



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**

**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Gintarė Vajegaitė**

**N-PAKEISTŲ 3-AMINO-9-METILKARBAZOLO DARINIŲ  
BIOLOGINIO AKTYVUMO TYRIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

**KAUNAS, 2016**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**N-PAKEISTŲ 3-AMINO-9-METILKARBAZOLO DARINIŲ**  
**BIOLOGINIO AKTYVUMO TYRIMAS**

Baigiamasis magistro projektas  
Chemijos inžinerija (kodas 621H81004)

**Vadovas**

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

2016-06-07

**Recenzentas**

Doc. dr. Ingrida Tumosienė

2016-06-07

**Projektą atliko**

Gintarė Vajegaitė

2016-06-07

**KAUNAS, 2016**



## KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos

(Fakultetas)

Gintarė Vajegaitė

(Studento vardas, pavardė)

Chemijos inžinerija, 621H81004

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„N-pakeistų 3-amino-9-metilkarbazolo darinių biologinio aktyvumo tyrimas“

### AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2016 m. birželio 7 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Gintarės Vajegaitės**, baigiamasis projektas tema „N-pakeistų 3-amino-9-metilkarbazolo darinių biologinio aktyvumo tyrimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

\_\_\_\_\_  
(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Vajegaitė Gintarė. N-pakeistų 3-amino-9-metilkarbazolo darinių biologinio aktyvumo tyrimas. *Magistro* baigiamasis projektas, vadovas doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Chemijos ir procesų inžinerija, Technologijos mokslai

Reikšminiai žodžiai: karbazolai, biologinis aktyvumas, mirozinazė.

Kaunas, 2016. 76 p.

## SANTRAUKA

Šio darbo tikslas buvo ištirti naujai susintetintų N-pakeistų 3-amino-9-metilkarbazolo darinių biologinį aktyvumą ir sudaryti mirozinazės išskyrimo ir išgryninimo technologinę schemą. Nustatyta, kad didžiausias radikalo ABTS slopinimas buvo 3-[(3-hidrazino-3-oksopropil)-(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanhidrazido (**5**) – 0,401 A, kuris taip pat pasižymėjo ir didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pagal FRAP metodą – Fe<sup>+2</sup> koncentracija 56 μmol/l. Ištirta, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH radikalą buvo 3-[(9-metilkarbazol-3-il)karbamotioilamino]propano rūgšties (**15**), (90,9 %). Gauta, kad didžiausios redukcinės savybės buvo 3,3'-(fenilimino)bis(N'-benziliden)propanhidrazido (**9**) (2,401 A). Nustatyta, kad mažiausias gliukozinolatų kiekis „Abakus“ veislės rapsų kaliuje iš stiebų *in vitro* (1,97 %) ir didžiausias mirozinazės aktyvumas „Abakus“ veislės rapsų kaliaus kultūroje iš lapų ir iš šaknų *in vitro* (0,51 vnt/ml ir 2,04 vnt/ml) buvo 3-(4-amino-5-tioksa-1H-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidino (**11**) poveikyje. Pateikta mirozinazės išskyrimo ir išgryninimo technologinio proceso schema.

Vajegaitė, Gintarė. *Investigation of Biological Activity of N-substituted 3-amino-9-methylcarbazole Derivatives: Master's thesis in Chemical Engineering*, supervisor assoc. prof. Ilona Jonuškienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Chemical and Process Engineering, Technological Sciences

Key words: carbazole, biological activity, myrosinase.

Kaunas, 2016. 76 p.

## SUMMARY

The aim of the present research was to investigate the newly synthesized of N-substituted 3-amino-9-methylcarbazole derivatives biological activity and to present technological scheme of

myrosinase extraction and purification. It was found, that the highest suppression of ABTS radical was of 3-[(3-hydrazin-3-oxopropyl)-(9-methylcarbazol-3-yl)amino]propanhydrazide (**5**) – 0.401 A, which also showed the highest antioxidant activity by FRAP method – 56  $\mu\text{mol/l}$  concentration of  $\text{Fe}^{+2}$ . It was established, that the highest antioxidant activity against DPPH radicals was of 3-[(9-methylcarbazol-3-yl)carbamothioylamino]propan acid (**15**), (90.9 %). It was found, that the highest reductive properties were of 3,3'-(phenylimino)bis(N'-benzyliden)propanhydrazide (**9**) (2.401 A). It was found, that the smallest amount of glucosinolates in „Abakus“ rapeseed callus culture from stems *in vitro* (1.97 %). The highest activity of myrosinase in „Abakus“ rapeseed callus culture from leaves and roots *in vitro* (0.51 U/ml and 2.04 U/ml), which were grown with 3-(4-amino-5-tioxo-1H-1,2,4-triazol-3-yl)-1-(9-methylcarbazol-3-yl)-5-oxopyrrolidine (**11**). It was presented technological scheme of myrosinase extraction and purification.

## TURINYS

SANTRAUKA.....	4
SUMMARY.....	4
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS .....	8
LENTELIŲ SĄRAŠAS .....	10
SANTRUMPOS.....	11
ĮVADAS .....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
1.1. Karbazolai .....	14
1.2. Pirimidinas ir jo dariniai .....	14
1.3. Triazolo dariniai .....	15
1.4. Oksadiazolo junginiai .....	17
1.5. 2-Pirolidinonai .....	17
1.6. Rapsų ( <i>Brassica napus</i> L.) charakteristika .....	18
1.7. Augalų audinių kultūros <i>in vitro</i> .....	19
1.8. Augimo reguliatoriai .....	19
1.8.1. Auksinai .....	20
1.8.2. Citokininai.....	21
1.8.3. Giberelinai.....	21
1.8.4. Abscizo rūgštis.....	22
1.8.5. Etilenas.....	22
1.9. Antioksidacinis aktyvumas .....	23
1.10. Gliukozinolatai.....	23
1.10.1. Gliukozinolatų struktūra .....	24
1.10.2. Gliukozinolatų-mirozinazės sistema.....	25
1.10.3. Gliukozinolatų biosintezė .....	27
1.11. 4-Metilsulfinilbutilgliukozinolatas.....	28
2. MEDŽIAGOS IR JŲ APTARIMAS .....	31
2.1. Tiriamoji medžiaga .....	31
2.2. Nauji biologiškai aktyvūs junginiai .....	31
2.3. Biologiškai aktyvių junginių paruošimas.....	35
2.4. <i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> bakterijų dygimo įvertinimas...36	
2.5. Biologiškai aktyvių junginių tirpalų antibakterinio aktyvumo nustatymas agaru difuziniu metodu .....	36
2.6. Augalų regeneracija ir kaliaus gavimas .....	37

2.7. Rapsų ( <i>Brassica napus</i> L.) sėklų sterilinimas .....	37
2.8. Augalų ląstelių maitinamoji terpė .....	38
2.9. Biologiškai aktyvių junginių antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH.....	39
2.10. Biologiškai aktyvių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną .....	40
2.11. Biologiškai aktyvių junginių redukcinių savybių nustatymas .....	41
2.12. Biologiškai aktyvių junginių 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonrūgšties)-diamonio druskos slopinimo nustatymas .....	42
2.13. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų nustatymas rapsuose ( <i>Brassica napus</i> L.).....	42
2.14. Mirozinazės aktyvumo nustatymas rapsuose ( <i>Brassica napus</i> L.) .....	43
2.15. Gliukozinolatų nustatymas rapsuose ( <i>Brassica napus</i> L.) .....	44
3. REZULTATAI.....	46
3.1. Biologiškai aktyvių junginių antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaru difuziniu metodu.....	46
3.2. Biologiškai aktyvių junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas prieš DPPH ..	47
3.3. Antioksidacinio aktyvumo biologiškai aktyviuose junginiuose įvertinimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną .....	48
3.4. Biologiškai aktyvių junginių redukcinių savybių įvertinimas .....	49
3.5. Biologiškai aktyvių junginių 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonrūgšties)-diamonio druskos slopinimo įvertinimas .....	49
3.6. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų įvertinimas rapsuose .....	50
3.7. Gliukozinolatų kiekio nustatymas rapsuose.....	57
3.8. Mirozinazės aktyvumo įvertinimas rapsuose .....	60
4. REKOMENDACIJOS .....	63
IŠVADOS .....	66
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	68

## PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

<b>1.1 pav.</b> Karbazolo darinys .....	14
<b>1.2 pav.</b> Pirimidino dariniai .....	15
<b>1.3 pav.</b> Priešgrybeliniai triazolo dariniai .....	16
<b>1.4 pav.</b> Pagrindinė gliukozinolatų struktūra .....	24
<b>1.5 pav.</b> Alifatinio (4-metilsulfinilbutilgliukozinoltas), aromatinio (benzilgliukozinolatas), indolinio (indol-3-il-metilgliukozinolatas) gliukozinolato struktūros.....	24
<b>1.6 pav.</b> Gliukozinolatų hidrolizė mirozinazės poveikyje .....	26
<b>1.7 pav.</b> Gliukozinolatų biosintezė .....	27
<b>1.8 pav.</b> Gliukorafanino transformacija į sulforafaną (gliukoerucino transformacija į eruciną) veikiant fermentui – mirozinazei.....	29
<b>2.1 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių tirpalų antibakterinio aktyvumo nustatymas agaru difuziniu metodu .....	37
<b>2.2 pav.</b> Radikalo DPPH redukcijos reakcija su antioksidantu.....	39
<b>2.3 pav.</b> Šviesos sugerties priklausomybė nuo $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ tirpalo koncentracijos .....	41
<b>2.4 pav.</b> Šviesos sugerties priklausomybė nuo gliukozės tirpalo koncentracijos .....	44
<b>3.1 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių tirpalų (1000 $\mu\text{g/ml}$ ) antibakterinio aktyvumo prieš <i>Rhizobium radiobacter</i> įvertinimas agaru difuziniu metodu.....	46
<b>3.2 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių tirpalų (500 $\mu\text{g/ml}$ ) antibakterinio aktyvumo prieš <i>Rhizobium radiobacter</i> įvertinimas agaru difuziniu metodu.....	47
<b>3.3 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių DPPH radikalo slopinimas .....	48
<b>3.4 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių antioksidacinis aktyvumas.....	48
<b>3.5 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių redukcinių savybių įvertinimas .....	49
<b>3.6 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonrūgšties)diamonio druskos radikalo slopinimo įvertinimas .....	50
<b>3.7 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (0,5 mg/l) įtaka rapsų daigų aukščiui daiginant rapsus MS terpėje .....	51
<b>3.8 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (0,5 mg/l) įtaka rapsų šaknų ilgiui daiginant rapsus MS terpėje .....	51
<b>3.9 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (0,5 mg/l) įtaka rapsų biomasei daiginant rapsus MS terpėje .....	52
<b>3.10 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (2 mg/l) įtaka rapsų daigų aukščiui daiginant rapsus MS terpėje .....	52
<b>3.11 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (2 mg/l) įtaka rapsų šaknų ilgiui daiginant rapsus	



MS terpėje .....	53
<b>3.12 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (2 mg/l) įtaka rapsų biomasei daiginant rapsus	
MS terpėje .....	53
<b>3.13 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (0,5 mg/l) įtaka chlorofilo <i>a</i> kiekiui rapsuose <i>in vitro</i> ...	54
<b>3.14 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (0,5 mg/l) įtaka chlorofilo <i>b</i> kiekiui rapsuose <i>in vitro</i> ...	54
<b>3.15 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (0,5 mg/l) įtaka karotinoidų kiekiui rapsuose <i>in vitro</i> ...	55
<b>3.16 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (2 mg/l) įtaka chlorofilo <i>a</i> kiekiui rapsuose <i>in vitro</i> .....	55
<b>3.17 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (2 mg/l) įtaka chlorofilo <i>b</i> kiekiui rapsuose <i>in vitro</i> .....	56
<b>3.18 pav.</b> Biologiškai aktyvių junginių (2 mg/l) įtaka karotinoidų kiekiui rapsuose <i>in vitro</i> .....	56
<b>3.19 pav.</b> Gliukozinolatų kiekis rapsų sėklose.....	57
<b>3.20 pav.</b> Gliukozinolatų kiekis rapsų daiguose <i>in vitro</i> .....	58
<b>3.21 pav.</b> Gliukozinolatų kiekis rapsų kaliuje iš stiebų susiformavusių ant MS terpės su BAP+2,4-D <i>in vitro</i> .....	58
<b>3.22 pav.</b> Gliukozinolatų kiekis „Abakus“ rapsų kaliuje iš lapų ir stiebų susiformavusiame ant MS terpės su <b>2, 11, 14</b> tiriamaisiais junginiais <i>in vitro</i> .....	59
<b>3.23 pav.</b> Mirozinazės aktyvumo įvertinimas rapsų sėklose .....	60
<b>3.24 pav.</b> Mirozinazės aktyvumo įvertinimas rapsų daiguose <i>in vitro</i> .....	60
<b>3.25 pav.</b> Mirozinazės aktyvumas „Abakus“ rapsų kaliuje iš lapų, šaknų ir stiebų susiformavusių ant MS terpės su <b>2, 11, 14</b> tiriamaisiais junginiais <i>in vitro</i> .....	61
<b>4.1 pav.</b> Mirozinazės išskyrimo ir išgryninimo technologinė schema.....	65

## LENTELIŲ SĄRAŠAS

<b>1.6.1 lentelė.</b> Riebalų rūgščių sudėtis rapsų aliejuje .....	18
<b>1.8.1 lentelė.</b> Fitohormonų klasifikacija .....	20
<b>2.2.1 lentelė.</b> Tiriamajame darbe naudoti nauji biologiškai aktyvūs junginiai .....	31
<b>2.4.1 lentelė.</b> Antibiotikų paruošimas darbui su bakterijomis .....	36
<b>2.8.1 lentelė.</b> Maitinamosios Murashige & Shoog (MS) terpės sudėtis .....	38
<b>2.10.1 lentelė.</b> Šviesos sugertis, esant skirtingoms $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ tirpalo koncentracijoms .....	40
<b>2.14.1 lentelė.</b> Šviesos sugertis, esant skirtingoms gliukozės tirpalo koncentracijoms.....	43
<b>4.1 lentelė.</b> Technologinės schemos įrenginių žymėjimas ir pavadinimai .....	64

## SANTRUMPOS

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonrūgštis)diamonio druska

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas

Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diolis

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

PVP – polivinilpirolidonas

DTT – ditiotreitolis

LB – Luria-Bertani terpė

MS – Murashige-Skoog terpė

BAP – 6-benzilaminopurinas

2,4-D – 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis

DMSO – dimetilsulfoksidas

## ĮVADAS

Sparčiai besiplėtojant biotechnologijai, medicinai, chemijos pramonei, nuolat reikalingi nauji, efektyvūs gamtiniai ir sintetiniai biologiškai aktyvūs junginiai. Tarp šių junginių svarbią vietą užima penkianariai ir šešianariai heterocikliniai junginiai. Jie įeina į vaistinių preparatų, pesticidų, dažiklių, antioksidantų, korozijos inhibitorių, termiškai patvarių polimerinių medžiagų sudėtį [1].

Triazolas ir jo dariniai plačiai naudojami farmacijos pramonėje gaminant vaistinius preparatus. Karbazolas ir jo junginiai yra gerai žinomi dėl jų įvairaus farmakologinio aktyvumo: anti-ŽIV, priešvėžinio, antibakterinio ir priešgrybelinio. Pirolol dariniams būdingas fungicidinis ir antimikrobinis veikimas. Jie yra potencialūs dopamino antagonistai, naudojami hiperlipidemijai gydyti. Pirimidino dariniai naudojami infekciniams susirgimams gydyti. Pirimidino žiedas įeina į tiamino sudėtį bei antibiotiko bleomicino, pasižyminčio priešvėžinėmis savybėmis. Pavyzdžiui, 5-fluoruracilas – priešvėžinis preparatas, AZT (3'-azido-3'-deoksi-timidinas) – priešvėžinis anti-AIDS preparatas [2,3].

Rapsų produktyvumą, juose besikaupiančių maistinių medžiagų, pirminių ir antrinių metabolitų kiekį lemia: agrotechnikos, gamtinės sąlygos ir veislė. Priklausomai kokiais cheminiais preparatais augalai buvo veikiami vegetacijos metu, gliukozinolatų ir kitų metabolitų kiekis gali kisti [4].

Rapsuose esantys gliukozinolatai, tiogliukozido gliukohidrolazės (mirozinazės) poveikyje skyla į gliukozę ir aglikoną, kuris esant neutralioms sąlygoms atpalaiduoja sulfatą, o po to skyla į: nitrilą, epitionrilą, tiocianatą, izotiocianatą arba oksazolidin-2-ioną, priklausomai nuo gliukozinolatų prigimties ir reakcijos sąlygų [5].

Atliekant naujai susintetintų junginių pirminius tyrimus, svarbu išvengti ilgalaikių lauko bandymų ir ieškoti būdų jų greitam ir efektyviam testavimui. Tam gali padėti *in vitro* tyrimų sistema [6].

Vykdant darbus heterociklinių junginių sintezės ir tyrimų srityje bei atsižvelgiant į galimas panašios struktūros junginių taikymo sritis buvo iškeltas šis **darbo tikslas** – ištirti naujai susintetintų N-pakeistų 3-amino-9-metilkarbazolo darinių, savo struktūroje turinčių triazolo, oksadiazolo, pirolidinono ar pirimidino fragmentų, biologinį aktyvumą.

Darbo tikslui pasiekti reikėjo išspręsti šiuos **uždavinius**:

1. Įvertinti biologiškai aktyvių junginių antibakterinį aktyvumą prieš bakterijas *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris*.
2. Įvertinti junginių ABTS radikalo slopinimą, antioksidacines ir redukcines savybes.
3. Atrinkti junginius, pasižyminčius didžiausiu biologiniu aktyvumu.

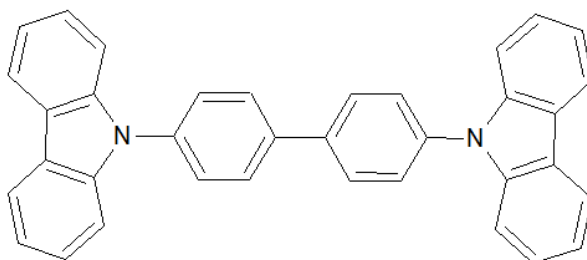
4. Paruošti maitinamąsias terpes su atrinktais junginiais ir sudaiginti rapsus (*Brassica napus* L.) *in vitro* steriliomis sąlygomis.
5. Suformuoti rapsų kaliaus kultūras *in vitro* su atrinktais junginiais terpėje.
6. Ištirti atrinktų junginių įtaką rapsų augimui *in vitro*, chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų kiekiams.
7. Nustatyti gliukozinolatų kiekius rapsų sėklose, daiguose, kaliaus kultūrose ir atrinktų junginių poveikyje susiformavusiose kaliaus kultūrose *in vitro*.
8. Įvertinti mirozinazės aktyvumą rapsų sėklose, daiguose, kaliaus kultūrose ir atrinktų junginių poveikyje susiformavusiose kaliaus kultūrose *in vitro*.
9. Pateikti mirozinazės išskyrimo ir išgryninimo technologinę schemą.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Karbazolai

Karbazolai sudaro svarbią heterociklinių junginių klasę [7]. Susintetinti karbazolo dariniai: oksazinokarbazolai, piridokarbazolai [8], tetrahidrokarbazolai [9], benzokarbazolai [10], furokarbazolai [11], pirolokarbazolai [12], tiazolokarbazolai [13], benzopiranokarbazolai [14] ir N-pakeisti karbazolai yra gerai žinomi dėl farmakologinių savybių [15]. Kai kurie karbazolo dariniai pasižymi antioksidacinėmis [16], priešūždegiminėmis [17], antibakterinėmis [18], priešvėžinėmis [19] savybėmis.

Ištirta, kad antimikrobinėmis, antibakterinėmis ir priešgrybelinėmis savybėmis pasižymi N-pakeisti karbazolai [20,21]. N-pakeisti karbazolai savo sudėtyje turintys 2-(2,-3-dimetilfenil)amino benzoinės rūgšties fragmentą pasižymi antiepilepsinėmis savybėmis [22]. Piridokarbazolai pasižymi stipriu antivėžiniu ir anti-ŽIV aktyvumu. Nustatyta, kad kai kurie karbazolo junginiai įeina į profilaktinius ir terapinius vaistus naudojamus gydyti cukrinį diabetą, nutukimą ir hiperlipidemiją [23].



1.1 pav. Karbazolo darinys [24]

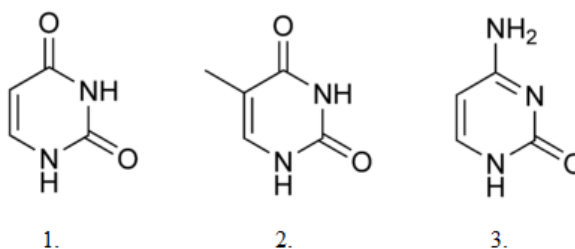
Karbazolai taip pat yra naudingos organinės medžiagos, pasižyminčios fotorefrakcinėmis, fotolaidžiomis ir šviesą spinduliuojančiomis savybėmis. Karbazolo žiedą turintys junginiai naudojami optoelektronikoje kaip skyles pernešančios medžiagos. Pavyzdžiui, 4,4'-bis(karbazol-9-il)bifenilas (žr. 1.1 pav.) kaip transportuojanti skyles medžiaga naudojama OLED (organiniuose šviesos dioduose) [24-26].

## 1.2. Pirimidinas ir jo dariniai

Pirimidinas ir jo dariniai jau seniai yra žinomi ir naudojami medicinoje praktiškai. Pasižymi ir stipriu priešvėžiniu aktyvumu, įskaitant antivirusinį aktyvumą prieš ŽIV ir HSV virusus [27]. 1-(3-Azido-2,3-dideokspentofuranosil)-5-metil-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidindionas stipriai slopina

replikacijas *in vivo* ir citopatinį ŽIV poveikį ir yra naudojamas gydant AIDS ir su AIDS susijusias komplikacijas [28].

Gerai žinomi trys pirimidino dariniai (žr. 1.2 pav.): uracilas (1), timinas (2), citozinas (3), kurie yra esminiai nukleino rūgščių DNR ir RNR blokai ir tai yra viena iš galimų priešasčių jų plataus panaudojimo gydomaisiais tikslais [29].



**1.2 pav.** Pirimidino dariniai [30]

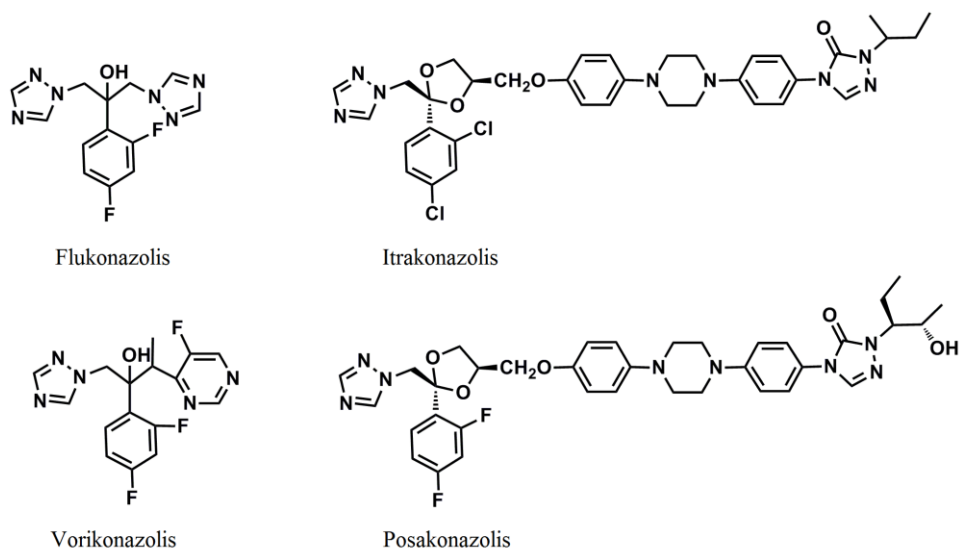
Taip pat heterociklai su pirimidino fragmentu yra labai svarbūs, nes jie sudaro didelę klasę natūralių gamtos produktų, pasižyminčių naudingomis biologinėmis savybėmis [31]. Yra ištirta, kad įvairūs pirimidino analogai turi: antibakterinį [32], priešgrybelinį [33], priešuždegiminį [34], antihipertenzinį [35], antioksidacinį [36], skausmą ir karščiavimą [37] mažinantį poveikį. Pavyzdžiui, pirazolo[3,4-d]pirimidinas pasižymi antimikrobinu ir priešuždegiminiu poveikiu [38]. Žinoma, kad 5-hidroksi-2-metoksipirimidin-4-aminas yra antibiotikas, kuris yra aktyvus prieš stafilokokinę infekciją [39].

Daugelis pirimidino darinių turi potencialių centrinę nervų sistemą slopinančių savybių bei veikia kaip kalcio kanalų blokatoriai. Be to pirimidino fragmentas įeina į daugelio natūralių produktų sudėtį, tokių kaip vitaminas B<sub>1</sub> (tiaminas) bei sintetinių junginių sudėtį, tokių kaip barbitūro rūgštis ir Veranalas, kurie naudojami kaip migdomieji vaistai [40,41].

### 1.3. Triazolo dariniai

Triazolas ir jo dariniai vieni iš biologiškai aktyviausių heterociklinių junginių, pasižyminčių antimikrobinėmis [42], antituberkuliozinėmis [43] ir priešvėžinėmis savybėmis [44]. Taip pat biologiniu aktyvumu tokiu kaip: antiuždegiminis, analgetikas, antivirusinis [45-47] ir kt. Yra nustatyta, kad 1,2,4-triazolas turi priešgrybelinių ir anti-ŽIV savybių [48].

Triazolo junginiai įeina į svarbius vaistus (žr. 1.3 pav.) naudojamus grybelinei infekcijai gydyti.



**1.3 pav.** Priešgrybeliniai triazolo dariniai [49]

Šie triazolo vaistai (Flukonazolis, Itrakonazolis, Vorikonazolis ir Pozakonazolis) jau daugelį metų sėkmingai paplitę ir naudojami klinikinėje terapijoje įvairių mikrobu infekcijoms gydyti [50]. Nepaisant to, kad šie triazolo dariniai plačiai vartojami, jie sukelia ir daug nepageidaujamų reakcijų. Triazolai yra teratogeniški ir embriotoksiški, pavyzdžiui, Flukonazolis sukelia pykinimą, alopeciją, odos pažeidimus, galvos ir pilvo skausmus, kepenų pažeidimus, o Itrakonazolis yra hepatotoksiškas ir sukeliantis gastrointestinalinius sutrikimus [51].

Šiuo metu svarbu sukurti naujų priešgrybelinių preparatų, kurie būtų efektyvūs, tačiau nesukeltų arba sukeltų kuo mažesnę šalutinę poveikį bei būtų kuo mažesnis grybelių atsparumas jiems [52]. 2009 m. Prancūzijoje buvo susintetinti 1-[(1*H*-indol-5-ilmetil)amino]-2-fenil-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)propan-2-oliai, iš kurių vienas junginys (turintis *N*-Boc protekcinę grupę indolo liekanoje ir *N*-H jungtį) pasižymėjo priešgrybeliniu aktyvumu prieš Flukonazoliui mažai jautrias ir atsparias rūšis [53]. 2011 m. Kinijoje buvo susintetinti nauji triazolo junginiai, kurie pasižymėjo didesniu aktyvumu nei Vorikonazolis prieš *C. albicans* ir tokiu pat poveikiu prieš *A. fumigatus* bakterijas [54].

Vis daugiau mokslininkų dėmesio yra skiriama 4-tiazolidinono dariniams, kurie pasižymi didesniu aktyvumu nei palyginamieji junginiai (ketokonazolis, streptomocinas, bifonazolis, ampicilinas) ir yra potencialūs priešgrybeliniai preparatai [55].

Yra žinoma, kad triazolo žiedas įeina ir į šių vaistų sudėtį: Ribavirinas (antivirusinis) [56], Rizatriptanas (antimigreninis) [57], Estazolamas ir Alprazolamas (anksiolitinis) [58], Letrozolas ir Anastrozolas (priešvėžinis) [59], Rufinamidas (nuo epilepsijos) [60]. Triazolo dariniai yra naudojami ir žemės ūkyje kaip veiksmingi pesticidai ir fungicidų antiseptikai [61].



## 1.4. Oksadiazolo junginiai

Pastaraisiais metais oksadiazolo chemija vis dar plačiai vystosi. Šiuo metu yra daug kliniškai vartojamų vaistų, kuriuos sudaro oksadiazolo, tetrazolo fragmentas kartu su įvairiais heterocikliniais žiedais [62]. Daugelis oksadiazolų junginių pasižymi antibakterinėmis, priešgrybelinėmis [63], priešuždegiminėmis, prieš traukulinėmis, antihipertenzinėmis savybėmis ir turi analgetiko ir diuretiko savybių [64]. Kai kuriems dariniams būdingas antivirusinis poveikis prieš RNR virusus ir gali slopinti ŽIV replikaciją [65]. Be to, dariniai yra aktyvūs prieš hepatito B ir ŽIV virusus [66].

Vienas iš oksadiazolo izomerų, 1,3,4-oksadiazolas, pasižymi įvairiomis biologinėmis savybėmis, pavyzdžiui, 2-amino-1,3,4-oksadiazolas veikia raumenis atpalaiduojančiai. 1,3,4-Oksadiazolo dariniai yra geri monoamino oksidazės inhibitoriai (antidepresantai), epilepsijos agentai ir potencialūs chitino biosintezės skatintojai. 1,3,4-Oksadiazolas turintis naftaleno branduolį pasižymi priešuždegiminėmis savybėmis [67].

## 1.5. 2-Pirolidinonai

Penkianaris heterociklinis junginys – 2-pirolidinonas turi daug biologinių savybių, pavyzdžiui, nustatytas jų antibakterinis ir priešgrybelinis poveikis [68]. Ištirta, kad 5-[1-*N*-fenil-3-fenil-pirazol]-2-okso-1-*N*-fenil-sulfanilamido-pirolidinono-4-karboksilo rūgštis gauta iš 2-pirolidinono, pasižymi panašiomis arba geresnėmis antimikrobinėmis savybėmis prieš *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* ir *Ps. aeruginosa* bakterijas, lyginant su standartiniais junginiais: ampicilinu, tetraciklinu, gentamicinu ir chloramfenikoliu [69].

Žinoma, kad *N*-metil-2-pirolidinonas daugiausiai naudojamas kaip ekstrahavimo tirpiklis naftos chemijos pramonėje, reaktyvus tarpininkas polimerinėse ir nepolimerinėse cheminėse reakcijose bei kaip dažų nuėmiklis. Jis taip pat naudojamas farmacijos pramonėje siekiant pagerinti vaistų efektyvumą ir kosmetikos pramonėje, kaip tirpiklis [70].

Efektyvūs gydant opaligę yra 1-pakeisti-4-karboksi-2-pirolidinonai ir jų alkilimo, feniletilamino, cikloheksilamino, geranilamino dariniai [71].

1-Arilm-pakeistiems-4-karboksi-2-pirolidinono dariniams – druskoms, esteriams, amidams, aromatiniam žiede turintiems įvairius alkilinius, alkoksi-, trifluormetilinius pakaitus būdingos augalų augimą reguliuojančios savybės [72].

## 1.6. Rapsų (*Brassica napus* L.) charakteristika

Rapsai (*Brassica napus* L.) – bastutinių šeimos augalų genties aliejinė kultūra. Skirstomi į du porūšius – vasariniai rapsai bei žieminiai rapsai. Žieminiai rapsai žydi gegužės mėnesį, o vasariniai birželio-liepos mėnesiais tai priklauso nuo sėjos ir vegetacijos laikotarpio [73].

Iš rapsų išgaunamas aliejus, lyginant su kitomis aliejinėmis kultūromis, pasižymi geriausiai subalansuota riebalų rūgščių sudėtimi. Yra gan nemažas kiekis polinesočiųjų rūgščių grupei priklausančio  $\alpha$ -linoleno, kuris žmogaus organizme yra nesintetinamas [74].

### 1.6.1 lentelė. Riebalų rūgščių sudėtis rapsų aliejuje

Riebalų rūgštys	Kiekis, %
Mononesočiosios	61
Polinesočiosios	8-12
Sočiosios	6

Rapsų kokybę lemiančios sudedamosios dalys yra išskiriamos į tris grupes:

- vertingos sudedamosios medžiagos;
- neutralios sudedamosios medžiagos;
- maistinę vertę mažinančios sudedamosios medžiagos.

Vertingos sudedamosios medžiagos – aminorūgštys, baltymai, vitaminai, riebalai bei riebalų rūgštys, lyginant su kitų aliejinių augalų sėklomis pvz. sojų pupelėmis, riebalų rapsų sėklose yra daugiau nei dvigubai, tačiau baltymų beveik 40 % mažiau. Neutralios sudedamosios medžiagos – tai cukrus, celiuliozė. Maistinę vertę mažinančios sudedamosios medžiagos – gliukozinolatai, ligninas, oligosacharidai, sinapinas ir kitos medžiagos.

Rapsų sėklos bei jų produktai plačiai naudojami įvairioms reikmėms. Apdorojant rapsų sėklas gaunamas žaliavinis aliejus ir ekstrahuoti rupiniai, kurie naudojami maistui, pašarui. Toliau apdorojant žaliavinį aliejų gaunamas biodyzelinas ir neapdorotas glicerolis, kuris naudojamas pašarams bei farmacijos produktų gamybai.

Aliejus iš rapsų gali būti išgaunamas vienu iš šių būdų:

- spaudimo ir ekstrahavimo derinimu;
- šaltuoju spaudimu;
- karštuoju spaudimu.

Vienas iš plačiausiai naudojamų būdų yra spaudimo ir ekstrahavimo derinimas, nes aliejaus liekana šalutiniame produkte itin maža. Lyginant karštąjį spaudimą su šaltuoju, aliejaus liekana šalutiniame produkte yra mažesnė spaudžiant – šaltuoju būdu [75].

Rapsai yra vertinga kultūra tiek dėl maistinio aliejaus, tiek dėl išspaudų. Augalinis rapsų aliejus pasižymi kaloringumu, išgaunama didelė potencinė energija. Yra apskaičiuota, kad sudeginus 1 g rapsų aliejaus, išsiskiria net – 9,5 tūkst. kalorijų. Žmogaus organizmas kartu su aliejumi gauna ir geriausiai pasisavina natūralius vitaminus A, K, F, E, D, kurie tirpsta riebaluose ir jų perteklius nesikaupia organizme. Taip pat naudojami rapsų sėklų miltai, rupiniai bei išspaudos, kaip baltyminis pašaras gyvuliams. Vidutiniškai rapsų sėklose yra 18-21 % baltymų: 1 kg rapsų sėklų yra 1,7-1,8 pašarinio vieneto ir 150-170 g virškinamųjų baltymų [76].

### **1.7. Augalų audinių kultūros *in vitro***

Augalų audinių kultūros auginimas *in vitro* – izoliuotų audinių ląstelių auginimas ant maitinamųjų terpių steriliomis sąlygomis. Tai vienas svarbiausių augalų biotechnologijoje naudojamų metodų.

Veiksniai, lemiantys augalų audinių kultūrų augimą:

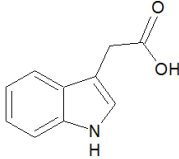
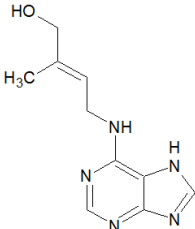
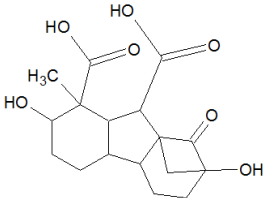
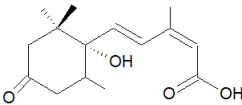
- augimo terpė;
- eksplanto šaltinis;
- genetika;
- aplinkos veiksniai.

Efektyviems rezultatams pasiekti svarbu parinkti tinkamą maitinamąją terpę. Būtina optimizuoti hormoninius ir mineralinius priedus, kurie reikalingi augalų augimui ir vystymuisi bei sudaryti tinkamą temperatūros ir šviesos režimą [77].

### **1.8. Augimo reguliatoriai**

Augalų augimo reguliatoriai yra hormonai, kurie vadinami – fitohormonais. Tai organinės medžiagos – tiek natūraliai aptinkami fitohormonai tiek sintetinės medžiagos, kadangi daugumos sintetinių medžiagų poveikis yra panašus į fitohormonų. Šios medžiagos mažomis koncentracijomis veikia augalų augimą, vystymąsi, žydėjimą, vaisių formavimąsi, dauginimąsi bei kontroliuoja specifines biochemines reakcijas. Paprastai jų sintezė vyksta kurioje nors vienoje augalo dalyje iš kur vėliau transportuojami ir į kitas. Augalų fitohormonai kaupiasi mažomis koncentracijomis, daugelyje ląstelių bei audinių, taip pat meristemoje ir pumpuruose. Fitohormonų klasifikacija su kiekvienos grupės cheminė struktūra pateikti 1.8.1 lentelėje.

### 1.8.1 lentelė. Fitohormonų klasifikacija

Fitohormonai	Cheminė struktūra
Auksinai	
Citokininai	
Giberelinai	
Abscizo rūgštis	
Etilenas	$H_2C=CH_2$

Audinių kultūrose plačiausiai yra naudojami auksinai ir citokininai. Fitohormonai gali būti naudojami kartu ir atskirai, pavyzdžiui, auksinų ir citokininų santykis lemia regeneruoto audinio tipą: esant didesnei auksinų koncentracijai formuojasi – šaknys, esant citokininų koncentracijai – ūgliai, esant vienodam santykiui – formuojasi kalius.

Tiek natūralūs tiek sintetiniai augimo reguliatoriai plačiai taikomi augalų biotechnologijoje bei augalininkystėje. Augimo reguliatoriai naudojami siekiant padidinti derlių ir atsparumą nepalankiems aplinkoms veiksniams [77].

#### 1.8.1. Auksinai

Auksinai būna meristeminiuose ir besidalinančiuose audiniuose. Jie sintezuojami viršutiniuose pumpuruose bei jaunuose lapuose iš kurių juda į apačią. Didžiausias kiekis jų aptinkamas augančiose augalo dalyse [78].

Auksinams priskiriami cheminiai junginiai, kurie atsakingi yra už augalų stiebų ilgėjimą. Dažniausiai naudojami auksinai yra: 3-indolilacto rūgštis (IAR) ir 3-indolilbutano rūgštis (IBR). Auksino sintezė vykdoma iš aminorūgšties triptofano. Jo funkcijos:

- neapšviestoje vietoje skatina ląstelių ilgėjimą;
- skatina apytakinio audinio (rėtinių ir vandens indų) diferenciaciją;
- atsakingas už augalo judesius (reguliuoja: fototropizmą, geotropizmą, hidrotropizmą);
- stimuliuoja augalų vaisių formavimąsi neįvykus apvaisinimui (dėl šios priežasties vaisiai būna besėkliai);
- skatina etileno sintezę;
- skatina šaknų formavimąsi;
- neleidžia vystytis šoninėms šakoms t. y. indukuoja viršūnės dominavimą;
- indukuoja augalo storėjimą, nes kartu su citokininu skatina brazdo augimą ir dalijimąsi;
- slopina vaisių nokimą;
- stimuliuoja kai kuriuose augaluose vaisių formavimąsi ir augimą.

### **1.8.2. Citokininai**

Citokininai kaupiasi augalų meristemose bei sparčiai augančiose dalyse t. y. šaknyse, sėklose, besivystančiuose vaisiuose, jaunuose lapuose. Citokininų sintezė vykdoma šaknyse, o dar tiksliau jų viršūnėlėse. Iš apačios vandens indais jie juda į aukščiau esančias augalo dalis. Citokininų sintezė vykdoma modifikuojant nukleotidą adeniną. Jų atliekamos funkcijos:

- indukuoja ramybės būseną;
- skatina ląstelių dalijimąsi;
- audinių kultūroje stimuliuoja pumpurų formavimąsi;
- didėjant ląstelėms stimuliuoja lapo platėjimą;
- stimuliuoja šoninių šakų vystymąsi.

### **1.8.3. Giberelinai**

Giberelinai – fitohormonai, kurie skatina ląstelės tįsimą. Daugiausiai randami žiedinių augalų jaunuose lapuose, gemaluose, vaisiuose, šaknyse, sėklose. Sintetinant acetyl-CoA giberelinų sintezė vykdoma jaunuose augalo ūglio audiniuose bei besivystančiose sėklose. Jų funkcijos:

- stimuliuoja vaisių augimą;
- skatina žydėjimą;
- stimuliuoja tįstamąjį augimą;
- stabdo augalo ramybės būseną – pradeda dygti sėklos ir sprogti pumpurai;
- nutraukia augalo audinių senėjimą;
- iš gemalo į endospermą patekę giberelinais suaktyvina proteazes bei  $\alpha$ -amilazės sintezę.

#### **1.8.4. Abscizo rūgštis**

Abscizo rūgštis – augalų streso hormonas, nes abscizo rūgšties sintezę sukelia įvairūs stresai. Šis fitohormonas slopina augalų augimą. Didžiausi jo kiekiai randami kuomet augalas yra ramybės būsenoje, jo sėklose ir pumpuruose. Abscizo rūgšties sintezė vyksta iš  $\beta$ -karoteno. Abscizo rūgšties atliekamos funkcijos:

- skatina augalo organų senėjimą;
- stimuliuoja lapų ir vaisių kritimą;
- mažina pumpurų augimą;
- slopina amilazės sintezę;
- slopina vegetaciją;
- stimuliuoja sėklų ir pumpurų ramybės būseną;
- skatina žiotelių atsivėrimą.

#### **1.8.5. Etilenas**

Etilenas – fitohormonas skatinantis vaisių nokimą. Tai vienintelis hormonas esantis dujinės būsenos. Etileno sintezė vykdoma iš aminorūgšties metionino beveik visose augalo audiniuose. Jo atliekamos funkcijos:

- stimuliuoja vaisių nokimą;
- lemia lapų ir vaisių kritimą;
- stimuliuoja augalų šaknų ir pumpurų augimą bei diferenciaciją;
- skatina lapų ir žiedų senėjimą;
- indukuoja šaknų formavimąsi joms nebūdingoje vietoje;
- indukuoja trigubą atsaką [79].

## 1.9. Antioksidacinis aktyvumas

Antioksidantai esantys maiste vaidina svarbų vaidmenį kaip sveikatos apsauginis faktorius. Mokslininkų yra įrodyta, kad antioksidantai sumažina lėtinių ligų riziką įskaitant vėžį ir širdies ligas. Tokie antioksidantai kaip vitaminas C, vitaminas E, fenolinės rūgštys, fitatas, karotinoidai bei fitoestrogenai yra pripažinti kaip mažinantys ligų riziką. Didžioji antioksidacinių junginių dalis yra gaunama iš augalų šaltinių, priklausančių įvairioms junginių klasėms su įvairiomis cheminėmis ir fizikinėmis savybėmis. Vieni junginiai, pavyzdžiui, galatai pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu, o kiti, pavyzdžiui, monofenoliai yra silpni antioksidantai.

Pagrindinis antioksidantų požymis tai jų gebėjimas sugaudyti laisvuosius radikalus. Reaktyvūs laisvieji radikalai ir deguonies junginiai dalyvauja įvairių šaltinių biologinėse sistemose. Šie laisvieji radikalai gali oksiduoti nukleino rūgštis, lipidus, baltymus bei inicijuoti degeneracines ligas. Antioksidaciniai junginiai, tokie kaip fenolinės rūgštys, flavonoidai, polifenoliai, slopinant oksidacinį mechanizmą, pašalina laisvuosius radikalus: peroksidą, hidroperoksidą ar lipidų peroksidaciją, kurie lemia degeneracines ligas [80].

Praktikoje antioksidacinis aktyvumas matuojamas naudojant laisvąjį radikalą 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilą (DPPH). Šis laisvųjų radikalų metodas remiasi elektronų perdavimu, kuris suteikia etanolyje violetinę spalvą [81].

## 1.10. Gliukozinolatai

Gliukozinolatai – tai antrinių metabolitų grupė, apimanti mažiausiai 120 anijoninių tiogliukozidų su aiškiai apibrėžtomis struktūromis. Randami augaluose, daugelyje svarbių kultūrų tokių kaip: rapsai, kopūstai, brokoliai. Gliukozinolatai egzistuoja kartu su mirozinaze, kuri yra atsakinga už gliukozinolatų skilimo produktus. Kai audiniai yra pažeidžiami mirozinazės, gliukozinolatai yra hidrolizuojami į skirtingus skilimo produktus su įvairiu biologiniu aktyvumu.

Dėl savo toksiškumo ir kintamumo skilimo produktai yra svarbūs augalų sąveikoje su patogenais ir vabzdžiais žolėdžiais. Gliukozinolatai atlieka apsauginį ir evoliuciškai svarbų vaidmenį augaluose. Jie apima alelopatiją (kaimyninių augalų augimo slopinimą), plačias antibiotikų savybes įskaitant nematicidinį, antimikrobinį, priešgrybelinį ir insekticidinį poveikius. Kai kurie skilimo produktai dalyvauja augalų mitybos ir augimo reguliavime. Gliukozinolatų metabolitai turi įtakos žmogaus sveikatai. Gliukozinolatai ir jų izotiocianatų hidrolizės produktai gerai žinomi kaip apsauga prieš kancerogenus [82,83].

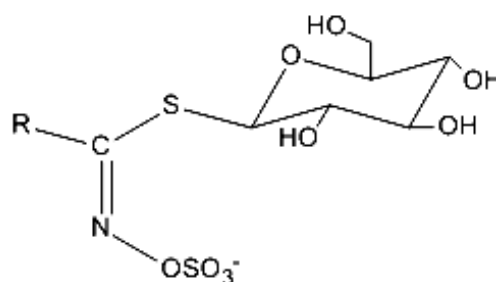
### 1.10.1. Gliukozinolatų struktūra

Gliukozinolatai – gamtinių junginių grupė, kuri kaupiasi bastutinių augalų sėklose bei paplitusi *Capparales* augaluose, kuriems priklauso šios šeimos:

- *Tovariaceae*,
- *Resedaceae*,
- *Capparaceae*,
- *Moringaceae*,
- *Brassicaceae*.

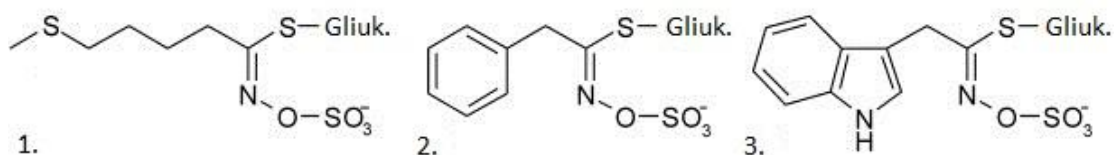
Gliukozinolatų molekulę sudaro:

- $\beta$ -tiogliukozė arba  $\beta$ -D-tiogliukopiranozė,
- sulfoninta oksimo dalis,
- radikalas R (kurio pirmtakas – aminorūgštys).



1.4 pav. Pagrindinė gliukozinolatų struktūra [84]

Daugiau nei šimtas skirtingų gliukozinolatų yra randami gamtoje. Visi jie turi gliukozės liekaną prijungtą per sierą su aglikonu. Įvairiuose junginiuose radikalas kinta, kuris gali būti: alifatinis, aromatinis (heteroaromatinis), heterociklinis. Apima tokias funkcines grupes kaip: hidroksilo, metil-, esterių arba ketonų. Pagal šoninės grandinės prigimtį yra išskiriamos trys gliukozinolatų grupės: alifatiniai, aromatiniai ir indoliniai gliukozinolatai.



1.5 pav. Alifatinio (4-metilsulfonilbutilgliukozinoltas), aromatinio (benzilgliukozinoltas), indolinio (indol-3-il-metilgliukozinoltas) gliukozinolato struktūros [85]



Yra žinomos septynios gliukozinolatų šoninės grandinės struktūros, kurios susintetintos iš šių aminorūgščių: alanino, fenilalanino, leucino, izoleucino, valino, tirozino, triptofano. Vyraujantys gliukozinolatai yra susintetinti atitinkamai iš metionino, fenilalanino ir triptofano. Kitos šoninės grandinės gali susidaryti šiais būdais:

1. Iš aminorūgščių, dažniausiai metionino arba fenilalanino, pailgos homologų grandinės.
2. Modifikuojant šoninės grandinės struktūrą po aminorūgšties prailginimo ir gliukozinolato biosintezės.

Skirtingas radikalas gliukozinolatų molekulėje sąlygoja jų įvairovę bei klasifikaciją. Tam tikroje augalų rūšyje bendrą gliukozinolatų kiekį sudaro keli tai rūšiai būdingi individualūs junginiai, tačiau kiekviena augalų rūšis turi ribotą junginių skaičių.

Rapsuose yra aptikta 12 skirtingų gliukozinolatų junginių, o baltažiedyje vairyne – 23 skirtingų gliukozinolatų. Rapsų sėklose daugiausia yra aptinkama 4-hidroksibrasicino, gliukonapino, gliukobrasikanapino, progoitrino bei napoleiferino, kurių kiekiai priklauso nuo rapsų veislės bei metų sąlygų. Pavyzdžiui, nuo veislės priklauso alifatinių gliukozinolatų progoitrino bei gliukonapino koncentracijos, tačiau 4-hidroksibrasicino koncentracijai turi mažą įtaką. Taip pat gliukozinolatų kiekiui ir sudėčiai rapsuose didelę įtaką turi auginimo sąlygos. Rapsai reaguoja į šiuos aplinkos veiksnius:

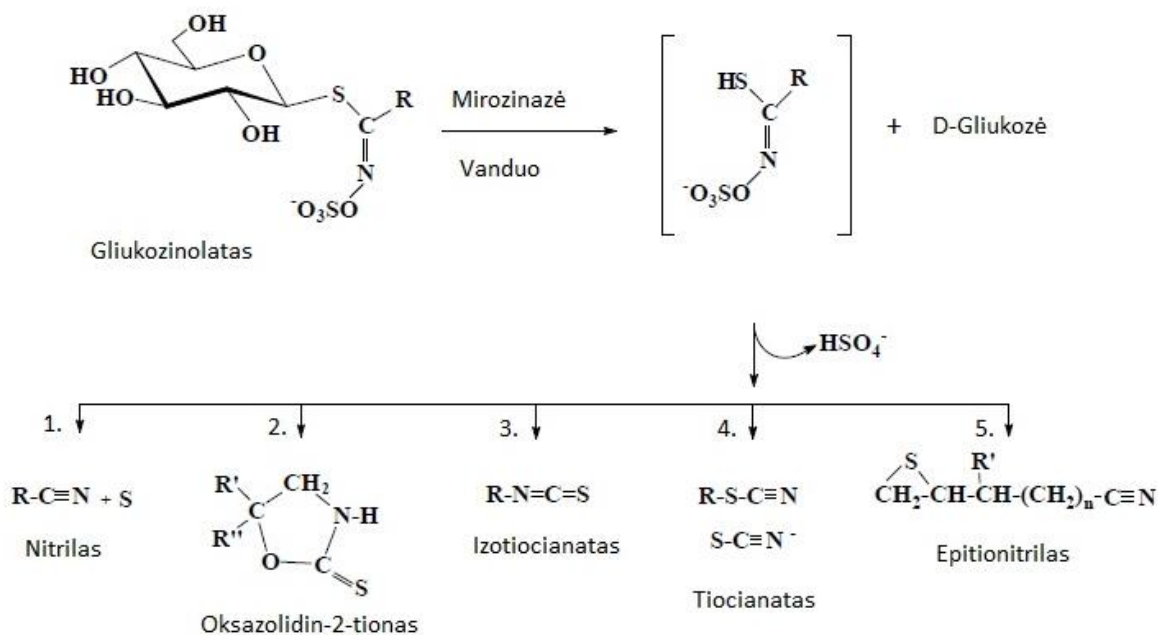
- vandens trūkumą;
- ligas;
- dirvos rūgštingumą;
- temperatūros pokyčius.

Esant vandens trūkumui, sieros pertekliui dirvoje bei aukštai oro temperatūrai skatins gliukozinolatų kaupimąsi. Yra ištirta, kad gliukozinolatų kaupimąsi rapsuose skatina azoto trąšos, tačiau tokiam dirvožemyje kuriame yra pakankamai sieros junginių [86-88].

### **1.10.2. Gliukozinolatų-mirozinazės sistema**

Sveikose sėklose gliukozinolatai yra stabilūs, tačiau paveiktos drėgmės ar kokiu kitoku poveikiu pažeistose sėklose yra išlaisvinamas fermentas tiogliukozido gliukohidrolazė – mirozinazė, kuris hidrolizuoja gliukozinolatus. Gliukozinolatai ir jų fermentas yra skirtinguose audiniuose: gliukozinolatai vakuolėse, o mirozinazė – idioplastuose dar vadinamosiose mirozin-celėse. Gliukozinolatų skilimo metu susidaro stochiometriniai D-gliukozės ir hidrosulfato jono kiekiai bei įvairūs aglikonai, tokie kaip izotiocianatai, nitrilai, tiocianatai ir kt. Priklausomai nuo gliukozinolatų cheminės struktūros bei reakcijos sąlygų, skilimo junginių sudėtis gali būti įvairi.

Pavyzdžiui, jei terpės pH artimas neutraliam bus išskirti izotiocianatai, o jei terpė rūgšti susidarys daugiau nitrilų, kurių susidarymą ypač skatina geležies jonai [88].



### 1.6 pav. Gliukozinolatų hidrolizė mirozinazės poveikyje

(1) Esant mažesniame pH ( $pH < 3$ ), susidaro nitrilai. (2) Jei gliukozinolato šoninė grandinė yra hidroksilinama anglies, gaunamas oksazolidin-2-tionas. (3) Esant neutraliame pH nestabilus aglikonas pakeičiamas į izotiocianatą. (4) kai kurie gliukozinolatai gali būti hidrolizuojami į tiocianatus. (5) esant epitiospecifiniam proteinui (ESP), susidaro epitionitrilai [89,90].

Vienas iš gliukozinolatų-mirozinazės sistemos pavyzdžių yra nustatytas baltažiedyje vairyneje (*Arabidopsis thaliana* L.): tarp ląstelės turinčios daug sieros, esančios tarp floemos ir žiedkočio endodermos bei turinčios didelę koncentraciją gliukozinolatų ir uždaros mirozinazės esančios kaimyninėje ląstelėje [90].

Gliukozinolatų hidrolizės produktai yra atsakingi už prieskonių aštrų skonį tokių kaip garstyčios ir krienai, ir prisideda prie daržovėms būdingo skonio, pavyzdžiui, kopūstų, Briuselio kopūstų, ridikėlių, ropių, žiedinių kopūstų ir brokolių.

Biologinis vaidmuo gliukozinolatų-mirozinazės sistemos nėra visiškai aiškus, tačiau šios sistemos sudėtingumą parodo, kad ji atlieka svarbų vaidmenį augalų gyvavimo cikle [91].

### 1.10.3. Gliukozinolatų biosintezė

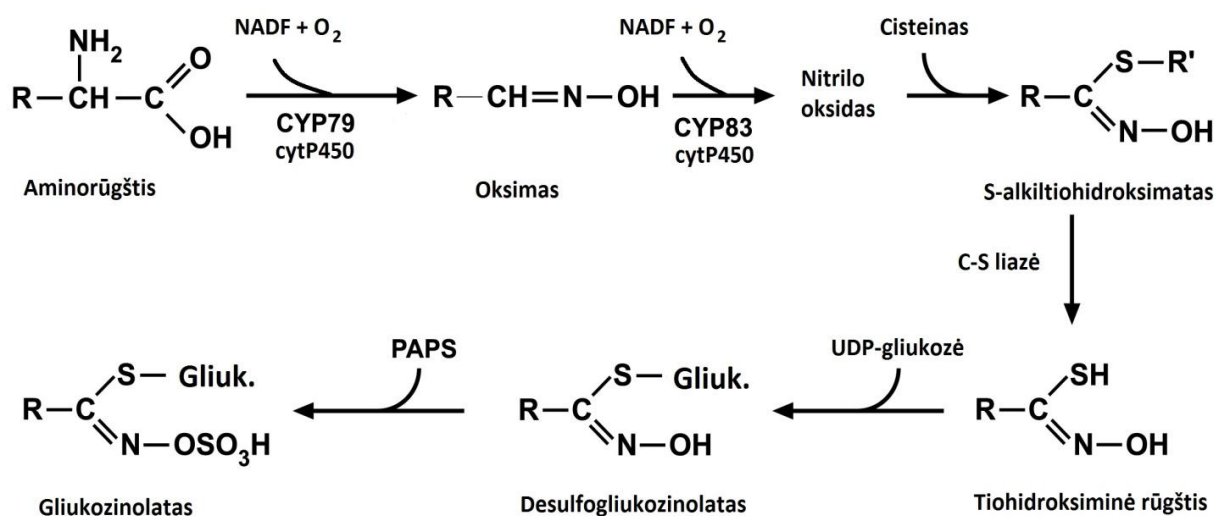
Gliukozinolatų biosintezė apima tris etapus:

1. Šoninės grandinės pailgėjimas.
2. Gliukono sintezė.
3. Šoninės grandinės modifikacija.

Pirmasis etapas, kai aminorūgštys, tokios kaip metionino ir fenilalanino, pailginamos viena ar keliomis metileno grupėmis. Antrasis, pirminės aminorūgštys pakeičiamos į gliukozinolatus. Ir trečiasis etapas, pirminių gliukozinolatų modifikacijos. Šių etapų sekos buvo pasiūlytos remiantis tyrimais *in vivo*.

**Šoninės grandinės pailgėjimas.** Pailgėjimas prasideda aminorūgšties transamininimu – amino grupė yra pernešama iš vienos molekulės į kitą siekiant gauti  $\alpha$ -ketorūgštį. Po to seka kondensacija su acetil-KoA, izomeracija perkeliant hidroksilo grupę ir oksidacija siekiant gauti pailgėjusią  $\alpha$ -ketorūgštį. Šis pailgėjimas yra panašus į leucino susidarymą iš valino. Pailgėjusi  $\alpha$ -ketorūgštis gali dalyvauti tolimesniuose pailgėjimo cikluose – yra nustatyta iki 11 ciklų santykinai pailgėjusio produkto. Pabaigoje  $\alpha$ -ketorūgštis yra transamininima ir gaunama pailgėjusi aminorūgštis.

**Gliukono sintezė.** Pirmasis etapas gliukozinolatų biosintezėje yra pradinės aminorūgšties pervertimas į oksimą. Skirtingos aminorūgštys yra paverčiamos skirtingų fermentų. Oksimas yra oksiduojamas į nitrilo oksidą, kuris vėliau jungiasi su cisteinu. Gauta tihidroksiminė rūgštis yra S-gliukozilinama su tirpia UDP-gliukoze: tihidroksimato gliukoziltransferaze siekiant gauti desulfogliukozinolatą. Pabaigoje desulfogliukozinolatai yra sulfoninami 3'-fosfoadenozino 5'-fosfosulfato (PAPS): desulfogliukozinolato sulfotransferazės iki gliukozinolato [90,91].



1.7 pav. Gliukozinolatų biosintezė [92]

Aminorūgščių pėvertimas į oksimą yra pagrindinis etapas gliukozinolatų biosintezėje. Šis etapas yra dažnai pasitaikantis gliukozinolatuose ir susijęs su natūralių augalinių produktų grupe – cianogeniniais glikozidais. CYP79 šeimos citochromai P450 katalizuoja alifatinių ir aromatinių aminorūgščių pavertimą į atitinkamus oksimus, cianogeninių glikozidų biosintezėje. Taip pat šie citochromai katalizuoja alifatinių ir aromatinių aminorūgščių bei triptofano konversiją į oksimus gliukozinolatų biosintezėje. Oksimų susidarymas gliukozinolatų biosintezėje yra reguliarus etapas.

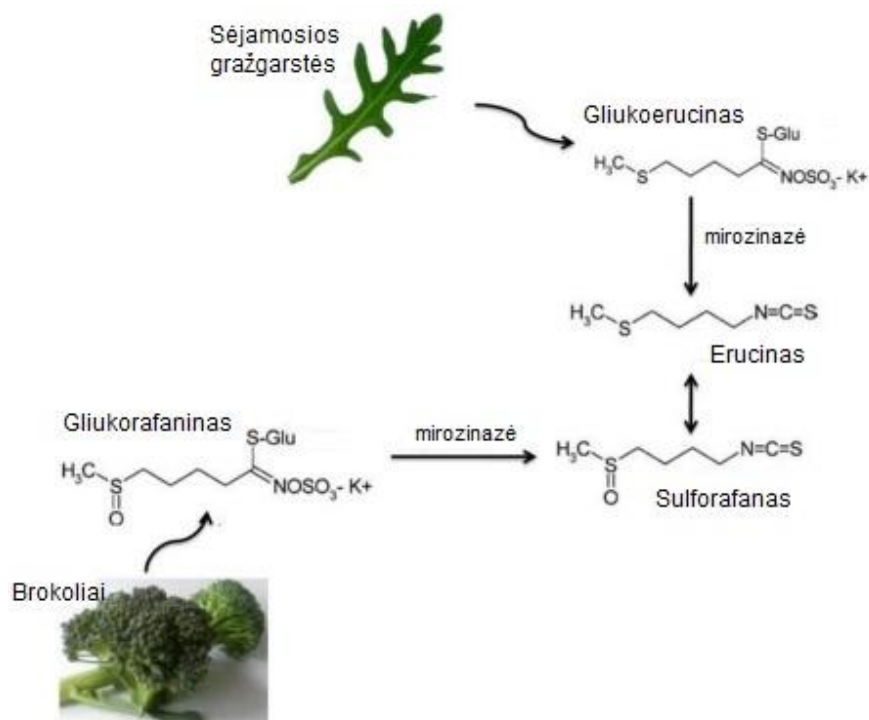
**Šoninės grandinės modifikacija.** Po gliukono biosintezės gali būti atliekamos šoninės grandinės įvairios modifikacijos. Ypač iš gliukozinolatų gautas metioninas rodo didelius šoninės grandinės pasikeitimus. Dažniausiai pasitaikančios modifikacijos yra oksidacija, hidroksilinimas. Metilinimas yra dar viena galima modifikacija, kai keli aromatiniai ir indoliniai gliukozinolatai yra metoksilinami [90-93].

### 1.11. 4-Metilsulfinilbutilgliukozinolatas

Izotiocianatai gauti iš *Cruciferae* šeimos metilsulfinilalkilgliukozinolatų hidrolizės metu yra svarbūs žmogaus mitybai mažinant vėžio riziką. Pagal atliktus tyrimus yra nustatyta, kad žmonės kurie valgo daug daržovių yra mažiau linkę į vėžinius susirgimus, tačiau nėra nustatyta būtent kurie junginiai galėtų būti kaip potencialūs antikancerogenai.

Manoma, kad kopūstinės (*Brassica*) daržovės pasižymi antikancerogeninėmis savybėmis dėl tam tikrų gliukozinolatų buvimo. 4-Metilsulfinilbutilizocianatas, kilęs iš atitinkamų gliukozinolatų rastų brokoliuose, yra nustatytas kaip stiprus induktorius antikancerogeninio žymeklio, fermento – chinono reduktazės (NADP(H): chinono-akceptorius oksidoreduktazė) pelių hepatomos Hepa 1c1c7 ląstelėse. Mokslininkai siekia išauginti kopūstinių daržovių hibridus su didesniu kiekiu šių antikancerogeninių gliukozinolatų ir jų ekstraktų gebėjimu padidinti chinono reduktazės aktyvumą [94].

Vienas iš geriausiai ištirtų izotiocianatų išskirtų iš kryžmažiedžių daržovių yra sulforafanas (1-izotiocianato-4-metilsulfinilbutanas), kuris buvo izoliuotas brokoliuose ir buvo gaunamas iš gliukozinolatų pirmtako gliukorafanino (4-metilsulfinilbutilgliukozinolato) [95].



**1.8 pav.** Gliukorafanino transformacija į sulforafaną (gliukoerucino transformacija į eruciną) veikiant fermentui – mirozinazei [96]

Gliukorafaninas paverčiamas mirozinaze į sulforafaną. Mirozinazė yra denatūruojama virimo metu, kai nepažeistas gliukorafaninas yra nuryjamas, galiausiai, jis yra konvertuojamas į sulforafaną žarnyno mikrofloros tiogliukozidazių.

Gliukozinolato gliukorafanino skilimo produktas sulforafanas yra stiprus fazės II detoksikuojančių fermentų, glaudžiai susijusių su tam tikrų vėžio rūšių prevencija, induktorius. Pavyzdžiui, izotiocianatas – sulforafanas slopina fazės I fermentus, aktyvuojančius kancerogenus, sužadina fazės II detoksikuojančius fermentus tokius kaip chinono reduktazė ir glutationo S-transferazė pelių hepatomos ląstelėje ir blokuoja krūties naviko formavimąsi.

Sulforafanas gali slopinti kancerogeninius mechanizmus tokius kaip:

- oksidacinis stresas;
- fazės I fermentus;
- uždegiminę angiogenezę;
- metastazę.

Ir atvirkščiai sukelti apsaugančiuosius mechanizmus tokius kaip:

- fazės II detoksikuojančius fermentus, kurios apima glutationo S-transferazę;
- terminio šoko atsaką;
- apoptozę.

Žmogaus vėžyje pastebėta pakitimų tarp epigenetinių DNR, sulforafanas slopina DNR metilinimą ir Histono pakitimus [95-98].

## 2. MEDŽIAGOS IR JŲ APTARIMAS

Magistrinio baigiamojo darbo tyrimai atlikti Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakulteto Organinės chemijos katedros Biotechnologijos laboratorijoje.

### 2.1. Tiriamoji medžiaga

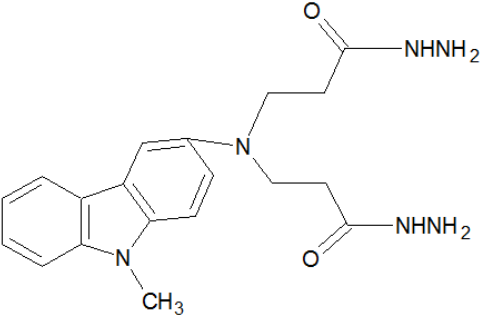
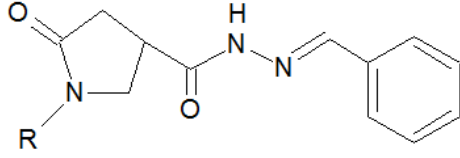
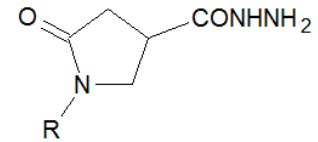
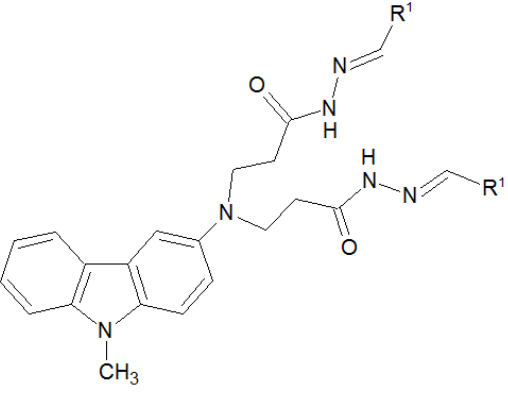
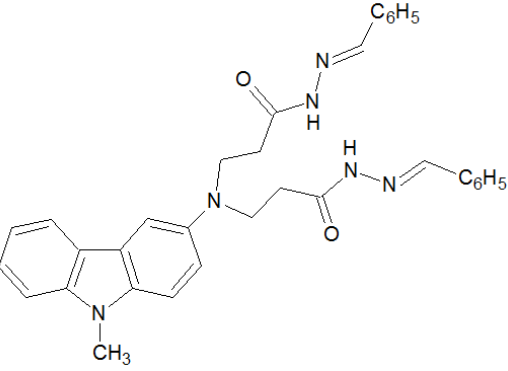
- Rapsai (*Brassica napus* L.) – „Sponsor“, „Terra“, „Digger“, „Abakus“.
- Naujai susintetinti biologiškai aktyvūs junginiai (iš viso 21).
- Tiriamosios bakterijos – *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*.

### 2.2. Nauji biologiškai aktyvūs junginiai

2.2.1 lentelė. Tiriamajame darbe naudoti nauji biologiškai aktyvūs junginiai

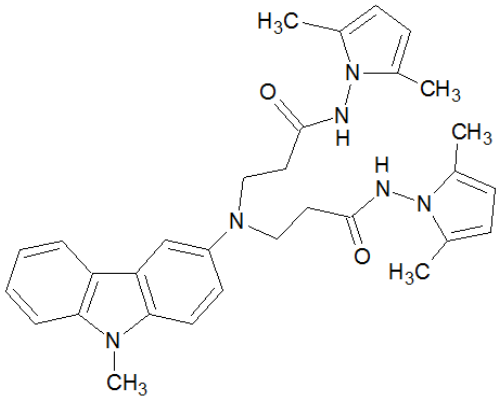
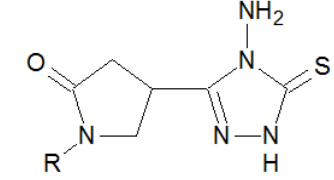
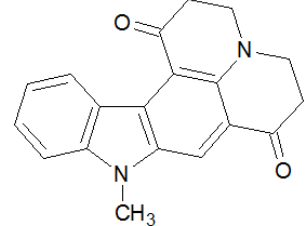
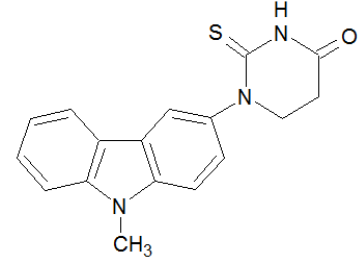
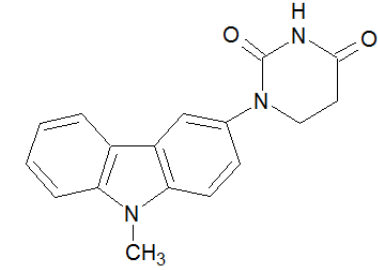
Nr.	Struktūrinė formulė	Pavadinimas
1.		<i>N</i> -(2,5-Dimetil-1 <i>H</i> -pirol-1-il)-3-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidin-3-karboksamidas  <i>R</i> = 9-metilkarbazol-3-il
2.		1-(9-Metilkarbazol-3-il)-3-(2-tioakso-3 <i>H</i> -1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidinas  <i>R</i> = 9-metilkarbazol-3-il
3.		3-[4-(Fenilmetiliden)amino]-1-[(9-metilkarbazol-3-il)-5-tioakso-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol]-5-oksopirolidinas  <i>R</i> = 9-metilkarbazol-3-il
4.		3-(3,5-Dimetilpirazolo-1-karbonil)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas  <i>R</i> = 9-metilkarbazol-3-il

## 2.2.1 lentelės tęsinys

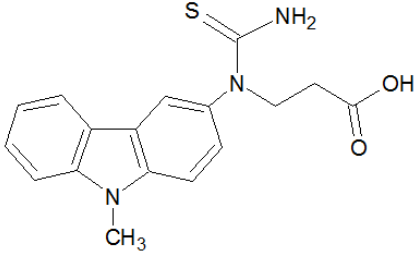
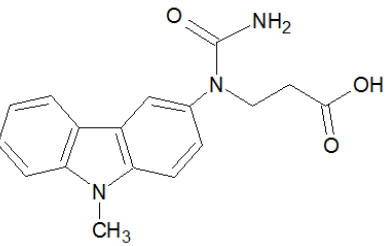
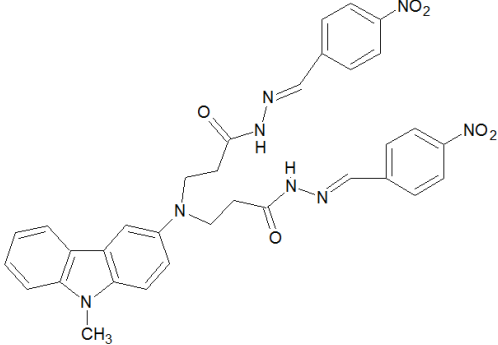
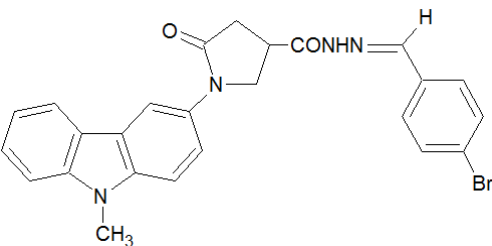
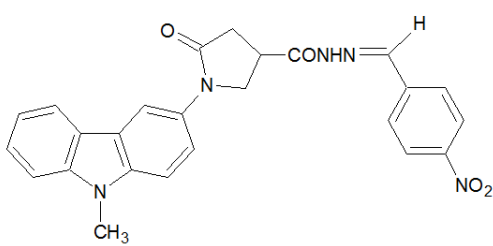
5.		3-[(3-Hidrazino-3-oksopropil)(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanhidrazidas
6.		3-(Benzilidenhidrazinokarbonil)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas  <i>R = 9-metilkarbazol-3-il</i>
7.		1-(9-Metilkarbazol-3-il)-5-okso-3-pirolidin-karbhidrazidas  <i>R = 9-metilkarbazol-3-il</i>
8.		3,3'-(9-Metilkarbazol-3-il)imino]]bis( <i>N'</i> -3-indolil)propanhidrazidas  <i>R<sup>1</sup> = 3-indolil</i>
9.		3,3'-(Fenilimino)bis( <i>N'</i> -benziliden)propanhidrazidas



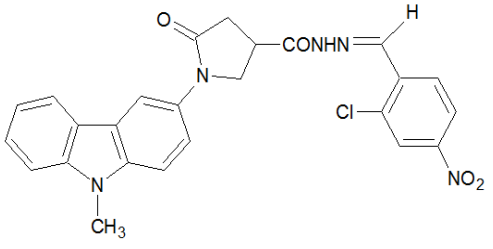
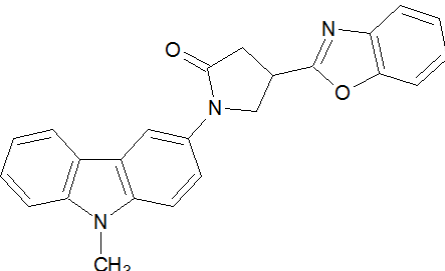
## 2.2.1 lentelės tęsinys

10.		N-(2,5-Dimetilpirol-1-il)-3-[3-dimetilpirol-1-il)-amino]-3-oksopropil)-(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanamidas
11.		3-(4-Amino-5-tio-1H-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas  <i>R = 9-metilkarbazol-3-il</i>
12.		9-Metil-2,3,5,6-tetrahidro-1H-chinolizino[1,9-bc]karbazol-1,7(9H)-dionas
13.		1-(9-Metilkarbazol-3-il)dihidro-4(1H,3H)-pirimidinon-2-tionas
14.		1-(9-Metilkarbazol-3-il)dihidro-2,4-(1H,3H)-pirimidindionas

## 2.2.1 lentelės tęsinys

15.		3-[(9-Metilkarbazol-3-il)karbamotioilamino]-propano rūgštis
16.		3-[(9-Metilkarbazol-3-il)karbamoilamino]-propano rūgštis
17.		3,3'-[(9-Metilkarbazol-3-il)imino]]bis-(N'-4-nitrobenziliden)propanhidrazidas
18.		3-(4-Brombenzilidenhidrazinokarbonil)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas
19.		1-(9-Metilkarbazol-3-il)-3-(4-nitrobenzilidenhidrazinokarbonil)-5-oksopirolidinas

## 2.2.1 lentelės tęsinys

20.		3-(2-Chlor-4-nitrobenzilidenhidrazinokarbonil)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas
21.		4-(1,3-Benzoksazol-2-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas

## 2.3. Biologiškai aktyviųjų junginių paruošimas

Paruošta pradinio tiriamosios medžiagos tirpalo (1 mg/ml). Pasverta 10 mg tiriamojo junginio ir suberta į matavimo kolbą. Įpilta 10 ml dimetilsulfoksido, kad ištirptų medžiaga. Reikalingas paimti tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris iš pradinio tirpalo apskaičiuota pagal formulę [99]:

$$X = \frac{A \times B}{C} \quad (1)$$

Čia:

X – reikalingas paimti tirpalo tūris iš pradinio paruošto tirpalo su tiriamąja medžiaga, ml;

A – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;

B – praskiedimo tūris, l;

C – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamąja medžiaga, koncentracija (mg/ml).

Šis tūris praskiestas iki 100 ml, gaunant reikiamą koncentraciją (mg/l).

$$\frac{\text{Norima junginio koncentracija, mg/l} \quad X \quad \text{Tirpalo tūris, l}}{\text{Turima junginio koncentracija, mg/ml}} = \text{Reikalingas junginio kiekis, ml}$$

## 2.4. *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* bakterijų dygimo įvertinimas

Paruoštos Luria-Bertani terpės bakterijoms auginti. Luria-Bertani (LB) terpės sudėtis:

- natrio chloridas – 10 g/l;
- triptonas - 10,0 g/l;
- mielių ekstraktas – 5,0 g/l;
- mikro agaras – 10,0 g/l.

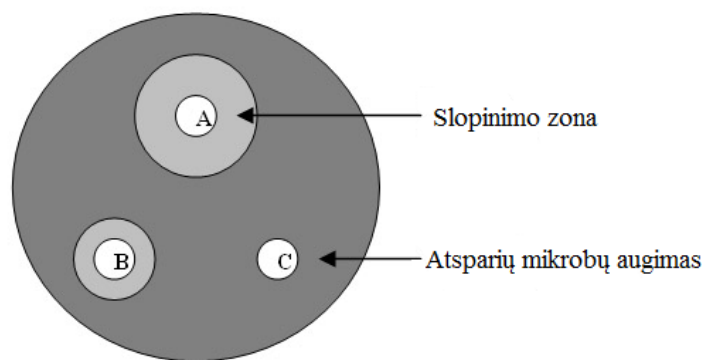
Tyrimams naudotas ampicilinas (darbinė koncentracija – 50 µg/ml). Bakterijos buvo pasėtos į terpes *Petri* lėkštelėse. Po 24 val stebėtas jų augimas [100].

### 2.4.1 lentelė. Antibiotikų paruošimas darbui su bakterijomis

Antibiotikas	Pradinė koncentracija ir antibiotiko paruošimas	Darbinė koncentracija
Ampicilinas	10 mg/ml vandenyje	50 µg/ml
Karbenicilinas	10 mg/ml	50 µg/ml
Chloramfenikolis	6 mg/ml 100% etanolyje	30 µg/ml
Gentamicinas	3 mg/ml vandenyje	15 µg/ml
Kanamicinas	10 mg/ml vandenyje	50 µg/ml
Rifampicinas	20 mg/ml 100% metanolyje	100 µg/ml
Spektinomicinas	20 mg/ml vandenyje	100 µg/ml
Streptomicinas	10 mg/ml vandenyje	50 µg/ml
Tetraciklinas	2,5 mg/ml 50% etanolyje	12,5 µg/ml

## 2.5. Biologiškai aktyvių junginių tirpalų antibakterinio aktyvumo nustatymas agaro difuziniu metodu

Ant LB terpės *Petri* lėkštelėse užpilta *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* bakterijų suspensijos 50 µl ir uždėtas popierinis diskas, po to užpilta 25 µl biologiškai aktyvaus junginio tirpalo (1 mg/ml). *Petri* lėkštelės sudėtos į termostatą 37 °C. Po vienos paros stebėtas bakterijų augimas ir sintetinių junginių antibakterinis poveikis [99,100].



**2.1 pav.** Biologiškai aktyvių junginių tirpalų antibakterinio aktyvumo nustatymas agaru difuziniu metodu

## 2.6. Augalų regeneracija ir kaliaus gavimas

### Darbo eiga:

1. Paruoštos maitinamosios kultūrų terpės rapsams:
  - Murashige-Skoog (MS);
  - MS+BAP (2 mg/l) + 2,4-D (0,2 mg/l).
2. Išsterilintos sėklos.
3. Sudaigintos sėklos *in vitro*.
4. Suformuotas kaliaus iš augalų.

**Reagentai:**  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KJ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , mioinozitolis, nikotino rūgštis, piridoksinas-HCl, tiaminas-HCl, glicinas, sacharozė, Agar-agaras, augimo hormonai [101].

## 2.7. Rapsų (*Brassica napus* L.) sėklų sterilinimas

Rapsų sėklų sterilinimas buvo atliktas tokiomis sąlygomis:

- 0,1 %  $\text{HgCl}_2$  – 10 minučių;
- 6 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 5 minutes;
- 70 %  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  – 1 minutę;
- steriliu distiliuotu vandeniu – 3 kartus praplaunant juo rapsus.

Sėklų sėjimas į lėkšteles vykdytas laminare aseptinėmis sąlygomis. Laminaras sterilintas ultravioletiniais spinduliais bei 96 % etanolu [102].

## 2.8. Augalų ląstelių maitinamoji terpė

Augalų ląstelių kultūros kultivavimui būtina maitinamoji terpė ir išorinės aplinkos faktoriai (šviesa, temperatūra). Kultivuojant augalų ląsteles *in vitro* maitinamoji terpė buvo sudaryta iš šių komponentų: makroelementai, mikroelementai, geležies šaltinis, organiniai priedai, anglies šaltinis, augimo hormonai.

Eksperimento metu naudotos MS (Murashige & Skoog) terpės sudėtis (2.8.1 lentelė). Svarbus šios terpės bruožas yra aukštos nitratų, kalio ir amonio jonų koncentracijos. Sudėtyje yra mioinozitolis, nikotino rūgštis, piridoksino hidrochloridas (B<sub>6</sub>) ir tiamino hidrochloridas (B<sub>1</sub>).

2.8.1 lentelė. Maitinamosios Murashige & Skoog (MS) terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale mg/l	Koncentracija terpėje
<b><i>Makroelementai</i></b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33000	1650
KNO <sub>3</sub>	38000	1900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8800	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7400	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3400	170
<b><i>Mikroelementai</i></b>		
KJ	166	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1240	6,2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4460	22,3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1720	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5	0,025
<b><i>Geležies šaltinis</i></b>		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5560	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	7460	37,3
<b><i>Organiniai priedai</i></b>		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas-HCl	100	0,5
Tiaminas-HCl	100	0,5

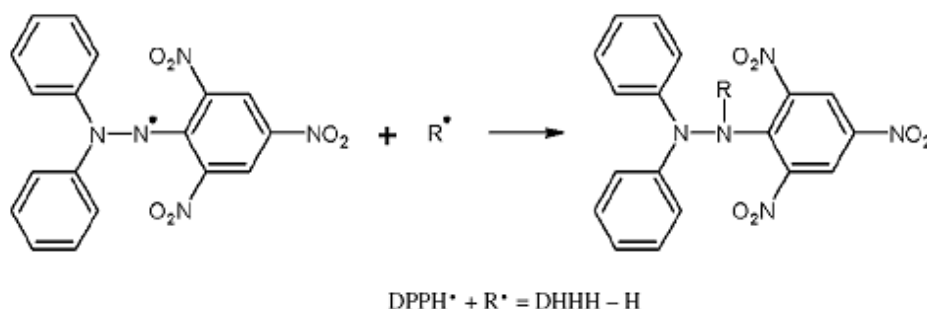
### 2.8.1 lentelės tęsinys

Glicinas	400	2
Anglies šaltinis		
Sacharozė	Dedama kietu pavidalu	30000
Agar-agaras		5

Eksperimento metu optimali kultivavimo temperatūra 20 – 22 °C, fotoperiodas – 24 valandos, terpės pH – 5,7 (išmatuotas naudojant pH-metrą). Maitinamoji terpė buvo sterilinta autoklave 120 °C, esant 0,75 – 1 atm. slėgiui, 15 min [103].

### 2.9. Biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH

Biologiškai aktyviųjų medžiagų antiradikalinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja biologiškai aktyvūs junginiai.



**2.2 pav.** Radikalo DPPH• redukcijos reakcija su antioksidantu

Biologiškai aktyviems junginiams būdingas antioksidacinis aktyvumas dėl jų gebėjimo išaktyvinti laisvuosius radikalus. Reakcijos metu antioksidantas atiduoda vandenilį ir taip išaktyvina laisvuosius radikalus ir jie tampa stabiliai DPPH – H tipo junginiais.

Tiriamieji junginiai (1 mg/ml) buvo ištirpinti dimetilsulfoksido (DMSO).

**Tiriamąjo tirpalo ruošimas.** DPPH (1 mM) tirpalas paruoštas etanolyje ir 3 ml tirpalo įpilta į 3 ml tiriamų junginių tirpalą (1 mg/ml).

Mėgintuvėlio turinys sumaišytas ir po 20 minučių laikymo tamsoje išmatuotas tirpalo šviesos sugertis prie 515 nm bangos ilgio.

**Palyginamojo tirpalo ruošimas.** Į mėgintuvėlį įpilta 3 ml DMSO ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.

**Etaloninio DPPH tirpalo ruošimas.** 0,0024 g DPPH radikalo tirpinta metanolyje 100 ml talpos matavimo kolbutėje [104].

Slopinimas apskaičiuotas pagal (2) formulę:

$$\text{slopinimas}(\%) = \frac{A_B - A_A}{A_B} \cdot 100 \quad (2)$$

Čia:

$A_B$  – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis;

$A_A$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.

## 2.10. Biologiškai aktyvių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Šis metodas nustato junginio redukuojančias savybes, kuris paremtas  $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ pavirtimu į  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ (mėlyna spalva) esant 593 nm.

Mėginiai 100  $\mu\text{L}$  sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu ir pakaitinti iki 37 °C 10 min. Reakcijos mišinys išmatuotas esant 593 nm spektrofotometriškai. Reikšmė apskaičiuota pagal kalibravimo kreivę.

**FRAP reagento ruošimas.** 5 ml (10 mmol/l) TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) tirpalo ištirpinto 40 mmol/l HCl ir 5 ml  $\text{FeCl}_3$  (20 mmol/l) ir 50 ml acetato buferio (0,3 mol/l, pH=3,6) šviežiai paruošta ir pakaitinta iki 37°C.

**Kalibravimo kreivės ruošimas.** Paimta 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5  $\mu\text{mol/l}$   $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , įpilta 3 ml FRAP reagento ir skiesta vandeniu iki 10 ml. Mėginiai sumaišyti ir išmatuota šviesos sugertis prie 593 nm. Iš gautų duomenų nubraižyta kalibracinė kreivė [105].

### 2.10.1 lentelė. Šviesos sugertis, esant skirtingoms $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ tirpalo koncentracijoms

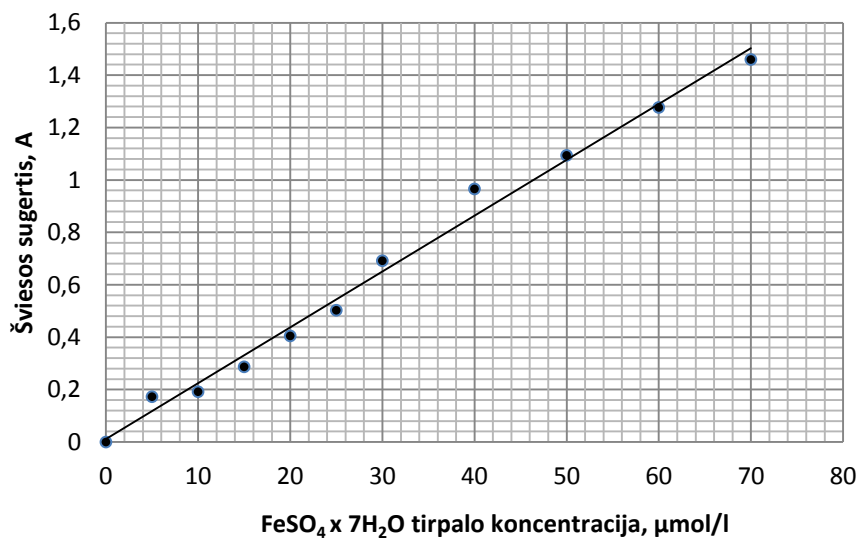
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ tirpalo koncentracija, įvertinant praskiedimą vandeniu, $\mu\text{mol/l}$	Šviesos sugertis, A
0	0
5	0,173
10	0,192
15	0,287
20	0,405
25	0,503



### 2.10.1 lentelės tęsinys

30	0,692
40	0,966
50	1,094
60	1,277
70	1,460

Pagal gautus duomenis nubraižyta kalibravimo kreivė (žr. 2.3 pav.)



2.3 pav. Šviesos sugerties priklausomybė nuo FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O tirpalo koncentracijos

### 2.11. Biologiškai aktyviųjų junginių redukcinių savybių nustatymas

#### Reagentai:

- Natrio fosfatinis buferis 0,2 M (pH=6,6);
- 1 % K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>];
- 10 % Trichloracto rūgštis;
- 0,1 % FeCl<sub>3</sub>.

Paruošti biologiškai aktyviųjų junginių tirpalai (1 mg/ml). Į 1 ml mėginius supilta 2,5 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 2,5 ml K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. Mėginiai sumaišyti ir inkubuoti 50 °C temperatūroje 20 min. Po to pridėta 2,5 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišyta. Centrifuguota 10 min.

Viršutinio tirpalo (2,5 ml) sumaišyta su 2,5 ml distiliuotu vandeniu ir 0,5 ml 0,1 % FeCl<sub>3</sub>. Mėginiai išmatuoti esant 700 nm bangos ilgiui. Didesnė šviesos sugertis reiškė didesnes redukcines savybes [106].

## 2.12. Biologiškai aktyvių junginių 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonrūgšties)diamonio druskos slopinimo nustatymas

ABTS metodas yra paremtas radikalo anijono slopinimu. ABTS yra gaunamas pridėdant jį į kalio persulfato tirpalą. Radikalo anijonas turi mėlynai-žalią spalvą ir šviesos sugertis išmatuota esant 734 nm.

Į reakcijos mišinį, turintį 50 µl (1000 µg/ml) junginių, įpilta 1 ml 100 µM ABTS (paruoštas sumaišant 2 mM ABTS su 0,17 mM kalio persulfatu, kuris ištirpintas 20 mM fosfato buferyje (pH=7,4) ir buvo laikomas per naktį). Nustatytas radikalo ABTS slopinimas [107].

## 2.13. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas rapsuose (*Brassica napus* L.)

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas rapsuose paremtas šviesos sugerties nustatymu spektrofotometru esant bangos ilgiams:

- chlorofilui *a* (662 nm);
- chlorofilui *b* (644 nm);
- karotinoidams (441 nm).

Chlorofilo *a* ir *b* kiekio nustatymui 0,1 g rapsų lapų susmulkinta grūstuvėlyje. Įpilta 20 ml 96 % etanolio, sumaišyta iki vientisos masės ir nufiltruota. Filtratas supiltas į matavimo kiuvetę ir matavimai atlikti spektrofotometru esant 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidams) bangų ilgiams [108].

Išmatavus augalų ekstrakto šviesos sugertį, apskaičiuota pigmentų koncentracija (mg/l) naudojantis (3-7) formulėmis:

$$\text{Chlorofilo } a \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_a = 9,784 D_{662} - 0,99 D_{644}; \quad (3)$$

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_b = 21,426 D_{644} - 4,65 D_{662}; \quad (4)$$

$$C_a + C_b = 5,134 D_{662} + 20,436 D_{644}; \quad (5)$$

$$\text{Karotinoidų koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_{\text{karotinoidai}} = 4,695 D_{441} - 0,268 (C_a + C_b); \quad (6)$$

Pigmentų kiekis mg/100g apskaičiuotas pagal (7) formulę:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000} \quad (7)$$

Čia:

$C$  – pigmentų koncentracija, mg/l;

$V$  – pradinis ekstrakto tūris, ml;

$V_1$  – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

$V_2$  – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

$n$  – augalinė masė g.

#### 2.14. Mirozinazės aktyvumo nustatymas rapsuose (*Brassica napus* L.)

Rapsų audiniai 0,1 g susmulkinti ir ekstrahuoti 1 ml ekstrakcijos buferyje, kurį sudaro 10 mM Tris-HCl (pH=8,0), 1 mM EDTA, 1 % PVP (polivinilpirolidonas) ir 1 mM DTT (ditiotreitolis). Mišinys buvo maišomas 15 min 9000 4 °C ir laikomas 4 °C. Supernatantas turėjo fermentą mirozinazę, baltymus.

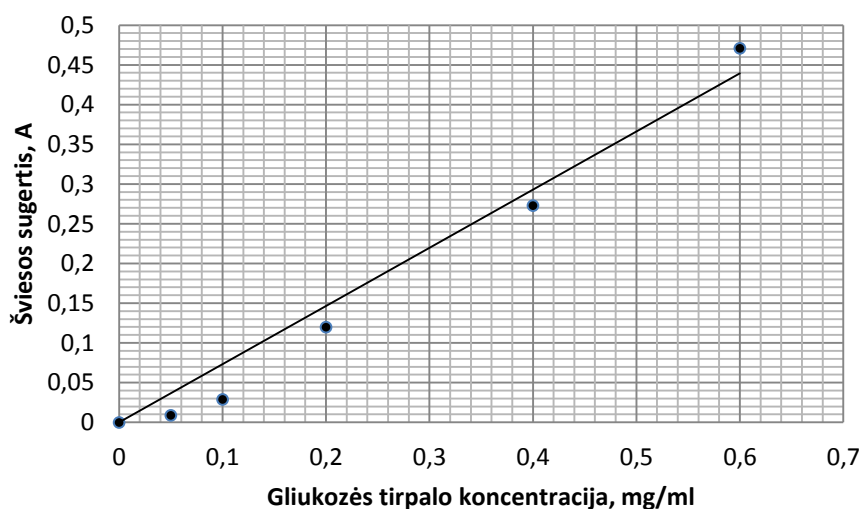
Mirozinazė nustatyta pagal gliukozę hidrolizės reakcijoje iš 2-propenil gliukozinolato (sinigrino), kuris buvo pridėtas į mirozinazės ekstraktą. Sinigrino tirpalas paruoštas taip: 15 mg sinigrino ištirpinta 1 ml distiliuotame vandenyje. Mėgintuvėliai skirstomi į reakcijos mėgintuvėlius ir kontrolinius mėgintuvėlius. Į reakcijos mėgintuvėlius įpilta 0,35 ml kalio fosfato buferio 33 mM (pH=6), turinčio 0,05 ml tiriamo tirpalo, ir 0,1 ml sinigrino. Kontroliniuose mėgintuvėliuose įpilta 0,35 ml kalio fosfato buferio ir 0,05 ml tiriamo tirpalo. Visi mėgintuvėliai inkubuoti 37 °C 30 min. Mirozinazės aktyvumas inaktyvuotas 100 °C 5 min. Po to 0,1 ml sinigrino tirpalo įpilta į kontrolinį mėgintuvėlį. Tuomet į mėgintuvėlius įpilta 2 ml o-toluidininio reagento, viskas sumaišyta ir įdėta 8 min į verdančią vonelę. Atšaldžius išmatuotas intensyvumas esant 540 nm (prieš vandenį ir o-toluidininis reagentas).

**Gliukozės kreivės paruošimas.** Paruošti 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 ir 0,6 mg/ml gliukozės tirpalai. Į mėgintuvėlius įpilta 0; 0,5; 1; 2; 4 ir 6 ml gliukozės (1 mg/ml) tirpalo, 4 ml o-toluidininio tirpalo ir iki 10 ml distiliuoto vandens. Šviesos sugertis buvo matuojama esant 540 nm. Iš gautų duomenų nubraižyta gliukozės kreivė [109].

2.14.1 lentelė. Šviesos sugertis, esant skirtingoms gliukozės tirpalo koncentracijoms

Gliukozės tirpalo koncentracija, mg/ml	Šviesos sugertis, A
0	0
0,05	0,009
0,1	0,029
0,2	0,120
0,4	0,273
0,6	0,471

Pagal gautus duomenis nubraižyta gliukozės kalibravimo kreivė (žr. 2.4 pav.)



2.4 pav. Šviesos sugerties priklausomybė nuo gliukozės tirpalo koncentracijos

Mirozinazės aktyvumas apskaičiuotas (vnt/ml) pagal (8) formulę:

$$x = \frac{m \cdot V_1}{180,1 \cdot V_2 \cdot t} \quad (8)$$

Čia:

m – gliukozės kiekis,  $\mu\text{g}$ ;

$V_1$  – bendras tirpalo kiekis, ml;

$V_2$  – sunaudoto enzimo kiekis, ml;

t – inkubacijos laikas, min.

### 2.15. Gliukozinolatų nustatymas rapsuose (*Brassica napus* L.)

**Reagentai:** fosfatinis buferis (pH=7); askorbo rūgštis (5 %),  $\text{ZnSO}_4$  (30 %),  $\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (15 %), o-toluidininis tirpalas, tiogliukozidazė (0,001g/100ml).

#### Darbo eiga:

Į 2 mėgintuvėlius įdėta po 0,5 g susmulkintų rapsų audinių. Mirozinazės inaktyvacijai įpilta 20 ml fosfatinio buferio, sumaišyta ir kaitinta 5 min verdančioje vandens vonelėje, po to atšaldyta iki 37 °C. Į 1 bandymo mėgintuvėlį įpilta 5 ml mirozinazės tirpalo ir 1 ml 5 % vitamino C, į 1 kontrolinį mėgintuvėlį įpilta 5 ml fosfatinio buferio ir 1 ml 5 % vitamino C. Mėgintuvėliai sumaišyti ir įdėti į termostatą 37 °C. Po hidrolizės paimtos 100 ml kolbos ir įpilta 60 ml

distiliuoto vandens, 2 ml ZnSO<sub>4</sub>, ir 2 ml 15 % K<sub>4</sub> [Fe(CN)<sub>6</sub>] ir po 10 min praskiestos vandeniui iki žymės.

Į mėgintuvėlius įpilta 1 ml filtrato ir 4 ml o-toluidininio reagento, viskas sumaišyta ir įdėta 8 min į verdančią vonelę. Atšaldžius išmatuotas intensyvumas esant 650 nm (prieš vandenį ir o-toluidininį reagentą).

Gliukozės kiekis nustatytas iš kreivės (žr. 12 pav.), kai ruošiami gliukozės tirpalai, turintys 0,05-0,6 mg/ml gliukozės. Po o-toluidininio tirpalo įdėjimo buvo atliktas spektrofotometrinis nustatymas. Gliukozė, įeinanti į gliukozinolatų sudėtį, nustatyta pagal skirtumą tarp bandinio ir kontrolės [110].

Gliukozinolatų kiekis (%) apskaičiuotas pagal (9) formulę:

$$x = \frac{M \cdot a \cdot V \cdot 100}{M_1 \cdot n} \quad (9)$$

Čia:

M – gliukozinolato molekulinė masė;

(421,1 – vidutiniškai rapsams).

a – gliukozės kiekis g/ml;

M<sub>1</sub> – gliukozės molekulinė masė;

n – masė, g;

V – hidrolizato tūris, ml.

Gliukozinolatų kiekis (μmol/g) apskaičiuotas pagal (10) formulę:

$$x = \frac{M \cdot a \cdot V}{M_1 \cdot n \cdot 10^{-6} \cdot 421,1} \quad (10)$$

Čia:

M – gliukozinolato molekulinė masė;

(421,1 – vidutiniškai rapsams).

a – gliukozės kiekis g/ml;

M<sub>1</sub> – gliukozės molekulinė masė;

n – masė, g;

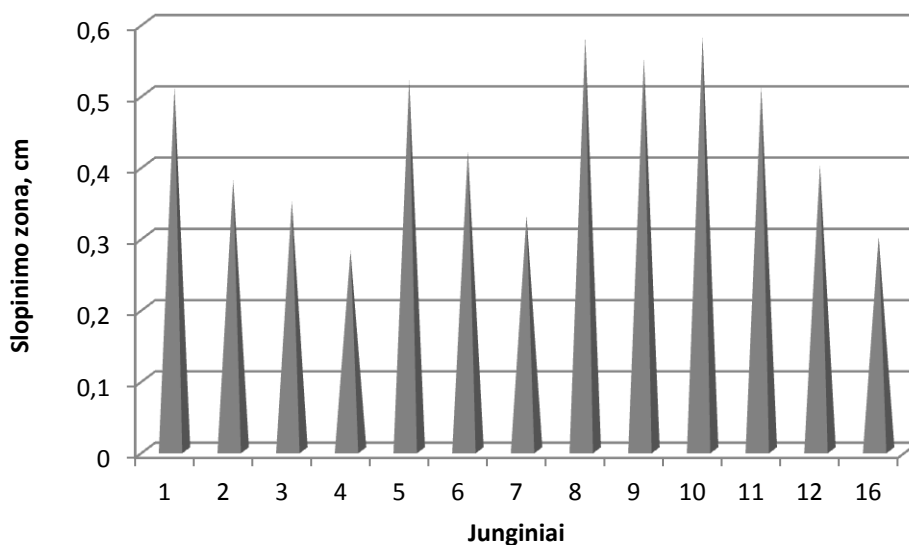
V – hidrolizato tūris, ml.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Biologiškai aktyvių junginių antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaru difuziniu metodu

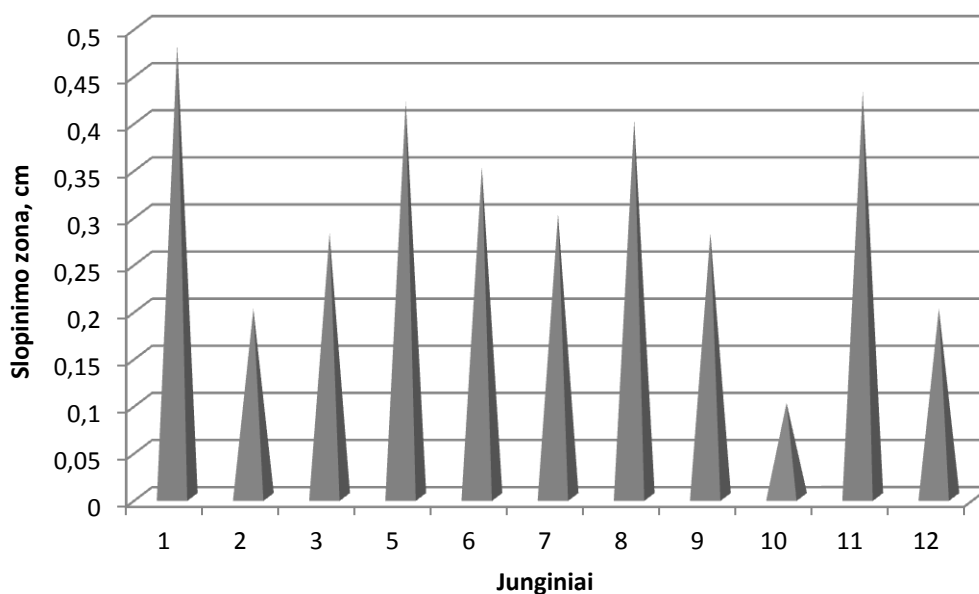
Atliekant bandymą buvo naudotos *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* bakterijų suspensijos 50  $\mu$ l ir biologiškai aktyvūs junginiai 1000  $\mu$ g/ml ir 500  $\mu$ g/ml.

Gauti rezultatai pateikti 3.1 ir 3.2 paveiksluose.



**3.1 pav.** Biologiškai aktyvių junginių tirpalų (1000  $\mu$ g/ml) antibakterinio aktyvumo prieš *Rhizobium radiobacter* įvertinimas agaru difuziniu metodu

Tyrimo rezultatai (žr. 3.1 pav.) parodė, kad didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Rhizobium radiobacter* pasižymėjo 3,3'-[9-metilkarbazol-3-il)imino]]bis(*N*'-3-indoliden)propanhidrazidas (**8**) ir *N*-(2,5-dimetilpirol-1-il)-3-[3-dimetilpirol-1-il)amino]-3-oksopropil)-(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanamidas (**10**), kurių slopinimo zona buvo atitinkamai 0,58 cm ir 0,58 cm, esant junginių koncentracijai 1000  $\mu$ g/ml. Ampicilino slopinimo zona buvo 2,9 cm. Likusieji **13-15** ir **17-21** junginiai antibakteriniu aktyvumu prieš *Rhizobium radiobacter* nepasižymėjo.



**3.2 pav.** Biologiškai aktyvių junginių tirpalų (500 µg/ml) antibakterinio aktyvumo prieš *Rhizobium radiobacter* įvertinimas agaru difuziniu metodu

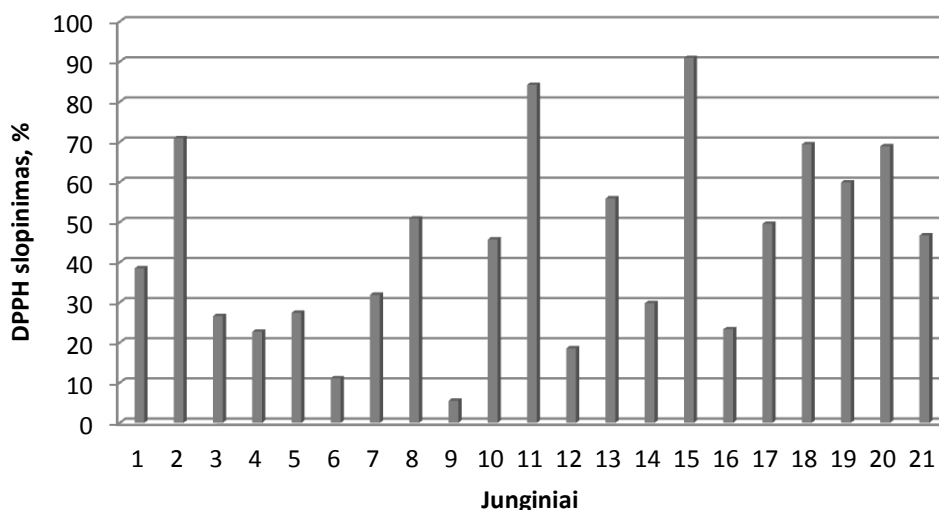
Tyrimo rezultatai (žr. 3.2 pav.) parodė, kad didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Rhizobium radiobacter* pasižymėjo *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidin-3-karboxamidas (**1**) ir 3-(4-amino-5-tioksa-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas (**11**), kurių slopinimo zona buvo atitinkamai 0,48 cm ir 0,43 cm, esant jų koncentracijai 500 µg/ml. Likusieji **4**, **13-21** junginiai antibakteriniu aktyvumu prieš *Rhizobium radiobacter* nepasižymėjo.

Tirti junginiai neslopino *Xanthomonas campestris* bakterijų augimo, išskyrus **16** junginys, esant jo 1000 µg/ml koncentracijai.

### 3.2. Biologiškai aktyvių junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas prieš DPPH

Eksperimentui ruošiantis tiriamieji junginiai (1 mg/ml) buvo ištirpinti dimetilsulfokside (DMSO).

Atlikus bandymą su biologiškai aktyviais junginiais, gauti rezultatai pateikti 3.3 paveiksle.



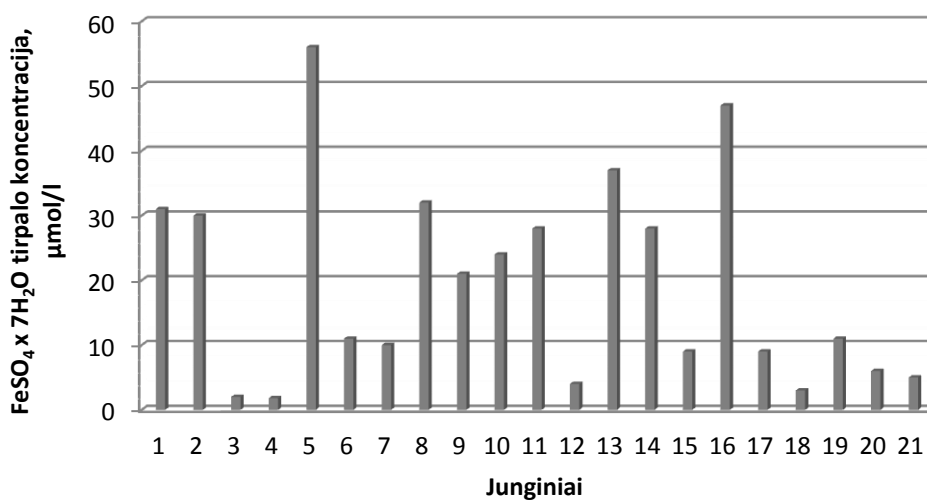
**3.3 pav.** Biologiškai aktyvių junginių DPPH radikalo slopinimas

Tyrimo rezultatai (žr. 3.3 pav.) parodė, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo 3-(4-amino-5-tioakso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas (**11**) ir 3-[(9-metilkarbazol-3-il)karbamotioilamino]propano rūgštis (**15**), kurių DPPH slopinimas buvo atitinkamai 90,9 % ir 84,2 %.

### 3.3. Antioksidacinio aktyvumo biologiškai aktyviuose junginiuose įvertinimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Bandymui buvo naudoti biologiškai aktyvių junginių (1-21) 1000 µg/ml koncentracijos tirpalai.

Gauti rezultatai pateikti 3.4 paveiksle.



**3.4 pav.** Biologiškai aktyvių junginių antioksidacinis aktyvumas

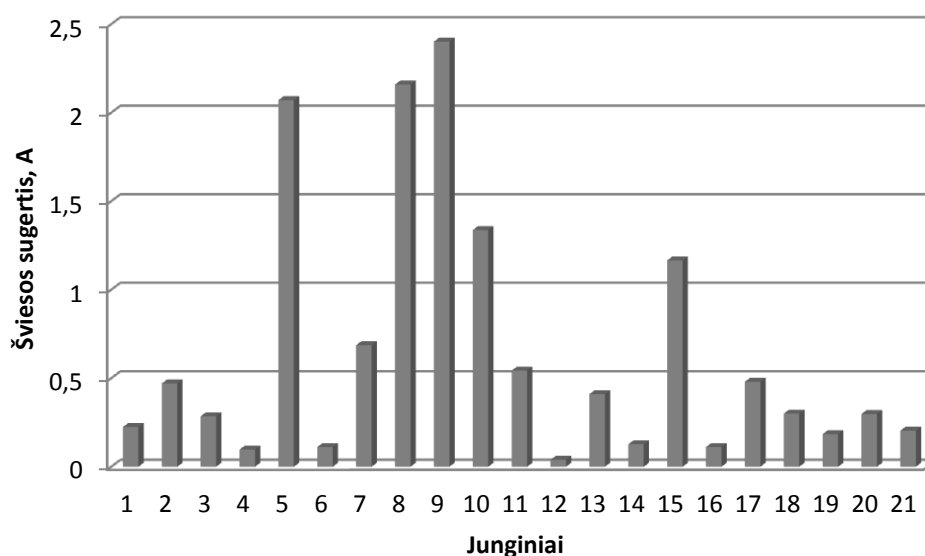


Remiantis diagramos duomenimis matyti (žr. 3.4 pav.), kad 3-[(3-hidrazino-3-oksopropil)(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanhidrazide (**5**) didžiausias antioksidacinis aktyvumas – 56  $\mu\text{mol/l}$ , o mažiausias **3** ir **4** junginiuose atitinkamai – 2  $\mu\text{mol/l}$  ir 1,8  $\mu\text{mol/l}$ .

### 3.4. Biologiškai aktyvių junginių redukcinių savybių įvertinimas

Eksperimentui atlikti buvo naudoti biologiškai aktyvių junginių (1-21) 1000  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos tirpalai.

Redukcinių savybių įvertinimas pateiktas 3.5 paveiksle.



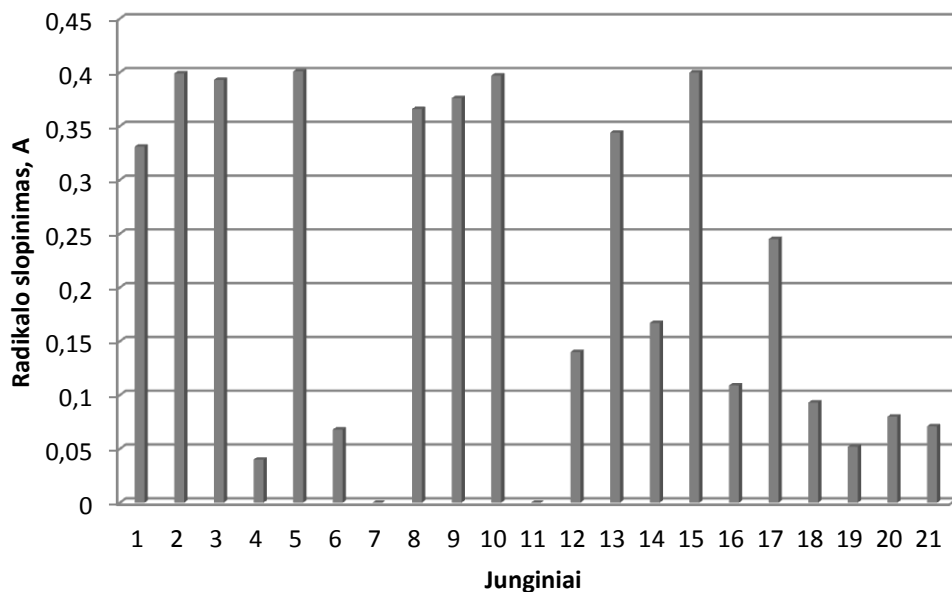
### 3.5 pav. Biologiškai aktyvių junginių redukcinių savybių įvertinimas

Iš diagramos duomenų (žr. 3.5 pav.) matyti, kad didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo 3,3'-(fenilimino)bis(*N*'-benziliden)propanhidrazidas (**9**) – 2,401 A. Taip pat didesnėmis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo **8** junginys – 2,159 A bei **5** junginys – 2,071 A. Mažesnėmis redukcinėmis savybėmis – **4** (0,097 A), **6** (0,111 A), **16** (0,111 A) junginiai, o mažiausiomis **12** junginys – 0,039 A.

### 3.5. Biologiškai aktyvių junginių 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonrūgšties)diamonio druskos slopinimo įvertinimas

Eksperimentui atlikti buvo naudojami biologiškai aktyvūs junginiai.

Gauti rezultatai pateikti 3.6 paveiksle.



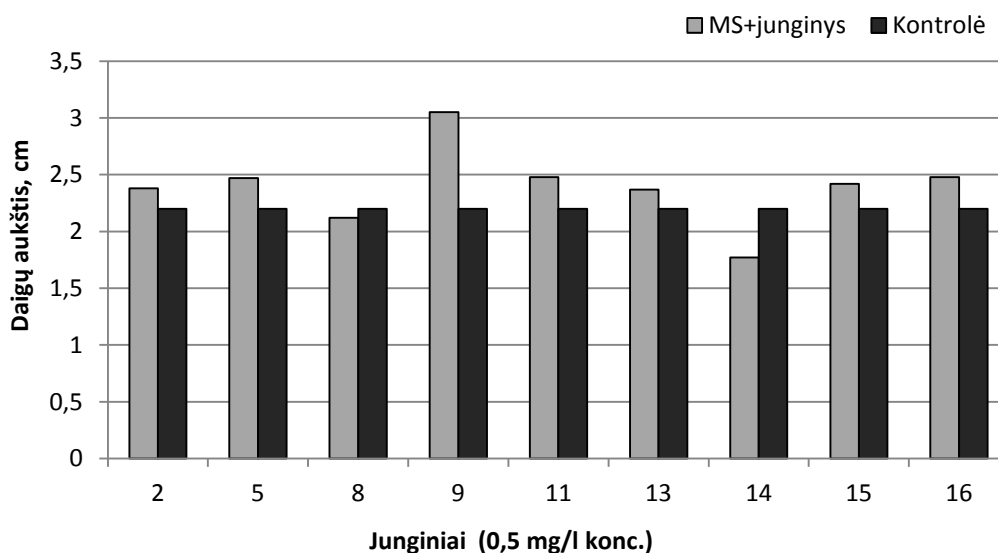
**3.6 pav.** Biologiškai aktyvių junginių 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonrūgšties)diamonio druskos slopinimo įvertinimas

Remiantis diagramos duomenimis matyti (žr. 3.6 pav.), kad didžiausias radikalo slopinimas pasireiškė **2, 3, 5, 10 ir 15** junginiuose, iš kurių didžiausias buvo 3-[(3-hidrazino-3-oksopropil)-(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanhidrazide (**5**) – 0,401 A. Mažiausias slopinimas pasireiškė **4** junginyje – 0,040 A, o **7 ir 11** junginiai visai neslopino radikalo.

### 3.6. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų įvertinimas rapsuose

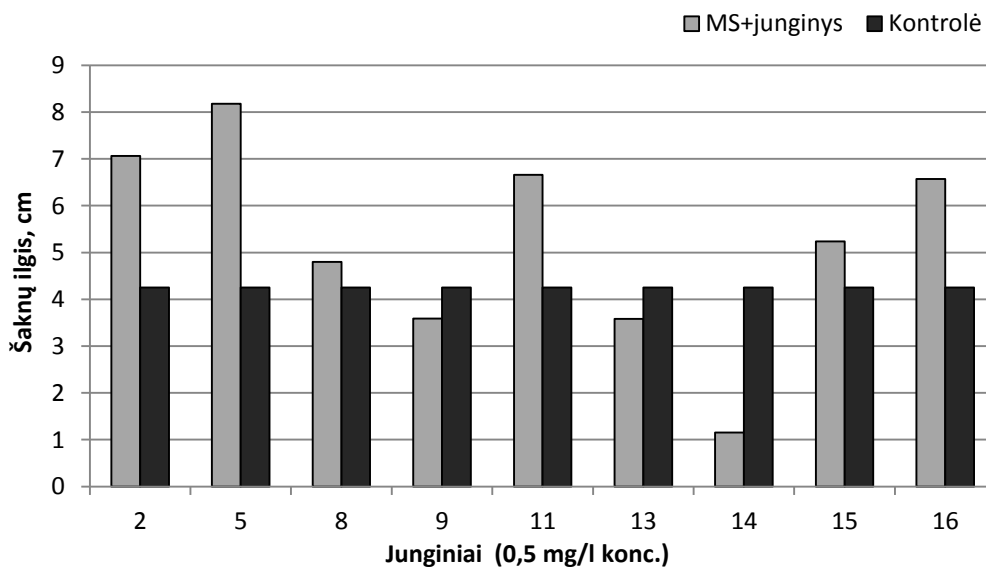
Bandymui buvo naudojami **2, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16** biologiškai aktyvūs junginiai bei rapsai. Rapsai po sterilinimo buvo sėjami į *Petri* lėkšteles su maitinamąja terpe ir skirtinga (0,5 mg/l ir 2 mg/l) koncentracija biologiškai aktyviais junginiais. Sudygus rapsams įvertintas jų daigų aukštis, šaknų ilgis bei biomasė. Taip pat buvo nustatytas chlorofilo *a*, chlorofilo *b* bei karotinoidų kiekis sudygusiuose skirtingose terpėse rapsuose.

Skirtingose terpėse sudygusių rapsų daigų aukščio, šaknų ilgio bei biomasės įvertinimas pateiktas 3.7 – 3.12 paveiksluose.



**3.7 pav.** Biologiškai aktyviųjų junginių (0,5 mg/l) įtaka rapsų daigų aukščiui daiginant rapsus MS terpėje

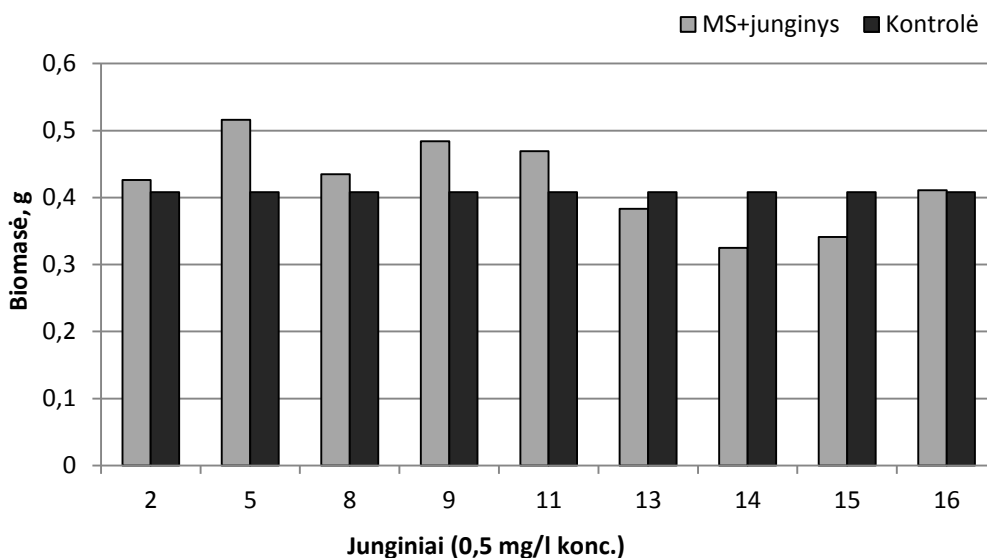
Iš gautų tyrimo rezultatų matyti (žr. 3.7 pav.), kad rapsų daigai buvo aukščiausi augalams augant MS terpėse, papildytose **9** junginiu – 3,3'-(fenilimino)bis(*N*'-benziliden)propanhidrazidu. Gauta, kad dėl šio junginio 0,5 mg/l koncentracijos poveikio daigų aukštis buvo 1,4 karto didesnis, lyginant su kontroliniu variantu.



**3.8 pav.** Biologiškai aktyviųjų junginių (0,5 mg/l) įtaka rapsų šaknų ilgiui daiginant rapsus MS terpėje

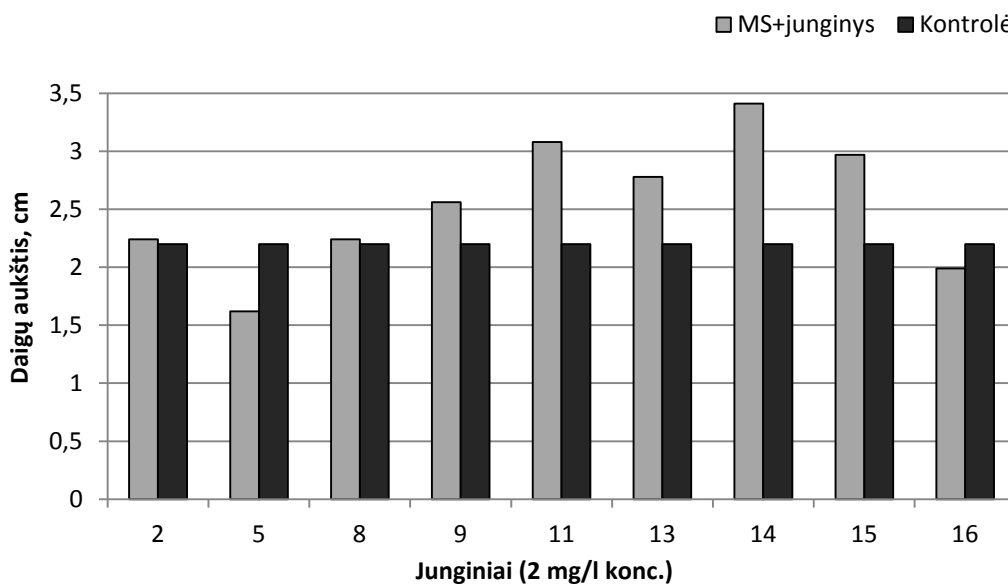
Tyrimo rezultatai parodė (žr. 3.8 pav.), kad rapsų šaknys buvo ilgiausios augalams augant MS terpėse, papildytose junginiu **5** – 3-[(3-hidrazino-3-oksopropil)(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanhidrazidu, palyginti su MS terpėje be papildomų junginių augusiais rapsais. Dėl šio

junginio 0,5 mg/l koncentracijos poveikio šaknys buvo 1,9 karto ilgesnės, lyginant su kontroliniu variantu.



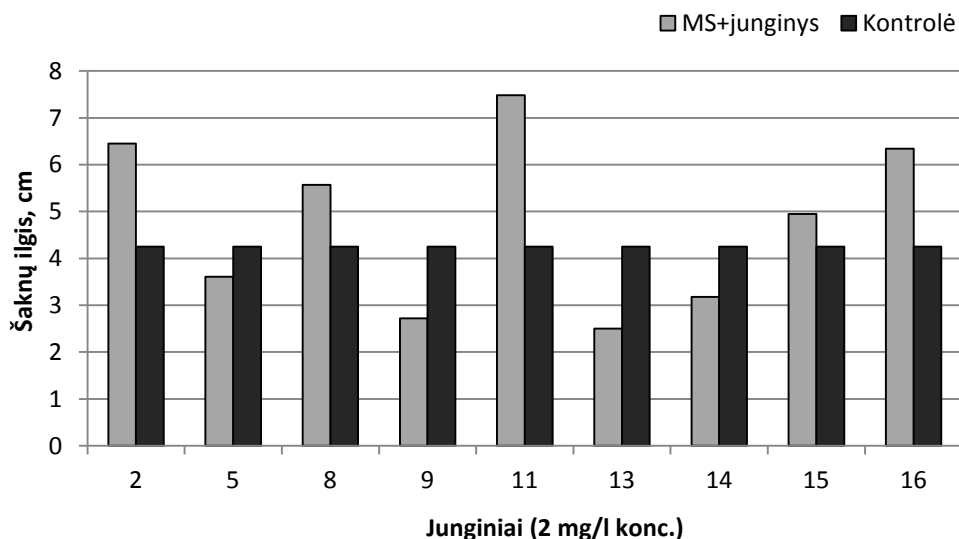
**3.9 pav.** Biologiškai aktyviųjų junginių (0,5 mg/l) įtaka rapsų biomasėi daiginant rapsus MS terpėje

Iš gautų tyrimo rezultatų matyti (žr. 3.9 pav.), kad didžiausia rapsų biomasė buvo MS terpėje su 5 junginiu – 3-[(3-hidrazino-3-oksopropil)(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanhidrazidu (koncentracija 0,5 mg/l). Dėl šio junginio poveikio rapsų biomasė 1,3 karto buvo didesnė, lyginant su kontroliniu variantu.



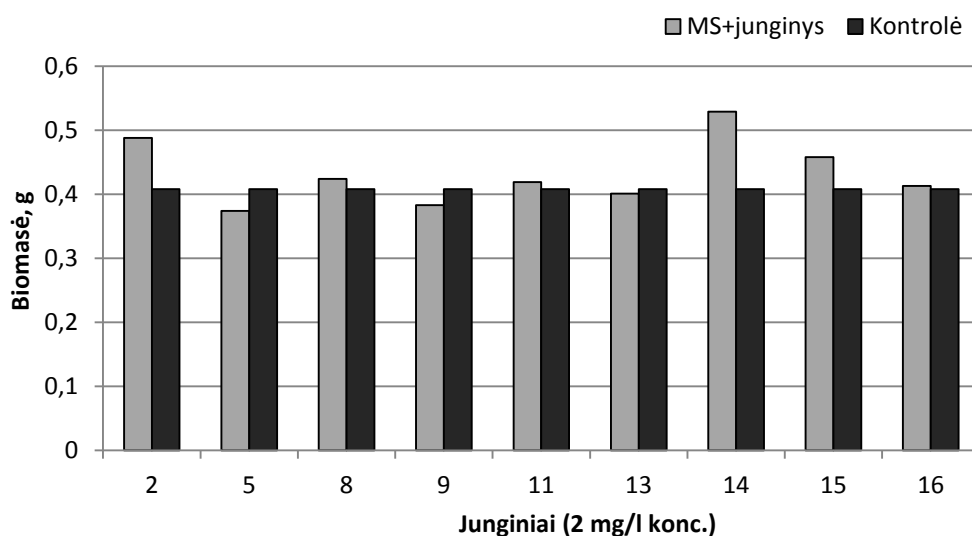
**3.10 pav.** Biologiškai aktyviųjų junginių (2 mg/l) įtaka rapsų daigų aukščiui daiginant rapsus MS terpėje

Iš gautų tyrimo rezultatų matyti (žr. 3.10 pav.), kad rapsų daigai buvo aukščiausi augalams augant MS terpėse, papildytose 1-(9-metilkarbazol-3-il)dihidro-2,4-(1*H*,3*H*)-pirimidindionu (**14**). Gauta, kad dėl šio junginio 2 mg/l koncentracijos poveikio daigų aukštis buvo 1,6 karto didesnis, lyginant su kontroliniu variantu.



**3.11 pav.** Biologiškai aktyviųjų junginių (2 mg/l) įtaka rapsų šaknų ilgiui daiginant rapsus MS terpėje

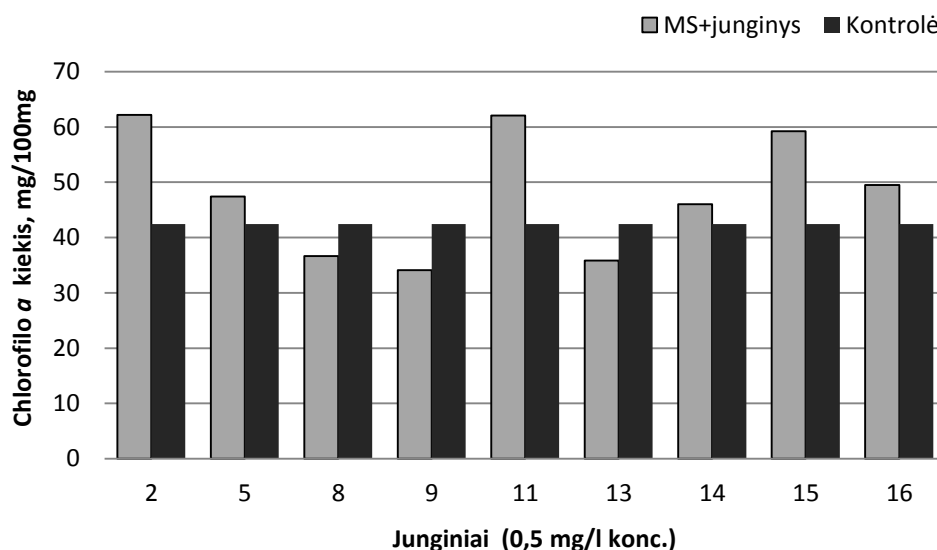
Tyrimo rezultatai parodė (žr. 3.11 pav.), kad rapsų šaknys buvo ilgiausios augalams augant MS terpėse, papildytose 3-(4-amino-5-tiokso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinu (**11**), lyginant su MS terpėje be papildomų junginių augusiais rapsais. Dėl šio junginio 2 mg/l koncentracijos poveikio šaknys buvo 1,8 karto ilgesnės, lyginant su kontroliniu variantu.



**3.12 pav.** Biologiškai aktyviųjų junginių (2 mg/l) įtaka rapsų biomasei daiginant rapsus MS terpėje

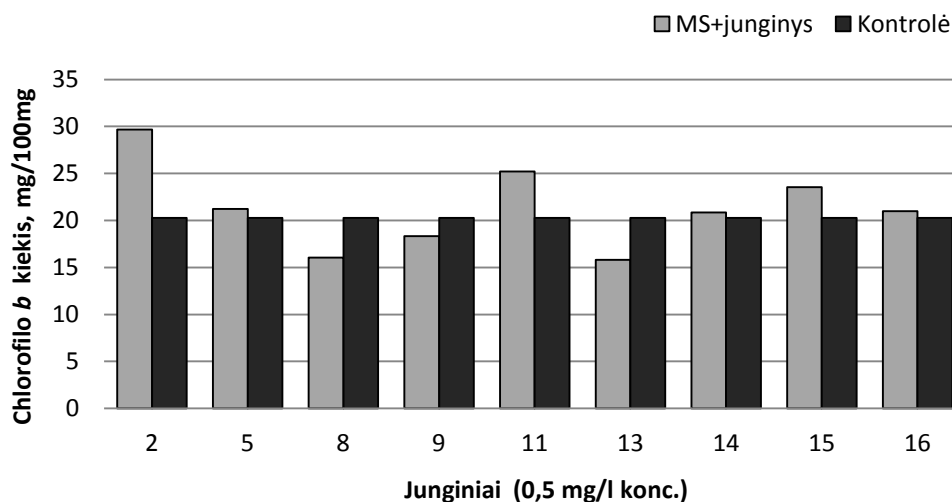
Iš gautų tyrimo rezultatų matyti (žr. 3.12 pav.), kad didžiausia rapsų biomasė buvo MS terpėje su 1-(9-metilkarbazol-3-il)dihidro-2,4-(1*H*,3*H*)-pirimidindionu (**14**) (koncentracija 2 mg/l). Dėl šio junginio poveikio rapsų biomasė 1,3 karto buvo didesnė, lyginant su kontroliniu variantu.

Chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų kiekio nustatymo skirtingose terpėse sudyguosiuose rapsuose bandymo rezultatai pateikti 3.13 – 3.18 paveiksluose.



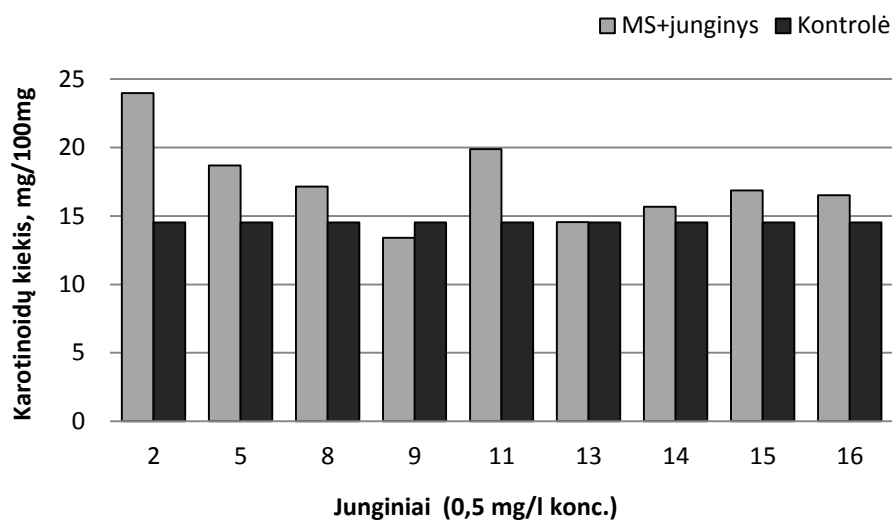
**3.13 pav.** Biologiškai aktyviųjų junginių (0,5 mg/l) įtaka chlorofilo *a* kiekiui rapsuose *in vitro*

Apibendrinus rezultatus (žr. 3.13 pav.) matyti, kad didžiausias chlorofilo *a* kiekis rapsuose buvo augintuose MS terpėse, papildytose 1-(9-metilkarbazol-3-il)-3-(2-tioakso-3*H*-1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidinu (**2**) ir 3-(4-amino-5-tioakso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinu (**11**). Gauta, kad dėl šių junginių (koncentracija 0,5 mg/l) poveikio chlorofilo *a* kiekis buvo 1,5 karto didesnis, lyginant su kontroliniu variantu.



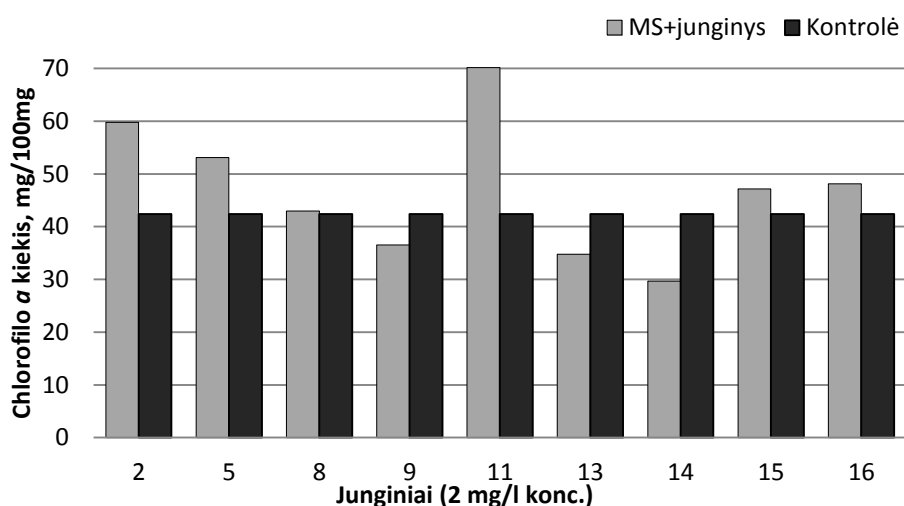
**3.14 pav.** Biologiškai aktyvių junginių (0,5 mg/l) įtaka chlorofilo *b* kiekiui rapsuose *in vitro*

Iš gautų duomenų matyti (žr. 3.14 pav.), kad chlorofilo *b* kiekis buvo didžiausias rapsams, augant MS terpėse, papildytose 1-(9-metilkarbazol-3-il)-3-(2-tiokso-3*H*-1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidinu (**2**). Dėl šio junginio (koncentracija 0,5 mg/l) poveikio chlorofilo *b* kiekis buvo 1,5 karto didesnis, lyginant su kontroliniu variantu.



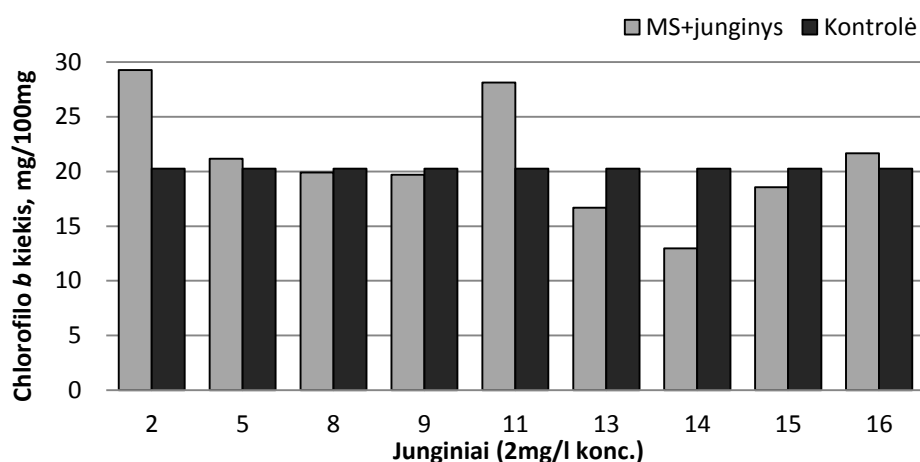
**3.15 pav.** Biologiškai aktyvių junginių (0,5 mg/l) įtaka karotinoidų kiekiui rapsuose *in vitro*

Tyrimo rezultatai (žr. 3.15 pav.) parodė, kad didžiausias karotinoidų kiekis buvo rapsuose augintuose MS terpėje su 1-(9-metilkarbazol-3-il)-3-(2-tiokso-3*H*-1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidinu (**2**) esant 0,5 mg/l koncentracijai. Karotinoidų kiekis buvo 1,7 karto didesnis, palyginti su rapsais, augintais kontroliniame variante.



**3.16 pav.** Biologiškai aktyvių junginių (2 mg/l) įtaka chlorofilo *a* kiekiui rapsuose *in vitro*

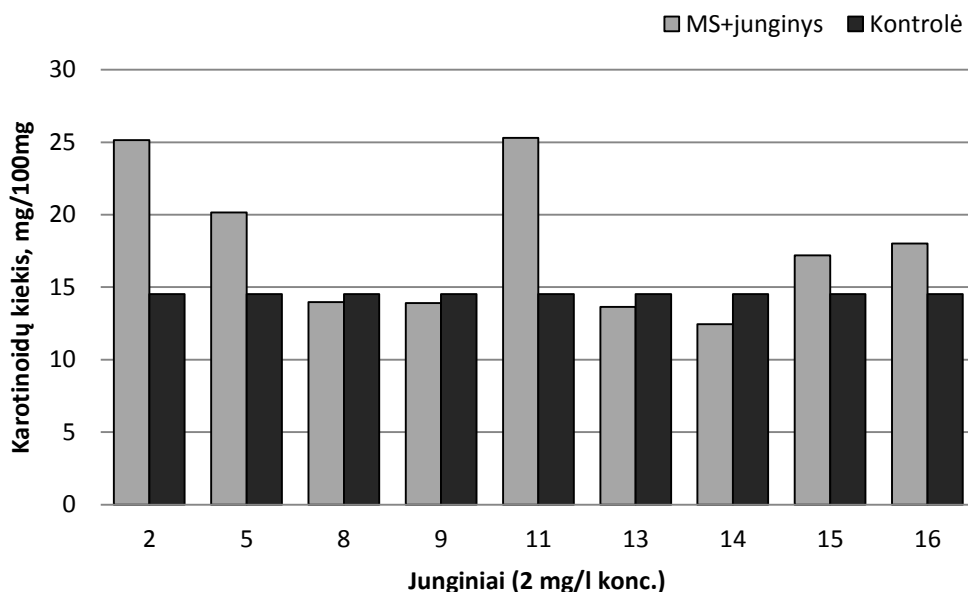
Apibendrinus rezultatus (žr. 3.16 pav.) matyti, kad didžiausias chlorofilo *a* kiekis rapsuose buvo augintuose MS terpėse, papildytose 3-(4-amino-5-tiokso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinu (**11**). Gauta, kad dėl šio junginio (koncentracija 2 mg/l) poveikio chlorofilo *a* kiekis buvo 1,7 karto didesnis, lyginant su kontroliniu variantu.



**3.17 pav.** Biologiškai aktyvių junginių (2 mg/l) įtaka chlorofilo *b* kiekiui rapsuose *in vitro*

Iš gautų duomenų matyti (žr. 3.17 pav.), kad chlorofilo *b* kiekis buvo didžiausias rapsams, augant MS terpėse, papildytose 1-(9-metilkarbazol-3-il)-3-(2-tiokso-3*H*-1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidinu (**2**) ir 3-(4-amino-5-tiokso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinu (**11**). Dėl šių junginių (koncentracija 2 mg/l) poveikio chlorofilo *b* kiekis buvo 1,4 karto didesnis, lyginant su kontroliniu variantu.





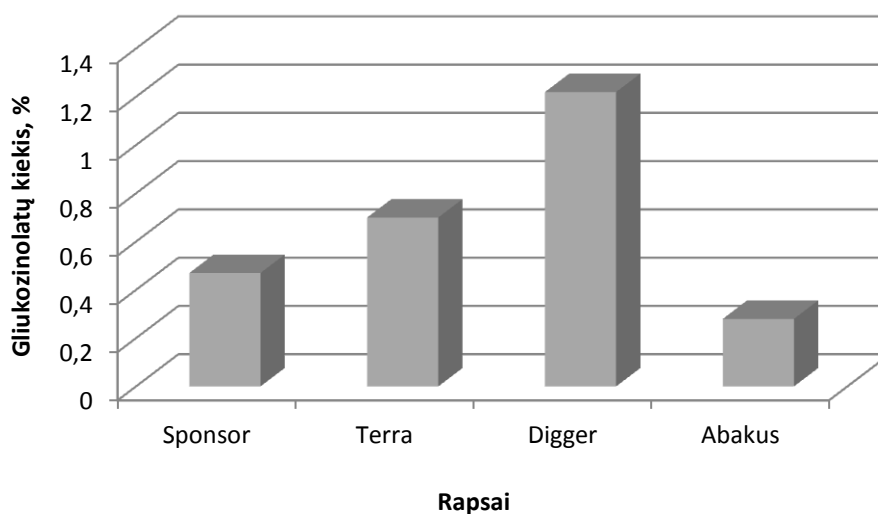
**3.18 pav.** Biologiškai aktyvių junginių (2 mg/l) įtaka karotinoidų kiekiui rapsuose *in vitro*

Tyrimo rezultatai (žr. 3.18 pav.) parodė, kad didžiausias karotinoidų kiekis buvo rapsuose augintuose MS terpėse su 1-(9-metilkarbazol-3-il)-3-(2-tioksa-3*H*-1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidinu (**2**) ir 3-(4-amino-5-tioksa-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinu (**11**) esant 2 mg/l koncentracijai. Karotinoidų kiekis buvo 1,7 karto didesnis, lyginant su rapsais, augintais kontroliniame variante.

### 3.7. Gliukozinolatų kiekio nustatymas rapsuose

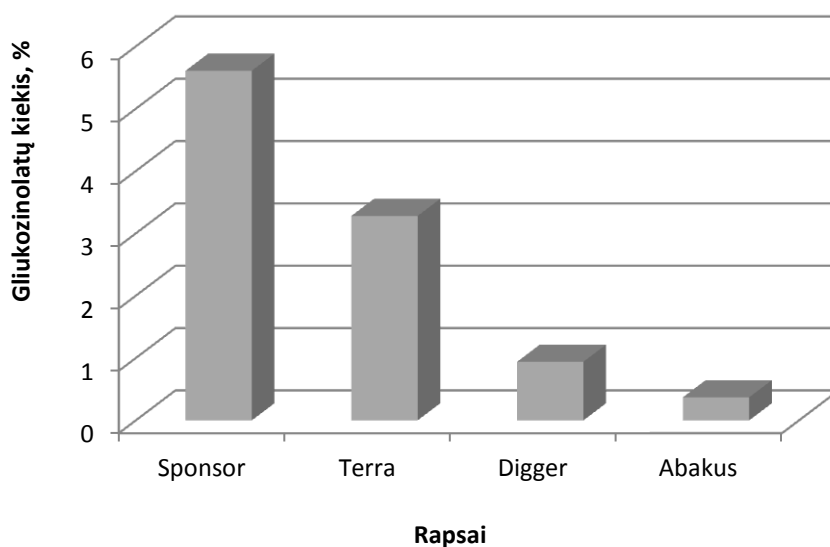
Gliukozinolatų kiekio nustatymas buvo atliktas su „Sponsor“, „Terra“, „Digger“ ir „Abakus“ veislių rapsais. Gliukozinolatų kiekis nustatytas rapsų sėklose, daiguose ir jų kaliaus kultūrose. Taip pat „Abakus“ veislės rapsų kaliaus kultūrose, esant **2**, **11**, **14** biologiškai aktyvių junginių poveikiui. Bandymui paimta po 0,5 g medžiagos.

Tyrimo rezultatai pateikti 3.19-3.22 paveiksluose.



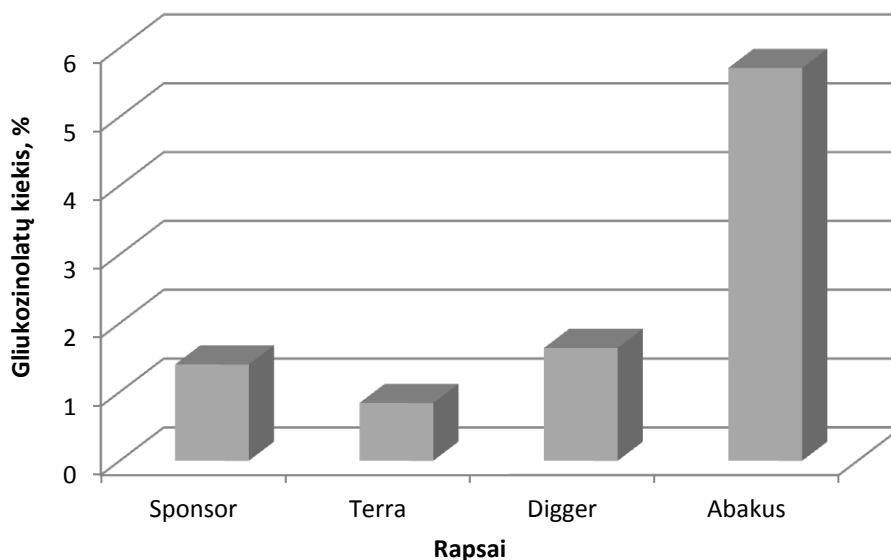
**3.19 pav.** Gliukozinolatų kiekis rapsų sėklose

Tyrimo rezultatai parodė (žr. 3.19 pav.), kad mažiausias gliukozinolatų kiekis rapsų sėklose buvo nustatytas „Abakus“ veislės rapsuose, 4,3 karto mažesnis, lyginant su „Digger“ veislės rapsais, kuriuose gliukozinolatų kiekis buvo didžiausias.



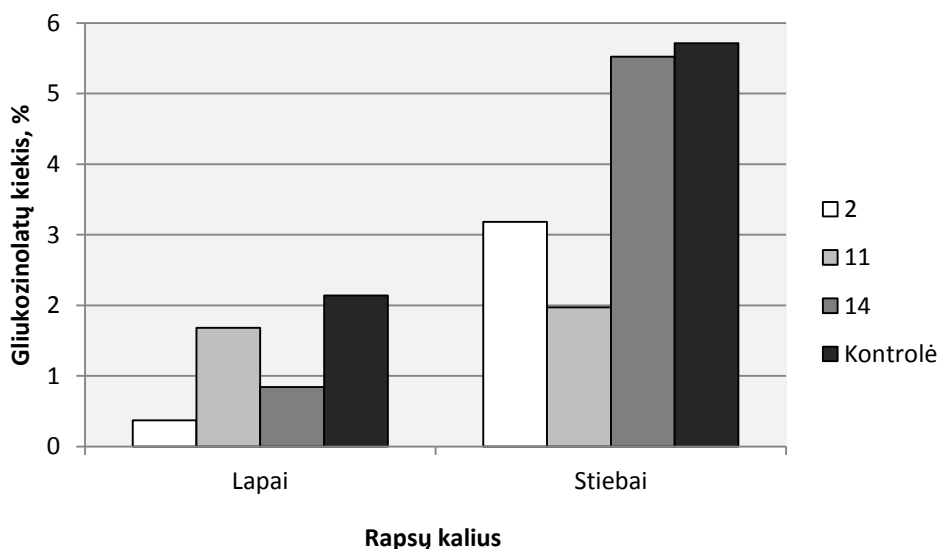
**3.20 pav.** Gliukozinolatų kiekis rapsų daiguose *in vitro*

Apibendrinus gautus rezultatus (žr. 3.20 pav.) nustatyta, kad mažiausias gliukozinolatų kiekis buvo „Abakus“ veislės rapsuose, 15,2 karto mažesnis lyginant su „Sponsor“ veislės rapsais, kuriuose gliukozinolatų kiekis buvo didžiausias.



**3.21 pav.** Gliukozinolatų kiekis rapsų kaliuje iš stiebų susiformavusių ant MS terpės su BAP+2,4-D *in vitro*

Remiantis diagramos duomenis (žr. 3.21 pav.) matyti, kad mažiausiai gliukozinolatų susikaupė „Terra“ veislės rapsų stiebuose. Jų buvo 6,8 karto mažiau už „Abakus“, 1,7 karto už „Sponsor“ ir 1,9 karto už „Digger“ rapsų stiebuose susikaupusių gliukozinolatų kiekį.



**3.22 pav.** Gliukozinolatų kiekis „Abakus“ rapsų kaliuje iš lapų ir stiebų susiformavusiame ant MS terpės su **2**, **11**, **14** tiriamaisiais junginiais *in vitro*

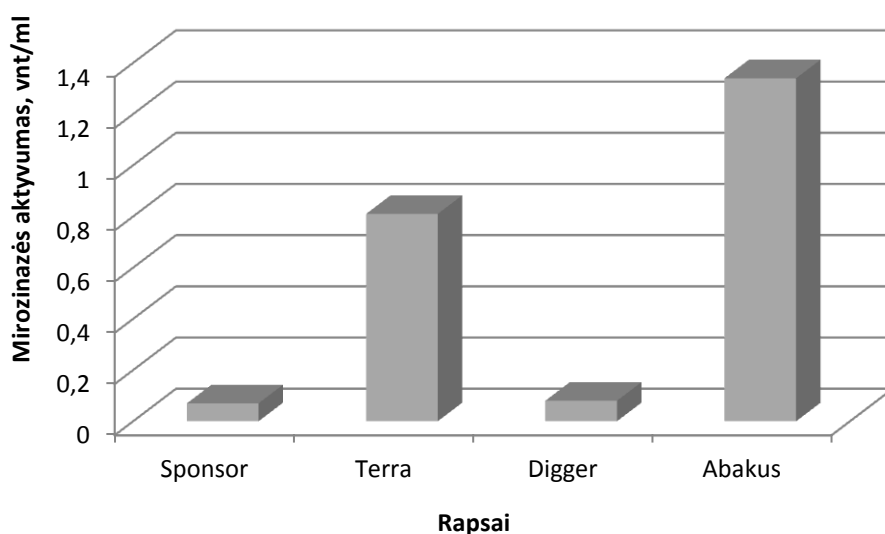
Apibendrinus rezultatus (žr. 3.22 pav.) matyti, kad tiriamasis junginys – 3-(4-amino-5-tioakso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas (**11**) nežymiai mažino gliukozinolatų kiekį rapsų kaliaus kultūroje iš lapų, tačiau efektyviai slopino rapsų kaliuje iš

stiebų. Nustatytas gliukozinolatų kiekis 2,9 karto mažesnis nei kontroliniame bandinyje. 1-(9-metilkarbazol-3-il)dihidro-2,4-(1*H*,3*H*)-pirimidindionas (**14**) taip pat stabiliai mažino gliukozinolatų kiekį rapsų kaliuje iš lapų ir stiebų. Tyrimų eigoje pastebėtas svarbus tiriamojo junginio – 1-(9-metilkarbazol-3-il)-3-(2-tiokso-3*H*-1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidino (**2**) poveikis. Remiantis rezultatais nustatyta, kad **2** junginys gliukozinolatus mažino rapsų kaliaus kultūroje ir iš lapų, ir iš stiebų. Rapsų kaliuje iš lapų gliukozinolatų kiekis 5,8 karto buvo mažesnis, o rapsų kaliuje iš stiebų 1,8 karto mažesnis, lyginant su kontrole.

### 3.8. Mirozinazės aktyvumo įvertinimas rapsuose

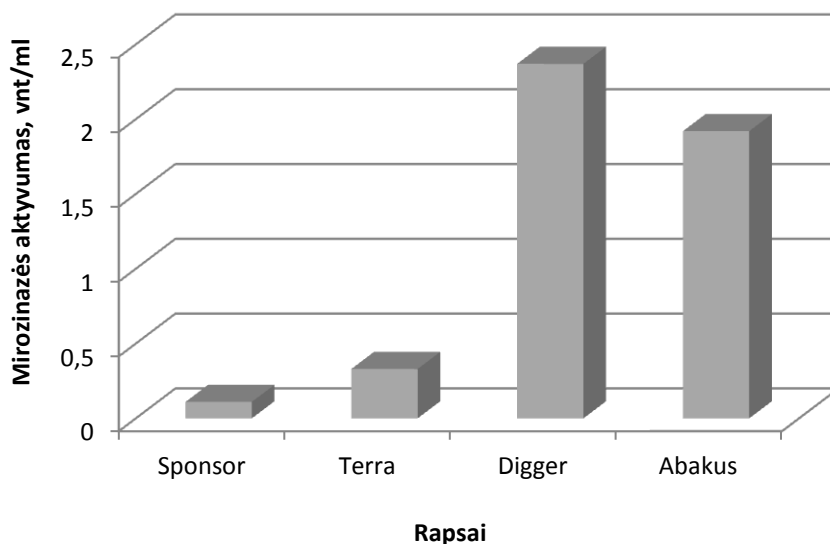
Mirozinazės aktyvumo įvertinimas buvo atliktas su „Sponsor“, „Terra“, „Digger“ ir „Abakus“ veislių rapsais. Aktyvumas iširtas rapsų sėklose, daiguose ir „Abakus“ veislės rapsų kaliaus kultūrose, esant **2**, **11**, **14** biologiškai aktyvių junginių poveikiui. Bandymui paimta po 0,1 g medžiagos.

Tyrimo rezultatai pateikti 3.23-3.25 paveiksluose.



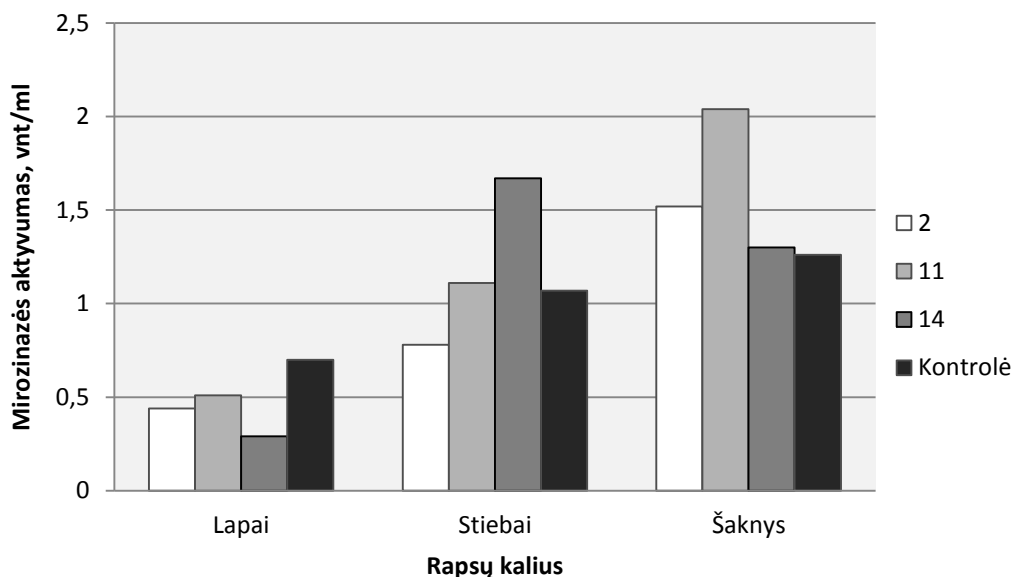
**3.23 pav.** Mirozinazės aktyvumo įvertinimas rapsų sėklose

Iš gautų rezultatų matyti (žr. 3.23 pav.), kad didžiausias mirozinazės aktyvumas buvo „Abakus“ veislės rapsuose (1,34 vnt/ml), 19,1 karto didesnis, lyginant su „Sponsor“ ir „Digger“ veislės rapsais.



**3.24 pav.** Mirozinazės aktyvumo įvertinimas rapsų daiguose *in vitro*

Iš rezultatų matyti (žr. 3.24 pav.), kad didžiausias mirozinazės aktyvumas buvo „Digger“ ir „Abakus“ veislės rapsuose, atitinkamai 2,37 vnt/ml ir 1,92 vnt/ml. Šiuose rapsuose 21,5 ir 17,5 karto aktyvumas buvo didesnis nei „Sponsor“ veislės rapsuose.



**3.25 pav.** Mirozinazės aktyvumas „Abakus“ rapsų kaliuje iš lapų, šaknų ir stiebų susiformavusių ant MS terpės su **2**, **11**, **14** tiriamaisiais junginiais *in vitro*

Apibendrinus rezultatus (žr. 3.25 pav.) matyti, kad tiriamieji junginiai 1-(9-metilkarbazol-3-il)-3-(2-tioakso-3*H*-1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidinas (**2**), 3-(4-amino-5-tioakso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas (**11**) ir 1-(9-metilkarbazol-3-il)dihidro-

2,4-(1*H*,3*H*)-pirimidindionas (**14**) didino mirozinazės aktyvumą rapsų kaliaus kultūroje iš šaknų, tačiau rapsų kaliaus kultūroje iš lapų, lyginant su kontrole, aktyvumas nepadidėjo. Nustatytas mirozinazės aktyvumą kaliuje iš stiebų didinantis **11** ir **14** junginių poveikis.

#### 4. REKOMENDACIJOS

Remiantis tyrimo rezultatais ir moksline literatūra galima nubraižyti mirozinazės išskyrimo ir išgryninimo technologinę schemą. Nustatyta, kad tinkamiausias biologiškai aktyvus junginys tinkantis didinanti mirozinazės išskyrimo iš rapsų augalinės žaliavos apimtis yra naudojant – 3-(4-amino-5-tiokso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidiną (**11**).

Mirozinazės išskyrimo ir išgryninimo technologinė schema pateikta (žr. 4.1 pav.), o ją sudarančių įrenginių sąrašas pateiktas 4.1 lentelėje. Technologinė schema apima biomasės auginimo, biomasės apdorojimo ir gryninimo etapus.

**1. Biomasės auginimas.** Nerūdijančio plieno maišyklėje (M-1) ruošiama MS terpė. Į ją tiekiamas vanduo, mineralinės medžiagos ir parinktas biologiškai aktyvus junginys (**11**). Paruoštas tirpalas išcentrinu siurbliu (S-1) tiekiamas į sterilizatorių (ST-1). MS terpė sterilizuojama 15 min esant 120 °C temperatūrai ir 0,75 atm slėgiui. Sterilizuota terpė išcentrinu siurbliu (S-2) tiekama į bioreaktorių (BR-1), į kurį taip pat tiekiamas oras iš dujų kompresoriaus (DK-1), kuris išvalomas oro filtre (OF-1) ir sumaišomas su amoniaku. Pašalintas oras iš bioreaktoriaus (BR-1) yra filtruojamas oro filtru (OF-2) iš kurio susidariusios dujų atliekos yra pašalinamos. Į bioreaktorių (BR-1) taip pat tiekiami rapsų daigai iš rezervuaro (R-1). Bioreaktoriuje (BR-1) rapsai kultivuojami 2 savaites esant 20-22 °C temperatūrai ir 5,7 terpės pH. Užauginti rapsai su MS terpe tiekiami siurbliu (S-3) į laikymo rezervuarą (R-2).

**2. Biomasės apdorojimas.** Išcentrinu siurbliu (S-4) biomasė tiekama į diskinę centrifugą (DC-1) iš laikymo rezervuaro (R-2). Po centrifugavimo kieta augalinė masė tiekama į praplovimo filtrą (PF-1), o skystos atliekos pašalinamos. Praplovimo filtre vandeniu praplauta augalinė medžiaga patenka į džiovyklą (D-1). Išdžiovinta augalinė masė tiekama į homogenizatorių (H-1). Iš homogenizatoriaus (H-1) augalinė medžiaga patenka į ekstraktorių (E-1), kuriame vyksta homogenizuotos medžiagos ekstrakcija buferiais (Tris-HCl, EDTA, DTT, PVP). Po ekstrakcijos augalinė medžiaga siurbliu (S-5) tiekama į diskinę centrifugą (DC-2), o susidariusios atliekos tiekiamos į rezervuarą (R-3) ir pašalinamos.

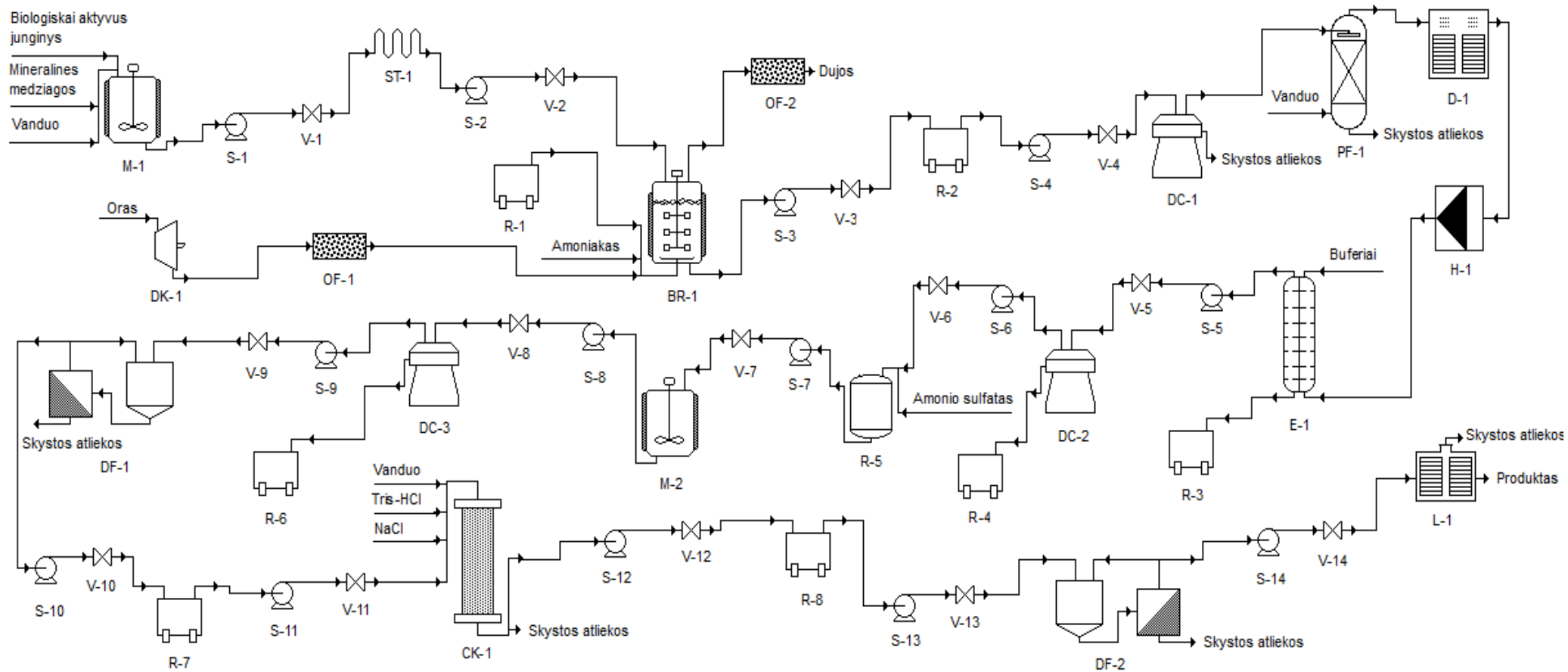
**3. Gryninimas.** Baltyminis tirpalas išcentrinu siurbliu (S-6) iš diskinės centrifugos (DC-2) tiekiamas į rezervuarą (R-5), kuriame nusodinamas 55 % prisotintu amonio sulfato tirpalu. Mišinys siurbliu (S-7) tiekiamas į maišyklę (M-2), kurioje maišomas 10 min ledo vonioje ir 30 min paliekamas nusistovėti kambario temperatūroje. Siurbliu (S-8) suspensija patenka į diskinę centrifugą (DC-3). Centrifuguojama 7000 aps/min 30 min, nuosėdos patenka į rezervuarą (R-6) iš kurio pašalinamos. Viršutinis sluoksnis siurbliu (S-9) patenka į diafiltratorių (DF-1), kuriame tirpalas sukonzentruojamas ir pašalinamos skystos atliekos. Sukonzentruotas tirpalas siurbliu (S-10) tiekiamas į rezervuarą (R-7) ir siurbliu (S-11) į lektinu užpildytą afininę chromatografijos

kolonėlę (CK-1). Į kolonėlę tiekiamas buferis (Tris-HCl, NaCl) ir vanduo. Skystos atliekos pašalinamos, o buferiais praplautas tirpalas siurbliu (S-12) patenka į laikymo rezervuarą (R-8). Iš kurio vėliau siurbliu (S-13) tiekiamas į diafiltratorių (DF-2), kuriame tirpalas yra sukonzentruojamas, pašalinamos skystos atliekos. Tuomet išgrynintas tirpalas tiekiamas siurbliu (S-14) ir liofilizuojamas (L-1). Gaunamas produktas yra fermentas – mirozinazė.

**4.1 lentelė.** Technologinės schemos įrenginių žymėjimas ir pavadinimai

<b>Žymėjimas</b>	<b>Pavadinimas</b>
M-1 – M-2	Maišyklės
S-1 – S-14	Išcentriniai siurbliai
V-1 – V-14	Vožtuvai
ST-1	Sterilizatorius
BR-1	Bioreaktorius
DK-1	Dujų kompresorius
OF-1-2	Oro filtrai
DC-1 – DC-3	Diskinės centrifugos
PF-1	Praplovimo filtras
DF-1 – DF-2	Diafiltratorius
D-1	Džiovyklė
H-1	Homogenizatorius
E-1	Ekstraktorius
L-1	Liofilizatorius
CK-1	Chromotografinė kolonėlė
R-1 – R-8	Rezervuarai





4.1 pav. Mirozinazės išskyrimo ir išgryninimo technologinė schema

## IŠVADOS

1. Įvertinta, kad didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Rhizobium radiobacter* bakterijas pasižymėjo:
  - *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidin-3-karboksamidas (**1**) (500 µg/ml) – slopinimo zona 0,48 cm;
  - 3-(4-amino-5-tioakso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidinas (**11**) (500 µg/ml) – slopinimo zona 0,43 cm;
  - 3,3'-[9-metilkarbazol-3-il]imino]bis(*N*'-3-indoliden)propanhidrazidas (**8**) (1000 µg/ml) ir *N*-(2,5-dimetilpirol-1-il)-3-[3-dimetilpirol-1-il]amino]-3-oksopropil)-(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanamidas (**10**) (1000 µg/ml) – slopinimo zona 0,53 cm.
2. Gauta, kad didžiausias radikalo ABTS slopinimas buvo 3-[(3-hidrazino-3-oksopropil)-(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanhidrazido (**5**) – 0,401 A, kuris taip pat pasižymėjo ir didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pagal FRAP metodą – Fe<sup>+2</sup> koncentracija 56 µmol/l. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu prieš DPPH radikalą pasižymėjo 3-[(9-metilkarbazol-3-il)karbamotioilamino]propano rūgštis (**15**), kuris neutralizuoja radikalą 90,9 %. 3,3'-(Fenilimino)bis(*N*'-benziliden)propanhidrazidas (**9**) pasižymėjo didžiausiomis redukciniėmis savybėmis – 2,401 A.
3. Nustatyta, kad didžiausią įtaką rapsų augimui *in vitro* turėjo 3-[(3-hidrazino-3-oksopropil)-(9-metilkarbazol-3-il)amino]propanhidrazidas (**5**) ir 1-(9-metilkarbazol-3-il)dihidro-2,4-(1*H*,3*H*)-pirimidindionas (**14**). Junginio **5** (0,5 mg/l) poveikyje rapsų šaknys 1,9 karto ilgesnės ir 1,3 karto rapsų biomasė didesnė, lyginant su kontrole. Junginio **14** (2 mg/l) poveikyje rapsų daigų aukštis 1,6 karto didesnis ir 1,3 karto rapsų biomasė didesnė, lyginant su kontrole.
4. Įvertinta, kad didžiausią įtaką rapsų pigmentų kiekiams turėjo 1-(9-metilkarbazol-3-il)-3-(2-tioakso-3*H*-1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidinas (**2**) ir 3-(4-amino-5-tioakso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidino (**11**). Junginio **2** (0,5 mg/l) poveikyje chlorofilo *a* kiekis buvo 62,19 mg/100g, chlorofilo *b* – 29,66 mg/100g, karotinoidų – 23,98 mg/100g. Junginio **11** (2 mg/l) poveikyje chlorofilo *a* kiekis buvo 70,18 mg/100g, chlorofilo *b* – 28,13 mg/100g, karotinoidų – 25,29 mg/100g.
5. Gauta, kad „Abakus“ veislės rapsų kaliuje iš lapų *in vitro* mažiausias gliukozinolatų kiekis buvo 1-(9-metilkarbazol-3-il)-3-(2-tioakso-3*H*-1,3,4-oksadiazol-5-il)-5-oksopirolidino (**2**) poveikyje (0,37 %), o iš stiebų – 3-(4-amino-5-tioakso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidino (**11**) poveikyje (1,97 %).

6. Nustatyta, kad „Abakus“ veislės rapsų kaliaus kultūroje iš lapų ir iš šaknų *in vitro* didžiausias mirozinazės aktyvumas buvo 3-(4-amino-5-tiokso-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-1-(9-metilkarbazol-3-il)-5-oksopirolidino (**11**) poveikyje (0,51 vnt/ml ir 2,04 vnt/ml), o iš stiebų – 1-(9-metilkarbazol-3-il)dihidro-2,4-(1*H*,3*H*)-pirimidindiono (**14**) poveikyje (1,67 vnt/ml).
7. Pateikta mirozinazės išskyrimo ir išgryninimo technologinio proceso schema.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. MICKEVIČIUS, V. ir kt. Pakeistų 1-(2-metoksi-5-nitrofenil)-5-oksopirolidinų sintezė. *Cheminė technologija*. Kaunas: Kauno technologijos universitetas, 2013, **64**(2), 21-26. ISSN 1392-1231.
2. BRUKŠTUS, A. ir S. TUMKEVIČIUS. *Heterociklinių junginių chemija: vadovėlis* [interaktyvus]. Vilnius: Vilniaus pedagoginis universitetas, 2008, 63-161, [žiūrėta 2016-04-10]. ISBN 978-9955-20-310-0. Prieiga per:  
<https://www.ebooks.ktu.lt/eb/477/heterocikliniu-junginiu-chemija/>
3. HOLUB, J. and et al. Lipid-lowering effects of ethyl 2-phenacyl-3-aryl-1*H*-pyrrole-4-carboxylates in rodents. *Molecules*. 2004, **9**(3), 135-157. Prieiga per: doi:  
<http://dx.doi.org/10.3390/90300134>
4. MICKEVIČIUS, V. ir kt. Naujų aminorūgščių darinių su indolo, benzoksazolinono fragmentais sintezė ir jų poveikio rapsų (*Brassica napus* L.) augimui *in vitro* tyrimas. *Cheminė technologija*. Kaunas: Kauno technologijos universitetas, 2013, **64**(2), 35-43. ISSN 1392-1231.
5. JONUŠKIENĖ, I ir kt. al. 3-(6,11-Diokso-6,11-dihidro-12*H*-benzo[b]fenoksazin-12-il)butano rūgšties poveikis rapsų (*Brassica napus* L.) morfogenezei *in vitro* ir gliukozinolatų bei tiocianatų kiekiui. (*Cheminė technologija*. Kaunas: Kauno technologijos universitetas, 2012, **60**(2), 44-49. ISSN 1392-1231.
6. ŽIAUKIENĖ, D. ir kt. Kai kurių β-alanino darinių poveikis vasarinių rapsų (*Brassica napus* L.) augimui ir sėklų derliui. *Cheminė technologija*. Kaunas: Kauno technologijos universitetas, 2010, **56**(3-4), 11-18. ISSN 1392-1231.
7. NANDY, B. C. and et al. *Carbazole: It's biological activity*. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*. USA: JBPR, 2014, **3**(1), 42-48. ISSN 2279-0594.
8. TYLINSKA, B. and et al. Synthesis and structure-activity relationship analysis of new olivacine derivatives. *Acta Pol. Pharm. Drug Res*. 2010, **67**(5), 495–502.
9. KANG, S. K. and et al. Synthesis of tetrahydrocarbazole derivatives as potent β<sub>3</sub>-adrenoceptor agonists. *Bull. Korean Chem. Soc*. 2004, **25**(12), 1784–1790. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2004.25.12.1784>
10. ASCHE, C. and et al. Synthesis, antitumour activity and structure-activity relationships of 5*H*-benzo[b]carbazoles. *Bioorg. Med. Chem*. 2005, **13**(3), 819–837. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.038>
11. NAILLY, C. and et al. Synthesis and biological activities of new furo[3,4-*b*]carbazoles: Potential topoisomerase II inhibitors. *Eur. J. Med. Chem*. 2010, **45**(1), 5428–5437.

12. GIRAUD, F. and et al. Synthesis and biological activities of 4-substituted pyrrolo[2,3-*a*]carbazole Pim kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2012, **56**(1), 225–236. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.08.029>
13. CHABANE, H. and et al. Synthesis of novel 2-cyanothiazolocarbazoles analogues of ellipticine. *Tetrahedron Lett.* Elsevier Science: 2002, **43**(1), 2483–2486.
14. OLIVERIA, M. M. and et al. New benzopyranocarbazoles: Synthesis and photo-chromic behavior. *Tetrahedron.* 2005, **61**(7), 1681–1691. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2004.12.055>
15. MARTIN, A. E. and K. J. R. PRASAD. Synthesis and characterization of carbazole derivatives and their antimicrobial studies. *Acta Pharm.* 2006, **56**(1), 79–86.
16. GUILLONNEAU, C. and et al. Synthesis of 9-*O*-substituted derivatives of 9-hydroxy-5,6-dimethyl-6*H*pyrido[4,3-*b*]carbazole-1-carboxylic acid (2-(Dimethylamino)ethyl)amide and their 10- and 11-methyl analogues with improved antitumor activity. *J. Med. Chem.* 1999, **42**(1), 2191–2203.
17. BANDGAR, B.P. and et al. Synthesis, biological evaluation, and docking studies of 3-(substituted)-aryl-5-(9-methyl-3-carbazole)-1*H*-2-pyrazolines as potent anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, **22**(18), 5839–5844. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.080>
18. BIAMONTE, M.A. and et al. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, **23**(10), 2829–2843. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.067>
19. CARUSO, A. and et al. Efficient and Simple Synthesis of 6-Aryl-1,4-dimethyl-9*H*-carbazoles. *Molecules* 2008, **13**(6), 1312–1320. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules13061312>
20. SHARMA, D. and et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of some newer carbazole derivatives. *J. Serb. Chem. Soc.* 2014, **79**(2), 125–132. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.2298/JSC130123069S>
21. ZHANG, F.F. and et al. Synthesis, anti-bacterial and antifungal activities of some carbazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, **20**(6), 1881–1884. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.159>
22. RAJAMANICKAM, V. and et al. Anti-nociceptive and anti-epileptic evaluation of *N*-Mannich bases of some substituted carbazoles. *Int. J. Chem. Sci.* 2008, **6**(3), 1669–1675.
23. GHAZALA, Y. and et al. Advancements in Syntheses of Carbazole and Its Derivatives. *Asian Journal of Chemistry.* 2009, **21**(4), 2485–2520

24. STROHRIEGL, P. and et al. A series of CBP-derivatives as host materials for blue phosphorescent organic light-emitting diodes. *J. Mater. Chem.* 2011, **21**(7), 2266-2273. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1039/c0jm03321a>
25. ADACHI, C. and et.al. Endothermic energy transfer: a mechanism for generating very efficient high-energy phosphorescent emission in organic materials. *Appl. Phys. Lett.* 2001, **79**(13), 2082-2084. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1063/1.1400076>
26. HUANG, J.J. and et al. Novel benzimidazole derivatives as electron-transporting type host to achieve highly efficient sky-blue phosphorescent organic light-emitting diode (PHOLED) device. *Organic Letters*. American Chemical Society: 2014, **16**(20), 5398-5401. ISSN 1523-7060.
27. GHABBOUR, H. A. and et al. 5-Propyl-6-(*p*-tolylsulfanyl)pyrimidine-2,4-(1*H*,3*H*)-dione. *Acta Crystallographica Section. Cross Mark.*: 2014, **70**(1), 179-180. ISSN 1600-5368.
28. MITSUYA, H. and et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA: 1985, **82**(20), 7096-7100.
29. KAPPE, C. O. 100 years of the biginelli dihydropyrimidine synthesis. *Tetrahedron*. 1993, **49**(32), 6937-6963.
30. *Pyrimidines: Definition and Examples* [interaktyvus]. 2003 [žiūrėta 2016-04-16]. Prieiga per: <http://study.com/academy/lesson/pyrimidines-definition-examples-quiz.html>
31. MANLOVE, A. and M. P. GROZIAK. Six-membered ring systems: diazines and benzo derivatives. *Progress in Heterocyclic Chemistry*. 2009, **21**, 375–414. Prieiga per: doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-6380\(09\)70040-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-6380(09)70040-6)
32. PRAKASH, O. and et al. Organoiodine (III) mediated synthesis of 3-aryl/hetryl-5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pyrimidines as antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2004, **39**(12), 1073-1077.
33. BASAVARAJA, H. S. and et.al. Synthesis and biological activity of novel pyrimidino imidazolines. *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2005, **15**, 69.
34. SONDHI, S. M. and et al. Synthesis of condensed pyrimidines and their evaluation for anti-inflammatory and analgesic activities. *Indian Journal of Chemistry B*. 2008, **47**(1), 136–143.
35. KUMAR, B. and et al. Synthesis and antihypertensive activity of some dihydropyrimidines. *Indian Journal of Chemistry B*, 2004, **43**(7), 1553–1557.
36. YOUSSEF, M. M and et al. Synthesis, antioxidant, antitumor activities of some new thiazolopyrimidines, pyrrolothiazolopyrimidines and triazolopyrrolothiazolopyrimidines Derivatives. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2011, **58**(1), 41–48.

37. S.VEGA, S. and et al. Synthesis of 3-substituted-4-phenyl-2-thioxo-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydrobenzo [4,5]thieno[2,3-d]pyrimidines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 1990, **27**(2), 269–273.
38. BEKHIT, A. A. and et al. Design and synthesis of some substituted 1*H*-pyrazolyl-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidines as anti-inflammatory–antimicrobial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2003, **38**(1), 27-36. Prieiga per: doi:  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)00009-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0223-5234(02)00009-0)
39. BEGLEY, T. P. and et al. The mechanism of action of bacimethrin, a naturally occurring thiamin antimetabolite. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2001, 11(17), 2245–2248.
40. RODRIGUES, A. L. S. and et al. Antidepressant-like and antinociceptive-like actions of 4-(4'-chlorophenyl)-6-(4'-methylphenyl)-2-hydrazinepyrimidine Mannich base in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2005, **82**(1), 156-162.
41. KUMAR, B. and et al. Thermal/microwave assisted synthesis of substituted tetrahydropyrimidines as potent calcium channel blockers. *Indian Journal of Chemistry B*. 2002, **41**(7), 1526–1530.
42. PRASAD, J. D. and et al. Synthesis and antimicrobial activities of some new triazolothiadiazoles bearing 4-methylthiobenzyl moiety. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, **44**(2), 551-557. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.03.025>
43. GONDELA, A. and et al. Synthesis and anti-tuberculosis activity of *N*-aryl-*C*-nitroazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 2004, **39**(10), 849–853. Prieiga per: doi:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.06.014>
44. HOLLA, B. S. and et al. Synthesis characterization and anticancer activity studies on some Mannich bases derived from 1,2,4-triazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 2003, **38**(7-8), 759-767. Prieiga per: doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0223-5234\(03\)00128-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00128-4)
45. AMIR, M. and et al. Synthesis and anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and lipid peroxidation activities of some new 2-[(2,6-dichloroanilino) phenyl]acetic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2004, **39**(6), 535-545. Prieiga per: doi:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.02.008>
46. ALMASIRAD, A. and et al. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-[2-(2-fluorophenoxy)phenyl]-1,3,4-oxadiazoles and 1,2,4-triazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 2004, **14**(24), 6057-6059. Prieiga per: doi:  
<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.bmcl.2004.09.072>
47. MASUDA, K. and et al. Synthesis of 3-morpholino-*N*-ethoxycarbonyl sydnonimine-5-<sup>14</sup>C (sin-10-<sup>14</sup>C). *Labelled Compd.* 1975, **11**(2), 301–304. Prieiga per: doi:

<http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.2590110219>

48. JOSHI, S. S. and et al. Rapid and efficient microwave-assisted synthesis of 4-amino-3-mercapto- 5-substituted-1,2,4-triazoles. *Indian Journal J Chem.* 2006, **45B**, 1057-1059.
49. GROLL, A. H. and et al. New developments in invasive fungal disease. *Future Microbiol.* 2012, **7**, 179–184.
50. GADHAVE, P. P. and et al. Current biological and synthetic profile of triazoles: A review. *Annals Biol. Res.* 2010, **1**(1), 82–89. ISSN 0976-1233.
51. BRUNTON, L. L. Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics. 2006, **12**, 1571-1589. ISBN 0-07-142280-3.
52. DAMBRAUSKAITĖ, J. ir kt. Priešgrybeliniai vaistai: dabartis ir ateitis (literatūros apžvalga). *Medicinos teorija ir praktika.* 2012, **18**(2), 193-203.
53. GUILLON, R. and et al. Design of new antifungal agents: synthesis and evaluation of 1-[(1H-indol-5-ylmethyl)amino]-2-phenyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 2009, **19**(20), 5833–5836. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.089>
54. CHAI, X. and et al. Design, synthesis and molecular docking studies of novel triazole as antifungal Agent. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, **46**(7), 3167–3176. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.022>
55. OMAR, K. and et al. Novel 4-thiazolidinone derivatives as potential antifungal and antibacterial drugs. *Bioorg Med Chem.* 2010, **18**(1), 426-432. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.041>
56. RAO, M. and et al. Development and validation of a specific stability indicating high performance liquid chromatographic method for rizatriptan benzoate. *J Pharm Biomed Anal.* 2006, **41**(4), 1146-1151.
57. HANCU, G. and et al. Separation of 1,4-benzodiazepines by micellar elektrokinetic capillary chromatography. *J Biochem Biophys Methods.* 2007, **69**(3), 251-259.
58. WANG, Z. Z. And et al. Clinical efficacies of treating refractory insomnia patients with estazolam plus alternating current magnetic field. *Chin Med J.* 2012, **125**(17), 3175-3176.
59. GODHANI, D. R. and et al. Synthesis and biological screening of 1,2,4-triazole derivatives. *Indian J Chem.* 2015, **54B**, 556-564.
60. HSIEH, D. T. and et al. Epileptic spasms in tuberous sclerosis complex. *Epilepsy Res.* 2013, **106**(1-2), 200-210. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2013.05.003>



61. KOPARIR, M. and et al. Synthesis of Some 5-Substituted-1,2,4-triazole-3-thiones, Containing Thiourea, Arylidenamino and Morpholin-4-yl methyl Fragments. *Asian J Chem.* 2010, **22**(8), 6059-6066.
62. MUHANNED, M and et al. Synthesis and characterization of some new mannich base derivatives from oxadiazole compounds. *International J Chem. and Pharma. Sciences.* 2013, **4**(1), 42-45. ISSN 0976-9390
63. MACAEV, F. and et al. Synthesis of novel 5-aryl-2-thio-1,3,4-oxadiazoles and the study of their structure-anti-mycobacterial activities. *Bioorganic and Medicinal Chem.* 2005, **13**(16), 4842-4850. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.011>
64. KADI, A. A. and et al. Synthesis, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of novel 2-(1-adamantyl)-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles and 2-(1-adamantylamino)-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 2007, **42**(2), 235-242. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.10.003>
65. HAMOULY, W. S. and et al. Synthesis and antitumor activity of some new 1,3,4-oxadiazole, pyrazole and pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives attached to 4-benzothiazol-2-yl phenyl moiety. *Scholars Research Library.* USA: 2011, **3**(6), 282-292. ISSN 0975-413X.
66. TAN, T. M. C. and et al. Synthesis and the biological evaluation of 2-benzen-esulfonylalkyl-5-substituted-sulfanyl-[1,3,4]-oxadiazoles as potential anti-hepatitis B virus agents. *Antivir. Res.* 2006, **71**(1), 7-14. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.02.007>
67. MAYEKAR, A. N. and et al. Synthesis and Antimicrobial Studies on New Substituted 1,3,4-Oxadiazole Derivatives Bearing 6-Bromonaphthalene Moiety. *Interna. J. Chem.* 2010, **2**(1), 38-54.
68. ZHANG. A. and et al. High  $\pi$ -Facial Selectivity Through Chelation of Magnesium Ions in the DMD Epoxidation of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Imides with Chiral Pyrrolidinone Auxiliaries. *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 2004(1), 147-152. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.200300544>
69. SUTARIYA, S. D. and et al. Synthesis, spectral studies and antibacterial screening of some novel derivatives of 2-Pyrrolidinones based on Schiff base. *Der Chemica Sinica.* USA: 2012, **3**(4), 854-859. ISSN 0976-8505.
70. AKESSON. B. N-Methyl-2-pyrrolidone. *Concise International Chemical Assessment Document.* World Health Organization: Geneva, 2001. ISBN 92 4 153035 9.
71. PATENTAS. 57183757. Japonija.//C.A.1983.Vol.98.N.143267f
72. PATENTAS. 2650604. Vokietija//C.A.1977.Vol.87.N.102159x

73. *Rapsas* [interaktyvus]. 2012 [žiūrėta 2016-01-27]. Prieiga per:  
<http://www.kkzub.lt/musu-veikla/rapsai/>
74. GRUZDIENĖ, D. ir K. BAGDONAITĖ. Lietuvoje auginami tradiciniai ir netradiciniai aliejiniai augalai: sėklų ir aliejaus cheminė sudėtis ir savybės. *Antroji Lietuvos – Vokietijos aliejinių augalų diena*. Kaunas: dauginimo priemonių laboratorija, 2003, **100**(16), 31-37.
75. JEROCH, H. Rapsų sėklų ir jų produktų reikšmė gyvūnų mitybai ir gyvūninių maisto produktų kokybei. *Žemės ūkio mokslai*. Vilnius: Lietuvos mokslų akademija, 2008, **15**(4), 40-52.
76. VELIČKA, R. Aliejiniai augalai pasaulyje ir Lietuvoje. *Antroji Lietuvos – Vokietijos aliejinių augalų diena*. Kaunas: dauginimo priemonių laboratorija, 2003, **100**(16), 11-25.
77. JONUŠKIENĖ, I. *Augalų ir mikroorganizmų biotechnologija: metodinė priemonė* [interaktyvus]. Vilnius: UAB TEV, 2012 [žiūrėta 2016-02-20]. ISBN 978-609-433-1886. Prieiga per: <https://www.ebooks.ktu.lt/eb/906/augalu-ir-mikroorganizmu-biotechnologija/>
78. *Augimo reguliatoriai* [interaktyvus]. [Žiūrėta 2016-02-22]. Prieiga per:  
[http://kmaik.lt/e-mokymas/augalu\\_anatomija/234666.html](http://kmaik.lt/e-mokymas/augalu_anatomija/234666.html)
79. PETRULYTĖ, M. *Augalų hormonai (fitohormonai)* [interaktyvus]. 2014 [žiūrėta 2016-02-22]. Prieiga per:  
<http://www.scribd.com/doc/233392257/Augal%C5%B3-hormonai#scribd>
80. PRAKASH, A. and etc. Antioxidant activity. *Analytical Progress* [interaktyvus]. Minneapolis: Medallion Laboratories [žiūrėta 2016-04-01]. Prieiga per: doi:  
<http://dx.doi.org/800.245.5615>.
81. GARCIA, E. J. and etc. Antioxidant activity by DPPH Assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian Dental Journal* [interaktyvus]. Sao Paulo: SciELO, 2012, **23**(1), 22-27 [žiūrėta 2016-04-01]. ISSN 0103-6440. Prieiga per:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-64402012000100004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402012000100004)
82. YAN, X. and S. CHEN. Regulation of plant glucosinolate metabolism. China: Springer, 2007. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-007-0627-7>
83. TALALAY, P. and J. W. FAHEY. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *The Journal of Nutrition*. United States: American Society for Nutritional Sciences, 2001, **131**(11), 3027-3032. ISSN 0022-3166
84. VERPOORTE, R. and etc. Health-affecting compounds in *Brassicaceae*. *Stress response and health affecting compounds in Brassicaceae* [interaktyvus]. Gouda: Smart printing solutions, 2010 [žiūrėta 2016-03-24]. ISBN 978-90-9025306-0. Prieiga per:  
<https://www.researchgate.net/publication/227741512>

85. WITTSTOCK, U. and etc. Evolution of specifier proteins in glucosinolate-containing plants. *BMC Evolutionary Biology*. 2012, **12**(1), 127. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-12-127>
86. MITHEN, R. Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation*. Norwich: 2001, **34**(1), 91-103.
87. BUTKUTĖ, B. ir Z. DABKEVIČIUS. Agropriemonių bei genotipo įtaka gliukozinolatų kaupimuisi rapsų sėklose ir jų kiekio įvairavimas išspaudose. *Gyvulininkystė*. Kėdainiai: Lietuvos žemdirbystės institutas, 2007, **49**(1), 40-55. ISSN 1392-6144.
88. BUTKUTĖ, B. ir Z. DABKEVIČIUS. Individualių gliukozinolatų kaupimosi dėsningumai ir jų tarpusavio santykis rapsų sėklose. *Žemės ūkio mokslai* [interaktyvus]. Vilnius: Lietuvos mokslų akademija, 2008, **15**(2), 24-31 [žiūrėta 2016-02-11].  
Prieiga per: <http://www.lmaleidykla.lt/publ/1392-0200/2008/2/24-31.pdf>
89. DIALLO, A. and etc. Development of a Performant Method for Glucocapparin Determination in *Boscia senegalensis* Lam Ex. Poir.: A Study of the Variability. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2013, 4, 104-110. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2013.42014>
90. HALKIER, B. A. and U. WITTSTOCK. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science*. Amsterdam: Elsevier, 2002, **7**(6), 263-269. ISSN 1360-1385.
91. PONTOPPIDAN, B. Studies of the glucosinolate-myrosinase system in relation to insect herbivory on oilseed rape (*Brassica napus*) and in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*. Swedish University of Agricultural Sciences: 2001. ISBN 9157658013.
92. *Glucosinolate metabolism* [interaktyvus]. [Žiūrėta 2016-03-10]. Prieiga per: [http://homepage.ruhr-uni-bochum.de/Markus.Piotrowski/Research\\_Glucosinolate.html](http://homepage.ruhr-uni-bochum.de/Markus.Piotrowski/Research_Glucosinolate.html)
93. MIKKELSEN, M, D. and etc. Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids*. Austria: Springer, 2002, **22**(3), 279-295.
94. FAULKNER, K. and R. MITHEN and Gary WILLIAMSON. Selective increase of the potential anticarcinogen 4-methylsulphinylbutyl glucosinolate in broccoli. *Carcinogenesis*. Oxford: Oxford University Press, 1998, **19**(4), 605-609.
95. CIPOLLA, B. G. and etc. Effect of sulforaphane in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Cancer prevention research*. Philadelphia: American association for cancer research, 2015, **8**(8), 712-719. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0459>

96. MELCHINI, A. and M. H. TRAKA. Biological profile of erucin: a new promising anticancer agent from cruciferous vegetables. *Toxins*. 2010, 2, 293-612. Prieiga per: doi: doi:10.3390/toxins2040593
97. VAUGHN, S. F. and M. A. BERHOW. Glucosinolate hydrolysis products, from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial crops and products* [interaktyvus]. Amsterdam: Elsevier, 2004 [žiūrėta 2016-03-21]. ISSN 0926-6690. Prieiga per: Science Direct.
98. GROSS, H. B. and etc. Functional detection of chemopreventive glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. Amsterdam: Elsevier, 2000, **159**(2), 265-272. Prieiga per: doi:10.1016/S0168-9452(00)00354-X
99. CHAND, S. Practical Biotechnology and Plant Tissue Culture. India: Rajendra Ravindra, 2009. ISBN 81-219-3200-9.
100. GARG, K. L. and et al. Laboratory Manual of Food Microbiology. *International Publishing House*, 2010. ISBN 978-93-80578-01-9.
101. WANG, Q. and et al. *Journals Americal Society for Microbiology*. 2013, **79**(22), 7021-7027.
102. WALTON, P. D. and D. C. W. BROWN. *J. Genet.* 1988, **67**(2), 95-100.
103. LAPINA, L. and et al. *Environment. Technology. Resources* Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Scientific and Practical Conference. 2009, **1**(1), 166.
104. WANG, Y. L. and et al. Enhancing antioxidative capacity of *Lepidium meyenii* calli by addition of methyl salicylate to culture medium. *Acta Physiol Plant.* 2007, **29**(5), 417 – 423.
105. CAPITANI, C. D. and et al. Evulation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. *Eur. J. Lipid Sci. Techno.* 2009, **111**(1), 1090-1099. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1002.ejlt.200800215>
106. JAISHREE, V. and et al. In vitro antioxidant properties of new thiazole derivatives. *J. Saudi Chem. Society*. 2012, **16**(1), 371-376. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2011.02.007>
107. MOUSTAFA, A. and et al. Synthesis, antitumor and antioxidant evaluation of some new thiazole and thiophene derivatives incorporated coumarin moiety. *Med. Chem. Res.* 2012, **21**(1), 1062-1070. Prieiga per: doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-011-9610-8>
108. DAUNORAS, G. Farmokopėjos straipsnių rinkinys. Kaunas: 2001.
109. BINGJIE, H. Myrosinase in leafy *Brassica*. Singapore: National University, 2006.
110. Ермаков, А. И. и В. В. Арасимович. Методы биохимического исследования растений. Москва: 1987.