivirové odpovědi, která je zásadní v boji s infekcí RSV.



Obr.6 Inhibice signální dráhy vedoucí k produkci antivirového interferonu IFN- β virovými proteiny RSV NS1 a NS2. Virové proteiny NS1 a NS2 potlačují signalisaci vedoucí k produkci antivirového interferonu IFN- β . Působí na klíčové komponenty signálních dráh RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) a TLR (toll-like receptor) jako MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), TRAF3, IRF3 (interferon regulatory factor) a STAT2 (signal transducer and activator of transcription 2). Převzato a upraveno ze Shin et al. (2014).

Další analýza ukázala snížení hladiny prozánětlivých interleukinů IL-6 a IL-8 a molekul oxidačního stresu. Tím potvrdila efekt kolchicinu na zánět dýchacích cest (Lu et al., 2019). Poškození způsobené RSV je především následkem oxidačního stresu v důsledku virové infekce (Hosakote et al., 2012).

Vliv kolchicinu na infekci RSV byl potvrzen i v *in vivo* podmínkách. Efekty kolchicinu pozorované v infikovaných novorozenech krysách byly podobné, co se týče exprese zmíněných genů, jako u infikovaných BEAS-2B buněk. Navíc krysy léčené kolchicinem měly mnohem nižší pravděpodobnost rozvoje zánětu plicních dýchacích cest a plicního parenchymu, oproti neléčeným. Poškození plicní tkáně bývá způsobeno molekulami oxidačního stresu, produkovanými alveolárními epitelálními a endotelovými buňkami, které ničí membránové lipidy, proteiny a chromatin, přičemž sekrece těchto molekul, která narůstá při infekci RSV, byla u krys léčených kolchicinem výrazně nižší, což vysvětluje i menší poškození plic (Lu et al., 2019).

Díky inhibici replikace viru, aktivaci exprese IFN- β 1 a potlačení produkce prozánětlivých cytokinů a molekul oxidačního stresu u buněk infikovaných RSV se kolchicin jeví jako nadějný kandidát pro léčbu infekce RSV u dětských pacientů (Lu et al., 2019).

Největší pozornost se však ke kolchicinu v poslední době obrací v souvislosti s onemocněním COVID-19. V léčbě tohoto onemocnění způsobeného novým koronavirem SARS-CoV2 se mohou uplatnit hlavně protizánětlivé vlastnosti kolchicinu ovlivňující především leukocyty.

Pacienty s COVID-19 ohrožuje především tzv. cytokinová bouře, což je život ohrožující stav, při kterém dochází k nárůstu sekrece prozánětlivých cytokinů IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α a chemokinů IL-8 (Lopes et al., 2021; Qin et al., 2020). Díky efektu na mikrotubuly kolchicin inhibuje intracelulární transport váčků a sekreci cytokinů (Dalbeth et al., 2014) a tím snižuje nebezpečí rozvoje cytokinové bouře.

Jedním z uvažovaných mechanismů účinků kolchicinu je také inhibice skládání NLRP3 inflamasomu, který má hlavní podíl na rozvoji syndromu akutní dechové tísně, který je typickým klinickým projevem u pacientů s COVID-19 (Deftereos, Siasos, et al., 2020). Podíl na indukci skládání inflamasomu NLRP3 má zřejmě koronavirový protein viroporin E. Ten vytváří transmembránové póry propouštějící Ca^{2+} kationty z vnitrobuněčných zásobáren do cytoplasmy a nárůst cytoplasmatické hladiny Ca^{2+} aktivuje skládání inflamasomu (Castaño-Rodriguez et al., 2018; Ito et al., 2012). Díky schopnosti stabilizace dynamiky mikrotubulů kolchicin brání skládání inflamasomu a tím i aktivaci kaspasy-1 a výlevu prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-18 a IL-6 (Deftereos, Siasos, et al., 2020), které se účastní imunitní reakce. Bylo dokázáno, že kolchicin rychle snižuje hladiny IL-1 β , IL-18 a IL-6 v organismu (Nasiripour et al., 2020).

Významné je působení kolchicinu na adhezivitu, chemotaxi a obranné funkce buněk imunitního systému. Kolchicin ovlivňuje expresi E-selektinu na povrchu buněk endotelu a L-selektinu na povrchu neutrofilů, což má vliv na adhezi leukocytů potřebnou pro přilnutí k endotelu a extravazaci do místa zánětu. Na tomto jevu má zásluhu opět schopnost kolchicinu ovlivňovat mikrotubuly, které regulují množství a rozmístění povrchových glykoproteinů (Cronstein et al., 1995). Stabilizace dynamiky mikrotubulů má dopad i na motilitu a chemotaxi prozánětlivých buněk jako neutrofilů a monocytů (Parra-Medina et al., 2020). Významný je i jeho účinek na další prozánětlivé procesy – fagocytosu a degranulaci (Cronstein et al., 1995). Ovlivnění adhezivity a chemotaxe neutrofilů je užitečné pro zabránění jejich infiltrace do plic pacientů s COVID-19. V plicích těchto pacientů byly totiž nalezeny vyšší počty neutrofilů, které zřejmě mají svůj podíl na patogenezi nemoci (Xu et al., 2020). Mimo to kolchicin navíc redukuje produkci superoxidu neutrofilů, a to opět díky jeho efektu na mikrotubuly, potažmo na intracelulární transport a skládání komplexu NADPH oxidasy (Chia et al., 2008). Potlačení těchto procesů by kolchicin mohl zabránit poškození plic u pacientů s COVID-19.

Jedním z dalších uvažovaných efektů kolchicinu je inhibice dráhy endocytosu zprostředkované klatrinem, která je nezbytná pro vstup viru do buňky (Deftereos, Siasos, et al., 2020). Jelikož je tento proces závislý na remodelaci mikrotubulů, kolchicin by ho mohl inhibovat.

Účinnost kolchicinu v léčbě COVID-19 byla potvrzena několika klinickými studiemi.

Italská studie, která se konala v březnu a dubnu 2020, prokázala u pacientů, léčených kromě standardní léčby navíc kolchicinem, vyšší míru přežití, než u pacientů jen se standardní léčbou (Scarsi et al., 2020).

Brazilská studie probíhající od dubna do června 2020 u pacientů, kteří dostávali ke standardní léčbě navíc 0,5 mg kolchicinu 2-3x denně po dobu 10 dní, zaznamenala kratší dobu, po kterou pacienti potřebovali kyslíkovou terapii a kratší dobu hospitalizace, oproti pacientům z kontrolní skupiny, kteří dostávali pouze standardní léčbu. Kolchicin byl tedy označen za bezpečnou a dobře tolerovanou léčivou látku, bez závažnějších vedlejších účinků (Lopes et al., 2021).

Klinická studie GRECCO-19 v dubnu 2020 zkoumala možný přínos kardioprotektivních účinků kolchicinu u pacientů s COVID-19, u nichž často dochází k poškození srdce. Tato studie se zaměřila na srovnání srdečních a zánětlivých biomarkerů u 105 pacientů v 16 nemocnicích v Řecku. Část pacientů dostávala oproti standardní léčbě navíc 0.5 mg kolchicinu 2x denně po dobu 3 týdnů. Stav sledovaných biomarkerů u pacientů léčených kolchicinem potvrdilo protizánětlivý a antitrombogenní účinek kolchicinu. Naopak hladiny ukazatelů poškození myokardu se mezi oběma skupinami výrazně nelišily, což však stále zcela nevylučuje kardioprotektivní účinky kolchicinu (Deftereos, Giannopoulos, et al., 2020).

Další studie probíhající v USA se 66 pacienty se uskutečnila od dubna do května 2020. Polovině pacientů byl kromě standardní léčby navíc podáván kolchicin. Pacienti z kolchicinové skupiny měli do 28. dne sledování menší úmrtnost a 5x větší šanci zkrácení doby hospitalisace (Brunetti et al., 2020).

Avšak oproti potvrzenému léčebnému potenciálu nemá kolchicin protektivní účinky, což ukázala studie srovnávající účinek hydroxychlorochinu a kolchicinu na prevenci infekce SARS-CoV-2. Tato studie neprokázala mezi skupinami, kterým byly tyto dvě látky podávány, žádný významný rozdíl v tom, kolik pacientů bylo poté zjištěno jako pozitivní a kolik negativní, čímž tato studie popírá protektivní účinky kolchicinu proti nákaze SARS-CoV-2 (Gendelman et al., 2020).

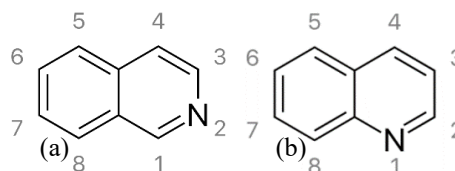
I přes velmi nadějně výsledky klinických studií zabývajících se léčbou kolchicinem, je těžké hodnotit výsledky komplexně, protože „standardní léčba“ a ostatní podmínky byly v každé studii nastaveny jinak. Kolchicin byl podáván v různých koncentracích, v kombinaci s různými léky, v různých fázích postupu nemoci a byly sledovány odlišné parametry. Proto by bylo vhodné provést standartizovanou a koordinovanou mezinárodní studii, která by dosažené výsledky přesvědčivě potvrdila. Důležité však je, že většina studií potvrdila pozitivní přínos kolchicinu v léčbě COVID-19.

Pozitivní účinky kolchicinu při léčbě virových onemocnění byly prokázány u širokého spektra virů. Příčinou širokého antivirotického účinku může být, že efekty kolchicinu většinou necílí přímo na samotné virové částice, ale spíše na buněčné procesy, které se účastní jejich replikačního cyklu, a především na procesy imunitní reakce organismu. Kromě toho, díky schopnosti ovlivňovat dynamiku mikrotubulů, interferuje kolchicin hned s několika procesy, které hrají nepostradatelnou roli ve virovém replikačním cyklu (jako klatrinem zprostředkovaná endocytosa a vnitrobuněčný transport). Tyto

vlastnosti však lze v praxi jen těžko využít, protože koncentrace potřebná pro kompletní rozrušení mikrotubulů je pro organismus toxická (Jordan & Wilson, 2004). Místo toho může tedy spíše nalézt uplatnění jako nadějný imunomodulátor díky schopnosti ovlivnit mnoho procesů účastnících se imunitní odpovědi (a to při nižších koncentracích). Zvyšuje expresi mediátorů účastnících se antivirové odpovědi. Inhibuje sekreci prozánětlivých cytokinů a sekreci molekul oxidačního stresu, inhibuje skládání inflamazomu a tím snižuje nebezpečí cytokinové bouře. Také má vliv na expresi selektinů, motilitu a chemotaxi prozánětlivých buněk, fagocytosu a degranulaci, což jsou všechno procesy důležité v boji proti patogenům, ale také mohou přispět k poškození vlastního organismu. Kolchicin tedy vykazuje nadějně protizánětlivé, antirevmatické a antifibrotické vlastnosti, a má tak obrovský potenciál v léčbě chronických zánětlivých onemocnění i onemocnění virového původu.

6 Isochinolinové alkaloidy

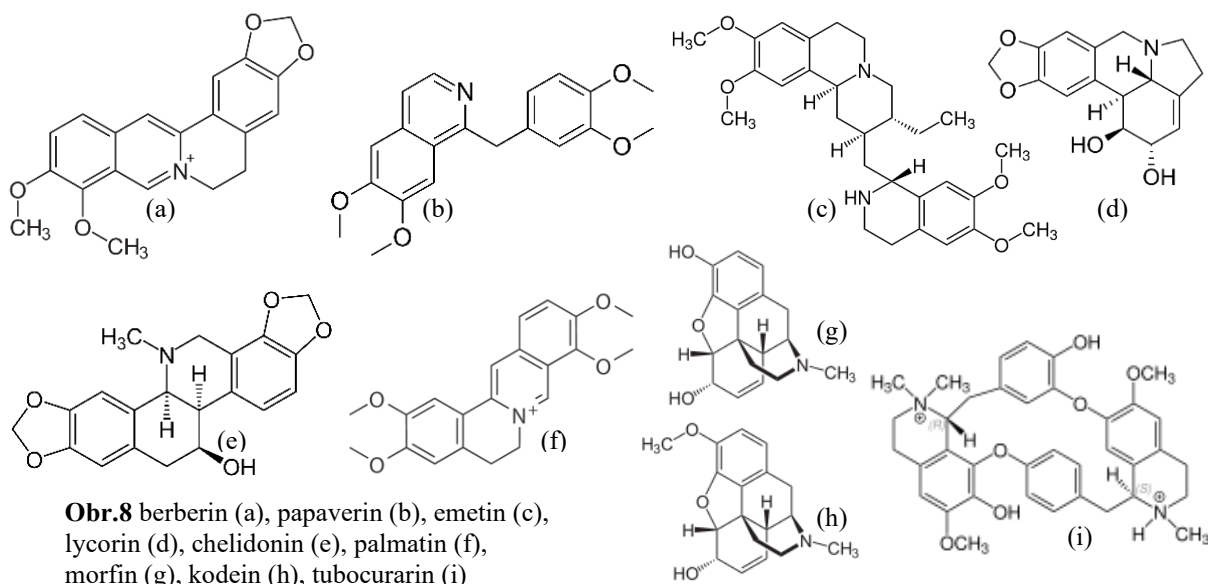
Isochinolinové alkaloidy jsou největší skupinou alkaloidů (Kukula-Koch & Widelski, 2017) čítající více než 2500 dosud známých látek (Ruff, 2012). Základní strukturou, od níž se všechny odvozují, je **isochinolin (Obr.7a)**, neboli benzo[c]pyridin, heterocyklická aromatická organická sloučenina odvozená fúzí benzenového jádra s pyridinovým kruhem, s atomem dusíku v poloze 2 (strukturní isomer chinolinu (Obr.7b), který má dusík v poloze 1).



Obr.7 isochinolin (a), chinolin (b)

Dále se tato skupina dělí na 8 podskupin: benzyloisochinolinové, aporphinové, protoberberinové, benzo[c]phenanthridinové, protopinové, ftalidisochinolinové, morphinanové a emetinové alkaloidy (Kukula-Koch & Widelski, 2017). Největší je podskupina protoberberinová, která tvoří až 25 % isochinolinových alkaloidů, což ji dělá nejrozsaáhlejší skupinou metabolitů obsahujících dusík v rámci přírodních produktů (Grycová et al., 2007). Nejrozšířenějším zástupcem protoberberinových i isochinolinových alkaloidů vůbec je **berberin (Obr.8a)**, jehož antivirové, ale i antimikrobiální, protizánětlivé, imunomodulační a mnohé další účinky (shrnuté v Neag et al., 2018) jsou intenzivně zkoumány. Dalšími isochinolinovými alkaloidy, u nichž byl účinek na virovou infekci zaznamenán, jsou například **papaverin (Obr.8b)**, **emetin (Obr.8c)** **lycorin (Obr.8d)**, **chelidonin (Obr.8e)** a **palmatin (Obr.8f)**. Kromě nich má isochinolinová skupina i další význačné zástupce, jako agonisty opioidních receptorů **morfin (Obr.8g)** a jeho methylderivát **kodein (Obr.8h)**, užívané jako analgetika, sedativa a antitusika. Nebo známý šípový jed **tubokurarin (Obr.8i)**, který je antagonistou nikotinového acetylcholinového receptoru, působí relaxaci svalů, což se používalo v chirurgii, ale bez mechanické ventilace i rychlou smrt udušením. Isochinolinové alkaloidy jsou produkovány rostlinami z několika čeledí. Vyskytují se téměř ve všech zástupcích čeledi *Papaveraceae*. Dále isochinolinové alkaloidy produkují zástupci z čeledí *Berberidaceae*, *Fumariaceae*, *Menispermaceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae*, *Annonaceae*, a několik druhů z čeledí *Magnoliaceae* a *Convolvulaceae*.

Antivirové účinky byly zkoumány u mnoha zástupců této skupiny alkaloidů. Například **chelidonin** je alkaloid, nalézající se především v mléce vlašovičniku většího (*Chelidonium majus*) z čeledi *Papaveraceae*, které je odpradávná známa a využíváno pro svou schopnost hojení bradavic, působených zejména virem z čeledi *Papillomaviridae* (Nawrot et al., 2020). Možným vysvětlením léčivého účinku chelidoninu na bradavice je vedle přímého antivirového působení i jeho schopnost indukovat apoptosu poškozených, patologicky pozměněných, transformovaných nebo maligních buněk (Kulp & Bragina, 2013). U dalšího alkaloidu z této skupiny, **palmatinu**, byly objeveny anti-virotické účinky proti viru západonilské horečky, viru horečky dengue a viru žluté zimnice z čeledi *Flaviviridae*. K potlačení replikace těchto virů zřejmě vede schopnost palmatinu specificky blokovat aktivitu jejich virové proteasy (Jia et al., 2010). **Lycorin** a **emetin** zase vykazují inhibiční efekt, kromě mnohých jiných virů, i proti virům z čeledi *Coronaviridae*, a proto by mohly přinášet naději v léčbě infekcí způsobených novým koronavirem SARS-CoV-2. Emetin má schopnost inhibovat vstup blízce příbuzného viru MERS-CoV do buňky (Shen et al., 2019). Nejlépe však byly antivirové účinky prozkoumány u isochinolinových alkaloidů papaverinu a berberinu.



6.1 Papaverin

Benzoisochinolinový opiový alkaloid papaverin (Obr.8b) s chemickým názvem 6,7-dimethoxy-1-veratryl-isochinolin se nachází vedle morfinu a kodeinu v opiu získávaném z máku setého (*Papaver somniferum*) z čeledi makovitých (*Papaveraceae*). Díky schopnosti působit relaxaci hladkých svalů se používá jako spasmolytikum k léčbě spasmů cév a vnitřních orgánů (trávicí soustavy, žlučovodu, močovodu), k uvolnění svalů během operací, ale také k léčbě poruch erekce a jako profylaxe migrény (Aggarwal et al., 2020).

Papaverin inhibuje enzym fosfodiesterasu, která štěpí cAMP (Triner et al., 1970). Inhibice tohoto enzymu vede k nárůstu intracelulární hladiny cAMP a z toho plynou důsledky působení papaverinu nejen na relaxaci svalů, ale i na virovou replikaci. Další možností, jak může papaverin indukovat relaxaci hladkého svalstva, je inhibice mitochondriální respirace anebo zvýšení intracelulární

hladiny Ca^{2+} vápenatých kationtů. To, jaký mechanismus se uplatňuje, záleží na typu hladkého svalstva (Kaneda et al., 1998).

Efekt papaverinu na virovou infekci byl zkoumán především u virů s RNA genomy, obzvláště pak u virů z čeledi *Paramyxoviridae*. Bylo publikováno několik studií, které se zabývaly vlivem papaverinu na replikaci viru spalniček z této čeledi. Virus spalniček napadá nervové buňky a může být příčinou rozvoje subakutní sklerózující panencefalitidy (SSPE). Jedná se o fatální, pomalu postupující nemoc CNS, objevující se většinou v dětském věku po prodělání akutní infekce virem spalniček, ustanovení persistence a následném relapsu (Miller & Carrigan, 1982). Bylo ukázáno, že při SSPE dochází v mozkových buňkách k poruše syntesy virového matrixového (M) proteinu. I když je mRNA pro M protein přítomna, nedochází k syntese funkčního M proteinu v buňce (Carter et al., 1983). M protein je nezbytný pro vznik infekčního virového potomstva. Váže nově vznikající nukleokapsidy k virovým glykoproteinům vnořeným v membráně a tím se účastní pučení viru z infikované buňky. Absence tohoto mechanismu (a tím znemožněná maturace virionu) plně vysvětluje hromadění velkého množství virových nukleokapsid uvnitř nervových buněk, což je charakteristický fenotyp pozorovaný při SSPE (Carter et al., 1983).

Persistence viru spalniček může být spojena se stavem diferenciaci nervových buněk. Bylo zjištěno, že se zvyšující se mírou diferenciaci buněk koreluje množství cAMP v nich (Prasad & Kumar, 1975). V terminálně diferencovaných buňkách je hladina intracelulárního cAMP vysoká, a naopak se snižuje, pokud buňka opět vstoupí do buněčného cyklu (Miller & Carrigan, 1982).

Neurony jsou buňky vysoce diferencované a specialisované, tudíž by v nich měla být hladina cAMP přirozeně vysoká, což bylo také experimentálně potvrzeno (Prasad & Kumar, 1975). Papaverin, jako inhibitor fosfodiesterasy, má navíc schopnost intracelulární hladinu cAMP zvyšovat, a tudíž může u viru spalniček podporovat přechod z akutní do persistentní infekce, ve které nedochází k replikaci viru. Především však může následně tento stav persistentní infekce pomoci udržet a zabránit tak reaktivaci viru. (Miller & Carrigan, 1982).

Po ošetření buněk infikovaných virem spalniček papaverinem byla pozorována především inhibice virové replikace a snížení produkce infekčního viru, provázené současně potlačením cytopatického efektu (Miller & Carrigan, 1982). Avšak konkrétní mechanismus inhibice replikace viru zůstává stále předmětem diskuse.

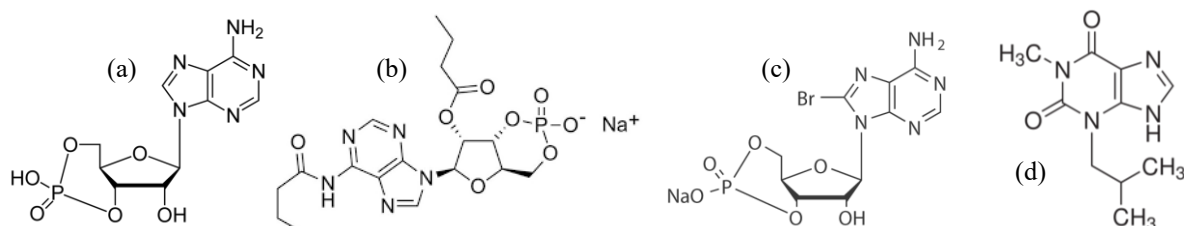
V buňkách ošetřených papaverinem bylo pozorováno selektivní vymizení matrixového (M) proteinu. Množství a rozmístění polymerasy (P), hemagglutininu a fúzního proteinu zůstaly nedotčeny. Na rozdíl od nukleokapsidového proteinu, jehož zvýšený výskyt byl zaznamenán v inkluzních těliscích v cytoplasmě, oproti buňkám infikovaným a neošetřeným, v jejichž cytoplasmě byl rozmístěn rovnoměrně (Miller & Carrigan, 1982).

Studie zkoumající přímý vliv hladiny cAMP na replikaci viru spalniček v lidských amniových buňkách AV3 zase pozorovala po přidání exogenního cAMP snížení exprese u proteinů M a P. Také bylo zjištěno, že nedochází k asociaci virových nukleokapsid s membránou a k pučení kompletních virů.

Z toho lze usuzovat, že exogenní cAMP inhibuje skládání virionů spalniček tím, že blokuje syntesu konkrétních virových proteinů (Robbins & Rapp, 1980).

Bližší zkoumání v lidských nervových buňkách potvrdilo, že látka inhibuje syntesu virových RNA, včetně genomové RNA a mRNA, avšak na samotnou translaci virových proteinů z mRNA inhibiční vliv nemá. Dále také blokuje fosforylaci virových proteinů. Vedle translace virových proteinů z mRNA nemá inhibiční vliv ani na jejich glykosylaci a transport glykoproteinů k buněčné membráně. Také brzké kroky virové replikace (adsorpce, penetrace, a uncoating) jsou papaverinem nedotčeny (Yoshikawa & Yamanouchi, 1984). Z těchto pozorování vyplývá, že papaverin inhibuje pouze virovou transkripci, a nikoli translaci.

Všechny studie potvrzují, že efekt papaverinu byl zcela reversibilní. Po odebrání látky se brzy obnovila virová syntesa, včetně exprese M proteinu (Miller & Carrigan, 1982). Ke stejnému efektu, obnovení virové syntesy, vedlo i přidání cyklického GMP (cGMP), které působí recipročně oproti cAMP (Miller & Carrigan, 1982). Podobný účinek na virovou replikaci jako cAMP (Obr.9a), avšak slabší, vykazovaly i jiné deriváty nukleosidů dibutyryl cAMP (Obr.9b), 8-bromo-cAMP (Obr.9c) a isobutylmethylxanthin (Obr.9d) (Miller & Carrigan, 1982).



Obr.9 cAMP (a), dibutyryl cAMP (b), 8-bromo-cAMP (c), isobutylmethylxanthin (d)

Dále z výsledků všech studií vyplývá, že papaverin selektivně inhibuje expresi některých virových proteinů, a to pravděpodobně na úrovni transkripce virových mRNA a nikoli jejich translace. Především brání vzniku M proteinu a tím pádem i na pučení virionů a vznik infekčního potomstva. Právě prevence pučení a tím i šíření viru z místa primární infekce by mohla být klíčová pro ochranu před infekcí CNS a ustanovením persistence. Pokud by k ustavení perzistence již došlo, může léčba papaverinem pomoci udržet v buňkách vysokou hladinu cAMP a tím zabránit reaktivaci viru.

Dalším studovaným paramyxovirem byl respirační syncytiální virus (RSV). I u něj ošetření papaverinem *in vitro* vedlo k inhibici replikace. Jako mechanismus byla podobně jako u viru spalniček uvažována inhibice fosfodiesterasy papaverinem a blokáce fosforylace virových proteinů (Wyde et al., 1989). Avšak *in vivo* při intraperitoneálním podání infikovaným křečkům se žádný efekt nedostavil. Po provedení výplachů plic a nosní dutiny u nich nebylo pozorováno žádné snížení množství viru v porovnání s infikovanými křečkami, jimž bylo podáno placebo. Vyšší dávky však již byly pro křečky toxické (Wyde et al., 1989). Přestože toto pozorování nevedlo k pozitivnímu závěru, mohla by mít schopnost papaverinu inhibovat replikaci RSV v léčbě infekcí tímto virem jistý potenciál.

Třetím Paramyxovirem, u kterého byl prokázán inhibiční účinek papaverinu byl virus Sendai. Ten podléhal stejným účinkům papaverinu, jako dva předchozí viry a tyto účinky byly též reversibilní po odebrání látky. Stejně jako u viru spalniček došlo k supresi replikace i transkripce virového genomu. Syntesa virových proteinů a jejich fosforylace se však (při použité koncentraci) jevíly normální, proteosyntesa byla pouze pomalejší z důvodu menší dostupnosti RNA. Při použití 5x větší koncentrace papaverinu však došlo i k selektivní inhibici fosforylace virového nukleoproteinu a fúzního proteinu (Ogura et al., 1987).

Virové strukturální proteiny asociované s membránou byly detekovány všechny v nezměněném množství a glykoproteiny HN a F0 byly exponovány na buněčném povrchu. Tato data naznačují, že papaverin přímo nepostihuje syntesu virových proteinů, ani jejich transport na membránu. Podobně jako u viru spalniček postihuje pučení viru z plasmatické membrány, ale působí v jiném kroku pučení než u viru spalniček (Yoshikawa & Yamanouchi, 1984). Také na rozdíl od viru spalniček u viru Sendai přidání exogenního cAMP nebo dibutyryl cAMP nemělo na replikaci viru žádný efekt a přidání cGMP nezvrátilo inhibici virové replikace způsobenou papaverinem. Účinek papaverinu na replikaci viru Sendai tedy může být jiný, než u viru spalniček a zřejmě nezahrnuje intracelulární změnu hladiny cAMP a inhibiční efekt papaverinu na aktivitu fosfodiesterasy (Ogura et al., 1987).

I když pochází z jiné čeledi, podléhal virus vesikulární stomatitidy z čeledi *Rhabdoviridae* stejnému účinku papaverinu jako virus spalniček. Ošetření buněk papaverinem před i po infekci virem vedlo až ke stonásobnému snížení jeho výtěžků (Mukherjee & Simpson, 1985). Efekt byl opět reversibilní, po odebrání látky se virová syntesa rychle obnovila. Také přidání cGMP zvrátilo účinek papaverinu a došlo k obnovení replikace viru. Podobně jako u viru spalniček papaverin též silně inhiboval produkci virové RNA a buněčné RNA i DNA. Také ovlivnil syntesu všech virových proteinů, ovšem bez vlivu na expresi buněčných proteinů. Zjevně nebyla blokována translace existujících buněčných mRNA. Papaverin má tedy silný inhibiční efekt na virovou biosyntesu včetně časné transkripce (Mukherjee & Simpson, 1985).

Nejnovější poznatky týkající se mechanismu antivirotických účinků papaverinu byly získány při zkoumání jeho účinků u viru chřipky (*Orthomyxoviridae*), konkrétně u kmenů A/WSN/33 (H1N1), A/Udorn/72 (H3N2), a B/Lee/40. Papaverin neměl žádný vliv na aktivitu virových proteinů hemagglutininu (HA) a neuraminidasy (NA) mimo buňky, ale v buňkách ošetřených papaverinem došlo k výraznému poklesu aktivity NA. V infikovaných buňkách nemělo ošetření papaverinem žádný vliv na přichycení a vstup viru, ani syntesu virové RNA. K inhibici virové replikace tak zřejmě dochází až v její v pozdní fázi. Byly pozorovány změny morfologie virionů. V přítomnosti papaverinu vznikaly převážně sferické viriony, zatímco v mediu bez papaverinu vznikaly viriony sférické a filamentární v téměř vyrovnaném poměru. Papaverin také měnil lokalizaci virového ribonukleoproteinu (RNP). Zatímco v infikovaných neošetřených buňkách se RNP nacházel převážně v cytoplasmě, v buňkách ošetřených papaverinem se nacházel v jádře. To naznačuje, že jeho transport do cytoplasmy byl blokován a tím pádem je pravděpodobně ovlivněna i morfogeneze virionu (Aggarwal et al., 2020).

V neposlední řadě byl efekt papaverinu sledován i u viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV, *Retroviridae*) Po přidání papaverinu nebyla detekována aktivita virové reversní transkriptasy, ani přítomnost kapsidového proteinu p24. Po krátkém čase (60h) byla ovlivněna syntesa prekurzoru env – gp160, respektive gp160 nebyl detekován vůbec, pouze malá množství env proteinů gp120 a gp41, které asi vznikly naštěpením veškerých de novo syntetisovaných gp160. Z core proteinů byl redukován jen precursor p53. Důvod selektivity papaverinu v inhibici env vs. core proteinů však nebyl objasněn. Pokles proteosyntesy se týkal pouze exprese virových, ale ne buněčných proteinů. Z výsledků vyplývá, že papaverin působí na pozdní fáze replikace viru HIV, pravděpodobně na kroky následující po reversní transkripci (Turano et al., 1989).

Efekt papaverinu byl dále zkoumán také u virů s DNA genomy, konkrétně u lidského cytomegaloviru (HCMV) z čeledi *Herpesviridae*. Papaverin inhiboval replikaci viru nezávisle na použitých buňkách, zatímco buněčná životaschopnost nebyla ovlivněna. Stejně jako u ostatních virů, byl inhibiční efekt reversibilní a ošetření buněk před infekcí nemělo žádný profylaktický účinek. Největšího efektu bylo dosaženo, byl-li papaverin přidán 6 h po infekci (p.i.) během buněčné kontraktilní fáze, před zahájením relaxace a zvětšování – pozdní fáze buněčné odpovědi na infekci HCMV. Pokud byla látka přidána později, nedosáhla inhibice plného rozsahu. Mechanismem, který je uvažován v souvislosti se schopností papaverinu ovlivňovat infekci HCMV, je opět zvýšení hladiny cytosolického cAMP v důsledku inhibice fosfodiesterasy papaverinem (Albrecht et al., 1987).

Účinek papaverinu nebyl zkoumán u žádného neobaleného viru, ani u virů s +ssRNA genomy. Není však sebemenších pochyb, že papaverin působí na -ssRNA obalené viry jako paramyxoviry, orthomixoviry a rhabdoviry, dokonce zřejmě též na obalené viry s dsDNA genomy. U nich je zřejmě ve většině případů mechanismem účinku schopnost papaverinu inhibovat fosfodiesterasu, štěpící intracelulární cAMP a tím zvyšovat jeho hladinu v buňce.

Společným výsledkem všech studií je pozorování, že efekt papaverinu je reversibilní a po odebrání látky dochází k rychlému obnovení virové replikace. Tento fakt je plně v souladu s tvrzením, že účinek papaverinu se vztahuje na virovou replikaci závislou na hostitelských faktorech jako intracelulární hladina cAMP (Miller & Carrigan, 1982). Samotný virus není látkou postižen, ale hostitelské faktory a jejich funkce potřebné pro jeho produktivní infekci jsou po odebrání látky obnoveny a virus může pokračovat ve své replikaci (Mukherjee & Simpson, 1985). Dalším důkazem podporujícím tuto domněnku je fakt, že přidání cGMP, které má reciproční účinek oproti cAMP vedlo též k obnovení virové replikace (Miller & Carrigan, 1982).

6.2 Berberin

Berberin (Obr.8a), celým chemickým názvem 5,6-dihydro-9,10-dimethoxybenzo[g]-1,3-benzodioxolo [5,6-a]quinolizinium, je kvarterní amoniová sůl náležící do protoberberinové podskupiny benzylisochinolinových alkaloidů.

Berberin je nejrozšířenějším zástupcem protoberberinových alkaloidů, které tvoří až čtvrtinu největší – isochinolinové podskupiny alkaloidů. To z něj dělá pravděpodobně nejzastoupenější alkaloid vůbec. Je obsažen v mnoha rostlinách náležících do různých čeledí z řádů pryskyřníkotvaré (*Ranunculales*) a mýdelníkotvaré (*Sapindales*), jako: dříšťál obecný (*Berberis vulgaris*), dříšťál osinatý (*Berberis aristata*) a mahónie cesmínolistá (*Mahonia aquifolium*) z čeledi dříšťálovité (*Berberidaceae*), vodilka kanadská (*Hydrastis canadensis*), žlutokořen jednoduchý (*Xanthorhiza simplicissima*) a koptis čínský (*Coptis chinensis*) z čeledi pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*), vlašovičnick větší (*Chelidonium majus*), pleskanka mexická (*Argemone mexicana*) a sluncovka kalifornská (*Eschscholzia californica*) z čeledi makovité (*Papaveraceae*), korkovník amurský (*Phellodendron amurense*) z čeledi routovité (*Rutaceae*), nebo chebule srdčitá (*Tinospora cordifolia*) z čeledi lunoplodovité (*Menispermaceae*). Nachází se především v jejich kořenech, stoncích a popřípadě kůře.

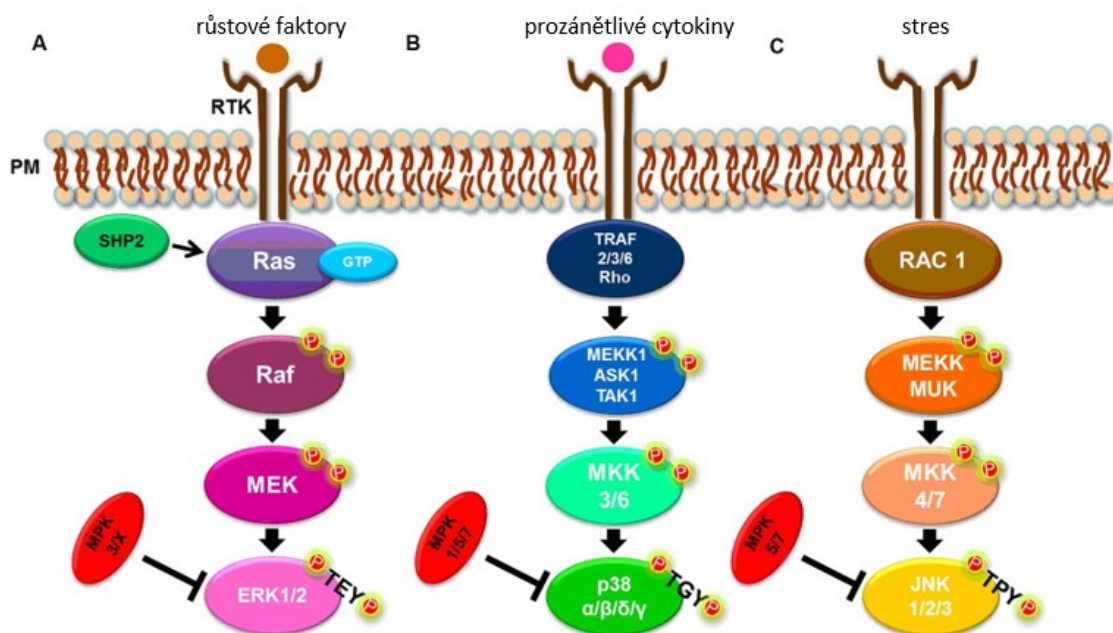
Po mnoho staletí je součástí ayurvédské a tradiční čínské lidové medicíny pro své protizánětlivé a antimikrobiální účinky (Wu et al., 2011). V poslední době se však portfolio jeho známých účinků značně rozšiřuje. Byly u něj prokázány mimo jiné protirakovinné, imunomodulační, antioxidační, kardioprotektivní, hepatoprotektivní a protidiabetické účinky (shrnuto v Neag et al., 2018).

Antivirotické účinky berberinu byly pozorovány u celé škály virů, a to s RNA i DNA genomem, obalených i neobalených.

U obalených virů s +ssRNA genomem z čeledi *Togaviridae* byl doložen jasný inhibiční účinek berberinu u viru chikungunya (CHIKV), Semliky forest viru a Sindbis viru. U CHIKV bylo zjištěno, že berberin inhibuje syntesu virové RNA, a to jak genomové, tak i antigenomové. Dále byla redukována také exprese virových proteinů. Nejlepších výsledků v potlačení virového titru bylo dosaženo, pokud byl berberin přidán později ve virovém cyklu, proto zřejmě (kromě RNA syntesy) ovlivňuje též některou z pozdních fází virového replikačního cyklu (Varghese et al., 2016a).

Další studie, se zabývaly vlastním mechanismem působení berberinu na CHIKV. Výsledky studie ukázaly, že berberin cílí na MAP kinasovou signalisaci, dokonce na všechny její 3 větve (p38MAPK, ERK a JNK, Obr.11), kterou CHIKV během své replikace dereguluje. Po infekci CHIKV dochází ke dvojnásobnému nárůstu fosforylace MAP kinas ERK, p38 mitogen-activated protein kinasy (p38MAPK) a c-Jun N-terminální kinasy (JNK). Dále k trojnásobnému nárůstu fosforylace transkripčního faktoru c-Jun, který je substrátem kinas ERK i JNK. V buňkách infikovaných CHIKV je také zvýšená fosforylace tumor supresoru p35 (substrát p38 MAPK) a Akt kinasy, která je součástí PI3K-Akt dráhy. Fosforylace všech těchto signalizačních komponent byla berberinem snížena zpět na původní hladinu, v čemž spočívá právě jeho inhibiční účinek na infekci virem CHIKV, mající za následek výrazné snížení virové exprese a virových titrů. Hlavním molekulárním cílem berberinu je

zřejmě ERK větev MAP kinasové signalisace, protože berberin silně redukoval aktivaci ERK. Dle hypotézy autorů studie berberin ovlivňuje proces „upstream“ od finálního efektoru MAP kinasové dráhy a má pleiotropní molekulární cíle, spíše než jeden cílový faktor, čemuž napovídá i jeho nízká toxicita (Varghese et al., 2016b). Kromě toho také tato studie dokázala, že berberin nemá vliv na vstup viru do buňky, a také že mechanismem jeho účinku není inhibice replikační aktivity virového replikačního komplexu. To také podporuje tvrzení, že berberin přímo neinteraguje s komponentami viru, ale jeho infekci ovlivňuje nepřímo přes hostitelské buněčné faktory. Redukce virové exprese proteinů a virových titrů je pak následek redukce virem indukované signalisace (Varghese et al., 2016b).



Obr.11 Zjednodušené schéma 3 větví MAPK signalizačních drah. (A) ERK1/2 dráha. (B) p38 α, β, δ a γ dráhy. (C) JNK 1, 2 a 3 dráhy. Převzato a upraveno ze Soares-Silva et al. (2016).

Effekt berberinu na infekci CHIKV byl navíc potvrzen *in vivo* experimenty na C57BL/6 myších, kterým byl počínaje 1.dnem po infekci (p.i.) denně intraperitoneálně podáván berberin. Již 2.den p.i. byla pozorována redukce otoku kloubů snížení virové nálože a množství virové RNA v krvi v porovnání s kontrolními jedinci. Dále bylo pozorováno výrazné snížení zánětu kloubů, přičemž došlo ke zlepšení stavu srovnatelné se stavem kloubů před infekcí, k čemuž u neléčených myší nedošlo. Pozitivní účinek berberinu se však projevil jen pokud byla látka podána do 6.dne p.i.. Z toho lze též soudit, že berberin funguje jako časné antivirotikum, kontroluje virovou nálož v časně fázi infekce, a tudíž podání po 6.dni p.i. již nemá na průběh infekce efekt (Varghese et al., 2016b).

Další virovou čeledí, u které byl zkoumán vliv berberinu na replikaci viru byla čeleď *Flaviviridae*. I když Varghese et al. (2016a) nepozorovali žádný efekt berberinu na replikaci viru žluté zimnice, u jiných flavivirů, jako virus Zika (ZIKV) nebo virus hepatitidy C (HCV) efekt potvrzen byl.

Berberin má na ZIKV virucidní efekt. V buňkách Vero ošetřených berberinem byla pozorována redukce infekтивности ZIKV o 77.6 %. Ošetření buněk berberinem před infekcí nemělo žádný vliv na vstup viru. Bylo ale zjištěno, že berberin interaguje s virovými částicemi v roztoku a virové částice narušuje.

Z toho vyplývá, že berberin přímo inaktivuje virus ještě před přichycením na buňku, a proto by mohl být použit profylakticky (Batista et al., 2019).

Dalším zkoumaným flavivirem byl HCV. V infikovaných Huh-7.5 buňkách ošetřených berberinem byla pozorována inhibice replikace HCV. Berberin vykazoval vliv na časné fáze replikačního cyklu viru. Virus sice nebyl látkou inaktivován, ale látka blokovala přichycení viru a vykazovala též schopnost inhibovat fúzi viru s membránou endosomu. Kroky následující po vstupu viru, jako replikace, však už byly z repertoáru účinků berberinu vyloučeny, stejně jako indukce antivirové odpovědi. Absence rozdílu v expresi receptorů a koreceptorů HCV v ošetřených i neošetřených buňkách napověděla, že berberin neovlivňuje hostitelské buněčné faktory. Analýza metodou „molecular docking“ však potvrdila, že místo toho jsou cílem berberinu E1 a E2 obalové glykoproteiny viru. Právě vazba na tyto glykoproteiny vede k dříve pozorované inhibici přichycení a vstupu viru do buněk (Hung et al., 2019).

Účinek berberinu byl popsán i u coxsackie viru B typu 3 (CVB3) z čeledi *Picornaviridae*. Tento virus je hlavní etiologickou příčinou myokarditidy, což je zánětlivé srdeční onemocnění, které vzniká v důsledku kombinace virových procesů a imunitní odpovědi hostitele (Esfandiarei & McManus, 2008).

I replikace tohoto viru byla berberinem inhibována, za současného snížení cytotoxických projevů infekce virem na buňkách. V infikovaných ošetřených buňkách byla pozorována inhibice exprese virového proteinu VP1 a také jeho mRNA. Dále bylo redukováno i množství virových dsRNA, což napovídá, že berberin má vliv na syntesu virových RNA. Mechanismus inhibice replikace viru je v tomto případě podobný jako u viru CHIKV. Berberin inhibuje fosforylaci (aktivaci) MAP kinas JNK a p38, které jsou indukované virovou replikací následující po vstupu viru do buňky (Dai et al., 2017).

Působení berberinu na infekci CVB3 bylo v následujícím experimentu ověřeno i *in vivo*. Podávání látky výrazně zvýšilo přežití myši oproti myším neléčeným. Berberin chránil myši před rozvojem srdečních lézí, redukoval otok srdce a snižoval výskyt nekros myokardu. Berberin tedy myši chránil před poškozením srdce a jeho dysfunkcí. Tato ochranná funkce zřejmě vychází ze samotné schopnosti berberinu inhibovat replikaci CVB3, která přímo vede k poškození myokardu (Dai et al., 2020). U myši, kterým byl podáván berberin, došlo též ke snížení množství prozánětlivých cytokinů a chemokinů TNF- α , IL-6, IL-1 β , CCL2, CCL5 a CXCL10. Dále byl v myokardu těchto myši pozorován nižší výskyt infiltrujiících CD68⁺ makrofágů, jejichž nadměrná aktivace vede právě k produkci prozánětlivých mediátorů a rozvoji zánětem způsobených srdečních lézí. Ovšem další zkoumaný faktor – poměry CD4⁺/CD3⁺ T lymfocytů a CD8⁺/CD3⁺ T lymfocytů ve slezinách léčených i neléčených myši byly srovnatelné. Berberin tedy výrazně nemění antivirovou aktivitu zprostředkovanou T lymfocyty, jejíž navýšení by mohlo přispět k redukcí poškození tkání v důsledku replikace CVB3 (Dai et al., 2020). I přesto je přínos berberinu při léčbě infekce CVB3 v podobě snížení úmrtnosti a poškození srdce nepopíratelný.

Další studie se zabývaly vlivem berberinu na replikace virů s -ssRNA genomy. Účinky berberinu na replikaci viru byly testovány u viru chřipky z čeledi *Orthomyxoviridae* a u respiračního syncytiální viru (RSV) z čeledi *Paramyxoviridae*.

Poprvé byla antivirová aktivita berberinu proti viru chřipky potvrzena na kuřecích vejcích, v nichž soli berberinu inhibovaly růst viru chřipky na alantoidních membránách (Lesnau et al., 1990). Následovalo několik pokusů provedených *in vitro* na různých buněčných liniích. Zatímco v některých buněčných liniích byly pozorovány silné inhibiční účinky berberinu na replikaci viru chřipky (Botwina et al., 2020; Cecil et al., 2011), v jiných, např. MDCK buňkách (psí ledvinné buňky), byl efekt berberinu na replikaci viru chřipky sporný (Botwina et al., 2020; Cecil et al., 2011; Wu et al., 2011). Odlišné výsledky pozorování byly zřejmě způsobeny rozdíly v použitých koncentracích látky. Ve studiích, které efekt na replikaci viru pozorovaly, byly totiž použity vyšší koncentrace berberinu oproti těm, které efekt nepozorovaly (Botwina et al., 2020).

Již pozorování, že efekt berberinu je v různých buňkách odlišný naznačuje, že látka neinterferuje se samotným virem, ale s buněčnými faktory, které jsou pro replikaci viru důležité. Další analýzy ukázaly, že látka neinteraguje přímo s virem, jeho vstupem, rozbalením virionu nebo replikací genomu, avšak mohla by mít vliv na skládání virionů, maturaci virionů nebo opuštění buňky (Botwina et al., 2020). Berberin také neovlivňuje transkripci a translaci virových mRNA. Neinterferuje ani s produkcí virových genomových RNA. (Cecil et al., 2011).

Dále bylo pozorováno, že přidání berberinu k buňkám infikovanými s nízkou multiplicitou infekce (MOI) vedlo k silné inhibici exprese 4 virových proteinů – hemaglutininu (HA), neuraminidázy (NA), nukleoproteinu (NP) a matrixového proteinu (M), avšak při vysokých MOI neměla látka efekt na expresi žádného z virových proteinů. Z toho lze usuzovat, že pozorovaný účinek na syntesu proteinů nepramení z její vlastní blokace v jednotlivých buňkách, ale spíše z inhibice šíření viru v buněčné kultuře a že berberin zřejmě interferuje s fázemi virového replikačního cyklu následujícími až po translaci virových proteinů (Cecil et al., 2011).

Možnými kandidáty na procesy, se kterými by berberin mohl interferovat, jsou tedy vnitrobuněčný pohyb nově syntetizovaných virových proteinů a jejich maturace. Studie zaměřující se na intracelulární transport virového HA odhalila změnu buněčné lokalizace HA po ošetření berberinem. Místo na buněčném povrchu, kde by se HA nacházel v neošetřených infikovaných buňkách, se HA v infikovaných buňkách ošetřených berberinem vyskytoval spíše intracelulárně. To naznačuje, že berberin může způsobovat blokaci intracelulární translokace HA a jeho přesunu k povrchu, nebo také může ovlivňovat zaujmutí správné sekundární a terciální struktury HA a jeho následné hromadění uvnitř buňky (Cecil et al., 2011). Kromě efektu berberinu na HA bylo také pozorováno dramatické snížení aktivity virové NA (Wu et al., 2011).

Dalším mechanismem, kterým berberin může replikaci viru chřipky inhibovat, je snížení aktivity MAPK/ERK signální dráhy. V buňkách ošetřených berberinem byla 12 h p.i. pozorována výrazná akumulace virových RNP komplexů uvnitř jádra, přičemž stejný fenomén byl pozorován i

v buňkách, k nimž byl přidán inhibitor MAPK/ERK dráhy U0126 (Botwina et al., 2020). Shodný výsledek působení naznačuje, že obě látky působí na replikaci viru stejným mechanismem. Následná analýza ukázala na inhibici aktivace kinasy ERK jak v buňkách ošetřených berberinem, tak v buňkách ošetřených inhibitorem U0126. Z těchto pozorování vyplývá, že berberin nemá vliv přímo na skládání virových částic nebo uvolnění virionů, ale na buněčné faktory, a to konkrétně MAPK/ERK signální dráhu (Botwina et al., 2020). Tato dráha je potřebná pro export virových RNP komplexů z jádra do cytoplasmy, kde se stávají součástí nově vznikajících virionů (Botwina et al., 2020; Pleschka et al., 2001). Jedná se pravděpodobně o stejný mechanismus, jakým na replikaci viru chřipky působí papaverin.

Na inhibici replikace viru chřipky se podílí také schopnost berberinu ovlivňovat další větev MAP kinasových drah – p38 MAPK. Infekce virem chřipky stimuluje Toll-like receptor 4 (TLR-4), který indukuje aktivaci p38 MAPK nezbytné pro úspěšnost časných kroků virové infekce. Interakce virových glykoproteinů s TLR-4 je vedle vazby na receptor součástí první interakce viru s hostitelskou buňkou, a i když vede k aktivaci drah přirozené imunity, je nutná pro úspěšnou internalizaci a vstup viru do buňky (Marchant et al., 2010). A právě fosforylaci a aktivaci této kinasy berberin snižuje a tím znemožňuje úspěšný průběh replikačního cyklu viru chřipky (Shin et al., 2015).

Následně bylo antivirotické působení berberinu testováno také v *in vivo* modelu. U myši infikovaných virem chřipky přispěl berberin ke snížení mortality z 90 % na 55 %. Kromě navýšení průměrné délky dožití měla léčba berberinem za následek snížení virového titru a patologických změn v myších plicích. Myši léčené berberinem měly výrazně lepší plicní histologické skóre (Wu et al., 2011). Navíc berberin bránil váhovému úbytku myši indukovanému virovou infekcí (Yan et al., 2018).

Berberin výrazně snižoval hladiny mRNA i proteinů Toll-like receptoru 7 (TLR-7), adaptorového proteinu MyD88 a NF- κ B(p65) účastnících se signalisace přes TLR-7, jehož aktivace během infekce vede k produkci prozánětlivých cytokinů. V plicích virem infikovaných myši byla detekována berberinem snížená exprese prozánětlivých cytokinů IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α a naopak zvýšená exprese protizánětlivého IL-4. S tímto pozorováním koresponduje schopnost berberinu snižovat hladinu NF- κ B, který indukuje produkci prozánětlivých cytokinů IFN- γ , TNF- α . Tento efekt může tedy bránit vzniku cytokinové bouře. (Yan et al., 2018).

Dalším studovaným faktorem byla produkce molekul působících oxidační stres – oxidu dusnatého a inducibilní syntetasy oxidu dusnatého. Produkce těchto molekul byla berberinem potlačena 2., 4., i 6. den p.i. a 2. a 4. den p.i. byla dokonce nižší než v kontrolní, virem neinfikované skupině. Také byla inhibována transkripce a exprese TNF- α a MCP-1 (specifický chemoatraktant pro monocyty). Inhibiční vliv berberinu na prozánětlivé substance byl však inkonzistentní se změnami virových titrů. Z těchto výsledků lze usuzovat, že berberin nezlepšuje patogenní změny jen inhibicí virové infekce (přímý antivirotický efekt), ale také vlastní protizánětlivou aktivitou (Wu et al., 2011).

V neposlední řadě byl prozkoumán vliv léčby berberinem na úroveň buněčné imunitní odpovědi v infikovaném jedinci. Bylo zjištěno, že berberin brání iniciaci T buněčné odpovědi. Dosahuje toho tím,

že suprimuje expresi TLR-7/NF- κ B signalizačních molekul a také inhibuje virovou replikaci, která T buněčnou odpověď indukuje. Po infekci virem došlo k výraznému nárůstu Th1 a Th17 lymfocytů, ale berberin množství těchto lymfocytů snižoval zpět na původní množství. U myši léčených berberinem se tedy nerozvinula T buněčná odpověď, která by mohla přispět ke zhoršení imunopatologického poškození infikovaných myších plic. Berberin tudíž chrání plíce nejen před poškozením vlastní virovou replikací, ale především před nepříznivými účinky vlastní imunitní reakce, a to jak T-buněčné, tak způsobené protizánětlivými cytokiny (Yan et al., 2018).

Stejný mechanismus inhibice replikace jako u viru chřipky, zahrnující p38 MAPK, se uplatňuje i u respiračního syncytiálního viru (RSV) z čeledi *Paramyxoviridae*. V infikovaných buňkách byl nejprve prokázán významný antivirotický účinek berberinu na RSV bez výrazné cytotoxicity. (Shin et al., 2015). Především však byla pozorována schopnost berberinu snižovat fosforylaci p38 MAPK, kterou RSV, stejně jako virus chřipky, indukuje stimulací TLR-4. Díky inhibici aktivace p38 MAPK, která je potřebná v časných fázích virového cyklu pro rozbalení virionu, byly tyto rané kroky infekce berberinem potlačeny. V cytoplasmě buněk nebyl pozorovatelný virový nukleoprotein, což ukazuje, že nedošlo k úspěšnému rozvolnění virionu a uvolnění obsahu virionu do cytoplazmy (Marchant et al., 2010). Suprese virem zprostředkované aktivace p38 MAPK pomocí berberinu tedy blokuje rané kroky virového cyklu a tím i průběh celé virové infekce. Navíc ještě potlačuje virem indukovanou prozánětlivou odpověď, což potvrzuje pozorované snížení exprese IL-6 (Shin et al., 2015).

Kromě početného zástupu RNA virů má berberin vliv i na replikaci DNA virů. Vliv berberinu na jejich replikaci byl zkoumán zejména u zástupců z čeledi *Herpesviridae*. Jako první byl potvrzen účinek chloridu berberinu na β -Herpesvirus, lidský cytomegalovirus (HCMV). Bylo zjištěno, že berberin neinhibuje penetraci ani adsorpci viru a také, že působí v dřívějších fázích virové replikace než inhibitor DNA polymerasy ganciclovir. Z těchto pozorování byl vyvozen závěr, že berberin interferuje s intracelulárními událostmi následujícími po virové penetraci, ale předcházejícími replikaci DNA (Hayashi et al., 2007).

Další studie rozšířila poznatky o inhibičních účincích berberinu na replikaci HCMV. A to v první řadě o zjištění, že berberin inhibuje replikaci různých kmenů HCMV, a to i kmenů rezistentních na běžně užívaná léčiva (Luganini et al., 2019).

Bylo potvrzeno, že berberin inhibuje replikaci virového genomu, a proto zřejmě ovlivňuje fázi virového replikačního cyklu, která předchází vlastní replikaci virové DNA. Toto tvrzení bylo dále rozšířeno o domněnku, že látka ovlivňuje fázi cyklu následující po expresi bezprostředně časných genů. Tato hypotéza vyplynula z pozorování, že berberin neovlivnil syntesu bezprostředně-časných proteinů IE1 a IE2, ale redukoval hladinu časného proteinu UL44 a pozdního proteinu UL99. Navíc také interferoval s IE2-dependentní transaktivací promotoru esenciálního virového časného genu UL54 a efektivně inhiboval IE2-dependentní transaktivaci promotoru buněčného cyklinu E. Z toho vyplývá, že tento alkaloid inhibuje IE2-dependentní transaktivaci virových i buněčných genů. Následně bylo ještě potvrzeno, že berberin není obecným inhibitorem virové a buněčné transkripce, ale specificky

zprostředkuje inhibici IE2-dependetní transaktivační aktivity. Toto zjištění je tedy v souladu s prvotní domněnkou, že berberin ovlivňuje fázi virového replikačního cyklu následující po expresi bezprostředně časných genů (Luganini et al., 2019). Berberin narušuje replikaci HCMV *in vitro* tím, že brání syntese DNA a expresi časných a pozdních genů prostřednictvím interference s transaktivační aktivitou virového IE1 proteinu.

Inhibiční efekt berberinu se vztahuje i na myší cytomegalovirus (MCMV) a působí na něj stejným mechanismem jako na HCMV. Exprese IE3 (IE3 protein MCMV je strukturní a funkční homolog IE2 proteinu HCMV) navýšila aktivitu E1 promotoru – berberin tuto IE3-dependetní transaktivaci promotoru genu E1 redukoval (Luganini et al., 2019).

Dalšími zkoumanými Herpesviry byly herpes simplex virus 1 a 2 (HSV-1 a HSV-2), které se řadí do podčeledi *α -Herpesvirinae*.

Stejně jako u HCMV, berberin u HSV neinhiboval adsorpci viru ani penetraci. Dále také inhiboval syntesu pozdních proteinů (glykoproteinů gB a gE) u HSV-1 i HSV-2. Tato pozorování jsou v souladu s výsledky získanými studiem HCMV (Hyashi et al 2007) a to, že berberin zřejmě interferuje s virovým replikačním cyklem někde mezi penetrací viru a syntesou DNA (Chin et al., 2010).

Další studie se zabývala mechanismem inhibice. Berberin inhiboval virovou replikaci a virem způsobený cytopatický efekt v HEC-1-A buňkách (buňky odvozené od lidského adenokarcinomu děložní výstelky), a to jak v případě HSV-1, tak HSV-2. Stejný efekt byl pozorován i v ledvinných HEK293T buňkách, což vedlo autory studie k závěru, že inhibiční efekt berberinu není závislý na zvolené buněčné linii. Navíc berberin projevoval synergistický efekt s acyklovirem v potlačení virové replikace (Song et al., 2014).

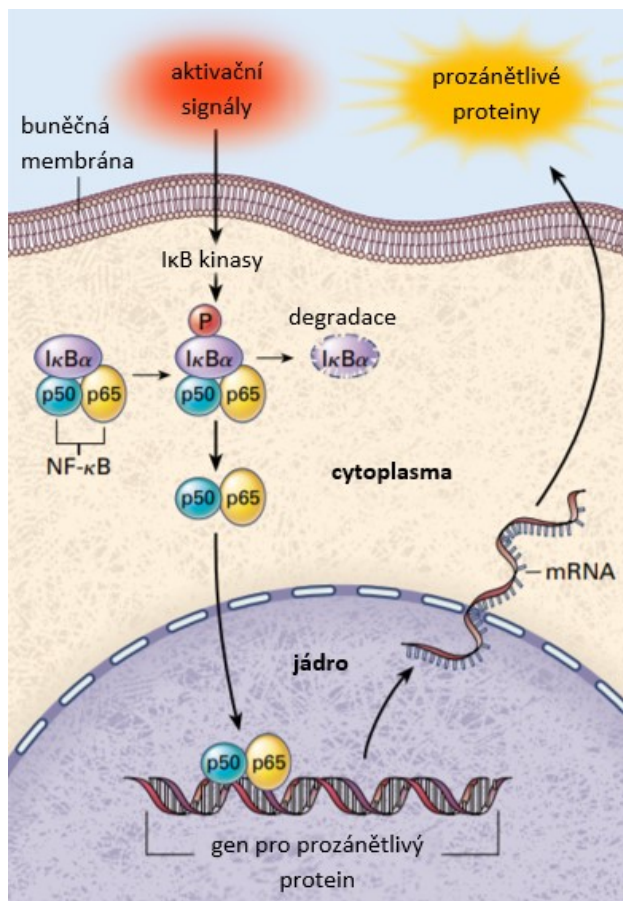
Obdobně jako u HCMV, byla berberinem inhibována exprese pozdních genů HSV gD a VP5 (hlavní kapsidový protein), a to jak na úrovni mRNA, tak proteinu. Avšak, na rozdíl od HCMV, berberin inhiboval u HSV i expresi bezprostředně časného genu ICP4. Následně bylo potvrzeno, že berberin, specificky inhibuje expresi z promotoru ICP4. Z pozorování vyplývá, že berberin inhibuje replikaci HSV interferencí s expresí bezprostředně časných genů (Song et al., 2014).

Berberin ovlivňoval expresi i dalších genů – inhiboval expresi bezprostředně časného genu ICP27 a kompletně blokoval expresi časného genu ICP8. Protein ICP8 váže ssDNA a je potřebný pro replikaci virové DNA. Produkty bezprostředně časných genů ICP4 a ICP27 jsou dva hlavní transkripční aktivátory HSV, které modulují expresi časných a pozdních genů. Jestliže tedy berberin zastaví expresi IE genů ICP4 a ICP27, dojde také k inhibici exprese časných (ICP8) a pozdních (ICP5 a gD) genů a tím i k redukcí infekitivity HSV a inhibici jeho replikace. (Song et al., 2014).

Pátrání po molekulárním mechanismu, kterým berberin inhibuje replikaci HSV, ukázalo, že berberin inhiboval aktivaci dráhy NF- κ B (Obr.12), která je indukována HSV infekcí. Dále blokoval degradaci I κ B a bránil jaderné translokaci p65. Blokáci HSV-indukované aktivace NF- κ B berberin inhibuje i replikaci HSV. NF- κ B je transkripční faktor zprostředkující imunitní, zánětlivé a antiapoptotické odpovědi, virem-indukovaná aktivace NF- κ B vede k produkci cytokinů. Avšak jeho aktivace mimo jiné slouží k udržení hostitelské buňky při životě během lytické fáze virového cyklu (Patel et al., 1998). Během infekce HSV dochází k perzistentní jaderné translokaci a aktivaci NF- κ B, která je nezbytná pro replikaci viru, pravděpodobně hraje roli ve skládání kapsid a maturaci virionů. Berberin tedy inhiboval aktivaci NF- κ B a tím pádem i snižovat expresi IL-8 a TNF- α v HSV infikovaných buňkách. (Song et al., 2014).

Kromě signalizační dráhy NF- κ B inhiboval berberin v infikovaných buňkách i aktivaci JNK dráhy. JNK a p38 MAPK jsou další signalizační dráhy důležité pro replikaci HSV. Podobně jako u některých RNA virů došlo v infikovaných buňkách ošetřených berberinem k inhibici aktivace JNK indukované infekcí HSV. Berberin zabránil fosforylaci aktivátoru JNK a zároveň také fosforylaci c-Jun, což je substrát JNK. Naopak a na rozdíl od RNA virů, ke snížení fosforylace p38 MAPK vlivem berberinu nedošlo. I přes to má však berberin dostatečný anti-herpesvirový potenciál díky modulaci signalizačních drah NF- κ B a JNK, což dokazuje i redukováná exprese prozánětlivých cytokinů v berberinem ošetřených infikovaných buňkách (Song et al., 2014).

Třetím Herpesvirem, u kterého byl zkoumán vliv berberinu na průběh replikačního cyklu byl virus Epstein-Barrové (EBV), který je řazen mezi γ -herpesviry. EBV je původcem nádorových onemocnění člověka, kromě jiných způsobuje rakovinu nosohltanu (nasopharyngeal carcinoma, NCP). Buňky NCP jsou odvozeny od buněk nosního a krčního epitelu, v nichž virus EBV po infekci ustanovil latentní fázi typu II. Ve stavu latence typu II dochází k expresi virových proteinů EBNA 1 (Epstein-Barr



Obr.12 Schema aktivace NF- κ B. Aktivace NF- κ B vyžaduje současnou fosforylaci a proteolytickou degradaci proteinu I κ B, který je inhibítoem NF- κ B, pomocí specifických I κ B kinas. Volný NF- κ B (tj. heterodimer p50 a p65) poté může vstoupit do jádra a vázat se zde na specifická κ B místa v promotorových oblastech genů pro prozánětlivé proteiny jako cytokiny, enzymy a adhezivní molekuly. Převzato a upraveno z Barnes & Karin (1997).

nuclear antigen 1), latentních membránových proteinů (LMP1, LMP2A a LMP2B) a několika malých nekódujících RNA, které způsobí nádorovou transformaci infikovaných buněk (Wang et al., 2017).

Berberin snižoval viabilitu EBV-pozitivních buněčných linií HONE1 a HK1-EBV (odvozené od NCP) tak, že v těchto buněčných liniích indukoval zástavu buněčného cyklu a apoptosu. Naopak u EBV-negativních HK2 buněk berberin pouze slabě inhiboval proliferaci. Berberin v HONE1 i HK1-EBV buňkách snižoval expresi EBNA1 a také bylo pozorováno, že snižuje poločas života EBNA1 proteinu. Expresi dalšího proteinu udržujícího latenci, LMP1, však nebyla snížena ani v jednom buněčném typu, stejně jako jeho mRNA a množství štěpené kaspasy 3 bylo také beze změny (Wang et al., 2017).

Dále bylo pozorováno, že berberin snížil aktivitu virového Q promotoru, z něž je iniciována transkripce proteinu EBNA1. Tento promotor je regulován JAK-STAT signalizační dráhou. Protein STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) je esenciální pro aktivaci Q promotoru a zároveň aberantní aktivace STAT3 je příčinou tumorigeneze EBV (Chen et al., 2001). Berberin však suprimoval expresi STAT3 v HONE1 i HK1-EBV buňkách a tím i aktivaci Q promotoru a transkripční aktivitu EBNA1. Schopnost berberinu snižovat expresi EBNA1 tedy pramení z inhibice STAT3 dráhy (Wang et al., 2017).

Berberin dále snížil latentní i lytickou replikaci EBV. Expresní hladiny EBV transkripčního aktivátoru *BZLF1*, který je kódován bezprostředně-časným genem, byly sníženy v HONE1 i HK1-EBV buňkách, a to jak v buňkách, ve kterých byla indukována lytická replikace, tak v buňkách neindukovaných. Ve všech případech došlo ke snížení počtu genomových kopií a množství virionů. (Wang et al., 2017).

Výzkum *in vitro* byl následován pozorováním *in vivo* v těžce imunodeficientních NOD/SCID myších (non-obese diabetic/severe-combined immunodeficient mice). V těchto myších, jimž byly subkutánně injikovány EBV-pozitivní HONE1 buňky, přispěla léčba berberinem k výrazné inhibici růstu nádoru a jeho menší hmotnosti. Berberin také v myších snižoval produkci proteinu i mRNA EBNA1, snížil expresi *BZLF1* a indukoval apoptosu nádorových buněk štěpenou kaspasou-3. V berberinem léčených myších byl tedy detekován nižší počet EBNA1-pozitivních buněk. Z těchto výsledků vyplývá, že berberin potlačil růst EBV-pozitivních buněk *in vivo* i *in vitro* (Wang et al., 2017).

Účinek berberinu na virovou infekci byl potvrzen u širokého spektra virů, a to u virů obalených i neobalených s genomy tvořenými molekulou RNA i DNA. Stejně široký je i rozsah mechanismů, kterými replikaci těchto virů inhibuje. U některých, jako ZIKV a HCV, interaguje přímo s virovými částicemi, čímž blokuje vstup viru. U mnohých virů však nedochází k přímému ovlivnění virových komponent a procesů, ale k inhibici virového replikačního cyklu, která je zapříčiněna interferencí berberinu s buněčnými procesy. Především se 3 větvemi MAP kinasových drah ERK, p38MAPK a JNK, což často vede k redukci virem indukované signalisace. U viru chřipky má snížení aktivace MAPK/ERK dráhy za následek zablokování jaderného exportu virových RNP, což se promítá dokonce do změny morfologie virionů. Aktivace dráhy JNK je snížena u HSV spolu s dráhou NF- κ B. A inhibice další dráhy

– JAK-STAT zase u EBV potlačuje expresi virového proteinu EBNA1 (berberin suprimuje expresi STAT3).

Berberin působí též protizánětlivě. Potlačením signalisace přes TLR-4 a TLR-7 snižuje expresi prozánětlivých IFN- γ , IL-1 β , TNF- α a IL-6 a zvyšuje expresi protizánětlivého IL-4. Navíc jeho antioxidační vlastnosti přispívají ke snížení hladiny molekul oxidačního stresu. Berberin vykazuje všestranné antivirové vlastnosti, díky nimž by se mohl uplatnit v léčbě mnoha virových onemocnění.

7 Závěr

Mnohé rostliny jsou cenným zdrojem alkaloidů, které jsou velmi nadějnými antiviroty. Díky pleiotropním účinkům mohou být alkaloidy efektivním nástrojem v boji proti širokému spektru virů. Většina z nich je přitom přinejmenším stejně účinná a některé dokonce účinnější než doposud standartně používaná léčba.

Antivirotické účinky rostlinných alkaloidů jsou zkoumány zejména u virů, proti kterým neexistuje účinná vakcína a není dostupná ani cílená antivirová léčba (např. Zika virus, virus Chikungunya, RSV). Dále mají velký potenciál jako léčiva u nově se objevujících virů (SARS-Cov-2), virů vykazujících rezistenci k v současnosti používané léčbě (např. HCMV) nebo u virů podléhajících rychlým evolučním změnám a majících pandemický potenciál (např. virus chřipky).

Ve všech těchto případech mohou pomoci rostlinné alkaloidy, už jen proto, že často působí jinými mechanismy než stávající léčiva a mohou tak být účinné na viry, které jsou vůči působení stávajících antivirotických resistantní. Rostlinné alkaloidy ovlivňují spíše buněčné komponenty a dráhy, na kterých je závislá replikace viru, než že by přímo interferovaly s virovými enzymy, jak je tomu ve většině případů užívaných antivirotických. Atropin mění vlastnosti biologických membrán a tím může bránit přichycení a vstupu viru do buněk. Kolchicin inhibuje dynamiku buněčných mikrotubulů a ovlivňuje imunitní reakce organismu na virovou infekci. Utlumuje zánětlivou odpověď – inhibuje tvorbu a aktivaci inflamazomu, intracelulární transport váčků a sekreci prozánětlivých cytokinů. Také narušuje motilitu, chemotaxi a schopnost extravazace buněk imunitního systému. Kofein a papaverin jsou inhibitory fosfodiesterasy, zvyšují hladinu cAMP v buňce a tím negativně ovlivňují virovou replikaci. Papaverin a berberin regulují signalisaci přes MAP kinasovou dráhu a ovlivňují mimo jiné virem indukovanou signalisaci, fosforylaci proteinů nebo virovou transkripci. Berberin také snižuje signalisaci přes TLR-4 a TLR-7, čímž snižuje produkci prozánětlivých cytokinů.

U většiny těchto látek byl sice antivirotický efekt potvrzen zatím pouze na úrovni *in vitro* nebo ve zvířecím modelu. Klinické studie efektu kolchicinu při léčbě COVID-19, které probíhají v současnosti, však potvrzují jeho pozitivní efekt a tím jasně poukazují na použitelnost alkaloidů v léčbě virových onemocnění. Díky jejich účinku spíše na buněčné cíle a tím pádem i menší pravděpodobnosti selekce rezistentních forem viru mají tyto látky potenciál stát se univerzálně používanými antiviroty.

Kromě několika zde zmíněných alkaloidů bylo pro antivirový efekt zkoumáno mnoho dalších. I z těch, u kterých už byl antivirový efekt potvrzen, některé stále čekají na objevení přesného mechanismu působení, jehož pochopení nám umožní potenciál dané látky využít naplno. A mimo to existuje ještě mnoho látek, které ještě popsány (a otestovány) nebyly. Stále se před námi tedy otevírá velice široké pole působnosti pro hledání a snad i nalezení nových účinných antivirotických.

8 Seznam literatury

- Aggarwal, M., Leser, G. P., & Lamb, R. A. (2020).** Repurposing Papaverine as an Antiviral Agent against Influenza Viruses and Paramyxoviruses. *Journal of Virology*, 94(6). <https://doi.org/10.1128/jvi.01888-19>
- Alarcon, B., Gonzalez, M. E., & Carrasco, L. (1984).** Antiherpesvirus Action of Atropine. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 26(5) 702-706.
- Albrecht, T., Lee, C. H., Speelman, D. J., & Steinsland, O. S. (1987).** Inhibition of Cytomegalovirus Replication by Smooth-Muscle Relaxing Agents. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 186(1) 41-46. <https://doi.org/10.3181/00379727-186-42581>
- Arrieta, O., Rodriguez-Diaz, J. L., Rosas-Camargo, V., Morales-Espinosa, D., de Leon, S. P., Kershenovich, D., & Leon-Rodriguez, E. (2006).** Colchicine delays the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis virus-related liver cirrhosis. *Cancer*, 107(8), 1852–1858. <https://doi.org/10.1002/cncr.22198>
- *Barnes, P. J., & Karin, M. (1997).** Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *New England Journal of Medicine*, 336(15), 1066–1071. <https://doi.org/10.1056/nejm199704103361506>
- Batista, M. N., Braga, A. C. S., Fernandes Campos, G. R., Michel Souza, M., de Matos, R. P. A., Zara Lopes, T., Maria Candido, N., Duarte Lima, M. L., Cristina Machado, F., de Andrade, S. T. Q., Bittar, C., Nogueira, M. L., Carneiro, B. M., Mariutti, R. B., Krishnaswamy Arni, R., Freitas Calmon, M., & Rahal, P. (2019).** Natural products isolated from oriental medicinal herbs inactivate zika virus. *Viruses*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/v11010049>
- Batista, M. N., Carneiro, B. M., Braga, A. C. S., & Rahal, P. (2015).** Caffeine inhibits hepatitis C virus replication in vitro. *Archives of Virology*, 160(2), 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2302-1>
- *Ben-Chetrit, E., & Levy, M. (1998).** Colchicine: 1998 update. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 28(1), 48–59. [https://doi.org/10.1016/S0049-0172\(98\)80028-0](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(98)80028-0)
- Biziagos, E., Crance, J.-M., Passagot, J., & Deloince, R. (1990).** Inhibitory Effects of Atropine, Protamine, and Their Combination on Hepatitis A Virus Replication in PLC/PRF/5 Cells. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 34(6) 1112-1117.
- Botwina, P., Owczarek, K., Rajfur, Z., Ochman, M., Urlik, M., Nowakowska, M., Szczubialka, K., & Pyrc, K. (2020).** Berberine hampers influenza a replication through inhibition of MAPK/ERK pathway. *Viruses*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/v12030344>
- Brunetti, L., Diawara, O., Tsai, A., Firestein, B. L., Nahass, R. G., Poiani, G., & Schlesinger, N. (2020).** Colchicine to Weather the Cytokine Storm in Hospitalized Patients with COVID-19. *Journal of Clinical Medicine*, 9(9) 2961. <https://doi.org/10.3390/jcm9092961>
- Carter, M. J., Willcocks, M. M., & ter Meulen, V. (1983).** Defective translation of measles virus matrix protein in a subacute sclerosing panencephalitis cell line. *Nature*, 305(5930), 153–155. <https://doi.org/10.1038/305153a0>
- Castaño-Rodríguez, C., Honrubia, J. M., Gutiérrez-Álvarez, J., DeDiego, M. L., Nieto-Torres, J. L., Jimenez-Guardeño, J. M., Regla-Nava, J. A., Fernandez-Delgado, R., Verdia-Báguena, C., Queralt-Martín, M., Kochan, G., Perlman, S., Aguilella, V. M., Sola, I., & Enjuanes, L. (2018).** Role of severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporins E, 3a, and 8a in replication and pathogenesis. *MBio*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.02325-17>
- Cecil, C. E., Davis, J. M., Cech, N. B., & Laster, S. M. (2011).** Inhibition of H1N1 influenza A virus growth and induction of inflammatory mediators by the isoquinoline alkaloid berberine and extracts of goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *International Immunopharmacology*, 11(11), 1706–1714. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.06.002>
- Chakraborty, U., Sinha, M., Bhattacharjee, A., Nayak, D., Khurana, A., Manchanda, R. K., Sarkar, D., & Das, S. (2020).** Sub-lethal Dose of Atropine Gives Protection from Japanese Encephalitis Virus Infection in Chick Embryo Model. *Proceedings of the Zoological Society*, 73(3) 235-242. <https://doi.org/10.1007/s12595-020-00324-8>
- Chen, H., Lee, J. M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M. H., Ambinder, R. F., & Hayward, S. D. (2001).** Linkage between STAT Regulation and Epstein-Barr Virus Gene Expression in Tumors. *Journal of Virology*, 75(6), 2929–2937. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.6.2929-2937.2001>
- Chia, E. W., Grainger, R., & Harper, J. L. (2008).** Colchicine suppresses neutrophil superoxide production in a murine model of gouty arthritis: A rationale for use of low-dose colchicine. *British Journal of Pharmacology*, 153(6), 1288–1295. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.20>
- Chin, L. W., Cheng, Y. W., Lin, S. S., Lai, Y. Y., Lin, L. Y., Chou, M. Y., Chou, M. C., & Yang, C. C. (2010).** Anti-herpes simplex virus effects of berberine from *Coptidis rhizoma*, a major component of a Chinese herbal medicine, Ching-Wei-San. *Archives of Virology*, 155(12), 1933–1941. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0779-9>

- Cronstein, B. N., Molad, Y., Reibman, J., Balakhane, E., Levin, R. I., & Weissmann, G. (1995).** Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 96(2), 994–1002. <https://doi.org/10.1172/JCI118147>
- Dai, Q., He, X., Yu, H., Bai, Y., Jiang, L., Sheng, H., Peng, J., Wang, M., Yu, J., & Zhang, K. (2020).** Berberine impairs coxsackievirus B3-induced myocarditis through the inhibition of virus replication and host pro-inflammatory response. *Journal of Medical Virology*, 93(6) 3581-3589. <https://doi.org/10.1002/jmv.26747>
- Dai, Q., Zhang, D., Yu, H., Xie, W., Xin, R., Wang, L., Xu, X., He, X., Xiong, J., Sheng, H., Zhang, L., Zhang, K., & Hu, X. (2017).** Berberine restricts coxsackievirus B type 3 replication via inhibition of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK activation in vitro. *Medical Science Monitor*, 23, 1448–1455. <https://doi.org/10.12659/MSM.899804>
- *Dalbeth, N., Lauterio, T. J., & Wolfe, H. R. (2014).** Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clinical Therapeutics*, 36(10), 1465–1479. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.07.017>
- Deftereos, S. G., Giannopoulos, G., Vrachatis, D. A., Siasos, G. D., Giotaki, S. G., Gargalianos, P., Metallidis, S., Sianos, G., Baltagiannis, S., Panagopoulos, P., Dolianitis, K., Randou, E., Syrigos, K., Kotanidou, A., Koulouris, N. G., Milionis, H., Sipsas, N., Gogos, C., Tsoukalas, G., ... Stefanadis, C. (2020).** Effect of Colchicine vs Standard Care on Cardiac and Inflammatory Biomarkers and Clinical Outcomes in Patients Hospitalized With Coronavirus Disease 2019: The GRECCO-19 Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open*, 3(6). <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.13136>
- Deftereos, S. G., Siasos, G., Giannopoulos, G., Vrachatis, D. A., Angelidis, C., Giotaki, S. G., Gargalianos, P., Giamarellou, H., Gogos, C., Daikos, G., Lazanias, M., Lagiou, P., Saroglou, G., Sipsas, N., Tsiodras, S., Chatzigeorgiou, D., Moussas, N., Kotanidou, A., Koulouris, N., ... Stefanadis, C. (2020).** The Greek study in the effects of colchicine in COvid-19 complications prevention (GRECCO-19 study): Rationale and study design. *Hellenic Journal of Cardiology*, 61(1), 42–45. <https://doi.org/10.1016/j.hjc.2020.03.002>
- *Esfandiarei, M., & McManus, B. M. (2008).** Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3, 127–155. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151534>
- Gendelman, O., Amital, H., Bragazzi, N. L., Watad, A., & Chodick, G. (2020).** Continuous hydroxychloroquine or colchicine therapy does not prevent infection with SARS-CoV-2: Insights from a large healthcare database analysis. *Autoimmunity Reviews* 19(7), <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102566>
- *Grycová, L., Dostál, J., & Marek, R. (2007).** Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 68(2), 150–175. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.004>
- *Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R. J. (2015).** The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2). <https://doi.org/10.1038/nrd4510>
- Hayashi, K., Minoda, K., Nagaoka, Y., Hayashi, T., & Uesato, S. (2007).** Antiviral activity of berberine and related compounds against human cytomegalovirus. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17(6), 1562–1564. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.12.085>
- Hosakote, Y. M., Komaravelli, N., Mautemps, N., Liu, T., Garofalo, R. P., & Casola, A. (2012).** Antioxidant mimetics modulate oxidative stress and cellular signaling in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(11). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00192.2012>
- Hung, T. C., Jassey, A., Liu, C. H., Lin, C. J., Lin, C. C., Wong, S. H., Wang, J. Y., Yen, M. H., & Lin, L. T. (2019).** Berberine inhibits hepatitis C virus entry by targeting the viral E2 glycoprotein. *Phytomedicine*, 53, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.025>
- Ito, M., Yanagi, Y., & Ichinohe, T. (2012).** Encephalomyocarditis Virus Viroporin 2B Activates NLRP3 Inflammasome. *PLoS Pathogens*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002857>
- Javelle, E., Ribera, A., Degasne, I., Gaüzère, B. A., Marimoutou, C., & Simon, F. (2015).** Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003603>
- Jia, F., Zou, G., Fan, J., & Yuan, Z. (2010).** Identification of palmatine as an inhibitor of West Nile virus. *Archives of Virology*, 155(8), 1325-1329. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0702-4>
- *Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004).** Microtubules as a target for anticancer drugs. In *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 253–265. <https://doi.org/10.1038/nrc1317>
- Kaneda, T., Shimizu, K., Nakajyo, S., & Urakawa, N. (1998).** The difference in the inhibitory mechanisms of papaverine on vascular and intestinal smooth muscles. *European Journal of Pharmacology*, 355(2–3), 149–157. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00479-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00479-8)
- Kang, C. H., Jayasooriya, R. G. P. T., Dilshara, M. G., Choi, Y. H., Jeong, Y. K., Kim, N. D., & Kim, G. Y. (2012).** Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF-κB activation and ERK phosphorylation. *Food and Chemical Toxicology*, 50(12) 4270-4276. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.041>

- Katsilabros, L. (1964).** Treatment of virus diseases with demecolcine. *The Lancet*, 284 (7369), 1126. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)92655-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)92655-8)
- Kennedy, O. J., Roderick, P., Buchanan, R., Fallowfield, J. A., Hayes, P. C., & Parkes, J. (2017).** Coffee, including caffeinated and decaffeinated coffee, and the risk of hepatocellular carcinoma: A systematic review and dose-response meta-Analysis. *BMJ Open*, 7(5), <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-013739>
- Kershenobich, D., Rojkind, M., Quiroga, A., & Alcocer-Varela, J. (1990).** Effect of colchicine on lymphocyte and monocyte function and its relation to fibroblast proliferation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 11(2), 205–209. <https://doi.org/10.1002/hep.1840110208>
- Koyama, A., Yamasaki, H., Utsunomiya, H., Tsujimoto, K., Uozaki, M., Katsuyama, Y., & Murayama, M. (2008).** Effect of caffeine on the multiplication of DNA and RNA viruses. *Molecular Medicine Reports*, 1(2), 251–255. <https://doi.org/10.3892/mmr.1.2.251>
- *Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & García-Sastre, A. (2018).** Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
- Kukula-Koch, W. A., & Widelski, J. (2017).** Alkaloids. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*, 163–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00009-3>
- Kulp, M., & Bragina, O. (2013).** Capillary electrophoretic study of the synergistic biological effects of alkaloids from *Chelidonium majus L.* in normal and cancer cells. *Anal Bioanal Chem*, 405(10), 3391–3397. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6755-y>
- Kumar, S., Maurya, V. K., Kabir, R., Nayak, D., Khurana, A., Manchanda, R. K., Gadugu, S., Shanker, K., & Saxena, S. K. (2020).** Antiviral Activity of Belladonna During Japanese Encephalitis Virus Infection via Inhibition of Microglia Activation and Inflammation Leading to Neuronal Cell Survival. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(21), 3683–3696. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.0c00603>
- Kunzmann, S., Krempl, C., Seidenspinner, S., Glaser, K., Speer, C. P., & Fehrholz, M. (2018).** Increase in CTGF mRNA expression by respiratory syncytial virus infection is abrogated by caffeine in lung epithelial cells. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 12(5), 662–666. <https://doi.org/10.1111/irv.12561>
- Lesnau, A., Hils, J., Pohl, G., Beyer, G., Janka, M., & Thi Thieu Hoa, L. (1990).** Antiviral aktivitat von Salzen des Berberins. *Pharmazie*, 45(8), 638–739. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2080224/>
- Li, S., Hong, X., Wei, Z., Xie, M., Li, W., Liu, G., Guo, H., Yang, J., Wei, W., & Zhang, S. (2019).** Ubiquitination of the HPV oncoprotein E6 is critical for E6/E6AP-mediated p53 degradation. *Frontiers in Microbiology*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02483>
- Liang, B., Jiang, S., Zhang, Z., Inserra, P., Lee, J., Solkoff, D., & Watson, R. R. (2001).** Anti-inflammatory effects of theophylline: Modulation on immune functions during murine leukemia virus infection. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 23(3), 307–319. <https://doi.org/10.1081/IPH-100107332>
- Lin, Y. T., Wu, Y. H., Tseng, C. K., Lin, C. K., Chen, W. C., Hsu, Y. C., & Lee, J. C. (2013).** Green Tea Phenolic Epicatechins Inhibit Hepatitis C Virus Replication via Cyclooxygenase-2 and Attenuate Virus-Induced Inflammation. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054466>
- *Liu, N., Song, W., Schienebeck, C. M., Zhang, M., & Tang, W. (2014).** Synthesis of naturally occurring tropones and tropolones. *Tetrahedron*, 70(49), 9281–9305. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.07.065>
- Liu, Z., Guo, Z., Wang, G., Zhang, D., He, H., Li, G., Liu, Y., Higgins, D., Walsh, A., Shanahan-Prendergast, L., & Lu, J. (2009).** Evaluation of the efficacy and safety of a statin/caffeine combination against H5N1, H3N2 and H1N1 virus infection in BALB/c mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.07.004>
- Lopes, M. I., Bonjorno, L. P., Giannini, M. C., Amaral, N. B., Menezes, P. I., Dib, S. M., Gigante, S. L., Benatti, M. N., Rezek, U. C., Emrich-Filho, L. L., Sousa, B. A. A., Almeida, S. C. L., Luppino Assad, R., Veras, F. P., Schneider, A., Rodrigues, T. S., Leiria, L. O. S., Cunha, L. D., Alves-Filho, J. C., ... Oliveira, R. D. R. (2021).** Beneficial effects of colchicine for moderate to severe COVID-19: a randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *RMD Open*, 7(1), <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2020-001455>
- Lu, N., Yang, Y., Liu, H., Ding, X., Ou, Y., Xia, J., & Du, Y. (2019).** Inhibition of respiratory syncytial virus replication and suppression of RSV-induced airway inflammation in neonatal rats by colchicine. *3 Biotech*, 9(11). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1917-z>
- Luganini, A., Mercorelli, B., Messa, L., Palù, G., Gribaudo, G., & Loregian, A. (2019).** The isoquinoline alkaloid berberine inhibits human cytomegalovirus replication by interfering with the viral Immediate Early-2 (IE2) protein transactivating activity. *Antiviral Research*, 164, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.006>
- Marchant, D., Singhera, G. K., Utokaparch, S., Hackett, T. L., Boyd, J. H., Luo, Z., Si, X., Dorscheid, D. R., Mcmanus, B. M., & Hegele, R. G. (2010).** Toll-Like Receptor 4-Mediated Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is a Determinant of Respiratory Virus Entry and Tropism. *Journal of Virology*, 84(21), 11359–11373. <https://doi.org/10.1128/JVI.00804-10>

- Miller, C. A., & Carrigan, D. R. (1982).** Reversible repression and activation of measles virus infection in neural cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(5), 1629–1633. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.5.1629>
- Mukherjee, P. K., & Simpson, R. W. (1985).** Inhibitory effect of papaverine on RNA and protein synthesis of vesicular stomatitis virus. *Virus Research*, 3(1), 57–67. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(85\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0168-1702(85)90041-3)
- Nakagawa, S. ichiro, Umehara, T., Matsuda, C., Kuge, S., Sudoh, M., & Kohara, M. (2007).** Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(4) 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.117>
- Nasiripour, S., Zamani, F., & Farasatinasab, M. (2020).** Can Colchicine as an Old Anti-Inflammatory Agent Be Effective in COVID-19? *Journal of Clinical Pharmacology*, 60(7), 828–829. <https://doi.org/10.1002/jcph.1645>
- *Nawrot, R., Warowicka, A., Musidlak, O., Węglewska, M., Baldysz, S., & Goździcka-Józefiak, A. (2021).** Przeciwwirusowe związki izolowane z roślin. *Postępy Biochemii*, 66(4), 356–372. https://doi.org/10.18388/pb.2020_361
- Nawrot, J., Wilk-jędrusik, M., Nawrot, S., Nawrot, K., Wilk, B., Dawid-pać, R., Urbańska, M., Micek, I., Nowak, G., & Gornowicz-porowska, J. (2020).** Milky sap of greater celandine (*Chelidonium majus L.*) and anti-viral properties. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph17051540>
- *Neag, M. A., Mocan, A., Echeverría, J., Pop, R. M., Bocsan, C. I., Crisan, G., & Buzoianu, A. D. (2018).** Berberine: Botanical Occurrence, traditional uses, extraction methods, and relevance in cardiovascular, metabolic, hepatic, and renal disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00557>
- Nehlig, A., Daval, J. L., & Debry, G. (1992).** Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 17(2), 139–170. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(92\)90012-B](https://doi.org/10.1016/0165-0173(92)90012-B)
- *Nevins, J. R. (2001).** The Rb/E2F pathway and cancer. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 699–703. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.699>
- *O'Brien, W. T., Pham, L., Symons, G. F., Monif, M., Shultz, S. R., & McDonald, S. J. (2020).** The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: Potential as a biomarker and therapeutic target. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01778-5>
- Ogura, H., Sato, H., & Hatano, M. (1987).** Inhibitory effect of papaverine on HVJ (Sendai virus) replication in rat glioma C6 cells. *Journal of General Virology*, 68(4), 1143–1152. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-4-1143>
- Olson, N. J., & Consigli, R. A. (1979).** Production of labile Newcastle disease virus progeny after infection of chicken embryo cells in the presence of caffeine. *American Journal of Veterinary Research*, 40(3), 387–392.
- Parra-Medina, R., Sarmiento-Monroy, J. C., Rojas-Villarraga, A., Garavito, E., Montealegre-Gómez, G., & Gómez-López, A. (2020).** Colchicine as a possible therapeutic option in COVID-19 infection. *Clinical Rheumatology*, 39(8), 2485–2486. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05247-5>
- Patel, A., Hanson, J., McLean, T. I., Olgiate, J., Hilton, M., Miller, W. E., & Bachenheimer, S. L. (1998).** Herpes simplex virus type 1 induction of persistent NF- κ B nuclear translocation increases the efficiency of virus replication. *Virology*, 247(2), 212–222. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9243>
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U. R., & Ludwig, S. (2001).** Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nature Cell Biology*, 3(3), 301–305. <https://doi.org/10.1038/35060098>
- Prasad, K. N., & Kumar, S. (1975).** Role of cyclic amp in differentiation of human neuroblastoma cells in culture. *Cancer*, 36(4), 1338–1343. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197510\)36:4<1338::AID-CNCR2820360422>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197510)36:4<1338::AID-CNCR2820360422>3.0.CO;2-1)
- Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., Xie, C., Ma, K., Shang, K., Wang, W., & Tian, D. S. (2020).** Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases*, 71(15) 762–768. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
- Redel, H. (2016).** A case of chikungunya virus induced arthralgia responsive to colchicine. *Open Forum Infectious Diseases*, 3(2). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw114>
- Robbins, S. J., & Rapp, F. (1980).** Inhibition of measles virus replication by cyclic AMP. *Virology*, 106(2) 317–326. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90255-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90255-X)
- *Roberts, W. N., Liang, M. H., & Stern, S. H. (1987).** Colchicine in Acute Gout: Reassessment of Risks and Benefits. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 257(14), 1920–1922. <https://doi.org/10.1001/jama.1987.03390140090033>
- Rodriguez, L., Cerbon-Ambriz, J., & de Lourdes Munoz, M. (1998).** Effects of colchicine and colchicine in a biochemical model of liver injury and fibrosis. *Archives of Medical Research*, 29(2), 109–116.

- *Rosemeyer, H. (2004). The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Chemistry & Biodiversity*, 1(3), 361–401. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490033>
- Rudd, B. D., Burstein, E., Duckett, C. S., Li, X., & Lukacs, N. W. (2005). Differential Role for TLR3 in Respiratory Syncytial Virus-Induced Chemokine Expression. *Journal of Virology*, 79(6) 3350-3355. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.6.3350-3355.2005>
- Ruff, B. (2012). *Chemische Und Biochemische Methoden Zur Stereoselektiven Synthese Von Komplexen Naturstoffen (Beitrage Zur Organischen Synthese) (German Edition)*. (1st ed., Vol. 1), 8-10. Logos Verlag Berlin. https://books.google.cz/books?id=WGmXnr6Ks-UC&pg=PA8&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Safranow, K., & Machoy, Z. (2005). Methylated purines in urinary stones. *Clinical Chemistry*, 51(8), 1493–1498. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.048033>
- Scarsi, M., Piantoni, S., Colombo, E., Airó, P., Richini, D., Miclini, M., Bertasi, V., Bianchi, M., Bottone, D., Civelli, P., Cotelli, M. S., Damiolini, E., Galbassini, G., Gatta, D., Ghirardelli, M. L., Magri, R., Malamani, P., Mendeni, M., Molinari, S., ... Andreoli, L. (2020). Association between treatment with colchicine and improved survival in a single-centre cohort of adult hospitalised patients with COVID-19 pneumonia and acute respiratory distress syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 79(10), 1286–1289. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217712>
- Shen, L., Niu, J., Wang, C., Huang, B., Wang, W., Zhu, N., Deng, Y., Wang, H., Ye, F., Cen, S., & Tan, W. (2019). High-Throughput Screening and Identification of Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Coronaviruses. *Journal of Virology*, 93(12). <https://doi.org/10.1128/jvi.00023-19>
- *Shin, H. B., Choi, M. S., Yi, C. M., Kim, J. E., Jo, S. J., Kim, H. I., Lee, N. R., & Inn, K. S. (2014). Regulation of host cell signaling pathways by respiratory syncytial virus nonstructural protein NS1 and NS2. *Journal of Bacteriology and Virology*, 44(3) 283-289. <https://doi.org/10.4167/jbv.2014.44.3.283>
- Shin, H. B., Choi, M. S., Yi, C. M., Lee, J., Kim, N. J., & Inn, K. S. (2015). Inhibition of respiratory syncytial virus replication and virus-induced p38 kinase activity by berberine. *International Immunopharmacology*, 27(1), 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.045>
- Shiraki, K., & Rapp, F. (1988). Effects of caffeine on herpes simplex virus. *Intervirology*, 29(4), 235–240. <https://doi.org/10.1159/000150050>
- *Soares-Silva, M., Diniz, F. F., Gomes, G. N., & Bahia, D. (2016). The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00183>
- Sola, A., Rodriguez, S., Gil-Fernandez, Balbino Alarcon, C., Gonzalez, M. E., & Carrasco, L. (1986). New Agents Active against African Swine Fever Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 29(2) 284-288. <http://aac.asm.org/>
- Song, S., Qiu, M., Chu, Y., Chen, D., Wang, X., Su, A., & Wu, Z. (2014). Downregulation of cellular c-Jun N-terminal protein kinase and NF-κB activation by berberine may result in inhibition of herpes simplex virus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 5068–5078. <https://doi.org/10.1128/AAC.02427-14>
- Talib, S., & Banerjee, A. K. (1981). Protamine-A potent inhibitor of vesicular stomatitis virus transcriptase in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 98(3), 875–883. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)91192-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)91192-X)
- *Touchell, D. H., Palmer, I. E., & Ranney, T. G. (2020). In vitro Ploidy Manipulation for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00722>
- Triner, L., Vulliamoz, Y., Schwartz, I., & Nahas, G. G. (1970). Cyclic phosphodiesterase activity and the action of papaverine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40(1) 64-69. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)91046-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)91046-6)
- Turano, A., Scura, G., Caruso, A., Bonfanti, C., Manca, N., Luzzati, R., & Bassetti, D. (1989). Inhibitory Effect of Papaverine on HIV Replication In Vitro. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 5(2), 183–192. <https://doi.org/10.1089/aid.1989.5.183>
- Varghese, F. S., Kaukinen, P., Gläsker, S., Bepalov, M., Hanski, L., Wennerberg, K., Kümmerer, B. M., & Ahola, T. (2016). Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. *Antiviral Research*, 126, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.12.012>
- Varghese, F. S., Thaa, B., Amrun, S. N., Simarmata, D., Rausalu, K., Nyman, T. A., Merits, A., McNerney, G. M., Ng, L. F. P., & Ahola, T. (2016). The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Journal of Virology*, 90(21), 9743–9757. <https://doi.org/10.1128/jvi.01382-16>
- Wang, C., Wang, H., Zhang, Y., Guo, W., Long, C., Wang, J., Liu, L., & Sun, X. (2017). Berberine inhibits the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells via an Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-dependent mechanism. *Oncology Reports*, 37(4), 2109–2120. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5489>
- *Webster, K., Parish, J., Pandya, M., Stern, P. L., Clarke, A. R., & Gaston, K. (2000). The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 87–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.87>

- Wijarnpreecha, K., Thongprayoon, C., & Ungprasert, P. (2017).** Impact of caffeine in hepatitis C virus infection: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 29(1), 17–22. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000757>
- Wu, Y., Li, J. Q., Kim, Y. J., Wu, J., Wang, Q., & Hao, Y. (2011).** In vivo and in vitro antiviral effects of berberine on influenza virus. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 17(6), 444–452. <https://doi.org/10.1007/s11655-011-0640-3>
- Wyde, P. R., Gilbert, B. E., & Ambrose, M. W. (1989).** Comparison of the anti-respiratory syncytial virus activity and toxicity of papaverine hydrochloride and pyrazofurin in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 11(1), 15–26. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(89\)90017-X](https://doi.org/10.1016/0166-3542(89)90017-X)
- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., & Wang, F. S. (2020).** Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(4) 420–422. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)
- Yan, L., Huang, H., Zhang, Y., Yuan, X., Yan, Z., Cao, C., & Luo, X. (2020).** Involvement of p53-dependent apoptosis signal in antitumor effect of Colchicine on human papilloma virus (HPV)-positive human cervical cancer cells. *Bioscience Reports*, 40(3). <https://doi.org/10.1042/BSR20194065>
- Yan, Y. Q., Fu, Y. J., Wu, S., Qin, H. Q., Zhen, X., Song, B. M., Weng, Y. S., Wang, P. C., Chen, X. Y., & Jiang, Z. Y. (2018).** Anti-influenza activity of berberine improves prognosis by reducing viral replication in mice. *Phytotherapy Research*, 32(12), 2560–2567. <https://doi.org/10.1002/ptr.6196>
- Ye, J., Chen, Z., Li, Y., Zhao, Z., He, W., Zohaib, A., Song, Y., Deng, C., Zhang, B., Chen, H., Cao, S., Ye, C. J., & Stanley Perlman, E. (2017).** Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF- κ B. *Journal of Virology*, 91(8), 39–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.00039-17>
- Yi, Z., Pan, T., Wu, X., Song, W., Wang, S., Xu, Y., Rice, C. M., MacDonald, M. R., & Yuan, Z. (2011).** Hepatitis C Virus Co-opts Ras-GTPase-Activating Protein-Binding Protein 1 for Its Genome Replication. *Journal of Virology*, 85(14) 6996–7004. <https://doi.org/10.1128/jvi.00013-11>
- Yoshikawa, Y., & Yamanouchi, K. (1984).** Effect of papaverine treatment on replication of measles virus in human neural and nonneural cells. *Journal of Virology*, 50(2), 489–496. <https://doi.org/10.1128/jvi.50.2.489-496.1984>
- Z Yamazaki, & I Tagaya. (1980).** Antiviral Effects of Atropine and Caffeine. *J. Gen. ViroL*, 50(2), 429–431. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-2-429>.
- Zhang, W., Boyapalle, S., Cao, X., Wang, J., Lockey, R. F., & Mohapatra, S. S. (2009).** RSV NS1 Protein Blocks the IFN Response by Blocking RIG-I Interaction with the Mitochondrial Antiviral Signaling Protein, MAVS. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(2), S208–S208. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.795>
- Zhou, T., & Zhu, Y. (2019).** Cascade Signals of Papaverine Inhibiting LPS-Induced Retinal Microglial Activation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 68(1), 111–119. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01289-w>

review v seznamu literatury označena *