

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognozie

**PŘÍRODNÍ LÁTKY – POTENCIÁLNÍ ZDROJE A
BIOLOGICKÁ AKTIVITA**

Habilitační práce

(soubor publikovaných vědeckých prací opatřený komentářem)

Děkuji spolupracovníkům z Katedry farmakognozie, Katedry farmaceutické botaniky a Katedry analytické chemie, ale i všem dalším, bez jejichž pomoci by tato práce nevznikla. Mé velké poděkování patří také zahraničním kolegům, kteří jsou jmenovitě uvedeni na příslušných publikacích, za jejich cennou spolupráci.

Obsah

1	Úvod	1
2	Rostlinné explantátové kultury jako potenciální zdroj přírodních látek	5
2.1	Zakládání explantátových kultur a jejich charakteristika	6
2.2	Ovlivňování produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách	12
2.2.1	Složení živného média	12
2.2.2	Růstové regulátory	13
2.2.3	Prekuzory	16
2.2.4	Elicitace	18
3	Biologická aktivita vybraných přírodních látek	28
3.1	Bellidis flos – hemolytický a antioxidační účinek	28
3.2	Hibisci sabdariffae flos – účinek u chronického renálního selhání	30
3.3	Isochinolinové alkaloidy – inhibiční účinek vůči acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyloligopeptidase, glykogensynthasa kinase-3 β	32
3.4	Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae – inhibice aldoketoreduktasy 1C3	37
4	Závěr a výhled do budoucna	39
5	Literatura	41
6	Tematické publikace předkladatele	57

1 Úvod

Příroda byla po celá tisíciletí surovinovým zdrojem pokrývajícím člověku celý rozsah jeho základních potřeb; v procesu vývoje lidské civilizace se pro přežití každého jedince stala důležitou i péče o zdraví (Nagy et al., 2011). Látky přírodního původu se v této péči uplatňovaly od nepaměti a po velmi dlouhou dobu v lidské historii byli také jedinými prostředky pro léčbu zdravotních potíží. O prvních hmatatelných známkách využívání rostlin pro léčebné účely se spekuluje na základě archeologických vykopávek z období středního paleolitu (Irák, Španělsko, Texas) (Solecki, 1975; Sendker et al., 2017) či nálezů z období neolitu (ledovcový muž Ötzi) (Capasso, 1998). První písemné zmínky z období starověkých civilizací (Mezopotámie, Egypt, Čína, Indie) svědčí o již velmi rozvinutém používání látek přírodního původu v terapii a jeho další rozvoj a význam pak následně dokládají díla antických autorů a bohatá literatura středověku a novověku až po současnost (Holland, 1994; De Vos, 2010; Nagy et al., 2011; Sendker et al., 2017; Badal et al., 2017). Od počátku 19. století byly izolovány první účinné látky z rostlinného materiálu, jako např. morfin, kapsaicin, kofein (Bharate et al., 2018). S přibýváním znalostí o geografickém výskytu, složení, účincích a použití přírodních léčiv, která byla hlavně rostlinného, ale i živočišného a minerálního původu, souhrnně označovaných jako *materia medica*, se začal formovat samostatný vědní obor, jehož název „farmakognozie“ se objevil v učebnici „Lehrbuch der Materia medica“ Johanna Adama Schmidta, profesora obecné patologie, terapie a *materia medica* na Vídeňské medicínsko-chirurgické akademii (Nagy et al., 2011; Upton et al., 2011). V jeho knize, vydané posmrtně v r. 1811, byla *materia medica* rozdělena na „Pharmacognosis“ (die Arzeneyenkunde), která se zabývá původem, získáváním a popisem vlastností léčiv, a „Pharmacodynamik“ (die Arzeneykräftenlehre), jejíž náplní je působení léčiva na lidský nebo zvířecí organismus (Schmidt, 1811). Vstupu nového názvu do širšího povědomí napomohl německý student medicíny Christianus Anotheus Seydler, který jej použil ve své doktorské disertační práci „Analecta Pharmacognostica“, sepsané v r. 1815. Během 19. století se postupně vyvíjely také věda o syntetických léčivech (farmaceutická chemie) a věda o účinku léčiv (farmakologie) (Nagy et al., 2011).

Ruku v ruce se stavem poznání prošla farmakognozie dlouhým vývojem od empirické praktické činnosti přes popisnou vědu, shromažďující poznatky o makroskopických a mikroskopických znacích, provenienci, obchodních názvech a známém terapeutickém využití používaných přírodních surovin rostlinného a živočišného původu (Nagy et al., 2011; Upton et al., 2011), až po moderní exaktní vědu, která studuje všechny farmaceutické a medicínské aspekty

přírodních látek s využitím nejen svých specifických postupů, ale i relevantních přístupů a metod ostatních farmaceutických oborů.

Existuje mnoho definic farmakognozie, které jsou často formulovány na základě konkrétního vědecko-výzkumného zaměření jejich autorů (Nagy et al., 2011; Upton et al., 2011; Badal et al., 2017). Jedna z nich, stručná, ale současně obsáhlá, charakterizuje farmakognozii jako studium biologicky aktivních přírodních látek; k tomu je potřeba dodat, že farmakognozie je spojena s mnoha dalšími oblastmi vědy, jejichž poznatky v sobě zahrnuje a které je nezbytné brát v úvahu pro její celkové pochopení (Badal et al., 2017). Patří k nim mimo jiné botanika (taxonomie, morfologie, histologie, fyziologie a ekologie rostlin), chemie (izolace a strukturní analýza obsahových látek), enzymologie (biosyntéza účinných látek), genetika (šlechtění rostlin), farmakologie a toxikologie (mechanismus účinku biologicky aktivních látek a jejich osud v organismu), zahradnictví (optimalizace pěstebních podmínek), kontrola kvality (zajištění bezpečnosti a účinnosti léčiv přírodního původu), biotechnologie (rostlinné explantátové kultury jako zdroj biologicky aktivních látek tam, kde je klasická izolace z přírodního materiálu nebo chemická syntéza z nějakého důvodu limitována). Stejně tak využívá farmakognozie znalostí pomocných oborů, jako jsou např. farmakovigilance, farmaceutická technologie, farmakoekonomika, právo, ochrana přírody (Badal et al., 2017).

Výzkum přírodních látek si zaslouží velkou pozornost a jeho význam v poslední době stále stoupá z několika důvodů.

Přibližně 80 % světové populace je podle Světové zdravotnické organizace odkázáno na rostlinná léčiva tradiční medicíny pro primární formu zdravotní péče a velké oblibě se těší fytotherapie jako doplňková léčba ve Spojených státech a Evropě (Upton et al. 2011; Cordell et al., 2012; Veith et al., 2013) – je potřeba objasňovat mechanismus účinku (u přírodních léčiv se může díky polykomponentnímu složení uplatňovat aditivní, antagonistický či synergní efekt v působení obsahových látek) (Williamson, 2001; Upton et al., 2011; Nagy et al., 2011; Yang et al., 2014; Patel et al., 2018), případné nežádoucí účinky nebo interakce s jinými léčivy (Boullata et al., 2000; Valli et al., 2002; Tachjian et al., 2010; Shaw et al., 2012; Neergheen-Bhujun, 2013; Moreira et al., 2014; Di Lorenzo et al., 2015; Liperoti et al., 2017; Grimstein et al., 2018).

Rostliny nadále zůstávají jediným zdrojem pro izolaci mnoha terapeuticky významných látek, např. rutinu, aescinu, silymarinu, morfinu, pilokarpinu, vinkristinu, vinblastinu (Bruntton, 1999), ingenol mebutátu (Ogbourne et al., 2014), nebo látek, které slouží jako prekurzory pro získávání důležitých léčiv semisyntetickým postupem, např. 10-deacetylbaicatinu III (pro

paklitaxel a docetaxel), podofylotoxinu (pro etoposid a teniposid), kamptotecinu (pro irinotekan a topotekan) (Bruneton, 1999).

Přírodní látky byly a stále jsou předlohou pro vývoj mnoha syntetických léčiv, např. khelin byl inspirací pro syntézu kromoglykátu, papaverin verapamilu, galegin metforminu (Cragg et al., 2013) nebo florizin dapagliflozinu (Choi, 2016).

Hlavní potenciál přírodních zdrojů spočívá v prakticky neomezené možnosti nacházet látky s unikátními a mnohdy docela komplikovanými strukturami, a objevovat nové, dosud neznámé mechanismy účinku, což je dáno obrovskou rozmanitostí druhů a jejich schopností syntetizovat nepřeberné množství rozličných strukturálních typů sloučenin s mnoha obměnami. Klasickým příkladem je paklitaxel, který se používá jako antineoplastikum a byl objeven v 60. letech minulého století ve Spojených státech během testování velkého množství náhodně nasbíraných rostlinných vzorků v rámci programu zaměřeného na hledání nových protinádorově účinných léčiv (Wani et al., 2014), nebo artemisinin, objevený v 70. letech minulého století v Číně při testování antimalarické aktivity extraktů rostlin vytypovaných na základě studia starých předpisů tradiční čínské medicíny, a jehož deriváty dihydroartemisinin, artemeter a artesunat jsou používány jako antimalarika (Tu, 2016; Muangphrom et al., 2016). Jedním příkladem terapeuticky slibné látky je thapsigargin, který byl původně izolován jako sloučenina odpovědná za kůži dráždivý účinek rostliny *Thapsia garganica* (Christensen et al., 1980); v průběhu zkoumání mechanismu tohoto účinku se mimo jiné zjistilo, že thapsigargin je účinným selektivním inhibitorem kalciové ATPasy sarko/endoplazmatického retikula, a stal se tak jednak výzkumným nástrojem pro objasňování vnitrobuněčné vápníkové signalizace v savčí buňce (Thastrup et al., 1990; Treiman et al., 1998), a později se též ukázal být nadějnou protinádorově účinnou molekulou, protože narušení kalciové homeostázy vede k apoptóze buňky – jeho derivát, mipsagargin, je v současnosti ve 2. fázi klinického zkoušení v léčbě hepatocelulárního karcinomu (Doan et al., 2015, Mahalingam et al., 2019). Je důležité zmínit, že velkým rezervoárem zatím nepoznaných přírodních látek jsou nejen rostliny, ale také živočichové, houby, mořské organismy a samozřejmě mikroorganismy (Cragg et al., 2005; Cragg et al., 2014; Orlikova et al., 2014; Martins et al., 2014; Atanasov et al., 2015; Katz et al., 2016; Iqbal et al., 2018; Uzma et al., 2018; Gupta et al., 2018; Deskmukh et al., 2018; Mushtaq et al., 2018; Gezici et al., 2019).

Tato práce, jak naznačuje její název „Přírodní látky – potenciální zdroje a biologická aktivita“, se zabývá dvěma tematickými okruhy. Prvním z nich je zkoumání rostlinných explantátových kultur jako potenciálního zdroje pro získávání přírodních látek využitelných

v terapii, což může být výhodnou alternativou ve srovnání s jejich izolací z volně rostoucích nebo pěstovaných rostlin. Pojednává se zde o produkci širokého spektra sekundárních metabolitů – kumarinů, antokyanů, flavonoidů, isoflavonoidů, anthraglykosidů, lignanů, skořicových kyselin – v kalusových a suspenzních kulturách. Druhým tématem je sledování biologické aktivity přírodních látek, a to antioxidačního a hemolytického účinku extraktů z drogy *Bellidis flos*, účinku extraktů z drogy *Hibisci sabdariffae flos* u chronického renálního selhání, a dále inhibičního působení isochinolinových alkaloidů izolovaných z rostlin čeledi *Amaryllidaceae*, *Berberidaceae* a *Papaveraceae* vůči některým enzymům, jež mají souvislost s etiopatogenesí Alzheimerovy choroby a nádorových onemocnění.

2 Rostlinné explantátové kultury jako potenciální zdroj přírodních látek

Explantátové kultury představují aseptickou *in vitro* kultivaci rostlinných buněk, pletiv nebo orgánů na umělém živném médiu za kontrolovaných podmínek prostředí (Tazeb, 2017). Teoretický základ explantátových kultur vychází z konceptu totipotence, již lze charakterizovat jako schopnost jednotlivé rostlinné buňky reexprimovat celou genetickou informaci a vyvinout se v kompletní rostlinu (Tazeb, 2017; Fehér, 2019).

Explantátové kultury se staly jedním z nástrojů základního výzkumu, neboť poskytují v porovnání s intaktní rostlinou snazší možnost manipulovat s jedním nebo více faktory během experimentů vedoucích k pochopení nejrůznějších dějů probíhajících v rostlinách (Narayani et al., 2017). Techniky explantátových kultur nacházejí také široké praktické uplatnění – využívají se pro množení rostlin mikropropagací, získávání patogenů prostých rostlin (ozdravování rostlin), uchovávání genofondu vzácných nebo jinak významných rostlin, rostlinné šlechtění, získávání geneticky modifikovaných rostlin (Tazeb, 2017; Efferth, 2019).

Vedle výše zmíněných aplikací jsou explantátové kultury rovněž velmi nadějnou cestou k udržitelné produkci terapeuticky či jinak komerčně důležitých sekundárních metabolitů jako alternativa k jejich získávání izolací z volně rostoucích nebo pěstovaných rostlin – mnohé rostliny je obtížné pěstovat, mnohé z pěstovaných mají dlouhou kultivační dobu (i několik let), u volně rostoucích rostlin může být ohrožena jejich existence v důsledku devastace jejich přirozeného prostředí a nadměrného sběru, komplikací může být také nízký obsah žádaných látek v rostlinách a s tím spojené nákladné izolační postupy (Espinosa-Leal et al., 2018). Mezi výhody využití explantátových kultur patří nezávislost na geografických a sezónních podmínkách a na vlivech prostředí, možnost kontinuální kontrolované produkce v jednotné kvalitě a výtěžku, nekontaminovaný rostlinný materiál (prostý mikroorganismů, pesticidů a herbicidů) a snazší izolace, zachování ohrožených druhů, růstový cyklus v řádu týdnů oproti rokům u intaktních rostlin (Ramirez-Estrada et al., 2016). První průmyslově získávanou látkou byl v roce 1984 pro kosmetické účely používaný šikonin (červené barvivo s antimikrobiální a protizánětlivou aktivitou do rtěnek, pleťových vod a mýdel), produkováný v Japonsku firmou Mitsui pomocí suspenzní kultury *Lithospermum erythrorhizon* – vyselektovaná buněčná linie obsahuje 20 % šikoninu, zatímco v kořenech rostliny je obsah asi 1,4 %; pro srovnání: během 2 týdnů se v 750 l bioreaktoru získá tolik šikoninu, jako z rostlin po 4 letech pěstovaných na rozloze 17,6 hektaru; chemická syntéza této látky v průmyslovém měřítku je nerentabilní (probíhá ve 12 krocích s výtěžkem 0,7 %) (Malik et al., 2016; Yazaki, 2017). Od té doby látek komerčně

získávaných fermentací s využitím rostlinných explantátových kultur mnoho nepřibylo (Ochoa-Villarreal et al., 2016), což se ale v poslední době začíná měnit. Za zmínku bezesporu stojí terapeuticky velmi významný protinádorově účinný paklitaxel, jehož přírodní zdroje jsou značně omezené (Isah, 2015); vedle izolace z některých druhů tisů a semisyntetického postupu, pro nějž jako výchozí látka slouží 10-deacetylbaaccatin III izolovaný z jehličí *Taxus baccata*, je od roku 2002 komerčně produkován také ze suspenzní kultury *Taxus chinensis*, a to v Německu firmou Phytion v bioreaktoru o objemu 75 000 l – buněčná kultura obsahuje 6 % paklitaxelu, kdežto v tisech se jeho množství pohybuje v řádu setin procenta (Bruneton, 1999; Ullisch et al., 2018; <https://phytonbiotech.com/apis/paclitaxel/>, 23. 8. 2019).

Širšímu využití explantátových kultur jako producentů sekundárních metabolitů stále brání ne zcela vyřešené problémy vyplývající z nedostatečného poznání biologických procesů probíhajících v rostlinných buňkách. Hlavním problémem je často velmi nízká tvorba žádaných metabolitů a její velká nestabilita a variabilita v explantátových kulturách; technologickou výzvou je zvětšování měřítka procesů z laboratorního do provozního a velkoobjemová kultivace (některé rostlinné buňky mají tendenci agregovat v suspenzní kultuře nebo jsou citlivé vůči střizným silám apod.; kořenové a transformované kořenové kultury vyžadují speciální přístupy v konstrukci bioreaktorů) (Kolewe et al., 2008; Georgiev et al. 2014).

Existuje mnoho přístupů, jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů v explantátových kulturách, což je základní předpoklad rentability biotechnologického procesu a jeho potenciálního komerčního využití – všechny jsou dosti empirické kvůli omezené znalosti rostlinného sekundárního metabolismu a jeho regulace; patří mezi ně např. selekce vysokoprodukčních buněčných linií, optimalizace kultivačních podmínek (složení živného média, typ a koncentrace růstových regulátorů; teplota, světelné podmínky), přidávání prekurzorů, elicítace, imobilizace, permeabilizace, *in situ* extrakce, dvoustupňová kultivace, orgánové kultury, metabolické inženýrství (Georgiev et al., 2009; Ochoa-Villarreal et al., 2016; Ramirez-Estrada et al., 2016; Hidalgo et al., 2018; Isah et al., 2018). Některým z těchto přístupů se věnuje tato práce a bude o nich detailněji pojednáno v kapitolách 2.1. a 2.2.

2.1 Zakládání explantátových kultur a jejich charakteristika

Rostlinné buňky jsou totipotentní, a lze tedy v principu založit *in vitro* kultury z jakékoliv části rostliny nebo semenáčku pěstováním explantátu na vhodném živném médiu podporujícím buněčný růst, přičemž nejlépe se pro tento účel hodí meristemická pletiva (pupeny, mladé listy, klíčící rostliny) (Mustafa et al., 2011). Z hlediska kontaminace výchozího

rostlinného materiálu je výhodnější použít pro zakládání kultur sterilně získaný semenáček než části intaktní rostliny (stonky, listy, kořeny), protože semena je zpravidla snazší účinně povrchově sterilizovat. Vytvořený kalus (neorganizovaná masa parenchymatických buněk) se oddělí od původní rostlinné části a kalusová kultura se dále udržuje pasážováním. Umístěním částí kalusu do tekutého živného média se získá suspenzní kultura; kalus se rozvolňuje nejčastěji mechanicky třepáním (výhodné je, když je kalus dobře rozpadavý) nebo enzymově působením pektinasy (Mustafa et al., 2011; Ikeuchi et al., 2013; Efferth, 2019).

Existuje několik široce použitelných základních živných médií, která se obvykle využívají pro zakládání a kultivaci explantátových kultur – jsou to média podle Murashigeho a Skooga (Murashige et al., 1962), Linsmaierové a Skooga (Linsmaier et al., 1965), Gamborga (Gamborg et al., 1968) a Schenka a Hildebrandta (Schenk et al., 1972) – vhodnost konkrétního média se může lišit podle rostlinného druhu/genotypu a také podle účelu, pro který má být kultura použita (Mustafa et al., 2011). Další, méně rozšířená média jsou médium podle Lloyda a McCowna (Lloyd et al., 1980), Nitsche a Nitsche (Nitsch et al., 1969) a Hellera (Heller, 1953).

Významnou součástí živných médií, velmi důležitou pro iniciaci kalogeneze a ovlivňující rovněž vzhled a strukturu kalusu, jsou růstové regulátory (auxiny, případně také cytokininy) (Mustafa et al., 2011). Rozdílnost v reakci na exogenně dodané růstové látky u jednotlivých rostlinných druhů je značná a může být důsledkem rozdílné citlivosti rostlinných pletiv vůči těmto látkám nebo různých endogenních hladin fytohormonů (Naikawadi et al., 2016; Phillips et al., 2019). Vzhledem k tomu, že o molekulárním mechanismu působení růstových regulátorů při indukci tvorby kalusu je poměrně málo známo (Ikeuchi et al., 2013), je potřeba nalézt jejich vhodný typ a koncentraci pro danou kulturu experimentálně (Mustafa et al., 2011; Gomes-Copeland et al., 2018). Růstové regulátory ovlivňují rovněž biosyntetickou aktivitu a organogenetický potenciál kultur (Lalaleo et al., 2018; Kumari et al., 2018). Nejběžněji užívané auxiny jsou kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová, kyselina α -naftyloctová, kyselina β -indolyloctová, případně kyselina β -indolylmáselná; mezi často používané cytokininy patří benzylaminopurin, kinetin, případně zeatin (Mustafa et al., 2011).

Růst kultur a produkce sekundárních metabolitů jsou ovlivňovány řadou faktorů (Espinosa-Leal et al., 2018). U každé kultury je nutné experimentálně určit optimální podmínky kultivace a stanovit růstovou a produkční charakteristiku s ohledem jednak na vhodnou dobu subkultivace, jednak na možnosti ovlivňování kultury změnami kultivačních podmínek a různými dalšími zásahy. Důležitou charakteristikou pro danou kulturu je také světelný režim, v němž je kultivována (tma, střídavá světelná perioda nebo trvalé osvětlení), neboť může ovlivnit jak proliferativní aktivitu, tak produkční schopnost kultury (Nakamura et al., 1999; Blando et al., 2005;

Mustafa et al., 2011; Wang et al., 2016; Appelhagen et al., 2018; Khan et al., 2018; Lalaleo et al., 2018; Coimbra et al., 2019).

Ke zkoumání produkce kumarinů byla odvozena kalusová kultura anděliky lékařské (*Angelica archangelica* L., Apiaceae), jednak z klíčící rostliny (Siatka, 1995), jednak z na jaře rašícího vrcholového pupene rostliny (Siatka, 1993). Kultury byly kultivovány na médiu podle Murashigeho a Skooga s kombinací růstových regulátorů kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová a benzylaminopurin ve třech světelných režimech – ve tmě (kalusy odvozené z klíčící a intaktní rostliny), za denní světelné periody a za stálého osvětlení (kalusy z klíčící rostliny). Kalusy dobře rostly (kromě kalusů za stálého osvětlení, jejichž růst byl světlem inhibován), byly světle žluté až krémově bílé, měkké a rozpádnuté. Z kalusové kultury pocházející z intaktní rostliny byla následně mechanickým rozvolněním na třepače v tekutém živném médiu stejného složení založena suspenzní kultura, která byla vizuálně jemná, homogenní, dobře proliferující, světle šedá až bílá (Siatka, 1993). Optimální subkultivační interval pro kalusovou kulturu byl osm týdnů, pro suspenzní kulturu dva týdny (Siatka, 1993; Siatka, 1995).

Na některých kalusech odvozených z klíčící rostliny anděliky lékařské se objevily skupinky nachově zbarvených buněk – tyto pigmentované části byly odebrány a selektivně subkultivovány, až se po přibližně jednom roce podařilo získat stabilní, dobře rostoucí, tmavě fialovou kulturu, jež byla využita pro studium produkce antokyanů *in vitro*; kultura byla kultivována ve tmě a pasážována ve čtyřtýdenním intervalu (Siatka, 2018).

Pro studium produkce flavonoidů a isoflavonoidů byly založeny kalusové kultury z klíčících rostlin čtyř odrůd jetele lučního (*Trifolium pratense* L., Fabaceae; odrůdy DO-8, DO-9, Tempus a Sprint) (Kašparová et al., 2006). Kultury byly kultivovány na médiu podle Gamborga s kombinací růstových regulátorů, která se osvědčila i v kulturách anděliky lékařské, tj. kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová s benzylaminopurinem. Kultivace probíhala při světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Kalusy byly světle žluté, křehké a vykazovaly uspokojivý růst bez tendence k morfogenezi. Charakter kalusů nejevil patrné rozdíly mezi kulturami odvozenými z různých odrůd. Z kalusových kultur byly odvozeny suspenzní kultury mechanickým roztřepáním v živném médiu stejného složení. Optimální subkultivační interval byl tři týdny pro kalusovou a dva týdny pro suspenzní kulturu. Pro indukci kalogeneze a kultivaci kalusů bylo zkoušeno také médium podle Murashigeho a Skooga, které však bylo méně vhodné než médium podle Gamborga, a rovněž různé kombinace auxinů (kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová a α -naphthoxyoctová) s cytokiny (kinetin a benzylaminopurin), z nichž optimální se ukázala být výše uvedená kombinace kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové s benzylaminopurinem.

Produkce flavonoidů byla zkoumána také v kalusové kultuře odvozené z květních pupenů sedmikrásky obecné (*Bellis perennis* L., Asteraceae) (Pohanková, 1992; Siatka et al. 1998a). Kultura byla kultivována na médiu podle Murashigeho a Skooga s kyselinou 2,4-dichlorfenoxycetovou jako růstovým regulátorem a za denní světelné periody. Kalusy dobře rostly, byly žlutě zbarvené a měkké. Z kalusové kultury byla mechanickým roztřepáním v tekutém živném médiu odvozena homogenní, světle žlutá suspenzní kultura (Siatka et al., 1999). Nejvhodnější délka subkultivačního intervalu byla pět týdnů pro kalusovou a dva týdny pro suspenzní kulturu. Pro odvození a kultivaci kultury byly zkoušeny také další auxiny v různých koncentracích, které byly ale méně vhodné než kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová – na médiu s kyselinou α -naftylacetovou docházelo k vytváření kalusu v menší míře, kalusy byly světle žluté s pevnou konzistencí, zatímco na médiu s kyselinou β -indolylacetovou se tvořily drobné a špatně proliferující tmavé kalusy, u nichž záhy docházelo k intenzivní diferenciaci vedoucí k tvorbě stonků a listů.

Pro zkoumání produkce podofylotoxinu byly založeny kalusové kultury z jehlic tří odrůd jalovce viržinského (*Juniperus virginiana* L., Cupressaceae; odrůdy Hetzii, Glauca a Grey Owl) (Kašparová et al., 2016). Kultury byly kultivovány na médiu podle Schenka a Hildebrandta s kombinací růstových regulátorů kyseliny α -naftylacetové a kinetinu, při světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Vznikající kalusy rychle hnědly a špatně proliferovaly, čemuž se podařilo zabránit obohacením kultivačního média o kyselinu askorbovou. Kalusy v kultuře byly relativně malé, nazelenale žluté, křehké a drobivé. Nebyly pozorovány žádné morfologické rozdíly mezi kulturami v závislosti na odrůdě jalovce viržinského. Z kalusů byly mechanickým roztřepáním v tekutém živném médiu shodného složení jako pro kalusové kultury odvozeny suspenzní kultury, které byly žlutě zbarvené, jemné a homogenní. Jako optimální subkultivační interval byly zjištěny čtyři týdny u kalusové a dva týdny u suspenzní kultury. Pro zakládání kalusové kultury byla zkoušena také další živná média podle Murashigeho a Skooga, Gamborga, Lloyda a McCowna – ani na jednom z nich nedošlo k indukci kalogeneze.

Pro experimenty zabývající se možnostmi ovlivnění produkce skořicových kyselin byly využity kalusové kultury z klíčnic rostlin třapatky nachové (*Echinacea purpurea*, Asteraceae) a třapatky bledé (*Echinacea angustifolia*, Asteraceae) založené dr. Šíchou (Šícha et al., 1989), jež byly kultivovány na médiu podle Murashigeho a Skooga s přidavkem kyseliny α -naftylacetové za denní světelné periody a se subkultivačním intervalem šest týdnů. Kalusy byly světle žluté a měkké.

Pro studium produkce anthracenových derivátů byly použity kalusová kultura založená doc. Duškem z kořenů reveně dlanité (*Rheum palmatum*, Polygonaceae) (Dušek et al., 1991) a

kalusové kultury nově odvozené z kořenů intaktní rostliny a z klíčnicí rostliny (Kašparová et al. 1999). Kultury byly kultivovány na médiu podle Murashigeho a Skooga s přidavkem kyseliny α -naftyloctové při světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma; byly dobře proliferující, žlutě zbarvené a rozpadavé. Za stejných podmínek byla kultivována suspenzní kultura, která byla z kalusové kultury odvozena mechanickým roztřepáním v tekutém živném médiu (Kašparová et al., 2001); byla světle béžová, morfologicky heterogenní s výskytem drobných shluků buněk. Subkultivační interval byl sedm týdnů pro kalusovou a dva týdny pro suspenzní kulturu.

Podobně jako pro kultury *Angelica archangelica*, *Bellis perennis*, *Rheum palmatum*, *Echinacea purpurea* a *Echinacea angustifolia* se médium podle Murashigeho a Skooga, jež je používáno nejčastěji při zakládání explantátových kultur, osvědčilo také např. pro kultury *Panax sikkimensis* (Mathur et al., 2010), *Juniperus communis* (Kocer et al., 2011), *Psoralea corylifolia* (Ahmed et al., 2014), *Tagetes erecta* (Benítez-García et al., 2014), *Trifolium pratense* (Esmacili et al., 2015; Reis et al., 2018), *Spilanthus acmella* (Abyari et al., 2016), *Corylus avellana* (Salehi et al., 2017), dvou odrůd *Echinacea purpurea* (Rady et al., 2018), *Pyrostegia venusta* (Coimbra et al., 2019). Pro indukci tvorby kalusu a proliferaci kultur *Parkia biglobosa* bylo médium podle Murashigeho a Skooga mnohem vhodnější než médium podle Gamborga, zatímco na médiu podle Lloyda a McCowna nedošlo, stejně jako u kultur *Juniperus virginiana*, k žádné kalogenezi (Abbas et al., 2018). Médium podle Gamborga se ukázalo být vhodné pro založení jiných kalusových kultur *Trifolium pratense* (MacLean et al., 1989; Poerba et al., 1997) a bylo příznivější než médium podle Murashigeho a Skooga pro indukci kalogeneze a růst kultur *Allium chinense* (Yan et al., 2009) a *Coronilla scorpioides* (Piovan et al., 2014), podobně jako u naší založených kultur *Trifolium pratense*. Média podle Lloyda a McCowna a podle Murashigeho a Skooga byla srovnatelná v účinnosti indukce kalogeneze při zakládání kultur *Barringtonia racemosa* (Osman et al., 2016) nebo *Juglans regia* (Avilés et al., 2009); lišila se však morfologie kalusů – na prvním médiu se tvořily kompaktní nodulární kalusy, na druhém naopak rozpadavé, což je výhodnější pro odvozování suspenzních kultur. Médium podle Lloyda a McCowna bylo naopak výhodnější než médium podle Murashigeho a Skooga pro tvorbu a růst kalusu při odvozování kultur *Juniperus excelsa*, *Juniperus horizontalis* a *Juniperus chinensis* (Zaidi et al., 2012). Médium podle Schenka a Hildebrandta se osvědčilo pro odvození a kultivaci kalusových kultur *Harpagophytum procumbens* (Grąmbowska et al., 2016), podobně jako tomu bylo u kultur *Juniperus virginiana*. Kalogenezi se nepodařilo indukovat na médiu podle Murashigeho a Skooga, Gamborga nebo Lloyda a McCowna u *Juniperus chinensis*, úspěšné pro založení kultury bylo pouze médium podle Schenka a Hildebrandta

(Muranaka et al. 1998), stejně jako v případě *Juniperus virginiana*. Médium podle Schenka a Hildebrandta bylo nejvhodnější pro založení a růst dobře proliferující kalusové kultury bez tendence k morfogenezi u *Genista tinctoria*, kdežto na médiu podle Gamborga se vytvářel špatně rostoucí nekrotizující kalus vykazující spontánní rhizogenezi (Łuczkiwicz et al., 2003).

Hnědnutí explantátu a tvořícího se kalusu pozorované při zakládání kultur *Juniperus virginiana* je dáno oxidací fenolických látek přítomných v rostlinné tkáni; hromadící se hnědé oxidační produkty mají velmi často inhibiční vliv jak na kalogenezi samotnou, tak na následnou životaschopnost, proliferaci a metabolickou aktivitu kultur, a proto se do kultivačního média přidávají některé látky, jako např. aktivní uhlí, polyvinylpyrolidon, kyselina citronová nebo kyselina askorbová, které mají tomuto nepříznivému jevu předejít nebo jej zmírnit (Kumari et al., 2008; Habibi et al., 2009; He et al., 2009; Chang et al., 2013; Silveira et al., 2016). Přídavkem antioxidačně působící kyseliny askorbové se podařilo hnědnutí v kultuře *Juniperus virginiana* zabránit. Podobně pozitivní vliv kyseliny askorbové byl pozorován např. v kalusové kultuře *Glycyrrhiza glabra* (Vijayalakshmi et al., 2016) *Papaver bracteatum* (Rostampour et al., 2010) nebo *Parkia biglobosa* (Abbas et al., 2018), zatímco v kalusové kultuře *Taxus brevifolia* byla neúčinná (Khosroushahi et al., 2011).

V rostlinných suspenzních kulturách se často vyskytují vedle volných buněk také jejich shluky. Stupeň agregace je ovlivněn mnoha okolnostmi a má vliv na metabolickou aktivitu buněk, a proto je důležité znát morfologický charakter suspenzní kultury (Qu et al., 2005; Patil et al., 2013; Mustafa et al., 2011; Mavituna et al., 2016, Alvarez-Yela, et al., 2016). Jemná, homogenní suspenzní kultura je preferována oproti směsi různě velkých buněčných shluků jednak jako modelový systém, protože zajišťuje vyšší reprodukovatelnost v experimentech, jednak je výhodnější z technologického hlediska (Chattopadhyay et al., 2002; Mustafa et al., 2011).

Pro sledování obsahu vybraných sekundárních metabolitů v příslušných kalusových a suspenzních kulturách byly použity následující metody.

Pro stanovení kumarinů v kulturách *Angelica archangelica* byla vypracována fluorimetrická metoda využívající techniku průtokové injekční analýzy (FIA) (Siatka et al., 1998b). Následně byla nahrazena metodou sekvenční injekční analýzy (SIA) (Siatka et al., 2011), jež je oproti předchozí metodě instrumentálně jednodušší, přitom analyticky mnohem variabilnější a flexibilnější, a je rovněž úspornější a ekologicky přátelštější (nižší spotřeby vzorku a činidel, nižší množství odpadu). Princip SIA spočívá v tom, že jsou zóny nosného média, vzorku a činidel nejprve nasáty do jednokanálového systému s využitím selekčního ventilu a pístového čerpadla a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zón a dopravení

disperze do detektoru. Obě metody jsou citlivé a jednoduché a splňují požadavek na rychlé kvantitativní stanovení sledovaných látek ve velkých sériích vzorků pocházejících z experimentů v explantátových kulturách. Pro stanovení skopoletinu byla vypracována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorimetrickou detekcí (Siatka et al., 2017).

Pro stanovení antokyanů v kulturách *Angelica archangelica* byla využita spektrofotometrická metoda popsaná v literatuře (Rajendran et al., 1992).

V kulturách *Trifolium pratense* bylo prováděno stanovení flavonoidů lékopisnou spektrofotometrickou metodou (Český lékopis, 2002) a isoflavonoidů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie podle literatury (De Rijke et al., 2002).

Obsah flavonoidů v kulturách *Bellis perennis* byl stanovován spektrofotometricky metodou podle literatury (El'-Kommos et al., 1979).

Pro stanovení podofylotoxinu v kulturách *Juniperus virginiana* byla vypracována metoda využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (Kašparová et al., 2018).

Obsah kyseliny skořicové a jejích derivátů v kulturách *Echinacea purpurea* a *Echinacea angustifolia* byl stanovován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií metodou podle literatury (Šícha et al., 1989).

Stanovení anthracenových derivátů v kulturách *Rheum palmatum* bylo prováděno lékopisnou spektrofotometrickou metodou (Československý lékopis 4, 1987).

2.2 Ovlivňování produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách

Z mnoha faktorů, jež ovlivňují produkci sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro* a jejichž modifikace může vést k jejímu zvýšení, byla v této práci věnována pozornost několika z nich, které budou probrány podrobněji v následujících kapitolách: složení živného média, růstové regulátory, přídavek prekurzorů a elicitace.

2.2.1 Složení živného média

Živná média dodávají veškeré živiny, energii a vodu potřebné pro explantátové kultury (Phillips et al., 2019); obsahují několik základních složek – makroprvky, přítomné v relativně velkých množstvích v řádu milimolů (N, P, Ca, Mg, K, S); mikroprvky, potřebné ve stopových, mikromolárních množstvích (např. Fe, Mn, Zn, Cu, Co, B, I, Cl); zdroje uhlíku, neboť rostlinné kultury *in vitro* jsou kultivovány zpravidla heterotrofně (obvykle sacharosa); vitaminy, důležité pro mnoho biochemických pochodů (např. thiamin, pyridoxin, myo-inositol); růstové

regulátory (nejčastěji auxiny a cytokininy), které řídí všechny životní pochody v rostlinných buňkách a jsou nezbytné pro indukci kalogeneze při zakládání kultur i pro jejich další udržování v podmínkách *in vitro* (Smetanska, 2008; Mustafa et al., 2011, Murthy et al., 2014; Phillips et al., 2019). Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, bylo vyvinuto několik základních živných médií, která se od doby svého vzniku osvědčila u řady kultur odvozených z nejrůznějších rostlinných druhů. Tato média se vzájemně liší zastoupením a koncentrací jednotlivých látek (např. množství dusíku a poměr mezi jeho dusičnanovou a amonnou formou, koncentrace fosforečnanu, přítomnost a koncentrace jednotlivých stopových prvků nebo vitaminů), což má výrazný vliv na proliferaci a produkční schopnosti jednotlivých kultur (Smetanska, 2008, Murthy et al., 2014).

V kalusové kultuře *Angelica archangelica* byl sledován vliv různých živných médií na růst a na produkci antokyanů. Růst kultury byl nejvyšší na médiu podle Schenka a Hildebrandta a podle Lloyda a McCowna, nižší a srovnatelný na médiu podle Murashigeho a Skooga, podle Linsmaierové a Skooga a podle Gamborga; naopak média podle Nitsche a Nitsche a podle Hellera byla pro podporu růstu nevhodná. Pro produkci antokyanů se osvědčilo pouze médium podle Murashigeho a Skooga a podle Linsmaierové a Skooga, na ostatních médiích byl obsah antokyanů v kultuře velmi nízký. Posuzováno z obou hledisek, tj. buněčné proliferace a tvorby antokyanů, jsou pro kultivaci kalusové kultury anděliky lékařské nejvhodnější média podle Murashigeho a Skooga a podle Linsmaierové a Skooga (Siatka, 2018).

Při podobném srovnávání živných médií z pohledu optimální podpory růstu kultury i produkce antokyanů bylo např. pro kalusovou kulturu *Daucus carota* jako nejlepší nalezeno médium podle Murashigeho a Skooga (Narayan et al., 2005), pro kalusovou kulturu *Fragaria ananassa* médium podle Gamborga (Nakamura et al., 1999) a pro kalusovou kulturu *Aralia cordata* médium podle Linsmaierové a Skooga (Sakamoto et al., 1994), zatímco ostatní porovnávaná média vykazovala v příslušných kulturách horší výsledky. Obdobně tomu tak bylo s médiem podle Schenka a Hildebrandta v případě kalusové kultury *Genista tinctoria* produkující isoflavony (Łuckiewicz et al., 2003).

2.2.2 Růstové regulátory

Růstové regulátory hrají zásadní roli v kontrole a regulaci růstu a vývoje rostlin tím, že zasahují do takových procesů jako je např. dělení, prodlužování a diferenciacce rostlinných

buněk (Ling et al., 2011). Bylo zjištěno, že typ a koncentrace růstových regulátorů významným způsobem ovlivňují nárůst biomasy a tvorbu produktů v explantátových kulturách a že požadavky různých kultur se značně liší v závislosti na rostlinném druhu (Smetanska, 2008; Jamwal et al., 2018). Vzhledem k tomu, že stále není dostatečně objasněn mechanismus účinku růstových regulátorů na molekulární úrovni, stejně jako mnohdy chybí detailní znalosti jednotlivých biosyntetických drah primárního a sekundárního metabolismu a jejich vztahů (Ji et al., 2015; Wang et al., 2018; Kurepa et al., 2019; Phillips et al., 2019), je obtížné předpovědět působení auxinů a cytokininů na buněčnou proliferaci a produkci sekundárních metabolitů v každé konkrétní kultuře, a musí tedy být vhodné růstové regulátory nebo jejich kombinace a jejich optimální koncentrace zjišťovány experimentálně.

V suspenzní kultuře *Angelica archangelica* byl zkoumán vliv čtyř auxinů (kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová, α -naftyloctová, β -indolyloctová, β -indolylmáselná) ve čtyřech koncentracích (0,2; 2; 10 a 20 mg/l) a vliv světelného režimu (kultivace ve tmě a za stálého osvětlení) na růst kultury a obsah kumarinů v buňkách a médiu. Růst kultury a produkce kumarinů byla významně ovlivňována typem a koncentrací auxinu; vliv světelného režimu byl v porovnání s vlivem auxinů méně výrazný – změny vyvolané auxiny byly modifikovány světelnými podmínkami. Nejvyšší růst byl dosažen s kyselinou 2,4-dichlorfenoxyoctovou (2 mg/l) a β -indolyloctovou (10 mg/l); produkce kumarinů byla nejvyšší v přítomnosti kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a α -naftyloctové v koncentraci 0,2 mg/l (Siatka et al., 2003c; Siatka et al., 2008).

Ovlivnění buněčné proliferace a tvorby antokyanů působením čtyř auxinů a dvou cytokininů ve třech koncentracích (0,1; 1 a 10 mg/l) bylo zkoumáno v kalusové kultuře *Angelica archangelica*. Nejlepšího růstu kultury bylo docíleno v přítomnosti cytokininů benzylaminopurinu a kinetinu (0,1 a 1 mg/l), nižší růst byl zaznamenán při požití kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a α -naftyloctové (0,1 a 1 mg/l); neosvědčila se koncentrace 10 mg/l těchto čtyř růstových regulátorů a ani kyselina β -indolylmáselná a β -indolyloctová ve všech koncentracích. Obdobně tomu bylo i u produkce antokyanů – nejvyšší obsah antokyanů, stejně jako nejvyšší růst, byl dosažen působením benzylaminopurinu a kinetinu v koncentraci 1 mg/l (Siatka, 2019).

Vliv tří auxinů ve třech koncentracích (0,1; 1 a 10 mg/l) na buněčnou proliferaci a tvorbu flavonoidů byl zkoumán v kalusové kultuře *Bellis perennis*. Nejvyšší růst kultury a současně i produkce flavonoidů byly pozorovány u kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové v koncentraci 0,1 a 1 mg/l, α -naftyloctové v koncentraci 1 mg/l a β -indolyloctové v koncentraci 0,1 mg/l (Siatka, 1998). Dále bylo zkoumáno působení tří výše uvedených auxinů ve třech koncentracích v kombinaci s cytokininem benzylaminopurinem ve dvou koncentracích (0,1 a 1 mg/l) – kombinace

auxinů s benzylaminopurinem vedla ke zvýšené proliferaci kultury v porovnání se samotnými auxiny; pokud jde o obsah flavonoidů, kombinace benzylaminopurinu s kyselinou 2,4-dichlorfenoxyoctovou vedly ke snížení a s kyselinou α -naftyloctovou naopak ke zvýšení produkce flavonoidů ve srovnání se samotným auxinem, u kombinací s kyselinou β -indolyloctovou nebyl vztah zcela jednoznačný; nejlepších výsledků bylo dosaženo kombinací benzylaminopurinu (0,1 mg/l) s kyselinou 2,4-dichlorfenoxyoctovou (0,1 mg /l) pro růst a s kyselinou α -naftyloctovou (1 mg/l) pro produkci flavonoidů (Siatka et al., 2001).

V kalusové kultuře *Rheum palmatum* byl studován účinek čtyř auxinů ve třech koncentracích (0,1; 1 a 10 mg/l). Růst kultury stimulovala velmi dobře kyselina α -naftyloctová a 2,4-dichlorfenoxyoctová, méně kyselina β -indolylmáselná, zatímco kyselina β -indolyloctová byla z hlediska růstu nevhodná; vysoký obsah anthracenových derivátů byl zaznamenán při použití kyseliny α -naftyloctové (1 a 10 mg/l), β -indolylmáselné (0,1 mg/l) a β -indolyloctové (1 mg/l), u ostatních koncentrací těchto auxinů stejně jako u kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové byl obsah v kultuře nižší a vzájemně srovnatelný (Siatka et al., 2003a).

Jak je vidět u výše zkoumaných kultur, každá z nich má jiné nároky na optimální typ a koncentraci auxinu nebo cytokininu. Obdobně je tomu i u jiných kultur. Podobné účinky jako v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* měly kyselina β -indolyloctová, α -naftyloctová a 2,4-dichlorfenoxyoctová v kalusové a suspenzní kultuře *Evolvulus alsinoides*, pokud jde o růst kultury a produkci skopoletinu; prvně jmenovaný auxin byl nejúčinnější (Naikawadi et al., 2016). Obsah umbeliferonu v suspenzní kultuře *Haplophyllum patavinum* (Filippini et al., 1998) nebo skopoletinu v kalusové kultuře *Coronilla scorpioides* (Piovan et al., 2014) byl srovnatelný při kultivaci za světla i ve tmě, stejně jako v suspenzní kultuře *Angelica archangelica*. Cytokininy kinetin a benzylaminopurin vedly k vyššímu nárůstu biomasy než auxin kyselina α -naftyloctová v suspenzní kultuře *Panax vietnamnesis* (Trong et al, 2017), podobně jako v kalusové kultuře *Angelica archangelica* produkující antokyany, zatímco v kalusové kultuře *Stellera chamaejasme* to bylo pozorováno jen u benzylaminopurinu, nikoliv u kinetinu, který naopak růst ve srovnání s kyselinou α -naftyloctovou silně inhiboval (Wang et al., 2013). Kalusová kultura *Bridelia stipularis* rostla dobře v přítomnosti benzylaminopurinu a kinetinu, i když v trochu menší míře než s kyselinou 2,4-dichlorfenoxyoctovou a α -naftyloctovou, ale produkce antokyanů probíhala jen v kultuře s auxiny, nikoliv cytokininy (Sreenivas et al., 2011), na rozdíl od kalusové kultury *Angelica archangelica*, kde byly cytokininy mnohem účinnější než auxiny. Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová byla nejefektivnější v podpoře růstu v kalusové kultuře *Oxalis reclinata*, zatímco v přítomnosti kyseliny α -naftyloctové a β -indolyloctové kultury rostly

špatně a nebyly vůbec schopny růst při použití kyseliny β -indolylmáselné; na druhou stranu kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová snižovala biosyntézu antokyanů ve srovnání s kyselinou α -naftyloctovou a β -indolyloctovou (Makunga et al., 1997). Kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová a α -naftyloctová byly vhodnější než kyselina β -indolyloctová a β -indolylmáselná pro buněčnou proliferaci v suspenzní kultuře *Fragaria ananassa*, avšak z hlediska produkce antokyanů bylo působení kyseliny α -naftyloctové, β -indolyloctové a β -indolylmáselné srovnatelné a slabší než kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové (Mori et al., 1993). Biosyntéza flavonoidů byla vyšší v přítomnosti kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové než α -naftyloctové v kalusové kultuře *Hydrocotyle bonariensis*; kombinace prvně jmenovaného auxinu s kinetinem vedla ke zvýšení produkce (Masoumian et al., 2011). Růst kalusové kultury *Stellera chamaejasme* byl více stimulován benzylaminopurinem než kyselinou α -naftyloctovou, jejich kombinací se nárůst biomasy ještě podstatně zvýšil, kdežto produkce flavonoidů byla při použití tohoto auxinu a cytokininu každého samostatně srovnatelná, ale jejich kombinace nevedla k dalšímu zlepšení (Wang et al., 2013). Nejvyšší buněčné proliferace a produkce flavonoidů bylo dosaženo s kyselinou β -indolylmáselnou v kalusové kultuře *Rumex vesicarius*; nižší a u obou srovnatelný růst byl docílen s kyselinou 2,4-dichlorfenoxycetovou a α -naftyloctovou, zatímco pro tvorbu flavonoidů byl druhý auxin z obou účinnější (El-Shafey et al., 2016). Kyselina α -naftyloctová byla efektivnější než kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová pro biosyntézu flavonoidů v suspenzní kultuře *Ficus deltoidea*; benzylaminopurin a kinetin byly v porovnání s auxiny účinné velmi málo (Ong et al., 2011). V kalusové kultuře *Gynochthodes umbellata* se pro růst osvědčily kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová a β -indolylmáselná, méně β -indolyloctová a vůbec α -naftyloctová, z hlediska produkce anthrachinonů pak pouze kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (Anjusha et al., 2017). V kalusové kultuře *Morinda citrifolia* vykázaly kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová, α -naftyloctová a β -indolylmáselná srovnatelný účinek na růst; biosyntéza anthrachinonů byla nižší při použití kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové (Sreeranjini et al., 2013).

2.2.3 Prekuzory

Přidání sloučenin, které jsou intermediáty biosyntetických drah žádaných sekundárních metabolitů, představuje jeden z přístupů, jenž může vést ke zvýšení produkce těchto metabolitů v explantátových kulturách; přitom je také důležité, aby prekuzory byly snadno dostupné a levnější než kulturou produkované látky (Espinosa-Leal et al., 2018; Matsuura et al., 2018). Nalézt vhodný prekuzor může být problém – musí to být látka, kterou dokáže kultura přijmout

a přeměnit na žádané metabolity, která na ni však současně nebude v použité koncentraci působit toxicky.

V kalusové kultuře *Angelica archangelica* byl sledován vliv fenylalaninu a kyseliny skořicové v rozmezí koncentrací 0,1-10 mmol/l na růst kultury a produkci kumarinů – obě látky stimulovaly růst kultury v koncentracích 0,1-1 mmol/l, zatímco koncentrace 5 a 10 mmol/l působily na kulturu toxicky a inhibovaly její růst; produkce kumarinů byla zvýšena fenylalaninem v koncentraci 0,1; 0,25 a 0,5 mmol/l (Siatka, 1995). Účinek fenylalaninu, tyrosinu a kyseliny skořicové v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 mmol/l byl zkoušen v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* – nejlepší růst byl dosažen působením tyrosinu (0,1 a 1 mmol/l) a nejvyšší produkce kumarinů přidavkem fenylalaninu (0,1 mmol/l); kyselina skořicová a fenylalanin v koncentraci 1 mmol/l působily toxicky (Siatka et al., 2002).

U kalusových kultur *Echinacea purpurea* a *Echinacea angustifolia* byl zkoumán účinek fenylalaninu na růst kalusů a obsah kyseliny skořicové a kávové. Fenylalanin v koncentracích 0,1 a 0,25 mmol/l zvýšil růst, kdežto koncentrace 10 mmol/l působila toxicky v obou kulturách. Fenylalanin (0,5; 1; a 2,5 mmol/l) zvýšil produkci kyseliny skořicové v kultuře *Echinacea purpurea*, zatímco produkci kyseliny kávové příliš neovlivnil; v kultuře *Echinacea angustifolia* naopak stimuloval (v koncentraci 1 a 2,5 mmol/l) tvorbu kyseliny kávové a málo ovlivnil produkci kyseliny skořicové; koncentrace fenylalaninu 10 mmol/l snížila produkci kyseliny skořicové a kávové v obou kulturách (Šícha et al., 1991)

Vliv kyseliny skořicové (0,003; 0,03; 0,3 a 3 mmol/l) na biosyntézu podofylotoxinu byl testován v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana*; podstatné zvýšení produkce bylo dosaženo při koncentraci 0,3 mmol/l, nižší a vyšší koncentrace byly prakticky bez vlivu (Kašparová et al., 2018).

Obdobné výsledky byly zaznamenány i u jiných explantátových kultur – jednotlivé kultury se liší svou citlivostí vůči dodávaným potenciálním prekurzorům a schopností využít je pro biosyntézu sekundárních metabolitů. Fenylalanin v koncentracích 0,05; 0,1; 0,15 a 0,2 mmol/l významně neovlivnil růst suspenzní kultury *Spilanthes acmella*, zato měl výrazně stimulační účinek na produkci skopoletinu, nejlepší v koncentraci 0,1 mmol/l (Abyari et al., 2016), podobně jako tomu bylo v suspenzní kultuře *Angelica archangelica*. Růst suspenzní kultury *Evolvulus alsinoides* fenylalanin v koncentraci 0,06; 0,12 a 0,18 mmol/l neovlivnil a v koncentraci 0,24 mmol/l jej mírně snížil; obsah skopoletinu v kultuře výrazně vzrostl přidavkem fenylalaninu, s rostoucí koncentrací fenylalaninu mírně klesal (Naikawadi et al., 2016). Kyselina

skořicová ve všech testovaných koncentracích (0,0006-0,3 mmol/l) stimulovala produkci psoralenu v kalusové kultuře *Psoralea corylifolia* (Mohammadparast et al., 2015), v suspenzní kultuře v koncentraci 0,3 mmol/l snížila růst kultury, ale zvýšila produkci psoralenu (Gajula et al., 2018). Tyrosin a fenylalanin v koncentracích 0,3; 0,6 a 0,9 mmol/l značně zlepšily produkci derivátů kyseliny kávové v kalusových kulturách dvou odrůd *Echinacea purpurea* (Rady et al., 2018). Kyselina skořicová (2,1 mmol/l) působila toxicky na suspenzní kulturu *Podophyllum hexandrum*, fenylalanin a tyrosin (0,6-9,5 mmol/l) sice neovlivnily růst kultury, ale biosyntézu podofylotoxinu snížily (Van Uden et al., 1990). Fenylalanin (1 mmol/l) snížil růst, ale zvýšil tvorbu podofylotoxinu v transformované kořenové kultuře *Linum flavum* (Renouard et al., 2018). Produkci podofylotoxinu v kalusové kultuře *Juniperus chinensis* fenylalanin zvýšil v koncentraci 3 mmol/l a naopak snížil v koncentraci 6 mmol/l (Muranaka et al., 1998).

2.2.4 Elicitace

Elicitace představuje jednu z nejúčinnějších technik pro zlepšování biotechnologické produkce sekundárních metabolitů (Ramirez-Estrada et al., 2016). Její podstatou je manipulace metabolických drah vyvoláním stresu a může tedy být využita nejen ke zvyšování produktivity, ale také jako výzkumný nástroj ke studiu rostlinné tolerance vůči stresu a k pochopení role různých stresových faktorů a jim odpovídajících fyziologických procesů a změn odehrávajících se v rostlině po jejich působení využitím explantátových kultur jako modelového systému (Narayani et al., 2017).

Pojem elicítace znamená aplikaci elicitorů pro aktivaci obranné reakce rostlinné buňky a elicitory jsou jakékoliv fyzikální, chemické nebo biologické činitele, jež spouštějí řadu obranných mechanismů, podobných odpovědi rostlin na podněty z okolního prostředí nebo na napadení patogeny za účelem ochrany a adaptace na stresové podmínky, vedoucích v konečném důsledku k indukci nebo zvýšení syntézy a akumulace sekundárních metabolitů (Baenas et al., 2014; Ramirez-Estrada et al., 2016; Narayani et al., 2017; Thakur et al., 2019). Elicitory se podle své povahy dělí na abiotické a biotické. Abiotické elicitory jsou nebiologického původu a rozdělují se na fyzikální, mezi něž se řadí např. ultrafialové záření, nízká či vysoká teplota, mechanické poranění, pulsní elektrické pole, nízká či vysoká osmolarita, vysoký tlak, ultrazvuk, a chemické, k nimž patří např. soli kovů (zejména těžkých, ale nejen těch: Hg, Cu, Pb, Ni, Zn, Cd, Ag, Co, Fe, Cr, Mn, V, Al), ozon, některé syntetické organické sloučeniny (např. N,N-dicyklohexylkarbodiimid, benzothiadiazol), některé rostlinné signální molekuly, normálně produkované rostlinnou buňkou během reakce na stres (např. kyselina salicylová,

kyselina jasmínová, methyljasmonát) (Baenas et al., 2014; Narayani et al., 2017; Thakur et al., 2019). Biotické elicitory mají původ biologický a pocházejí z mikroorganismů, býložravců a rostlin; zahrnují např. homogenáty bakterií a hub nebo filtráty z jejich kultur, alginát, chitosan, pektin, proteiny (Baenas et al., 2014; Narayani et al., 2017).

Pokud jde o mechanismus účinku elicitorů, je poměrně složitý. Celý proces začíná percepcí elicitoru prostřednictvím receptorů lokalizovaných v cytoplasmatické membráně, což má za následek spuštění řady dalších dějů vedoucích k amplifikaci a přenosu signálu, jako je např. reverzibilní fosforylace a defosforylace proteinů v cytoplasmatické membráně a cytosolu, změny iontových toků (zvýšení cytosolické koncentrace kalcia; influx protonů a eflux kalium a chloridů), extracelulární alkalizace a cytoplasmatická acidifikace, aktivace mitogenem aktivované proteinové kinázy, aktivace nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidasy a produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku, aktivace G proteinů, aktivace fosfolipázy C, produkce kyseliny jasmonové a salicylové. Důsledkem všech těchto událostí je aktivace nebo *de novo* syntéza transkripčních faktorů, jež regulují mimo jiné expresi genů kódujících enzymy odpovědné za biosyntézu sekundárních metabolitů (Baenas et al., 2014; Ramirez-Estrada et al., 2016; Narayani et al., 2017; Zhai et al., 2017). Je sice mnoho známo o receptorech, sekundárních poslech, přenosu signálu i aktivaci genů, avšak obecně zůstává znalost celého procesu dosti nekompletní, protože se vyznačuje velikou variabilitou, jež dovoluje rostlinné buňce účelně reagovat odlišným a adekvátním způsobem aktivací rozdílných skupin genů na značně rozmanitou škálu stresových podnětů (elicitorů) (Ramirez-Estrada et al., 2016; Tsuda, 2017). Přestože se elicitory ukázaly být velmi účinným biotechnologickým nástrojem a osvědčili se v mnoha případech pro stimulaci produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách, je jejich použití stále empirické.

Úspěch a účinnost elicitační v kulturách *in vitro* závisí na mnoha faktorech jako jsou rostlinná buněčná linie a její kultivační podmínky, druh a koncentrace elicitoru, doba přidání elicitoru během růstového cyklu kultury, délka působení elicitoru na kulturu a další (Narayani et al., 2017).

V suspenzní kultuře *Angelica archangelica* byl testován účinek myceliálních homogenátů ze třinácti hub (ve třech koncentracích s dobou působení 48 hodin) na produkci skopoletinu. Nejúčinnější byly homogenáty z *Pythium aphanidermatum*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* a *Phytophthora infestans* (Siatka et al., 2000). V téže kultuře byly zkoumány změny elicitačního působení homogenátu *Pythium aphanidermatum* v několika koncentracích v závislosti na přítomnosti růstových regulátorů a světelném režimu (kultivace na světle

a ve tmě); růst nebyl přidavkem elicitoru nepříznivě ovlivněn, produkce kumarinů mnohonásobně vzrostla aplikací elicitoru při odstranění růstových regulátorů z média a při kultivaci za tmy (Siatka et al., 2009). Vliv koncentrace manganatých (0-50 $\mu\text{mol/l}$), kobaltnatých (0-500 $\mu\text{mol/l}$) a nikelnatých (0-500 $\mu\text{mol/l}$) iontů v živném médiu na produkci kumarinů byl sledován v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* kultivované na světle a ve tmě – růst kultury byl snížen při nejvyšších použitých koncentracích, více při kultivaci na světle; obsah kumarinů v buňkách a v médiu nebyl pozitivně ovlivněn, s rostoucí koncentrací kovových iontů klesal (Siatka et al., 2005). Za stejných podmínek byl testován vliv sloučenin vanadu: vanadičnanu sodného (v koncentraci 0-1000 $\mu\text{mol/l}$) a síranu vanadylu (v koncentraci 0-500 $\mu\text{mol/l}$); růst kultury byl snížen při nejvyšších použitých koncentracích, více při kultivaci na světle; vanadičnan sodný zvýšil produkci kumarinů (vyšší obsah v buňkách i v médiu) při koncentraci 0,2 a 1 $\mu\text{mol/l}$ při kultivaci na světle, v ostatních koncentracích neovlivnil produkci kumarinů při kultivaci na světle ani ve tmě kromě nejvyšší koncentrace 1000 $\mu\text{mol/l}$, při níž ji výrazně snížil; v případě síranu vanadylu tvorba kumarinů klesala s jeho rostoucí koncentrací (Siatka et al., 2007). Sledován byl také účinek chloridu hlinitého v koncentracích 0-1000 $\mu\text{mol/l}$; proliferace kultury byla mírně snížena nejvyšší koncentrací chloridu hlinitého; produkce kumarinů byla ovlivněna v závislosti na světelných podmínkách – při kultivaci ve tmě zvyšovaly hlinité ionty s rostoucí koncentrací množství kumarinů v buňkách a v médiu od koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$ až do koncentrace 1000 $\mu\text{mol/l}$, kdy byla produkce kumarinů nejvyšší; naproti tomu v kultuře kultivované na světle chlorid hlinitý tvorbu kumarinů nezvýšil, jeho vyšší koncentrace ji ještě snížily (Siatka et al., 2010a). Zkoumáno bylo působení chloridu rtuťnatého v koncentracích 0,5-100 $\mu\text{mol/l}$ v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* – nárůst biomasy nebyl ovlivněn do koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, zatímco koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ byla pro kulturu letální, a to nezávisle na světelném režimu; při kultivaci ve tmě obsah kumarinů v buňkách nebyl ovlivněn, v médiu stoupal s rostoucí koncentrací rtuťnatých iontů k maximu při 20 $\mu\text{mol/l}$; při kultivaci na světle zvyšoval chlorid rtuťnatý množství kumarinů v buňkách i v médiu, nejvíce při koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ (Siatka et al., 2011). Vliv zinečnatých iontů v koncentraci 0-1500 $\mu\text{mol/l}$ a kademnatých iontů v koncentraci 0-100 $\mu\text{mol/l}$ na suspenzní kulturu *Angelica archangelica* byl následující: proliferace buněk nebyla negativně ovlivněna zinečnatými ionty do koncentrace 150 $\mu\text{mol/l}$ ve tmě a 300 $\mu\text{mol/l}$ na světle (potom klesala s rostoucí hladinou zinečnatých iontů) a kademnatými ionty do koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ při kultivaci ve tmě a 50 $\mu\text{mol/l}$ na světle; toxické koncentrace kadmia byly o řád nižší než u zinku; obsah kumarinů v buňkách i v médiu nebyl pozitivně ovlivněn, naopak s rostoucí koncentrací zinečnatých a kademnatých iontů klesal při kultivaci ve tmě i na světle (Siatka et al., 2012). V suspenzní kultuře *Angelica archangelica* byl

sledován účinek síranu měďnatého na buněčnou proliferaci a produkci skopoletinu v závislosti na koncentraci měďnatých iontů (0-200 $\mu\text{mol/l}$) a světelném režimu; nárůst biomasy kultury kultivované na světle nebo ve tmě se neměnil do koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$, při koncentraci měďnatých iontů 200 $\mu\text{mol/l}$ byl mírně snížen; produkce skopoletinu byla ovlivněna v závislosti na koncentraci síranu měďnatého a světelném režimu – obsah skopoletinu v buňkách i v médiu vzrůstal se zvyšující se hladinou měďnatých iontů v živném médiu od koncentrace měďnatých iontů 0,1 $\mu\text{mol/l}$ k maximu při 5-50 $\mu\text{mol/l}$ v kultuře na světle a od 10 $\mu\text{mol/l}$ měďnatých iontů k maximu při 50 $\mu\text{mol/l}$ v kultuře ve tmě, pak postupně se stoupající koncentrací měďnatých iontů klesal za obou světelných režimů (Siatka et al., 2017b).

V suspenzní kultuře *Bellis perennis* byl zkoušen účinek homogenátu kultury *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida utilis* na růst a produkci flavonoidů; byl sledován vliv tří koncentrací a doby působení elicitorů (24, 48 a 72 hodin) a světelného režimu (kultivace na světle a za tmy). Elicitory neovlivňovaly negativně růst kultury; zvýšení produkce flavonoidů záviselo na druhu, koncentraci a době působení elicitoru a způsobu kultivace z hlediska světelného režimu – nejvyšší obsah flavonoidů byl dosažen homogenátem *Candida utilis* po 24 hodinách při kultivaci za světla a po 48 hodinách při kultivaci ve tmě (Siatka et al., 1999).

Vliv kyseliny jasmonové, její koncentrace (0,005; 0,05; 0,5 a 5 mmol/l) a doby působení (6, 24, 48 a 168 hodin), na produkci flavonoidů a isoflavonoidů byl zkoumán v suspenzních kulturách *Trifolium pratense* pocházejících ze dvou odrůd (DO-8 a DO-9); produkce flavonoidů byla zvýšena v obou kulturách nejlépe koncentrací kyseliny jasmonové 0,5 mmol/l, v kultuře DO-8 po 24 hodinách, v kultuře DO-9 po 6 hodinách; maximální obsah isoflavonoidů byl dosažen pomocí 0,05 mmol/l kyseliny jasmonové v kultuře DO-8 po 6 hodinách, v kultuře DO-9 po 48 hodinách; v kultuře DO-9 bylo zvýšení obsahu flavonoidů a isoflavonoidů výrazně větší než v kultuře DO-8 (Kašparová et al., 2008). Vliv kalcia (0,1; 1 a 10 mmol/l) a verapamilu (blokátor kalciového kanálu) na elicitální efekt kyseliny jasmonové (0,005; 0,05 a 0,5 mmol/l) byl studován v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* (odrůda Sprint) – tvorba jak flavonoidů, tak isoflavonoidů (z nich nejvíce u genistinu) byla nejvyšší v přítomnosti kyseliny jasmonové v koncentraci 0,05 mmol/l po dvaceti čtyřhodinovém působení; přídavek chloridu vápenatého elicitální účinek kyseliny jasmonové zvýšil, nejlépe v koncentraci 10 mmol/l; naopak kombinace kyseliny jasmonové s verapamilem vedla ke snížení elicitální aktivity kyseliny jasmonové, což ukazuje na důležitou úlohu vápenatých iontů v kyselinou jasmonovou stimulované produkci flavonoidů a isoflavonoidů v této kultuře (Kašparová et al., 2014). Účinek kyseliny salicylové (koncentrace 0,01; 0,1; 1; 10 mmol/l; doba působení 6, 24, 48 a 168 hodin) na tvorbu isoflavonoidů byl testován v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* (odrůda Sprint) – oproti

kyselině jasmonové se kyselina salicylová jako elicitor vůbec neosvědčila – obsah isoflavonoidů v kultuře zůstal nezměněn nebo byl snížen ve srovnání s neelicitovanou kulturou; zkoušeny byly také chlorid kademnatý a chlorid rtuťnatý (koncentrace 0,1; 1; 10 a 100 $\mu\text{mol/l}$; doba působení 6, 24, 48 a 168 hodin) jako potenciální elicitory – účinek kademnatých iontů byl zanedbatelný, zatímco rtuťnaté ionty významně zvyšovaly produkci isoflavonoidů, nejvíce v koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ po šestihodinovém působení (nejvíce vzrostl obsah daidzeinu, který byl vyšší než po elicitaci kyselinou jasmonovou, s níž bylo naopak dosaženo vyššího obsahu genistinu ve srovnání s elitací chloridem rtuťnatým) (Kašparová et al., 2009). Vliv síranu měďnatého (koncentrace 0,1; 1; 10 a 100 $\mu\text{mol/l}$; doba působení 6, 24, 48 a 168 hodin) na produkci flavonoidů a isoflavonoidů byl testován v suspenzních kulturách *Trifolium pratense* (odrůda DO-8 a DO-9) – nejvyšší obsah flavonoidů byl docílen koncentrací 100 $\mu\text{mol/l}$ po 168 hodinách v kultuře odrůdy DO-8 a koncentrací 10 $\mu\text{mol/l}$ po 24 hodinách v kultuře odrůdy DO-9 (více než v kultuře DO-8); v případě isoflavonoidů byla nejúčinnější koncentrace měďnatých iontů 1 $\mu\text{mol/l}$ (po 48 hodinách) v kultuře odrůdy DO-8 a 10 $\mu\text{mol/l}$ po 168 hodinách v kultuře odrůdy DO-9, nejvyšší obsah ze čtyř stanovovaných isoflavonoidů byl zaznamenán u genistinu (více v kultuře DO-8); obsah genistinu po elitaci v těchto kulturách byl vyšší než po elitaci chloridem rtuťnatým, ale nižší než po elitaci kyselinou jasmonovou nebo její kombinaci s chloridem vápenatým v suspenzní kultuře odrůdy Sprint (Kašparová et al., 2007). Jako potenciální elicitor produkce flavonoidů a isoflavonoidů byl zkoušen nově syntetizovaný benzylsulfanylpyridinový derivát [2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid] (látka s antimykobakteriální, antifungální a fotosyntézu inhibující aktivitou) v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* odrůdy DO-8 – byl sledován vliv koncentrace (1, 10 a 100 $\mu\text{mol/l}$) a délky expozice (6, 24, 48 a 168 hodin); produkce flavonoidů byla zvýšena všemi koncentracemi (nejlépe koncentrací 100 $\mu\text{mol/l}$) po šestihodinovém působení, při delším kontaktu s kulturou elicitací účinek slábnul; produkce isoflavonoidů genistinu, genisteinu, daidzeinu vzrostla různou měrou během 6-48 hodin působení elicitoru, delší aplikace elicitoru (168 hodin) vedla ke snížení obsahu isoflavonoidů v kultuře – z hlediska produkce isoflavonoidů byla optimální koncentrace elicitoru 1 $\mu\text{mol/l}$ a optimální doba působení 48 hodin (Kašparová et al., 2012a). Stejná látka byla testována také v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* odrůdy Tempus – na rozdíl od předchozí kultury, obsah flavonoidů vzrůstal působením všech koncentrací elicitoru (nejvíce při 10 $\mu\text{mol/l}$) s délkou expozice k nejvyššímu po 48 hodinách, delší působení (168 hodin) mělo účinek nižší; pro stimulaci produkce isoflavonoidů byla optimální koncentrace 1 $\mu\text{mol/l}$ a doba působení 48 hodin, stejně jako u kultury odrůdy DO-8 (Kašparová et al., 2012b).

V kalusových kulturách *Rheum palmatum* různého stáří a původu (osmiletá a jednoletá odvozená z kořene intaktní rostliny a jednoletá odvozená ze semenáčku) byl zkoušen vliv dvou forem biogenního elicitoru připraveného z kultury *Pseudomonas aeruginosa* (suspenze usmrčených buněk a homogenát kultury; dvě koncentrace, doba působení 6, 24 a 48 hodin) na produkci anthracenových derivátů. Působením obou forem elicitoru byl obsah anthracenových derivátů zvýšen podobně v obou kulturách různého stáří odvozených z kořene intaktní rostliny, a naopak snížen v kultuře odvozené z klíčnické rostliny (Kašparová et al., 1999). Vliv homogenátu kultury *Candida utilis* (tři koncentrace, doba působení 6, 24 a 48 hodin) byl testován v předchozích třech kalusových kulturách a v suspenzních kulturách, které z nich byly založeny. Elicitor zvyšoval produkci anthracenových derivátů v kulturách odvozených jak z intaktní rostliny, tak z klíčnické rostliny; mnohem lepších výsledků bylo dosaženo v suspenzních kulturách – nejvyšší obsah po elicitaci byl nalezen v suspenzní kultuře odvozené z osmileté kalusové kultury. Homogenát kultury *Candida utilis* byl jako elicitor účinnější než homogenát kultury *Pseudomonas aeruginosa* (Kašparová et al., 2001a). V kalusové a suspenzní kultuře *Rheum palmatum* odvozené z kořene intaktní rostliny byla sledována různá doba působení chitosanu ve čtyřech koncentracích – vyššího obsahu anthracenových derivátů bylo docíleno v suspenzní kultuře; optimální koncentrace a doba působení elicitoru byly 1 mg/ml a 24 hodin; účinnost chitosanu byla srovnatelná s homogenátem kultury *Candida utilis* (Kašparová et al., 2001b). V devítileté a tříleté kalusové a suspenzní kultuře *Rheum palmatum* odvozené z kořene intaktní rostliny byl hodnocen vliv kyseliny salicylové v pěti koncentracích (1, 2, 5, 10 a 15 mmol/l) a ve třech časových intervalech (6, 24 a 48 hodin) po aplikaci elicitoru na tvorbu anthracenových derivátů – vyšší produkce bylo dosaženo v mladších kulturách, suspenzní kultury reagovaly intenzivněji než kalusové a byla u nich potřebná nižší koncentrace kyseliny salicylové k vyvolání účinku; nejvyšší obsah byl nalezen v suspenzní kultuře po 48 hodinách působení kyseliny salicylové použité v koncentraci 1 mmol/l (Kašparová et al., 2002). Vliv koncentrace (0,005; 0,05; 0,5 a 5 mmol/l) a doby působení (6, 12, 24 a 48 hodin) kyseliny jasmonové na produkci anthracenových derivátů byl testován v tříleté kalusové a suspenzní kultuře *Rheum palmatum* odvozené z kořene intaktní rostliny – podobně jako v experimentu s kyselinou salicylovou byla kyselina jasmonová účinnější v suspenzní kultuře, optimální koncentrace a délka působení byly 0,05 mmol/l a 48 hodin (Kašparová et al., 2003b). V téže kalusové a suspenzní kultuře *Rheum palmatum* bylo zkoumáno ovlivnění elicitačního účinku chloridu olovnatého v koncentraci 20 μ mol/l vápenatými ionty (0,1; 1; 10 a 100 mmol/l; doba působení 6, 24 a 48 hodin) – v kalusové kultuře byla kombinace s chloridem vápenatým neúčinná; v suspenzní kultuře došlo k mírnému zvýšení obsahu anthracenových derivátů přidávkem chloridu vápenatého oproti použití

samotného chloridu olovnatého; nejvíce koncentrací 10 mmol/l po 24 hodinách (Kašparová et al., 2003a). Ve stejné kalusové a suspenzní kultuře *Rheum palmatum* byl sledován vliv chloridu kademnatého a chloridu hlinitého (koncentrace 1, 10 a 100 $\mu\text{mol/l}$; doba působení 6, 24, 48 a 168 hodin) na produkci anthracenových derivátů; elicitální účinek kademnatých a hlinitých iontů byl srovnatelný, pozitivně byla ovlivněna produkce zejména v suspenzní kultuře – maximální obsah anthracenových derivátů byl dosažen chloridem kademnatým v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po 48 hodinách působení a chloridem hlinitým v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ po 6 hodinách (Kašparová et al., 2004).

V suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* byl zkoumán vliv koncentrace kyseliny salicylové (0,01; 0,1; 1 a 10 mmol/l) a kyseliny jasmonové (0,005; 0,05; 0,5 a 5 mmol/l) a doby jejich působení (6, 24, 48 a 168 hodin) na produkci podofylotoxinu – k významnému zvýšení obsahu podofylotoxinu došlo v kultuře po působení kyseliny salicylové v koncentraci 10 mmol/l po 24 hodinách a kyseliny jasmonové po 168 hodinách; kyselina jasmonová byla mnohem účinnější než kyselina salicylová (Kašparová et al., 2018).

Myceliální homogenáty *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp. a *Helminthosporium* sp. výrazně inhibovaly růst v suspenzní kultuře *Evolvulus alsinoides*, na rozdíl od suspenzní kultury *Angelica archangelica*, ale podobně jako v této kultuře, významně stimulovaly produkci skopoletinu, a to s různou intenzitou v závislosti na druhu a koncentraci elicitoru (Naikawadi et al., 2016). Stejně tak fungální elicitory z *Aspergillus niger* a *Penicillium notatum* zvýšily různou měrou v závislosti na dávce obsah psoralenu v suspenzní kultuře *Psoralea corylifolia* (Ahmed et al., 2014). Stimulační efekt fungálního elicitoru z *Verticillium dahliae* na produkci chelirubinu v suspenzní kultuře *Sanguinaria canadensis* byl zesílen v médiu bez růstových regulátorů v porovnání s médiem s nimi (Cline et al., 1993), ve shodě s pozorováním v suspenzní kultuře *Angelica archangelica*. Myceliální homogenát *Aspergillus niger* v závislosti na koncentraci zvyšoval tvorbu flavonoidů v suspenzní kultuře *Blumea lacera* (Mendhulkar et al., 2017), obdobně jako homogenáty použité v suspenzní kultuře *Bellis perennis*. Biosyntézu anthrachinonů zvýšily myceliální homogenáty *Aspergillus niger* a *Aspergillus flavus* v suspenzní kultuře *Morinda elliptica* (Chong et al., 2005), jakož i naftodiantronů homogenáty *Fusarium oxysporum*, *Phoma exigua* a *Botrytis cinerea* v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* (Simic et al., 2015). Chitosan stimuloval produkci anthrachinonů v suspenzních kulturách *Morinda elliptica* (Chong et al., 2005) a *Rubia tinctorum* (Vasconsuelo et al., 2006). Pozitivní elicitální efekt fungálního homogenátu a chitosanu byl potvrzen i v suspenzní kultuře *Rheum palmatum*.

Chlorid kobaltnatý a chlorid nikelnatý neovlivňovaly negativně růst v suspenzní kultuře *Taxus chinensis* (Zhang et al., 2003), podobně jako v suspenzní kultuře *Angelica archangelica*, na rozdíl od ní ale zvyšovaly produkci paklitaxelu. V protikladu k produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* se manganaté ionty osvědčily jako vhodný elicitor pro tvorbu isochinolinových alkaloidů v suspenzní kultuře *Eschscholtzia californica* (Balažová et al., 2018). Síran manganatý a síran niklenatý nevykazovaly negativní vliv na růst suspenzní kultury *Panax ginseng*, produkci ginsenosidů první neovlivnil, kdežto druhý zvyšoval (Huang et al., 2013). Vanadičnan sodný zvýšil syntézu ligninu v suspenzní kultuře *Petunia hybrida* (Hagedoorn et al., 1990). Vanadičnan sodný a síran vanadylu mírně snížily růst suspenzní kultury *Panax ginseng*, ale výrazně zvyšovaly biosyntézu ginsenosidů, vanadičnan mnohem více než síran vanadylu (Huang et al., 2013). Chlorid hlinitý neovlivňoval negativně růst a zvyšoval produkci kolchicinu v kořenové kultuře *Gloriosa superba* (Ghosh et al., 2006) a produkci withanolidů v suspenzní kultuře *Withania somnifera* (Sivanandhan et al., 2014); pozitivní efekt na tvorbu sekundárních metabolitů vykázal i v suspenzních kulturách *Angelica archangelica* a *Rheum palmatum*. Byl popsán stimulační účinek chloridu rtuťnatého na produkci umbeliferonu v suspenzní kultuře *Ipomoea batatas* (Smith et al., 2001) nebo medikarpinu v kalusové kultuře *Trifolium repens* (Gustine, 1981), stejně jako byl nalezen u tvorby kumarinů a isoflavonoidů v suspenzních kulturách *Angelica archangelica* a *Trifolium pratense*. Kademnaté ionty působily s rostoucí koncentrací inhibičně na růst v *in vitro* kultuře celých rostlin *Dionaea muscipula*, ale současně stimulačně na biosyntézu antokyanů (Babula et al., 2009), a zvyšovaly produkci kyseliny kávové v suspenzní kultuře *Echinacea purpurea* (Açikgöz et al., 2018), podobně jako tvorbu anthracenových derivátů v suspenzní kultuře *Rheum palmatum*, zatímco se neosvědčily jako elicitor pro biosyntézu kumarinů a isoflavonoidů v suspenzních kulturách *Angelica archangelica* a *Trifolium pratense*. Síran zinečnatý neměl pozitivní účinek na produkci betalainů v suspenzní kultuře *Beta vulgaris* (Trejo-Tapia et al., 2001), stejně jako na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica*. Měďnaté ionty se ukázaly být vhodným elicitem produkce skopoletinu v suspenzní kultuře *Sphaeralcea angustifolia* (Pérez-Hernández et al., 2019), furanokumarinů v suspenzní kultuře *Conium maculatum* (Meier et al., 2015), pyranokumarinů v kořenové kultuře *Angelica gigas* (Rhee et al., 2010), flavonoidů v suspenzní kultuře *Digitalis lanata* (Bota et al., 2011) a isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* (Engelmann et al., 2009), obdobně jako v suspenzních kulturách *Angelica archangelica* a *Trifolium pratense*, ale nevykázaly žádný elicitální efekt na tvorbu furanokumarinů v suspenzní kultuře *Changium smyrnioides* (Cai et al., 2017). Olovnaté ionty pozitivně ovlivnily produkci silymarinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (Ashtiani et al., 2011), podobně jako anthraceno-

vých derivátů v suspenzní kultuře *Rheum palmatum*, a byly bez účinku na obsah podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Linum album* (Shams-Ardakani et al., 2005). Stimulační účinek kyseliny salicylové popsány u tvorby flavonoidů v suspenzních kulturách *Thevetia peruviana* (Mendoza et al., 2018) a *Blumea lacera* (Mendhulkar et al., 2016) a isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Psoralea corylifolia* (Shinde et al., 2009) či transformované kořenové kultuře *Pueraria candollei* (Udomsuk et al., 2011) se nepotvrdil u produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense*. Kyselina salicylová zvyšovala biosyntézu anthrachinonů v kalusové kultuře *Cassia alata* (Shah et al., 2019) a v suspenzních kulturách *Morinda citrifolia* (Komaraiah et al., 2005) a *Polygonum multiflorum* (Thiruvengadam et al., 2016) stejně jako v suspenzní kultuře *Rheum palmatum*. Produkci podofylotoxinu zlepšovala kyselina salicylová v suspenzní kultuře *Linum album* (Yousefzadi et al., 2010), podobně jako v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana*, ale neovlivnila ji pozitivním způsobem v suspenzní kultuře *Linum thracicum* (Sasheva et al., 2015). Stimulační efekt kyseliny jasmonové na produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* (Gadzovska et al., 2007), isoflavonoidů v transformované kořenové kultuře *Psoralea corylifolia* (Zaheer et al., 2016), anthrachinonů v suspenzních kulturách *Morinda elliptica* (Chong et al., 2005) a *Polygonum multiflorum* (Thiruvengadam et al., 2016) se projevil také u produkce příslušných sekundárních metabolitů v suspenzních kulturách *Trifolium pratense* a *Rheum palmatum*. Zvýšení obsahu podofylotoxinu pozorované v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* po aplikaci kyseliny jasmonové bylo popsáno také v suspenzních kulturách *Linum album* (Van Fürden et al., 2005) a *Podophyllum hexandrum* (Hazra et al., 2017) po aplikaci methyljasmonátu. Elicitační aktivitu vykazovaly nové syntetické látky na produkci např. flavonoidů v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum* deriváty ureidopyrazinu (Bouz et al., 2018) nebo isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* pyridinkarbothioamidů (Tůmová et al., 2013), obdobně jako benzylsulfanylpyridinový derivát v suspenzní kultuře *Trifolium pratense*.

Odlíšná citlivost kultur (buněčný růst a produkce sekundárních metabolitů) vůči elicitoru v závislosti na světelném režimu, jež byla zaznamenána v suspenzních kulturách *Angelica archangelica*, byla popsána např. v suspenzních kulturách *Digitalis lanata* (síran manganatý; kardenolidy) (Ohlsson et al., 1989), *Petroselinum crispum* (fungální homogenát; furanokumariny) (Reil et al., 1996), *Hypericum perforatum* (kyselina jasmonová a salicylová, fungální elicitory; hypericin) (Walker et al., 2002), *Silybum marianum* (kyselina jasmonová; flavolignany) (Hasanloo et al., 2008) a *Fagonia indica* (methyljasmonát; flavonoidy) (Khan et al., 2018), ale její příčina není známa. Pokud jde o schopnost kultur různého stáří, příp. původu (rostlinná část, z níž byla kultura odvozena), reagovat na přidaný elicitor, nebyl nalezen výrazný rozdíl např.

v suspenzních kulturách (sedmi- a jednoletá) *Papaver somniferum* produkujících sanguinarin po aplikaci fungálního elicitoru (Eilert et al., 1985), podobně jako to bylo pozorováno v suspenzních kulturách *Rheum palmatum* po působení mikrobiálních homogenátů nebo kyseliny salicylové; v případě obou kultur se odpověď vůči použitým elicitorům lišila jen svou intenzitou. Naproti tomu v suspenzní kultuře *Glycine max* jednoleté, odvozené ze semenáčku, indukovaly bakteriální elicitory a chlorid rtuťnatý produkci glyceollinu, zatímco v šestnáctileté, odvozené z kořene, nedošlo k žádné reakci po přidání těchto elicitorů (Fett et al., 1982). Různá intenzita odpovědi vůči abiotickým a biotickým elicitorům v závislosti na odrůdě, jak byla pozorována v kulturách *Trifolium pratense* odvozených z různých odrůd, byla popsána např. v suspenzních kulturách dvou odrůd *Pueraria candollei* při produkci isoflavonoidů (Korsangruang et al., 2010) nebo *Echinacea purpurea* při produkci derivátů kyseliny kávové (Rady et al., 2018).

Jak vyplývá z výsledků elicítace v kalusových a suspenzních kulturách *Angelica archangelica*, *Bellis perennis*, *Trifolium pratense*, *Rheum palmatum* a *Juniperus virginiana* a z literárních údajů, explantátové kultury se liší svou schopností zvýšit produkci sekundárních metabolitů po působení jednotlivých elicitorů. Je to dáno tím, že odpověď rostlinných buněk na elicitem vyvolaný stres je tvořena multikomponentní sítí skládající se z mnoha paralelních nebo vzájemně provázaných signálních drah, které mezi sebou spolupracují a mohou se lišit v percepci různých elicitorů i ve způsobu a míře reakce na jejich působení. Flexibilitnost těchto mechanismů umožňuje na základě rozličných podnětů variabilně regulovat velké množství metabolických kontrolních míst, což může, ale nemusí, vést ke zvýšené akumulaci různých skupin sekundárních metabolitů (Ramirez-Estrada et al., 2016; Narayani et al., 2017; Betsuyaku et al., 2017). Při současném stavu poznání není možné předpovědět, zda určitý elicitor bude účinný v konkrétní explantátové kultuře pro stimulaci žádaných sekundárních metabolitů (Ahmed et al., 2014).

3 Biologická aktivita vybraných přírodních látek

V této kapitole jsou shrnuty výsledky zkoumání antioxidačního a hemolytického účinku extraktů z drogy *Bellidis flos*, účinku extraktů z drogy *Hibisci sabdariffae flos* u chronického renálního selhání, inhibičního působení izolovaných isochinolinových alkaloidů vůči enzymům souvisejícím s etiopatogenezí Alzheimerovy choroby (acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyloligopeptidasa, glykogen synthasa kinasa-3 β) a nádorových onemocnění (aldoketo-reduktasa AKR1C3)

3.1 *Bellidis flos* – hemolytický a antioxidační účinek

Bellis perennis, sedmikráska obecná (Asteraceae) je vytrvalá bylina, původní v Evropě a západní Asii a rozšířená prakticky po celém; má velmi dlouhou dobu kvetení, zpravidla od března do listopadu (Mítich, 1997; Slavík, 2004; Brouillet, 2006). V tradiční medicíně se používá úbor jako expektorans, diuretikum, antiflogistikum (Schöpke et al., 1992; Nazaruk et al., 2001) a dermatologikum (Karakas et al., 2012). Hlavní obsahové látky jsou flavonoidy (apigenin, kvercetin, kaempferol, isorhamnetin a jejich glykosidy) (Gudej et al., 1997; Nazaruk et al., 2000; Gudej et al., 2001; Nazaruk et al., 2001; Haselgrübler et al., 2018), fenolické kyseliny (např. kyselina kávová a chlorogenová) (Grabias et al., 1995; Haselgrübler et al., 2018), triterpenické saponiny (hlavně oleananového typu) (Glensk et al., 2001; Morikawa et al., 2008; Yoshikawa et al., 2008; Morikawa et al., 2010; Morikawa et al., 2011). U saponinů byl prokázán antiprolifertivní účinek *in vitro* (Ninomiya et al., 2016), antihyperlipidemický *in vivo* u myši (Morikawa et al., 2010), extrakty z úborů podporují hojení ran bez vytváření jizev u potkanů (Karakas et al., 2012) a tvorbu kolagenu v lidských kožních fibroblastech *in vitro* (Morikawa et al., 2015), mají účinek protizánětlivý, antibakteriální (Karakas et al., 2017), antioxidační (Marques et al., 2013; Karakas et al., 2017). *Bellidis flos* je kodexovou drogou – tvoří ji usušený úbor, je zařazena do farmakologické skupiny fytofarmaka (diuretika) (Český farmaceutický kodex, 1993).

Reaktivní formy kyslíku a dusíku hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech v organismu (Weidinger et al., 2015). Jejich zdroje jsou endogenní a exogenní, mají povahu radikálovou a neradikálovou, a v organismu existuje mnoho mechanismů regulujících jejich hladinu (tvorbou a eliminací) (Kohen et al., 2002; Lushchak, 2014; Liguori et al., 2018). Nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty posunutá ve prospěch oxidantů vedoucí k narušení

redoxní signalizace a kontroly a k poškození biomolekul se označuje jako oxidační stres (Sies, 2018); reaktivní formy kyslíku a dusíku oxidativně poškozují lipidy, proteiny a DNA a jsou účastny v procesu stárnutí (oxidační teorie stárnutí) a etiopatogenezi mnoha patologických stavů jako jsou např. kardiovaskulární onemocnění, diabetes, chronická obstrukční plicní nemoc, Alzheimerova choroba, makulární degenerace, chronické renální selhání a nádorová onemocnění (Liguori et al., 2018). Antioxidačně účinné přírodní látky se mohou uplatnit v prevenci nebo zmírňování progresu těchto stavů (Pohl et al., 2018; Chikara et al., 2018; Zhang et al., 2018); dobře prokázané jsou antioxidační účinky flavonoidů (Perez-Vizcaino et al., 2018) a fenolických kyselin (Razzaghi-Asl et al., 2013).

Byla zkoumána hemolytická účinnost drogy *Bellidis flos* získané sběrem úborů sedmikrásky obecné v hlavním období jejího kvetení, tj. od března do října, v jednoměsíčním intervalu v průběhu tří let ze čtyř lokalit, a to lékopisnou metodou pro stanovení saponinů (Československý lékopis 4, 1987). Hemolytická účinnost drogy se v závislosti na době sběru úborů během roku významně mění – nejnižší je u drogy z březnových sběrů, potom postupně stoupá, maxima dosahuje na konci jara a v letních měsících (červen červenec, srpen), pak dochází opět k jejímu poklesu, neklesá však až na březnové minimum ani u sběru z října (Siatka et al., 2003b).

Na základě předchozího zjištění byly sledovány také změny obsahu celkových fenolů a flavonoidů a antioxidační aktivity u drogy *Bellidis flos* pocházející se sběrů v jednoměsíčním intervalu po dobu tří let na třech lokalitách. Pro analýzu drogy byly použity osvědčené metody popsané v literatuře: pro stanovení flavonoidů lékopisné spektrofotomerické metody podle Christa a Müllera (Christ et al., 1960; Evropský lékopis, 1997) a podle Glasla (Glasl, 1985; Evropský lékopis, 1999), obsah celkových fenolů byl stanovován spektrofotometricky po reakci s Folin-Ciocalteuovým činidlem (Singleton et al., 1965) a antioxidační aktivita byla hodnocena spektrofotometricky metodou založenou na zhášení stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (Blois, 1958; Brand-Williams et al., 1995). Byla nalezena signifikantní korelace mezi antioxidační aktivitou a obsahem celkových fenolů, nikoliv flavonoidů, takže flavonoidy nejsou jedinými látkami odpovědnými za antioxidační účinek drogy. Změny obsahu flavonoidů a celkových fenolů, stejně jako antioxidační aktivita, byly v droze získané sběrem během roku relativně malé a nebyla v nich shledána žádná pravidelnost mezi jednotlivými roky (Siatka et al., 2010b).

Obsah sekundárních metabolitů a účinky rostlin se mohou měnit v průběhu roku, znalost těchto změn je důležitá pro určení nejvhodnější doby sběru (Soni et al., 2015). Tyto změny mohou být podmíněny jednak ontogenetickým vývojem rostlin, jednak vlivy prostředí (teplota, intenzita světla, vodní poměry, cirkadiální rytmy, koncentrace ozonu nebo oxidu uhličitého atd.) (Pavarini et al., 2012; Verma et al., 2015). Pokud jde o hodnocení antioxidační aktivity *in vitro*, bylo popsáno velké množství metod, nejčastěji používaná je metoda využívající 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (Alam et al., 2013), proto byla zvolena, podobně jako v jiných pracích (Cheel et al., 2013; Pandey et al., 2016; Soltanabad et al., 2018). Antioxidační aktivita korelovala s obsahem flavonoidů a celkových fenolů u extraktů z rostliny *Tephrosia purpurea* (Pandey et al., 2016), zatímco u sedmikrásky jen s celkovými fenoly; u listů *Rosmarinus officinalis* s flavonoidy a celkovými fenoly (Soltanabad et al., 2018), ale u kořenů *Glycyrrhiza glabra* s obsahem tříslovin, nikoliv s flavonoidy a celkovými fenoly (Cheel et al., 2013). Minimální změny obsahu seskviterpenických laktonů, relativně malé kolísání v obsahu flavonoidů, zato výrazné změny v obsahu fenolických kyselin v průběhu roku byly pozorovány v listech *Eremanthus mattogrossensis* (Gouvea et al., 2012), kdežto u sedmikrásky se výrazně měnil obsah triterpenických saponinů v závislosti na ročním období; obdobně se významně měnil v průběhu roku obsah triterpenického saponinu glycyrrhizinu v kořenech *Glycyrrhiza glabra* (u něj ale docházelo i k výrazným změnám množství flavonoidů a fenolů na rozdíl od sedmikrásky) (Cheel et al., 2013), diterpenu kyseliny karnosové v listech *Rosmarinus officinalis* (Soltanabad et al., 2018) nebo diterpenických alkaloidů v jehličí *Taxus baccata* (Hook et al., 1999).

Změny obsahu jednotlivých skupin obsahových látek v úborech sedmikrásky obecné v závislosti na době sběru v průběhu roku nesouvisí s ontogenetickým vývojem, neboť úbory byly sbírány po celou dobu ve stejném vývojovém stadiu, a jsou tedy vyvolány vlivy prostředí – u rostlin rostoucích v přirozených podmínkách je ale obtížné oddělit efekty jednotlivých faktorů prostředí a určit, které jsou významné a jaký mají vliv, a je tudíž složité tyto změny interpretovat. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že droga získaná sběrem úborů *Bellis perennis* od jara do podzimu je srovnatelně použitelná v indikacích, jež jsou založeny na účincích fenolických látek a flavonoidů v ní obsažených.

3.2 Hibisci *sabdariffae* flos – účinek u chronického renálního selhání

Hibiscus sabdariffa, ibišek súdánský (Malvaceae) je jednoletá vysoká bylina, pěstovaná v tropických a subtropických oblastech zemí Afriky, Asie, Střední Ameriky a v Mexiku; čerstvé nebo usušené kalichy jsou používány pro přípravu nápojů po celém světě, v tradiční medicíně

je využívána jako diuretikum, choleretikum, febrifugum, antihypertensivum a laxativum (Da-Costa-Rocha et al., 2014; Jabeur et al., 2017). Hlavní obsahové látky jsou organické kyseliny, antokyany (glykosidy delfinidinu a cyanidinu), flavonoidy, fenolické kyseliny a polysacharidy. V pokusech na zvířeti a v klinickém zkoušení byl prokázán účinek antihypertenzivní a antihyperlipidemický, v pokusech na zvířeti hepatoprotektivní a některé další (Da-Costa-Rocha et al., 2014; Riaz et al., 2018). *Hibisci sabdariffae flos* je lékopisnou drogou – tvoří ji usušený kalich a kalíšek sklizený v době zralosti (Český lékopis, 2017).

Chronické renální selhání, charakterizované progresivním poklesem glomerulární filtrace (Choi et al., 2014), je rostoucí problém v rozvinutých i rozvojových zemích (Tokoroyama et al., 2016; Perica et al., 2016), jenž se týká přibližně 10 % dospělé populace světa (Kalantar-Zadeh et al., 2017) – zkracuje délku a snižuje kvalitu života kvůli zvýšené prevalenci morbidity a mortality v důsledku kardiovaskulární a neurohumorální dysfunkce a selhání ledvin (Wouters et al., 2015, Nelson et al., 2016). Doposud není žádné léčivo na toto onemocnění a současné terapeutické přístupy se soustředí na normalizaci hyperglykemie, dyslipidemie a krevního tlaku (Chauhan et al., 2009; Choi et al., 2014), úpravu diety a životosprávy (Van Huffel et al., 2014; Kalantar-Zadeh et al., 2017; Palmer et al., 2017). Je tedy zapotřebí hledat a vyvíjet nové, bezpečné a účinné prostředky pro zmírnění následků onemocnění nebo zpomalení či odvrácení poškození funkce ledvin, jehož konečným stadiem je renální selhání, kde zůstávají jediné dvě možnosti řešení, a to dialýza nebo transplantace, obojí drahé a v mnoha zemích i nedostupné.

Zkoumání biologické aktivity extraktu z drogy *Hibisci sabdariffae flos* předcházela analýza jejích obsahových látek se zaměřením na antokyany – byla vypracována metoda ultrasokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a ionizací elektrospřejem – byly potvrzeny delfinidin-3-sambubiosid a cyanidin-3-sambubiosid jako hlavní látky, minoritně byly přítomny další glykosidy delfinidinu a cyanidinu (Cahlíková et al., 2015).

Pro hodnocení biologické aktivity byl připraven extrakt z drogy s vysokým obsahem antokyanů – k extrakci byl použit ethanol místo vody, aby se omezila přítomnost slizů, které komplikují filtraci; ethanolový extrakt byl odpařen do sucha, poté rozpuštěn ve vodě a po filtraci aplikován na sloupec s polyamidem, z něhož byly nejdříve vodou vymyty aglykony a monoglykosidy a poté byla vymytím 95% ethanolom získána frakce bohatá na 3-sambubiosidy delfinidinu a cyanidinu; ethanolový extrakt byl smíchán s diethyletherem, vzniklý precipitát byl odfiltrován, usušen a upráškován. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl stanoven obsah hlavních složek extraktu – obsahoval kolem 50 % delfinidin-3-sambubiosidu, 12 % cyanidin-3-sambubiosidu, 4 % rutinu a 1 % kyseliny chlorogenové (Opletal et al., 2017).

Byl zkoumán protektivní účinek vodného extraktu drogy Hibisci sabdariffae flos ve dvou koncentracích a antokyanového koncentrátu, připraveného výše uvedeným způsobem, ve třech koncentracích po perorálním podání na modelu adeninem indukovaného chronického renálního selhání u potkanů, jako srovnávací látka byl použit lisinopril – vodný extrakt i antokyanový koncentrát vykazaly významný protektivní, dávkově závislý efekt u chronického renálního selhání srovnatelný s účinkem lisinoprilu – při současném podávání s adeninem snížily diastolický krevní tlak a přírůstek hmotnosti, zlepšily biochemické indikátory funkce ledvin a zmírnily histopatologické změny na ledvinách (zánět a fibrosu) (Ali et al., 2017).

Podobně byl prospěšný účinek extraktu drogy po perorálním podání prokázán v chirurgickém modelu chronického renálního selhání u potkanů (Seujange et al., 2013), u nefrotoxicity vyvolané organofosfátovým pesticidem malathionem u potkanů (Mossalam et al., 2011) nebo při diabetické nefropatii u potkanů s diabetem navozeným streptozocinem (Wang et al., 2011). Patofyziologický základ chronického renálního selhání a jeho komplikací zahrnuje zánět, oxidační stres a apoptózu (Filiopoulos et al., 2009; Okamura et al. 2015). Mechanismy, jež se podílejí na příznivém působení extraktu a koncentrátu antokyanů z ibišku súdánského u tohoto patologického procesu, mohou zahrnovat jejich antihypertenzivní efekt (Nwachukwu et al., 2017), protože snížení krevního tlaku u osob trpících chronickým renálním selháním u nich snižuje mortalitu (Malhotra et al., 2017), hmotnost snižující účinek (Chang et al., 2014; Kao et al., 2016; Ojulari et al., 2019), neboť redukce hmotnosti zlepšuje stav pacientů s chronickým renálním selháním (Van Huffel et al., 2014), a snížení hladiny prozánětlivých cytokinů a markerů oxidačního stresu, protože bylo prokázáno, že oxidační stres způsobuje glomerulární sklerosu, poškození tubulů, albuminurii a postupnou renální dysfunkci (Wang et al., 2011); extrakt ibišku je silným antioxidantem (Da-Costa-Rocha et al., 2014; Jabeur et al., 2017) a antioxidanty mají příznivý vliv u chronického renálního selhání (Jun et al., 2012). Vodný extrakt květu ibišku súdánského a jeho antokyaniny mohou tedy být považovány za snadno dostupný, bezpečný dietní prostředek ke zpomalení progresu chronického renálního selhání u člověka.

3.3 Isochinolinové alkaloidy – inhibiční účinek vůči acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyloligopeptidase a glykogensynthasa kinase-3 β

Acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyloligopeptidasa a glykogensynthasa kinasa-3 β jsou enzymy, jež hrají významnou roli v etiopatogenezi Alzheimerovy choroby.

Alzheimerova choroba je chronické, progredující, multifaktoriální, neurodegenerativní onemocnění, jež se projevuje poruchami poznávacích funkcí a chování a omezeními v každodenních činnostech. Je nejčastější formou demence, představuje asi 80 % všech případů demence u lidí pokročilejšího věku, a jeho prevalence stoupá exponenciálně od 65. do 85. roku života se zdvojením během každých pěti let (Lleó, 2007; Kumar et al., 2015a; Maqbool et al., 2016). Pokud jde o patologický nález, je pro Alzheimerovu chorobu charakteristické extracelulární hromadění β -amyloidního peptidu (amyloidní či senilní plaky) a tvorba intraneuronálních filament hyperfosforylovaného τ -proteinu (neurofibrilární klubka), což vede k postupující ztrátě neuronů a rozpadu nervových propojení, zejména v mozkové kůře (Park, 2010; Rasool et al. 2014; Maqbool et al., 2016). Etiologie a patofyziologie Alzheimerovy choroby není zcela známa a existuje mnoho hypotéz, např hypotéza cholinerní, amyloidní, tauproteinová, zánětu, mitochondriální dysfunkce, od nichž se odvíjí možná místa terapeutického zásahu (Kumar et al., 2015a; Nesi et al., 2017; Kinney et al., 2018; Li et al., 2019; Perez Ortiz et al., 2019). Použití tří (donezepil, rivastigmin, galantamin) ze čtyř v současnosti dostupných léčiv je založeno na cholinerní hypotéze (Li et al., 2019), jež je stále považována za velmi robustní (Manyevitch et al., 2018) a je podpořena mnoha pozorováními, že pokles cholinerní transmise v mozku koreluje se závažností demence, neboť centrální cholinerní systém hraje klíčovou roli v regulaci učení, paměti a pozornosti (Lleó, 2007; Li et al., 2019). Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa jsou zodpovědné za rozklad acetylcholinu v synapsích; ve zdravém mozku je relativní poměr těchto enzymů 99:1, s progresí Alzheimerovy choroby koncentrace a aktivita prvního enzymu klesá a druhého stoupá až na poměr 2:1 (Nordberg et al., 2013). Inhibice obou enzymů může proto být prospěšná při léčbě symptomů tohoto onemocnění (Lleó, 2007). Čtvrtým v současnosti používaným léčivem je memantin, nekompetitivní antagonist N-methyl-D-aspartátového receptoru, který chrání neurony před zvýšenou stimulací tohoto receptoru vyskytující se u Alzheimerovy choroby, a tím ochraňuje před glutamátem a kalcium zprostředkovanou neurotoxicitou (Kumar et al., 2016; Li et al., 2019).

Prolyloligopeptidasa představuje další z možných cílů při terapii Alzheimerovy choroby. Tento enzym, který štěpí peptidy s relativně malou molekulovou hmotností (např. vasopresin, thyreotropin uvolňující hormon, substance P), se vyskytuje v mnoha lidských tkáních, jeho nejvyšší aktivita byla nalezena v kosterním svalstvu a mozku, zejména v mozkové kůře, a jeho abnormální hladiny mohou být spojeny s neurodegenerací a poruchami paměti a kognice (Wilson et al., 2011; Svarchahs et al., 2019). Byly např. pozorovány signifikantně vyšší hladiny prolyloligopeptidasy u pacientů s Alzheimerovou chorobou ve srovnání se zdravými lidmi (Wilson et al., 2011) nebo deficit substance P a vasopresinu v *postmortem* studiích mozkových

tkání pacientů s neurodegenerativními onemocněními (Morain et al., 2002). Různé *in vivo* experimenty na zvířecích modelech (López et al., 2011) ukázaly, že inhibice prolyloligopeptidasy měla neuroprotektivní efekt a zlepšovala kognitivní funkce, krátkodobou i dlouhodobou paměť (López et al., 2011). Exaktní mechanismus účinku stále není zcela vysvětlen (Brandt et al., 2007; López et al., 2011; Männistö et al., 2017). Byly prováděny i klinické pokusy s inhibitory prolyloligopeptidasy; nejčastěji je referováno o syntetické látce S-17092, při jejímž podávání bylo prokázáno zlepšení poznávacích schopností a paměti u zdravých starších osob (Morain et al., 2000) a navíc určitý náladu stabilizující potenciál u zdravých mladých dobrovolníků (Morain et al., 2007). Slibné výsledky vedou k tomu, že jsou hledány další látky s inhibiční aktivitou vůči tomuto enzymu (Lawandi et al., 2010; Kumar et al., 2019).

Glykogensynthasa kinasa-3 β byla původně objevena jako enzym regulující metabolismus glykogenu, následně bylo zjištěno, že je exprimována ubikvitárně v savčích tkáních a ovlivňuje mnoho procesů, např. buněčné dělení a diferenciaci, apoptózu, cirkadiální rytmy (Maqbool et al., 2016); poruchy v její aktivitě mohou hrát roli v různých patologických stavech, jako jsou např. nádorová, kardiovaskulární, psychiatrická a neurodegenerativní onemocnění nebo diabetes (Takanashi-Yanaga et al., 2013; Saraswati et al., 2018). V patogenezi Alzheimerovy choroby je glykogensynthasa kinasa-3 β zodpovědná za hyperfosforylaci τ -proteinu, za normálních okolností rozpustného proteinu stabilizujícího mikrotubuly v axonech; nadměrná fosforylace vede k jeho agregaci a vzniku neurofibrilárních klubek, čímž dochází k poškození neuronů a jejich odumírání (Balaraman et al., 2006; Maqbool et al., 2016; Saraswati et al., 2018). Glykogensynthasa kinasa-3 β má také spojitost s mitochondriální dysfunkcí u Alzheimerovy choroby a indukuje rovněž tvorbu β -amyloidu, který zároveň přispívá k její aktivaci (Hernández et al., 2010; Reddy, 2013). Inhibitory glykogensynthasy-3 β redukují tvorbu β -amyloidu a hyperfosforylaci τ -proteinu a vykázaly příznivý efekt u Alzheimerovy choroby; některé látky vstoupily již do klinického hodnocení, příkladem může být syntetický tideglusib (Domínguez et al., 2012; Del Ser et al., 2013; Lovestone et al., 2015; Maqbool et al., 2016); z přírodních látek mají zajímavou aktivitu např. β -karbolinové alkaloidy manzamininy izolované z mořských hub (Eldar-Finkelman et al., 2011; Kramer et al., 2012).

Byl vypracován přehledový článek o boldinových alkaloidech, jež patří mezi isochinolinové alkaloidy aporfinového typu – shrnuje informace o jejich struktuře, izolaci, rozšíření v rostlinách, a hlavně o jejich biologické aktivitě. V literatuře je největší pozornost věnována boldinu – vykazuje účinky antioxidační (jsou příznivé u neurodegenerativních onemocnění, na druhou stranu schopnost boldinu inhibovat lidskou acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu

v testu *in vitro* je malá) a hepatoprotektivní, zvyšuje sekreci žluči a vyznačuje se nízkou toxicitou. Byly u něj a některých dalších boldinových alkaloidů, případně jejich semisyntetických derivátů, studovány i účinky antiin vazivní, antidiabetické, imunomodulační, protizánětlivé apod. V článku je diskutována také perspektiva praktického využití boldinových alkaloidů ve farmacii a mimo ni (Hošťálková et al., 2015).

U alkaloidních extraktů čtyř kultivarů *Narcissus nanus*, dvou kultivarů *Narcissus jonquilla*, *Narcissus pumilus* var. *plenus* a *Narcissus jonquilla* var. *henriquesii* (Amaryllidaceae) byly zkoumány obsažené alkaloidy pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie – bylo identifikováno dvacet pět alkaloidů čeledi Amaryllidaceae galantaminového, homolykorinového, lykorinového a tazettinového typu, pět alkaloidů se tímto způsobem nepodařilo identifikovat (je nutná jejich izolace). U pěti extraktů byla stanovena jejich inhibiční aktivita vůči lidské acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase spektrofotometricky Ellmannovou metodou (Ellmann et al., 1961) – nejaktivnější byl u prvního enzymu extrakt z *Narcissus pumilus* var. *plenus*, u druhého extrakt z *Narcissus nanus* cv. Elka). U dvou izolovaných alkaloidů narwedinu a inkartinu byla stanovena inhibiční aktivita vůči cholinesterasám – byla nízká ve srovnání s galantaminem, huperzinem a eserinem; hodnocena byla také inhibice rekombinantní prolyloligopeptidasy spektrofotometrickou metodou – aktivita byla u obou látek srovnatelná s baikalinem (Havlasová et al., 2014).

Byly zkoumány alkaloidy obsažené v *Argemone platyceras* (Papaveraceae) – nať s kořeny byla extrahována ethanolem, extrakt byl frakcionován sloupcovou chromatografií s využitím oxidu hlinitého, následně byly opakovanou preparativní tenkovrstvou chromatografií izolovány alkaloidy typu benzylochinolinového (laudanin – byl z této rostliny izolován poprvé), protopinového (protopin, allokryptopin) a pavinanového (argemonin, norargemonin, platycerin, munitagin) a jejich struktury byly určeny spektroskopickou a spektrometrickou analýzou. U izolovaných alkaloidů byla testována schopnost inhibice lidské acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy a rekombinantní prolyloligopeptidasy – alkaloidy vykazovaly různě silnou inhibiční aktivitu (nižší než galantamin, huperzin a eserin u cholinesteráz a berberin a Z-proprinal u prolyloligopeptidasy); nejaktivnější byl munitagin, jenž vykázal duální inhibici acetylcholinesterasy a prolyloligopeptidasy, i když byly jeho účinky na oba enzymy nižší než u srovnávacích látek (Siatka et al., 2017a).

Z alkaloidního extraktu kořenové kůry *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) bylo sloupcovou chromatografií a následnou preparativní tenkovrstvou chromatografií izolováno sedm známých isochinolinových alkaloidů (berberin, 8-oxoberberin, berbodin, berbamin, aromolin, obamegin, palmatin) a tři nové (bersavin, muraricin, berbostrejdin), jejichž struktura byla

identifikována pomocí spektroskopických metod. U alkaloidů byl hodnocen jejich *in vitro* inhibiční účinek na lidskou acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu a rekombinantní prolyloligopeptidasu – signifikantní inhibice butyrylcholinesterasy, řádově vyšší ve srovnání s galantaminem a huperzinem, byla nalezena u aromolinu, jehož aktivita byla podpořena též výsledky molekulového modelování (Hošťálková et al., 2019).

Inhibiční účinek na rekombinantní glykogensynthasa kinasu-3 β byl studován u dvaceti osmi alkaloidů čeledi Amaryllidaceae různých strukturních typů (belladinový, haemanthaminový, krininový, galantaminový, lykorinový, homolykorinový a tazettinový) izolovaných v předchozích pracech z rostlin této čeledi (*Zephyranthes robusta*, *Chlidanthus fragrans*, *Nerine bowdenii*, *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol a *Narcissus poeticus* cv. Brackenhurst), a to luminiscenční metodou popsanou v literatuře (Baki et al., 2007). Nejaktivnější byly 9-O-demethylhomolykorin, masonin a karanin s účinkem nesrovnatelně nižším než inhibitor použitý jako porovnávací látka (syntetický arylindolmaleimidový derivát SB-415286).

Fakt, že se anticholinergně účinné látky osvědčili v terapii Alzheimerovy choroby, vede k tomu, že jsou hledány další pro rozšíření farmakoterapeutické palety, stejně jako jsou hledány látky s inhibiční aktivitou vůči jiným enzymům zúčastněným v etiopatogenezi Alzheimerovy choroby pro vývoj nových léčiv. Mnoho rostlin s obsahovými látkami různých skupin, včetně alkaloidů, bylo zkoumáno na jejich inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesterase (Mukherjee et al., 2007; Hussain et al., 2018; Khan et al., 2018; Wu et al., 2019) a butyrylcholinesterase (Orhan et al., 2004; Tallini et al., 2018; Adessi et al., 2019), žádná z nich nedosahuje aktivity srovnatelné s galantaminem, jenž je používán v terapii a využívá se také jako standard pro hodnocení *in vitro* inhibiční aktivity. Zkoumány byly také alkaloidy čeledi Amaryllidaceae izolované z *Chlidanthus fragrans* (Cahlíková et al., 2013) a vykazovaly lepší účinky než narwedín a inkartin izolované z narcisů; naopak jen jediný alkaloid z této rostliny, undulatin, inhiboval prolyloligopeptidasu (Cahlíková et al., 2013), ale s nižší účinností než narwedín a inkartin, jejich aktivity ovšem byly nižší v porovnání s isochinolinovými alkaloidy pavinanového, benzo-fenanthridinového nebo protoberberinového typu (Cahlíková et al., 2015; Siatka et al., 2017), takže je lze hodnotit jako v tomto směru ne příliš významné.

Argemone platyceras (Papaveraceae) je jednoletá bylina hojně rozšířená v Mexiku, kde je používána při kašli, bronchitidě a pneumonii; existuje jen jedna studie zabývající se účinky obsahových látek – isokvercitrin byl izolován jako látka odpovědná za antiastmatickou aktivitu extraktů z této rostliny (Fernandez et al., 2005). Relativně hodně bylo publikováno o izolaci isochinolinových alkaloidů z *Argemone platyceras* (přehled je uveden v naší práci), ale nebyla

zkoumána jejich aktivita. Na základě testování inhibičních aktivit byl nejaktivnější munitagin, a to vůči acetylcholinesterase a prolyloligopetidase; aktivity byly sice nižší než u standardních látek, ale zajímavý je právě jeho duální účinek. Takovým látkám je věnována velká pozornost, protože by mohly zásahem více cílů, vzhledem ke komplexnosti mechanismů zúčastněných v patofyziologii Alzheimerovy choroby, účinněji ovlivnit toto onemocnění (Kumar et al., 2015a; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Berberis vulgaris, dřevitá rostlina (Berberidaceae) je keř rozšířený v Evropě a Asii a jeho různé části jsou využívány v tradiční medicíně ve Francii, Bulharsku, Turecku, Íránu, Indii a dalších zemích při gastrointestinálních, respiračních, kardiovaskulárních a jiných obtížích (Imenshahidi et al., 2016). Mezi obsahové látky patří flavonoidy, třísloviny, triterpeny a isochinolinové alkaloidy, nejdůležitější z nich je berberin, který je považován za hlavní účinnou látku a byl v posledních letech zkoušen i v klinických studiích např. při léčbě diabetu 2. typu, metabolického syndromu a hyperlipidémie; berberin je kvartérní alkaloid, vyznačuje se relativně nízkou toxicitou, problémem u něj je malá perorální biodostupnost a interakční potenciál (Kumar et al., 2015b; Imenshahidi et al., 2018; Feng et al., 2019). Berberin inhibuje acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu *in vitro*, u transgenního myšního modelu redukuje tvorbu amyloidních plaků a snižuje neuronální a mentální poškození (Jiang et al., 2015). Nález významné inhibiční aktivity terciárního alkaloidu oromolinu vůči butyrylcholinesterase je velmi zajímavý, protože představuje nový strukturální typ látky aktivní vůči tomuto enzymu, a rozšiřuje znalosti o účincích obsahových látek dřevitých rostlin.

Inhibitory glykogensynthasy kinasy-3 β jsou intenzivně zkoumanou skupinou látek, vzhledem k tomu že aberantní funkce tohoto enzymu byla prokázána u mnoha onemocnění, jako jsou např. diabetes, zánětlivá onemocnění, nádory, Alzheimerova choroba, bipolární porucha. Bylo zkoumáno mnoho látek syntetických i přírodních a semisyntetických, ale mnohé z nich nevyhovují z hlediska selektivity s ohledem na jiné kinasy nebo svými farmakokinetickými vlastnostmi, a proto je neustálá potřeba hledání nových struktur (Khan et al., 2017; Dinda et al., 2019). Proto byly testovány alkaloidy čeledi Amaryllidaceae – jen 9-O-demethylhomolykorin a masonin (oba homolykorinového typu) a karanin (lykorinového typu) vykázaly významnější inhibiční aktivitu, která je však z hlediska jejich případného využití velmi nízká.

3.4 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae – inhibice aldoketoreduktasy 1C3

Aldoketoreduktasa 1C3, známá také jako 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 5, je enzym, jenž katalyzuje konverzi 4-androsten-3,17-dionu na testosteron, 5 α -androsten-3,17-

dionu na dihydrotestosteron a estronu na 17β -stradiol; funguje také jako prostaglandin $F_{2\alpha}$ synthasa přeměňující prostaglandin H_2 na prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Penning, 2019). Tento enzym hraje svým působením na metabolismus steroidů a prostaglandinů důležitou roli v etiopatogenezi zhoubných nádorů prostaty, případně některých dalších nádorových onemocnění (Rižner, 2012; Zeng et al., 2017; Penning, 2019; McNamar et al., 2019; Poutanen et al., 2019). Jeho zvýšená exprese je biomarkerem progresu karcinomu prostaty a je spojena se zvýšenou rezistencí vůči radioterapii a antiandrogenní léčbě (Sun et al., 2016; Karunasighe et al., 2017). Inhibice tohoto enzymu je nadějným místem zásahu pro léčbu karcinomu prostaty a první inhibitory vstoupily již do fáze I a II klinického zkoušení (Karunasighe et al., 2017; Poutanen et al., 2019).

Dvacet devět alkaloidů čeledi Amaryllidaceae různých strukturních typů (belladinový, haemanthaminový, krininový, galantaminový, lykorinový, homolykorinový a tazettinový) izolovaných v předchozích pracích z rostlin této čeledi (*Zephyranthes robusta*, *Chlidanthus fragrans*, *Nerine bowdenii* a *Narcissus poeticus* cv. Brackenhurst) bylo testováno na inhibiční aktivitu vůči rekombinantní lidské aldoketoreduktase 1C3. Pouze tazettin vykázal střední aktivitu ve srovnání s indometacinem, který byl použit jako standard; jedenáct dalších alkaloidů mělo jen velmi nízký inhibiční účinek, ostatní byly bez účinku (Hulcová et al., 2017).

Vzhledem k potenciálnímu terapeutickému významu inhibitorů aldoketoreduktasy AKR1C3 jsou hledány látky s touto aktivitou (Penning, 2017; Penning, 2019) – vedle silných inhibitorů, indometacinu a kyseliny flufenamové (Gobec et al., 2005), byly výrazné inhibiční účinky popsány také např. u kyseliny skořicové a hlavně u od ní odvozených jednodušších (Brožič et al., 2006) nebo složitějších syntetických derivátů (Gazvoda et al., 2013) nebo jejího přírodního derivátu, baccharinu, izolovaného z brazilského propolisu (Endo et al., 2012), dále u flavonoidů (naringenin, kvercetin, apigenin a především 2'-hydroxyflavanon) (Škarydová et al., 2009) nebo isochinolinových alkaloidů (stylopin) (Škarydová et al., 2014). Tazettin sám o sobě má inhibiční účinek nižší než tyto látky, ale mohl by posloužit jako předlohová struktura pro přípravu sloučenin s vyšší aktivitou.

4 Závěr a výhled do budoucna

Živé organismy, a mezi nimi rostliny, jež jsou hlavním objektem zájmu farmakognozie, která se zabývá všemi jejich aspekty důležitými z pohledu farmaceuta, jsou nepostradatelným zdrojem řady léčivých látek využívaných v terapii, ale především představují obrovské bohatství látek dosud nepoznaných nebo látek známých se zatím neobjevenými účinky – mnohé tyto látky mohou být potenciálně využity jako léčiva nebo by se mohly uplatnit jako nutraceutika.

Využití tento potenciál znamená na jedné straně izolovat nové sloučeniny, pokud možno z velkého objemu rostlinného materiálu pocházejícího nejen z do současnosti neprobádaných rostlin, ale i z rostlin známých a zdánlivě prozkoumaných, případně již používaných v lidovém léčitelství nebo oficiální medicíně, protože lze z tohoto velkého množství vyizolovat vedle hlavních i minoritní sloučeniny, které mohou mít neočekávanou strukturu a stát se tak novým farmakoforem. Je to velmi pracné a časově náročné, ale přináší to zajímavé výsledky. Tou druhou stranou je testování biologické aktivity u izolovaných sloučenin, a čím více je dané látky k dispozici, tím více testů je možné provést a zvýšit tak šanci na objevení něčeho nového. Velké pokroky v analytické a fyzikální chemii umožňují díky vysoké citlivosti a rozlišovací schopnosti moderních instrumentálních metod analyzovat velmi detailně i vzorky získané extrakcí malých množství přírodního materiálu a získat tak představu i o minoritních látkách a jejich konstituci, z níž ale nelze odvodit biologické účinky – ty lze zjistit jen testováním *in vitro* a *in vivo*, k němuž je zapotřebí mít příslušné látky v množství větším, než je nezbytné pro analýzu.

Jinou z výzev pro farmakognozii, vedle hledání nových účinných látek, je zajištění dostatku již zavedených a žádaných léčivých látek, aby se zdroj těchto látek nestal faktorem limitujícím jejich terapeutické použití. Primárně slouží pro jejich získávání rostlinný materiál, v ideálním případě z pěstovaných rostlin. Ne všechny rostliny ale lze snadno zavést do kultury (např. *Podophyllum hexandrum* jako zdroj podofylotoxinu) a musí pak být sbírány ve volné přírodě; tento zdroj je však relativně omezený (a některé druhy mohou být ohroženy až i vyhubením jako tomu bylo např. u *Taxus brevifolia* jako zdroje paklitaxelu) a nelze ho v případě potřeby zvětšit tak, jak to umožňuje polní kultura. Někdy se problém podaří řešit chemickou syntézou, která může izolaci nahradit nebo alespoň doplnit (např. papaverin, galantamin); nicméně tato cesta se zatím mnohdy ukazuje jako neschůdná – mnohé přírodní léčivé látky mají velmi komplikovanou strukturu se spoustou chirálních center, a tak, ač je někdy popsáno i

několik různých syntetických cest, žádná z nich zatím není ekonomicky rentabilní v průmyslovém měřítku (např. u paklitaxelu nebo podofylotoxinu). Nabízí se další možnost, a tou je využití rozvinutých možností technologie rekombinantní DNA a heterologní produkce rostlinných látek v mikroorganismech, jež lze snadno a relativně levně průmyslově kultivovat ve velkých objemech – i přes velké pokroky v základním výzkumu tohoto směru a přes některé úspěchy, jakým bylo např. zavedení průmyslové výroby kyseliny artemisinové pomocí kvasinek před pár lety (jako druhý zdroj artemisininu vedle izolace z *Artemisia annua*), naráží tento způsob stále na mnoho problémů vyplývajících např. z neúplných znalostí všech enzymů biosyntetických drah rostlinných sekundárních metabolitů a jejich regulace nebo z nedostatečné exprese rostlinných genů v mikroorganismech. A tak se opět obrací značná pozornost k rostlinným explantátovým kulturám, po určité euforii z 80. let minulého století spojené s první průmyslovou produkcí využívající kultivaci rostlinných buněk *in vitro* (pro získávání šikoninu), vystřídané skepsí v 90. letech v důsledku malých pokroků a ne zcela naplněných nadějí. Jedním z nových impulzů rozvoje se stalo úspěšné zavedení průmyslové produkce paklitaxelu pomocí suspenzních kultur tisu na počátku nového tisíciletí. Mnohá úskalí, z nichž některá byla probírána ve druhé kapitole této práce, se díky přibývání poznatků v této oblasti daří stále lépe řešit, a postupně tak dochází k širší realizaci průmyslových procesů pro získávání žádaných látek technologií založenou na využití explantátových kultur.

Výše uvedená dvě témata, jež byla námětem této práce, stojí spolu s mnoha dalšími, zmíněnými v úvodu, v centru pozornosti současné farmakognozie a zůstanou v něm bezesporu i do budoucna.

5 Literatura

- Abbas MS, E-Shabrawi HM, Soliman AS, Selim MA. Optimization of germination, callus induction, and cell suspension culture of African locust beans *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. J Gen Eng Biotechnol 2018, 16, 191-201.
- Aboul-Enein AL, Rady AM, Ibrahim MM. Active compounds and biological activity of *in vitro* cultures of some *Echinacea purpurea* varieties. Bull Nat Res Centre 2018, 42, 4-12.
- Abyari M, Nasr N, Soorni J, Sadhu D. Enhanced Accumulation of Scopoletin in Cell Suspension Culture of *Spilanthes acmella* Murr. Using Precursor Feeding. Braz Arch Biol Technol 2016, 59, article e16150533.
- Açikgöz MA, Yarılgaç T, Kara ŞM. Enhancement of Phytochemical Compounds Using Biotic and Abiotic Elicitors in Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Indian J Pharm Educ 2018, 52, S140-S145.
- Adessi TG, Borioni JL, Pigni NB, Bastida J, Cavallaro V, Murray AP, Puiatti M, Oberti JC, Leiva S, Nicotra VE, Garcia ME. *Clinanthus microstephium*, an Amaryllidaceae Species with Cholinesterase Inhibitor Alkaloids: Structure-Activity Analysis of Haemanthamine Skeleton Derivatives. Chem Biodiversity 2019, 16, article e1800662.
- Ahmed AS, Baig MMV. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. Saudi J Biol Sci 2014, 21, 499-504.
- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J 2013, 21, 143-152.
- Ali BH, Cahlíková L, Opletal L, Karaca T, Manoj P, Ramkumar A, Suleimani YMA, Za'abi MA, Nemmar A, Chocholoušová-Havlíková L, Ločárek M, Siatka T, Blunden G. Effect of aqueous extract and anthocyanins of calyces of *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) in rats with adenine-induced chronic kidney disease. J Pharm Pharmacol 2017, 69, 1219-1229.
- Alvarez-Yela AC, Chiquiza-Montaña LN, Hoyos R, Orozco-Sánchez F. Rheology and mixing analysis of plant cell cultures (*Azadirachta indica*, *Borojoa patinoi* and *Thevetia peruviana*) in shake flasks. Biochem Eng J 2016, 114, 18-25.
- Anjusha S, Gangaprasad A. Callus culture and *in vitro* production of anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae). Ind Crop Prod 2017, 95, 608-614.
- Appelhaagen I, Wulff-Vester AK, Wendell M, Hvoslef-Eide AK, Russell J, Oertel A, Martens S, Mock HP, Martin C, Matros A. Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures. Metab Eng 2018, 48, 218-232.
- Ashtiani SR, Hasanloo T, Sephehrifar R, Bihanta MR. Elicitation of silymarin production in cell suspension culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Pharm Sci 2011, 17, 253-266.
- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwiiger S, Heiss EH, Rollinger JM, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM, Stuppner H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnol Adv 2015, 33, 1582-1614.
- Avilés F, Ríos D, González R, Sánchez-Olate M. Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves. Chil J Agric Res 2009, 69, 460-467.
- Babula P, Ryant P, Adam V, Zehnalek J, Havel L, Kizek R. The role of sulphur in cadmium(II) ions detoxification demonstrated in *in vitro* model: *Dionaea muscipula* Ell. Environ Chem Lett 2009, 7, 353-361.
- Badal S, Delgoda R (eds.). Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies. Academic Press, London 2017, 3-13, 31-44.
- Baenas N, García-Viguera C, Moreno DA. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of food. Molecules 2014, 21, article 13542.
- Baki A, Bielik A, Molnár L, Szendrei G, Keserü GM. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. Assay Drug Dev Techn 2007, 5, 75-83.
- Balamaran Y, Limaye AR, Levey AI, Srinivasan S. Glycogen synthase kinase 3 β and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. Cell Mol Life Sci 2006, 63, 1226-1235.
- Balažová A, Urdová J, Bilka F, Holková I, Horváth B, Forman V, Mučaji P. Evaluation of Manganese Chloride's Effect on Biosynthetic Properties of *In Vitro* Cultures of *Eschscholzia californica* Cham. Molecules 2018, 23, article 971.

- Benítez-García I, Vanegas-Espinoza PE, Meléndez-Martínez AJ, Heredia FJ, Paredes-López O, Villar-Martínez AAD. Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. *Electron J Biotechnol* 2014, 17, 107-113.
- Betsuyaku S, Katou S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Nomura N, Fukuda H. Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2018, 59, 8-16.
- Bharate SS, Mignani S, Vishwakarma RA. Why Are the Majority of Active Compounds in the CNS Domain Natural Products? A Critical Analysis. *J Med Chem* 2018, 61, 10345-10374.
- Blando F, Scardino AP, De Bellis L, Nicoletti I, Giovinazzo G. Characterization of *in vitro* anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. *Food Res Int* 2005 38, 937-942.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958, 181, 1199-1200.
- Bota C, Deliu C. The effect of copper sulphate on the production of flavonoids in *Digitalis lanata* cell cultures. *Farmacia* 2011, 59, 113-118.
- Boullata JI, Nace AM. Safety issues with herbal medicine. *Pharmacotherapy* 2000, 20, 257-269.
- Bouz G, Juhás M, Niklová P, Jand'ourek O, Paterová P, Janoušek J, Tůmová L, Kovalíková Z, Kastner P, Doležal M, Zitko J. Ureidopyrazine Derivatives: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-Infectives and Abiotic Elicitors. *Molecules* 2017, 22, article 1797.
- Brandt I, Scharpé S, Lambeir AM. Suggested functions for prolyl oligopeptidase: A puzzling paradox. *Clin Chim Acta* 2007, 377, 50-61.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 1995, 28, 25-30.
- Brouillet L. *Bellis perennis*. In: Board of Directors. *Flora of North America North of Mexico*, Vol 20, 1st ed. Oxford University Press, New York 2006, 23.
- Brožič P, Golob B, Gomboc N, Rižner TL, Gobec S. Cinnamic acids as new inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3). *Mol Cell Endocrinol* 2006, 248, 233-235.
- Bruneton J. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. 2nd ed. Intercept, Hampshire 1999.
- Cahlíková L, Ali BH, Havlíková L, Ločárek M, Siatka T, Opletal L, Blunden G. Anthocyanins of *Hibiscus sabdiffera* calyces from Sudan. *Nat Prod Commun* 2015, 10, 77-79.
- Cahlíková L, Hrabínová M, Kulhánková A, Benešová N, Chlebek J, Jun D, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Kuča K, Opletal L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities. *Nat Prod Commun* 2013, 8, 1541-1544.
- Cahlíková L, Hulová L, Hrabínová M, Chlebek J, Hošťálková A, Adamcová M, Šafratová M, Jun D, Opletal L, Ločárek M, Macáková K. Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia* 2015, 103, 192-196.
- Cai J, Ma Y, Hu P, Zhang Y, Chen J, Li X. Elicitation of furanocoumarins in *Changium smyrnioides* suspension cells. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2017, 130, 1-12.
- Capasso L. 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. *Lancet* 1998, 352, 1864.
- Československý lékopis 4. Avicenum, Praha 1987, 105-108.
- Český farmaceutický kodex 1. vydání. X-EGEM, Praha 1993.
- Český lékopis 2002. Grada, Praha 2002, 2155.
- Český lékopis 2017. Grada, Praha 2017, 4067-4068.
- Chang HC, Peng CH, Yeh DM, Kao ES, Wang CJ. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans. *Food Funct* 2014, 5, 734-739.
- Chang S, Shu H. A method to suppress the browning in banana (*Musa*, AAA) embryogenic callus induced. *Res J Biotechnol* 2013, 8, 63-69.
- Chattopadhyay S, Farkya S, Srivastava AK, Bisaria VS. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2002, 7, 138-149.
- Chauhan V, Vaid M. Dyslipidemia in Chronic Kidney Disease: Managing a High-risk Combination. *Postgrad Med* 2009, 121, 54-61.
- Cheel J, Tůmová L, Areche C, Van Antwerpen P, Nève J, Zouaoui-Boudjeltia K, Martin AS, Vokřál I, Wsól V, Neugebauerová J. Variations in the chemical profile and biological activities of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), as influenced by harvest times. *Acta Physiol Plant* 2013, 35, 1337-1349.
- Chikara S, Nagaprashantha LD, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Singhal SS. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Lett* 2018, 413, 122-134.
- Choi CI. Sodium-Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitors from Natural Products: Discovery of Next-Generation Antihyperglycemic Agents. *Molecules* 2016, 21, article 1136.

- Choi HY, Park HC, Ha SK. How do We Manage Coronary Artery Disease in Patients with CKD and ESRD? *Electrolyte Blood Press* 2014, 12, 41-54.
- Chong TM, Abdullah MA, Lai OM, Nor'Aini FM, Lajis NH. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochem* 2005, 40, 3397-3405.
- Christ B, Müller KH. Determination of the amount of flavonol derivatives in drugs. *Arch Pharm* 1960, 293, 1033-1042.
- Christensen SB, Rasmussen U, Christophersen C. Thapsigargin, constitution of a sesquiterpene lactone histamine liberator from *Thapsia garganica*. *Tetrahedron Lett* 1980, 21, 3829-3830.
- Cline SD, McHale RJ, Coscia CJ. Differential Enhancement of Benzophenanthridine Alkaloid Content in Cell Suspension Cultures of *Sanguinaria canadensis* Under Conditions of Combined Hormonal Deprivation and Fungal Elicitation. *J Nat Prod* 1993, 56, 1219-1228.
- Coimbra MC, Chagas RCR, Vilela MSP, Castro AHF. Growth, morphology and bioactive phenolic compounds production in *Pyrostegia venusta* calli. *Biocatal Agric Biotechnol* 2019, 18, 101036
- Cordell GA, Colvard MD. Natural Products and Traditional Medicine: Turning on a Paradigm. *J Nat Prod* 2012, 75, 514-525.
- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. New Horizons for Old Drugs and Drug Leads. *J Nat Prod* 2014, 73, 703-723.
- Cragg GM, Newman DJ. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pur Appl Chem* 2005, 77, 7-24.
- Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1830, 3670-3695.
- Da-Costa-Rocha I, Bonllaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chem* 2014, 165, 424-443.
- De Rijke E, Joshi HC, Sanderse HR, Ariese F, Brinkman UAT, Gooijer C. Natively fluorescent isoflavones exhibiting anomalous Stokes' shifts. *Anal Chim Acta* 2002, 468, 3-11.
- De Vos P. European materia medica in historical texts: Longevity of a tradition and implications for future use. *J Ethnopharmacol* 2010, 132, 28-47.
- Del Ser T, Steinwachs KC, Gertz HJ, Andrés MV, Gómez-Carrillo B, Medina M, Vericat JA, Redondo P, Fleet D, León T. Treatment of Alzheimer's Disease with the GSK-3 Inhibitor Tideglusib: A Pilot Study. *J Alzheimers Dis* 2013, 33, 205-215.
- Deskmukh SK, Prakash V, Ranjan N. Marine Fungi: A Source of Potential Anticancer Compounds. *Front Microbiol* 2018, 8, article 2536.
- Di Lorenzo C, Ceschi A, Kupferschmidt H, Lüde S, De Souza Nascimento E, Dos Santos A, Colombo F, Frigerio G, Nørby K, Plumb J, Finglas P, Reastani P. Adverse effects of plant food supplements and botanical preparations: a systematic review with critical evaluation of causality. *Br J Clin Pharmacol* 2015, 79, 578-592.
- Dinda B, Dinda M, Kulsi G, Chakraborti A, Dinda S. Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review. *Eur J Med Chem* 2019, 169, 185-199.
- Doan NTQ, Christensen SB. Thapsigargin, Origin, Chemistry, Structure-Activity Relationships and Prodrug Development. *Curr Pharm Des* 2015, 21, 5501-5517.
- Domínguez JM, Fuertes A, Orozco L, Del Monte-Millán M, Delgado E, Medina M. Evidence for Irreversible Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 β by Tideglusib. *J Biol Chem* 2012, 287, 893-904.
- Dušek J, Dušková J, Tůmová L, Šícha J, Hubík J. Produkce anthracenových derivátů v *Rheum palmatum* L. *in vivo* a *in vitro*. *Českoslov Farm* 1991, 40, 118-120.
- Efferth T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering* 2019, 5, 50-59.
- Eilert U, Kurz WGW, Constabel F. Stimulation of Sanguinarine Accumulation in *Papaver somniferum* Cell Cultures by Fungal Elicitors. *J Plant Physiol* 1985, 119, 65-76.
- Eldar-Finkelman H, Martinez A. GSK-3 inhibitors: preclinical and clinical focus on CNS. *Front Mol Neurosci* 2011, 4, article 32.
- El'-Kommos MI, Maksjutina NP. Photometric determination of flavonoids using nitrous acid. *Farmacia* 1979, 28, 23-26.
- Ellmann GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961, 7, 88-95.
- El-Shafey NM, Ahmd ES, Sayed M, Hammouda O, Khodary SA. Effect of Growth Regulators, Carbohydrates and Antioxidant Compounds on Biomass, Flavonoid Accumulation and Enzyme Activity in Callus Cultures of *Rumex vesicarius* L. *Egypt J Bot* 2016, 56, 595-612.

- Endo S, Matsunaga T, Kanamori A, Otsuji Y, Nagai H, Sundaram K, El-Kabbani O, Toyooka N, Ohta S, Hara A. Selective inhibition of human type-5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) by baccharin, a component of Brazilian propolis. *J Nat Prod.* 2012, 75, 716-721.
- Engelmann NJ, Reppert A, Yousef G, Rogers RB, Lila MA. *In Vitro* Production of Radiolabeled Red Clover (*Trifolium pratense*) Isoflavones. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2009, 98, 147-156.
- Esmacili AK, Taha RM, Mohajer S, Banisalam B. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from *In Vivo* and *In Vitro* Grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). *Biomed Res Int* 2015, article 643285.
- Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* 2018, 248, 1-18.
- Evropský lékopis 3. vydání - Doplněk 2000. EDQM, Strasbourg 1999, 2035-2036.
- Evropský lékopis 3. vydání. EDQM, Strasbourg 1997, 1098-1099.
- Fehér A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Front Plant Sci* 2019, 10, article 536.
- Feng X, Sureda A, Jafari S, Memariani Z, Tewari D, Annunziata G, Barrea L, Hassan STS, Šmejkal K, Malanik M, Sychrová A, Barreca D, Ziberna L, Mahomoodally MF, Zengin G, Xu S, Nabavi SM, Shen AZ. Berberine in Cardiovascular and Metabolic Diseases: From Mechanisms to Therapeutics. *Theranostics* 2019, 9, 1923-1951.
- Fernandez J, Reyes R, Ponce H, Oropeza M, Van Calsteren MR, Jankowski C, Campos MG. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol* 2005, 522, 108-115.
- Fett WF, Zacharius RM. Bacterially-induced glyceollin production in soybean cell suspension cultures. *Plant Sci Lett* 1982, 24, 303-309.
- Filiopoulos V, Vlassopoulos D. Inflammatory Syndrome in Chronic Kidney Disease, Pathogenesis and Influence on Outcomes. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009, 8, 369-382.
- Filippini R, Piovan A, Innocenti G, Caniato R, Cappelletti EM. Production of coumarin compounds by *Haplophyl- lum patavinum* *in vivo* and *in vitro*. *Phytochemistry* 1998, 49, 2337-2340.
- Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, Joseph C, Hagège D. Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2007, 89, 1-13.
- Gajula H, Kumar V, Vijendra PD, Rajashekar J, Sannabommaji T, Basappa G. A combination of elicitor and precursor enhances psoralen production in *Psoralea corylifolia* Linn. suspension cultures. *Ind Crop Prod* 2018, 124, 685-691.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 1968, 50, 151-158.
- Gazdovska Simic S, Tusevski O, Maury S, Hano C, Delaunay A, Chabbert B, Lamblin F, Lainé E, Joseph C, Hagège D. Fungal elicitor-mediated enhancement in phenylpropanoid and naphthodianthrene contents of *Hypericum perforatum* L. cell cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2015, 122, 213-226.
- Gazvoda M, Beranič N, Turk S, Burja B, Kočevar M, Rižner TL, Gobec S, Polanc S. 2,3-Diarylpropenoic acids as selective non-steroidal inhibitors of type-5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Eur J Med Chem* 2013, 62, 89-97.
- Georgiev MI, Weber J, Maciuk A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009, 83, 809-823.
- Georgiev MI, Weber J. Bioreactors for plant cells: Hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. *Biotechnol Lett* 2014, 36, 1359-1367.
- Gezici S, Şekeroğlu N. Current Perspectives in the Application of Medicinal Plants Against Cancer: Novel Therapeutic Agents. *Anticancer Agents Med Chem* 2019, 19, 101-111.
- Ghosh S, Ghosh B, Jha S. Aluminium chloride enhances colchicine production in root cultures of *Gloriosa superba*. *Biotechnol Lett* 2006, 28, 497-503.
- Glasl H. Photometrische Normierung von Flavonoid-O- und -C-Glykosiden. *Fresenius Z Anal Chem* 1985, 321, 325-330.
- Glensk M, Wray V, Nimtz M, Schöpke T. Triterpenoid saponins of *Bellis perennis*. *Sci Pharm* 2001, 69, 69-73.
- Gobec S, Brožič P, Rižner TL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their analogues as inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3: new lead compounds for the development of anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2005, 15, 5170-5175.

- Gomes-Copeland KKP, Léo ADS, De Almeida FTC, Moreira BO, Dos Santos DC, Santos RAF, David JM, David JP. Effect of elicitors in *Poincianella pyramidalis* callus culture in the biflavonoid biosynthesis. *Ind Crop Prod* 2018, 126, 421-425.
- Gouvea DR, Gobbo-Neto L, Sakamoto HT, Lopes NP, Lopes JLC, Meloni F, Amaral JG. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus matto Grossoensis* Less (Asteraceae, Vernoniae) leaves. *Quim Nova* 2012, 35, 2139-2145.
- Grabias B, Dombrowicz E, Kalembe D, Świątek L. Phenolic acids in *Flores Bellidis* and *Herba Tropaeoli*. *Herba Pol* 1995, 41, 111-114.
- Grąmbowska R, Matkowski A, Grzegorzczak-Karolak I, Wysokińska H. Callus cultures of *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn.; production of secondary metabolites and antioxidant activity. *S Afr J Bot* 2016, 103, 41-48.
- Grimstein M, Huang SM. A regulatory science viewpoint on botanical-drug interactions. *J Food Drug Anal* 2018, 26, S12-S25.
- Gudej J, Nazaruk J. Apigenin glycosidoesters from flowers of *Bellis perennis* L. *Acta Pol Pharm* 1997, 54, 233-235.
- Gudej J, Nazaruk J. Flavonol glycosides from the flowers of *Bellis perennis*. *Fitoterapia* 2001, 72, 839-840.
- Gustine DL. Evidence for Sulfhydryl Involvement in Regulation of Phytoalexin Accumulation in *Trifolium repens* Callus Tissue Cultures. *Plant Physiol* 1981, 68, 1323-1326.
- Habibi N, Suthar RK, Purohit SD. Role of PGRs and inhibitors in induction and control of somatic embryogenesis in *Themeda quadrivalvis*. *Ind J Exp Bot* 2009, 47, 198-203.
- Hagendoorn MJM, Traas TP, Boon JJ, Van der Plas LHW. Orthovanadate induced lignin production, in batch and continuous cultures of *Petunia hybrida*. *J Plant Physiol* 1990, 137, 72-80.
- Hasanloo T, Khavari-Nejad MA, Majidi E, Shams-Ardakani MR. Flavonolignan Production in Cell Suspension Culture of *Silybum marianum*. *Pharm Biol* 2008, 46, 876-882.
- Haselgrübler R, Stadlbauer V, Stübl F, Schwarzingler B, Rudzionyte I, Himmelsbach M, Iken M, Weghuber J. Insulin Mimetic Properties of Extracts Prepared from *Bellis perennis*. *Molecules* 2018, 23, article 2605.
- Havlasová J, Šafratová M, Siatka T, Štěpánková Š, Novák Z, Ločárek M, Opletal L, Hrabínová M, Jun D, Benešová N, Kuneš J, Cahlíková L. Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. *Nat Prod Commun* 2014, 9, 1151-1155.
- Hazra S, Bhattacharyya D, Chattopadhyay S. Methyl Jasmonate Regulates Podophyllotoxin Accumulation in *Podophyllum hexandrum* by Altering the ROS-Responsive Podophyllotoxin Pathway Gene Expression Additionally through the Down Regulation of Few Interfering miRNAs. *Front Plant Sci* 2017, 8, article 164.
- He Y, Guo X, Lu R, Niu B, Pasapula V, Hou P, Cai F, Xu Y, Chen F. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2009, 98, 11-17.
- Heller R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann Sci Nat Bot Biol Veg* 1953, 14, 1-223.
- Hernández F, De Barreda EG, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J. GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol* 2010, 223, 322-325.
- Hidalgo D, Sánchez R, Lalaleo L, Bonfill M, Corchete P, Palazon J. Biotechnological Production of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals in Plant Cell and Organ Cultures. *Curr Med Chem* 2018, 25, 3577-3596.
- Holland BK. Prospecting for grugs in ancient texts. *Nature* 1994, 369, 702.
- Hošťálková A, Maříková J, Opletal L, Korábečný J, Hulcová D, Kuneš J, Nováková L, Perez DI, Jun D, Kučera T, Andrisano V, Siatka T, Cahlíková L. Isoquinoline Alkaloids from *Berberis vulgaris* as Potential Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Nat Prod* 2019, 82, 239-248.
- Hošťálková A, Siatka T, Chlebek J, Opletal L, Drašar P, Cahlíková L. Boldinové alkaloidy a perspektivy jejich využití. *Chem Listy* 2015, 109, 846-855.
- Huang C, Zhong JJ. Elicitation of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax ginseng* by vanadate. *Process Biochem* 2013, 48, 1227-1234.
- Hulcová D, Breiterová K, Siatka T, Klímová K, Davani L, Šafratová M, Hošťálková A, De Simone A, Andrisano V, Cahlíková L. Amaryllicidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 beta Inhibitors. *Molecules* 2018, 23, article 719.
- Hulcová D, Breiterová K, Zemanová L, Siatka T, Šafratová M, Vaněčková N, Hošťálková A, Wsól V, Cahlíková L. AKR1C3 Inhibitory Potency of Naturally-occurring Amaryllicidaceae Alkaloids of Different Structural Types. *Nat Prod Commun* 2017, 12, 245-246.

- Hussain G, Rasul A, Anwar H, Aziz N, Razzaq A, Wei W, Ali M, Li J, Li X. Role of Plant Derived Alkaloids and Their Mechanism in Neurodegenerative Disorders. *Int J Biol Sci* 2018, 14, 341-357.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *Plant Cell* 2013, 25, 3159-3173.
- Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review. *Phytother Res* 2019, 33, 504-523.
- Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. *Berberis Vulgaris* and Berberine: An Update Review. *Phytother Res* 2016, 30, 1745-1764.
- Inyushkina YV, Bulgakov VP, Veselova MV, Bryukhanov VM, Zverev YF, Lampatov VV, Azarova OV, Tchernodnod G, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. High Rabdosiin and Rosmarinic Acid Production in *Eritrichium sericeum* Callus Cultures and the Effect of the Calli on Masugi-Nephritis in Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, 71, 1286-1293.
- Iqbal J, Abbasi BA, Batool R, Mahmood T, Ali B, Khalil AT, Kanwal S, Shah SA, Ahmad R. Potential phyto-compounds for developing breast cancer therapeutics: Nature's healing touch. *Eur J Pharmacol* 2018, 827, 125-148.
- Isah T, Umar S, Mujib A, Sharma MP, Rajasekharan PE, Zafar N, Frukh A. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2018, 132, 239-265.
- Isah T. Natural Sources of Taxol. *Br J Pharm Res* 2015, 6, 214-227.
- Jabeur I, Pereira E, Barros L, Calhella RC, Soković M, Oliveira MBPP, Ferreira ICFR. *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Res Int* 2017, 100, 717-723.
- Jamwal K, Bhattacharya S, Puri S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *J Appl Res Med Aromat Plants* 2018, 9, 26-38.
- Ji XH, Wang YT, Zhang R, Wu SJ, An MM, Li M, Wang CZ, Chen XL, Zhang YM, Chen XS. Effect of auxin, cytokinin and nitrogen on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2015, 120, 325-337.
- Jiang WX, Li SH, Li XJ. Therapeutic potential of berberine against neurodegenerative diseases. *Sci China Life Sci* 2015, 58, 564-569.
- Jun M, Venkataraman J, Razavian M, Cooper B, Zoungas S, Ninomyia T, Webster AC, Perkovic V. Antioxidants for chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2012, 10, article CD008176.
- Kalantar-Zadeh K, Fouque D. Nutritional management of chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2017, 377, 1765-1776.
- Kao ES, Yang MY, Hung CH, Huang CN, Wang CJ. Polyphenolic extract from *Hibiscus sabdariffa* reduces body fat by inhibiting hepatic lipogenesis and preadipocyte adipogenesis. *Food Funct* 2016, 7, 171-182.
- Karakaş FP, Karakaş A, Boran Ç, Türker AU, Yalçın FN, Bilensoy E. The evaluation of topical administration of *Bellis perennis* fraction on circular excision wound healing in Wistar albino rats. *Pharm Biol* 2012, 50, 1031-1037.
- Karakaş, FP, Türker AU, Karakaş A, Mshvildadze V, Pichette A, Legault J. *In vitro* cytotoxic, antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities and phenolic content in wild-grown flowers of common daisy – A medicinal plant. *J Herb Med* 2017, 8, 31-39.
- Karunasinghe N, Masters J, Flanagan JU, Ferguson LR. Influence of Aldo-keto Reductase 1C3 in Prostate Cancer – A Mini Review. *Curr Cancer Drug Tar R* 2017, 17, 603-616.
- Kašparová M, Pilařová P, Tůmová L, Siatka T. Effect of Precursor and Phytohormones on Podophyllotoxin Production in *Juniperus virginiana* Suspension Cultures. *Nat Prod Commun* 2018, 13, 1527-1529.
- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Abiotic elicitation of *Trifolium pratense* L. suspension culture. *Čes Slov Farm* 2007, 56, 225-229.
- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Biotic elicitation of the *Trifolium pratense* L. suspension culture. *Čes Slov Farm* 2008, 57, 107-110.
- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Production of isoflavonoids in the *Trifolium pratense* L. suspension culture. *Čes Slov Farm* 2009, 58, 67-70.
- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Vliv abiotické elicítace a vápenatých iontů na produkci explantátové kultury *Rheum palmatum* L. *Čes Slov Farm* 2003a, 52, 248-251.
- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Vliv kyseliny jasmínové na produkci anthracenových derivátů v kultuře *Rheum palmatum* L. *in vitro*. *Čes Slov Farm* 2003b, 52, 148-151.
- Kašparová M, Siatka T, Klimešová V, Dušek J. New synthetic pyridine derivate as potential elicitor in production of isoflavonoids and flavonoids in *Trifolium pratense* L. suspension culture. *Sci World J* 2012a, article 746412.

- Kašparová M, Siatka T, Klimešová V, Dušek J. Vliv syntetického benzylpyridinového derivátu na produkci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. Chem Listy 2012b, 106, 660-664.
- Kašparová M, Siatka T, Spilková J, Dušek J. Explantátová kultura *Trifolium pratense* L. Čes Slov Farm 2006, 55, 44-47.
- Kašparová M, Siatka T. Abiotická elicitace explantátové kultury *Rheum palmatum* L. těžkými kovy. Čes Slov Farm 2004, 53, 252-255.
- Kašparová M, Siatka T. Production of flavonoids and isoflavonoids in jasmonic acid-induced red clover suspension cultures. Čes Slov Farm 2014, 63, 17-21.
- Kašparová M, Siatka T. Vliv biotického elicitoru *Candida utilis* na produkci anthracenových derivátů tkáňovou kulturou *Rheum palmatum* L. Čes a Slov Farm 2001 a, 50, 41-45.
- Kašparová M, Siatka T. Vliv chitosanu na produkci anthracenových derivátů v tkáňové kultuře *Rheum palmatum* L. Čes Slov Farm 2001b, 50, 249-253.
- Kašparová M, Siatka T. Vliv kyseliny salicylové na produkci anthracenových derivátů v kultuře *Rheum palmatum* L. *in vitro*. Čes Slov Farm 2002, 51, 177-181.
- Kašparová M, Siatka T: Produkce anthracenových derivátů elicitovanou tkáňovou kulturou *Rheum palmatum* L. Čes a Slov Farm 1999, 48, 256-261.
- Kašparová M, Spilková J, Cvak L, Siatka T, Martin J. Plant Tissue Cultures of *Juniperus virginiana*. Nat Prod Commun 2016, 11, 681-683.
- Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. J Ind Microbiol Biotechnol 2016, 43, 155-176.
- Khan H, Marya, Amin S, Kamal MA, Patel S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. Biomed Pharmacother 2018, 101, 860-870.
- Khan I, Tantray MA, Alam MS, Hamid H. Natural and synthetic bioactive inhibitors of glycogen synthase kinase. Eur J Med Chem 2017, 125, 464-477.
- Khan T, Abbasi BH, Khan MA. The interplay between light, plant growth regulators and elicitors on growth and secondary metabolism in cell cultures of *Fagonia indica*. J Photochem Photobiol 2018, 185, 153-160.
- Khosroushahi AY, Naderi-Manesh H, Simonsen HT. Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. BioImpacts 2011, 1, 37-45.
- Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. Alzheimers Dement (N Y) 2018, 4, 575-590.
- Kocer ZA, Gozen AG, Onde S, Kaya Z. Indirect organogenesis from bud explants of *Juniperus communis* L. Effects of genotype, gender, sampling time and growth regulator combinations. Dendrobiology 2011, 66, 33-40.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicol Pathol 2002, 30, 620-650.
- Kolewe ME, Gaurav V, Roberts SC. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. Mol Pharm 2008, 5, 243-256.
- Komaraiah P, Kishor PBK, Carlsson M, Magnusson KE, Mandenius CF. Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. Plant Sci 2005, 168, 1337-1344.
- Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintakapakorn Y, Saralamp P, Prathanturarug S. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. Plant Cell Tiss Organ Cult 2010, 103, 333-342.
- Kramer T, Schmidt B, Monte FL. Small-Molecule Inhibitors of GSK-3: Structural Insights and Their Application to Alzheimer's Disease Models. Int J Alzheimers Dis 2012, article 381029.
- Kumar A, Chopra EK, Mukherjee M, Pottabathini R, Dhull DK. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. Eur J Pharmacol 2015b, 761, 288-297.
- Kumar A, Ekavali AS. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacol Rep 2015a, 67, 195-203.
- Kumar A, Nisha CM, Silakari C, Sharma I, Anusha K, Gupta N, Nair P, Tripathi T, Kumar A. Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer's disease. J Formos Med Assoc 2016, 115, 3-10.
- Kumar R, Parameswaran S, Bavi R, Baek A, Son M, Rampogu S, Park C, Lee G, Zeb A, Parate S, Rana RM, Lee KW. Investigation of novel chemical scaffolds targeting prolyl oligopeptidase for neurological therapeutics. J Mol Graph Model 2019, 88, 92-103.

- Kumari A, Baskaran P, Plačková I, Omámíková H, Nisler J, Doležal K, Van Staden J. Plant growth regulator interactions in physiological processes for controlling plant regeneration and *in vitro* development of *Tulbaghia simmleri*. *J Plant Physiol* 2018, 223, 65-71.
- Kumari KG, Ganesan M, Jayabalan N. Somatic organogenesis and plant regeneration in *Ricinus communis*. *Biol Plant* 2008, 52, 17-25.
- Kurepa J, Shull TE, Karunadasa S, Smalle JA. Modulation of auxin and cytokinin responses by early steps of the phenylpropanoid pathway. *BMC Plant Biol* 2018, 18, article 278.
- Lalaleo L, Testillano P, Risueño MC, Cusidó RM, Palazon J, Alcazar R, Bonfill M. Effect of *in vitro* morphogenesis on the production of podophyllotoxin derivatives in callus cultures of *Linum album*. *J Plant Physiol* 2018, 228, 47-58.
- Lawandi J, Gerber-Lemaire S, Juillerat-Jeanneret L, Moitessier N. Inhibitors of Prolyl Oligopeptidases for the Therapy of Human Diseases: Defining Diseases and Inhibitors. *J Med Chem* 2010, 53, 3423-3438.
- Li DD, Zhang YH, Zhang W, Zhao P. Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials on the Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, and Memantine for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 2019, 13, article 472.
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018, 13, 757-772.
- Ling APK, Ong SL, Sobri H. Strategies in enhancing secondary metabolites production in plant cell cultures. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol* 2011, 5, 94-101.
- Linsmaier EM, Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1965, 18, 100-127.
- Liperoti R, Vetrano DL, Bernabei R, Onder G. Herbal Medications in Cardiovascular Medicine. *J Am Coll Cardiol* 2017, 69, 1188-1199.
- Lleó A. Current therapeutic options for Alzheimer's disease. *Curr Genomics* 2007, 8, 550-558.
- Lloyd G, McCown BH. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagator's Society* 1980, 30, 421-427.
- López A, Tarragó T, Giralt E. Low molecular weight inhibitors of Prolyl Oligopeptidase: a review of compounds patented from 2003 to 2010. *Expert Opin Ther Pat* 2011, 21, 1023-1044.
- Lovestone S, Boada M, Dubois B, Hüll M, Rinne JO, Huppertz HJ, Calero M, Andrés MW, Gómez-Carrillo M, León T, Del Ser T. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015, 45, 75-88.
- Łuczkiwicz M, Głód D. Callus cultures of *Genista* plants – *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Sci* 2003, 165, 1101-1108.
- Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014, 224, 164-175.
- MacLean NL, Nowak J. Plant regeneration from hypocotyl and petiole callus of *Trifolium pratense* L. *Plant Cell Rep* 1989, 8, 395-398.
- Mahalingam D, Peguero J, Cen P, Arora SP, Sarantopoulos J, Rowe J, Allgood V, Tubb B, Campos L. A Phase II, Multicenter, Single-Arm Study of Mipsagargin (G-202) as a Second-Line Therapy Following Sorafenib for Adult Patients with Progressive Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* 2019, 11, article 833.
- Makunga NP, Van Staden J, Cress WA. The effect of light and 2,4-D on anthocyanin production in *Oxalis reclinata* callus. *Plant Growth Regul* 1997, 23, 153-158.
- Malhotra R, Nguyen NA, Benavente O, Mete M, Howard BV, Mant J, Odden MC, Peralta CA, Cheung AK, Nadkarni GN, Coleman RL, Holman RR, Zanchetti A, Peters R, Beckett N, Staessen JA, Ix JH. Association Between More Intensive vs Less Intensive Blood Pressure Lowering and Risk of Mortality in Chronic Kidney Disease Stages 3 to 5. *JAMA Intern Med* 2017, 177, 1498-1505.
- Malik S, Bhushan S, Sharma M, Ahuja PS. Biotechnological approaches to the production of shikonins: A critical review with recent updates. *Crit Rev Biotechnol* 2016, 36, 327-340.
- Männistö PT, García-Horsman JA. Mechanism of Action of Prolyl Oligopeptidase (PREP) in Degenerative Brain Diseases: Has Peptidase Activity Only a Modulatory Role on the Interactions of PREP with Proteins? *Front Aging Neurosci* 2017, 9, article 27.
- Manyevitch R, Protas M, Scarpiello S, Deliso M, Bass B, Nanajian A, Chang M, Thompson SM, Khouri N, Gonnella R, Trotz M, Moore DB, Harms E, Perry G, Clunes L, Ortiz A, Friedrich JO, Murray IVJ. Evaluation of Metabolic and Synaptic Dysfunction Hypotheses of Alzheimer's Disease (AD): A Meta-Analysis of CSF Markers. *Curr Alzheimer Res* 2018, 15, 164-181.
- Maqbool M, Mobashir M, Hoda N. Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 2016, 107, 63-81.

- Marques THC, De Melo CHS, De Carvalho RBF, Costa LM, De Souza AA, David JM, De Lima David JP, De Freitas RM. Phytochemical profile and qualification of biological activity of an isolated fraction of *Bellis perennis*. *Biol Res* 2013, 46, 231-238.
- Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Mar Drugs* 2014, 12, 1066-1101.
- Masoumian M, Arbakariya A, Syahida A, Maziah M. Flavonoids production in *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues. *J Med Plants Res* 2011, 5, 1564-1574.
- Mathur A, Mathur AK, Gangwar A, Yadav S, Verma P, Sangwan RS. Anthocyanin production in a callus line of *Panax sikkimensis* Ban. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2010, 46, 13-21.
- Matsuura HN, Malik S, De Costa F, Yousefzadi M, Mirjalili MH, Arroo R, Bhambra AS, Strnad M, Bonfill M, Fett-Neto AG. Specialized Plant Metabolism Characteristics and Impact on Target Molecule Biotechnological Production. *Mol Biotechnol* 2018, 60, 169-183.
- Mavituna F, Yoon SYH, Park JM. Modelling size distribution changes of plant cell aggregates during batch growth of *Capsicum frutescens* suspension culture. *Chem Eng Sci* 2016, 148, 1-13.
- McNamara KM, Sasano H. The role of 17 β HSDs in breast tissue and breast cancers. *Mol Cell Endocrinol* 2019, 489, 32-44.
- Meier P, Hotti H, Rischer H. Elicitation of furanocoumarins in poison hemlock (*Conium maculatum* L.) cell culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2015, 123, 443-453.
- Mendhulkar VD, Patade P, Vakil M. Elicitation of Flavonoids in *Blumea lacera* (Burm.f.) DC. Cell Culture using Chemical Elicitor, Salicylic Acid and Biological Elicitor, *Aspergillus niger*. *Int J Curr Res Biosci Plant Biol* 2016, 3, 85-91.
- Mendoza D, Cuaspuod O, Arias JP, Ruiz O, Arias M. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnol Rep* 2018, 19, article e00273.
- Mitich LW. English daisy (*Bellis perennis* L.). *Weed Technol* 1997, 11, 626-628.
- Miyazaki Y, Teramoto Y, Shibuya S, Goto T, Okasho K, Mizuno K, Uegaki m, Yoshikawa T, Akamatsu S, Kobayashi T, Ogawa O, Inoue T. Consecutive Prostate Cancer Specimens Revealed Increased Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C3 Expression with Progression to Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Med* 2019, 8, article 601.
- Mohammadparast B, Rustaiee AR, Rasouli M, Zardari S, Agrawal V. *In vitro* enhancement of psoralen as an important anticancer compound in *Psoralea corylifolia* through precursor feeding. *Pharm Biol* 2015, 53, 735-738.
- Morain P, Boeijinga PH, Demazières A, De Nanteuil G, Luthringer R. Psychotropic Profile of S 17092, a Prolyl Endopeptidase Inhibitor, Using Quantitative EEG in Young Healthy Volunteers. *Neuropsychobiology* 2007, 55, 176-183.
- Morain P, Lestage P, De Nanteuil G, Jochemsen R, Robin JL, Guez D, Boyer PA. S 17092: A Prolyl Endopeptidase Inhibitor as a Potential Therapeutic Drug for Memory Impairment. *Preclinical and Clinical Studies. CNS Drug Rev* 2002, 8, 31-52.
- Morain P, Robin JL, De Nanteuil G, Jochemsen R, Guez VHD. Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study. *Br J Clin Pharmacol* 2000, 50, 350-359.
- Moreira DL, Teixeira SS, Monteiro MHD, De-Oliveira ACAX, Paumgarten FJR. Traditional use and safety of herbal medicines. *Rev Bras Pharmacogn* 2014, 24, 248-257.
- Mori T, Sakurai M, Shigeta JI, Yoshida K, Kondo T. Formation of anthocyanins from cells cultured from different parts of strawberry plants. *J Food Sci* 1993, 58, 788-792.
- Morikawa T, Li X, Nishida E, Ito Y, Matsuda H, Nakamura S, Muraoka O, Yoshikawa M. Perennisosides I-VII, Acylated Triterpene Saponins with Antihyperlipidemic Activities from the Flowers of *Bellis perennis*. *J Nat Prod* 2008, 71, 828-835.
- Morikawa T, Li X, Nishida E, Nakamura S, Ninomiya K, Matsuda H, Hamao M, Muraoka O, Hayakawa T, Yoshikawa M. Medicinal Flowers. XXXII. Structures of Oleanane-Type Triterpene Saponins, Perennisosides VIII, IX, X, XI, and XII, from the Flowers of *Bellis perennis*. *Chem Pharm Bull* 2011, 59, 889-895.
- Morikawa T, Li X, Nishida E, Nakamura S, Ninomiya K, Matsuda H, Oda Y, Muraoka O, Yoshikawa M. Medicinal Flowers. Part 29. Acylated Oleanane-Type Triterpene Bidesmosides: Perennisosaponins G, H I, J, K, L, and M with Pancreatic Lipase Inhibitory Activity from the Flowers of *Bellis perennis*. *Helv Chim Acta* 2010, 93, 573-586.

- Morikawa T, Muraoka O, Yoshikawa M. Anti-hyperlipidemic Saponin Constituents from the Flowers of *Bellis perennis*. *Yukugaku Zasshi* 2010, 130, 673-678.
- Morikawa T, Ninomiya K, Takamori Y, Nishida E, Yasue M, Hayakawa T, Muraoka O, Li X, Nakamura S, Yoshikawa M, Matsuda H. Oleanane-type triterpene saponins with collagen synthesis-promoting activity from the flowers of *Bellis perennis*. *Phytochemistry* 2015, 116, 203-212.
- Mossalam HH, Aty OAAE, Morgan EN, Youssaf SMS, Mackawy AMH. Biochemical and Ultra Structure Studies of the Antioxidant Effect of Aqueous Extract of *Hibiscus Sabdariffa* on the Nephrotoxicity Induced by Organophosphorous Pesticide (Malathion) on the Adult Albino Rats. *Life Sci J* 2011, 8, 561-574.
- Muangphrom P, Seki H, Fukushima EO, Muranak T. Artemisinin-based antimalarial research: application of biotechnology to the production of artemisinin, its mode of action, and the mechanism of resistance of *Plasmodium* parasites. *J Nat Med* 2016, 70, 318-334.
- Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 2007, 14, 289-300.
- Muranaka T, Miyata M, Ito K, Tachibana S. Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor. *Phytochemistry* 1998, 49, 491-496.
- Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 1962, 15, 473-497.
- Murthy HN, Lee EJ, Paek KY. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2014, 118, 1-16.
- Mushtaq S, Abbasi BH, Uzair B, Abbasi R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. *EXCLI J* 2018, 17, 420-451.
- Mustafa NR, De Winter W, Van Iren F, Verpoorte R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc* 2011, 6, 715-742.
- Nagy M, Grančai D, Mučaji P. Farmakognózia. Biologicky aktívne rastlinné metabolity a ich zdroje. *Osveta, Martin* 2011, 13-19.
- Nagy M, Mučaji P, Grančai D. Farmakognózia. Biogenéza prírodných látok. *Herba, Bratislava* 2015, 25-52.
- Naikawadi VB, Ahire ML, Lahiri A, Nikam TD. *In vitro* propagation and cell cultures of memory tonic herb *Evolvulus alsinoides*: a best source for elicited production of scopoletin. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016, 100, 3463-3476.
- Nakamura M, Takeuchi Y, Miyanaga K, Seki M, Furusaki S. High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus. *Biotechnol Lett* 1999, 21, 695-699.
- Nakamura M, Takeuchi Y, Miyanaga K, Seki M, Furusaki S. High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus. *Biotechnol Lett* 1999, 21, 695-699.
- Narayan MS, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochem* 2005, 40, 351-358.
- Narayani M, Srivastava S. Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochem Rev* 2017, 16, 1227-1252.
- Nazaruk J, Gudej J. Apigenin glycosides from the flowers of *Bellis perennis* L. *Acta Pol Pharm* 2000, 57, 129-130.
- Nazaruk J, Gudej J. Qualitative and quantitative chromatographic investigation of flavonoids in *Bellis perennis* L. *Acta Pol Pharm* 2001, 58, 401-404.
- Neergheen-Bhujun VS. Underestimating the toxicological challenges associated with the use of herbal medicinal products in developing countries. *Biomed Res Int* 2013, article 804086.
- Nelson A, Otto J, Whittle J, Stephens RCM, Martin DS, Prowle JR, Ackland GL. Subclinical cardiopulmonary dysfunction in stage 3 chronic kidney disease. *Open Heart* 2016, 3, article 000370.
- Nesi G, Sestino S, Digiacomo M, Rapposelli S. Oxidative Stress, Mitochondrial Abnormalities and Proteins Deposition: Multitarget Approaches in Alzheimer's Disease. *Curr Top Med Chem* 2017, 17, 3062-3079.
- Ninomiya K, Motai C, Nishida E, Kitagawa N, Yoshihara K, Haykawa T, Muraoka O, Li X, Nakamura S, Yoshikawa M, Matsuda H, Morikawa T. Acylated oleanane-type triterpene saponins from the flowers of *Bellis perennis* show anti-proliferative activities against human digestive tract carcinoma cell lines. *J Nat Med* 2016, 70, 435-451.
- Nitsch JP, Nitsch C. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 1969, 163, 85- 87.
- Nordberg A, Ballard C, Bullock R, Darreh-Shori T, Somogyi M. A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Prim Care Companion CNS Disord* 2013, 15, article 12r01412.

- Nwachukwu DC, Aneke EI, Nwachukwu NZ, Azubike N, Obika LF. Does consumption of an aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* affect renal function in subjects with mild to moderate hypertension? *J Physiol Sci* 2017, 67, 227-234.
- Ochoa-Villarreal M, Howat S, Hong SM, Jang MO, Jin YW, Lee EK, Loake GJ. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Rep* 2016, 49, 149-158
- Ogbourne SM, Parsons PG. The value of nature's natural product library for the discovery of New Chemical Entities: The discovery of ingenol mebutate. *Fitoterapia* 2014, 98, 36-44.
- Ohlsson AB, Berglund T. Effects of High MnSO₄ Levels on Cardenolide Accumulation by *Digitalis lanata* Tissue Cultures in Light and Darkness. *J Plant Physiol* 1989, 135, 505-507.
- Ojulari OV, Lee SG, Nam JO. Beneficial Effects of Natural Bioactive Compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. on Obesity. *Molecules* 2019, 24, article 210.
- Okamura DM, Pennathur S. The balance of powers: Redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury. *Redox Biol* 2015, 6, 495-504.
- Ong SL, Ling APK, Poosporagi R, Moosa S. Production of Flavonoid compounds in cell cultures of *Ficus deltoidea* as influenced by medium composition. *Int J Med Arom Plants* 2011, 1, 62-74.
- Opletal L, Chocholoušová-Havlíková L, Siatka T, Cahlíková L, Ločárek M, Ali BH, Manoj P, Ramkumar A, Suleimani YMA, Za'abi MA, Karaca T, Nemmar A. Preparation and Validated Analysis of Anthocyanin Concentrate from the Calyces of *Hibiscus sabdariffa*. *Nat Prod Commun* 2017, 12, 43-45.
- Orhan I, Şener B, Choudhari MI, Khalid A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2004, 91, 57-60.
- Orlikova B, Legrand N, Panning J, Dicato M, Diederich M. Anti-Inflammatory and Anticancer Drugs from Nature. In: Zappia V, Panico S, Russo GL, Budillon A, Della Ragione F (eds.). *Advances in Nutrition and Cancer*. Springer, Berlin 2014, 123-143.
- Osman NI, Sidik NJ, Awal A. Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of *Barringtonia racemosa* L. *Asian Pac J Trop Biomed* 2016, 6, 143-147.
- Palmer SC, Maggo JK, Campbell KL, Craig JC, Johnson DW, Sutanto B, Ruospo M, Tong A, Strippoli GFM. Dietary interventions for adults with chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2017, 4, article CD011998.
- Pandey MM, Khatoon S, Rastogi S, Rawat AKS. Determination of flavonoids, polyphenols and antioxidant activity of *Tephrosia purpurea*: a seasonal study. *J Integr Med* 2016, 14, 447-455.
- Park SY. Potential Therapeutic Agents against Alzheimer's Disease from Natural Sources. *Arch Pharm Res* 2010, 33, 1589-1609.
- Patel A, Khan FA, Sikdar A, Mondal A, Shukla SD, Khurana S. Test for Non-Synergistic Interactions in Phyto-medicine, Just as You Do for Isolated Compounds. *J Exp Neurosci* 2018, 12, 1-3.
- Patil RA, Kolewe ME, Roberts SC. Cellular aggregation is a key parameter associated with long term variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2013, 112, 303-310.
- Pavarini DP, Pavarini SP, Niehues M, Lopes NP. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim Feed Sci Tech* 2012, 176, 5-16.
- Penning TM. Aldo-Keto Reductase (AKR) 1C3 inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2017, 27, 1329-1340.
- Perez Ortiz JM, Swerdlow RH. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Role in pathogenesis and novel therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol* 2019, 1-19.
- Pérez-Hernández J, Martínez-Trujillo A, Nicasio-Torres P. Optimization of active compounds production by interaction between nitrate and copper in *Sphaeralcea angustifolia* cell suspension using Response Surface Methodology. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2019, 136, 407-413.
- Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Arch Biochem Biophys* 2018, 646, 107-112.
- Perico N, Remuzzi G. Prevention programs for chronic kidney disease in low-income countries. *Intern Emerg Med* 2016, 11, 385-389.
- Phillips GC, Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2019, 55, 242-257.
- Piovan A, Filippini R, Innocenti G. Coumarin Compounds in *Coronilla scorpioides* Callus Cultures. *Nat Prod Commun* 2014, 9, 489-492.
- Poerba YS, Quesenberry KH, Wofford DS, Pfahler PL. Combining ability analysis of *in vitro* callus formation and plant regeneration in red clover. *Crop Sci* 1997, 37, 1302-1305.

- Pohanková E. Srovnávací studie obsahových látek v *Bellis perennis* L. *in vivo* a *in vitro*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 1992.
- Pohl F, Lin PKT. The Potential Use of Plant Natural Products and Plant Extracts with Antioxidant Properties for the Prevention/Treatment of Neurodegenerative Diseases: *In Vitro*, *In Vivo* and Clinical Trials. *Molecules* 2018, 23, article 3283.
- Poutanen M, Penning TM. Biology and clinical relevance of Hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase enzymes. *Mol Cell Endocrinol* 2019, 489, 82-91.
- Penning TM. AKR1C3 (type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase): Roles in malignancy and endocrine disorders. *Mol Cell Endocrinol* 2019, 489, 1-2.
- Qu J, Zhang W, Yu X, Jin M. Instability of anthocyanin accumulation in *Vitis vinifera* L. var. Gamay Freaux suspension cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2005, 10, 155-161.
- Rajendran L, Ravishankar GA, Venkataraman LV, Prathiba KR. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influenced by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnol Lett* 1992, 14, 707-712.
- Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Goleniowski M, Cusidó RM, Palazon J. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* 2016, 21, article 182.
- Rasool M, Malik A, Qureshi MS, Manan A, Pushparaj PN, Asif M, Qazi MH, Qazi AM, Kamal MA, Gan SH, Sheikh IA. Recent Updates in the Treatment of Neurodegenerative Disorders Using Natural Compounds. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014, article 979730.
- Razzaghi-Asl N, Garrido j, Khazraei H, Borges F, Firuzi O. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure-Activity Relationships. *Curr Med Chem* 2013, 20, 4436-4450.
- Reddy PH. Amyloid beta-induced glycogen synthase kinase 3 β phosphorylated VDAC1 in Alzheimer's disease: Implications for synaptic dysfunction and neuronal damage. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1832, 1913-1921.
- Reil G, Berger RG. Elicitation of volatile compounds in photomixotrophic cell culture of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1996, 46, 131-136.
- Reis A, Scopel M, Zuanazzi JAS. *Trifolium pratense*: Friable calli, cell culture protocol and isoflavones content in wild plants, *in vitro* and cell cultures analyzed by UPLC. *Rev Bras Pharmacogn* 2018, 28, 542-550.
- Renouard S, Corbin C, Drouet S, Medvedec B, Doussot J, Colas C, Maunit B, Bhambra AS, Gontier E, Jullian N, Mesnard F, Boitel M, Abbasi BH, Arroo RRJ, Lainé E, Hano C. Investigation of *Linum flavum* (L.) Hairy Root Cultures for the Production of Anticancer Aryltetralin Lignans. *Int J Mol Sci* 2018, 19, article 990.
- Rhee HS, Cho HY, Son SY, Yoon SYH, Park JM. Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2010, 101, 295-302.
- Riaz G, Chopra R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomed Pharmacother* 2018, 102, 575-586.
- Rižner TL. Enzymes of the AKR1B and AKR1C subfamilies and uterine diseases. *Front Pharmacol* 2012, 3, article 34.
- Rostampour S, Sohi HH, Dehestani A. *In vitro* regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). *Biologia* 2010, 65, 647-652.
- Sakamoto K, Iida K, Sawamura K, Hajiro K, Asada Y, Yoshikawa T, Furuya T. Anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata* Thunb. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1994, 36, 21-26.
- Salehi M, Moieni A, Safaie N. A Novel Medium for Enhancing Callus Growth of Hazel (*Corylus avellana* L.). *Sci Rep* 2017, 7, 15598.
- Saraswati AP, Hussaini SMA, Krishna NH, Babu BN, Kamal A. Glycogen synthase kinase-3 and its inhibitors: Potential target for various therapeutic conditions. *Eur J Med Chem* 2018, 144, 843-858.
- Sasheva P, Ionkova I. Podophyllotoxin Production by Cell Cultures of *Linum thracicum* ssp. *thracicum* Degen Elicited with Methyl Jasmonate and Salicylic Acid. *C R Acad Bulg Sci* 2015, 68, 883-888.
- Schenk RU, Hildebrandt AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 1972, 50, 199-204.
- Schmidt JA. *Lehrbuch der Materia medica*. Kupffer and Wimmer, Wien 1811, 9-12.
- Schöpke T, Hiller K. *Bellis perennis* L. In: Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G (eds). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Vol 4, 5th ed. Springer, Berlin/Heidelberg 1992, 477-479.
- Sendker J, Sheridan H. History and Current status of Herbal Medicines. In: Pelkonen O, Duez, P, Vuorela PM, Vuorela H (eds.). *Toxicology of Herbal Products*. Springer, Cham 2017, 11-27.

- Seujange Y, Leelahavanichkul A, Yisarakun W, Khawsuk W, Meepool A, Phamonleatmongkol P, Saechau W, Onlamul W, Tantiwarattanatikul P, Oonsook W, Eiam-Ong S, Eiam-Ong S. *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus aqueous extracts attenuate the progression of renal injury in 5/6 nephrectomy rats. *Ren Fail* 2013, 35, 118-125.
- Shah MR, George IA. Increased biomass and pigment production from *Cassia alata* L. callus cultures and their potential as a textile dye. *Ind Crop Prod* 2019, 128, 346-353.
- Shams-Ardakani M, Hemmati S, Mohagheghzadeh A. Effect of elicitors on the enhancement of podophyllotoxin biosynthesis in suspension cultures of *Linum album*. *DARU* 2005, 13, 56-60.
- Shaw D, Ladds G, Duez P, Williamson E, Chan K. Pharmacovigilance of herbal medicine. *J Ethnopharmacol* 2012, 140, 513-518.
- Shinde AN, Malpathak N, Fulzele DP. Optimized Production of Isoflavones in Cell Cultures of *Psoralea corylifolia* L. Using Elicitation and Precursor Feeding. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2009, 14, 612-618.
- Siatka T, Adamcová M, Opletal L, Cahlíková L, Jun D, Hrabínová M, Kuneš J, Chlebek J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). *Molecules* 2017a, 22, article 1181.
- Siatka T, Chlebek J, Hošťálková A. Copper(II) Sulfate Stimulates Scopoletin Production in Cell Suspension Cultures of *Angelica archangelica*. *Nat Prod Commun* 2017b, 12, 1779-1780.
- Siatka T, Kašparová M, Šícha J, Dušek J. Effects of auxins on growth and anthraquinone production in *Rheum palmatum* L. callus cultures. *Herba Pol* 2003a, 49, 44-48.
- Siatka T, Kašparová M, Sklenářová H, Solich P. Vliv manganatých, kobaltnatých a nikelnatých iontů na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Čes Slov Farm* 2005, 54, 47-51.
- Siatka T, Kašparová M, Spilková J. Effects of zinc and cadmium ions on cell growth and production of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. *Čes Slov Farm* 2012, 61, 261-266.
- Siatka T, Kašparová M. Effects of aluminium chloride on cell growth and production of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. *Čes Slov Farm* 2010a, 59, 112-116.
- Siatka T, Kašparová M. Effects of auxins on growth and scopoletin accumulation in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. *Čes Slov Farm* 2008, 57, 17-20.
- Siatka T, Kašparová M. Effects of combined hormonal deprivation and fungal elicitation on the production of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. *Čes Slov Farm* 2009, 58, 168-171.
- Siatka T, Kašparová M. Growth and flavonoid production in *Bellis perennis* L. callus cultures. *Herba Pol* 2001, 47, 17-21.
- Siatka T, Kašparová M. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. *Molecules* 2010b, 15, 9450-9461.
- Siatka T, Kašparová M. Sezónní změny hemolytické účinnosti úborů *Bellis perennis* L. *Čes Slov Farm* 2003b, 52, 39-41.
- Siatka T, Kašparová M. Vliv auxinů na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Čes Slov Farm* 2003c, 52, 186-188.
- Siatka T, Kašparová M. Vliv biotických elicitorů na produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Bellis perennis* L. *Čes a Slov Farm* 1999, 48, 268-271.
- Siatka T, Kašparová M. Vliv prekurzorů na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Čes Slov Farm* 2002, 51, 47-50.
- Siatka T, Kašparová M. Vliv sloučenin vanadu na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Čes Slov Farm* 2007, 56, 230-234.
- Siatka T, Pohanková E, Spilková J. Obsah flavonoidů v rostlině a kalusové kultuře *Bellis perennis* L. *Čes a Slov Farm* 1998a, 47, 44-46.
- Siatka T, Reichling J. Stimulation of scopoletin accumulation in *Archangelica officinalis* Hoffm. cell suspension cultures by fungal elicitors. *Herba Pol* 2000, 46, 12-17.
- Siatka T, Sklenářová H, Kašparová M, Solich P. Vliv chloridu rtuťnatého na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Chem Listy* 2011, 105, 367-370.
- Siatka T, Solich P, Kotyk R. Flow injection analysis of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica*. *Pharmazie* 1998b, 53, 273-274.
- Siatka T. Effects of Growth Regulators on Production of Anthocyanins in Callus Cultures of *Angelica archangelica*. *Nat Prod Commun* 2019, 14, 1-4.
- Siatka T. Production of Anthocyanins in Callus Cultures of *Angelica archangelica*. *Nat Prod Commun* 2018, 13, 1645-1648.
- Siatka T. Produkce sekundárních metabolitů explantáty *Angelica archangelica* L. Kandidátská disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 1993.

- Siatka T. Vliv auxinů na růst kalusové kultury *Bellis perennis* L. a produkci flavonoidů. Čes a Slov Farm 1998, 47, 273-275.
- Siatka T.: Andělka lékařská *in vitro* – vliv světla a vybraných prekurzorů na růst kalusové kultury a produkci kumarinů. Čes a Slov Farm 1995, 44, 252-256.
- Šícha J, Becker H, Dušek J, Hubík J, Siatka T, Hroneš I. Callus cultures of the genus *Echinacea* II. Effect of phenylalanine on the growth of cultures and the production of cinnamic acids. Pharmazie 1991, 46, 363-364.
- Šícha J, Hubík J, Dušek J. Produkce fenylopropanů tkáňovými kulturami rodu *Echinacea*. Českoslov Farm 1989, 38, 124-129.
- Sies H. On the history of oxidative stress, concept and some aspects of current development. Curr Opin Toxicol 2018, 7, 122-126.
- Silveira SS, Cordeiro-Silva R, Degenhardt-Goldbach J, Quoirin M. Micropropagation of *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. Braz J Biol 2016, 76, 656-663.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965, 16, 144-158.
- Sivanandhan G, Selvaraj N, Ganapathi A, Manickavasgam M. Enhanced Biosynthesis of Withanolides by Elicitation and Precursor Feeding in Cell Suspension Culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in Shake-Flask Culture and Bioreactor. PloS One 2014, 9, article e104005.
- Škarydová L, Hofman J, Chlebek J, Havránková J, Kosanová K, Skarka A, Hošťálková A, Plucha T, Cahlíková L, Wsól V. Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors. J Steroid Biochem Mol Biol 2014, 143, 250-258.
- Škarydová L, Živná L, Xiong G, Maser E, Wsól V. AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. Chem Biol Interact 2009, 178, 138-144.
- Slavík B. *Bellis perennis* L. – sedmikráska obecná. In: Slavík B, Štěpánková J (eds.). Květena České republiky, Vol 7, 1st ed. Academia, Praha 2004, 124-125.
- Smetanska I. Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. Adv Biochem Engin/Biotechnol 2008, 111, 187-228.
- Smith R, Drummond S, Haines A, Porter JR, Hock RS. Induction of umbelliferone in sweet potato cell suspension culture using mercuric chloride. Biotechnol Lett 2001, 23, 1397-1400.
- Solecki J. Shanidar IV, a Neanderthal Flower Burial in Northern Iraq. Science 1975, 190, 880-881.
- Soltanabad MH, Bagherieh-Najjar MB, Mianabadi M. Seasonal Variations in Carnosic Acid Content of Rosemary Correlates with Anthocyanins and Soluble Sugars. J Med Plants By Prod 2018, 2, 163-171.
- Soni U, Brar S, Gauttam VK. Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants. Int J Pharm Sci Res 2015, 6, 3654-3662.
- Sreenivas VK, Jisha VN, Martin KP, Madhusoodanan PV. *Bridelia stipularis*: a new source for anthocyanin production *in vitro*. Acta Physiol Plant 2011, 33, 2051-2056.
- Sreeranjini S, Siril EA. Production of anthraquinones from adventitious root derived callus and suspension cultures of *Morinda citrifolia* L. in response to auxins, cytokinins and sucrose levels. Asian J Plant Sci Res 2013, 3, 131-138.
- Standridge JB. Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. Clin Ther 2004, 26, 615-630.
- Sun SQ, Gu X, Gao XS, Li Y, Yu H, Xiong W, Yu H, Wang W, Li Y, Teng Y, Zhou D. Overexpression of AKR1C3 significantly enhances human prostate cancer cells resistance to radiation. Oncotarget 2016, 7, 48050-48058.
- Svachahs R, Julku U, Kilpeläinen T, Kyyrö M, Jäntti M. New tricks of prolyl oligopeptidase inhibitors – A common drug therapy for several neurodegenerative diseases. Biochem Pharmacol 2019, 161, 113-120.
- Tachjian A, Maria V, Jahangir A. Use of Herbal Products and Potential Interactions in Patients With Cardiovascular Diseases. J Am Coll Cardiol 2010, 55, 515-525.
- Takanashi-Yanaga F. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target. Biochem Pharmacol 2013, 86, 191-199.
- Tallini LR, Bastida J, Cortes N, Osorio EH, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G. Cholinesterase Inhibition Activity, Alkaloid Profiling and Molecular Docking of Chilean *Rhodophiala* (Amaryllidaceae). Molecules 2018, 23, article 1532.
- Tazeb A. Plant Tissue Culture Technique as a Novel Tool in Plant Breeding: A Review Article. Am-Euras J Agric Environ Sci 2017, 17, 11-118.
- Thakur M, Bhattacharya S, Khosla PK, Puri S. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. J Appl Res Med Aromat Plants 2019, 12, 1-12.

- Thastrup O, Cullen PJ, Drøbak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 2466-2470.
- Thiruvengadam M, Rekha K, Rajakumar G, Lee TJ, Kim SH, Chung IM. Enhanced Production of Anthraquinones and Phenolic Compounds and Biological Activities in the Cell Suspension Cultures of *Polygonum multiflorum*. *Int J Mol Sci* 2016, 17, article 1912.
- Tian Y, Zhao L, Zhang H, Liu X, Zhao L, Zhao X, Li Y, Li J. AKR1C3 overexpression may serve as a promising biomarker for prostate cancer progression. *Diagn Pathol* 2014, 9, article 42.
- Tokoroyama T, Ando M, Setoguchi K, Tsuchiya K, Nitta K. Prevalence, incidence and prognosis of chronic kidney disease classified according to current guidelines: a large retrospective cohort study of rheumatoid arthritis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2016, 32, 2035-2042.
- Treiman M, Caspersen C, Christensen SB. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *Trends Pharmacol Sci* 1998, 19, 131-135.
- Trejo-Tapia G, Jimenez-Aparicio A, Rodriguez-Monroi R, De Jesus-Sanchez A, Gutierrez-Lopez G. Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2001, 67, 19-23.
- Trong TT, Truong DH, Nguyen HC, Tran DT, Thi HTN, Dang GD, Huu HN. Biomass accumulation of *Panax vietnamensis* in cell suspension cultures varies with addition of plant growth regulators and organic additives. *Asian Pac J Trop Med* 2017, 10, 907-915.
- Tsuda K. Division of Tasks: Defense by the Spatial Separation of Antagonistic Hormone Activities. *Plant Cell Physiol* 2018, 59, 3-4.
- Tu, Y. Artemisinin – A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angew Chem* 2016, 55, 10210-10226.
- Tůmová L, Klimešová V, Vildová A. The Effect of Pyridinecarbothioamides on Isoflavonoid Production in *Genista tinctoria* Cultures *in Vitro*. *Nat Prod Commun* 2013, 8, 593-596.
- Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H, Putalun W. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnol Lett* 2011, 33, 369-374.
- Ullisch DA, Sankar-Thomas YD, Wilke S, Selge T, Pump M, Leibold T, Schütte K, Gorr G. Plant Cell Cultures – up to Commercial Scale Production of Actives. *In Vitro Cell Dev-Pl* 2018, 54(Suppl 1), S112.
- Upton R, Graff A, Jolliffe G, Länger R, Williamson E (eds.). *American Herbal Pharmacopoeia: botanical pharmacognosy – microscopic characterization of botanical medicines*. CRC Press, Boca Raton 2011, 4-30.
- Uzma F, Mohan CD, Hashem A, Konappa NM, Rangappa S, Kamath PV, Singh BP, Mudili V, Gupta VK, Sidaiah CN, Chowdappa S, Alqarawi AA, Abd Allah EF. Endophytic Fungi – Alternative Sources of Cytotoxic Compounds: A Review. *Front Pharmacol* 2018, 9, article 309.
- Valli G, Giardina EGV. Benefits, Adverse Effects and Drug Interactions of Herbal Therapies with Cardiovascular Effects. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39, 1083-1095.
- Van Fürden B, Humburg A, Fuss E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 2005, 24, 312-317.
- Van Huffel L, Tomson CRV, Ruige J, Nistor I, Van Biesen W, Bolignano D. Dietary Restriction and Exercise for Diabetic Patients with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Plos ONE* 2014, 9, article e113667.
- Van Uden W, Pras N, Malingré TM. On the improvement of the podophyllotoxin production by phenylpropanoid precursor feeding to cell cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1990, 23, 217-224.
- Vasconsuelo A, Picotto G, Giuletti AM, Boland R. Involvement of G-proteins in chitosan-induced anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. *Physiol Plant* 2006, 128, 29-37.
- Veith NC, Smith M, Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. *Herbal Medicines*, 4th ed. Pharmaceutical Press, London 2013, 4-26.
- Verma N, Shukla S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J Appl Res Med Aromat Plants* 2015, 2, 105-113.
- Vijayalakshmi U, Shourie A. Remedial effect of ascorbic acid and citric acid on oxidative browning of *Glycyrrhiza glabra* callus cultures. *BioTechnologia* 2016, 97, 179-186.
- Walker TS, Bais HP, Vivanco JM. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry* 2002, 60, 289-293.
- Wang J, Xiao X, Wang Q, Li X, Zhang L, Li J. Accumulation of flavonoids and antioxidant activity of *Stellera chamaejasme* by an efficient callus culture. *Hort Environ Biotechnol* 2013, 54, 441-449.

- Wang N, Zhang Z, Jiang S, Xu H, Wang Y, Feng S, Chen X. Synergistic effects of light and temperature on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2016, 127, 217-227.
- Wang SC, Lee SF, Wang CJ, Lee CH, Lee WC, Lee HJ. Aqueous Extract from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulating Oxidative Status and Akt/Bad/14-3-3 γ in an Experimental Animal Model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, article 938126.
- Wang T, Liu XH, Guan J, Ge S, Wu MB, Lin JP, Yang LR. Advancement of multi-target drug discoveries and promising applications in the field of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 2019, 169, 200-223.
- Wang YC, Wang N, Xu HF, Jiang SH, Fang HC, Su MY, Zhang ZY, Zhang TL, Chen XS. Auxin regulates anthocyanin biosynthesis through the Aux/IAA-ARF signaling pathway in apple. *Hortic Res* 2018, 5, article 59.
- Wani MC, Horwitz SB. Nature as a Remarkable Chemist: A Personal Story of the Discovery and Development of Taxol[®]. *Anticancer Drugs* 2014, 25, 482-487.
- Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress *versus* Signal Transduction. *Biomolecules* 2015, 5, 472-484.
- Williamson EM. Synergy and other interactions in phytochemicals. *Phytochemistry* 2001, 8, 401-409.
- Wilson J, Hayes M, Carney B. Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products. *Food Chem* 2011, 129, 235-244.
- Wouters OJ, O'Donoghue DJ, Ritchie J, Kanavos PG, Narva AS. Early chronic kidney disease: diagnosis, management and models of care. *Nat Rev Nephrol* 2015, 11, 491-502.
- Wu X, Cai H, Pan L, Cui G, Qin F, Li YC, Cai Z. Small Molecule Natural Products and Alzheimer's Disease. *Curr Top Med Chem* 2019, 19, 187-2014.
- Yan MM, Xu C, Kim CH, Um YC, Bah AA, Guo DP. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). *Sci Hortic* 2009, 123, 124-128.
- Yang Y, Zhang Z, Li S, Ye X, Li X, He K. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* 2014, 92, 133-147.
- Yazaki K. *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures: Present and future aspects. *Plant Biotechnol* 2017, 34, 131-142.
- Yoshikawa M, Li X, Nishida E, Nakamura S, Matsuda H, Muraoka O, Morikawa T. Medicinal Flowers. XXI. Structures of Perennisaponins A, B, C, D, E, and F, Acylated Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, from the Flowers of *Bellis perennis*. *Chem Pharm Bull* 2008, 56, 559-568.
- Yousefzadi M, Sharifi M, Behmanesh M, Ghasempour A, Moyano E, Palazon J. Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis. *Biotechnol Lett* 2010, 32, 1739-1743.
- Zaheer M, Reddy VD, Giri CC. Enhanced daidzin production from jasmonic and acetyl salicylic acid elicited hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. (Fabaceae). *Nat Prod Res* 2016, 30, 1542-1547.
- Zaidi MA, Khan S, Jahan N, Yousafzai A, Mansoor A. Micropropagation and conservation of three *Juniperus* species (Cupressaceae). *Pak J Bot* 2012, 44, 301-304.
- Zeng CM, Chang LL, Ying MD, Cao J, He QJ, Zhu H, Yang B. Aldo-Keto Reductase AKR1C1-AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Front Pharmacol* 2017, 8, article 119.
- Zhai X, Jia M, Chen L, Zheng C, Rahman K, Han T, Quin L. The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants. *Crit Rev Microbiol* 2017, 43, 238-261.
- Zhang CH, Wu JY. Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus* spp. *Cells. Enzyme Microb Technol* 2003, 32, 71-77.
- Zhang D, Du M, Wei Y, Wang C, Shen L. A review on the structure-activity relationship of dietary flavonoids for protecting vascular endothelial function: Current understanding and future issues. *J Food Biochem* 2018, 42, article e12557.
- Zhang P, Xu S, Zhu Z, Xu J. Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 2019, 176, 228-247.

6 Tematické publikace předkladatele

- Ali BH, Cahlíková L, Opletal L, Karaca T, Manoj P, Ramkumar A, Suleimani YMA, Za'abi MA, Nemmar A, Chocholoušová-Havlíková L, Ločárek M, Siatka T, Blunden G. Effect of aqueous extract and anthocyanins of calyces of *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) in rats with adenine-induced chronic kidney disease. *J Pharm Pharmacol* 2017, 69, 1219-1229.
- Cahlíková L, Ali BH, Havlíková L, Ločárek M, Siatka T, Opletal L, Blunden G. Anthocyanins of *Hibiscus sabdiffera* calyces from Sudan. *Nat Prod Commun* 2015, 10, 77-79.
- Havlasová J, Šafratová M, Siatka T, Štěpánková Š, Novák Z, Ločárek M, Opletal L, Hrabínová M, Jun D, Benešová N, Kuneš J, Cahlíková L. Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. *Nat Prod Commun* 2014, 9, 1151-1155.
- Hošťálková A, Maříková J, Opletal L, Korábečný J, Hulcová D, Kuneš J, Nováková L, Perez DI, Jun D, Kučera T, Andrisano V, Siatka T, Cahlíková L. Isoquinoline Alkaloids from *Berberis vulgaris* as Potential Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Nat Prod* 2019, 82, 239-248.
- Hošťálková A, Siatka T, Chlebek J, Opletal L, Drašar P, Cahlíková L. Boldinové alkaloidy a perspektivy jejich využití. *Chem Listy* 2015, 109, 846-855.
- Hulcová D, Breiterová K, Siatka T, Klímová K, Davani L, Šafratová M, Hošťálková A, De Simone A, Andrisano V, Cahlíková L. Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 beta Inhibitors. *Molecules* 2018, 23, article 719.
- Hulcová D, Breiterová K, Zemanová L, Siatka T, Šafratová M, Vaněčková N, Hošťálková A, Wsól V, Cahlíková L. AKR1C3 Inhibitory Potency of Naturally-occurring Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types. *Nat Prod Commun* 2017, 12, 245-246.
- Kašparová M, Pilařová P, Tůmová L, Siatka T. Effect of Precursor and Phytohormones on Podophyllotoxin Production in *Juniperus virginiana* Suspension Cultures. *Nat Prod Commun* 2018, 13, 1527-1529.
- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Abiotic elicitation of *Trifolium pratense* L. suspension culture. *Čes Slov Farm* 2007, 56, 225-229.
- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Biotic elicitation of the *Trifolium pratense* L. suspension culture. *Čes Slov Farm* 2008, 57, 107-110.
- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Production of isoflavonoids in the *Trifolium pratense* L. suspension culture. *Čes Slov Farm* 2009, 58, 67-70.

- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Vliv abiotické elicitace a vápenatých iontů na produkci explantátové kultury *Rheum palmatum* L. Čes Slov Farm 2003a, 52, 248-251.
- Kašparová M, Siatka T, Dušek J. Vliv kyseliny jasmínové na produkci anthracenových derivátů v kultuře *Rheum palmatum* L. *in vitro*. Čes Slov Farm 2003b, 52, 148-151.
- Kašparová M, Siatka T, Klimešová V, Dušek J. New synthetic pyridine derivate as potential elicitor in production of isoflavonoids and flavonoids in *Trifolium pratense* L. suspension culture. Sci World J 2012a, article 746412.
- Kašparová M, Siatka T, Klimešová V, Dušek J. Vliv syntetického benzyropyridinového derivátu na produkci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. Chem Listy 2012b, 106, 660-664.
- Kašparová M, Siatka T, Spilková J, Dušek J. Explantátová kultura *Trifolium pratense* L. Čes Slov Farm 2006, 55, 44-47.
- Kašparová M, Siatka T. Abiotická elicitace explantátové kultury *Rheum palmatum* L. těžkými kovy. Čes Slov Farm 2004, 53, 252-255.
- Kašparová M, Siatka T. Production of flavonoids and isoflavonoids in jasmonic acid-induced red clover suspension cultures. Čes Slov Farm 2014, 63, 17-21.
- Kašparová M, Siatka T. Produkce anthracenových derivátů elicitovanou tkáňovou kulturou *Rheum palmatum* L. Čes a Slov Farm 1999, 48, 256-261.
- Kašparová M, Siatka T. Vliv biotického elicitoru *Candida utilis* na produkci anthracenových derivátů tkáňovou kulturou *Rheum palmatum* L. Čes a Slov Farm 2001a, 50, 41-45.
- Kašparová M, Siatka T. Vliv chitosanu na produkci anthracenových derivátů v tkáňové kultuře *Rheum palmatum* L. Čes Slov Farm 2001b, 50, 249-253.
- Kašparová M, Siatka T. Vliv kyseliny salicylové na produkci anthracenových derivátů v kultuře *Rheum palmatum* L. *in vitro*. Čes Slov Farm 2002, 51, 177-181.
- Kašparová M, Spilková J, Cvak L, Siatka T, Martin J. Plant Tissue Cultures of *Juniperus virginiana*. Nat Prod Commun 2016, 11, 681-683.
- Opletal L, Chocholeušová-Havlíková L, Siatka T, Cahlíková L, Ločárek M, Ali BH, Manoj P, Ramkumar A, Suleimani YMA, Za'abi MA, Karaca T, Nemmar A. Preparation and Validated Analysis of Anthocyanin Concentrate from the Calyces of *Hibiscus sabdariffa*. Nat Prod Commun 2017, 12, 43-45.
- Siatka T, Adamcová M, Opletal L, Cahlíková L, Jun D, Hrabínová M, Kuneš J, Chlebek J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). Molecules 2017a, 22, article 1181.
- Siatka T, Chlebek J, Hošťálková A. Copper(II) Sulfate Stimulates Scopoletin Production in Cell Suspension Cultures of *Angelica archangelica*. Nat Prod Commun 2017b, 12, 1779-1780.

- Siatka T, Kašparová M, Sklenářová H, Solich P. Vliv manganatých, kobaltnatých a nikelnatých iontů na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Čes Slov Farm 2005, 54, 47-51.
- Siatka T, Kašparová M, Spilková J. Effects of zinc and cadmium ions on cell growth and production of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. Čes Slov Farm 2012, 61, 261-266.
- Siatka T, Kašparová M, Šícha J, Dušek J. Effects of auxins on growth and anthraquinone production in *Rheum palmatum* L. callus cultures. Herba Pol 2003a, 49, 44-48.
- Siatka T, Kašparová M. Effects of aluminium chloride on cell growth and production of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. Čes Slov Farm 2010a, 59, 112-116.
- Siatka T, Kašparová M. Effects of auxins on growth and scopoletin accumulation in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. Čes Slov Farm 2008, 57, 17-20.
- Siatka T, Kašparová M. Effects of combined hormonal deprivation and fungal elicitation on the production of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. Čes Slov Farm 2009, 58, 168-171.
- Siatka T, Kašparová M. Growth and flavonoid production in *Bellis perennis* L. callus cultures. Herba Pol 2001, 47, 17-21.
- Siatka T, Kašparová M. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. Molecules 2010b, 15, 9450-9461.
- Siatka T, Kašparová M. Sezónní změny hemolytické účinnosti úborů *Bellis perennis* L. Čes Slov Farm 2003b, 52, 39-41.
- Siatka T, Kašparová M. Vliv auxinů na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Čes Slov Farm 2003c, 52, 186-188.
- Siatka T, Kašparová M. Vliv biotických elicitorů na produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Bellis perennis* L. Čes a Slov Farm 1999, 48, 268-271.
- Siatka T, Kašparová M. Vliv prekurzorů na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Čes Slov Farm 2002, 51, 47-50.
- Siatka T, Kašparová M. Vliv sloučenin vanadu na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Čes Slov Farm 2007, 56, 230-234.
- Siatka T, Pohanková E, Spilková J. Obsah flavonoidů v rostlině a kalusové kultuře *Bellis perennis* L. Čes a Slov Farm 1998a, 47, 44-46.
- Siatka T, Reichling J. Stimulation of scopoletin accumulation in *Archangelica officinalis* Hoffm. cell suspension cultures by fungal elicitors. Herba Pol 2000, 46, 12-17.

- Siatka T, Sklenářová H, Kašparová M, Solich P. Vliv chloridu rtuťnatého na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Chem Listy 2011, 105, 367-370.
- Siatka T, Solich P, Kotyk R. Flow injection analysis of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica*. Pharmazie 1998b, 53, 273-274.
- Siatka T. Andělka lékařská *in vitro* – vliv světla a vybraných prekurzorů na růst kalusové kultury a produkci kumarinů. Čes a Slov Farm 1995, 44, 252-256.
- Siatka T. Effects of Growth Regulators on Production of Anthocyanins in Callus Cultures of *Angelica archangelica*. Nat Prod Commun 2019, 14, 1-4.
- Siatka T. Production of Anthocyanins in Callus Cultures of *Angelica archangelica*. Nat Prod Commun 2018, 13, 1645-1648.
- Siatka T. Vliv auxinů na růst kalusové kultury *Bellis perennis* L. a produkci flavonoidů. Čes a Slov Farm 1998, 47, 273-275.
- Šícha J, Becker H, Dušek J, Hubík J, Siatka T, Hroneš I. Callus cultures of the genus *Echinacea* II. Effect of phenylalanine on the growth of cultures and the production of cinnamic acids. Pharmazie 1991, 46, 363-364.