

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

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



Dagmar Mudrová

Změny obsahu sekundárních metabolitů léčivých rostlin v reakci na působení vybraných
kontaminantů životního prostředí

Change in the production of secondary metabolites by medicinal plants in response to
selected environmental contaminants

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Školitel: RNDr. Hana Konrádová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 23.04.2021

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Radce Podlipné, Ph.D. a RNDr. Haně Konrádové, Ph.D. za jejich cenné rady, trpělivost a podporu při psaní této práce.

Abstrakt

Produkty sekundárního metabolismu umožňují rostlinám reagovat na mimo jiné i na nepříznivé změny vnějšího prostředí a jimi způsobený biologický stres. Z chemického hlediska jsou sekundární metabolity velmi různorodou skupinou látek, často bývají druhově či rodově specifické. Některé sekundární metabolity jsou pro své chemické vlastnosti a biologickou aktivitu využívány v humánní či veterinární medicíně a problematika jejich extrakce a terapeutického využití je v centru zájmu biotechnologického výzkumu. Na modulaci sekundárního metabolismu mají vliv různé typy kontaminantů, se kterými se rostliny setkávají stále častěji. V současné době představuje kontaminace životního prostředí závažný problém pro některé typy zpracování léčivých rostlin, kdy kvalita a zdravotní nezávadnost výsledného produktu výrazně kolísá. Na druhou stranu nabízí výzkum interakcí běžných i méně obvyklých kontaminantů se sekundárním metabolismem rostlin nové biotechnologické možnosti v produkci fytotherapeutik díky fenoménu elicitace. Různé typy a různé koncentrace kontaminantů působí na rostlinný sekundární metabolismus odlišně, u některých kontaminantů není zatím jejich působení uspokojivě popsáno v literatuře. V této práci jsou stručně představeny nejvýznamnější skupiny kontaminantů, se kterými se rostliny v současné době setkávají, a u skupiny těžkých kovů je blíže popsán jejich vliv na obsah sekundárních metabolitů u několika konkrétních druhů léčivých rostlin.

Klíčová slova

elicitace, fytotherapeutika, kontaminanty, sekundární metabolismus, těžké kovy

Abstract

The products of secondary metabolism allow plants to respond to, among other things, adverse changes in the external environment and the biological stress caused by them. From a chemical point of view, secondary metabolites are a very diverse group of substances, often species or genus specific. Some secondary metabolites are used in human or veterinary medicine for their chemical properties and biological activity, and the issue of their extraction and therapeutic use is in the center of attention of biotechnological research. The modulation of secondary metabolism is influenced by various types of contaminants, which plants encounter more and more often. Currently, environmental contamination is a serious problem for some types of processing of medicinal plants, where the quality and safety of the final product varies significantly. On the other hand, research into the interactions of common and less common contaminants with plant secondary metabolism offers new biotechnological possibilities in the production of phytotherapeutics due to the phenomenon of elicitation. Different types and different concentrations of contaminants affect plant secondary metabolism differently; effects of some contaminants are yet to be satisfactorily described in the literature. In this work, the most important groups of contaminants encountered by plants are briefly introduced, and in the group of heavy metals, their influence on the content of secondary metabolites in several specific species of medicinal plants is described in more detail.

Keywords

elicitation, phytotherapeutics, contaminants, secondary metabolism, heavy metals

Obsah

1. Úvod	1
2. Část první - vybrané kontaminanty životního prostředí	3
2.1. Humánní léčiva.....	3
2.2. Veterinární léčiva.....	5
2.3. Soli	6
2.4. Nanomateriály	7
2.5. Mikroplasty	8
2.6. Těžké kovy	8
3. Část druhá - vliv těžkých kovů na obsah sekundárních metabolitů u vybraných druhů rostlin	14
3.1. Třezalka tečkovaná (<i>Hypericum perforatum</i>)	14
3.2. Barvínkovec růžový (<i>Caranthus roseus</i>).....	16
3.3. Kamptotéka ostrolistá (<i>Camptotheca acuminata</i>).....	18
3.4. Mák setý (<i>Papaver somniferum</i>)	20
3.5. Pelyněk roční (<i>Artemisia annua</i>)	21
3.6. Bakopa drobnolistá (<i>Bacopa monnieri</i>)	23
3.7. Máta peprná (<i>Mentha piperita</i>)	24
4. Závěr	27
5. Seznam použité literatury	28
6. Přílohy.....	37

Seznam zkratek

10-HCPT - 10-hydroxycamptothecin

APX - enzym askorbátperoxidáza

ASTDR - Agency for Toxic Substances and Disease Control

CAT - enzym kataláza

CPT - camptothecin

DHA - enzym dehydrogenáza

DHPPA - 3,5-dihydroxyfenylpropanová kyselina

G3PDH - enzym glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza

GPX - enzym glutathion peroxidáza

GSH - glutathion

GST - enzym glutathion-S-transferáza

L-DOPA - L-3,4-dihydroxyphenylalanin

MDHAR - enzym monodehydroaskorbátreduktáza

NK - nukleová kyselina (DNA, RNA)

NSAID - nesteroidní antiflogistika, nesteroidní protizánětlivé látky

POX - enzym guaiacolperoxidáza

SM - sekundární metabolismus, sekundární metabolit

TDC - enzym tryptofandekarboxyláza

SOD - enzym superoxid dismutáz

WHO - World Health Organisation

1. Úvod

Převážná většina vyšších rostlin jsou makroskopické, přisedlé a fotosyntetizující organismy, které tvoří významnou část živé hmoty na této planetě. Životní procesy rostlin ovlivňují okolní prostředí a další organismy, které se v něm nacházejí. Vývoj lidstva je úzce spojen s rostlinami jako zdrojem potravy, zdrojem výrobních surovin a chemických látek vhodných k dalšímu zpracování a využití. Rostliny byly v minulosti hlavním a často i jediným zdrojem látek používaných k léčbě či zmírnění příznaků chorob, které lidstvo vždy provázely. Metody extrakce a aplikace fytoterapeutik se v průběhu času staly výrazně efektivnějšími, a i přes významný rozvoj syntetických léčiv si rostliny i v dnešní době zachovávají obrovský potenciál v oblasti humánní a veterinární medicíny. Vysoké procento běžně užívaných léčiv je odvozeno od látek obsažených v rostlinách a některé látky rostlinného původu jsou zcela nezastupitelné v léčbě závažných onemocnění (Almgaro et al., 2015). Některé zdroje uvádí, že produkty vyšších rostlin a jejich deriváty tvoří více než 25 % všech léčiv celosvětově užívaných v klinické praxi (Gurub-Fakim, 2006).

Díky nesmírné chemické rozmanitosti rostlin mnoho potenciálních léčiv teprve čeká na své objevení a podrobný výzkum. Látky či skupiny látek s předpokládanými fyziologickými účinky jsou izolovány, je zjištěna jejich chemická struktura a po ověření účinků a bezpečnosti jsou využity k přímé léčbě, nebo jako výchozí materiál k další přípravě derivátů s lepší terapeutickou hodnotou (Bauer, 1998).

Léčebné látky odvozené od rostlin jsou ve většině případů produkty tzv. sekundárního metabolismu. Přestože jednoznačné dělení metabolitů na primární a sekundární může být pro určitý překryv či druhovou specifitu často sporné, obvykle se za sekundární metabolity označují produkty syntetických drah, které vedou k tvorbě látek neesenčních pro růst, stavbu těla a rozmnožování. Produkty sekundárního metabolismu jsou rostlinou využívány zejména při získávání konkurenčních a ekologických výhod, jakými jsou například repelentní efekt pro herbivory nebo odolnost vůči plísním díky obsahu fungicidních látek. Sekundární metabolity mohou plnit i regulační a detoxikační funkci, kdy jejich přítomnost zvyšuje odolnost rostlinného organismu vůči stresu (shrnuto v Erb a Kliebenstein, 2020).

Sekundární metabolity mohou být úzce specifické pro několik rostlinných druhů, či společné pro širší taxony, jejich výzkum je díky této skutečnosti přínosný i z hlediska fylogenetického (Cronquist, 1977)

Vliv vnějších faktorů na modulaci sekundárních metabolických drah rostlin je dalším zásadním bodem ve studiu rostlin, neboť se díky němu dozvídáme více jak o fungování samotného sekundárního metabolismu a jeho produktech, tak o možnostech manipulace s ním k našemu prospěchu. Modulaci sekundárních metabolických drah může vyvolat mnoho faktorů, včetně látek přítomných ve vnějším prostředí, které jsou běžně považovány za nežádoucí kontaminanty. V rámci reakce na tyto podněty může dojít například ke snížení či naopak zvýšení výtěžnosti vzácného metabolitu, změnám v zastoupení jednotlivých metabolitů a ke změnám v obsahu toxických produktů (Verma a Shukla, 2015).

Zvýšení obsahu sekundárního metabolitu v reakci na kontakt s určitou látkou je označováno jako elicitace, či bioelicitace v případě, kdy daná látka byla produktem metabolismu jiných organismů, především mikroorganismů jako např. plísní či bakterií (Shasmita et al., 2018). Využití fenoménu elicitace a bioelicitace k efektivnímu získávání účinných rostlinných produktů má do budoucna významný potenciál pro farmacii, medicínu, bioinženýrství i ekologické obory. S růstem a vývojem lidské civilizace roste poptávka po nových léčivech a dalších rostlinných produktech, jejichž získávání za pomoci současných metod sběru, pěstování a zpracování je neuspokojivé, finančně náročné či ekologicky nepříznivé (Schippmann et al., 2002). Cílem této práce je stručné shrnutí dosud dostupných poznatků o vlivu známých a významných kontaminantů životního prostředí na produkci rostlinných sekundárních metabolitů, které vykazují již ověřené či do budoucna slibné terapeutické účinky.

2. Část první - Vybrané kontaminanty životního prostředí

Kontaminanty životního prostředí jsou obecně definovány jako látky (prvky a jejich sloučeniny) nebo skupiny látek, které jsou chemicky stabilní, mají tendenci se v životním prostředí akumulovat a jejich přítomnost může mít na něj nepříznivé účinky (Tornera a d'Alcalà, 2014). Do prostředí mohou být uvolňovány z přírodních zdrojů, jako vedlejší produkt průmyslové výroby, dopravy nebo nehodou. Podle jejich fyzikálně-chemických vlastností dojde k jejich distribuci mezi vzduch, vodu a půdu. Některé zůstávají v životním prostředí velmi dlouho, některé se mohou akumulovat přímo v tělech organismů, a tímto způsobem může docházet k dalšímu ovlivnění jedinců, populací a ekosystémů (Callow a Forbes, 2012).

Existuje velké množství kontaminantů, popsat zde všechny není možné vzhledem k omezenému rozsahu práce. Pro ilustraci problematiky kontaminace rostlin jsem vybrala k bližšímu popisu pět skupin kontaminantů (humánní a veterinární léčiva, soli, mikroplasty a nanomateriály) a pak skupinu těžkých kovů, u které se zaměřím na detailní popis interakce jednotlivých kovů s konkrétními rostlinami.

2.1. Humánní léčiva

Skupina humánních léčiv je velmi rozmanitá, zahrnuje například antibiotika, NSAID (nesteroidní antiflogistika - ibuprofen, naproxen atd.), beta-blokátory, syntetické analogy hormonů, antihelmintika, antimalarika a další skupiny.

Léčiva se do životního prostředí dostávají především tak, že jsou užita pacientem, a poté v metabolizované, nebo naopak nezměněné formě vyloučena v moči či v exkrementech do odpadní vody. V kanalizačních sítích se jejich zbytky mohou nacházet v relativně vysokých koncentracích, zejména v hustě osídlených oblastech a v okolí nemocnic (Sim et al., 2013). Obsah a složení léčiv v odpadní vodě závisí i na ročním období, kdy v zimě je objem některých léčiv vyloučených do kanalizační sítě vyšší, pravděpodobně díky zvýšené spotřebě přípravků určených na léčbu sezónních infekcí a zároveň i díky jejich pomalejšímu rozkladu (Yu et al., 2013).

Odstranění léčiv a jejich metabolitů z odpadních vod je stále technicky poměrně složité, proces čištění je často nedokáže z vody dokonale eliminovat, což vede k tomu, že se

běžně do povrchové vody a tím i dále do životního prostředí dostává nezanedbatelné množství léčiv a jejich metabolitů (Thomas a Hilton, 2004). Některé zdroje uvádějí, že celková účinnost čištění odpadních vod v případě léčiv není vyšší než 40 % (Castiglioni et al., 2006).

Vyšší koncentrace léčiv ve vodě, kterou do svých těl vstřebávají rostliny, mohou mít vliv na jejich vývoj, morfologické a fyziologické charakteristiky. Ve studii (Pino et al., 2016) byly zkoumány reakce rostlin na ošetření roztokem s rozpuštěnými léčivy ze skupin NSAID, beta-blokátorů, antibiotik a léků snižujících hladinu cholesterolu v krvi. Jako modelový zástupce vyšších rostlin byla použita *Lactuca sativa*, u které došlo k výrazné (45%) inhibici klíčení semen při použití kyseliny acetylsalicylové (1000 mg/L) a k mírné (cca 10%) inhibici při použití vyšších koncentrací ostatních testovaných léčiv. Kyselina acetylsalicylová zároveň spolu s propranololem (beta-blokátor) vedla k nejvýraznějšímu zkrácení primárního kořene a hypokotylu u klíčících rostlin. U některých rostlin byly po kontaminaci léčivy pozorovány také změny ve zbarvení a symetrii listů.

Ve výše zmíněné studii (Pino et al., 2016) byl zároveň zkoumán vliv léčiv na zástupce nižších rostlin, *Chlamydomonas reinhardtii*, protože negativní vliv kontaminace humánními léčivy se netýká pouze vyšších rostlin, ale i rostlin nižších, které jsou často primárními producenty ve vodních ekosystémech (shrnutí v Guo et al., 2015). U *Ch. reinhardtii* došlo k výrazné inhibici fotosyntézy zejména při kontaminaci kyselinou acetylsalicylovou, ibuprofenem, diclofenacem a paracetamolem.

V souvislosti s pozorovanými změnami v růstu a vývoji rostlin byl často pozorován příjem a akumulace léčiv v některých částech rostlinného těla (Herklotz et al., 2010). V případě druhu *Brassica rapa var. pekinensis*, běžně známého jako pekingské zelí, trvale zavlažovaného vodou s obsahem vybraných léčiv, byly naměřeny nejvyšší koncentrace přijatých léčiv v kořenové části rostliny. Listy zelí, které tvoří konzumovanou část rostliny, obsahovaly léčiv méně. U druhu *Brassica rapa* (brukev řepák) byla zjištěna přítomnost některých léčiv v celé rostlině včetně semen. Ve studii, která zelí i řepák zkoumala (Herklotz et al., 2010), byla pomocí floroglucinolového barvení potvrzena existence neporušené endodermis a Caspariho proužků, což vedlo autory k závěru, že léčiva se v rostlině mohla šířit přes neporušenou epidermis, pravděpodobně symplastickou cestou.

Jak jsou léčiva akumulována v jednotlivých částech rostliny i související míra poškození rostliny závisí také na způsobu kontaminace. Ve studii (Wu et al., 2010) byl zkoumán rozdíl v akumulaci léčiv aplikovaných v pevném hnojivu a závlivky vodou s

rozpuštěnými léčivy. Akumulace byla výraznější při aplikaci pevných hnojiv, rostliny kontaminované zálivkou naopak vykazovaly vyšší míru translokace léčiv v rostlinné tkáni. Tento poznatek je důležitý i díky tomu, že humánní léčiva mohou být součástí kalů z čističek odpadních vod. Kaly z odpadních vod se na území ČR buď používají přímo jako zemědělská hnojiva, jsou spalovány nebo ukládány na skládky. Volba způsobu likvidace nebo využití závisí na obsahu vybraných rizikových látek (Sbírka zákonů, 2001). Problém kontaminace a následné akumulace humánních léčiv v rostlinách, zejména v těch určených k přímé konzumaci nebo ke krmení hospodářských zvířat, má jako jedno z možných řešení úpravu pevných, kontaminovaných hnojiv pomocí torefikace a pyrolýzy. Pouhé vysušení tuhých odpadních materiálů je nedostatečné. Torefikace (220 °C - 320 °C) a hlavně pyrolýza (420 °C) výrazně přispívají k rozpadu molekul léčiv a tím snižují jejich obsah v hnojivu (Mercl et al, 2021).

Vliv humánních léčiv na produkci farmaceuticky významných sekundárních metabolitů léčivých rostlin nebyl zatím zkoumán. Problematice akumulace léčiv v rostlinném pletivu a léčivy způsobeného poškození rostlin je věnována výrazně vyšší pozornost.

2.2. Veterinární léčiva

K veterinárním účelům jsou často používány látky analogické k humánním přípravkům, mezi které opět patří široce užívaná léčiva ze skupin antibiotik, NSAID, analogů hormonů a antihelmintik. Většina výše popsaných jevů (poškození rostlin, akumulace léčiv nebo jejich metabolitů v pletivu), které se týkají humánních léčiv, je společná i pro léčiva veterinární (Bártíková et al., 2016).

Primárním zdrojem veterinárních léčiv a jejich metabolitů v prostředí je trus zvířat, která jimi byla cíleně léčena, nebo jim byla podána preventivně. Metabolismus chovných zvířat často nefunguje dokonale, při hnojení se dostává do půdy trus s vysokým obsahem neúplně metabolizovaných léčiv a v půdě poté dochází k vysoce komplexním reakcím, zahrnujícím sorpci, transport a degradační procesy. Všechny tyto reakce způsobují, že je velmi těžké předvídat, jak se konkrétní léčivo bude v životním prostředí chovat (Shayler et al., 2009).

Kromě přímého hnojení se rezidua veterinárních léčiv dostávají do půdy i díky splachování zvířecích exkrementů a jiného biologického odpadu z chovů do odpadní a povrchové vody, odkud se dále šíří do vodního prostředí (Sim et al., 2013).

Po kontaktu s veterinárními léčivy mohou rostliny tyto látky akumulovat a pomocí nespecifických drah i drah sekundárního metabolismu je biotransformovat na několik pro rostlinu pravděpodobně neškodných metabolitů. Dobrým příkladem tohoto jevu je zpracování antihelmintik rostlinou *Plantago lanceolata*, popsané ve studiích (Stuchlíková et al., 2017) a (Stuchlíková et al., 2018). Rostliny *Plantago lanceolata* pravidelně ošetřované antihelmintiky obsahují kromě původních molekul také minimálně 12 částečně metabolizovaných forem léčiva, jejich počet závisí na použitém antihelmintiku (zde flubendazol, fenbendazol a albendazol). Kontaminované rostliny nemusí jevit vizuální známky stresu způsobeného přítomností antihelmintik v rostlině, ovšem zvýšení obsahu antioxidantních enzymů (APX, CAT, GST, POX a SOD) spolu se zvýšením obsahu prolinu v rostlinných pletivech ukazuje na zvýšenou míru oxidačního stresu. Proces akumulace a biotransformace antihelmintik tedy může pro rostlinu představovat zvýšenou oxidační zátěž, obzvlášť, pokud probíhá dlouhodobě.

2.3. Soli

Rostliny nejčastěji přicházejí do kontaktu s vodnými roztoky solí. Jedná se o odpadní vodu kontaminovanou při zpracování ropných produktů, odpadní vodu z povrchových dolů a solných dolů, nebo o dešťovou vodu a tající led splachující posypové soli z vozovek a cest (Cook, 2002). Další, méně obvyklá příčina kontaminace rostlin solí je náhlé zaplavení mnoha hektarů rostlinných porostů při tsunami. Zde se nepříznivý vliv solí kombinuje s extrémním nárazovým zatopením a písčnými depozity (Dawson, 1994).

Nejlépe zdokumentovaný je vliv masově užívaných posypových solí ze skupiny chloridů, konkrétně chloridu vápenatého (CaCl_2), chloridu hořečnatého (MgCl_2), chloridu draselného (KCl) a chloridu sodného (NaCl). Přebytek těchto solí se akumuluje v půdě a díky osmóze, kdy se voda pohybuje ve směru snižujícího se osmotického potenciálu, přestává být voda v půdě snadno dostupná pro kořeny, může z nich být i odčerpávána do vnějšího prostředí. To vede k výrazné dehydrataci kořenů a tím k dysbalanci rostlinného vodního režimu. Kořeny rostlin vystavených zvýšené koncentraci soli v půdě mohou vykazovat změnu morfologie i změnu fyziologických funkcí. Některé skupiny rostlin absorbují velké množství chloridových iontů, které jsou transportovány do listů, kde se akumuluji a interferují s tvorbou chlorofylu. Narušení tvorby chlorofylu následně omezuje fotosyntetickou aktivitu rostlin, což vede k dalšímu zvýšení stresu (Cunningham et al, 2008).

Stres vyvolaný kontaminací solí může negativně ovlivňovat i celkovou produkci sekundárních metabolitů, což se děje například u šafránu, rostliny nepříliš tolerantní k výraznému zasolení (Moslemi et al., 2021).

Existují také skupiny rostlin, které se umí se zvýšenou koncentrací chloridových iontů vypořádat díky regulaci jeho příjmu kořeny, jiné dokážou přijatý nadbytek iontů sekvestrovat a tím zabránit jejich kontaktu s citlivými složkami rostlinného metabolismu (Flowers, 1985). U tolerantních rostlin, jako je například agáve, nemusí docházet k žádným viditelným projevům stresu, zároveň je možné zjistit změnu v koncentraci některých sekundárních metabolitů (u agáve zejména saponinů). Zda se obsah sekundárních metabolitů u agáve sníží, nebo naopak zvýší, závisí jak na koncentraci, tak na složení použité soli (Puente-Garza et al., 2021). Vztah mezi kontaminací solí, tolerancí k salinitě a změnou v sekundárním metabolismu (SM) je pravděpodobně velmi složitý a závislý na mnoha faktorech (druh rostliny, její tolerance, použítá sůl a její koncentrace).

Možným řešením nepříznivého vlivu kontaminace posypovými materiály na rostlinná společenstva je octan vápenato-hořečnatý (CMA) jako biodegradovatelná, pro rostliny téměř netoxická alternativa ke klasickým posypovým solím. Hlavním důvodem, proč CMA není celosvětově upřednostňována, je její vysoká cena (Akbar et al., 2006).

2.4. Nanomateriály

Za nanomateriály jsou dle ustanovení Evropské komise považovány objekty, které splňují alespoň jednu ze tří podmínek: mají alespoň jeden vnější rozměr o velikosti 1 - 100 nm nebo mají vnitřní či povrchové struktury ve stejném rozpětí velikostí, nebo je velikost jejich povrchu větší než $60 \text{ m}^2\text{cm}^{-3}$, a zároveň jsou samy větší než 1 nm. Tato kritéria splňují některé látky jak přírodního, tak technického původu (Göran, 2011). Objekty běžně označované jako nanočástice pak mají v řádu 1 - 100 nm všechny své rozměry. Nanomateriály a nanočástice jsou tvarově velmi různorodé, vzájemně se liší svou reaktivitou a případně i toxicitou pro živé organismy (Hamilton et al., 2009).

Interakce nanomateriálů s rostlinami je závislá na více faktorech - kromě složení, velikosti, typu povrchu a tvaru nanomateriálů záleží i na druhu rostliny a stavbě její buněčné stěny (Sabo-Attwood et al, 2012). Některé druhy reagují na kontaminaci nanomateriály jejich akumulací, u jiných k ní vůbec nedochází, pravděpodobně právě díky rozdílné stavbě a velikosti pórů v buněčné stěně (Judy et al., 2012).

Určité nanomateriály mohou být díky své tendenci k akumulaci v rostlinném pletivu využity jako nový typ hnojiv zvyšující příjem vody a nutrientů rostlinou, a tím zlepšující její růst a kvalitu semen (Hasaneen et al., 2016), nebo jako elicitory, kdy nanooxidy v nízkých koncentracích zlepšují produkci farmaceuticky významných metabolitů (Sharafi, 2013).

2.5. Mikroplasty

Jako mikroplasty označujeme plastové objekty různého tvaru o velikosti 100 nm - 5 mm. Tyto zlomky jsou do prostředí uvolňovány již v dané velikosti, nebo mohou vznikat fragmentací větších plastových objektů (Bergmann et al, 2015). Mikroplasty ve formě malých abrazivních částic jsou součástí mnoha čistících, průmyslových a kosmetických přípravků, které jsou po použití běžně splachovány s odpadní vodou do kanalizační sítě, odkud se dále mohou šířit do vodních ekosystémů (Zitko, 1991).

Kontaminace vodního prostředí mikroplasty někdy může u vodních vyšších rostlin snížit rychlost růstu, pravděpodobně díky jejich adhezi k povrchu sběrných orgánů (kořenů a listů), kterými rostliny získávají z vody minerální živiny potřebné pro růst. Přítomnost mikroplastů pravděpodobně nevede u vodních rostlin k významnému narušení fotosyntézy, zejména u rostlin, jako je *Salvinia cucullata*, u kterých listy splývají na hladině (Yu et al., 2021).

I u suchozemských rostlin, které se do kontaktu s mikroplasty dostávají díky hnojení půdy čistírenským kalem, způsobuje kontaminace zpomalení růstu. Mikroplasty se hromadí na povrchu kořenů a zároveň vstupují do kořenových buněk, kde pravděpodobně blokují struktury v buněčné stěně a ztěžují transport nutrientů do vyšších částí rostliny. Odpověď rostlinného metabolismu na stresovou zátěž se zpravidla projevuje zvýšením antioxidantních enzymů SOD, CAT a APX (Jiang et al., 2019). U vyšších, krytosemenných suchozemských rostlin pěstovaných na kontaminované půdě dochází také k hromadění mikroplastů v semenném obalu (testa), konkrétně v buněčných stěnách a dochází k omezení příjmu vody a později ke zpomalení klíčení semen (Bosker et al., 2019).

2.6. Těžké kovy

Jako těžké kovy označujeme prvky, kovy nebo polokovy s relativně vysokou atomovou hmotností a vysokým atomovým číslem. Některé zdroje uvádí, že těžké kovy mají

mít alespoň pětkrát vyšší hustotu, než voda. Do této skupiny se běžně řadí například zinek (Zn), měď (Cu), nikl (Ni), molybden (Mo), mangan (Mn), chrom (Cr), železo (Fe), olovo (Pb), kadmium (Cd), arsen (As), vanad (V) a rtuť (Hg), někdy jsou započítávány i méně obvyklé prvky, jako jsou astat (At) či lanthanoidy nebo aktinoidy (Tchounwou et al., 2012).

Část těžkých kovů (Cu, Zn, Mn, Ni a Fe) se dá zařadit mezi mikroprvky využívané rostlinami i živočichy (Wintz et al, 2002). Tyto prvky se účastní redoxních reakcí a přenosu elektronů při základních metabolických procesech v rostlině, mohou být součástí nezbytných enzymů jako jejich kofaktory (Mildvan, 1970).

Těžké kovy ve vysokých koncentracích působí na rostlinu toxicky, ovšem koncentrace, od které jsou již pro rostlinu toxické, se u jednotlivých prvků a rostlin značně liší. Obecně se předpokládá, že prvky, u kterých není známa žádná biologická funkce v organismu rostliny a neúčastní se metabolických procesů (například kadmium), jsou pro rostlinu toxické už při výrazně nižších koncentracích, než ty, které je rostlina v malé míře schopna využít (Sanità di Toppi a Gabrielli, 1999).

Za nejvíce nebezpečné díky častému výskytu a zároveň značné toxicitě pro rostliny a další živé organismy jsou dle ASTDR (Agency for Toxic Substances and Disease Control) považovány arsen (As), olovo (Pb), kadmium (Cd) a rtuť (Hg) (ASTDR Priority list, 2019). Těžké kovy se ve stopovém množství dostávají do prostředí přirozeně díky půdotvorným procesům, nebo ve větším množství jako odpadní produkt průmyslové činnosti. Mezi nejvýznamnější znečišťovatele patří metalurgická odvětví průmyslu, uhelné doly, doprava a jednotky nakládající s odpady, jako jsou skládky a spalovny, zejména ty, při jejichž konstrukci nebyly respektovány aktuální bezpečnostní a ekologické požadavky. (Tan et al, 2014; Fierens et al., 2007).

Hlavním a problémovým rezervoárem těžkých kovů v prostředí jsou půdy. Těžké kovy a jejich sloučeniny mohou v půdě přetrvávat v nezměněné formě velmi dlouho, narozdíl od organických látek u nich prakticky nedochází k biologické či chemické degradaci (Kirpichtchikova et al., 2006). Kontaminované půdy často bývají využívány k pěstování jedlých plodin a léčivých rostlin, u kterých může další zpracování představovat významná zdravotní rizika díky schopnosti některých rostlin akumulovat velké množství těžkých kovů ve své biomase (Zheljazkov et al., 2008).

Mimo půdu se rostliny setkávají i s těžkými kovy rozptýlenými v atmosféře a ve vodě. Rozptyl částic těžkých kovů je v atmosféře výraznější, než v půdě, zároveň mohou být částice unášeny na velké vzdálenosti od původního místa znečištění (Tan et al., 2014).

Akumulace těžkých kovů ve vodním prostředí ovlivňuje jak porosty vodních rostlin, tak i suchozemské rostliny zavlažované kontaminovanou vodou. Stejně jako v případě kontaminace půd může častá konzumace rostlin zavlažovaných výhradně kontaminovanou vodou představovat zdravotní riziko (Arora et al., 2008).

Studie sledující vliv kontaminace prostředí těžkými kovy na rostliny se zaměřují na obsah těžkých kovů v celé rostlině a jejích jednotlivých částech, na ukazatele nepříznivého vlivu kontaminace, jako jsou viditelné a měřitelné změny v rostlinné morfologii a změny v chemické kompozici rostlinných tkání a rostlinných produktů.

Stres vyvolaný kontaminací rostlin těžkými kovy se na buněčné a molekulární úrovni projevuje především významným zvýšením obsahu reaktivních forem kyslíku v rostlině. Reaktivní formy kyslíku (ROS) vznikají z molekulárního kyslíku v rostlinách především v mitochondriích, chloroplastech, a peroxisomech jako vedlejší produkt aerobního metabolismu (podrobněji popsáno v Apel a Hirt, 2004). Mezi ROS patří jak radikály (superoxid, hydroxylový radikál, hydroperoxyl, alkoxy, peroxy), tak neutrální formy (peroxid vodíku, singletový kyslík) (Karuppanapandian et al., 2011).

Běžně je v rostlině přítomna nízká hladina ROS, které se účastní signálních a strukturních funkcí a které podléhají citlivé regulaci, ovšem díky stresu je tato regulace narušena. Pokud je stres výrazný, nebo přetrvává po delší dobu, dochází k narušení rovnováhy vzniku a odstraňování ROS. Množství ROS stoupá vysoko nad fyziologickou hodnotu, překonává kapacitu běžných obranných mechanismů rostliny a vede k oxidativnímu poškození rostlinných buněk, pletiv a orgánů (AbdElgawad et al., 2016).

Nadbytek vysoce reaktivních ROS způsobuje poškození makromolekul přítomných v rostlinných buňkách, zejména lipidů, proteinů a nukleových kyselin.

Peroxidace lipidů (lipid peroxidation) vede k nežádoucí modifikaci lipidových komponent buněčných membrán, především nenasycených mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů. Membrány, na kterých k peroxidaci došlo, vykazují změny v propustnosti a aktivitě membránových enzymů, což dále vede k poškození rostliny na vyšší úrovni (Catalá a Díaz, 2016).

U proteinů způsobuje oxidativní stres fragmentaci peptidového řetězce, změny v náboji jednotlivých proteinů a vede ke karboxylaci. Výskyt karboxylovaných proteinů je nejvýznamnějším ukazatelem probíhající oxidace proteinů ve zkoumaném rostlinném pletivu (Møller a Kristensen, 2004)

V případě nukleových kyselin dochází při nadměrné přítomnosti hydroxylového radikálu k indukci jednovláknových zlomů v DNA a modifikaci jednotlivých bází (Hiramoto et al., 1996). Mechanismy poškození NK a dalších buněčných komponent shrnuje obr. 1.

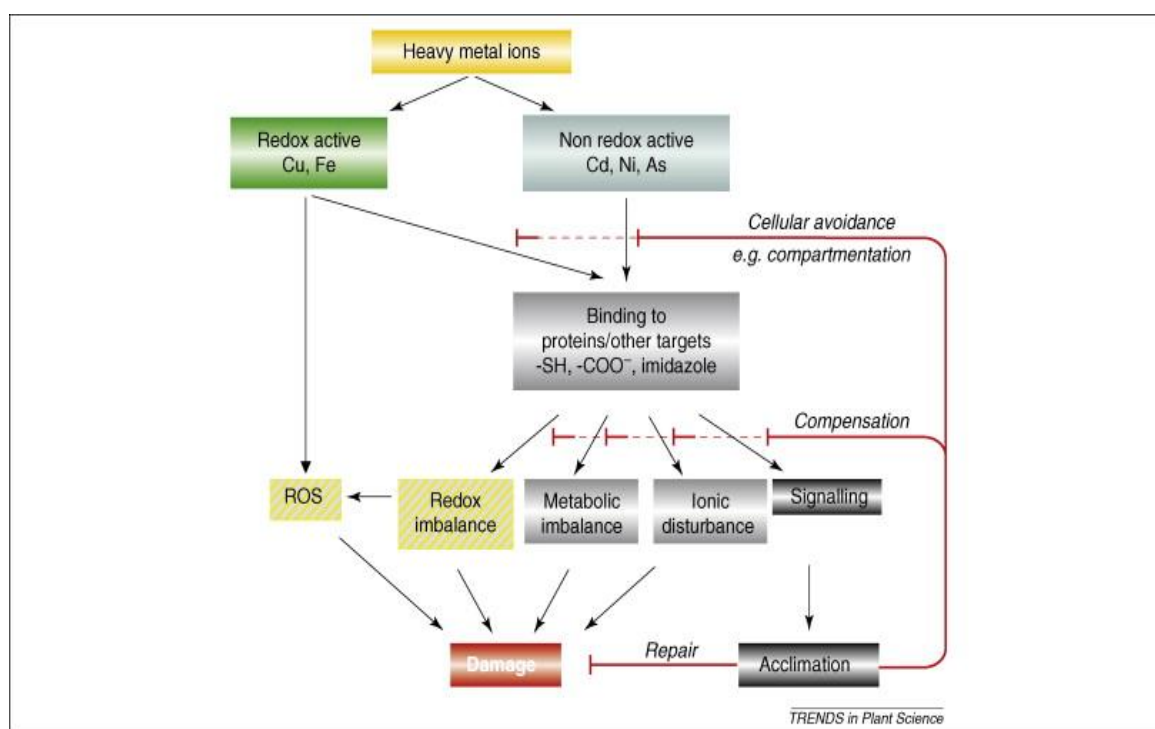
Vysoký obsah ROS je v rámci rostlinné stresové reakce regulován pomocí nízkomolekulárních antioxidantů a enzymatických zhašecích systémů, které jsou vzájemně provázány - viz obr. 2. Regulační sloučeniny najdeme u všech rostlin, jejich zastoupení ale může být druhově specifické a závislé na vnějších faktorech, jako je například nadmořská výška, ve které rostliny rostou (Wildi a Lütz, 1996).

Jako nejdůležitější rostlinné antioxidanty, které jsou zároveň sekundárními metabolity, jsou v literatuře uváděny flavonoidy a další fenolické a polyfenolické sloučeniny (Thabrew et al., 1998). Flavonoidy dokážou přímo neutralizovat ROS díky přenosu protonu na volný radikál za vzniku nereaktivní sloučeniny, tzv. zhašením volných radikálů (Burda a Oleszek, 1994). Antioxidační účinky flavonoidů se odvíjí od jejich chemické struktury a počtu hydroxylových skupin, které se mohou účastnit neutralizace ROS. Pro určení, které flavonoidy budou mít nejlepší antioxidační účinky *in vitro*, existuje několik empirických pravidel popisujících strukturní prvky, které nejvíce přispívají ke schopnosti flavonoidů vychytávat radikály (Wright et al., 2001). Kromě přímé interakce s radikály mohou také molekuly flavonoidů interagovat s různými antioxidačními enzymy a zvyšovat jejich účinnost (Cefarelli et al., 2006). Některé polyfenoly a flavonoidy přispívají k eliminaci ROS i díky své schopnosti chelátovat ionty mědi a železa. Navázání na ionty kovů vede k ke ztrátě reaktivity, chelátované ionty se v rostlinných buňkách nemohou jako katalyzátory účastnit Fentonovy reakce (Zhao et al, 2005). Konečným produktem této reakce je vysoce reaktivní hydroxylový radikál, který reaguje s většinou molekul v buňce, včetně DNA, u které díky oxidační reakci může navodit změnu konformace ze supercoiled na lineární. Účinek polyfenolů brzdících Fentonovu reakci tedy přispívá k ochraně DNA (Zhao et al, 2005; Qin et al., 2020).

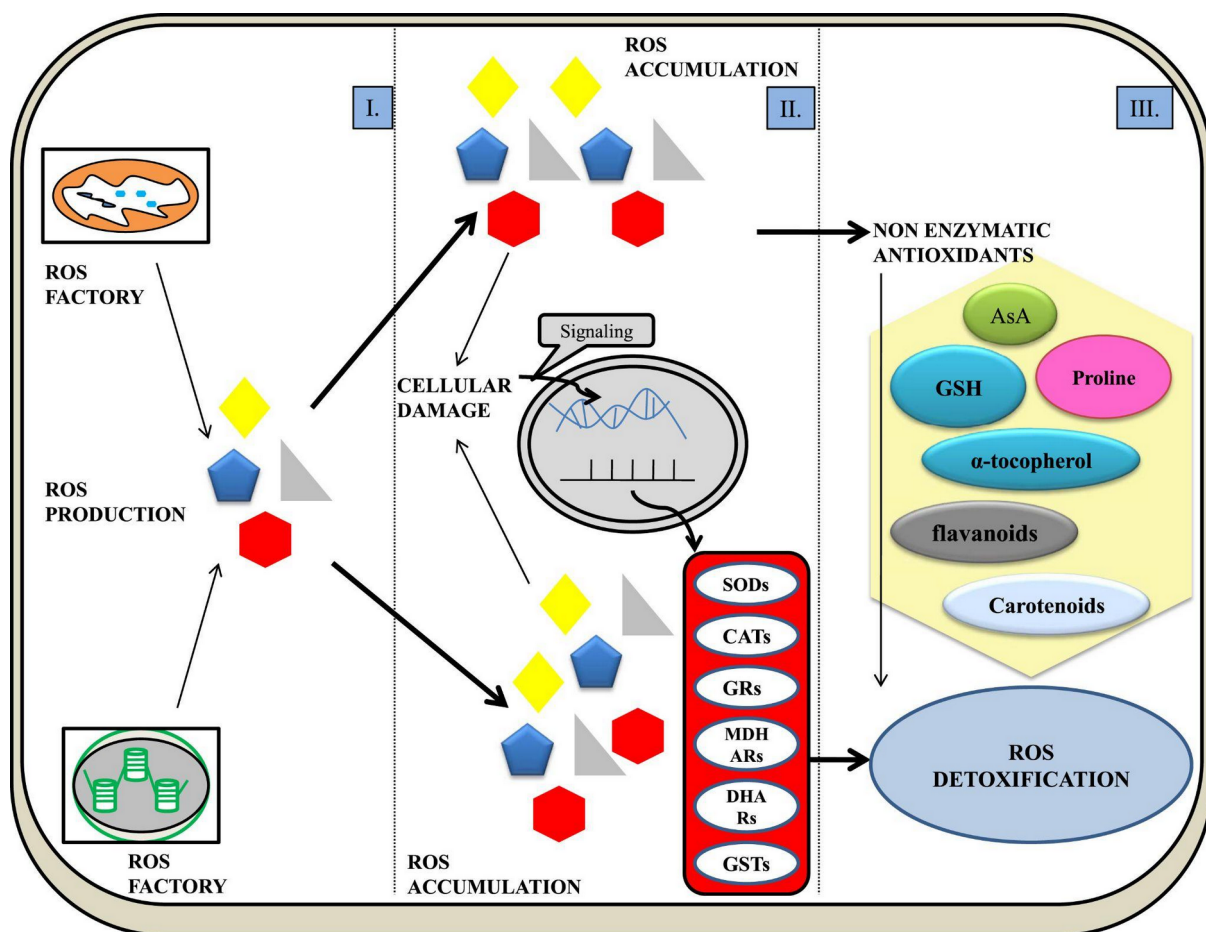
Při sledování působení těžkých kovů na rostliny jsou hlavními a dobře měřitelnými indikátory probíhajícího stresu a s ním souvisejícího zvýšení obsahu ROS hladiny antioxidačních enzymů (CAT, APX,...) a změna celkového obsahu polyfenolických látek. Zároveň je možné sledovat změnu v obsahu sloučenin sekundárního metabolismu vysoce specifických pro daný rostlinný druh, včetně těch, jejichž primární účel není spojován s odstraňováním ROS. Oxidativní stres, který byl vyvolán působením těžkých kovů, zřejmě

ovlivňuje syntetické dráhy vedoucí ke specifickým rostlinným metabolitům (Pitta-Alvarez et al., 2000). V případě léčivých rostlin se jedná o metabolity medicínsky významné.

Dostupné studie, které zpracovávají téma vlivu kontaminace těžkými kovy na změny v obsahu sekundárních metabolitů s medicínskými účinky, se věnují širokému spektru léčivých rostlin a zájmových metabolitů, často chemicky výrazně odlišných. Rostlinný materiál je použit jak ve formě celé rostliny, tak i in vitro kalusu a buněčných kultur, často je pokus opakován v různých fázích životního cyklu rostliny. Nejčastějším způsobem, jakým je zjišťována interakce těžkých kovů s rostlinnými sekundárními metabolity, je měření obsahu zájmového metabolitu před a po ošetření rostliny těžkým kovem, nebo měření ve srovnání s neošetřenou kontrolou. Tato měření bývají zpravidla doplněna o měření změn v hladinách antioxidačních produktů SM (polyfenoly), antioxidačních enzymů (APX a další), případně o morfologická měření, která obsah chemických látek dávají do kontextu s celkovým stavem rostliny.



Obr. 1: Základní mechanismy poškození rostlin kontaminací těžkými kovy. Redoxně aktivní těžký kov přímo spouští produkci ROS, ostatní k jejich produkci přispívají nepřímo díky vazbám s proteiny, thioley, karboxykyselinami a dalšími látkami přítomnými v rostlinných buňkách, u kterých dochází k narušení jejich běžné funkce. Tato narušení dále vedou ke změnám v buněčném mechanismu, nebo spouští signální řetězec, který vede k opravě poškozených molekul, zvýšené aktivitě obranného antioxidačního systému nebo snížení obsahu těžkého kovu v buňce (převzato z Sharma a Dietz, 2009)



Obr. 2: Proces vzniku a neutralizace ROS v buňce: I) ROS factory = místa vzniku ROS (především chloroplast, mitochondrie), II) oxidativní stres stimuluje produkci antioxidantních komponent, III) detoxifikace pomocí enzymatických (SOD, CAT, GPX, MDHAR, GST, DHA) a neenzymatických (prolin, flavonoidy, karotenoidy, tokoferol, GSH) antioxidantních sloučenin (převzato z Choudhary et al., 2020).

3. Část druhá - vliv těžkých kovů na obsah sekundárních metabolitů u vybraných druhů rostlin

Z velkého množství kontaminantů, se kterými se rostliny mohou setkat, bych se v této práci chtěla nejpodrobněji zaměřit na skupinu těžkých kovů. Těžké kovy patří mezi dlouho známé a lépe prozkoumané skupiny kontaminantů. Jejich anorganické sloučeniny mají jednodušší složení než kontaminanty ze skupin organických látek a i díky tomu je v literatuře snazší nalézt více studií zabývajících se vlivem kontaminace jednou konkrétní sloučeninou (např. solí mědi) na jeden rostlinný druh. Vzhledem k tomu, že ne všechny rostliny reagují na kontaminaci těžkými kovy stejně, dokonce ani jedna rostlina nemusí reagovat stejně na dva kovy nebo dvě jeho sloučeniny, rozdělila jsem další text podle konkrétních rostlin a toho, co o jejich interakci s kovy víme. Text doprovází jako příloha i tabulka (Tab.1), která shrnuje další mně známé studie na jiných druzích rostlin, které v rámci rozsahu práce nebylo možné podrobněji popsat.

3.1. Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*)

Z rodu třezalka je medicínsky významná především třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*), fytofarmakum, které je podáváno v různých formách (nálev, extrakt, tablety) dlouhodobě jako antidepresivum k léčbě mírných případů deprese či krátkodobě při náhle vzniklých úzkostných stavech (Mennini a Gobi, 2004). Hlavními účinnými látkami obsaženými v sušině třezalky jsou především hypericin a hyperforin. Hypericin je řazen do skupiny naftodiantronů, hyperforin patří mezi floroglucinoly (Vacek et al., 2007).

U běžně dostupných přípravků ze sušiny třezalek se již v minulosti vyskytly obavy o jejich zdravotní nezávadnost, vzhledem k tomu, že v třezalkách volně rostoucích na místech kontaminovaných těžkými kovy se obsah těžkých kovů v sušině rostliny často pohyboval vysoko nad doporučeným limitem (Đurović et al., 2013; Zheljazkov et al., 2008). Třezalky jsou velmi tolerantní ke kontaminaci těžkými kovy, které mohou ve svém pletivu akumulovat v množství toxickém pro savce a přitom samy zůstat životaschopné. Obzvláště výrazná akumulace nastává u třezalek rostoucích v půdách na serpentinovém podloží (Pavlova et al, 2015).

Obsah těžkých kovů v rostlinných extraktech se od obsahu v celých rostlinách a v sušině může lišit díky použitým solventům, jako jsou voda nebo ethanol (Guirguis, 2012) a

odlišné rozpustnosti různých forem kovů. Zároveň ale může docházet k tvorbě komplexů těžkých kovů se sekundárními metabolity, zde hypericinu se železem a rutinou s železem, mědí a olovem, což může vést k nežádoucí změně terapeutických vlastností rostlin (Afanas'eva et al, 2001).

Při studiu vlivu kontaminace u volně rostoucích rostlin nasbíraných v různých lokalitách je často možné naměřit zvýšený obsah více těžkých kovů v sušině současně, v kontrolovaném prostředí studií je pak vliv těžkých kovů zkoumán zpravidla jednotlivě. Kovy jsou rostlinám podávány nejčastěji ve formě solí, hydrátů, oxidů a výjimečně, tam, kde je to možné (např. olovo) ve formě prvku.

Přítomnost čistého olova jako kontaminantu v půdě vede u *Hypericum perforatum* ke změnám v celkovém obsahu hypericinu v sušině. Pokud je olovo v půdě přítomno v množství vyšším, než v kontrolní, nekontaminované zemině, dochází v třezalkách k postupnému navýšení obsahu hypericinu až do maximální hodnoty, které je dosaženo při koncentraci olova 600 mg/kg. Následné přidání olova už nevede k dalšímu navýšení obsahu hypericinu, při růstu třezalek v extrémně kontaminovaných zeminách naopak nastává jeho pokles (Zarinkamar et al., 2013). Změny v obsahu sekundárního metabolitu doprovází široká škála morfologických změn v rostlinném pletivu, které ukazují na schopnost rostliny vypořádat se s kontaminací olovem díky jeho akumulaci v některých pletivech (zejména v primární buněčné stěně kolenchymu a sekundární stěně xylemu). Dochází také ke změnám v otevírání průduchů a v depozici kutikulárních vosků. Většina stomat rostlin kontaminovaných olovem zůstává zavřená, u těchto rostlin také probíhá depozice neobvykle silné vrstvy kutikulárních vosků na povrchu listů. Zdá se pravděpodobné, že koncentrace olova 600 mg/kg je hranicí, na které obranné rostlinné mechanismy začínají být plně vyčerpány a rostlina začíná chřadnout (Zarinkamar et al., 2013),

Podobný trend jako u kontaminace olovem byl pozorován i v případě působení chromu (ve formě dichromanu draselného, $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) na sazenice třezalek. Se zvyšující se koncentrací těžkého kovu a délkou trvání jeho působení na rostlinu docházelo i ke zvýšení obsahu sekundárních metabolitů hypericinu, pseudohypericinu a protopseudohypericinu. Maximální navýšení se lišilo mezi jednotlivými metabolity, k nejvýraznějšímu přírůstku došlo u protopseudohypericinu, hypericin naopak svou koncentraci měnil nejméně. (Trillini et al., 2006)

Kontaminace niklem ve formě NiNO_3 působí u sazenic třezalek pěstovaných in vitro na médiu výrazné snížení akumulace sekundárních metabolitů hypericinu, pseudohypericinu a hyperforinu. V případě hypericinu šlo o dvacetinásobné snížení obsahu, pseudohypericin

byl snížen patnáctinásobně oproti kontrolním rostlinám a hyperforin klesl pod detekovatelnou hodnotu. Narozdíl od dříve popsané kontaminace olovem a chromem se v případě niklu neobjevila žádná koncentrace, při které by docházelo ke zvýšení produkce zkoumaných sekundárních metabolitů. Třezalky vystavené niklu tento kov ochotně akumulují ve vysokých koncentracích, ovšem nikl představuje pro rostlinu velmi výraznou zátěž. Nepříznivý účinek niklu zřejmě vyvolává jeho vysoká mobilita v rostlinném pletivu, která pro rostlinu komplikuje využití jejích běžných obranných mechanismů. (Murch et al., 2003)

Zajímavým pohledem na interakci třezalek s těžkými kovy ve formě nanočástic je studie (Sharafi, 2013), která nebyla provedena na celých rostlinách, ale na suspenzních buněčných kulturách a těžké kovy (Zn a Fe) zde byly dodány ve formě nanooxidů. Nanooxidy (ZnO a Fe₃O₄) v nízkých koncentracích (0 - 150 ppb) byly přidány do média, odkud byly vstřebány do rostliny přes buněčnou stěnu. Kultury ošetřené nanooxidy sledovaly stejný trend, jako například celé rostliny ošetřené olovem - v přítomnosti nižších koncentrací kontaminantu se obsah sledovných sekundárních metabolitů (hypericin, hyperforin) zvyšoval, u vyšších zkoumaných koncentrací (kolem 150 ppb) znovu klesl. Autor studie na základě výsledků navrhuje nanooxidy v nízkých koncentracích jako vhodné elicitory pro farmaceutickou produkci účinných třezalkových metabolitů. Zda jsou nanooxidy vhodnějšími elicitory než běžné formy těžkých kovů, zatím nebylo jednoznačně určeno. Vzhledem k nedostatku informací o možné akumulaci a toxicitě nanooxidů v sušině třezalek bude nutný další výzkum před uvedením elicítace pomocí nanooxidů do praxe.

3.2. Barvínkovec růžový (*Caranthus roseus*)

Narozdíl od třezalek, které produkují účinné metabolity v relativně velkém množství i za běžných podmínek, barvínkovec růžový (*Caranthus roseus*) obsahuje víc než 130 terpenoidních indolových alkaloidů, ovšem jen ve velmi omezeném množství. Z široké škály produkovaných alkaloidů je několik vysoce ceněných pro své antineoplastické a tumorsupresivní účinky. Jde především o anhydrovinblastin, vinblastin, vincristin a ajmalicin (Almgaro et al., 2015). Jejich nízké množství v rostlině a tím i vysoká cena extrakce a léčebného použití jsou překážkou, kterou se vědci snaží překonat pomocí elicítace různými biotickými i abiotickými faktory, jako jsou přítomnost mikroorganismů a jejich metabolitů (Maqsood a Abdul, 2017), přítomnost některých typů organických látek, např. chitosanu (Pliankong et al., 2018), analogů rostlinných hormonů, nanočástic (Shanin, 2018) a samozřejmě také přítomnost těžkých kovů v růstovém médiu.

Ve studii (Khataee, 2019) byl sledován vliv chromu ($K_2Cr_2O_7$) na obsah vincristinu a vinblastinu. Chrom byl sledován jak sám, tak v kombinaci s methyljasmonátem (látko odvozená od kyseliny jasmonové, fytohormonu). Z výsledků studie vyplynulo, že ošetření rostlin nízkou koncentrací Cr vedlo k výraznému zvýšení obsahu pouze u vincristinu, naopak pokud byly rostliny ošetřeny jak chromem, tak methyljasmonátem, byl zvýšen obsah všech zájmových metabolitů. Chrom a methyljasmonát prokázaly synergický účinek při záměrné elicitaci. Zvýšení obsahu dvou medicínsky významných metabolitů doprovázelo i zvýšení celkového obsahu polyfenolů, karotenoidů a flavonoidů. To ukazuje na probíhající odpověď rostliny na oxidativní stres způsobený těžkým kovem, kdy zejména flavonoidy a další polyfenoly hrají významnou roli v obraně rostliny před ROS (Cefarelli et al., 2006). Zvýšení obsahu obranných antioxidačních metabolitů však fungovalo jen u koncentrace kontaminantu nižší než 100 μ M. Když byl rostlině dodán chrom v této a vyšší koncentraci, jeho působení již bylo pro rostlinu toxické, a vedlo ke snížení jak objemu zájmových metabolitů, tak celkových fenolů, karotenoidů a flavonoidů. Z toho vyplývá, že rostlina se za pomoci změn v sekundárním metabolismu efektivně vypořádá s kontaminací pouze do určité koncentrace kontaminantu, pak její tolerance prudce klesá - sleduje podobný trend, jako kontaminace olovem u třezalek. Tento trend je možné sledovat u více těžkých kovů, ale i u elictorů jiné chemické povahy, například u dříve zmíněného jasmonátu (Lee-Parsons et al., 2004; Shanin, 2018).

Další studie (Kapiel et al., 2010) zaměřená na záměrnou elicitaci obsahu vincristinu a vinblastinu v kulturách proběhla s organickými i anorganickými elicitory, mezi anorganické byl zařazen i vanad. Vanad se příliš často nevyskytuje mezi zkoumanými těžkými kovy, přesto je možné se s ním jako s kontaminantem setkat. V této studii se ukázaly biologické elicitory jako výrazně úspěšnější, ale i u samotného vanadu došlo k měřitelnému zvýšení hladin vincristinu a vinblastinu. Zdá se, že přítomnost vanadu vede ke zvýšení koncentrace spíše extracelulárních alkaloidů, než intracelulárních. K vysvětlení tohoto jevu autor navrhuje hypotézu, že díky působení vanadu dochází k poškození buněčné stěny a zejména plazmatické membrány, což vede ke změnám v jejich propustnosti a tím k vyšší sekreci alkaloidů z buňky do média.

Výrazný vliv na interakci mezi sekundárním metabolismem barvínkovce a kontaminací těžkými kovy má u celých rostlin i to, v jaké morfoloické části (kořen, stonek, list) probíhá akumulace těžkých kovů a produkce sekundárních metabolitů (Srivastava, 2010). Při ošetření celých rostlin *in vitro* stejnou koncentrací (5mM) kadmia ($CdNO_3$),

manganu ($MnCl_2$), olova ($PbNO_3$) a niklu ($NiCl_2$) a následném porovnání rozdílu mezi elicitací v kořenu, stonku a listy bylo zjištěno, že celkový obsah alkaloidů se po ošetření těžkými kovy signifikantně zvýšil jen u kořenových alkaloidů. Při měření konkrétního obsahu ajmalicinu (spolu se serpentinem patří mezi kořenové alkaloidy), však bylo zjištěno, že v kořenech ošetřených Pb se obsah ajmalicinu téměř nezměnil oproti kontrole, a v kořenech ošetřených Cd, Mn a Ni se dokonce snížil. Oproti tomu obsah serpentinu v kořenech se 2 až 3-násobně zvýšil. Snížení obsahu ajmalicinu a dvojnásobné zvýšení obsahu serpentinu může dle autora studie ukazovat na vliv těžkých kovů na biosyntézu prekurzorů ajmalicinu a serpentinu a konverze mezi jednotlivými metabolity (Srivastava, 2010).

Vliv kadmia na produkci alkaloidového metabolitu ajmalicinu byl zkoumán na buněčných kulturách barvínkovce v různých růstových fázích (Zheng a Wu, 2004). U buněčných kultur je růstová fáze zásadním faktorem ovlivňujícím interakci těžkého kovu nebo jiného elicitoru se sekundárním metabolismem, vliv těžkého kovu nezávisí jen na jeho koncentraci v médiu, ale i na fázi buněčného cyklu, v jaké se kultura nachází v době ošetření (Rattan et al., 2021). U rostlin ve střední fázi exponenciálního růstu se do koncentrace 0,1 mM Cd obsah ajmalicinu zvyšoval, od této koncentrace a vyšší se naopak začal snižovat. Optimální koncentrací Cd pro elicitaci ajmalicinu přitom byla 0,4 mM. Ve stacionární fázi růstu byl sledován podobný trend, ovšem s jinými hraničními hodnotami, kdy ke zvyšování obsahu ajmalicinu docházelo až do koncentrace 0,5 mM Cd, zároveň se ale zdálo, že buňky se s Cd stresem vypořádávají hůře, při vyšších koncentracích jsou výrazně poškozené, byla častěji pozorována jejich lyze. Možným vysvětlením, proč růstová fáze ovlivňuje toleranci buněčných kultur ke kadmiu, je odlišná dostupnost prekurzoru ajmalicinu, tryptofanu, v různých růstových fázích. Kadmium zřejmě zvyšuje hladinu enzymu tryptofandekarboxylázy (TDC), která konvertuje tryptofan na tryptamin, další prekurzor ajmalicinu. Zvýšená hladina TDC vede k vyšší konverzi tryptofanu na tryptamin, což přispívá k vyšší sekreci ajmalicinu při vyšších koncentracích kadmia (Zheng a Wu, 2004).

Z dosud publikovaných studií vyplývá, že pokud by měly být těžké kovy využity jako elicitory pro komerční produkci, bylo by vhodné používat je pouze v nízkých koncentracích, případně v kombinaci s biotickými elicitory, jako je jasmonát.

3.3. Kamptotéka ostrolistá (*Camptotheca acuminata*)

Podobný problém jako u barvínkovce, tedy nízkou produkci medicínsky významného sekundárního metabolitu za běžných podmínek, řeší věda i u rostliny *Camptotheca*

acuminata. Tato rostlina je zdrojem camptothecinů, látek ze skupiny terpenoidních indolových alkaloidů, z nichž nejvýznamnější je pentacyklický camptothecin (CPT), 10-hydroxycamptothecin (10-HCPT) a ajmalicin, stejný metabolit jako v barvínkovci. Camptothecin má silné tumorsupresivní účinky, na jeho základě byly syntetizovány jeho analogy irinotecan a topotecan, schválená a dnes běžně užívaná chemoterapeutika určená k léčbě nádorových onemocnění (Landgraf et al., 2020).

Prvním důležitým bodem při hledání ideální metody elicitace CPT a 10-HCPT bylo zjištění, která rostlinné pletivo má nejvyšší obsah hledaného metabolitu. Rozložení koncentrace alkaloidů v rostlinné tkáni bylo značně nerovnoměrné, nejvyšší obsah CPT a 10-HCPT byl nalezen v poupatech, semenech a v kalusové kultuře odvozené od pupat. Přidání Cu a Mn (ve formě CuCl_2 a MnCl_2) ke kalusovým kulturám vedlo ke zvýšení obsahu CPT přibližně o polovinu, přidání Pb (ve formě PbCl_2) naopak vedlo k jeho signifikantnímu snížení. Působení Cu, Mn a Pb nemělo na hladinu 10-HCPT žádný prokazatelný vliv, na obsah 10-HCPT měly vliv spíše jiné testované elicitory (UV, zvýšení obsahu vody v pletivu, organické kyseliny) (Pi et al., 2010).

Zvýšení obsahu CPT po přidání sloučenin mědi do růstového média potvrzuje i studie (Pan et al., 2004), kde se měď (ve formě CuSO_4) ukázala jako druhý nejlepší elicitor hned po kobaltu (CoCl_2). Zatímco kobalt zvýšil výnos CPT až o 95 %, přidání mědi a molybdenu (Na_2MoO_4) vedlo k 70 - 87% zvýšení obsahu CPT v suspenzní buněčné kultuře. Kromě změn v obsahu CPT stimulovalo přidání Co, Cu, Mo do média buněčný růst, celkový efekt elicitorů na kulturu byl pozitivní. Na základě této informace bylo autorem studie navrženo a otestováno ideální složení elicitorů CPT pro suspenzní kulturu. Výsledkem elicitace touto směsí bylo 20% zvýšení hmotnosti biomasy, 209% zvýšení celkového obsahu camptothecinu a 273% zvýšení výtěžku extrahovaného camptothecinu.

Jako další do budoucna slibné komerční řešení byla navržena elicitace CPT a ajmalicinu pomocí vanadu ve formě hydrátu vanadylsulfátu ($\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) (Smith et al., 1987). Vanadylsulfát aplikovaný na suspenzní kultury v bioreaktoru vedl ke zvýšení produkce CPT i ajmalicinu u většiny testovaných buněčných linií včetně těch, které v běžných podmínkách produkovaly zcela minimální až stopové množství sledovaných metabolitů. Míra zvýšení produkce alkaloidů se lišila mezi jednotlivými buněčnými liniemi, stejně jako optimální množství elicitoru pro maximální výtěžek. Kromě důležitosti volby buněčné linie nejvýhodnější pro elicitaci je pro optimalizaci celého procesu zásadní správné načasování přidání vanadu ke kultuře, vzhledem k tomu, že reakce na přidání VOSO_4 se v

různých růstových fází kultury liší. Jako optimální se jeví přidání VOSO_4 v době, kdy se kultura nachází ve stacionární fázi růstu.

Vzhledem k tomu, že konečný výsledek procesu elicitace vanadem závisí na množství proměnných, jako je typ buněčné kultury, růstová fáze a koncentrace použitého elicitoru, je pravděpodobné, že mechanismus elicitace není jen jednoduchou reakcí na stres, ale může teoreticky zahrnovat i interakce mezi vanadem a rostlinnými enzymy, jejichž hladiny kolísají v průběhu růstového cyklu. Již byla zaznamenána interakce mezi vanadem (ve formě oxidu vanadičného, V_2O_5) a živočišným enzymem G3PDH s prostřednictvím thiolové skupiny v aktivním místě (Crans a Simone, 1991).

Kromě studií prováděných na kulturách z konkrétních rostlinných tkání byl realizován i výzkum na celých rostlinách. Celé hydroponicky pěstované rostliny byly ošetřeny tekutým médiem s přidavkem iontů mědi, zinku a stříbra. Těžké kovy zde vždy vedly ke zvýšení obsahu CPT v sušině, ovšem k signifikantnímu snížení hmotnosti biomasy suchých rostlin (Zeng et al., 2017). Narozdíl od dříve zmíněných buněčných kultur, u kterých přítomnost mědi měla kromě zvýšení obsahu CPT pozitivní vliv i na růst a hmotnost kultury, se u celých rostlin projevila výrazná inhibice růstu. Vzhledem k tomu, že snížená hmotnost rostlinné sušiny vede při zpracování ke sníženému výtěžku CPT, je elicitace u hydroponicky pěstovaných rostlin neefektivní ve srovnání s buněčnými kulturami v bioreaktorech.

3.4. Mák setý (*Papaver somniferum*)

Mák setý, *papaver somniferum*, je jednou z nejdéle známých rostlin s medicínami a omamnými účinky. Specializované buňky máku produkují latex, který obsahuje několik desítek sekundárních metabolitů ze skupiny alkaloidů, mezi které patří i známé látky jako papaverin, morfin, kodein, narcotin, berberin a thebain (Frick et al., 2005).

Obsah jednotlivých alkaloidů v rostlině je ve srovnání s dříve zmíněnými rostlinami *Caranthus* a *Camptotheca* relativně vysoký, při extrakci kyselinou octovou a následné HPLC chromatografické separaci se objem alkaloidů pohybuje se až v rámci desetin procenta celkového objemu extraktu. Obsah alkaloidů se liší mezi jednotlivými kultivary a lokalitami, morfin zpravidla výrazně převyšuje obsah ostatních alkaloidů, narcotin je naopak zastoupen nejméně (Stránská et al., 2013; Lachman et al., 2006).

V případě kontaminace kadmiem dochází u většiny kultivarů máku ke zvýšení produkce morfinu a narcotinu v semenech, pozitivní korelace byla zjištěna i u morfinu a narcotinu v makovicích. Kontaminace zinkem vedla k signifikantnímu zvýšení obsahu

narcotinu v semenech máku, naopak v makovicích byl vliv kontaminace na obsah alkaloidů negativní, došlo k výraznému snížení obsahu kodeinu a papaverinu (Lachman et al., 2006). Výrazný vliv kontaminace těžkými kovy na produkci alkaloidů v semenech je zajímavý i vzhledem k výsledkům studie (Chizzola, 2007), dle které jsou semena máku primárním místem, kam rostlina směřuje kadmium a další těžké kovy, kterými byla kontaminována. Semena máku představují jen 2,5 - 12,9 % celkové váhy sušiny z nadzemní části rostliny, přesto v sobě akumulují až 42 % kadmia přijatého rostlinou.

Zvýšená biosyntéza alkaloidů v semenech za přítomnosti Cd a Zn může být spojena se schopností molekul alkaloidů (zejména morfinu se dvěma hydroxylovými skupinami) vytvářet komplexy s kovy. Stejný proces může probíhat už u prekurzorů alkaloidů, které obsahují o-dihydroxy skupinu, což jsou v případě máku dopamin a kyselina 3- (3,5-dihydroxyfenyl)propanová (DHPPA) jako prekurzory papaverinu, dopamin a L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) pro morfin a (S)-norcoclaurin a (R)-retikulin pro kodein (Lachman, 2006).

3.5. Pelyněk roční (*Artemisia annua*)

Pelyněk patří mezi rostliny s neobvykle vysokou tolerancí ke kontaminaci těžkými kovy a jejich akumulaci ve své biomase. Je považován i za možný prostředek k fytoremediaci půd kontaminovaných některými těžkými kovy (WHO, 2006). Pokud není použita k fytoremediaci, může být *Artemisia annua* využívána jako zdroj artemisininu a jeho derivátů, látek s antimalarickými účinky. Artemisin patří do skupiny seskviterpenoidních laktonů, v rostlině je syntetizován z prekurzoru, kyseliny dihydroartemisinové (Krishna et al., 2008).

V případě rostlin hydroponicky pěstovaných v médiu s přidaným arsenem (ve formě $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) je těžký kov nejdříve zadržen a akumulován v kořenovém systému rostliny. Kořenový systém jeví známky poškození až při vysokých koncentracích arzenu v růstovém médiu, a výzkum naznačuje, že při dlouhotrvající a výrazné kontaminaci dochází k translokaci arsenu z kořenů dál do stonku (Rai et al., 2011). Přítomnost arsenu v rostlině vede ke zvýšení objemu její biomasy a délky kořenů, to vše až do hraniční hodnoty koncentrace 4,5 mg $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ na litr média. Při této hodnotě se již začíná na rostlině projevovat negativní vliv kontaminace. Tato koncentrace zpomaluje rychlost fotosyntézy a snižuje obsah chlorofylu v listech, zároveň se zvyšujícím se stresem dochází ke stimulaci aktivity antioxidantních enzymů, což je zcela v souladu s dřívějšími poznatky o rostlinné stresové fyziologii. Při opakování pokusu s celými rostlinami v půdě byly potvrzeny závěry z měření

provedených na hydroponicky pěstovaných rostlinách. Zajímavým zjištěním dle autora bylo, že rostliny pěstované v kontaminované půdě během prvních sedmi dní vypadaly výrazně zdravěji, než ty kontrolní (Rai et al., 2011).

Čím vyšší koncentraci As v půdě je rostlina vystavena, tím vyšší je zjištěný obsah artemisinu bez ohledu na kultivar. Rozdíl mezi jednotlivými kultivary pelyňku spočívá v míře zvýšení obsahu artemisinu, některé indické kultivary produkují více artemisinu i při nižší koncentraci kontaminantu. Trend pozitivní korelace obsahu artemisinu a koncentrace As v půdě je možné sledovat až do hraniční hodnoty 45mg $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ na kilogram půdy, kdy je produkce artemisinu maximální, ovšem fytotoxicita arsenu již silně poškozuje rostlinné buňky a tím negativně ovlivňuje životaschopnost rostliny (Aftab et al., 2019). Přítomnost As stimuluje syntézu sekundárního metabolitu artemisininu, seskviterpenoidu s antimalarickými účinky. U kontaminace arsenem bylo potvrzeno, že arsen spouští v rostlinných buňkách zvýšenou expresi genů zodpovědných za syntézu artemisinu a zároveň urychluje konverzi jeho prekursoru, kyseliny dihydroartemisinové na samotný artemisinin díky zvýšení produkce ROS. Především H_2O_2 hraje v syntéze artemisinu významnou roli (Rai et al., 2011).

Na rozdíl od arsenu je kontaminace rostliny chromem velmi nevýhodná z hlediska elicitace. Chrom, především ve své šestivazné formě, je vysoce mobilní v rostlinném pletivu, neprobíhá jeho akumulace v kořenech. Obsah artemisinu v rostlinách kontaminovaných chromem je velice nízký (Paul a Shakya, 2013).

Kontaminace kadmíem vyvolává zvýšení nebo snížení obsahu artemisinu v hydroponicky pěstované rostlině v závislosti na koncentraci kontaminantu a době jeho působení. Rozdíly v obsahu artemisinu u rostlin ošetřených různou koncentrací kadmia ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) jsou měřitelné již v prvních dvanácti hodinách po aplikaci kadmia, kdy u nízkých koncentrací kadmia dochází k mírnému zvýšení obsahu artemisinu a obsah artemisinu se poté výrazně zvýší po uplynutí přibližně šesti dní. Vysoké koncentrace kadmia vedou k nižšímu nárůstu obsahu metabolitu krátce po kontaminaci. Po uplynutí přibližně dvou týdnů je ve všech případech obsah artemisinu nižší než u kontrolních rostlin (Li et al., 2012). Pokud by kadmium mělo být použito jako elicitor, muselo by být podáváno v nízkých koncentracích po přiměřenou dobu. Jako ideální trvání a koncentrace kadmia pro elicitaci bylo navrženo 60 - 120 mM kadmia (ve formě $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) na litr růstového média po dobu tří dnů. U koncentrace kadmia 120 mM/l docházelo druhý den k navýšení transkripce genů kódujících klíčové enzymy, které odpovídají za syntézu prekursorů artemisinu (Zhou et al., 2017).

Měď je považována za esenciální živinu, ale zvyšuje produkci artemisininu pouze za předpokladu, že je přítomna v koncentraci nižší než 10 mg mědi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) na kilogram zeminy. Při hraniční koncentraci 10 mg/kg je naměřena maximální délka kořenů, velikost a hmotnost suché rostliny. Všechny hodnoty ovšem prudce klesají, pokud je koncentrace dále zvýšena. Obsah artemisininu sleduje stejný trend, nejvyšší hodnoty dosahuje při koncentraci mědi 10mg/kg a poté klesá, příliš vysoká koncentrace mědi má na jeho syntézu inhibiční efekt (Zehra et al., 2020).

Elicitace artemisininu pomocí hliníku (ve formě zálivky s rozpuštěným AlCl_3) probíhá velmi podobně, jako v případě kadmia a mědi, nízká koncentrace kontaminantu v půdě vede ke zvýšení produkce artemisininu, po překročení hranice, kterou v případě hliníku představuje koncentrace 0,1 mM, obsah opět klesá a zároveň se projevuje silná fytotoxicita hliníku.. Jakákoliv koncentrace hliníku v půdě negativně ovlivňuje velikost rostliny, suchou hmotnost a zejména délku kořenů, nejvyšší koncentrace hliníku vede k nejvýraznějším změnám. U všech rostlin došlo ke snížení fotosyntetické aktivity a obsahu chlorofylu (Idrees, Moinuddin, 2010).

Při pěstování pelyňku za účelem produkce fytoterapeutik by měla být za všech okolností věnována pozornost půdě, ve které rostlina roste a vodě, kterou je zavlažována. Díky jeho schopnosti hyperakumulace je nevhodné pěstovat pelyněk na silně kontaminovaných půdách, pokud má být využit k produkci léčiv. Pokud je cílem pěstování pelyňku pouze fytofarmacie, je tato rostlina ideálním řešením pro silně kontaminované půdy.

3.6. Bakopa drobnolistá (*Bacopa monnieri*)

Bacopa monnieri je vlhkomilná, subtropická rostlina využívaná v tradiční indické medicíně pro zlepšení soustředění. Neurostimulační účinky bakopy byly potvrzeny v porovnání s placebem (Kumar et al., 2016) a předklinické studie naznačují, že bakopa má neuroprotektivní účinky, které vedou ke zmírnění kognitivních obtíží při některých chronických neurologických onemocněních, jako je Alzheimerova choroba (Goswami et al., 2011). Z bakopy je možné izolovat řadu biologicky aktivních metabolitů ze skupin triterpenoidních saponinů a glykosidů (Hou et al., 2002) a kukurbitacinů (Bhandari et al., 2007). Některé z triterpenoidních glykosidů, bakopasidů, vykazují mírné antidepresivní účinky na myších modelech (Zhou et al., 2007).

Kontaminace železem (FeCl_3) mění obsah bakosidu A, triterpenoidního saponinu. Bakosid A byl v kontaminovaných rostlinách nalezen v mírně vyšším množství, než v kontrolních rostlinách. Železo je akumulováno především v kořenech bakopy, při delší expozici kontaminantu je akumulováno i v listech. Ve všech částech rostliny, ve které k akumulaci došlo, byl zvýšen obsah malondialdehydu (MDA), který indikoval probíhající peroxidaci lipidů a oxidativní stres. Některé antioxidační enzymy reagovaly na kontaminaci železem rozdílně v závislosti na části rostliny - například aktivita APX negativně korelovala s obsahem železa v kořenech, naopak k pozitivní korelaci docházelo v listech. Důvodem mírného zvýšení obsahu bakosidu A je pravděpodobně zvýšená retence bakosidu A v pletivu, ke které dochází díky přítomnosti železa a jím vyvolaného oxidativního stresu (Sinha a Saxena, 2006).

Kontaminace hydroponicky pěstované bakopy kadmíem (ve formě CdCl_2) vedla k akumulaci kadmia v celé rostlině, čím delšímu působení a čím vyšší koncentraci Cd byla rostlina vystavena, k tím výraznější akumulaci docházelo. Při vyšší koncentraci kontaminantu docházelo k většímu úbytku suché hmotnosti rostlin, jejich velikosti a délky kořenů. Obsah celkového chlorofylu byl nepřímo úměrný množství akumulovaného kovu. Vystavení kontaminaci trvajícím déle než jeden týden vedlo k viditelným projevům chřadnutí rostlin, hnědnutí a opadu listů. Obsah bakosidu A a bakopasidu I se se stoupající koncentrací kontaminantu zvyšoval, dokud nebylo dosaženo hraniční hodnoty tolerance. Při koncentraci CdCl_2 v kultivačním médiu vyšší než $50 \mu\text{M}$ se obsah obou metabolitů znovu snížil. Autoři studie považují bakopu za rostlinu vhodnou k fytoremediaci mírně kontaminovaných zemin a zároveň vhodnou k extrakci bakosidů z kontaminovaných rostlin (Gupta et al., 2014). Jedním z možných důvodů velmi dobré tolerance bakopy k nižším koncentracím kadmia je její schopnost produkovat vysoké množství fytochelatinů, zejména v kořenové části (Mishra et al., 2006).

U buněčných kultur bakopy se osvědčilo použití mědi jako elicitoru. Ideální koncentrací bylo 45 mg CuSO_4 na litr kultivačního média, podávaného po dobu šesti až devíti dnů, kdy došlo k 1,5 násobnému zvýšení produkce bakosidů (Sharma et al., 2015).

3.7. Máta peprná (*Mentha piperita*)

Máta peprná (*Mentha piperita*) je řazena jak mezi jedlé a aromatické rostliny, tak mezi rostliny léčivé. Běžně nachází využití v dermatologii, dentální hygieně nebo je konzumována jako nálev se zklidňujícími účinky na trávicí soustavu (Shah a D'Mello, 2005).

V případě nálevů a čajových směsí panují obavy o nezávadnost výrobků, kontaminace rostlinného materiálu těžkými kovy se často pohybuje na hranici nebo nad hranicí povoleného limitu. Zejména kontaminace hliníkem je u máty velmi výrazná, rostlina tento kov v sušině akumuluje ve velkém množství (Rubio et al., 2012). Při extrakci účinných látek ze sušiny pomocí horké vody dochází i k extrakci těžkých kovů, do hotového nálevu se dostává 70 - 80 % z obsahu těžkých kovů v sušině (Diaconu et al., 2012).

Druhým nejrozšířenějším způsobem zpracování máty hned po nálevech připravených z čerstvých rostlin nebo sušiny je lisování esenciálního oleje. Mátový olej obsahuje řadu aromatických látek, jako je menthol, isomenthol, menthon, metyl-acetát a pinen (Herro, Jacob, 2010). Díky společnému působení těchto látek má mátový olej mírné protizánětlivé a desinfekční účinky a tím podporuje proces hojení infikovaných ran u myších modelů (Modarresi et al., 2019).

Produkce jednotlivých složek oleje je ovlivněna některými environmentálními faktory, jako je teplota, sucho, zastínění (Telci et al., 2011) nebo přítomnost pevných organických látek v půdě (Scavroni et al., 2005). Také kontaminace těžkými kovy mění množství produkovaného oleje a někdy i zastoupení jednotlivých složek oleje.

V přítomnosti kobaltu (autoři formu přidávaného kobaltu nespecifikovali) byla produkce oleje výrazně ovlivněna, rostliny ošetřené kobaltem o koncentraci 15 ppm zaznamenaly nejvyšší obsah oleje, naopak zvýšení nad 20 ppm již vedlo ke snížení obsahu. Jak pro obsah oleje, tak pro objem biomasy byly nižší koncentrace kobaltu spíše příznivé, vyšší testované hodnoty naopak působily nepříznivě (Aziz et al., 2011). Podobné výsledky získal i (Amirmoradi, 2012) ve studii s kadmíem a olovem, kdy koncentrace Cd a Pb ($CdCl_2$ a $PbCl_2$) nad 100 ppm výrazně snižovaly jak objem biomasy, tak celkový obsah oleje. Přestože koncentrace, při které se přítomnost těžkého kovu začíná na rostlině negativně projevovat, se u Co, Cu a Pb výrazně liší, závislost obsahu oleje na koncentraci kovu sleduje stále stejný trend.

Přítomnost kobaltu ovlivnila i složení oleje. Nejvyšší testovaná koncentrace (30 ppm) vedla ke zvýšení obsahu menthonu a isomentholu o 37,8 % a 15,2 % za současného snížení obsahu L-mentholu o 20,5 %. Nejnižší testovaná koncentrace (7,5 ppm) měla na obsah L-mentholu přesně opačný vliv, došlo ke zvýšení obsahu o 28,5 % oproti kontrolním rostlinám (Aziz et al., 2011). Vzhledem k tomu, že obsah L-mentholu, nejméně zastoupené složky oleje, určuje jeho kvalitu pro trh (Beltagy, 2019), není kontaminace nízkými koncentracemi kobaltu překážkou pro pěstování máty, naopak u půd silně kontaminovaných kobaltem by

pěstování bylo nevýhodné.

Záměrem studie (Kumar et al., 2010) bylo optimalizovat výnos oleje z *Mentha arvensis*, příbuzného druhu *Mentha piperita*. Z jejich výsledků vyplývá, že nejvyšší výnos byl dosažen ve stavu, kdy rostliny dostávaly 130% doporučené dávky hnojiva obsahujícího dusík, fosfor a draslík a k tomu Zn a S v nízké koncentraci. Zinek a síra byly použity ve formě $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ o koncentraci 2,5 g/m³ půdy. Při tomto ošetření měl zároveň olej nejvyšší podíl mentholu. Kromě kobaltu je tedy zřejmě možné užít i zinek jako prostředek ke zkvalitnění oleje.

Možností produkce oleje z dalších druhů medicínálních či aromatických rostlin se zabývala i studie (Zheljazkov et al., 2008), která se zaměřila na možnost pěstování léčivých a aromatických rostlin v oblasti kontaminované vzdušnou cestou těžkými kovy z nedaleké, stále provozované huti. Primárně zkoumala možnost, zda zde léčivé rostliny mohou být pěstovány jako ekonomicky rovnocenná alternativa k zemědělským plodinám, u kterých by obsah těžkých kovů mohl být zdravotním rizikem pro obyvatele. Výsledky studie naznačují, že u rostlin pěstovaných v kontaminované půdě, které ve své sušině obsahují těžké kovy ve vysoké koncentraci, je obsah těžkých kovů v esenciálních olejích pod detekovatelnou hranicí. Zároveň je celkový výnos esenciálních olejů u kontaminovaných rostlin mírně snížen.

Lisování oleje z léčivých rostlin se tak jeví jako bezpečná metoda zpracování rostlin rostoucích na kontaminovaných půdách oproti využití jejich sušiny.

4. Závěr

Záměrem této práce bylo stručné shrnutí interakcí kontaminantů, zejména těžkých kovů, se sekundárním metabolismem léčivých rostlin. Vzhledem k tomu, že sekundární metabolity jsou tím, co v mnoha případech dělá z běžné rostliny rostlinu léčivou, je znalost vlivu kontaminace na jejich produkci klíčová pro bezpečné farmaceutické využití léčivých rostlin. Kontaminace některými těžkými kovy na jednu stranu představuje nebezpečí díky schopnosti některých léčivých rostlin akumulovat ve svém pletivu těžké kovy v toxických dávkách (nikl v třezalce, arsen v pelyňku), kdy přímá konzumace nebo použití některých extraktů může vést k až ke zdravotním potížím u konzumenta. Na druhou stranu jsou těžké kovy nadějnými elicitory pro některá obtížně získatelná fytofarmaka (např. vincristin z barvínkovce). Elicitace umožňuje až několikanásobné zvýšení produkce sekundárních metabolitů s terapeutickými účinky, za předpokladu, že je daná metoda optimalizována pro konkrétní druh, pro formu rostliny (kulturu, celé rostliny), konkrétní kontaminant a případně i pro další faktory, jako je růstová fáze kultury. Praktická aplikace poznatků o kontaminaci i elicítaci by měla vést jak ke zvýšení kvality produktů získaných z tradičně pěstovaných léčivých rostlin, tak i produktů z rostlin pěstovaných inovativními metodami.

5. Seznam použité literatury

Abdelgawad, H., Zinta, G., Hegab, M.M., Pandey, R., Asard, H., Abuelsoud, W. (2016) High Salinity Induces Different Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Maize Seedlings Organs, *Frontiers in Plant Science*, vol.7, 2016, p.276, DOI:10.3389/fpls.2016.00276

Afanas'eva, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal'chik, E.V., Ibragimova, G.A., Korkina, L.G. (2001) Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochem Pharmacol.* 2001 Mar 15;61(6):677-84, DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00526-3, PMID: 11266652.

Aftab, T., Ansari, A., Shabbir, A., Masroor, M., Khan, A., Naeem, M., Khan, M., Uddin, M. (2019) Arsenic exposure modulates physiological attributes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L., *International Journal of Herbal Medicine* 2019; 7(2): 19-26, Online ISSN: 2321-2187

Akbar, K.F., Headley, A.D., Hale, W.H.G., Athar, M. (2006) A comparative study of de-icing salts (sodium chloride and calcium magnesium acetate) on the growth of some roadside plants of England. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. Vol. 10, No. 1, pp. 67-71., ISSN: 1119-8362

Almagro, L., Fernández-Pérez, F., Pedreño, M. A. (2015) Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human health, *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(2), 2973–3000, DOI: 10.3390/molecules20022973

Amirmoradi, S. (2012) Effect of Cadmium and Lead on Quantitative and Essential Oil Traits of Peppermint (*Mentha piperita* L.), *Notulae Scientia Biologicae*, is. 4. pg. 101-109, DOI:10.15835/nsb448185

Apel, K., Hirt, H. (2004), Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55:1, 373-399, DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

Arora, M., Kiran, B., Rani, S., Rani, A., Kaur, B., Mittal, N., (2008) Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources, *Food Chemistry*, Volume 111, Issue 4, Pages 811-815, ISSN 0308-8146, DOI:10.1016/j.foodchem.2008.04.049

ASTDR Priority list - <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl>

Aziz, E.E., Gad, N., Khaled, S.M. (2011), Effect of cobalt on growth and chemical composition of peppermint plant grown in newly reclaimed soil, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, is. 5, pg 628-633, ISSN 1991-8178

Aziz, E.E., Gad, N., Badran, N.M. (2007) Effect of Cobalt and Nickel on Plant Growth, Yield and Flavonoids Content of *Hibiscus sabdariffa* L., *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(2): 73-78, ISSN 1991-8178

Bártíková H, Podlipná R, Skálová L. (2016) Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants, *Chemosphere*, Epub 2015 Nov 21, PMID: 26606183.

Bauer, R. (1998) Quality Criteria and Standardization of Phytopharmaceuticals: Can Acceptable Drug Standards Be Achieved?, *Ther. Innov. Regul. Sci.*, is. 32, pg. 101–110, DOI:10.1177/009286159803200114

Beltagy, A.M., Beltagy, D.M. (2019) Quality control, chemical composition and antioxidant activity of some marketed peppermint oil samples, *Int. J. Pharm. Sci. & Res.*; 10(8): 3865-72. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(8).3865-72

Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (2015). *Marine Anthropogenic Litter*, pg. 47-48, DOI:10.1007/978-3-319-16510-3, ISBN 978-3-319-16510-3 (eBook)

Bhandari, P., Kumar, N., Singh, B., Kaul, V. K. (2007) Cucurbitacins from *Bacopa monnieri*, *Phytochemistry*, Volume 68, Issue 9, Pages 1248-1254, ISSN 0031-9422, DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.03.01

Bosker, T., Bouwman, L.J., Brun, N.R., Behrens, P., Vijver, M.G. (2019) Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*, *Chemosphere*, Volume 226, Pages 774-781, ISSN 0045-6535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.163.

Burda, S., Oleszek, W. (1994) Flavonoids as antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, is. 49 (6), pg. 2774-2779, DOI: 10.1021/jf001413m

Calow, P., Forbes, V. E., (2012) *Ecotoxicology*, Published in *Encyclopedia of Theoretical Ecology*, edited by Alan Hastings and Louis J. Gross (Berkeley: University of California Press), p. 247-249., DOI: 10.1002/9780470015902.a0003245.pub2

Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., Zuccato, E., (2006) Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy (2006), *Environmental Science & Technology*, 40 (1), 357-363, DOI: 10.1021/es050991m

Catalá, A., Díaz, M. (2016) Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes, *Frontiers in Physiology*, DOI:10.3389/fphys.2016.00423

Cefarelli, G., D'Abrosca, B., Fiorentino, A., Izzo, A., Mastellone, C., Pacifico, S., Piscopo, V. (2006) Free-Radical-Scavenging and Antioxidant Activities of Secondary Metabolites from Reddened Cv. Annurca Apple Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 803–809. DOI:10.1021/jf052632g

Cook, S.V., Chu, A., Goodman, R.H. (2002) Leachability and Toxicity of Hydrocarbons, Metals and Salt Contamination from Flare Pit Soil, *Water, Air, & Soil Pollution*, 133, 297–314 . DOI: 10.1023/A:1012925812698

Crans, D.C., Simone, C.M. (1991) Nonreductive interaction of vanadate with an enzyme containing a thiol group in the active site: glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 30(27), 6734–6741. DOI:10.1021/bi00241a015

Cronquist A. (1977) On the Taxonomic Significance of Secondary Metabolites in Angiosperms, In: Kubitzki K. (eds) *Flowering Plants. Plant Systematics and Evolution / Entwicklungsgeschichte und Systematik der Pflanzen*, vol 1. Springer, Vienna. DOI: 10.1007/978-3-7091-7076-2_12

Cunningham, M.A., Snyder, E., Yonkin, D. et al., (2008) Accumulation of deicing salts in soils in an urban environment, *Urban Ecosyst.*, 11, 17–31, DOI: 10.1007/s11252-007-0031-x

Dawson, A.G., (1994) *Geomorphological effects of tsunami run-up and backwash*, Editor(s): Morisawa, M., *Geomorphology and Natural Hazards*, Elsevier, Pages 83-94, ISBN 9780444820129, DOI: 10.1016/B978-0-444-82012-9.50010-4.

Diaconu, D., Diaconu, R., Navrotescu, T. (2012) Estimation of heavy metals in medicinal plants and their infusions, *Ovidius University Annals of Chemistry* Volume 23, Number 1, pp.115-120, ISSN-1223-7221

Đurović, D., Bulat, Z., Buha, A., Matovic, V. (2013). Cadmium, Mercury and Lead in *Hypericum perforatum* L. collected in Western Serbia, *Web of Conferences.*, DOI: 10.1051/e3sconf/20130115009.

Erb, M., Kliebenstein, D. J. (2020) Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy, review, *Plant Physiology* Sep 2020, 184 (1) 39-52; DOI: 10.1104/pp.20.00433

Fierens, S., Mairesse, H., Heilier, J-F., Focant, J-F., Eppe, G., De Pauw, E., Bernard, A. (2007) Impact of Iron and Steel Industry and Waste Incinerators on Human Exposure to Dioxins, PCBs, and Heavy Metals: Results of a Cross-Sectional Study in Belgium, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70:3-4, 222-226, DOI: 10.1080/15287390600884628

Flowers, T.J. (1985) Physiology of halophytes, *Plant Soil* 89, 41–56 . DOI:10.1007/BF0218223

Frick, S., Kramell, R., Schmidt, J., Fist, A.J., Kutchan, T.M. (2005) Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment *Papaver somniferum* cultivars, *J. Nat. Prod.*; 68(5):666-73., DOI: 10.1021/np0496643, PMID: 15921406.

Göran L., (2011) The European Commission Tries to Define Nanomaterials *The Annals of Occupational Hygiene*, Volume 55, Issue 1, January 2011, Pages 1–5, DOI:10.1093/annhyg/meq092

Goswami S, Saoji A, Kumar N, Thawani V, Tiwari M, Thawani M. (2011) Effect of *Bacopa monnieri* on Cognitive functions in Alzheimer's disease patients, *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*, 3(4):285-293, ISSN 1840-4529

Guirguis, A., Owen, J., Stair, J. (2012) Presence of metals in herbal extracts, *The Pharmaceutical Journal*, Vol. 289, p. 536, November 2012, URI: 11110858

Guo, J., Boxall, A., Selby, K. (2015) Do Pharmaceuticals Pose a Threat to Primary Producers?, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45:23, 2565-2610, DOI: 10.1080/10643389.2015.1061873

Gupta, P., Khatoon, S., Tandon, P. K., Rai, V. (2014) Effect of Cadmium on Growth, Bacopaside A, and Bacopaside I of *Bacopa monnieri* (L.), a Memory Enhancing Herb, *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 824586, 6 pages, DOI: 10.1155/2014/824586

Gurib-Fakim, A., (2006) Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 2006 Feb;27(1):1-93. Epub 2005 Aug 18. Review. PMID: 16105678

Hamilton, R.F., Wu, N., Porter, D. (2009) Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part Fibre Toxicol* 6,35, DOI: 10.1186/1743-8977-6-35

Hasaneen, M.N.A.-G., Abdel-aziz, H.M.M., Omer, A.M. (2016) Effect of foliar application of engineered nanomaterials: carbon nanotubes NPK and chitosan nanoparticles NPK fertilizer on the growth of French bean plant, *Biochemistry and Biotechnology Research* Vol. 4(4), pp. 68-76, November 2016, ISSN: 2354-2136

Herklotz, P. A., Gurung, P., Vanden Heuvel, B., Kinney, Ch. A. (2010) Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions, *Chemosphere*, Volume 78, Issue 11, 2010, Pages 1416-1421, ISSN 0045-6535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.12.048.

Herro, E., Jacob, S.E. (2010) *Mentha piperita* (peppermint), *Dermatitis*, 21(6):327–329, PMID: 21144345

Hiramoto, K., Ojima, N., Sako, K., and Kikugawa, K. (1996) Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical, *Biol. Pharm. Bull.* 19, 558–563. DOI: 10.1248/bpb.19.558

Hou, Ch-Ch., Lin, S-J., Cheng, J-T., Hsu, F-L. (2002) Bacopaside III, Bacopasaponin G, and Bacopasides A, B, and C from *Bacopa monniera*, *Journal of Natural Products*, 65(12), 1759–1763. DOI:10.1021/np020238w

Chizzola, R. (2007) Micronutrient composition of *Papaver somniferum L.* grown under low cadmium stress condition, *Journal of plant nutrition*, 24(11). 1663-1677. DOI: 10.1081/PLN-100107305.

Choudhary, A., Kumar, A., Kaur, N. (2020) ROS and oxidative burst: Roots in plant development, *Plant Diversity*, Volume 42, Issue 1, Pages 33-43, ISSN 2468-2659, DOI: 10.1016/j.pld.2019.10.002.

Ibrahim, M.H., Chee, Y., Zain, N.A.M. (2017). Effect of Cadmium and Copper Exposure on Growth, Secondary Metabolites and Antioxidant Activity in the Medicinal Plant *Sambung Nyawa (Gynura procumbens (Lour.) Merr)*. *Molecules*. 22. 1623, DOI: 10.3390/molecules22101623.

Idrees, M. N., Moinuddin, T. A. M. M. A. K. M. (2010) Effects of Aluminium Exposures on Growth, Photosynthetic Efficiency, Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes and Artemisinin Content of *Artemisia Annu L.*, *Journal of Phytology*, Vol. 2, no. 8, Nov. 2010, ISSN: 2075-6240

Judy, J.D., Unrine, J.M., Rao, W., Wirick, S., Bertsch, P.M. (2012) Bioavailability of Gold Nanomaterials to Plants: Importance of Particle Size and Surface Coating, *Environmental Science & Technology*, 46 (15), 8467-8474, DOI: 10.1021/es3019397

Kapiel, T.Y.S., Abdel-Rahman, T.M., Ibrahim, D.I., Ali, E.A.M. (2010). Elicitation of alkaloids by biotic and abiotic stress factors in *Catharanthus roseus*. *Egypt. J. Bot.* pp. 207-224 (Special Volume 27-29 October 2010). *Egypt. J. Bot.* 207-224.

Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust. J. Crop Sci.* 2011;5:709-25.

Khataee, E., Karimi, F., Razavi, K. (2019). Chromium-induced alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G.Don in vitro cultured shoots and related gene expression patterns particularly for the novel gene GS, *Acta agriculturae Slovenica*, 113(1), 95-. DOI: 10.14720/aas.2019.113.1.09

Kim, D.I., Pedersen, H., Chin, C.K. (1991) Stimulation of berberine production in *Thalictrum rugosum* suspension cultures in response to addition of cupric sulfate, *Biotechnol Lett* 13, 213–216, DOI: 10.1007/BF01025820

Kirpichtchikova, T.A., Manceau, A., Spadini, L., Panfili, F., Marcus, M.A., Jacquet, T. (2006) Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 70, no. 9, pp. 2163–2190, 2006, DOI: 10.1016/j.gca.2006.02.006

Krishna, S., Bustamante, L., Haynes, R. K., & Staines, H. M. (2008) Artemisinin: their growing importance in medicine, *Trends in pharmacological sciences*, 29(10), 520–527. DOI: 10.1016/j.tips.2008.07.004

Kumar, A., Patro, H.K., Kewalanand, A. (2010) Effect of Zinc and Sulphur on herb, oil yield and quality of Menthol mint (*Mentha arvensis* L. var. *Kosi*), *J. Chem. Pharm. Res.*, 2(4):642-648, ISSN No: 0975-7384

Kumar, N., Abichandani, L.G., Thawani, V., Gharpure, K.J., Naidu, M.U., Venkat Ramana, G. (2016) Efficacy of Standardized Extract of *Bacopa monnieri* (Bacognize®) on Cognitive Functions of Medical Students: A Six-Week, Randomized Placebo-Controlled Trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016:4103423. DOI:10.1155/2016/4103423

Kumari, S., Narula, A., Sharma, M.P., Srivastava, P.S. (2004) In vitro propagation of *Pluchea lanceolata*, a medicinal plant, and effect of heavy metals and different aminopurines on quercetin content, *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 40:171–176, March–April 2004, DOI: 10.1079/IVP2003490

Kundu, D., Dey, S., Raychaudhuri, S.S. (2018) Chromium (VI) – induced stress response in the plant *Plantago ovata* Forsk in vitro, *Genes and Environ* 40, 21, DOI: 10.1186/s41021-018-0109-0

Lachman, J., Hejtmánková, A., Miholová, D., Kolihová, D., Tluka, P. (2006) Relations among alkaloids, cadmium and zinc contents in opium poppy (*Papaver somniferum* L.), *Plant, Soil and Environment*. 52, DOI: 10.17221/3442-PSE.

Landgraf, M., Lahr, Ch., Kaur, I., Shafiee, A., Sanchez-Herrero, A., Janowicz, P., Ravichandran, A., Howard, Ch., Cifuentes-Rius, A., McGovern, J., Voelcker, N., Hutmacher, D. (2020) Targeted camptothecin delivery via silicon nanoparticles reduces breast cancer metastasis. *Biomaterials*, 240.119791, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.119791.

Lee-Parsons, C., Ertürk, S., Tengtrakool, J. (2004) Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation. *Biotechnology letters*. 26. 1595-9. 10.1023/B:BILE.0000045825.37395.94.

Li, X., Zhao, M., Guo, L., Huang, L. (2012). Effect of cadmium on photosynthetic pigments, lipid peroxidation, antioxidants, and artemisinin in hydroponically grown *Artemisia annua*. , 24(8), DOI:10.1016/s1001-0742(11)60920-0

- Maqsood, M., Abdul, M.** (2017) Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in *Catharanthus roseus*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Volume 27, Issue 5, Pages 549-556, ISSN 0102-695X, DOI: 10.1016/j.bjp.2017.05.008.
- Melato, F.A., Regnier, T., McCrindle, R.I., Mokgalaka, N.S** (2012) Impact of Metals on Secondary Metabolites Production and Plant Morphology in Vetiver Grass (*Chrysopogon zizanioides*), *S. Afr. J. Chem.*, 2012, 65, 178–183, eISSN: 0379-4350
- Mennini, T., Gobbi, M.** (2004) The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*, *Life Sciences*, Volume 75, Issue 9, Pages 1021-1027, ISSN 0024-3205, DOI: 10.1016/j.lfs.2004.04.005.
- Mercl, F., Košnář, Z., Maršík, P., Vojtíšek, M., Dušek, J., Száková, J., Tlustoš, P.** (2021) Pyrolysis of biosolids as an effective tool to reduce the uptake of pharmaceuticals by plants, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 405, 124278, ISSN 0304-3894, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124278.
- Mildvan, A.S.** (1970) Metals in enzymes catalysis. In : *The enzymes* (Ed: D.D. Boyer). Academic Press, London. pp. 445-536, DOI:10.1016/S1874-6047(08)60188-2
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R. Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V.** (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L., *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 44, Issue 1, Pages 25-37, ISSN 0981-9428, DOI: 10.1016/j.plaphy.2006.01.007.
- Modarresi, M., Farahpour, MR. & Baradaran, B.** (2019) Topical application of *Mentha piperita* essential oil accelerates wound healing in infected mice model, *Inflammopharmacol* 27, 531–537, DOI: 10.1007/s10787-018-0510-0
- Møller, I. M., Kristensen, B. K.** (2004) Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(8), 730-735. DOI: 10.1039/b315561g
- Moslemi, F.S., Vaziri, A., Sharifi, G. et al.** (2021) The effect of salt stress on the production of apocarotenoids and the expression of genes related to their biosynthesis in saffron. *Mol Biol Rep* 48, 1707–1715 . DOI: 10.1007/s11033-021-06219-x
- Murch, S.J., Haq, K., Vasantha-Rupasinghe, H.P., Saxena, P.K.** (2003) Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) , 49(3), 251–257, DOI:10.1016/s0098-8472(02)00090-4
- Okem, A., Stirk, W.A., Street, R.A., Southway, C., Finnie, J.F., Van Staden, J.** (2015) Effects of Cd and Al stress on secondary metabolites, antioxidant and antibacterial activity of *Hypoxis hemerocallidea*, Fisch. & C.A. Mey. *Plant Physiol Biochem.* 97:147-55, DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.09.015, Epub 2015 Sep 25. PMID: 26473664.
- Osman, H.E., Badawy, R.K.** (2013) Effect of pollution on the chemical content and secondary metabolites of *Zygophyllum coccineum* and *Tamarix nilotica*, *Egyptian Pharmaceutical Journal* 2013,12:73–82, DOI:10.7123/01.EPJ.0000428268.89779.59
- Pan, X-W., Shi, Y-Y., Liu, X., Gao, X., Lu, Y-T.** (2004) Influence of inorganic microelements on the production of camptothecin with suspension cultures of *Camptotheca acuminata*, *Plant Growth Regulation*, 44, 59-63, DOI: 10.1007/s10725-004-1654-z.
- Paul, S., Shakya, K.** (2013) Arsenic, chromium and NaCl induced artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A valuable antimalarial plant, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 59–65. DOI:10.1016/j.ecoenv.2013.09.025
- Pavlova, D., Karadjova, I., Krasteva, I.** (2015) Essential and toxic element concentrations in *Hypericum perforatum*. *Australian Journal of Botany*, DOI:10.1071/BT14260
- Pi, Y., Jiang, K., Hou, R., Gong, Y., Lin, J., Sun, X.** (2010) Examination of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in *Camptotheca acuminata*, *Biocell* 2010, 34(3): 139-143, ISSN 0327 - 9545

- Pino, M.R., Muñiz, S., Val, J.** (2016) Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*, . *Environ Sci Pollut Res* 23, 22530–22541, DOI:10.1007/s11356-016-7446-y
- Pitta–Alvarez, S.I., Spollansky, T.C., Giulietti, A.M.** (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*, 26(2-4), 252–258, DOI:10.1016/s0141-0229(99)00137-4
- Pliankong, P., Suksa-Ard, P., Wannakrairoi, S.** (2018) Chitosan Elicitation for Enhancing of Vincristine and Vinblastine Accumulation in Cell Culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Journal of Agricultural Sciences*, vol. 10, No. 12, ISSN(Online): 1916-9760, DOI:10.5539/jas.v10n12p287
- Puente-Garza, C.A., Espinosa-Leal, C.A., García-Lara, S.** (2021) Effects of saline elicitors on saponin production in *Agave salmiana* plants grown in vitro, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 162, Pages 476-482, ISSN 0981-9428, DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.03.017.
- Qin, H., Fan, J., Mao, S.** (2020) Exploring the mechanism of Fe(III)-activated Fenton-like reaction based on the quantitative study. *New Journal of Chemistry*, DOI: 10.1039/C9NJ06104E
- Rai, R., Pandey, S., Rai, S.P.** (2011) Arsenic-induced changes in morphological, physiological, and biochemical attributes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*, an antimalarial plant. *Ecotoxicology* 20, 1900–1913, DOI:10.1007/s10646-011-0728-8
- Rai, V., Khatoon, S., Bisht, S.S., Mehrotra, S.** (2005) Effect of cadmium on growth, ultramorphology of leaf and secondary metabolites of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn, *Chemosphere* 2005 Dec;61(11):1644-50. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.052, PMID: 15992855.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N., Mehrotra, S.** (2004) Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L., *Plant Science* 167, 1159–1169, DOI:10.1016/j.plantsci.2004.06.016
- Rattan, S., Kumar, D. & Warghat, A.R.** (2021) Growth kinetics, metabolite yield, and expression analysis of biosynthetic pathway genes in friable callus cell lines of *Rhodiola imbricata* (Edgew), *Plant Cell Tiss Organ Cult*, DOI:10.1007/s11240-021-02057-8
- Rubio, C., Lucas, J.R.D., Gutiérrez, A.J., Glez-Weller, D., Pérez Marrero, B., Caballero, J.M., Revert, C., Hardisson, A.** (2012) Evaluation of metal concentrations in mentha herbal teas (*Mentha piperita*, *Mentha pulegium* and *Mentha* species) by inductively coupled plasma spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 71, Pages 11-17, ISSN 0731-7085, DOI: 10.1016/j.jpba.2012.07.015.
- Sabo-Attwood, T., Unrine, J.M., Stone, J.W., Murphy, C.J., Ghoshroy, S., Blom, D., Bertsch, P.M., Newman, L.A.** (2012) Uptake, distribution and toxicity of gold nanoparticles in tobacco (*Nicotiana xanthi*) seedlings, *Nanotoxicology*, 6:4, 353-360, DOI: 10.3109/17435390.2011.579631
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R** (1999) Response to cadmium in higher plants, *Environ. Exp. Bot.* 41:105–130, DOI: 10.1016/S0098-8472(98)00058-6
- Scavroni, J., Boaro, S.C.F., Marques, M.O.M., Ferreira, L.C.** (2005) Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. (*Lamiaceae*) grown with biosolid, *Braz. J. Plant Physiol.* vol.17 no.4, DOI: 10.1590/S1677-04202005000400002
- Shah, P.P., D’Mello, P.M.** (2005) A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperita*, *Natural Product Radiance*, 3(4): 214-221, ISSN: 0975-1092 (Online)
- Shanin, H.** (2018) Enhanced production of secondary metabolites by methyl jasmonate and silver nanoparticles elicitation in tissue culture of *Catharanthus roseus* (*Apocynaceae*), *Az. J. Pharm Sci.* Vol. 57, DOI: 10.21608/AJPS.2018.46627

Sharafi, E., Khayam-Nekoei, S., Fotokian, M., Davoodi, D., Hadavand-Mirzaei, H., Hasanloo, T. (2013) Improvement of hypericin and hyperforin production using zinc and iron nano-oxides as elicitors in cell suspension culture of St. John's Wort (*Hypericum perforatum L.*), Journal of Medical Plants and Products, issue 2, vol. 2, pp.177-184. Available at: <<https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=542295>>.

Sharma, M., Ahuja, A., Gupta, R., Mallubhotla, S. (2015). Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors. Natural Product Research, 29(8), 745–749, DOI:10.1080/14786419.2014.986657

Sharma, S.S., Dietz, K.-J., (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance, Trends in Plant Science, Volume 14, Issue 1, Pages 43-50, ISSN 1360-1385,

Shasmita, S.N.R., Rath, S.K., Behera, S., Naik, S.K. (2018) In Vitro Secondary Metabolite Production Through Fungal Elicitation: An Approach for Sustainability. In: Prasad R., Kumar V., Kumar M., Wang S. (eds) Fungal Nanobionics: Principles and Applications. Springer, Singapore, DOI: 10.1007/978-981-10-8666-3_9

Shayler H, McBride M, Harrison E., (2009) Sources and Impacts of Contaminants in Soils, Cornell Waste Management Institute, [Sources and Impacts of Contaminants in Soils \(cornell.edu\)](http://www.cornell.edu)

Schippmann, U., Leaman, D., Cunningham, A. (2002). Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issue, In book: Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry and fisheries (pp.142-167), ISBN : 9251049173

Sim, W.-J., Kim, H.-Y., Choi, S.-D., Kwon, J.-H., Oh, J.-E., (2013) Evaluation of pharmaceuticals and personal care products with emphasis on anthelmintics in human sanitary waste, sewage, hospital wastewater, livestock wastewater and receiving water, Journal of Hazardous Materials, Volumes 248–249, Pages 219-227, ISSN 0304-3894, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.01.007.

Sinha, S., Saxena, R. (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri L.*, Chemosphere, Volume 62, Issue 8, Pages 1340-1350, ISSN: 0045-6535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.07.03

Smith, J.I., Smart, N.J., Misawa, M., Kurz, W. G. W., Tallevi, S. G., DiCosmo, F. (1987) Increased accumulation of indole alkaloids by some cell lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of vanadyl sulphate, 6(2), 142–145. DOI:10.1007/bf00276673

Srivastava, N.K., Srivastava, A.K. (2010) Influence of some heavy metals on growth, alkaloid content and composition in *Catharanthus roseus L.*, Indian J Pharm Sci, 2010, 72 (6): 775-778, DOI: 10.4103/0250-474X.84592

Stránská, I., Skalický, M., Novák, J., Matyášová, E., Hejnák, V. (2013). Analysis of selected poppy (*Papaver somniferum L.*) cultivars: Pharmaceutically important alkaloids, 41(none), 120–126, DOI:10.1016/j.indcrop.2012.04.018

Stuchlíková, L., Skálová, L., Szotáková, B., Syslová, E., Vokřál, I., Vaněk, T., Podlipná, R. (2018) Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*), Ecotoxicol Environ Saf. 2018 Jan; 147:681-687, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.020., Epub 2017 Sep 19., PMID: 28934712.

Stuchlíková, L., Podlipná, R., Szotáková, B., Syslová, E., Skálová, L. (2017) Evaluation of drug uptake and deactivation in plant: Fate of albendazole in ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) cells and regenerants, Ecotoxicol Environ Saf. 2017 Jul;141 37-42, DOI:10.1016/j.ecoenv.2017.03.014. PMID: 28301809.

Tan, J.-H., Duan, J.-Ch., Ma, Y.-L., Yang, F.-M., Cheng, Y., He, K.-B., Yu, Y.-Ch., Wang, J.-W. (2014) Source of atmospheric heavy metals in winter in Foshan China, Science of The Total Environment, Volume 493, 2014, Pages 262-270, ISSN 0048-9697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.147

Telci, I., Kacar, O., Bayram, E., Arabacı, O., Demirtaş, I., Yılmaz, G., Özcan, I., Sönmez, Ç., Göksu, E. (2011) The effect of ecological conditions on yield and quality traits of selected peppermint (*Mentha piperita L.*) clones, *Industrial Crops and Products*, Volume 34, Issue 1, Pages 1193-1197, ISSN 0926-6690, DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.04.010.

Thabrew, M.I., Hughes, R.D., McFarlane, I.G. (1998) Antioxidant activity of *Osbeckia aspera*, *Phytotherapy research*, vol. 12, pgs 288–290, DOI:10.1002/(sici)1099-1573(199806)

Thomas, K.V., Hilton, M.J., (2004) The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 49, Issues 5–6, Pages 436-444, ISSN 0025-326X, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2004.02.028.

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J. (2012) Heavy metal toxicity and the environment, *Experientia supplementum*, vol. 101, pg. 133–164. DOI: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6

Tornero, V., d'Alcalà, M. R., (2014) Contamination by hazardous substances in the Gulf of Naples and nearby coastal areas: A review of sources, environmental levels and potential impacts in the MSFD perspective, *Science of The Total Environment*, Volumes 466–467, Pages 820-840, ISSN 0048-9697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.106.

Tirillini, B., Ricci, A., Pintore, G., Chessa, M., Sighinolfi, S. (2006) Induction of hypericins in *Hypericum perforatum* in response to chromium, *Fitoterapia*, 2006 Apr;77(3):164-70, DOI: 10.1016/j.fitote.2006.01.011.

Vacek, J., Klejdus, B., Kubáň, V. (2007) Hypericin a hyperforin: biologicky aktivní komponenty třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) Jejich izolace, analýza a studium fyziologických účinků, *Čes. slov. Farm.*, 2007; 56, 62–66

Verma, N., Shukla, S. (2015) Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites, review, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, Volume 2, Issue 4, Pages 105-113, ISSN 2214-7861, DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.09.002.

VYHLÁŠKA Ministerstva životního prostředí ze dne 17. října 2001 o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě - Sbírka zákonů - Nakladatelství Sagit, a.s.

WHO (2006) Monograph on good agricultural and collection practices (GACP) for *Artemisia annua L.* WHO, Geneva

Wildi, B., Lütz, C. (1996) Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes, *Plant, Cell & Environment*, 19: 138-146. DOI: j.1365-3040.1996.tb00235.x

Wintz, H., Fox, T., Vulpe, C. (2002) Responses of plants to iron, zinc and copper deficiencies, *Biochem. Soc. Trans.*, 30 (4): 766–768. DOI: 10.1042/bst0300766

Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G. A. (2001). Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.* 123(6), pages 1173–1183. DOI:10.1021/ja002455u

Wu, Ch., Spongberg, A.L., Witter, J.D., Fang, M., Czajkowski, K.P. (2010) Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Soybean Plants from Soils Applied with Biosolids and Irrigated with Contaminated Water, *Environmental Science & Technology* 44 (16), 6157-6161, DOI: 10.1021/es1011115

Xiaofeng, J., Hao, Ch., Yuanchen, Y., Ziqi, L.M., Göran, K. (2019). Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*, *Environmental Pollution*, DOI:10.1016/j.envpol.2019.04.055

Yu, H., Peng, J., Cao, X., Wang, Y., Zhang, Z., Xu, Y., Qi, W. (2021) Effects of microplastics and glyphosate on growth rate, morphological plasticity, photosynthesis, and oxidative stress in the aquatic species *Salvinia cucullata*, *Environmental Pollution*, 116900, ISSN 0269-7491, DOI:10.1016/j.envpol.2021.116900.

- Yu, Y., Wu, W., Chang, A.C.** (2013) Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants, *Science of The Total Environment*, Volume 442, Pages 310-316, ISSN 0048-9697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.001.
- Zarinkamar, F., Ghelich, S., Soleimanpour, S.** (2013) Toxic Effects of Pb on Anatomy and Hypericin Content in *Hypericum perforatum*, L.. *Bioremediation Journal*, 17(1), 40–51. DOI:10.1080/10889868.2012.751958
- Zehra, A., Choudhary, S., Mukarram, M., Naeem, M., Masroor, M., Khan, A., Aftab, T.** (2020) Impact of Long-Term Copper Exposure on Growth, Photosynthesis, Antioxidant Defence System and Artemisinin Biosynthesis in Soil Grown *Artemisia annua* Genotypes, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (2020) 104:609–618, DOI: 10.1007/s00128-020-02812-1
- Zeng, Q-Q., Jiang, L., Zhu, L-P., Zheng, H., Yang, D-P.** (2017) Improved Camptothecin Production of *Camptotheca Acuminata* on Hydroponic Medium Supplemented with Various Chemicals, *Advances in Biological Sciences Research (ABSR)*, volume 4, DOI: 10.2991/bbe-17.2017.55
- Zhao, Ch., Dodin, G., Yuan, Ch., Chen, H., Zheng, R., Jia, Z., Fan, B-T.** (2005) In vitro protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Volume 1723, Issues 1–3, 2005, Pages 114-123, ISSN 0304-4165, DOI:10.1016/j.bbagen.2005.02.004.
- Zheljzakov, V.D., Jeliakova, E.A., Kovacheva, N., Dzhurmanski, A.** (2008) Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter. *Environ. Exp. Bot.* vol. 64, issue 3, pgs 207–216, Elsevier, DOI:j.envexpbot.2008.07.003
- Zheng, Z., Wu, M.** (2004). Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*., 166(2), 0–514. DOI:10.1016/j.plantsci.2003.10.022
- Zhou, L., Yang, G., Sun, H., Tang, J., Yang, J., Wang, Y., Garran, T. A.,** (2017) Effects of different doses of cadmium on secondary metabolites and gene expression in *Artemisia annua L.m*, *Front. Med.* 2017, 11(1): 137–146, DOI 10.1007/s11684-016-0486-3
- Zhou, Y., Shen, Y-H., Zhang, Ch., Su, J., Liu, R-H., Zhang, W-D.** (2007). Triterpene Saponins from *Bacopa monnieri* and Their Antidepressant Effects in Two Mice Models, *Journal of Natural Products*, 70(4), 652–655, DOI:10.1021/np060470s
- Zitko, V., Hanlon, M.** (1991) Another source of pollution by plastics: Skin cleaners with plastic scrubbers, 22(1), 0–42. DOI:10.1016/0025-326x(91)90444-

6. Přílohy

Tab. 1 - Vliv kontaminace těžkými kovy na další druhy léčivých rostlin

rostlina	<i>Chrysopogon zizanioides</i>	<i>Zygophyllum coccineum</i>	<i>Tamarix nilotica</i>	<i>Ocimum tenuiflorum</i>
čeleď	<i>Poaceae</i>	<i>Zygophyllaceae</i>	<i>Tamaricaceae</i>	<i>Lamiaceae</i>
využití	kosmetika, antiseptikum, esenciální oleje	tradiční medicína, antirevmatikum	tradiční medicína, antipyretikum, antiseptikum	tradiční medicína, anxiolytikum
metabolity	fenolické látky	taniny, saponiny, alkaloidy	taniny	eugenol
těžký kov	As, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn	Al, B, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Pb, V, Zn	Al, B, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Pb, V, Zn	Cr
ve formě	solí kovů	neuveдено	neuveдено	$K_2Cr_2O_7 \cdot 7H_2O$
koncentrace	10, 50, 100, a 500 ppm	různé dle kontaminace sranoviště	různé dle kontaminace sranoviště	10, 20, 50, 100 μM
interakce	se zvyšující se koncentrací kovů probíhá zvýšení obsahu celkových rozpustných fenolických látek a výrazné zvýšení fenolů v buněčné stěně	snížení obsahu všech skupin sekundárních metabolitů u rostlin z kontaminovaných stanovišť	snížení obsahu všech skupin sekundárních metabolitů u rostlin z kontaminovaných stanovišť	stoupá aktivita antioxidantních enzymů, mírně zvýšená produkce eugenolu
zdroj	Melato et al., 2012	Osman a Badawy, 2013	Osman a Badawy, 2013	Rai et al., 2004

rostlina	<i>Plantago ovata</i>	<i>Gyanura procumbens</i>	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	<i>Phyllanthus amarus</i>
čeleď	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Hibisceae</i>	<i>Phyllanthaceae</i>
využití	projímadlo, snížení hladiny cholesterolu	tradiční medicína, ledvinové obtíže, hypertenze	snížení krevního tlaku	tradiční medicína, hepatoprotektivum, diuretikum, léčba hepatitidy B
metabolity	polyfenoly	fenoly, flavonoidy, saponiny	antokyany, flavony	phyllanthin, hypophyllanthin
těžký kov	Cr	Cd, Cu	Co, Ni	Cd
ve formě	$K_2Cr_2O_7$	$CdCl_2$, $CuSO_4$	neuveдено	$CdCl_2$

koncentrace	0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM a 1.8 mM	Cd 2 mg/L; Cd 4 mg/L; Cu 70 mg/L; Cu 140 mg/L; Cd 2 mg/L + Cu 70 mg/L; Cd 4 mg/L + Cu 70 mg/L a Cd 4 mg/L + Cu 140 mg/L	20 a 40 mg/kg Co a 25 a 50 kg Ni	< 0.002 ppm
interakce	stoupá aktivita antioxidantních enzymů, lineární zvýšení celkového obsahu polyfenolů	nižší koncentrace TK vedou ke zvýšení obsahu SM, vysoké ho naopak snižují, kombinace dvou kovů výrazně snižuje obsah SM	nejvyšší obsah antokyanů a flavonů při 20-25 mg/kg Ni nebo Co, při vyšších koncentracích klesá	snížení obsahu chlorofylů, akumulace škrobu, zvýšení obsahu phyllanthinu a hypophyllanthinu
zdroj	Kundu et al., 2018	Ibrahim et al., 2017	Aziz et al., 2007	Rai et al., 2005

rostlina	<i>Pluchea lanceolata</i>	<i>Thalictrum rugosum</i>	<i>Hypoxis hemerocallidea</i>
čeleď	<i>Asteraceae</i>	<i>Ranunculaceae</i>	<i>Hypoxidaceae</i>
využití	tradiční medicína, antipyretikum, analgetikum	pravděpodobně ovlivňuje hladinu krevních cukrů a tuků	tradiční medicína, tumorsupresivní aktivita
metabolity	quercetin	berberin	hypoxosid, fenoly, flavonoidy
těžký kov	Cu, Zn	Cu	Cd, Al
ve formě	CuSO ₄ , ZnSO ₄ ,	CuSO ₄	Cd(NO ₃) ₂ , Al(NO ₃) ₃
koncentrace	50 - 300 μM	10 μM - 2mM	2, 5, 10 mg Cd/L, 500, 1000, 1500 mg Al/L a kombinace Cd 2:Al 500, Cd 5:Al 1000, Cd 10:Al 1500 mg/L
interakce	buněčná kultura, oproti celým rostlinám méně quercetinu, nízké koncentrace Cu (50 - 150 μM) a Zn (50-200μM) zvyšují obsah quercetinu, při vyšší konc. se obsah quercetinu snižuje	buněčná kultura, přidání na konci růstové fáze kultury stimulovalo produkci berberinu, více než 1mM zabilo kulturu, optimum 200-500μm	zvýšení obsahu flavonoidů a fenolů, snížení obsahu hypoxosidu při všech koncentracích
zdroj	Kumari et al., 2004	Kim et al., 1991	Okem et al., 2015

