



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Fitocheminio, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo
įvertinimas bei palyginimas astrinių šeimos augalų ląstelių
kultūrose *in vitro* ir augalų *in vivo* ekstraktuose**

Baigiamasis magistro projektas

Akvilė Valvonytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Fitocheminio, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo
įvertinimas bei palyginimas astrinių šeimos augalų ląstelių
kultūrose *in vitro* ir augalų *in vivo* ekstraktuose**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Akvilė Valvonytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Vilija Kederienė

Recenzentė

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Akvilė Valvonytė

**Fitocheminio, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo
įvertinimas bei palyginimas astrinių šeimos augalų ląstelių
kultūrose *in vitro* ir augalų *in vivo* ekstraktuose**

Akademinių sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Akvilė Valvonytė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Valvonytė, Akvilė. Fitocheminio, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas bei palyginimas astrinių šeimos augalų ląstelių kultūrose *in vitro* ir augalų *in vivo* ekstraktuose. Magistro krypties studijų baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: astriniai augalai, antioksidacinis, antibakterinis, sidabro nanodalelės, *in vitro*, *in vivo*.

Kaunas, 2023. 73 p.

Santrauka

Astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos augalai – vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.), vaistinis kietis (lot. *Artemisia dracunculus* L.) ir rausvažiedė ežiuolė (lot. *Echinacea purpurea* L.) – jau nuo seno yra vieni iš populiariausių vaistinių augalų, kurie plačiai naudojami farmacijos, kosmetikos ir maisto pramonėje. Šie augalai pasižymi antioksidacinėmis, antibakterinėmis ir priešvėžinėmis savybėmis. Šias naudingas vaistinių augalų biologines savybes nulemia jų sintetinami antriniai metabolitai. Dėl astriniuose augalų ekstraktuose esančių bioaktyviųjų junginių, šie augalai gali būti naudojami žaliosios sintezės būdu sintetinti sidabro nanodalelės. Siekiant padidinti bioaktyviųjų medžiagų sintezę vaistinės medetkos, vaistinio kiekio ir rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūrose *in vitro*, buvo praturtinta mitybinė terpė augimo reguliatoriais. Pagrindinis šio tyrimo tikslas buvo įvertinti pasirinktų augimo reguliatorių poveikį astrinių augalų kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidaciniam, antibakteriniam ir fitocheminiam aktyvumui.

Projekto metu buvo suformuota vaistinės medetkos, vaistinio kiekio ir rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros *in vitro*, kurios augintos MS terpėje papildytoje augimo hormonais. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo vaistinio kiekio *in vitro*, auginto su BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l) augimo hormonais, ekstraktas. Tyrimo metu nustatyta, kad pasirinkti augimo hormonai efektyviai padidino prolindehidrogenazės aktyvumą vaistinio kiekio (53,1 %), rausvažiedės ežiuolės (27,1 %) ir vaistinės medetkos (67 %) kaliaus kultūrose bei kitų antioksidacinių fermentų aktyvumą. Didžiausios chlorofilo *a* (13,11 mg/100 mg), chlorofilo *b* (18,92 mg/100 mg), karotinoidų (6,17 mg/100 mg) ir baltymų (0,53 mg/100 mg) koncentracijos nustatytos rausvažiedės ežiuolės *in vitro* ekstrakto. Pasirinkti augimo hormonai neigiamai veikė antocianinų ir flavonoidų sintezę vaistinės medetkos ir rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūrose *in vitro*. Mitybinės terpės papildymas efektyviai padidino fenolinių junginių sintezę vaistinio kiekio (44,2 %), rausvažiedės ežiuolės (62,3 %) ir vaistinės medetkos (48,24 %) kaliaus kultūrose *in vitro*. Didžiausia *L*-prolino (25,17 mmol/g) ir fenolinių rūgščių (5,02 %) koncentracija nustatyta vaistinio kiekio *in vitro* ekstrakto. Didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* pasižymėjo rausvažiedės ežiuolės kaliaus *in vitro* ekstraktas (19,67 mm), o prieš *Bacillus subtilis* vaistinės medetkos *in vitro* ekstraktas (15,17 mm). Sidabro nanodalelių daugiausia susintetinta iš vaistinio kiekio *in vitro* ekstrakto. Geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pagal DPPH metodą (31,76 %) pasižymėjo vaistinės medetkos *in vitro*, o pagal redukcinių savybių įvertinimą rausvažiedės ežiuolės (0,32 A) *in vitro* koloidiniai tirpalai su sidabro nanodalelėmis. Didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* pasižymėjo vaistinio kiekio *in vitro* (22,80 mm), o prieš *Bacillus subtilis* vaistinės medetkos *in vitro* (18,50 mm) koloidiniai tirpalai su sidabro nanodalelėmis.

Valvonytė, Akvilė. Evaluation and Comparison of Phytochemical, Antioxidant and Antibacterial Activity in Plant Cell Cultures of the Asteraceae Family *in Vitro* and Plants *in Vivo* Extracts. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: *Asteraceae* plant, antioxidant activity, antibacterial activity, silver nanoparticles, callus cultures.

Kaunas, 2023. 73.

Summary

Plants of the *Asteraceae* family – marigold (*Calendula officinalis* L.), tarragon (*Artemisia dracuncululus* L.) and echinacea (*Echinacea purpurea* L.) – have long been among the most popular medicinal plants that are widely used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. These plants have antioxidant, antibacterial and anticancer properties. These beneficial biological properties of medicinal plants are determined by their synthesized secondary metabolites. Due to the bioactive compounds present in astral plant extracts, these plants can be used to synthesize silver nanoparticles by green synthesis. In order to increase the synthesis of bioactive substances in callus cultures of calendula, sedum and echinacea *in vitro*, the nutrient medium was enriched with growth regulators. The main objective of this study was to evaluate the effect of selected growth regulators on the antioxidant, antibacterial and phytochemical activity of *in vitro* extracts of callus cultures of aster plants.

During the project, *in vitro* callus cultures of marigold, tarragon and echinacea were formed, which were grown in MS medium supplemented with growth hormones. The extract of medicinal tarragon *in vitro* grown with BAP (2.5 mg/l) and NAA (0.5 mg/l) growth hormones showed the highest antioxidant activity. During the study, it was found that the selected growth hormones effectively increased the activity of proline dehydrogenase in callus cultures of tarragon (53.1%), echinacea (27.1%) and marigold (67%) and the activity of other antioxidant enzymes. The highest concentrations of chlorophyll *a* (13.11 mg/100 mg), chlorophyll *b* (18.92 mg/100 mg), carotenoids (6.17 mg/100 mg) and proteins (0.53 mg/100 mg) were found in echinacea *in vitro* extract. Selected growth hormones negatively affected the synthesis of anthocyanins and flavonoids in marigold and echinacea callus cultures *in vitro*. Nutrient medium supplementation effectively increased the synthesis of phenolic compounds in callus cultures of tarragon (44.2%), echinacea (62.3%) and marigold (48.24%) *in vitro*. The highest concentration of *L*-proline (25.17 mmol/g) and phenolic acids (5.02%) was determined in the *in vitro* extract of medicinal tarragon. The highest antibacterial activity against *Escherichia coli* was demonstrated by the *in vitro* extract of echinacea callus cultures (19.67 mm), and against *Bacillus subtilis* by the *in vitro* extract of marigold (15.17 mm). Silver nanoparticles were mainly synthesized from the *in vitro* extract of the medicinal tarragon. Marigold *in vitro* showed the best antioxidant properties according to the DPPH method (31.76%), and colloidal solutions with silver nanoparticles *in vitro* of echinacea (0.32 A) according to the reduction properties evaluation. Colloidal solutions with silver nanoparticles showed the highest antibacterial activity against *Escherichia coli in vitro* of tarragon (22.80 mm), and against *Bacillus subtilis in vitro* of marigold (18.50 mm).

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas.....	8
Įvadas	9
1. Literatūros apžvalga	11
1.1. Astriniai augalai	11
1.1.1. Vaistinės medetkos (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.) apibūdinimas ir panaudojimas	11
1.1.2. Vaistinio kiečio (lot. <i>Artemisia dracunculus</i> L.) apibūdinimas ir panaudojimas	12
1.1.3. Rausvažiedės ežiuolės (lot. <i>Echinacea purpurea</i> L.) apibūdinimas ir panaudojimas.....	13
1.2. Antriniai metabolitai	14
1.2.1. Fenoliniai junginiai	14
1.2.2. Fenolinės rūgštys.....	14
1.2.3. Flavonoidai	15
1.3. Antioksidacinės savybės.....	16
1.4. Antibakterinės savybės.....	18
1.5. Sidabro nanodalelės.....	19
1.6. Sidabro nanodalelių sintezė iš augalų (žalioji sintezė).....	19
1.6.1. Sidabro nanodalelių, susintetintų iš augalų ekstrakto, charakteristika.....	21
1.6.2. Sidabro nanodalelių antibakterinės savybės	21
1.7. Augalų kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	23
1.7.1. Augalų augimo reguliatoriai	24
1.7.2. Vaistinės medetkos (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.) kaliaus kultūrų susidarymas <i>in vitro</i>	24
1.7.3. Vaistinio kiečio (lot. <i>Artemisia dracunculus</i> L.) kaliaus kultūrų susidarymas <i>in vitro</i>	25
1.7.4. Rausvažiedės ežiuolės (lot. <i>Echinacea purpurea</i> L.) kaliaus kultūrų susidarymas <i>in vitro</i> ..	25
1.7.5. Antriniai metabolitai kaliaus kultūrose	26
1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	27
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	28
2.1. Tiriamoji medžiaga	28
2.2. Tyrimų eiga.....	28
2.3. Reagentai	29
2.4. Tyrimų metu naudota įranga.....	29
2.5. Augalų sėklų sterilinimas	29
2.6. Augalų ląstelių mitybinės terpės paruošimas	30
2.6.1. Augimo fitohormonų tirpalų paruošimas	31
2.6.2. Augalų kaliaus kultūrų formavimas	31
2.7. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas	32
2.7.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu	32
2.7.2. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose	32
2.7.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą	32
2.8. Augalų ekstraktų antioksidantinių fermentų aktyvumo įvertinimas	33
2.8.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas.....	33
2.8.2. Prolindehidrogenazės aktyvumo nustatymas.....	34
2.8.3. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas	34
2.8.4. Katalazės aktyvumo nustatymas	35
2.9. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas	35
2.9.1. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu.....	35

2.9.2. Sintetinių junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas	36
2.10. Metodai charakterizuojantys oksidacinį stresą augaluose	36
2.10.1. Malondialdehido koncentracijos nustatymas	36
2.11. Biologiškai aktyviųjų junginių koncentracijos nustatymas	36
2.11.1. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų nustatymas augaluose	36
2.11.2. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas	37
2.11.3. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu.....	37
2.11.4. <i>L</i> -Prolino nustatymas.....	38
2.11.5. Flavonoidų nustatymas augaluose.....	38
2.11.6. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas augalinėje žaliavoje	39
2.11.7. Baltymų koncentracijos nustatymas	39
2.12. Antibakterinio aktyvumo nustatymo metodai.....	40
2.13. Augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo nustatymas agar difuziniu metodu.....	40
2.14. Sidabro nanodalelių sintezė iš augalų ekstrakto ir savybių nustatymas	40
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	41
3.1. Vaistinės medetkos (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.), vaistinio kiekio (lot. <i>Artemisia dracunculus</i> L.) ir rausvažiedės ežiulės (lot. <i>Echinacea purpurea</i> L.) kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	41
3.2. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	42
3.2.1. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu.....	42
3.2.2. Reducinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose	43
3.2.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą	44
3.3. Augalų ekstraktų antioksidantinių fermentų aktyvumo įvertinimas	45
3.3.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas.....	45
3.3.2. Fermento prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas	46
3.3.3. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas	47
3.3.4. Katalazės aktyvumo įvertinimas	48
3.4. Metodai, charakterizuojantys oksidacinį stresą augaluose	49
3.5. Malondialdehido koncentracijos įvertinimas.....	49
3.6. Biologiškai aktyviųjų junginių koncentracijos įvertinimas	49
3.6.1. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas.....	49
3.6.2. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas	50
3.6.3. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu.....	51
3.6.4. <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas.....	52
3.6.5. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas augaluose	54
3.6.6. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje	55
3.6.7. Baltymų koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje	55
3.7. Augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas agar difuziniu metodu.....	56
3.8. Sidabro nanodalelių sintezė iš augalų ekstrakto ir jų savybių įvertinimas	57
3.8.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu	59
3.8.2. Reducinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas	60
3.8.3. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas difuzijos į agarą metodu	60
4. Rekomendacijų dalis	62
Išvados	64
Literatūros sąrašas.....	65

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

AgND – sidabro nanodalelės;
BAP – 6-benzilaminopurinas;
DMSO – dimetilsulfoksidas;
DNR – deoksiribonukleorūgštis;
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;
DTT – ditionitritolis;
EŽ-AgND – sidabro nanodalelės, susintetintos iš rausvažiedės ežiulės;
FRAP – geležies redukcijos antioksidacinės jėgos metodas;
IAR – 3-indolilacto rūgštis;
KT-AgND – sidabro nanodalelės, susintetintos iš vaistinio kiečio;
LB – *Luria Bertani*;
MDA – malondialdehididas;
MD-AgND – sidabro nanodalelės, susintetintos iš vaistinės medetkos;
MS – *Murashige-Skoog*;
NAD – nikotinamidadenindinukleotidas;
NAR – 1-naftilacto rūgštis;
ND – nanodalelės;
PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas;
ROR – reaktyviosios deguonies rūšys;
SOD – superoksido dismutazė;
TDZ – tidiazuronas (1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il-urėja);
TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;
UV spinduliuotė – ultravioletinė spinduliuotė.

Ivadas

Augalai farmacijoje yra svarbūs dėl gebėjimo sintetinti antrinius metabolitus, turinčius potencialiai reikšmingą biologinį aktyvumą. Tradicinėje medicinoje augalai naudojami skirtingais būdais įvairiems negalavimams gydyti. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, daugiau nei 80 % pasaulio gyventojų naudoja augalinius vaistinius preparatus gydymo tikslais. Augalų pagrindu pagaminti preparatai dažnai yra pigesni nei įprasti vaistai, yra lengvai prieinami ir turi mažiau šalutinių poveikių nei jų sintetinės alternatyvos. Dėl šios priežasties svarbu tirti vaistinių augalų biologines savybes, nustatyti jų fitocheminę sudėtį [1].

Dauguma astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos augalų turi terapinį pritaikymą ir ilgą istoriją tradicinėje medicinoje: kai kurios rūšys auginamos daugiau nei 3000 metų mitybos ir medicinos tikslais. Astriniai šeimos augalai pasižymi priešūždegiminėmis, antibakterinėmis, antioksidacinėmis, priešvėžinėmis bei hepatoprotekcinėmis savybėmis. Šis farmakologinis aktyvumas siejamas su augaluose sintetinamais antriniais metabolitais. Astriniai augalai taip pat naudojami kaip biologiškai aktyvių junginių šaltiniai kosmetikos ir maisto srityse. Šiuo metu susidomėjimas fitoantioksidantais nuolat auga dėl sintetinių antioksidantų pašalinio poveikio, o patogeninių bakterijų atsparumas antibiotikams yra viena didžiausių visuomenės sveikatos problemų. Dėl šios priežasties didelis dėmesys yra skiriamas astrinių šeimos augalų antioksidacinėms ir antibakterinėms savybėms [2]. Vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.), vaistinis kietis (lot. *Artemisia dracunculus* L.) ir rausvažiedė ežiuolė (lot. *Echinacea purpurea* L.) priklauso astrinių augalų šeimai.

Didelė vaistinių augalų paklausa, ypač besivystančiose šalyse (daugiau nei 80 %), lėmė daugelio vaistų gamyboje svarbių augalų perteklinį išnaudojimą. Dėl kelių chiralinių centrų ir medicininiu požiūriu sudėtingos svarbių antrinių metabolitų struktūros jų cheminė sintezė yra brangi ir komerciškai neperspektyvi. Šie veiksniai paskatino tiesioginį antrinių metabolitų išskyrimą iš augalų ir tai sukėlė grėsmę išnykti svarbioms augalų rūšims. Siekiant padidinti antrinių metabolitų produktyvumą pritaikomos biotechnologinės strategijos. Kaliaus kultūrų *in vitro* formavimas leidžia susintetinti didesnę koncentraciją antrinių metabolitų, kuriuos galima lengvai išskirti, išgryninti ir pritaikyti įvairiose pramonės srityse. Mitybinės terpės praturtinimas augimo reguliatoriais padidina antrinių metabolitų gamybą kaliaus kultūrose *in vitro*.

Augalų ekstraktų panaudojimas sidabro nanodalelių sintezei sulaukė susidomėjimo dėl greito, ekologiško ir ekonomiško gamybos proceso. Dėl astrinių šeimos augalų ekstraktuose esančių bioaktyviųjų junginių (alkaloidų, flavonoidų, taninų, terpenoidų ir glikozidų) jie gali būti naudojami žaliajam sidabro nanodalelių sintezės metodui. Todėl svarbu optimizuoti sidabro nanodalelių biosintezės procesą iš vaistinių augalų ekstraktų. Tai padidintų astrinių augalų ekstraktų panaudojimo galimybes.

Tyrimo tikslas – įvertinti ir palyginti pasirinktų augimo hormonų poveikį vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.), vaistinio kietio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) ir rausvažiedės ežiuolės (lot. *Echinacea purpurea* L.) *in vivo* bei *in vitro* kultūrų fitocheminiams junginiams susidaryti ir antioksidaciniam bei antibakteriniam aktyvumui. Taip pat susintetinti sidabro nanodaleles iš augalų ekstrakto ir nustatyti jų savybes.

Tyrimo uždaviniai:

1. įvertinti ir palyginti astrinių šeimos augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą;

2. įvertinti antioksidacinių fermentų aktyvumą astrinių šeimos augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose;
3. nustatyti *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* astrinių šeimos augalų ekstraktuose malondialdehido koncentraciją;
4. nustatyti ir palyginti biologiškai aktyviųjų junginių koncentracijas astrinių šeimos augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose;
5. įvertinti astrinių šeimos augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antibakterinį aktyvumą;
6. optimizuoti sidabro nanodalelių iš augalų ekstrakto sintezę ir nustatyti savybes.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Astriniai augalai

Astrinių šeimos (lot. *Asteraceae*) augalai yra viena didžiausių žydinčių augalų šeimų, apimanti daugiau nei 1 600 genčių ir 25 000 rūšių visame pasaulyje [3]. Jai priklauso nemažai gerai žinomų rūšių, pavyzdžiui, jurginai, saulėgražos, cikorijos ir ramunės, taip pat nemažai vaistinių augalų, tokių kaip medetkos, ežiuolės, kiečiai, pelynai, ramunėlės ir kraujažolės. Astrinių augalų šeima yra plačiai paplitusi visame pasaulyje įvairiose ekologinėse buveinėse, išskyrus Antarktidą [1]. Daugelis *Asteraceae* rūšių pasižymi įvairiu farmakologiniu aktyvumu, kuris yra priskirtas jų fitocheminiams komponentams, įskaitant eterinius aliejus, lignanus, saponinus, polifenolinius junginius, fenolines rūgštis, sterolius ir polisacharidus [4]. Dėl priešvėžinių, priešgrybelinių, priešuždegiminių, antivirusinių, antibakterinių ir antioksidacinių savybių, astriniai augalai gali būti naudojami įvairioms ligoms gydyti [5]. Per pastaruosius kelerius metus pastebimai išaugo susidomėjimas fitocheminiais ir farmakologiniais tyrimais, susijusiais su įvairiomis *Asteraceae* šeimos rūšimis [6].

1.1.1. Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) apibūdinimas ir panaudojimas

Vaistinė medetka – astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos, medetkų (lot. *Calendula*) genties augalas. *Calendula officinalis* yra gerai žinomas vienmetis augalas, paplitęs Centrinėje ir Pietų Europoje, taip pat Artimuosiuose Rytuose. Šis augalas gerai auga bet kokio tipo dirvoje, gausiausiai žydi saulės atokaitoje. Vaistinė medetka turi didelę ekonominę vertę kaip augalinis vaistas, taip pat, Jungtinėse Amerikos Valstijose (JAV) neseniai buvo patvirtintas šio augalo naudojimo tinkamumas maisto pramonėje. Paminėtina, kad jis yra įtrauktas į Maisto ir vaistų administracijos (FDA) visuotinai pripažintų saugių (GRAS) medžiagų sąrašą [7]. Atlikus fitocheminius tyrimus nustatyta, kad pagrindinės biologiškai aktyvios medžiagos, kaupiamos vaistinėse medetkose, yra terpenoidai, flavonoidai, kumarinai, chinonai, lakieji aliejai, karotinoidai ir aminorūgštys. Šios bioaktyvios medžiagos turi įvairių farmakologinių požymių, siejamų su priešuždegiminiu, antibakteriniu, antivirusiniu, antioksidaciniu ir regeneraciniu poveikiu [8].

Pagal farmakologinius tyrimus, *C. officinalis* pasižymi plačiu biologinių savybių spektru, kai kurios iš jų yra ypač perspektyvios ateityje kuriant vaistažolių pagrindu pagamintus vaistus [9]. Ši vaistažolė nuo seno naudojama kaip antiseptiniai, antispazminiai, prakaitavimą ir karščiavimą mažinantys vaistai. Medetkų ekstraktas medicinoje naudojamas žaizdoms gydyti [10, 11]. Tyrimais nustatyta, kad kasdienis 2 % medetkų gelio naudojimas palengvina ir sutrumpina žaizdų gijimą, padidina žaizdos angiogenezę, epitelizaciją ir glikoproteinų bei kolageno metabolizmą, todėl pagerėja vietinė medžiagų apykaita ir pažeisto audinio regeneracija. Gydytas vaistinės medetkos gelio buvo veiksmingesnis už kitus tepalus, nes sumažino diskomfortą keičiant tvarstį. Šios vaistažolės tepalo naudojimas taip pat skatina Achilo sausgyslės gijimą, pagerindamas kolageninio baltymo sintezę [12]. Kosmetikos gaminiuose medetkos yra naudojamos jautriai odai skirtuose preparatuose ir raminaujamąjį poveikį turinčiuose produktuose (pvz., gaminiuose, kurie skirti naudojimui po deginimosi), įskaitant akims ir plaukams skirtus produktus, kurių naudojimas yra pripažintas saugiu [13]. Kosmetikos gaminiuose dažniausiai naudojamas medetkų žiedų ekstraktas [14]. Medetkos preparatai taip pat veiksmingai gydo virškinamojo trakto sutrikimus. Šios vaistinės savybės yra susijusios su ekstrakto esančiais saponiniais, kurie apsaugo virškinamojo trakto gleivinę ir slopina skrandžio pažeidimus. Medetkos yra viena iš homeopatinių vaistų sudedamųjų dalių, kurie naudojami skausmui mažinti ir edemoms, susijusioms su ūminiais raumenų ir kaulų sistemos pažeidimais,

šalinti. Vaistažolių ausų lašai, kurių sudėtyje yra medetkų žiedų, naudingi gydant ausų skausmą vaikams, sergantiems ūminiu vidurinės ausies uždegimu. Šio augalo ekstraktas gali sulėtinti periodonto ligos progresavimą, nes sumažina hepatocitų augimo veiksnio sukeltą kolageno skaidymą ir metaloproteinazių aktyvumą [9]. Vaistinė medetka pasižymi antivirusiniu poveikiu prieš žmogaus imunodeficitą virusą. Daugybė klinikinių tyrimų atskleidė, kad vaistinės medetkos ekstraktai gali būti naudingi gydant vėžinius susirgimus. *In vivo* tyrimais nustatytas šio augalo nuoviro slopinamasis poveikis įvairioms navikinių ląstelių linijoms, gautoms iš krūties, gimdos kaklelio, prostatos, kasos ir plaučių. Burnos skalavimo skysčiai, kurių sudėtį įeina medetkų ekstraktas, naudojami siekiant palengvinti ir gydyti vėžio gydymo sukeltą burnos mukozitą, taip pat burnos ertmės opines patologijas. Šis preparatas rekomenduojamas visiems, pradėjusiems radiologinį gydymą ar chemoterapiją. Taigi, dėl didelio vaistinės medetkos ir jos sudedamųjų dalių biologinio aktyvumo būtina atkreipti dėmesį į šį augalą ir plėsti jo panaudojimą [10].

1.1.2. Vaistinio kiekio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) apibūdinimas ir panaudojimas

Per pastaruosius kelerius metus pastebimai išaugo susidomėjimas fitocheminiais ir farmakologiniais tyrimais, susijusiais su įvairiomis *Artemisia* L. genties rūšimis [15]. Tokį susidomėjimą neabejotinai lemia tai, kad 2015 m. Nobelio fiziologijos medicinos premija buvo skirta už artemisinino – seskviterpenoidinio laktono atradimą *Artemisia annua* (vienmetėje dumblyje) ir jo veiksmingumo gydant maliariją įrodymą [16]. Tarp tiriamųjų – vaistinis kietis (*Artemisia dracunculus* L.). *Artemisia dracunculus* L. yra daugiametis aromatinis augalas, priklausantis *Asteraceae* šeimai. Europoje tai yra viena iš 20 dažniausiai auginamų vaistažolių [17]. Svarbus sėkmingo kiekio auginimo aspektas yra tas, kad jis gerai auga bet kokiame dirvožemyje, nėra jautrus temperatūros bei apšvietimo svyravimams. Tačiau, jeigu nepakanka šviesos, sumažėja eterinio aliejaus koncentracija, todėl sumažėja ir aromatingumas. Pagrindinės biologiskai aktyvios medžiagos, kaupiamos vaistiniame kietyje yra eterinis aliejus, kumarinai, flavonoidai ir fenolinės rūgštys [18]. Šios medžiagos lemia, *A. dracunculus* biologinį aktyvumą ir galimą jo panaudojimą kaip augalinės kilmės farmacinių cheminių junginių šaltinį. Vaistiniame kietyje aptinkamos bioaktyvios medžiagos turi įvairių farmakologinių savybių, siejamų su antioksidaciniu, neuroprotekciniu, antibakteriniu, antivirusiniu, hepatoprotekciniu ir priešvėžiniu aktyvumu [18-21].

Vaistinio kiekio ekstraktai, nuovirai ir užpilai nuo seno buvo naudojami įvairiems negalavimams gydyti. Ši vaistažolė naudojama tiek virškinimo trakto ligoms gydyti, tiek kaip anestetikas, antidepresinis ir antiepilepsinis preparatas. Daugelis rekomenduoja kietį kaip veiksmingą uždegimą ir karščiavimą slopinantį preparatą. Alkoholinė tinktūra turi raminamąjį ir prieštraukulinį poveikį nervų sistemai; *A. dracunculus* vartojamas sergant epilepsija ir neurozėmis. Šios vaistažolės poveikis nervų sistemai yra susijęs su azoto bazių (alkaloidų ir benzodiazepinų darinių) terapiškai reikšmingomis koncentracijomis. Vaistinio kiekio ekstraktai pasižymi priešuždegiminiu poveikiu, kuris skatina žaizdų ir opų gijimą, yra naudingas gydyti burnos ligas (stomatitą, dantenų uždegimą ir kt.), nudegimus ir sąnarių ligas (artritą, reumatitą, radikulitą). Šiuolaikinė farmakologija atskleidžia, kad dėl kaupiamų įvairių fenolinių junginių, tokių kaip chlorogeno rūgštis, kavos rūgštis, liuteolinas ir kvercetas, *Artemisia dracunculus* ekstraktai veiksmingi gydant depresiją [19]. Daugybė klinikinių tyrimų ir metaanalizių parodė, kad vaistinio kiekio ekstraktai taip pat pasižymi hepatoprotekciniu aktyvumu. *In vivo* tyrimuose įvertintos šio augalo ekstrakto hepatoprotekcinės savybės su žiurkėmis, kurioms tetrachlormetanu buvo sukelti kepenų ląstelių pažeidimai. Pastebėta, kad šio augalo 70 % etanolinis ekstraktas reikšmingai sumažino nekrozės procesą (mažiausiai 30 %). Be to, po *A. dracunculus* ekstraktų įvedimo žiurkėms, kepenų parenchimos segmentuose buvo aptikta

daugiau hepatocitinių ląstelių be jokių distrofijos požymių. Tyrimais nustatyta, kad vaistinio kiekio ekstraktai stiprina ląstelių membranas bei hepatocitų kompensacinius mechanizmus, taigi, padidina atsparumą streso veiksniams. Kitas tyrimas, patvirtinantis hepatoprotekcinį vaistinio kiekio ekstrakto poveikį, buvo atliktas su žiurkėmis, kurioms buvo duodama 50, 100 arba 200 mg/kg ekstrakto 15 dienų. Atliktas histopatologinis tyrimas patvirtino mažesnę kepenų pažeidimą toms žiurkėms, kurioms buvo duodamas kiekio ekstraktas [20]. Maisto ir vaistų administracija įvardija *A. dracunculus* ir iš šios rūšies gautus aliejus bei ekstraktus kaip saugius naudoti.

Ši vaistažolė naudojama kosmetikos srityje kaip odos priežiūros produktų, kvapiųjų medžiagų ir maskuojamųjų medžiagų sudedamoji dalis. Kosmetologijoje vaistinis kietis naudojamas drėkinamiesiems kremams, šampūnams, losjonams ir valomiesiems pieneliams gaminti. Eterinis aliejus, gaunamas distiliuojant garais, plačiai naudojamas kaip kvėpalų komponentas.

Kietis turi konservuojančių savybių, todėl yra aktyviai naudojamas kaip natūralus konservantas maisto srityje [21]. Jo taip pat dedama į gaiviuosius ir nealkoholinius gėrimus. Dėl didelės aromatinių komponentų koncentracijos, maisto pramonėje įprasta kietį naudoti džiovintą, kad suteiktų maistui kvapą ir skonį [22]. Džiovintame vaistiniame kietyje yra 24 % baltymų, 45 % angliavandenių, 7 % riebalų ir 7 % skaidulų. Jame taip pat yra įvairių mineralų, nedidelis kiekis vitamino A ir kai kurių B grupės vitaminų [23]. Svarbus *A. dracunculus* eterinio aliejaus panaudojimas yra valgomų antibakterinių plėvelių gamyba, kurios naudojamos maisto gedimo prevencijai. Socaciu kartu su bendraautorais atliktas tyrimas patvirtino antibakterinį ir antioksidacinį kiekio eterinio aliejaus aktyvumą. Eksperimento metu buvo įvertinta ir aliejaus įtaka valgomos antibakterinės plėvelės savybėms. Rezultatai rodo, kad eterinio aliejaus panaudojimas plėvelės formavimo tirpale pagerino tirpumą vandenyje, apsaugą nuo regimosios šviesos, taip pat pagerino atsparumą mechaniniams pažeidimams, plėvelės elastingumą ir skaidrumą bei padidino jos drėgmės kiekį. Todėl vaistinio kiekio aliejus gali būti laikomas alternatyva sintetiniams junginiams maisto pakuotėse [24].

1.1.3. Rausvažiedės ežiuolės (lot. *Echinacea purpurea* L.) apibūdinimas ir panaudojimas

Rausvažiedė ežiuolė (*Echinacea purpurea* L.) yra daugiametis žydintis augalas, priklausantis *Asteraceae* šeimai. Tai vaistinis augalas, kilęs iš Šiaurės Amerikos. Šiais laikais jo panaudojimas eksponentiškai didėja, ypač kaip vaisto. Rausvažiedės ežiuolės rūšies tyrimai atskleidė daugybę biologiškai aktyvių junginių, kurie pasižymi farmakologiniu aktyvumu [25]. Svarbiausi rausvažiedės ežiuolės komponentai yra alkilamidai, polisacharidai, glikoproteinai, flavonoidai ir fenoliniai junginiai [26, 27]. Šis augalas yra fitocheminių medžiagų šaltinis, kuris gali būti naudojamas daugeliui ligų gydyti. Antioksidacinės, imunomodulatorinės, priešuždegiminės, antibakterinės, antivirusinės ir antiosteoporozinės savybės – tai tik keletas teigiamų biologinių poveikių, rodančių šios rūšies svarbą ekosistemoje [25].

Echinacea purpurea ekstraktai, tradiciškai naudoti Šiaurės Amerikoje įvairių rūšių infekcijoms ir žaizdoms gydyti, tapo labai populiarių vaistažolių preparatai visame pasaulyje. Polisacharido frakcijos (echinacino B) buvimas, gaminant hialurono rūgštis ir polisacharido kompleksą, skatina žaizdų gijimą, slopina hialuronidazę ir skatina fibroblastų augimą. Šios rūšies vaistinis augalas tradiciškai buvo naudojamas danties ir žarnyno skausmams, gyvatės įkandimui, odos ligoms, traukuliams, lėtiniam artritui ir vėžiui gydyti. Atliktų tyrimų duomenimis, alkamidai yra susiję su ežiuolės ekstraktų imunomoduliacinėmis savybėmis *in vitro* ir *in vivo*. Polisacharidai vaidina svarbų vaidmenį ežiuolės preparatų priešuždegiminiam poveikiui [28]. Naujausi tyrimai atskleidė, kad tam

tikri standartizuoti ežiulės preparatai turi stiprų ir selektyvų antivirusinį ir antimikrobinį poveikį. Rausvažiedės ežiulės preparatai – naudojami peršalimo, gripo tipo infekcijų ir panašių viršutinių kvėpavimo takų ligų simptomams palengvinti. Be to, jie pasižymi įvairiomis imuninės sistemos moduliavimo veiklomis, apimančiomis tam tikrų imuninių funkcijų, tokių kaip makrofagų fagocitinis aktyvumas, stimuliavimą ir epitelio ląstelių priešuždegiminių reakcijų į virusus ir bakterijas slopinimą, kuris pasireiškia kaip įvairių citokinų ir chemokinių sekrecijos pokyčiai. Šios imuninės moduliacijos atsiranda dėl atitinkamų genų ir jų transkripcijos veiksmų padidinto arba sumažėjusio reguliavimo. Visas šis biologinis aktyvumas gali būti įrodytas esant necitotoksinėms ekstrakto koncentracijoms ir, atrodo, atsiranda dėl kelių komponentų, o ne dėl atskirų cheminių junginių, būdingų ežiulės ekstraktams [29].

1.2. Antriniai metabolitai

Augalai natūraliai gamina įvairius skirtingos fitocheminės prigimties junginius, kurie naudojami jų augimui ir vystymuisi. Pirminiai metabolitai reikalingi tokiems procesams, kaip fotosintezė, kvėpavimas, tirpių medžiagų pernešimas, baltymų sintezė, maistinių medžiagų asimiliacija ir angliavandenių, baltymų ir lipidų diferenciacija arba susidarymas [30]. Produktai, gauti iš pirminių metabolitų, tiesiogiai nedalyvaujančių augime ir vystymesi, laikomi antriniais metabolitais. Paprastai antriniai metabolitai yra pirminių metabolitų produktai ir susidaro dėl biosintezės modifikacijų, įskaitant metilinimą, glikozilinimą ir hidroksilinimą. Antriniai metabolitai nėra būtini augalo augimui ir vystymuisi, bet vaidina svarbų vaidmenį jų išlikimui ir prisitaikymui prie kintančios aplinkos sąlygų. Augalų metabolitų cheminė prigimtis ir sudėtis įvairiose rūšyse skiriasi [31].

1.2.1. Fenoliniai junginiai

Fenoliniams junginiams priskiriama daugiau nei 8000 junginių, plačiai paplitusių visoje augalų karalystėje. Fenoliniai junginiai yra antriniai metabolitai, kurie atsakingi už augalo struktūros palaikymą ir apsauginę funkciją nuo biotinio ir abiotinio streso. Fenoliniai junginiai sintetinami augaluose per šikimo rūgštį. Šių junginių koncentracija augale priklauso nuo aplinkos sąlygų ir geografinės padėties. Bendras bruožas, kuris būdingas visiems fenoliniams junginiams – fenolinė grupė, t.y., aromatinis žiedas su prisijungusiu bent vienu hidroksilo radikalu [32]. Hidroksilo grupė gali būti laisva arba prisijungusi kitą funkcinę grupę (esterius, eterius, glikozidus). Fenoliniai junginiai skirstomi į šias grupes: fenolinės rūgštys, flavonoidai, kumarinai, taninai bei ligninai [33].

1.2.2. Fenolinės rūgštys

Fenolinės rūgštys, be pagrindinės fenolio struktūros, turi karboksirūgšties grupę. Augaluose jos dažniausiai būna esterintos ir glikozilintos, laisvos formos aptinkamos retai. Išskiriamos dvi svarbiausios fenolinių rūgščių grupės: hidroksicinamono rūgšties dariniai, kuriems priklauso ferulo, kavos, *p*-kumaro ir chlorogeninės rūgštys, bei hidroksibenzenkarboksi rūgšties dariniai, kurių pagrindinės atstovės yra galo, vanilino, salicilo ir protokatecho rūgštys. Mokslinėje literatūroje pateikiami duomenys, kad fenolinės rūgštys pasižymi antibakterinėmis, priešuždegiminėmis, priešvėžinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis [34].

Daugybė *in vivo* ir *in vitro* mokslinių tyrimų atskleidė, kad fenolinės rūgštys atlieka įvairias biologines funkcijas. Kavos rūgštis ir chlorogeno rūgštis yra svarbūs astrinių augalų komponentai, pasižymintys natūraliomis antioksidacinėmis ir priešvėžinėmis savybėmis [35]. Šios rūgštys pasižymi kraujospūdį mažinančiomis savybėmis ir sumažina pagrindinių fermentų, susijusių su ciklosporino

sukeltų žiurkių hipertenzijos patogenezę, aktyvumą. Nustatyta, kad galo rūgštis specifiskai veikia riebalinį audinį, slopina lipogenezę, gerina signalų perdavimą insulinui ir kartu mažina uždegiminius procesus ir perteklinį lipidų kaupimąsi [36]. Tarp šių savybių išskiriamas antihepatokarcinominis fenolinių rūgščių aktyvumas, nes hepatokarcinoma yra viena iš pagrindinių mirtingumo nuo vėžio priežasčių pasaulyje. Antikancerogeninis kavos rūgšties poveikis daugiausia susijęs su antioksidacinėmis savybėmis, o tai siejama su jo chemine struktūra. Pirma, laisvųjų fenolio hidroksilų (orto-dihidroksilo) buvimas leidžia sumažinti OH-jungties disociacijos entalpiją ir padidinti H atomų perdavimo greitį peroksilo radikalams, taip pat jų skaičių ir padėti fenilo žiede. Be to, dviguba jungtis anglies grandinėje padidina fenolio radikalo stabilumą. Šie cheminiai veiksniai, susiję su kavos rūgšties molekule, leidžia pašalinti laisvuosius radikalus, užkerta kelią reaktyviųjų deguonies rūšių gamybai, taip pat galimybei sukelti įvairių vėžinių ląstelių DNR oksidaciją. Vanilino rūgštis taip pat yra veiksmingas hipoksijos sukeliama veiksnio (HIF-1) inhibitorius ir gali reikšmingai slopinti naviko augimą ksenografinio naviko modelyje [37].

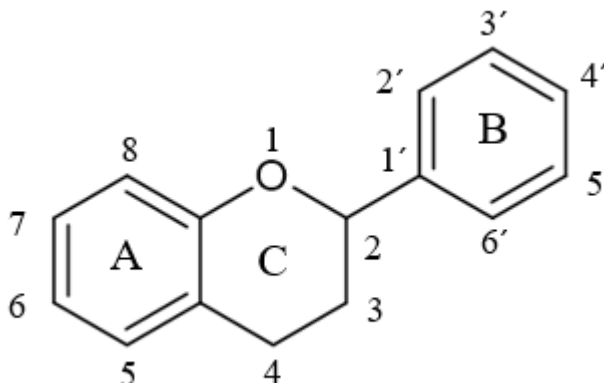
Svarbiausi rausvažiedės ežiuolės komponentai yra fenolinės rūgšties dariniai. Dažniausiai aptinkamos fenolinės rūgštys yra cikoro rūgštis, echinakozidas, chlorogeno rūgštis, kaftaro rūgštis, kavos rūgštis ir galo rūgštis, kurių koncentracijos skiriasi priklausomai nuo augalo dalių. Pagal rausvažiedės gydomąsias savybes svarbiausia laikoma cikoro rūgštis. Nustatyta, kad cikoro rūgštis turi imunostimuliatorių ir antivirusinį poveikį, nes slopina žmogaus imunodeficito viruso integracijos fermentą, skatina fagocitų aktyvumą. Be to, kaip antihialuronidazė, ji apsaugo kolageną ir pasižymi dideliu laisvųjų radikalų šalinimo aktyvumu, todėl turi apsauginį ir gydomąjį poveikį nuo UV spindulių daromos žalos odai. Cikoro rūgštis pasižymi efektyviu 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalų šalinimo aktyvumu, panašiu į flavonoidų ir rozmarino rūgštis [28]. Taip pat ši rūgštis gali susilpninti oksiduotų mažo tankio lipoproteinų sukeltus apoptotinius požymius, pavyzdžiui, vėlesnį mitochondrijų transmembraninio potencialo suskaidymą. Nustatyta, kad šis bioaktyvus junginys apsaugo nuo sisteminio uždegimo sukkelto atminties sutrikimo ir amiloidogenezės, inaktyvuodamas NF-κB. Cikoro rūgštis turi teigiamą poveikį įvairių lėtinių sisteminių ligų valdymui [38]. Taip pat buvo ištirta, kad iš rausvažiedės ežiuolės išskirta chlorogeno rūgštis pasižymi antikancerogeninėmis savybėmis, mažindama N-nitrozo junginių sukeliama kancerogeninį poveikį [39].

1.2.3. Flavonoidai

Flavonoidai yra antriniai metabolitai, kurių labai gausu augaluose. Iki šiol buvo nustatyta daugiau nei 4000 skirtingų augalinės kilmės flavonoidų. Dauguma flavonoidų augaluose randami glikozidų pavidalu. Augaluose flavonoidai gaunami dviem biosintezės būdais – fenilpropanoido, kuris gamina fenilpropanoido skeletą (C₆-C₃), ir poliketido, kuris gamina polimerinių C₂ vienetų blokus. Fermentas chalkono sintazė katalizuoja 2'-hidroksichalkono karkaso susidarymą iš *p*-kumaroilo CoA ir malonilo CoA, kurie vėliau naudojami keliuose fermentiniuose etapuose kitiems flavonoidams sintetinti. Keletas veiksnių, tokių kaip aplinkos sąlygos (pvz., šviesa, vandens prieinamumas ir temperatūra), hormonai (pvz., jazmono rūgštis) ir fiziniai veiksniai, turi įtakos flavonoidų biosintezėje dalyvaujančių genų ekspresijai, todėl keičiasi jų prieinamumas [40].

Augaluose flavonoidai atlieka daug funkcijų, pavyzdžiui, reguliuoja ląstelių augimą, pritraukia vabzdžius apdulkintojus bei apsaugo nuo biotinio ir abiotinio streso. Šie junginiai gali veikti kaip signalinės molekulės, UV spindulių filtrai, reaktyviųjų deguonies rūšių (RDR) šalintojai ir atlikti keletą svarbių funkcijų, susijusių su augalų atsparumu sausrui, karščiui ir šalčiui [41]. Flavonoidai turi pagrindinį penkiolikos anglių flavono skeletą, kuris yra sudarytas iš dviejų benzeno žiedų (A ir

B), sujungtų per heterociklinį pirano žiedą (C) [42]. Remiantis flavonoidų struktūra, juos galima suskirstyti į šešias pagrindines klases: flavan-3-olius, flavonus, flavonolius, flavanonus, izoflavonus ir antocianinus [32].



1.1 pav. Bendra flavonoidų struktūra

Mokslinių tyrimų duomenimis, flavonoidai yra naudingi žmonių sveikatai, o mityba, kurioje gausu šių junginių, gali padėti išvengti kai kurių lėtinių ligų. Flavonoidai turi keletą farmakologinių savybių, tačiau neabejotinai svarbiausia yra ta, kuri susijusi su gebėjimu pašalinti laisvuosius radikalus ir veikti kaip antioksidantas. Flavonoidų klasėse antioksidacinis pajėgumas skiriasi priklausomai nuo funkcinės grupės tipo ir jos išsidėstymo aplink branduolinę struktūrą. Hidroksi grupių skaičius ir padėtis katecholio B žiede turi įtakos laisvųjų radikalų pašalinimo gebėjimui. Funkcinės hidroksi grupės flavonoidai gali būti elektronų donorais ir taip stabilizuoti laisvuosius radikalus [43]. Flavonoidai, tokie kaip kvercetas ir kampferolis, aptinkami vaistinėje medetkoje, vaistiniame kietyje ir rausvažiedėje ežiuolėje, kurie, kaip įrodyta, pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu. Šie junginiai gali apsaugoti nuo DNR pažeidimo, sumažinti uždegimą ir sustiprinti imuninę funkciją [8, 18, 28].

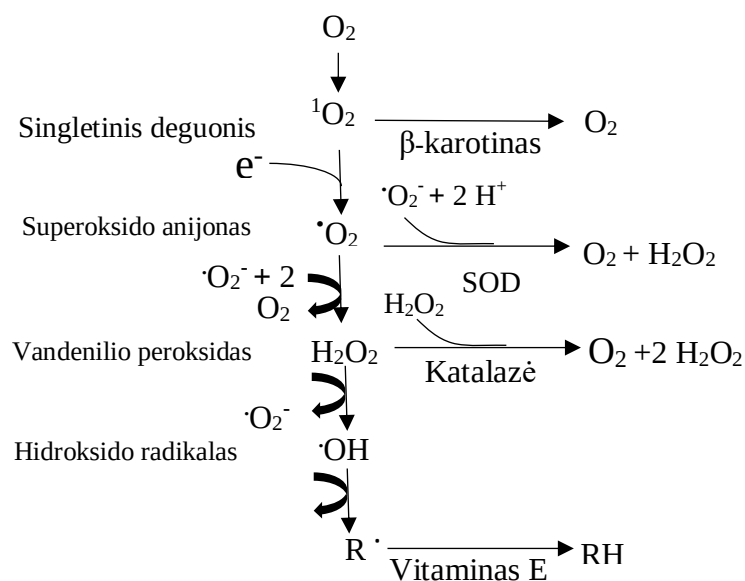
Be antioksidacinių, flavonoidai pasižymi priešuždegiminėmis, priešvėžinėmis, senėjimą stabdančiomis, neuroprotektinėmis, antidiabetinėmis, antibakterinėmis ir antivirusinėmis savybėmis [43].

1.3. Antioksidacinės savybės

Reaktyviosios deguonies rūšys (RDR) – superoksido anijonas, vandenilio peroksidas, hidroksilo radikalas – labai reaktyvios molekulės, pernešančios nesuporuotas elektronų poras, kurios suardo baltymus, lipidus bei DNR ir sukelia oksidacinį stresą. Oksidacinis stresas yra susijęs su patologiniais sutrikimais, kurie sukelia šias ligas: vėžį, širdies ir kraujagyslių ligas, aterosklerozę, hipertenziją, cukrinį diabetą, paspartina senėjimo procesą. Antioksidantai yra medžiagos, kurios neleidžia susidaryti laisviesiems radikalams žmogaus organizme, taip užkirsdami kelią oksidaciniam stresui ir su juo susijusioms ligoms. Jie gali būti suskirstyti į kelias kategorijas. Pagal jų aktyvumą jie gali būti suskirstyti į fermentinius ir nefermentinius antioksidantus [44]. Fermentiniai antioksidantai veikia skaidydami ir pašalindami laisvuosius radikalus. Antioksidaciniai fermentai pavojingus oksidacinius produktus paverčia vandenilio peroksidu (H_2O_2), o po to vandeniu, vykstant kelių etapų procesui, dalyvaujant kofaktoriams, tokiems kaip varis, cinkas, manganas ir geležis [45]. Šiai antioksidantų grupei priskiriami fermentai – superoksido dismutazė, katalazė, glutationo peroksidazė.

Nefermentiniai antioksidantai veikia nutraukdami laisvųjų radikalų grandines reakcijas [46]. Keletas nefermentinių antioksidantų pavyzdžių yra vitaminas C, vitaminas E, augaliniai flavonoidai, karotinoidai ir glutationas [47].

Antioksidantai veikia arba slopindami laisvųjų alkilo radikalų susidarymą inicijavimo etape arba pertraukdami laisvųjų radikalų grandinės plitimą. Oksidacinio slopinimo mechanizme, antioksidantai veikia kaip vandenilio donorai. Antioksidacinis radikalas stabilizuojamas, kai jo elektronai delokalizuojami, todėl antioksidaciniai laisvieji radikalai nesukelia kitų laisvųjų radikalų. Jie netgi reaguoja su lipidų laisvaisiais radikalais, sudarydami stabilus ir sudėtingus junginius.



1.2 pav. ROR susidarymo ir fermentinių bei nefermentinių antioksidantų ROR neutralizavimo schema

Šiuo metu įvairių medžiagų, įskaitant natūralias, antioksidacinės savybės yra plačiai tiriamos, siekiant nustatyti naujus junginius iš natūralių šaltinių. Vaistiniai augalai gali būti perspektyvūs antioksidantų šaltiniai. Daugelis augalų sudedamųjų dalių gali prisidėti prie jų antioksidacinių ir kitų apsauginių savybių. Atliktų tyrimų metu nustatyta, kad vaistinės medetkos, vaistinio kiekio ir rausvažiedės ežiuolės ekstraktai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Šių vaistažolių antioksidacinis aktyvumas siejamas su didele fenolinių junginių, tokių kaip flavonoidai ir fenolinės rūgštys, koncentracija.

Flavonoidų antioksidacinio veikimo mechanizmai gali būti: tiesioginis ROR pašalinimas, ROR susidarymo slopinimas per mikroelementų chelatą (pvz., kvercetas turi geležies kompleksų sudarymo ir geležį stabilizuojančių savybių) arba fermentų, dalyvaujančių gaminant laisvuosius radikalus (pvz., glutathiono S-transferazės, NADH oksidazės ir ksantino oksidazės), slopinimas ir antioksidacinės gynybos aktyvinimas (pvz., antioksidacinių fermentų, turinčių radikalų slopinimo gebėjimų, reguliavimas). Taip pat gali atsirasti kai kurių šių mechanizmų derinys – laisvųjų radikalų šalinimas ir kai kurių fermentų funkcijų slopinimas [40].

Tiriant fenolinius antioksidantus, nustatyta, kad jų antioksidacinės savybės yra susijusios su fenolinių grupių, užimančių 1, 2 arba 1, 4 pozicijas aromatiniam žiedui, skaičiumi, taip pat su žiedo pakaitų tūriu ir elektroninėmis savybėmis [47,48]. Antioksidantinių junginių rūšis ir koncentracija skiriasi priklausomai nuo augalo rūšies, aplinkos sąlygų, subrendimo laipsnio ir auginimo būdo. Augaliniuose

preparatuose (ekstraktuose, nuoviruose) antioksidantų koncentracija ir sudėtis taip pat priklauso nuo ekstrahavimo technikos, jos sąlygų (ekstrahavimo laiko ir temperatūros), tirpiklių. Fenoliniams junginiams iš augalinių medžiagų ekstrahuoti dažnai naudojami tirpikliai, tokie kaip metanolis, etanolis, vanduo, acetonas ir jų deriniai [48]. Šiuose augaluose aptinkami karotinoidai ir procianidinai taip pat vaidina svarbų vaidmenį antioksidaciniame aktyvume [49].

1.4. Antibakterinės savybės

Antibiotikams atsparių patogenų plitimas per šį šimtmetį tapo pasauline sveikatos problema. Bakterijų atsparumas antibiotikams ir biocidams atsiranda dėl plataus antibiotikų vartojimo, kuris yra pagrindinis veiksnys, lemiantis genų kaupimąsi bakterijose, koduojančiuose atsparumą konkrečiam agentui. Veiksmingų biologinių sprendimų, skirtų antibiotikų atspariems patogenams slopinti trūkumas, kartu su Vyriausybės direktyvomis, išdėstytomis dabartiniame ES reglamente 2019/6, skatina ieškoti alternatyvių priemonių [50]. Viena iš alternatyvų – vaistinių augalų panaudojimas antibakteriniams preparatams kurti. Šių augalų antibakterinis poveikis gali pasireikšti daugybėje mechanizmų, tokių kaip citoplazminės membranos pažeidimai, ląstelių sienelių sintezės, baltymų bei nukleorūgščių sintezės slopinimas arba medžiagų apykaitos slopinimas [51, 52].

Vaistinė medetka naudojama įvairiuose antibakteriniuose preparatuose dėl ekstrakte esančių fitocheminių junginių antibakterinio poveikio. *Calendula officinalis* žiedlapių metanolinio ir etanolinio ekstraktų antimikrobinis aktyvumas buvo ištirtas prieš klininius patogenus, įskaitant bakterijas ir grybelius. Nustatyta, kad metanolinis ekstraktas prieš daugumą tirtų bakterijų pasižymėjo geresniu antibakteriniu aktyvumu nei etanolinis ekstraktas. Mokslinių tyrimų duomenimis, vaistinės medetkos žiedų metanolinis ekstraktas pasižymėjo antibakteriniu poveikiu prieš anaerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių periodonto bakterijų kamienus (*Porphyromonas gingivalis*, *Furobacterium nucleatum*, *Vegilonella parvulycesa*, *Vegilonellantomycosa*) [53]. Vaistinės medetkos eterinis aliejus taip pat pasižymi antibakterinėmis savybėmis ir slopina *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* bei *Bacillus cereus* augimą. *Calendula officinalis* kaliaus *in vitro* ekstraktų antibakterinis aktyvumas buvo tiriamas naudojant disko difuzijos į agarą metodą. Šių augalų etanoliai ir chloroforminiai ekstraktai buvo tiriami prieš keturias bakterijų rūšis (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* ir *Kocuria rhizophila*). Palyginimui buvo naudojami antibiotikai: penicilinas, novobiocinas, ampicilinas, chloramfenikolis ir eritromicinas. Vaistinės medetkos kaliaus etanolinis ekstraktas parodė 38 mm slopinimo zoną prieš *S. aureus*, o chloroforminis ekstraktas – 32 mm slopinimo zoną prieš *B. cereus*. Slopinamasis poveikis buvo labai panašus į tiriamų antibiotikų slopinimą [54].

Vaistinis kietis, mokslinių tyrimų duomenimis, taip pat pasižymi antibakteriniu poveikiu. *A. dracuncululus* eterinis aliejus pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu slopindamas *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Salmonella* spp. bakterijų augimą, ypač *Staphylococcus epidermidis* (21,5 mm). Kitame tyrime įvertintas vaistinio kietio etanolinio ekstrakto slopinamasis poveikis prieš šiuos bakterijų kamienus: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*. Didžiausią slopinamąjį poveikį etanolinis ekstraktas parodė prieš *S. pyogenes* (18 mm), o mažiausią – *P. aeruginosa* (9 mm) [55].

Rausvažiedės ežiuolės ekstraktai veikia bakterijų dauginimąsi ir slopina jų išskiriamų medžiagų aktyvumą. Mokslinių tyrimų duomenimis, etanolinis *E. purpurea* ekstraktas pasižymėjo antibakteriniu poveikiu prieš visus tirtus bakterijų kamienus (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ir *Staphylococcus aureus*). Didžiausias etanolinio ekstrakto slopinamasis poveikis nustatytas prieš *Escherichia coli* (slopinimo zona – 11 mm) [56]. Rausvažiedės ežiuolės antibakterinis aktyvumas siejamas su ekstrakte aptinkamais fenoliniais junginiais, tokiais kaip limonenas ir *p*-cimenas, *p*-kumaro ir kavos rūgštis, kurie pasižymi įvairiomis biologinėmis savybėmis. Limonenas ir *p*-cimenas veikia citoplazminės membranos pralaidumą ir negrįžtamai sunaikina lipidų dvisluoksnį, suardydami membranos vientisumą. Taip pat didelė *p*-kumaro ir kavos rūgšties koncentracija sukelia negrįžtamus pralaidumo pokyčius bakterijų ląstelės membranoje ir gali prisijungti prie DNR, sukeldama struktūros pokyčius. Kavos rūgštis slopina ląstelių antioksidacinių fermentų aktyvumą, didina reaktyviųjų deguonies rūšių reakcijas oksidacijos būdu ir veikia baktericidiškai [57].

Aptariamų astrinių augalų ekstraktai ir eteriniai aliejai pasižymėjo slopinamuoju poveikiu daugelio bakterijų augimui, todėl jie galėtų būti gera bakterinių ligų prevencijos ir gydymo alternatyva.

1.5. Sidabro nanodalelės

Nanodalelė (ND) – mikroskopinė dalelė, kurios bent vienas matmuo mažesnis nei 100 nm [58]. ND pasižymi naujomis arba patobulintomis savybėmis, atsižvelgiant į konkrečias charakteristikas, pavyzdžiui: dydį (1–100 nm), formą ir struktūrą. Nanomedžiagos dėl fizikinių ir cheminių savybių per pastaruosius kelis dešimtmečius sulaukė didelio dėmesio. Šios dalelės pasižymi dideliu paviršiaus plotu, o tai lemia didesnę biocheminę reaktyvumą, katalizinį veikimą ir atominę elgseną, palyginti su didelėmis dalelėmis, kurios turi identišką cheminę konfigūraciją [59, 60].

Šiuo metu sidabro nanodalelės sulaukia didelio dėmesio dėl biologinės veiklos ir unikalių cheminių, optinių ir magnetinių savybių. Šios nanodalelės naudojamos farmacijos, medicininės diagnostikos, jutiklių, maisto konservavimo, žaizdų gydymo, vandens valymo ir kosmetikos srityse [58]. Sidabro nanodalelės nėra toksiškos eukariotiniams organizmams, įskaitant žmones, tačiau turi didelį toksiškumą prokariotinėms ląstelėms, tokioms kaip bakterijos, virusai ir grybeliai [61].

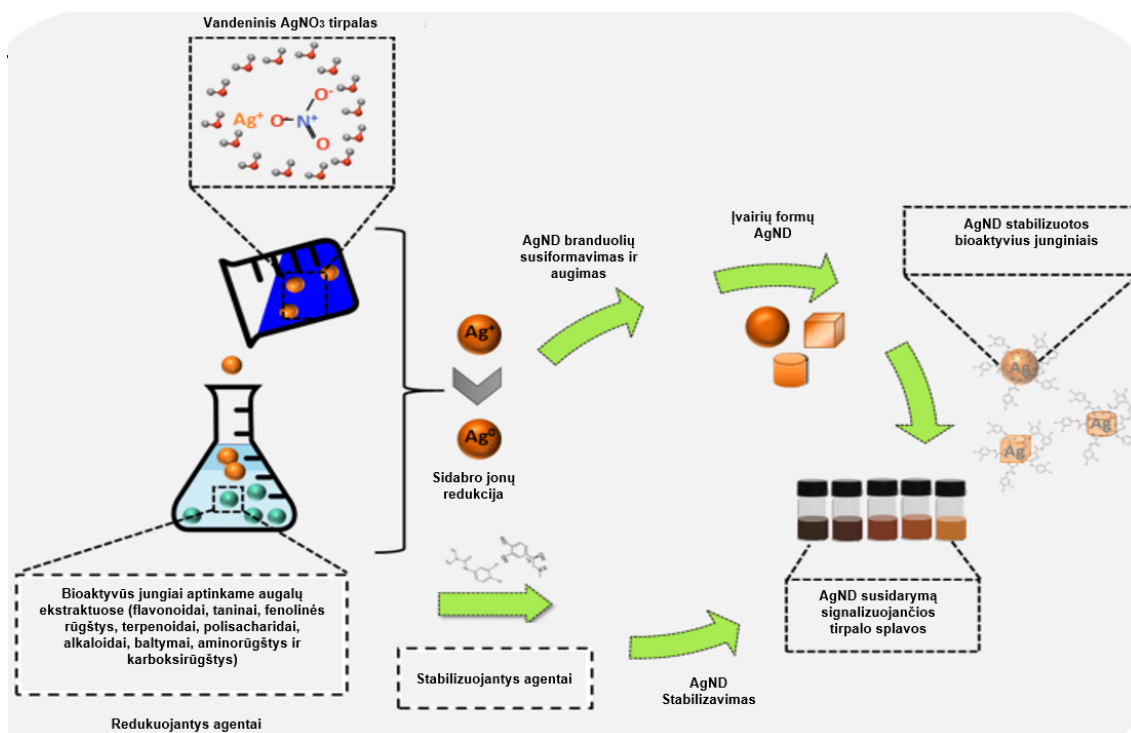
Sidabro nanodalelės (AgND) galima lengvai sintetinti naudojant įvairius metodus. Dažniausiai naudojami nanodalelių suformavimo būdai yra cheminė ir fizikinė sintezė, tačiau šie metodai reikalauja aukštos temperatūros ir slėgio sąlygų, jiems daugiausia naudojami toksiški ir pavojingi reagentai ir pradinės medžiagos. Neseniai biologinė (žalioji) metalų nanodalelių sintezė, naudojant aplinkai nekenksmingus metodus, padėjo šias problemas išspręsti. Vienas iš tokių perspektyvių metodų yra nanodalelių sintezė naudojant augalų ekstraktus [62].

1.6. Sidabro nanodalelių sintezė iš augalų (žalioji sintezė)

Augalų panaudojimas sidabro nanodalelių gamybai sulaukė didelio susidomėjimo dėl ekologiško, greito, nepatogeniško ir ekonomiško proceso [63]. Sidabro nanodalelių sintezė naudojant augalų ekstraktus turi daugiau privalumų ne tik už cheminius ir fizikinius metodus, tačiau ir už kitus biologinės sintezės metodus (naudojant bakterijas, mieles arba grybus), susijusius su labai sudėtingomis procedūromis, reikalaujančiomis aukštų aseptikos sąlygų, mikroorganizmų kultūrų palaikymo ir ilgo inkubavimo laikotarpio. Be to, augalų antrinių metabolitų redukcinės savybės siejamos su didesniu potencialiu gebėjimu sintetinti nanodaleles [64]. Svarbiausias augalų ekstraktų

naudojimo nanodalelių sintezėje privalumas – galimybė sukurti biokonjugatus su naujomis unikaliomis biologinėmis savybėmis, sujungiančiomis AgND ir augalų bioaktyviųjų junginių savybes. Didžiausias dėmesys skiriamas vaistiniams augalams, nes juose gausu sudėtingų fitocheminių medžiagų ir antioksidantų. Vaistiniai augalai pasižymi įvairiu priešuždegiminiu, antibakteriniu, antivirusiniu, senėjimą stabdančiu ir priešvėžinio poveikio spektru, todėl atliekama daug tyrimų, skirtų nanodalelėms pritaikyti farmacijos srityje, biomedicinoje, audinių inžinerijoje, maisto ir kosmetikos pramonėje [58].

AgND sintezė yra dviejų pakopų procesas. Pirmiausia vyksta Ag^+ jonų redukcija iki Ag^0 , o pasibaigus aglomeracijos ir stabilizacijos procesui, sintezė apima koloidinių AgND oligomerinių grupių kūrimą. Nanostruktūrinių medžiagų sintezė, naudojant augalų ekstraktus, yra saugi aplinkai, todėl ji priskiriama žaliosios sintezės metodui. Kaip aplinkai nekenksmingas tirpiklis, žaliosios nanodalelių sintezės metu, paprastai naudojamas vanduo [65]. AgND sintezei gali būti naudojamos įvairios augalo dalys: šaknys, stiebas, žiedai, vaisiai, lapai ir kaliaus kultūra. Biologiškai aktyvūs junginiai randami augalų ekstraktuose, ND sintezės proceso metu atlieka dvigubą funkciją, pirmiausia jie veikia kaip reduktoriai ir, antra, kaip stabilizatoriai [66]. Pagrindiniai junginiai, turintys įtakos nanodalelių redukcijai, yra biomolekulės, tokios kaip flavonoidai, taninai, fenolinės rūgštys, terpenoidai, polisacharidai, alkaloidai, baltymai, aminorūgštys ir karboksirūgštys. Atliktais tyrimais nustatyta, kad taninai yra svarbūs stabilizuojant sidabro nanodaleles, o kiti, vandenyje tirpūs antriniai metabolitai, daugiausia yra atsakingi už sidabro nanodalelių biosintezę [62]. Sidabro nanodalelių sintezėje taip pat dalyvauja augalų ekstraktuose aptinkami reduktazės fermentai [58].



1.3 pav. Bendras sidabro nanodalelių susidarymo iš augalo ekstrakto mechanizmas

Žalioji sidabro nanodalelių sintezė priklauso nuo kelių parametų. Pagrindiniai fiziniai ir cheminiai parametrai, turintys įtakos sidabro nanodalelių sintezei, yra reakcijos temperatūra, metalo jonų koncentracija, ekstrakto fitocheminė sudėtis, reakcijos mišinio pH, reakcijos trukmė ir maišymas. Tokie parametrai kaip metalo jonų koncentracija, ekstrakto fitocheminė sudėtis ir reakcijos laikotarpis labai veikia AgND dydį, formą ir morfologiją. Sidabro nanodalelių sintezei didelės įtakos

turi temperatūra. Dažniausiai AgND sintezė atliekama kambario temperatūroje kaip paprastas metodas, tačiau norint sutrumpinti sintezės laiką ir padidinti Ag^+ konversiją į Ag^0 , sintezė gali būti vykdoma ir aukštesnėje temperatūroje. Atliktais mokslininkų tyrimais nustatyta, kad temperatūros pakilimas ($30\text{ }^{\circ}\text{C} - 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) padidino sidabro nanodalelių sintezės greitį, taip pat paskatino mažesnio dydžio AgND sintezę [65]. Reakcijos laikas taip pat yra svarbus veiksnys nanodalelių susidarymui ir turi įtakos jų formai, dydžiui ir stabilumui. Reakcijos laikas kinta priklausomai nuo sintezės sąlygų, tokių kaip augalų ekstraktų koncentracija ir sudėtis, reakcijos temperatūra ir pH. Nustatyta, kad nanodalelės per tam tikrą laiką didėja. Įprastai reakcija įvyksta greitai, tirpalas nusidažo raudona spalva iš karto po Ag^+ jonų sumaišymo su augalų ekstraktais, rodančiais nanodalelių susidarymą. Tačiau kai kurie mokslininkai tyrimų metu nustatė, kad norint iki galo Ag^+ paversti ir nanodaleles stabilizuoti, reikia kelių parų [58].

1.6.1. Sidabro nanodalelių, susintetintų iš augalų ekstrakto, charakteristika

Sidabro nanodalelių dalelių formai, dydžiui, paviršiui ir sklaidai nustatyti, galima naudoti įvairius metodus. Įprastai naudojami metodai yra ultravioletinių spindulių (UV–Vis) spektrofotometrija, Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių (FTIR) spektroskopija, transmisinių elektronų mikroskopija (TEM) [65].

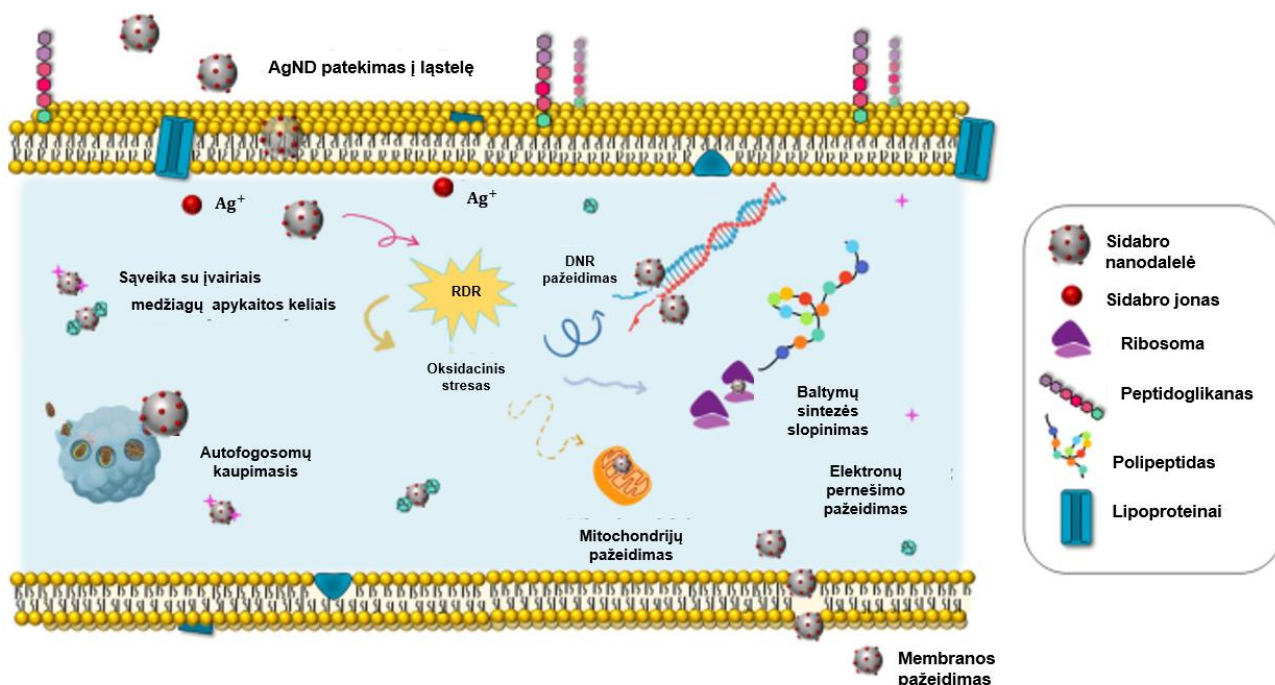
Ultravioletinių spindulių spektroskopija – nesudėtingas ir efektyvus metodas, leidžiantis greitai identifikuoti ir charakterizuoti sidabro nanodaleles. Taikant šią spektroskopiją, UV-Vis šviesa praleidžiama per mėginį ir matuojamas šviesos laidumas. Absorbcijos spektrai gali patvirtinti biosintetintų AgND susidarymą tirpale. Paprastai nanodalelių buvimui nustatyti naudojami bangos ilgiai nuo 400 iki 800 nm. AgND absorbuoja stiprią absorbcijos juostą, vadinamą paviršiaus plazmoniniu rezonansu (PPR), 400–500 nm diapazone dėl šviesos ir judrių sidabro nanodalelių paviršiaus. Mažesnės ir didesnės didžiausio bangos ilgio (λ_{max}) reikšmės atitinkamai yra susijusios su mažesniu ir vidutiniu AgND dydžiu bei didesne koncentracija. Be to, plačios ir siauros smailės, esant didesniems ir trumpesniems bangų ilgiams, atitinkamai rodo sidabro nanodalelių dydžio padidėjimą ir sumažėjimą. Susintetintų nanodalelių kokybę galima iliustruoti paviršiaus plazminio rezonanso smailės intensyvumu ir padėtimi, kuri atsiranda bangos ilgiuose nuo 380 iki 450 nm. Siaura ir mažo bangos ilgio absorbcijos smailė reiškia mažą nanodalelių dydį, o plati smailė, esant dideliui bangos ilgiui, dideles arba agreguotas nanodaleles [67]. Taigi, UV-Vis spektroskopija yra naudingas būdas apibūdinti susintetintas AgND.

1.6.2. Sidabro nanodalelių antibakterinės savybės

Sidabras nuo seno buvo plačiai naudojamas kaip antibakterinė priemonė, todėl prieš pradedant gydymą antibiotikais, sidabras naudotas kaip antiseptikas nudegimams ir žaizdoms gydyti. Antimikrobinis sidabro poveikis yra gerai žinomas, bet atsiradus sidabro nanodalelėms, jo poveikis ir įtaka gerokai išaugo. Tai paaiškinama naujomis fizinėmis ir cheminėmis AgND savybėmis. Šios dalelės turi didesnę paviršiaus ir tūrio santykį, o tai leidžia geriau sąveikauti su mikrobo paviršiumi ir pasižymėti geresniu slopinamuoju poveikiu. Sidabro nanodalelės, susintetintos naudojant augalų ekstraktus, pasižymi geresnėmis antibakterinėmis savybėmis, palyginant su gautomis naudojant cheminį ar fizikinį sintezės metodą [68]. Šiuo būdu gautos AgND laikomos perspektyvia alternatyva antibiotikams ir naujos klasės antibakterinių medžiagų gamybai, tai padėtų išspręsti bakterijų atsparumo antibiotikams problemą [66]. Nors sidabro nanodalelių antibakterinės savybės yra plačiai aprašytos literatūroje, tačiau jų veikimo mechanizmas nėra tiksliai žinomas. Stipraus ir plataus

spektro antibakterinis poveikis prieš morfologiškai ir metaboliškai skirtingus mikroorganizmus yra susijęs su skirtingais mechanizmais [69]. Šiuo metu literatūroje aptinkami trys galimi AgND antibakterinio veikimo mechanizmai, kurie gali veikti kartu arba atskirai:

- 1) AgND tiesiogiai ardo ląstelių sienes. Šios dalelės gali prasiskverbti pro išorinę membraną ir kauptis vidinėje membranoje, taip sukeldamos struktūrinius membranos pokyčius, kurie padidina bakterijų ląstelės membranos pralaidumą, todėl nekontroliuojamas molekulių transportavimas per citoplazminę membraną sukelia ląstelių mirtį. Taip pat įrodyta, kad AgND gali sąveikauti su sieros turinčiais baltymais bakterijų ląstelių sienelėje, sukelti baltymų denatūraciją ir suardyti ląstelės sienelę [70].
- 2) Sidabro nanodalelės gali patekti į ląstelės vidų ir sąveikauti su sieros ir fosforo grupėmis, esančiomis tarpląstelinėje medžiagoje, pavyzdžiui, dezoksiribonukleino rūgštimi (DNR) ir baltymais, keisti jų struktūrą ir funkcijas. Lygiai taip pat jos gali pakeisti kvėpavimo grandinę vidinėje membranoje, sąveikaudamos su tiolio grupėmis fermentuose ir generuodamos reaktyviųjų deguonies formų bei laisvųjų radikalų susidarymą. Reaktyvios deguonies formos – laikomos pagrindine daugumos ląstelių mirties priežastimi, nes inaktyvuoja DNR replikaciją bei sutrikdo adenoizino trifosfato (ATP) išskyrimą, o tai sukelia žalą tarpląsteliniais mechanizmais ir suaktyvina apoptozės kelią [71].
- 3) Trečiasis mechanizmas, kuris atsiranda lygiagrečiai su kitais dviem mechanizmais, yra laisvųjų sidabro jonų antibakterinis poveikis. Ag^+ jonai, dėl savo dydžio ir krūvio, gali sąveikauti su ląstelių komponentais, pakeisdami medžiagų apykaitos kelius, membranos struktūrą ir net genetinę medžiagą [72].



1.4 pav. Sidabro nanodalelių antibakterinis mechanizmas

Sidabro nanodalelių antibakterinis aktyvumas priklauso nuo įvairių veiksnių, įskaitant dalelių dydį, formą, pH, temperatūrą, bakterijų tipą ir $AgNO_3$ koncentraciją. AgND antibakterinis aktyvumas gramneigiamoms ir gramteigiamoms bakterijoms skiriasi. Atliktais tyrimais nustatyta, kad

gramneigiami bakterijų kamienai yra jautresni AgND, lyginant su gramteigiamų bakterijų kamienais. Jautrumo sidabro nanodalelėms skirtumai tarp gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų susiję su jų ląstelių paviršiaus savybių ir struktūrų skirtumais [73]. Gramteigiamos bakterijos turi storą ląstelės sienelę, sudarytą iš įvairių peptidoglikano sluoksnių, kuri apsunkina AgND prasiskverbimą per citoplazmines membranas. Priešingai gramteigiamoms, gramneigiamos turi ploną sienelę, kuri dažniausiai sudaryta tik iš vieno peptidoglikano sluoksnio, todėl sidabro nanodalelės lengvai patenka į citoplazmą ir sukelia ląstelių lizę [50]. Skirtingas sidabro nanodalelių antibakterinis poveikis gramneigiamoms ir gramteigiamoms bakterijoms parodo, kad sidabro nanodalelių įsisavinimas yra svarbus antibakteriniam poveikiui. Didelės įtakos antibakteriniam aktyvumui turi AgND dydis. Mažėjant dalelių dydžiui, savitasis paviršiaus plotas didėja, todėl paviršiuje yra daugiau atomų, kurie yra prieinami redoksinėms, fotocheminėms ir biocheminėms reakcijoms bei fizikinei ir cheminei sąveikai su ląstelėmis. Mažesnės nei 10 nm dydžio sidabro nanodalelės gali tiesiogiai pakeisti ląstelių laidumą, patekti į bakterijų ląsteles ir pažeisti jas. Biosintetintos AgND, tarpininkaujant augalų ekstraktams, gali įgyti augalų biologinį aktyvumą ir taip praplėsti taikymo sritį gydant patologinių bakterijų sukeltas ligas [72].

Sidabro nanodalelės, kurios susintetintos naudojant vaistinių augalų ekstraktą, pasižymi geresnėmis antibakterinėmis savybėmis, lyginant su augalo ekstraktu. Susintetintų sidabro nanodalelių antibakterinis aktyvumas vandeniniame vaistinės medetkos ekstrakto buvo įvertintas *in vitro* naudojant disko difuzijos į agarą metodą. Antibakterinės savybės buvo tiriamos prieš gramteigiamų (*Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *β-streptococcus* ir *Bacillus cereus*) ir gramneigiamų (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*) bakterijų kamienus bei palygintos su vaistinės medetkos ekstraktu. Gauti rezultatai parodė, kad susintetintos sidabro nanodalelės aktyviai sąveikauja su bakterijų membrana ir sutrikdo jų funkcijas. Ekstraktuose susintetintos AgND – stabilūs tirpalai su dideliu antibakteriniu aktyvumu, turėjo antimikrobinį poveikį visų rūšių tirtų bakterijų kamienams, o slopinimo zonos skersmuo buvo 7–18 mm. Vandeninis medetkų ekstraktas pasižymėjo antimikrobinio aktyvumu, tačiau tik prieš keletą bakterijų – *Staphylococcus aureus*, *β-streptococcus* ir *Staphylococcus epidermidis*. Ekstraktas su susintetintomis AgND pasižymėjo geresniu gramneigiamų bakterijų antibakteriniu poveikiu. Jautrumo sidabro nanodalelėms skirtumai tarp gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų buvo susiję su jų ląstelių paviršiaus savybių ir struktūrų skirtumais [50].

1.7. Augalų kaliaus kultūros *in vitro*

Augalų audinių kultūra *in vitro* – vienas iš biotechnologinių metodų, naudojamas augalams auginti ir dauginti kontroliuojamomis ir steriliomis sąlygomis. Šis metodas labai svarbus pramonėje, žemės ūkyje ir augalų selekcijoje, nes suteikia galimybę mikrodauginėti augalus, išsaugoti gemalo plazmą bei transformuoti augalus ir gaminti komercinės vertės antrinius metabolitus. Kaliaus kultūros gali būti embriogeninės arba neembriogeninės. Embriogeninėse kaliaus kultūrose yra diferencijuotų embriogeniškai kompetentingų ląstelių, kurios regeneruoja išsčius augalus [74]. Neembriogeniniuose yra vienalyčių, nediferencijuotų ląstelių, kurios naudojamos antrinių metabolitų gamybai. Kaliaus kultūros vystosi ne iš izoliuotų atskirų ląstelių, o iš nevienalyčių struktūrinių audinių, tačiau jos yra pakankamai homogeniškos, kad būtų galima mikrodauginėti ir sukurti identišką norimų savybių augalų kopijas [75]. *In vitro* kultūroje kaliaus gaunamas iš augalo eksplanto pasodinto ant kietos mitybinės terpės. Iš augalų audinių paimti eksplantai lėtai auga *in vitro* į ląstelių masę, kuri būna nuo bespalvės ir žalsvos iki šviesiai rudos spalvos. Šioms kultūroms formuoti galima naudoti beveik bet kurią augalo dalį [76], tačiau rekomenduojama – jaunų augalų, kadangi audiniai geriau formuoja

struktūras *in vitro*, juos lengviau dezinfekuoti ir gauti sterilią kultūrą. Augimą palaikančios ir sterilios sąlygos yra būtinos augimui palaikyti bei vystyti. Kaliaus kultūrų auginimo ir palaikymo sąlygos skiriasi, priklausomai nuo rūšies, bei turi būti optimizuotos kiekvienu atskiru atveju. Išoriniai veiksniai, tokie kaip temperatūra, šviesa, terpės pH ir kultūrų aeracija, veikia antrinių metabolitų biosintezę [77]. Paprastai kaliaus kultūros palaikomos kietoje mitybinėje terpėje, papildytoje specifinėmis maistinėmis medžiagomis, mineralinėmis druskomis, vitaminais ir makroelementais (pvz., azotu, fosforu ir kaliu). Įprastai didelės amonio jonų koncentracijos slopina antrinių metabolitų susidarymą, todėl reikalingos nedidelės koncentracijos. Dažnu atveju, didelės fosfatų koncentracijos skatina ląstelių augimą ir pirminį metabolizmą, o maža koncentracija pagerina antrinių metabolitų susidarymą. *Murashige* ir *Skoog* (MS), *White* ir sumedėjusių augalų mitybinės terpės plačiausiai naudojamos audinių kultūroms auginti [77]. Egzogeniškai tiekiami augimo reguliatoriai, esantys mitybinėje terpėje, lemia kaliaus susidarymą.

1.7.1. Augalų augimo reguliatoriai

Augimo reguliatoriai yra organiniai junginiai, natūraliai sintetinami aukštesniuose augaluose, kurie turi įtakos jų augimui, diferenciacijai ir antrinių metabolitų susidarymui. Siekiant sutrumpinti augalų augimo laiką, pagausinti derlių, pagerinti augalų savybes bei padidinti sintetinamų ir kaupiamų bioaktyviųjų medžiagų koncentraciją – naudojami augalų augimo reguliatoriai. Augimo reguliatoriai plačiai naudojami dauginant augalus iš įvairių eksplantų *in vitro* sąlygomis. Penkios pagrindinės fitohormonų klasės, kurios yra naudojamos *in vitro*, yra šios: citokininai, auksinai, giberelinai, etilenas ir abscizo rūgštis. Augimą ir morfogenezę *in vitro* reguliuoja terpėje tiekiamų augimo reguliatorių ir endogeniškai gaminamų augimo medžiagų sąveika ir pusiausvyra. *In vitro* kultūroje svarbu suderinti auksinų ir citokininų santykį, kuris atsakingas už ūglių ir šaknų formavimą. Didelė auksino koncentracija, palyginti su citokininu, skatina šaknų formavimąsi, o didelė citokinino koncentracija, palyginti su auksinu, skatina ūglių susidarymą [78]. Augimo reguliatorių pusiausvyra priklauso nuo auginimo *in vitro* tikslo ir nuo mikrodauginimo fazės (iniciacijos, dauginimosi arba iššaknijimo). Dauginimosi fazėje citokininų kiekis paprastai turėtų būti didesnis nei auksinų, tačiau iššaknijimo fazėje citokinino naudojimas nėra būtinas, o auginimo terpėje gali būti papildyta didesne auksinų koncentracija. Citokininai yra sintetinami iš adenino (aminopurino) ir atlieka svarbų vaidmenį manipuliuojant augalų ląstelėmis ir audiniais *in vitro*. Šie augimo reguliatoriai skatina augalų ląstelių dalijimąsi, yra įrodyta, kad jie veikia daugelį kitų fiziologinių ir vystymosi procesų. Šie poveikiai apima maistinių medžiagų mobilizaciją, chloroplastų brendimą, senėjimo stabdymą ir morfogenezės kontrolę. Dažniausiai mitybinėse terpėse naudojami citokininai – 2iP (N6-(2-izopentil)adenino), BAP (6-benzilaminopurinas) ir kinetinas (6-furfurilaminopurinas). Kaliaus kultūroje dažniausiai naudojamas auksinas – 3-indolilacto rūgštis (IAR), NAR (1-naftilacto rūgštis) bei IBR (3-indolilbutano rūgštis) [79].

1.7.2. Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūrų susidarymas *in vitro*

Audinių kultūros metodai buvo plačiai naudojami norint greitai gaminti vienodus, be patogenų ir aukštos kokybės augalus komerciniu mastu. Vaistinių medetkų dauginimas *in vitro* yra svarbus žingsnis tenkinant tokių augalų paklausą. Šios vaistažolės kaliaus formavimasis priklauso nuo įvairių veiksnių, įskaitant genotipą, eksplanto tipą, auginimo terpę ir egzogeninius augimo hormonus. Šie veiksniai turi įtakos ne tik kaliaus formavimui, bet ir kaliaus augimo parametrams, morfogenetiniam pajėgumui ir gamybos potencialui. Anksčiau buvo įrodyta, kad *C. officinalis* vystymasis terpėje be hormonų sukelia lėtą šaknų formavimąsi ir augalų augimo greitį [80]. Iš tiesų, visiškai augalų

regeneracija iš kaliaus kultūrų labai priklauso nuo citokininų ir auksinų sąveikos, nes šie augalų augimo hormonai skatina augalų ląstelių augimą ir diferenciaciją. Sudėtinga nustatyti tinkamą hormonų pusiausvyrą, kad tam tikra rūšis būtų sėkmingai išauginta auginimo terpėje [81]. Vaistinės medetkos kaliaus kultūros buvo suformuotos MS terpėje su skirtingomis auksino (2,4-dichlorfenoksiacto rūgšties (2,4-D) arba 3-indolilacto rūgšties (IAR) ir citokinino (kinetino arba N6-(2-izopentil)adenino (2iP)) koncentracijomis. Iš visų terpėje naudojamų hormonų derinių veiksmingiausiai kaliaus vystymąsi skatino du: 0,4 mg/l 2,4-D ir 0,4 mg/l kinetinas arba 0,1 mg/l 2,4-D ir 0,5 mg/l 2iP. Suspensijos kultūros buvo palaikomos šviesiomis arba tamsiomis sąlygomis. Šviesa stimuliuo ląstelių agregaciją kultūrose. Abiejose kultūrose ląstelės buvo nediferencijuotos tamsoje, o šviesoje vyko rizogenezė.

1.7.3. Vaistinio kiečio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) kaliaus kultūrų susidarymas *in vitro*

Dėl plataus vaistinio kiečio naudojimo maisto pramonėje, didelių nuostolių, patiriamų naudojant tradicinius auginimo būdus, vegetatyvinio dauginimosi sunkumų, atliekami alternatyvių, biotechnologinių *A. dracunculus* dauginimo būdų tyrimai. Vaistinio kiečio kaliaus kultūrą galima suformuoti iš įvairių augalo eksplantų – šaknų, stiebų ar lapų. *Artemisia dracunculus* L. kaliaus kultūros auginamos MS (*Murashige* ir *Skoog*), B5 (*Gamborg*) ir SH (*Schenk & Hildebrandt*) mitybinėse terpėse, papildytose skirtingų koncentracijų augimo reguliatorių – citokininų arba auksinų. Vaistinio kiečio kaliaus kultūros formavimą skatina tiek auksinai, tiek citokininai, tačiau veiksmingesni augimo hormonai – auksinai. Nepaisant to, formuojant ir auginant kaliaus kultūrą reikalingi abu šie fitohormonai, nes mitybinėse terpėse, kuriose yra tik auksinai ar citokininai, kaliaus genėzė nevyksta. Atliktais tyrimais nustatyta, kad mitybinės terpės, papildytos skirtingais augimo reguliatoriais, turėjo reikšmingą poveikį kaliaus savybėms, antriniams metabolitams ir augalų eteriniam aliejui bei jo sudėčiai. MS mitybinė terpė, papildyta auksinų (BAP) ir citokininų (NAR) deriniu, sukėlė didžiausią regeneracijos procentą (35,5 %), šaknies ilgį (1,28 cm), fenolinių junginių ir eterinio aliejaus (2,42 %) koncentraciją [82].

1.7.4. Rausvažiedės ežiuolės (lot. *Echinacea purpurea* L.) kaliaus kultūrų susidarymas *in vitro*

Kaliaus kultūrų susidarymas skiriasi, priklausomai nuo genotipo, eksplanto rūšies ir augalo augimo reguliatoriaus koncentracijos. Siekiant sukurti veiksmingą *Echinacea purpurea* kaliaus kultūrų formavimosi sistemą *in vitro*, naudoti skirtingi augalo eksplantai ir augimo hormonai. Atlikta dispersinė analizė, naudojant lapų, lapkočių, skilčialapių ir šaknų eksplantų susidarymo procentus. Kaliaus kultūras formavo visi tirti *E. purpurea* eksplantai. Didžiausias kaliaus kultūrų susidarymo procentas (90 %) gautas naudojant šiuos augimo reguliatorių derinius: 1,0 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l BAP lapuose; 0,5 mg/l IAR + 0,2 mg/l BAP lapkotyje; 2,0 mg/l NAR + 0,5 mg/l TDZ skilčialapyje; 0,2 mg/l NAR + 2,0 mg/l KIN, 0,5 mg/l IAR + 0,5 mg/l BAP šaknyse. Zebarjadi ir kt. pasiekė aukščiausią skilčialapio eksplanto kaliaus indukciją – 100 %, kuri apėmė skirtingus NAR ir TDZ derinius. TDZ yra sintetinis augimo reguliatorius, turintis auksino ir citokinino poveikį, kuris, priklausomai nuo naudojamos koncentracijos, gali sukelti didelę regeneraciją ir kaliaus susidarymą. Taip pat, buvo nustatyta skirtingų augimo reguliatorių įtaka fenolinių rūgščių koncentracijai, tiriant įvairius augalo eksplantus. Didžiausios kaftarų rūgšties (4,11 mg/g), chlorogeno rūgšties (8,83 mg/g) ir cikoro rūgšties (57,89 mg/g) koncentracijos gautos kaliaus kultūrose, suformuotose iš lapkočio ir šaknų eksplantų. Tyrimo rezultatai rodo, kad augalo genotipas, eksplanto rūšis, augimo reguliatoriaus koncentracija ir terpės sudėtis, yra svarbūs kaliaus kultūroms suformuoti [83].

1.7.5. Antriniai metabolitai kaliaus kultūrose

Kaliaus kultūros naudojamos antrinių metabolitų sintezei gamybos, farmacijos ir maisto pramonėje. Iš vaistinių augalų gaunamos bioaktyvios medžiagos, kurios naudojamos įvairių ligų gydymui, pavyzdžiui, vėžiui, infekcinėms, širdies ir kraujagyslių, neurodegeneracinėms. Taip pat antriniai metabolitai gali būti tiesiogiai išgaunami iš kaliaus kultūrų, nepakenkiant visam augalui, todėl kaliaus kultūrų technologija gali išsaugoti retas ir nykstančias augalų rūšis [77]. Kadangi šios kultūros auga kontroliuojamomis sąlygomis: be aplinkos veiksnių, sezoninių mikrobinių ligų, geografinių apribojimų ir kenkėjų įtakos, gali būti sintetinami aukštos kokybės antriniai metabolitai. Augalų totipotencijos savybė leidžia iš augalo ląstelės regeneruoti augalą. Palyginti su gyvūnų audiniais, augalų audinių kultūros gali gaminti daugiau ir greičiau tikslinių metabolitų dėl savo totipotentinės ypatybės. Be išvardintų privalumų, audinių kultūros technologijos taip pat suteikia galimybę manipuluoti augalų ląstelių biosintezės būdais, kad būtų gaminami patobulintų savybių antriniai metabolitai.

Artemisia augaluose, įskaitant vaistinį kietį, yra antrinių metabolitų, vadinamų artemisininu, kurie medicinoje labai svarbūs dėl veikimo spektro. Artemisininas ir jo analogai yra veiksmingiausi natūralūs antimaliariniai fitocheminiai junginiai. Šie junginiai taip pat turi reikšmingą poveikį įvairioms vėžio ląstelėms ir kai kurioms virusinėms ligoms. Atliktais tyrimais nustatyta, kad artemisinino metabolitas, seskviterpeno laktonas, yra veiksmingi gydant įvairių formų vėžį, įskaitant krūtį, storosios žarnos, plaučių ir leukemiją. Viena iš strategijų, leidžiančių gaminti dideles koncentracijas antrinių metabolitų, tokių kaip artemisininas, kurį mediciniškai svarbu ir brangu gaminti tiek natūraliai, tiek cheminės sintezės būdu, yra kaliaus kultūros, kurios padidina metabolitų gamybą [84]. Augalų kaliaus kultūrose įprastai antrinių metabolitų biosintezės išeiga nedidelė, todėl turi būti pagerinta, siekiant pasiekti komercinių tikslų įgyvendinimo [74]. Stimuliatorių (pvz., augalų hormonų, stresą signalizuojančių molekulių ir biotinių bei abiotinių junginių, taip pat fizinių veiksnių) naudojimas yra perspektyvus skatinti antrinių metabolitų gamybą.

Produkto susidarymą padidina mitybinės terpės praturtinimas pirmtakų molekulėmis bei augimo reguliatoriais. Daugumos antrinių metabolitų biosintezė susideda iš kelių fermentų daugiapakopijų reakcijų. Bet kuris fermentinės biosintezės reakcijų etapas gali būti stimuliuojamas, siekiant padidinti produktų susidarymą. Norint optimizuoti antrinio metabolito gamybą, naudojamas dviejų terpių metodas: viena terpė optimaliam ląstelių augimui, kita papildyta augimo reguliatoriais – antriniam metabolitams susidaryti [77].

Kaliaus kultūrose naudojamų biotinių ir abiotinių elicitorių rūšis bei koncentracija yra pagrindiniai veiksniai, turintys įtakos antrinių metabolitų sintezei ir kaupimuisi. Atliktuose tyrimuose įvertinta skirtingų koncentracijų chitozano ir UV šviesos įtaka vaistinio kietio kaliaus kultūrose, kaip biotinių ir abiotinių elicitorių. Pagrindinis tikslas buvo padidinti artemisinino, kvercetino, kavos rūgšties ir eterinių aliejų kaupimąsi. Tyrimų duomenimis, didžiausias kaliaus kultūrų suformavimas, masė ir skersmuo, buvo pastebėti UV spinduliais paveiktose kultūrose. Aukštos kokybės skysčių chromatografijos analizės parodė didelį artemisinino (1,9 µg/g), kvercetino (4,2 µg/g) ir kavos rūgšties (2,9 µg/g) kaupimąsi UV spinduliais paveiktuose mėginiuose. Abiotinis veiksnys – UV šviesa – gali būti veiksmingai naudojama kietio kaliaus kultūroje, siekiant padidinti farmakologiškai aktyvius junginius pramoninėje gamyboje [85].

Taigi, antrinių metabolitų gamybą kaliaus kultūrose *in vitro* galima padidinti mitybinę terpę papildant augimo reguliatoriais, naudojant biotinius ir abiotinius elicitorius, o astrinių šeimos augalų kultūros *in vitro* gali būti naudojamos kaip šaltinis intensyviai ir padidėjusiai antrinių metabolitų gamybai.

1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Astriniai augalai yra puikus fitocheminių junginių šaltinis. Vaistinėje medetkoje (lot. *Calendula officinalis* L.), vaistiniame kietyje (lot. *Artemisia dracunculus* L.) ir rausvažiedėje ežiuolėje (lot. *Echinacea purpurea* L.) kaupiami bioaktyvūs junginiai ne tik prisideda prie augalo apsaugos sistemos, padėdami prisitaikyti prie kintančių nepalankių aplinkos sąlygų, bet ir pasižymi įvairiomis biologinėmis (antioksidacinėmis, antibakterinėmis, priešuždegiminėmis, priešvėžinėmis ir kt.) savybėmis, kurios suteikia naudą žmogui ir jo sveikatai. Astrinių augalų kaupiami fitocheminiai junginiai plačiai naudojami įvairiose pramonės srityse: farmacijos, kosmetikos, parfumerijos, maisto papildų produktų gamyboje.

Pramoniniam naudojimui bioaktyvūs junginiai dažnai išgaunami iš natūraliomis sąlygomis augančių augalų, tačiau dėl to susiduriama su tam tikromis problemomis. Natūraliomis sąlygomis augantys augalai pasižymi lėtu augimu, lėtesne antrinių metabolitų biosinteze, augdami jie susiduria su nepalankiomis ir nekontroliuojamomis aplinkos sąlygomis, dėl ko gali kisti šių fitocheminių junginių koncentracija augalinėje žaliavoje.

Magistro baigiamajame darbe fitocheminių junginių panaudojimui siūloma pritaikyti biotechnologines strategijas: suformuoti kaliaus kultūras *in vitro* ir praturtinti šias kultūras didesnės pridėtinės vertės bioaktyviais junginiais, pritaikius mitybinių terpių praturtinimą augimo reguliatoriais. Tyrimo tikslas – įvertinti pasirinktų augimo reguliatorių poveikį vaistinio kiekio, vaistinės medetkos ir rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūrų *in vitro* antioksidaciniam, antibakteriniam ir fitocheminiam aktyvumui ir palyginti su tiriamųjų augalų *in vivo* kultūromis. Siekiant praplėsti astrinių augalų taikymo sritį biotechnologijoje, iš vaistinio kiekio, vaistinės medetkos ir rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ir *in vitro* ekstraktų taip pat biosintetintos sidabro nanodalelės.

Taigi, šiuolaikinėje visuomenėje sparčiai augant natūralių antioksidantų, antibakterinių preparatų bei fitocheminių junginių paklausai, reikalinga technologija, užtikrinanti nuolatinę ir didelę sukauptų antrinių metabolitų koncentraciją tiksliniuose augaluose ar jų kultūrose.

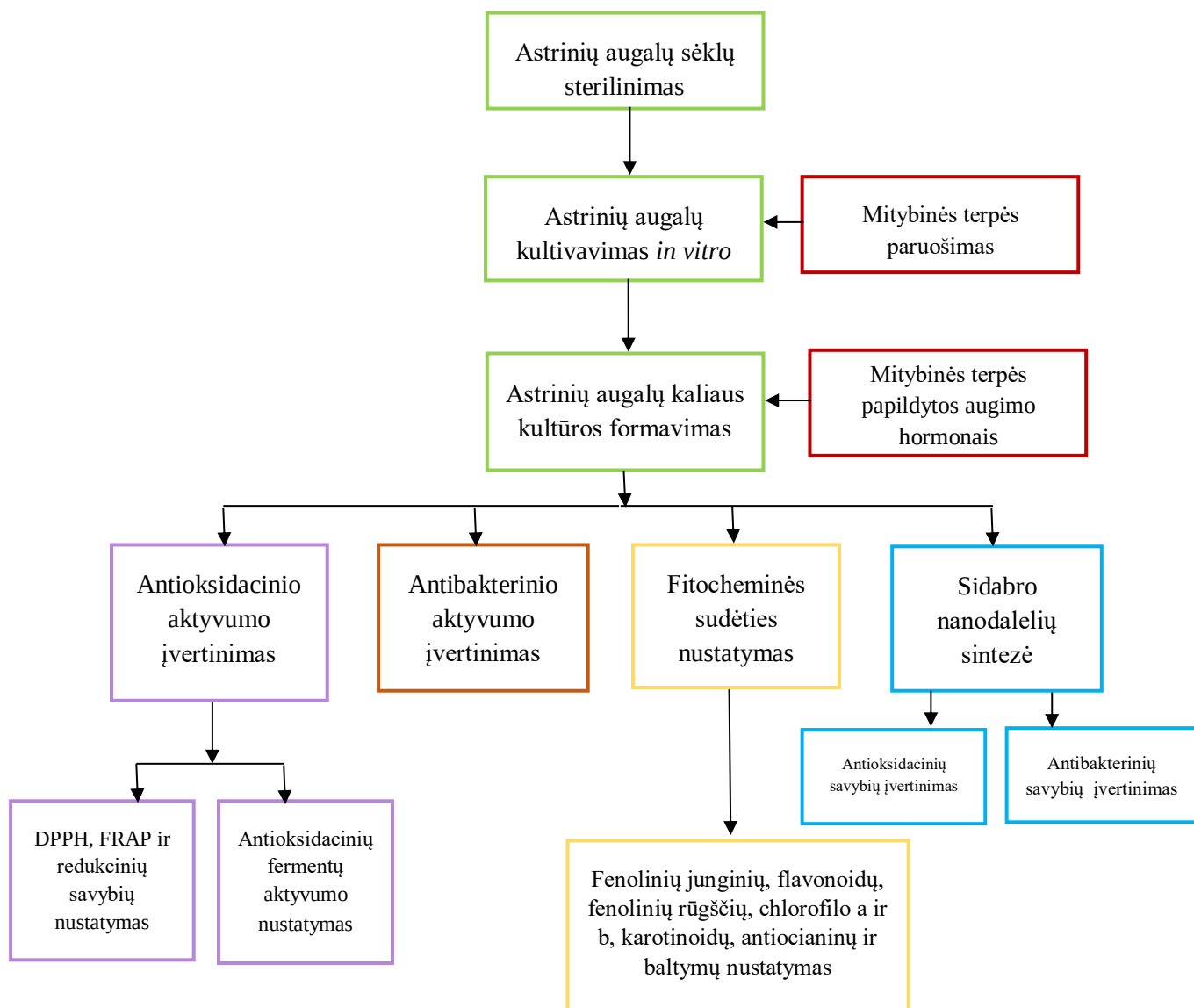
2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tiriamoji medžiaga

Apžvelgus mokslinę literatūrą, kaip tiriamieji objektai buvo pasirinkti astriniai (lot. *Asteraceae*) šeimos augalai. Baigiamojo tiriamojo projekto metu tirti šie astriniai augalai: vaistinis kietis *in vivo*, vaistinio kietio kaliaus kultūra BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l), rausvažiedė ežiuolė *in vivo*, rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūra BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l), vaistinės medetkos žiedai *in vivo*, vaistinės medetkos kaliaus kultūra IAR (0,1mg/l) + TDZ (0,5 mg/l), siekiant įvertinti šių augalų fitocheminį sudėtį, antioksidacinį ir antibakterinį aktyvumą. Tiriamasis mokslinis darbas buvo atliktas Kauno technologijos universiteto, Cheminės technologijos fakulteto, Biotechnologijos laboratorijoje.

2.2. Tyrimų eiga

Rengiant tiriamąjį projektą, išsikeltas tikslas ir uždaviniai buvo įgyvendinami pagal žemiau pateiktą schemą:



2.1pav. Tiriamojo projekto tyrimų atlikimo schema

2.3. Reagentai

Baigiamojo tiriamojo projekto metu naudoti reagentai: metanolis (CH₃OH), etanolis (C₂H₅OH), NaClO, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas), FRAP reagentas, acetato buferinis tirpalas, TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas), FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O, natrio fosfatinis buferinis tirpalas, K₃[Fe(CN)₆], kalio persulfatas, trichloracto rūgštis, FeCl₃, K/Na fosfatinis buferinis tirpalas, DMSO, ditiotreitolis (DTT), PMSF (fenilmetilsufonilfluoridas), EDTA, NAD, vandenilio peroksidas (H₂O₂), polivinilpirolidonas, Tris-HCl buferinis tirpalas, L-metioninas, nitromėlynasis tetrazolis, Tritonas X-100, riboflavinai, tiobarbitūrinė rūgštis, acetonas, Folino-Kiokalto reagentas, Na₂CO₃, tanino rūgštis, ledinė acto rūgštis, ninhidrinai, H₃PO₄, L-prolinai, albuminai, Bradfordo reagentas, AlCl₃, NaOAc buferinis tirpalas, KCl, Arnovo reagentas, AgNO₃.

2.4. Tyrimų metu naudota įranga

Baigiamojo tiriamojo projekto metu naudotos įrangos sąrašas:

- autoklavas „CertoClav“;
- centrifuga „Universal 320R“, HETTICH;
- mikrocentrifuga „D-6015 Mini Centrifuge“, neoLab;
- laminaras „BV-100 Laminar Flow Cabinet“, Telstar;
- pH-metras, „WinLab“;
- spektrofotometras „UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer“, Shimadzu;
- svarstyklės, „ATX84“, Shimadzu;
- kratytuvas „ZX3“, VELP Scientific;
- distiliatorius „Elix Type 2 Water Purification Systems“, Merc;
- termostatas „Binder“;
- termostatas „Mettler IN55“;
- termostatuojama vandens vonelė ULTRATHERM „BWT-U“, Biosan;
- termostatuojamas kratytuvas Environmental Shaker-Incubator „ES – 20“, Biosan“.

2.5. Augalų sėklų sterilinimas

Labai svarbu augalų steriliai užauginti *in vitro* sąlygomis, kad į maitinamąją terpę nepatektų nepageidaujamų mikroorganizmų ir infekcijų. Astrinių augalų sėklų sterilinimo metodai surašyti 2.1 lentelėje. Visi šie veiksmai atlikti laminare, kuriame UV spinduliuote sterilinta darbo vieta bei atlikta papildoma paviršių dezinfekcija 70 % etanolio tirpalu.

2.1 lentelė. Augalų sėklų sterilinimo metodai

Sėklos	Sėklų sterilinimo etapai
Vaistinio kiekio	70% etanolis – 1 min; 0,01% HgCl ₂ – 2 min; 3 kartus perplauti distiliuotu H ₂ O.
Vaistinės medetkos	70% etanolis – 1 min; 1,5% NaClO – 10 min; 3 kartus perplauti distiliuotu H ₂ O.
Rausvažiedės ežiuiolės	70% etanolis – 1 min; 1,5% NaClO – 10 min; 3 kartus perplauti distiliuotu H ₂ O.

2.6. Augalų ląstelių mitybinės terpės paruošimas

Augalų ląstelių kultūroms kultivuoti būtina maitinamoji terpė ir išorinės aplinkos veiksniai (šviesa, temperatūra). Kultivuoti augalų ląsteles *in vitro* mitybinė terpė sudaroma iš šių komponentų: makroelementų, mikroelementų, geležies šaltinio, organinių priedų, anglies šaltinio, augimo hormonų. *Murashige & Skoog* (MS) terpė – viena iš intensyviausiai naudojamų audinių kultūroms skirtų maitinamųjų terpių. Svarbus šios terpės bruožas yra aukštos nitrato, kalio ir amonio jonų koncentracijos. Į šios mitybinės terpės sudėtį įeina nikotino rūgštis, mioinozitolis, piridoksino hidrochloridas (B₆) ir tiamino hidrochloridas (B₁). Išsami šios terpės sudėtis pavaizduota 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Mitybinės *Murashige & Skoog* (MS) terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale mg/l	Koncentracija terpėje mg/l
Makroelementai		
NH ₄ NO ₃	33000	1650
KNO ₃	38000	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	8800	440
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	7400	370
KH ₂ PO ₄	3400	170
Mikroelementai		
KJ	166	0,83
H ₃ BO ₃	1240	6,2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4460	22,3
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1720	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	50	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5	0,025
Geležies šaltinis		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5560	27,8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	7460	37,3
Organiniai priedai		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas-HCl	100	0,5
Tiaminas-HCl	100	0,5
Glicinas	400	2
Sacharozė		30000
Augalų agaras		5

Ruoštos skirtingos mitybinės terpės kaliaus kultūroms suformuoti. Į tuščias talpas supilti makro ir mikroelementai, geležies šaltinis, organiniai priedai, skirtingi fitohormonai ir suberta sacharozė. Tyrimams naudotų fitohormonų sąrašas išvardintas 2.3 lentelėje. Visi šie elementai sumaišyti ir ištirpinti vandenyje. Išmatuota terpės pH naudojant pH-metrą. Augalų kultūroms pH turi būti lygus

5,7. Prireikus, terpių rūgštingumas ir šarmingumas atitinkamai keičiamas naudojant 0,1 N NaOH ir 0,01 N H₂SO₄ tirpalus. Atlikus šiuos žingsnius – į terpes subertas ir gerai ištirpintas agaras.

2.3 lentelė. Fitohormonai, naudoti skirtingoms MS terpėms

Rūšis	Cheminis pavadinimas	Sutrumpinimas
Auksinas	3-indolilacto rūgštis	IAR
Auksinas	1-naftilacto rūgštis	NAR
Citokininas	6-benzilaminopurinas	BAP
Citokininas	1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il-urėja)	TDZ

Paruoštos mitybinės terpės sterilintos autoklave 120 °C, 0,75 – 1 atm slėgyje, 15 min. Po autoklavavimo paruošta MS mitybinė terpė išpilstyta į *Petri* lėkšteles laminare steriliomis sąlygomis ir paliktos sustingti. Reagentų kiekiai, reikalingi 300 ml MS terpės paruošimui, išvardinti 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. MS terpės reagentų kiekis, paimamas iš pradinių tirpalų

Reagentai	Reagentų kiekis 300 ml terpei paruošti
Makro druskos	15 ml
Mikro druskos	1,5 ml
Fe-EDTA	1,5 ml
Sacharozė	9 g
Agaras	1,5 g
Organiniai priedai	1,5 ml

2.6.1. Augimo fitohormonų tirpalų paruošimas

Pradinio tiriamosios medžiagos tirpalo (0,1 mg/ml) paruošimas. Pasverta 10 mg tiriamojo junginio ir suberta į matavimo kolbą. Įpilta 5 ml distiliuoto vandens, kad ištirtų milteliai. Visiškai ištirpusiame tiriamajame junginyje, įpiltas dvigubas kiekis distiliuoto vandens. Tirpalą išmaišius, pripilta distiliuoto vandens iki reikiamo lygio, t. y. iki 100 ml. Reikalingas paimti tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris iš pradinio tirpalo apskaičiuojamas pagal 2.1 formulę:

$$X = \frac{A \times B}{C} \quad (2.1);$$

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).

2.6.2. Augalų kaliaus kultūrų formavimas

Tiriamų augalų kaliaus kultūros pradėtos formuoti atvėsus bei sustingus mitybinei terpei. Sterilios augalų sėklos buvo pasėtos į *Petri* lėkšteles, laminare, darbo vietą dezinfekavus 70 % etanoliu ir naudojant sterilų pincetą bei spiritinę lemputę aseptinėms sąlygoms palaikyti. MS terpėje užaugus augalų daigams, jie steriliu skalpeliu buvo suskaidyti į šaknų, stiebų ir lapų eksplantus, kurie buvo

perkelti į MS terpes, papildytas skirtingais augimo fitohormonais, varijuojant jų deriniais ir koncentracijomis. *Petri* lėkštelės laikytos kambario temperatūroje (20–22 °C), išlaikant 24 valandų fotoperiodą. Eksplantai kas tris savaites perkėlinėti į šviežią terpę. Susiformavus augalų kaliaus kultūroms, jos buvo džiovintos bei smulkintos ir naudotos tyrimams.

2.7. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas

2.7.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

0,2 g išdžiovinta augalinė medžiaga užpilta 2 ml metanolio ir homogenizuota 10 min. Homogenatas centrifuguotas 9000 aps./min greičiu, 10 min, 4 °C.

Tiriamieji tirpalai paruošti į mėgintuvėlius įpilant 0,077 ml paruoštų augalų ekstraktų, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo, kuris buvo ruoštas ištirpinant 0,0024 g DPPH radikalo metanolyje, 100 ml talpos matavimo kolboje. Palyginamasis tirpalas paruoštas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml metanolio 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Tirpalai išmaišyti ir laikyti tamsoje 15 min. Praėjus nustatytam laikui, spektrofotometru išmatuota tirpalų šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje.

Antioksidacinis aktyvumas įvertintas pagal 2.2 formulę, išmatavus ir apskaičiavus, kiek procentų stabilaus DPPH radikalo neutralizavo augalinėje medžiagoje esantys fenoliniai junginiai:

$$\% \text{ slopinimas} = \left[\frac{(A_B - A_A)}{A_B} \right] \cdot 100 \quad (2.2);$$

čia A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis [86].

2.7.2. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose

0,1 g išdžiovinta augalinė medžiaga ekstrahuota 5 ml metanolyje ir vandens vonelėje, 45 °C temperatūroje, 30 min. Metanolinis augalų ekstraktas centrifuguotas 9000 aps./min greičiu, 10 min, palaikant 4 °C temperatūrą.

Į 0,5 ml ekstraktų mėginius įpilta 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferinio tirpalo bei 1,25 ml 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$. Tirpalai sumaišyti ir inkubuoti 50 °C temperatūroje, 20 min. Po inkubacijos pridėta 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties, tirpalai sumaišyti ir centrifuguoti 5 min 9000 aps./min greičiu. 1,25 ml nucentrifuguotų tirpalų sumaišyta su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % $FeCl_3$ tirpalu. Tuščias mėginys – 1 ml 0,2 M fosfatinio buferinio tirpalo ir 1,0 ml 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$. Mėginiai išmatuoti spektrofotometru 700 nm bangos ilgyje. Šviesos sugertis tiesiogiai atspindi tiriamosios medžiagos redukcinį aktyvumą.

2.7.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą

0,1 g išdžiovintos augalinės žaliavos ekstrahuota 5 ml metanolyje ir inkubuota vandens vonelėje, 45 °C temperatūroje, 30 min. Metanoliniai augalų ekstraktai centrifuguoti 9000 aps./min greičiu, 10 min, palaikant 4 °C temperatūrą ir naudoti tyrimams.

Mėginiai (20 µl paruošto ekstrakto ir 80 µl metanolio) sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu. Tuščias mėginys – 100 µl metanolis ir 3 ml FRAP reagentas. Reakcijos mišinys spektrofotometriškai matuotas 593 nm bangos ilgyje.

Kalibracinės kreivės paruošimas: skirtingų koncentracijų $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ tirpalai (5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/l}$) sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu ir praskiesti vandeniu iki 10 ml. Reikšmė apskaičiuota pagal kalibracinę kreivę $\mu\text{mol/l Fe(II)}$. Tuščias mėginys – 3 ml FRAP ir 7 ml distiliuotas vanduo. Tirpalai išmatuoti spektrofotometru 593 nm bangos ilgyje [86].

2.8. Augalų ekstraktų antioksidantinių fermentų aktyvumo įvertinimas

2.8.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas

0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos užpilta 4 ml 0,66 M K/Na fosfatinio buferinio tirpalo, turinčio 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, ištirpinto DMSO ir 2 mg polivinilpirolidono. Mėginiai maišyti kratytuve 10 min, 25 °C temperatūroje. Homogenatai centrifuguoti 9000 aps./min greičiu, 10 min, 4 °C temperatūroje. Supernatantas pakartotinai centrifuguotas *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose.

40 μl paruošto supernatanto sumaišyta su 400 μl 200 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu, 200 μl 10 mM L-metioninu, 200 μl 540 mM nitromėlynuoju tetrazoliu, 500 μl 0,1 % Tritonu X-100, 20 μl 300 mM riboflavinu ir 620 μl distiliuoto vandens. Kontrolinis mėginys ruoštas taip pat tik be ekstrakto. Mėginiai 30 min apšviesti liuminescencinėmis lempomis. Šviesos sugertis išmatuota 560 nm bangos ilgyje. Fermento SOD aktyvumas apskaičiuojamas pagal 2.3 formulę:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{\log 2 \cdot m} \quad (2.3);$$

čia A – SOD aktyvumas vnt/mg;

E_K – kontrolinio bandinio šviesos sugertis;

E_T – tiriamojo bandinio šviesos sugertis;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml (baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal Bradfordo metodą).

Baltymams nustatyti paimta 200 μl mėginio ir įpilta 2 ml Bradfordo reagento. Tuščias mėginys – 200 μl 0,1 M fosfatinio buferinio tirpalo ir 2 ml Bradfordo reagento. Šviesos sugertis išmatuota spektrofotometru 595 nm bangos ilgyje.

2.5 lentelė. Albumino kalibracinės kreivės sudarymas

Eil. Nr.	Albumino pradinio tirpalo tūris	Iki 10 ml skiesto tirpalo koncentracija mg/ml
1	0,2	0,02
2	0,4	0,04
3	0,6	0,06
4	0,8	0,08
5	1,0	0,1
6	1,2	0,12
7	1,4	0,14
8	1,6	0,16
9	1,8	0,18

Paruošta baltymų koncentracijos nustatymo kalibracinė kreivė pagal albuminą: 25 mg albumino ištirpinta 25 ml distiliuoto vandens. Iš šio paruošto tirpalo imti žinomo tūrio (ml) pradinio tirpalo

mėginiai (žiūrėti 2.5 lentelėje) ir skiesti distiliuotu vandeniu iki 10 ml žymos. Į pirmąjį (kontrolinį) mėgintuvėlį įpilta 0,2 ml distiliuoto vandens ir 2 ml Bradfordo reagento, į kitus likusius mėgintuvėlius – po 0,2 ml kiekvienos koncentracijos albumino tirpalo ir 2 ml Bradfordo reagento. Mėginiai sumaišyti ir spektrofotometru išmatuota jų šviesos sugertis 595 nm bangoje. Nubraižyta kalibracinė kreivė, pagal kurią apskaičiuota baltymo masė ekstrakto tūryje [87].

2.8.2. Prolindehidrogenazės aktyvumo nustatymas

0,1 g augalinės žaliavos susmulkinta ir vykdyta ekstrakcija ekstrakcijos buferiniame tirpale (pH=7,8) 4 ml tūryje, turinčiame 0,05M tris-HCl; 1mM EDTA; 0,5 % tritonas X-100. Mėginiai maišyti termostatuojamame kratytuve 10 min, 25 °C temperatūroje. Homogenatai nucentrifuguoti 10 min 9000 aps./min greičiu. Supernatantas pakartotinai centrifuguotas *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose.

Baltymams nustatyti paimta 200 µl mėginio ir įpilta 2 ml Bradfordo reagento. Išmatuota šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Gauta baltymų kiekio kalibracinė kreivė pagal albuminą (žr. 2.7.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas), pagal kurią apskaičiuota baltymo masė ekstrakto tūryje.

Į kitą mėgintuvėlį įpilta 400 µl fermentinio preparato, 1800 µl karbonatinio buferinio tirpalo; 1800 µl 0,02 M *L*-prolino. Prieš matavimą į reakcijos mišinį įpilta 100 µl 100 mM NAD. Šviesos sugerties matavimo dinamika registruota pradžioje ir po 3 min 340 nm bangos ilgyje. Fermento prolindehidrogenazės aktyvumas apskaičiuotas pagal 2.4 formulę:

$$A = \frac{1000 \cdot V \cdot \Delta \bar{E}}{k \cdot m} A \quad (2.4);$$

čia A – prolindehidrogenazės aktyvumas, µmol NAD/mg baltymo per 1 min;

$\Delta \bar{E}$ – šviesos sugerties pokytis;

V – bendras mišinio tūris;

k – molinis ekstrakcijos koeficientas $6,22 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg (baltymo kiekis apskaičiuotas pagal kalibracinę kreivę) [88].

2.8.3. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas

0,1 g išdžiovintos augalinės žaliavos užpilta atšaldytu 4 ml 0,1 M fosfatinio buferiniu tirpalu (pH=7), kuris turi 1 mM ditiotreitolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO. Mėginiai maišyti termostatuojamame kratytuve 10 min, palaikant 25 °C temperatūrą. Nucentrifuguota 9000 aps./min greičiu, 10 min, 4 °C temperatūroje. Supernatantas (400 µl) pakartotinai centrifuguotas *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose 5 min.

0,2 ml fermentinio preparato (supernatanto) sumaišyta su 3 ml 0,1 M fosfatinio buferinio tirpalo (pH=7), 0,6 ml 0,5 mM askorbo rūgšties, 0,06 ml 0,1 mM EDTA, ir 2,08 ml distiliuoto vandens. Prieš matuojant šviesos sugertį į reakcijos mišinį įpilta 0,06 ml 0,1 mM vandenilio peroksido. Reakcija prasideda pridėjus vandenilio peroksido. Matuota šviesos sugertis 290 nm bangos ilgyje pradžioje ir po 40 min. Tuščias mėginys – be vandenilio peroksido ir fermentinio preparato. Askorbatperoksidazės aktyvumas apskaičiuotas pagal 2.5 formulę:

$$A = \frac{\Delta \bar{E}_{min} \cdot \left(\frac{V}{1000} + V_{buf.} + V_{peroks.} \right)}{k \cdot m} \quad (2.5);$$

čia A – askorbatperoksidazės aktyvumas, mmol/mg;

$\bar{E}_{\min}$ – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis 290 nm bangos ilgyje;
 V – tiriamojo tirpalo tūris, μl ;
 $V_{\text{buf.}}$ – buferinio tirpalo tūris, ml;
 $V_{\text{peroks.}}$ – vandenilio peroksido tūris, ml;
 k – molinės ekstinkcijos koeficientas 2,8 nmol/cm;
 m – baltymo koncentracija preparato tūryje, mg/ml.

Baltymams nustatyti paimta 200 μl supernatanto ir įpilta 2 ml Bradfordo reagento. Išmatuota šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Tuščias mėginys – 200 μl 0,1 M fosfatinio buferinio tirpalo ir 2 ml Bradfordo reagento. Panaudota baltymų koncentracijos nustatymui kalibracinė kreivė pagal albuminą. (žr. 2.7.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas), pagal kurią apskaičiuota baltymo masė ekstrakto tūryje [89].

2.8.4. Katalazės aktyvumo nustatymas

0,1 g augalinės žaliavos susmulkinta ir tirpių baltymų ekstrakcija vykdyta 0,05 M K/Na fosfatiniame buferiniame tirpale (pH=7,8) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM ditioneitolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1-3 mg polivinilpirolidono. Tiriamieji mėginiai maišyti termostatuojamame kratytuve 10 min, 25°C temperatūroje. Mėginiai centrifuguoti 9000 aps./min, 10 min ir supernatantas dar kartą centrifuguotas *Eppendorf* mėgintuvėliuose 5 min.

200 μl mėginio ir įpilta 2 ml Bradfordo reagento bei išmatuota šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Baltymų koncentracijai nustatyti panaudota kalibracinė kreivė pagal albuminą (žr. 2.7.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas). Pagal kalibracinę kreivę taip pat apskaičiuota baltymo masė ekstrakto tūryje.

100 μl fermentinio preparato (supernatanto) sumaišyta su 3900 μl 0,05 M K/Na fosfatinio buferinio tirpalo. Prieš matavimą į reakcijos mišinį įpilta 0,01 M 0,2 ml vandenilio peroksido. Išmatuota šviesos sugertis pradžioje ir po 40 min 30 °C 240 nm bangos ilgyje. Katalazės aktyvumas apskaičiuotas pagal 2.6 formulę:

$$A = \frac{\Delta \bar{E} \cdot 1000 \cdot V}{k \cdot m} \quad (2.6);$$

čia A – katalazės aktyvumas, vnt/mg;
 $\bar{E}$ – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis 240 nm bangos ilgyje;
 V – tiriamojo tirpalo tūris, ml;
 k – molinės ekstinkcijos koeficientas 32,57;
 m – baltymo koncentracija preparato tūryje, mg [87].

2.9. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas

2.9.1. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

Atlikta analizė, siekiant nustatyti butilato hidroksitolueno (BHT) ir askorbo rūgšties antioksidacinį aktyvumą DPPH metodu. Kiekvienas junginys ištirpintas vandenyje iki 0,02 g/ml koncentracijos. Darbo eiga analogiška tai, kuri nurodyta 2.6.1. skyrelyje.

2.9.2. Sintetinių junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas

Atlikta analizė, siekiant nustatyti butilato hidroksitolueno (BHT) ir askorbo rūgšties redukcines (antioksidacines) savybes. Kiekvienas junginys ištirpintas vandenyje iki 0,02 g/ml koncentracijos. Darbo eiga analogiška nurodyta 2.6.2. skyrelyje.

2.10. Metodai charakterizuojantys oksidacinį stresą augaluose

2.10.1. Malondialdehido koncentracijos nustatymas

0,1 g išdžiovintos augalinės žaliavos homogenizuotas su 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi. Homogenizatas maišytas 10 min termostatiname kratytuve 25 °C temperatūroje ir centrifuguotas 9000 aps./min greičiu, 10 min, 4 °C temperatūroje. Surinktas supernatantas pakartotinai centrifuguotas *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose 2 min. 0,3 ml supernatanto sumaišyta su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi (ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje) ir inkubuota 95 °C temperatūroje 30 min. Mėginiai atšaldyti ir centrifuguoti 10 min 9000 aps./min greičiu. Šviesos sugertis išmatuota 532 nm bei 600 nm bangos ilgyje. Malondialdehido (MDA) koncentracija apskaičiuota pagal 2.7 formulę:

$$C_{MDA} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \cdot V_e \cdot 2}{k \cdot m_s \cdot V_a} \quad (2.7);$$

čia C_{MDA} – MDA koncentracija, $\mu\text{mol/g}$;

A – tirpalo šviesos sugertis (532, 600 – atitinkamame bangos ilgyje, nm);

V_e – ekstrakto tūris, ml;

V_a – ekstrakto tūris analizei, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas $156 \text{ Mm}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$;

m_s – žaliavos masė, ekstrakcijai, g [90].

2.11. Biologiškai aktyviųjų junginių koncentracijos nustatymas

2.11.1. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas augaluose

Karotinoidų, chlorofilo *a* ir *b* nustatymas vaistinių augalų audiniuose paremtas šviesos sugerties nustatymu spektrofotometru bangos ilgiuose:

- Chlorofilui *a* (662 nm);
- Chlorofilui *b* (644 nm);
- Karotinoidams (441 nm).

Pasverta 0,1 g augalinės žaliavos ir užpilta 10 ml 96 % metanolio. Homogenizatas sumaišytas ir centrifuguotas 10 min 9000 aps./min greičiu, 4 °C temperatūroje. Supernatantų šviesos sugertis išmatuota spektrofotometru 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidų) bangose. Pigmentų koncentracijos apskaičiuotos pagal šias formules:

$$C (\text{chlorofilas } a \text{ (mg } 1^{-1} \text{)}) = 9,784 \cdot D_{662} - 0,99 \cdot D_{644} \quad (2.8);$$

$$C (\text{chlorofilas } b \text{ (mg } 1^{-1} \text{)}) = 21,426 \cdot D_{644} - 4,65 \cdot D_{622} \quad (2.9);$$

$$C (\text{chlorofilas } a + \text{chlorofilas } b) = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644} \quad (2.10);$$

$$C (\text{karotinoidai (mg } 1^{-1} \text{)}) = 4,695 \cdot D_{441} - 0,268 \cdot C (\text{chlorofilas } a + \text{chlorofilas } b) \quad (2.11);$$

Pigmentų koncentracija mg/100 g apskaičiuojama pagal 2.12 formulę:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000} \quad (2.12);$$

čia X – pigmentų koncentracija, mg/100 g;

C – pigmentų koncentracija, mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

V₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinės žaliavos masė, g [91].

2.11.2. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas

0,2 g išdžiovintos augalinės žaliavos užpilta 5ml etanolio ir mišinys homogenizuotas 15 min. termostatuojamame kratytuve 25 °C temperatūroje. Homogenatas centrifuguotas 10 min 9000 aps./min greičiu ir naudotas tyrimams.

Bendra antocianinų koncentracija nustatyta naudojant pH diferencinį metodą. Po 1 ml kiekvieno ekstrakto įpilta į 980 µl KCl buferinį tirpalą (pH 1) ir NaOAc buferinį tirpalą (pH 4,5). Visų tirpalų šviesos sugertis matuota 510 nm ir 700 nm bangos ilgiuose. Tuščias mėginys – 50 % etanolis, kuris buvo inkubuotas 15 min kambario temperatūroje. Bendra mėginių antocianinų koncentracija buvo apskaičiuota naudojant 2.13 formulę:

$$BAK = (A \cdot M \cdot PF) \cdot \frac{1000}{\epsilon} \quad (2.13);$$

čia BAK – bendra antocianinų koncentracija, miligramai cianidin-3-gliukozido ekvivalento 100 g;

A – absorbcija = (A_{510 nm} – A_{700 nm}) pH 1 – (A_{510 nm} – A_{700 nm}) pH 4,5;

M – molekulinė masė (449,2 g/mol);

PF – praskiedimo faktorius;

ε – cianidin-3-gliukozido (C-3-GE) molinis absorbcijos koeficientas (26900 l/mol cm) [92].

2.11.3. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu

Pasverta 0,05 g susmulkintos augalinės žaliavos ir užpilta 10 ml 70 % acetono tirpalu. Mėginiai maišyti termostatuojamame kratytuve 20 min, 25 °C temperatūroje. Tada centrifuguoti 9000 aps./min greičiu, 10 min, 4 °C temperatūroje. Mėginiai pakartotinai centrifuguoti *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose 2 min. Supernatantas surinktas ir toliau naudotas tyrimams.

Bendrai fenolinių junginių koncentracijai nustatyti: paimta 30 µl paruošto ekstrakto ir praskiesta vandeniu iki 500 µl. Pridėta 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Mėginiai sumaišyti ir inkubuoti 40 min tamsoje, kambario temperatūroje. Praėjus inkubacijos periodui, mėginių absorbcija išmatuota 725 nm bangos ilgyje. Apskaičiuota bendroji fenolinių junginių koncentracija pagal 2.14 formulę:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1} \quad (2.14);$$

čia X – bendra fenolinių junginių koncentracija, mg/100 mg;

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibracinės kreivės, mg/ml;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;
V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;
n – augalinės žaliavos masė, mg.

Tanino rūgšties kalibracinės kreivės parengimas: 25 ml distiliuoto vandens ištirpinta 25 mg tanino rūgšties ir gautas 0,1 mg/ml tanino rūgšties standartinis tirpalas. Į atskirus mėgintuvėlius įpilta 20; 40; 60; 80; 100 ir 120 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo. Tada į visus mėgintuvėlius įpilta distiliuoto vandens iki 500 µl žymos. Į šiuos tirpalus pridėta po 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Mėginiai sumaišyti ir inkubuoti tamsoje, kambario temperatūroje 40 min. Praėjus inkubacijos laikui, išmatuota šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje [93].

2.11.4. *L*-Prolino nustatymas

0,1 g vaistinės augalinės žaliavos susmulkinta ir užpilta 4 ml distiliuoto vandens. Mėgintuvėliai su tiriamąja augaline žaliava 3 min kaitinti 95 °C temperatūroje ir atšaldyti. Procedūra pakartota tris kartus. Mėgintuvėliai centrifuguoti 10 min 9000 aps./min greičiu.

Supernatantai nupilti į naujus mėgintuvėlius ir praskiesti iki 6 ml distiliuotu vandeniu. Dar į kitus mėgintuvėlius įpilta po 1 ml skiesto supernatanto (ekstrakto), 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir kaitinta 1 val. vandens vonelėje. Į kontrolinį mėginį vietoj ekstrakto įpilta 1 ml distiliuoto vandens. Šviesos sugertis išmatuota 520 nm bangos ilgyje. *L*-proline koncentracija apskaičiuota naudojant *L*-proline kalibracinę kreivę, pagal 2.15 formulę:

$$C_x = \frac{E \cdot k \cdot V_{bendras}}{V_{paimta} \cdot m} \quad (2.15);$$

čia C_x – *L*-proline koncentracija, µmol/g;

E – tirpalo šviesos sugertis;

k – *L*-proline koncentracija, gauta pagal kalibravimo kreivę, µmol;

V_{bendras} – bendras ekstrakto tūris, ml;

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

m – augalinės žaliavos masė, g.

L-proline kalibracinės kreivės paruošimas: 0,0011 g *L*-proline ištirpinta 10 ml distiliuoto vandens, gautas 1 mM koncentracijos pradinis tirpalas. Paimti 0,0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 µl pradiniai *L*-proline tirpalai, praskiesta iki 1 ml su distiliuotu vandeniu, įpilta 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento. Išmatuota šviesos sugertis 520 nm bangos ilgyje [94].

2.11.5. Flavonoidų nustatymas augaluose

0,2 g išdžiovinta susmulkinta augalinė žaliava sumaišyta su 2 ml 80 % metanolio ir mėginiai inkubuoti 24 val. termostatiname kratytuve. Homogenatas centrifuguotas 10 min. 9000 aps./min greičiu.

Bendra flavonoidų koncentracija nustatyta su aliuminio chloridu. Į kiekvieną 0,1 ml tiriamąjį mėginį įpilta 0,9 ml 80 % metanolio ir 1 ml 2 % aliuminio chlorido. Mišinys paliktas stovėti 30 min ir absorbcija išmatuota 415 nm bangos ilgyje. Flavonoidų koncentracija apskaičiuota pagal kvercetiną naudojant 2.16 formulę:

$$C = \frac{C_1 \cdot V}{g} \quad (2.16);$$

čia C – flavonoidų koncentracija, mg/g;

C_1 – kvercetino koncentracija, mg/ml pagal kalibracinę kreivę;

V – ekstrakto pradinis tūris, ml;

g – augalinės žaliavos masė, g.

Paruošta kvercetino kalibracinė kreivė: 10 mg kvercetinas ištirpintas 10 ml metanolio ir gautas 1 mg/ml koncentracijos pradinis tirpalas. Paruošti 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml ir 50 mg/ml kvercetino koncentracijos tirpalai: į mėgintuvėlius įpilta po 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml ir 0,5 ml pradinio tirpalo, tada po 0,15 ml 2 % aliuminio chlorido tirpalo ir praskiesta iki 10 ml su 80 % metanolio. Tuščias mėginys – metanolis. Išmatuota šviesos sugertis 415 nm bangos ilgyje [95].

2.11.6. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas augalinėje žaliavoje

0,1 g džiovintos tiriamos augalinės žaliavos homogenizuota 2,5 ml distiliuotu vandeniu termostatuojamame kratytuve 25 °C temperatūroje 30 min. Homogenatas centrifuguotas. 9000 aps./min greičiu 10 min. Po centrifugavimo 1 ml ekstrakto praskiestas distiliuotu vandeniu iki 5 ml tūrio.

Bendroji fenolinių rūgščių koncentracija nustatyta spektrofotometriškai. 1 ml ekstrakto sumaišytas su 5 ml distiliuotu vandeniu, 1 ml HCl (18 g/l), 1 ml Arno reagentu (10 g natrio molibdato ir 10 g natrio nitrato sumaišyta su metanolio 100 ml), 1 ml natrio šarmo (40 g/l) ir praskiesta iki 10 ml distiliuotu vandeniu. Šviesos sugertis matuota 490 nm bangos ilgyje. Bendroji fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį apskaičiuota naudojant 2.17 formulę:

$$X = \frac{A \cdot 1,7544}{m} \quad (2.17);$$

čia X – bendroji fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį, %;

A – šviesos sugerties reikšmė;

m – augalinės žaliavos masė, g [96].

2.11.7. Baltymų koncentracijos nustatymas

Pasverta po 0,05 g kiekvienos išdžiovintos susmulkintos tiriamos medžiagos ir, panaudojant buferinius tirpalus, išekstrahuoti baltymai. Augalinė medžiaga užpilta atskirais buferiniais tirpalais (1 M Glicinas – HCl; (pH 2,6); 0,1 M Natrio acetatas (pH 4,0); 0,1 M Tris – HCl (pH 8,0)) į atskirus mėgintuvėlius po 1 ml ir maišyti 1 val. Tada centrifuguoti 20 min 9000 aps./min greičiu. Po centrifugavimo į 200 µl kiekvieno gauto ekstrakto pridėta 2 ml Bradfordo reagento. Po 2 minučių matuotas optinis tankis 595 nm bangos ilgyje. Bendroji baltymų koncentracija, mg/100 g apskaičiuota, naudojantis 2.18 formule:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n} \quad (2.18);$$

čia a – baltymo koncentracija, mg/ml;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

n – augalinės žaliavos masė, mg.

Naudota baltymų koncentracijai nustatyti kalibracinė kreivė pagal albuminą (žr. 2.7.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas), apskaičiuota baltymo masė ekstrakto tūryje [97].

2.12. Antibakterinio aktyvumo nustatymo metodai

2.13. Augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo nustatymas agaru difuziniu metodu

Augalinės žaliavos paruošimas. 0,5 g augalinės žaliavos užpilta 5 ml DMSO tirpalu ir centrifuguota 10 min, 9000 aps./min greičiu.

Antibiotikų paruošimas. 50 mg ciprofloksacinas buvo ištirpintas 5 ml DMSO tirpalu (koncentracija 10 mg/ml).

Terpės paruošimas. Gaminta *Luria-Bertani* (LB) terpė (2.6 lentelė), kurios pH 7,2. Terpės pH reguliuota naudojant 1 N NaOH ir 1 N H₂SO₄.

2.6 lentelė. LB terpės reagentų kiekiai

Reagentai	Reagentų kiekiai g, reikalingi 1 l terpės
NaCl	10
Triptonas	10
Agaras	15
Mielų ekstraktas	5

Ant LB terpės įlašinta 50 µl bakterijų (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) suspensijos, išsklaidyta po *Petri lėkštelę* ir uždėti 6 popieriniai diskeliai, ant kurių užlašinta 25 µl paruošto augalų ekstrakto. Taip pat tyrimams naudotas antibiotikas – ciprofloksacinas (darbinė koncentracija – 50 µg/ml). Kontrolinis bandinys atliktas siekiant įvertinti, ar naudojamoje terpėje augo etaloninė bakterijų kultūra. *Petri lėkštelės* su bakterijomis inkubuotos termostate 24 val., 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos matuotas atstumas nuo diskelių iki bakterijų prieaugio [98].

2.14. Sidabro nanodalelių sintezė iš augalų ekstrakto ir savybių nustatymas

0,05 g susmulkintos augalinės žaliavos užpilta 25 ml distiliuotu vandeniu ir inkubuota vandens vonelėje, 80 °C temperatūroje 40 min. Ekstraktas centrifuguotas 10 min 9000 aps./min greičiu, 4 °C temperatūroje.

AgND sintezė. Į 1 ml ekstrakto įpilta 20 ml vandeninio 2 mM AgNO₃ tirpalo. Mėginiai intensyviai maišyti 25 °C, kol tirpalas nusidažė raudona spalva. Galiausiai buvo gautas raudonos spalvos AgND tirpalas, kai nanodalelės buvo pakartotinai disperguotos distiliuotame vandenyje. Šviesos sugertis išmatuota pradžioje ir po 24 val. 300–700 nm bangos ilgyje [99].

Antioksidacinis aktyvumas nustatytas DPPH (žr. 2.6.1 Antioksidacinio aktyvumo DPPH metodu nustatymas) ir redukciniu (žr. 2.6.2 Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose) metodais.

Antibakterinis aktyvumas prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* nustatytas naudojant difuzijos į agarą metodą (žr. 2.10.1 Antibakterinio aktyvumo nustatymas difuzijos į agarą metodu). Taip pat tyrimams naudotas 2 mM AgNO₃ tirpalas.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Baigiamojo projekto metu suformuotos vaistinės medetkos, vaistinio kiekčio ir rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros mitybinėje terpėje *in vitro*, papildytoje augimo fitohormonais. Taip pat šio tyrimo metu buvo ištirta vaistinio kiekčio *in vivo*, vaistinio kiekčio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l), rausvažiedės ežiuolės *in vivo*, rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l), vaistinės medetkos žiedų *in vivo*, vaistinės medetkos kaliaus kultūros IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) fitocheminė sudėtis ir biologinės savybės. Atlikti tyrimai astrinių augalų biologiniam aktyvumui nustatyti antioksidaciniai ir antibakteriniai tyrimai. Kadangi augalų ekstraktų antioksidacinės savybės negali būti įvertintos naudojant tik vieną tyrimo metodą, norint gauti tikslesnius rezultatus, atlikti keli aktyvumo tyrimai naudojant DPPH, FRAP, taip pat įvertintos augalų redukcinės savybės. Vėliau įvertinti antioksidacinių fermentų – superoksido dismutazės, katalazės, prolindehidrogenazės ir askorbatperoksidazės – aktyvumai. Oksidacinis tiriamųjų astrinių augalų stresas ištirtas nustatant MDA koncentraciją. Tirtuose astriniuose augaluose nustatyti biologiškai aktyvūs junginiai: chlorofilas *a* ir *b*, karotinoidai, antocianinai, fenoliniai junginiai, *L*-prolinas, flavonoidai, fenolinės rūgštys ir baltymai. Kiekvienas mėginys tiriamajame darbe buvo tiriamas 3 kartus (3 pakartojimai). Taip pat atlikta sidabro nanodalelių sintezė iš augalų ekstrakto ir jų savybių įvertinimas.

3.1. Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.), vaistinio kiekčio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) ir rausvažiedės ežiuolės (lot. *Echinacea purpurea* L.) kaliaus kultūros *in vitro*

Tiriamąjo projekto metu buvo suformuotos astrinių augalų kaliaus kultūros *in vitro*. Siekiant suformuoti gausias tiriamųjų augalų kaliaus kultūras ir padidinti biologiškai aktyvių junginių biosintezę bei koncentraciją, buvo pritaikyta viena iš biotechnologinių strategijų – mitybinę terpę papildyti augimo hormonais. Po atliktos literatūrinės analizės, buvo pasirinkta vaistinės medetkos kaliaus kultūrų mitybinę terpę papildyti IAR (0,1 mg/l) ir TDZ (0,5 mg/l), vaistinio kiekčio – BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l) (žr. 3.1 pav.), rausvažiedės ežiuolės – BAP (3 mg/l) ir IAR (0,5 mg/l) augimo hormonais.

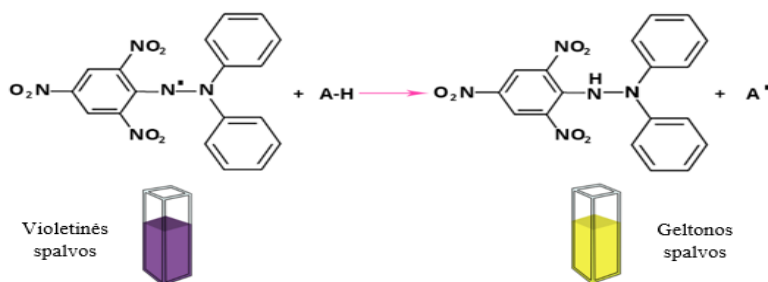


3.1 pav. Susiformavusios vaistinio kiekčio kaliaus kultūros *in vitro*

3.2. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

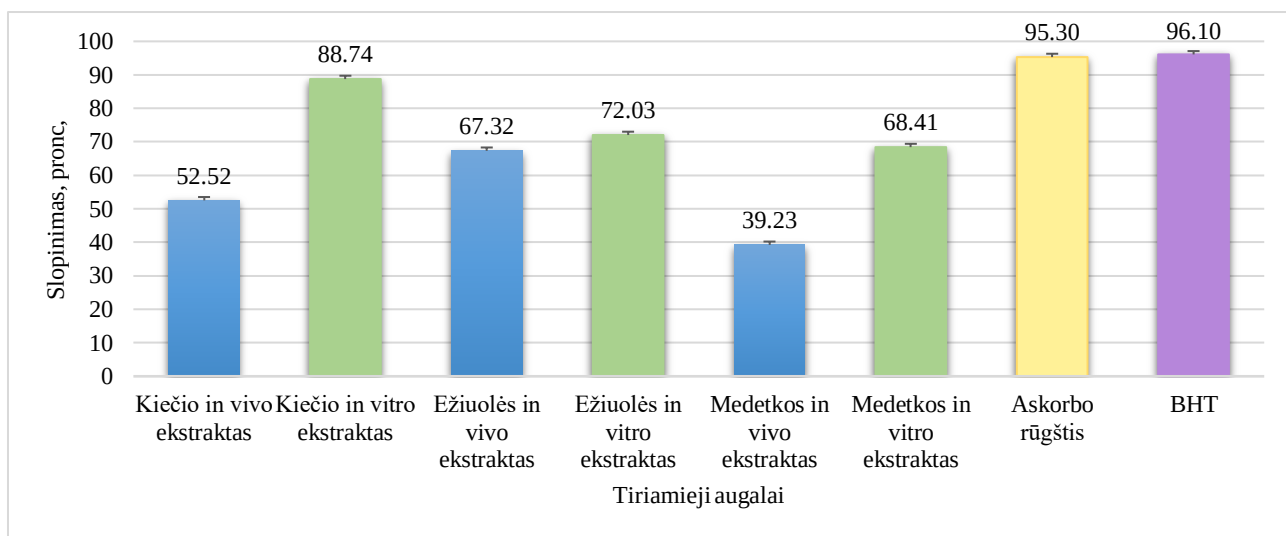
3.2.1. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Astrinių augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH•) radikalo neutralizuoja fenolinių junginiai. Fenoliniams junginiams būdingas antioksidacinis aktyvumas dėl jų gebėjimo išaktyvinti laisvuosius radikalus. Reakcijos metu antioksidantas atiduoda vandenilį ir taip išaktyvina (DPPH•) radikalą (violetinės spalvos), jie tampa stabiliais DPPH – H tipo (geltonos spalvos) junginiais. Geltonos spalvos intensyvumas priklauso nuo antioksidacinių junginių koncentracijos tiriamųjų augalų ekstrakte. Reakcija stebėta spektrofotometriškai [100].



3.2 pav. Antioksidanto (A-H) reakcija su DPPH• radikalu

Atlikus DPPH tyrimą, iš gautų rezultatų, kurie pateikti 3.3 paveiksle, matyti, kad didžiausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo vaistinio kiečio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstraktas (88,74 %), šis aktyvumas 36,22 % didesnis lyginant su vaistinio kiečio *in vivo* ekstraktu (52,52 %). Rausvažiedės ežiuolės *in vivo* (67,32 %) ir kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) ekstraktas *in vitro* (72,03 %) pasižymėjo panašiomis antioksidacinėmis savybėmis. Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo vaistinės medetkos žiedų ekstraktas *in vivo* – 39,23 %, ši reikšmė 29,18 % mažesnė už vaistinės medetkos kaliaus kultūros *in vitro* ekstrakte nustatytą DPPH• radikalo slopinimą. Taip pat tyrimas palygintas su sintetiniais antioksidantais – butilato hidroksitoluenu (BHT) ir askorbo rūgštimi. Sintetiniai antioksidantai pasižymėjo geresnėmis antioksidacinėmis savybėmis lyginant su tiriamų augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktais.



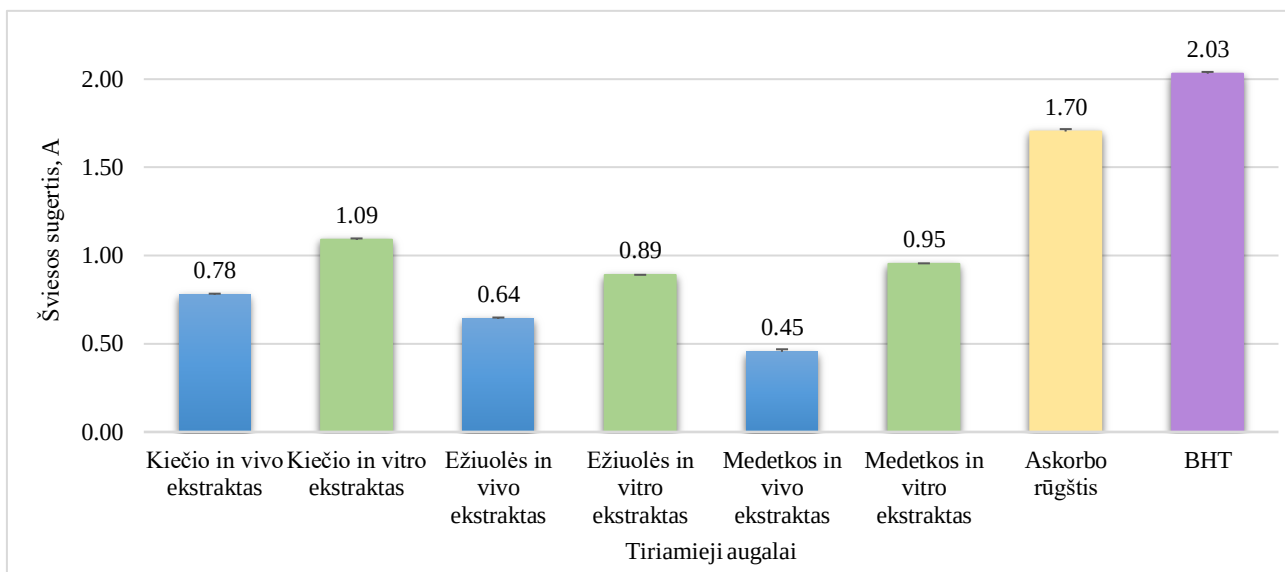
3.3 pav. DPPH slopinimo įvertinimas (%) astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

Iš gautų rezultatų nustatyta, kad mitybinės terpės papildymas augimo hormonais formuojant vaistinės medetkos, vaistinio kiečio bei rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūras *in vitro*, DPPH• radikalo slopinimo aktyvumą veikė teigiamai.

3.2.2. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose

Astrinių augalų ekstraktų redukcinėms savybėms įvertinti taikytas metodas, kurio metu nustatytas antioksidacinių junginių gebėjimas redukuoti Fe^{3+} fericianido kompleksą ($\text{Fe}[(\text{CN})_6]_3$) iki Fe^{2+} komplekso ($\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$). Į reakcijos mišinį pridėjus geležies chlorido tirpalo, redukuotas $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$ kompleksas ir reakcijos mišinys tarpusavyje reaguoja, taip suformuodami mėlynos spalvos kompleksą. Tyrimo metu redukcinės savybės įvertintos spektrofotometriškai matuojant tiriamųjų tirpalų šviesos sugertį. Didesnė šviesos sugerties reikšmė rodo geresnes redukcines savybes [101].

Iš gautų duomenų matyti (žr. 3.4 pav.), kad didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo (kaip ir naudojant DPPH metodą) vaistinio kiečio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstraktas – 1,09 A, šis aktyvumas 39,7 % didesnis lyginant su vaistinio kiečio *in vivo* ekstraktu (0,78 A). Mažiausia šviesos sugertis buvo nustatyta vaistinės medetkos žiedų *in vivo* ekstrakto – 0,45 A, kuri 2 kartus mažesnė nei vaistinės medetkos kaliaus kultūros (IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) ekstrakto (0,95 A). Mitybinės terpės papildymas BAP (3 mg/l) ir IAR (0,5 mg/l) augimo reguliatoriais 39,06 % padidino rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros *in vitro* ekstrakto (0,89 A) antioksidacines savybes lyginant su įprastomis sąlygomis augintos rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ekstraktu (0,64 A).

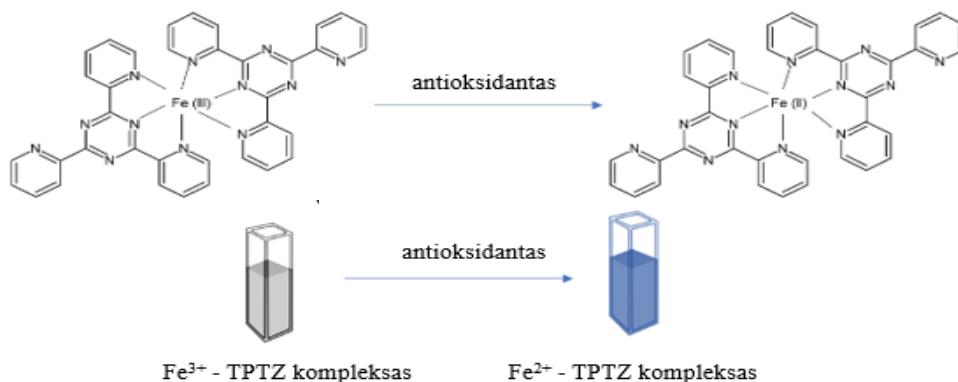


3.4 pav. Astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktų šviesos sugertis pagal redukcinių savybių įvertinimą

Redukcinio metodo rezultatai parodė, kad visų tiriamųjų augalų suformuotos kaliaus kultūros *in vitro* pasižymėjo geresnėmis antioksidacinėmis savybėmis, nei *in vivo* sąlygomis užauginti augalai.

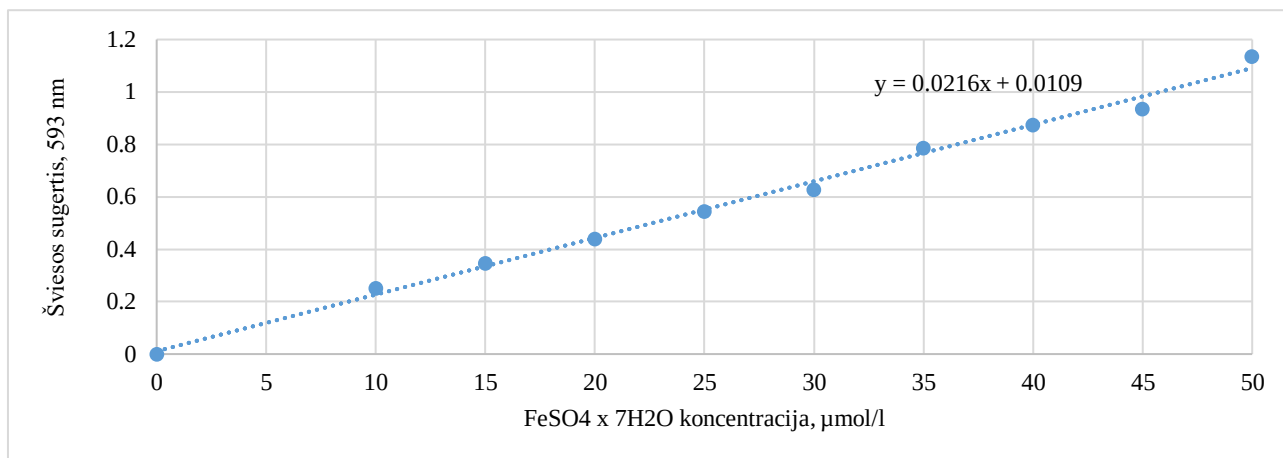
3.2.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą

FRAP metodas nustato augalo redukuojančias savybes. Jis paremtas bespalvio Fe^{3+} -TPTZ junginio redukavimu į mėlyną Fe^{2+} - TPTZ junginį rūgštinėje terpėje. Spalvų pokyčiai spektrofotometriškai matuojami 593 nm bangos ilgyje[102].



3.5 pav. Fe^{3+} -TPTZ junginio redukavimas į mėlyną Fe^{2+} - TPTZ junginį

Antioksidacinėms savybėms įvertinti sudaryta kalibracinė kreivė (žr.3.6 pav.), iš kurios išvesta tiesinė lygtis ($y = 0,0216x + 0,0109$) ir apskaičiuota $\text{Fe}(\text{II})$ koncentracija $\mu\text{mol/l}$.

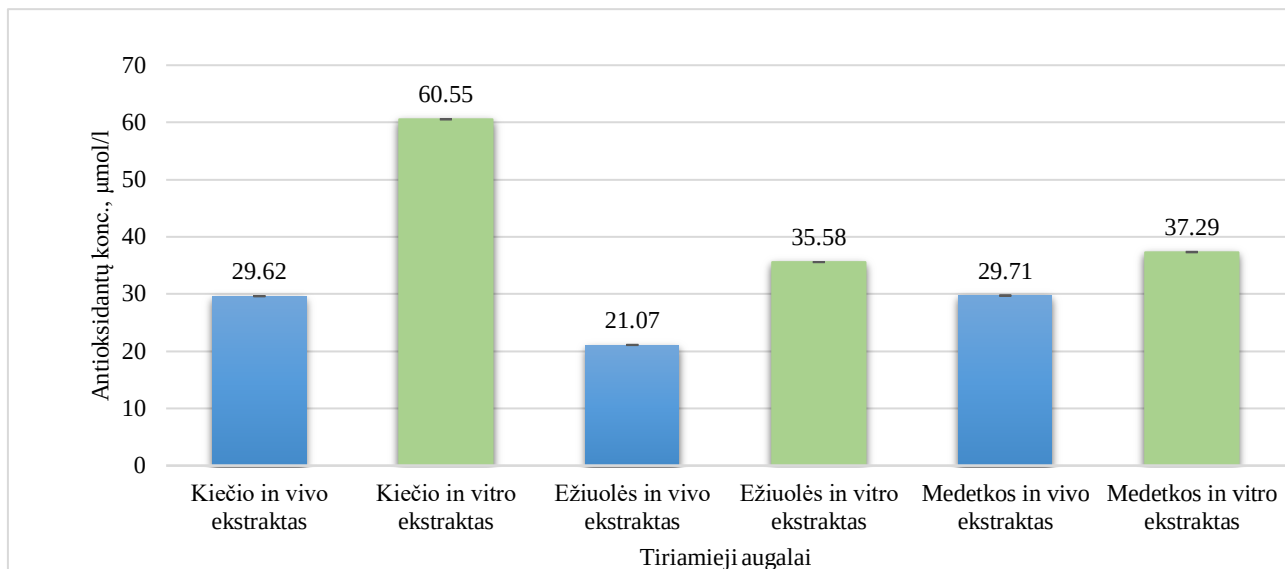


3.6 pav. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kalibracinė kreivė

Pagal gautus rezultatus, kurie pateikti 3.7 paveiksle, matyti, jog šie sutapo su DPPH ir redukcinių savybių įvertinimo metodo rezultatais. Šiame tyrime vaistinio kiekio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstraktas taip pat pasižymėjo geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis, jo $\text{Fe}(\text{II})$ jonų koncentracija buvo 60,55 $\mu\text{mol/l}$, šis aktyvumas 51,09 % didesnis lyginant su vaistinio kiekio *in vivo* ekstraktu (29,62 $\mu\text{mol/l}$). Suformavus rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūrą iš išaugintų MS terpėje augalo eksplantų, kurie buvo auginami ant MS terpės papildytos 3 mg/l BAP ir 0,5 mg/l IAR augimo reguliatoriais, šių augalų ekstraktų antioksidacinės savybės padidėjo 40,79 % (35,58 $\mu\text{mol/l}$). Vaistinės medetkos *in vitro* kultūros ekstraktas pasižymėjo 20,2 % didesnėmis antioksidacinių junginių koncentracijomis (37,29 $\mu\text{mol/l}$), lyginant su vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktu (29,71

$\mu\text{mol/l}$). O silpniausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo rausvažiedės ežiulės *in vivo* ekstraktas – $21,07 \mu\text{mol/l}$.

FRAP metodo rezultatai parodė, jog visų tiriamųjų augalų suformuotos kaliaus kultūros sukaupė didesnę antioksidacinių junginių koncentraciją ir pasižymėjo geresnėmis antioksidacinėmis savybėmis, lyginant su įprastomis sąlygomis užaugintų augalų *in vitro* ekstraktais.



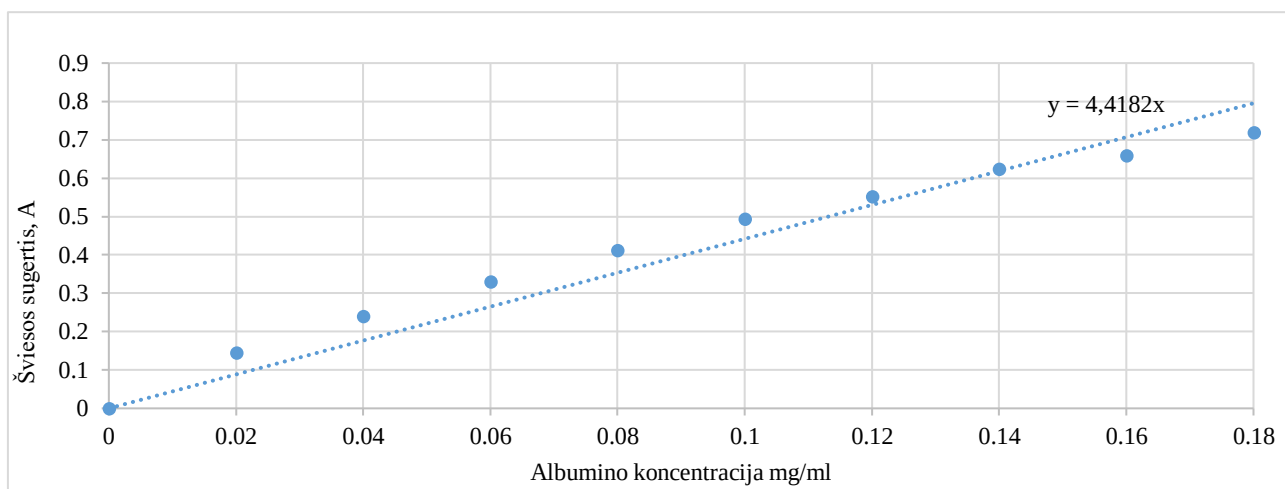
3.7 pav. Fe (II) koncentracija ($\mu\text{mol/l}$) astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

3.3. Augalų ekstraktų antioksidantinių fermentų aktyvumo įvertinimas

3.3.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

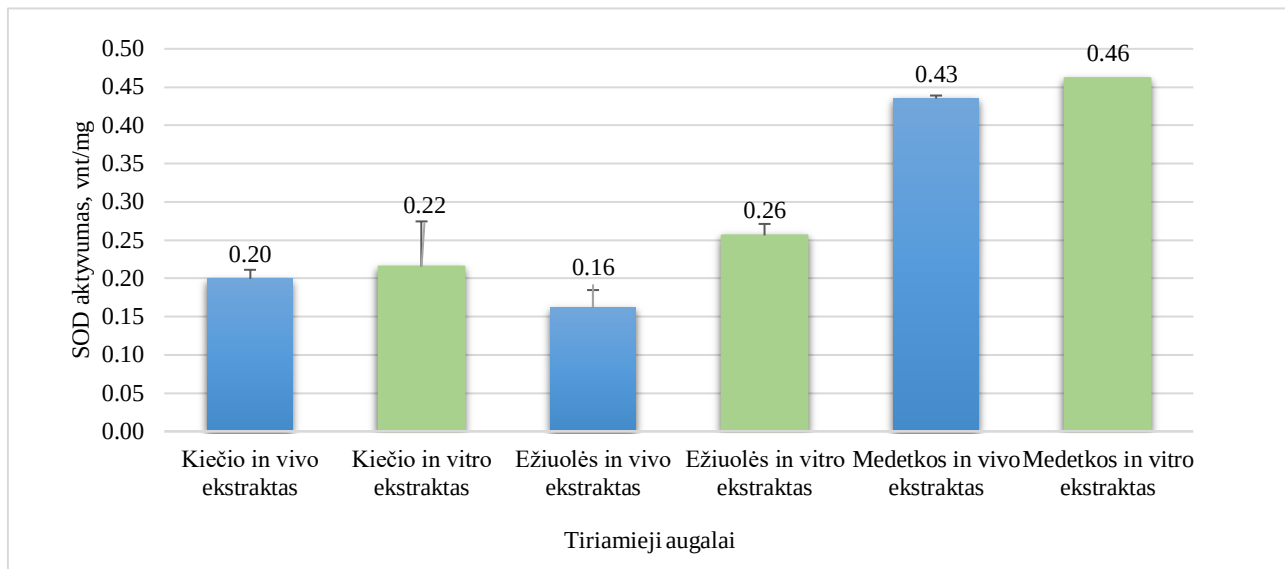
Superoksido dismutazė yra antioksidantinis fermentas, katalizuojantis dviejų superoksido anijonų dismutaciją į deguonies molekulę bei vandenilio peroksidą, taip apsaugantis audinius bei ląsteles nuo oksidacinio streso. Šis fermentas vadinamas pirmąja antioksidacine apsauga [103].

Superoksido dismutazės fermento aktyvumui nustatyti sudaryta kalibracinė kreivė pagal albuminą (žr. 3.8 pav), iš kurios buvo gauta tiesinė lygtis ($y = 4,4182x$) ir nustatytas SOD aktyvumas vnt/mg.



3.8 pav. Albumino tirpalo kalibracinė kreivė

Astrinių augalų ekstraktai pasižymėjo skirtingu superoksido dismutazės aktyvumu. Iš gautų tyrimo rezultatų (žr. 3.9 pav.) matoma, kad didžiausiu superoksido dismutazės aktyvumu pasižymėjo vaistinės medetkos kaliaus kultūros IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) ekstraktas – 0,46 vnt/mg bei vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktas – 0,43 vnt/mg. Vaistinio kiečio *in vivo* ir *in vitro* pasižymėjo labai panašiu aktyvumu, kurių vertės atitinkamai buvo 0,20 vnt/mg ir 0,22 vnt/mg. Mažiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ekstraktas – 0,16 vnt/mg, šis aktyvumas buvo 38,46 % mažesnis lyginant su rausvažiedės ežiuolės kaliaus *in vitro* ekstraktu (0,26 vnt/mg). SOD aktyvumo tyrimo rezultatai parodė, kad visų tiriamųjų augalų suformuotos kaliaus kultūros *in vitro* pasižymėjo šiek tiek didesniu šio fermento aktyvumu lyginant su *in vivo* sąlygomis užaugintais augalais.



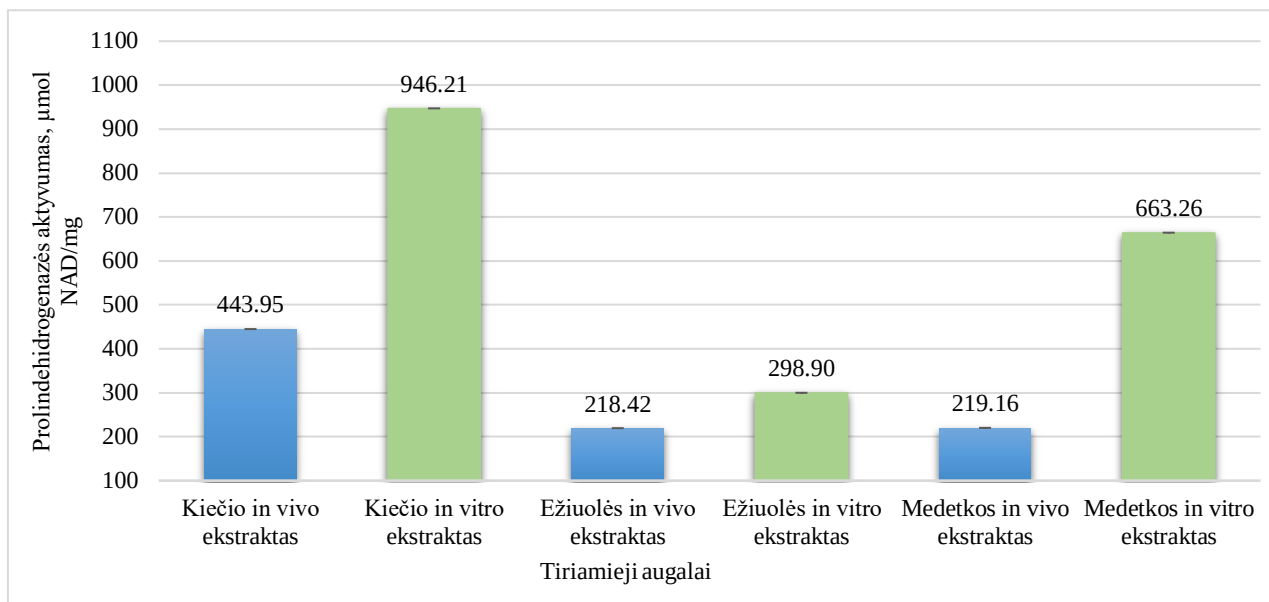
3.9 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumas (vnt/mg) astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

3.3.2. Fermento prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas

Įvertintas kito antioksidacinio fermento – prolindehidrogenazės aktyvumas tiriamų augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktų tirpaluose. Prolindehidrogenazė yra labai svarbi reguliuojant *L*-proliną, kuris apsaugo augalus nuo abiotinio ir biotinio streso bei jų sukeltų padarinių, koncentraciją ląstelėse [104].

Gauti tyrimo rezultatai (žr. 3.10 pav.) atskleidžia, kad didžiausias prolindehidrogenazės aktyvumas nustatytas vaistinio kiečio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstrakte – 946,21 $\mu\text{mol NAD/mg}$, šis aktyvumas buvo 2 kartus didesnis, lyginant su vaistinio kiečio *in vivo* ekstraktu – 443,95 $\mu\text{mol NAD/mg}$. Vidutiniu prolindehidrogenazės aktyvumu pasižymėjo vaistinės medetkos kaliaus kultūros IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) ekstraktas (663,26 $\mu\text{mol NAD/mg}$), šis aktyvumas 3 kartus didesnis negu vaistinės medetkos *in vivo* ekstrakto (219,169 $\mu\text{mol NAD/mg}$). Mažiausias šio fermento aktyvumas aptiktas rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ekstrakte – 218,42 $\mu\text{mol NAD/mg}$, ši vertė buvo 27 % mažesnė lyginant su rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) ekstraktu (298,90 $\mu\text{mol NAD/mg}$).

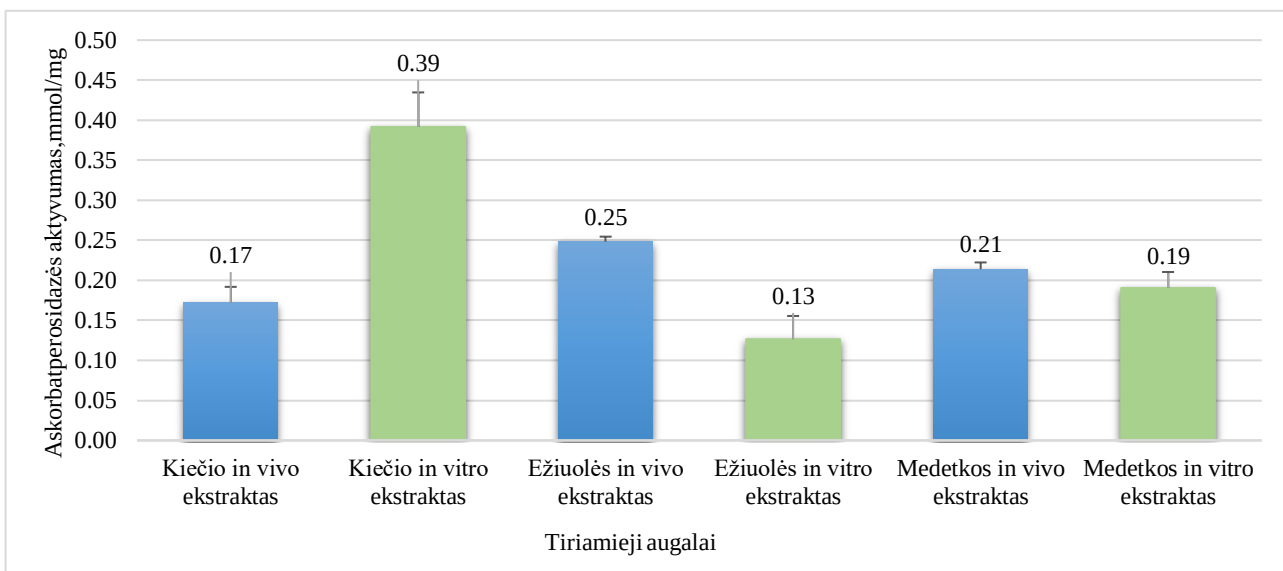
Apibendrinant rezultatus, mitybinės terpės papildymas augimo hormonais, formuojant vaistinės medetkos, vaistinio kiečio bei rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūras *in vitro*, prolindehidrogenazės aktyvumą veikė teigiamai.



3.10 pav. Proline dehidrogenazės aktyvumas ($\mu\text{mol NAD/mg}$) astriniuose augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

3.3.3. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas

Askorbatperoksidazė yra plačiai paplitęs antioksidacinis fermentas. Jis skiriasi nuo katalazės ir kitų peroksidazių tuo, kad slopina reaktyvias deguonies rūšis, naudodamas askorbatą kaip elektronų donorą. Šis fermentas yra pranašesnis už kitus panašius antioksidacinius fermentus šalinant ROR, nes askorbatas gali reaguoti superoksidu, singletiniu deguonimi ir hidroksilo radikalu bei katalizuoti vandenilio peroksidą iki vandens [89].



3.11 pav. Askorbatperoksidazės aktyvumas (mmol/mg) astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

Astriniai augalai *in vivo* ir jų kaliaus kultūros *in vitro*, užaugintos su skirtingais augimo fitohormonais, pasižymėjo skirtingu askorbatperoksidazės aktyvumu. Pagal pateiktus tyrimo rezultatus (3.11 pav.), didžiausiu askorbatperoksidazės aktyvumu pasižymėjo vaistinis kietis, kultivuotas su 2,5 mg/l BAP

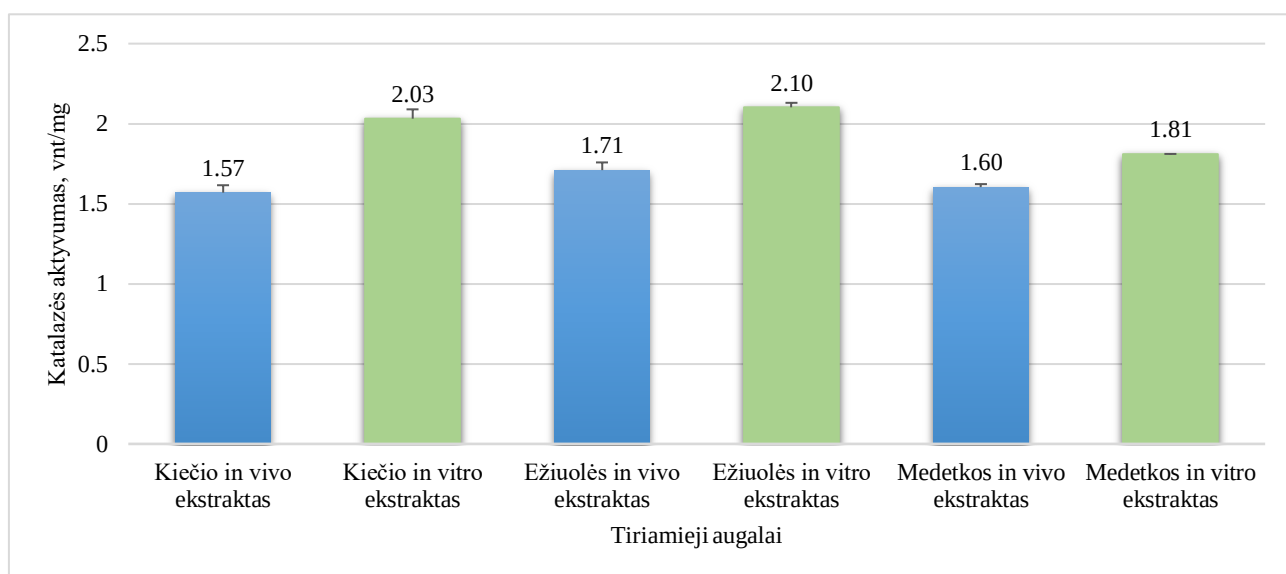
ir 0,5 mg/l NAR augimo regulatoriais, ši vertė buvo 0,39 mmol/mg, tai 2 kartus daugiau už vaistinio kiego, auginto *in vivo* (0,17 mmol/mg). Mažesnis šio fermento aktyvumas nustatytas vaistinės medetkos kaliaus kultūros IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) ekstrakto (0,19 mmol/mg) lyginant su vaistinės medetkos *in vivo* (0,21 mmol/mg) ekstraktu. Mažiausiu antioksidacinio fermento aktyvumu, lyginant visus tirtus ekstraktus, pasižymėjo rausvažiedės ežiulės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) ekstraktas – 0,13 mmol/mg. Šis aktyvumas 2 kartus mažesnis už rausvažiedę ežiulės *in vivo* ekstraktą (0,25 mmol/mg).

Papildžius tiriamųjų augalų mitybinę terpę augimo regulatoriais, nustatytas teigiamas poveikis vaistinio kiego kaliaus kultūrų askorbatperoksidazės aktyvumui, neigiamas – vaistinės medetkos ir rausvažiedės ežiulės.

3.3.4. Katalazės aktyvumo įvertinimas

Katalazė – vienas iš svarbiausių antioksidantų fermentų. Šis fermentas dviejų pakopų reakcijos metu suskaido dvi vandenilio peroksido molekules į vieną deguonies ir dvi vandens molekules. Augaluose per didelę vandenilio peroksido koncentraciją gali sukelti oksidacines audinių pažeidas ar ląstelių mirtį. Pirmajame reakcijos mechanizmo etape susidaro spektroskopiškai atskiras I tarpinis junginys, turintis porfirino π -katijono radikalą, redukuojant vieną vandenilio peroksido molekulę. Antrojo etapo reakcijos metu I junginys redukuojamas redokso reakcijomis, perduodant du elektronus iš elektronų donoro (antrosios vandenilio peroksido molekulės), kad susidarytų laisvas fermentas, deguonis ir vanduo [104].

Katalazės aktyvumo tyrimo rezultatai astrinių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose pateikti 3.12 pav. Iš gautų rezultatų matyti, jog didžiausiu katalazės aktyvumu pasižymėjo rausvažiedės ežiulės *in vitro* kultūros ekstraktas (2,10 vnt/mg), kurio vertės 18,57 % didesnės už rausvažiedės ežiulės *in vivo* ekstrakto (1,71 vnt/mg). Mažiausiu katalazės aktyvumu pasižymėjo vaistinio kiego *in vivo* ekstraktas – 1,57 vnt/mg. Šis aktyvumas 22,7 % mažesnis lyginant su vaistiniu kiečiu, kultivuotu su augimo regulatoriais BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l), jo vertė buvo 2,03 vnt/mg.

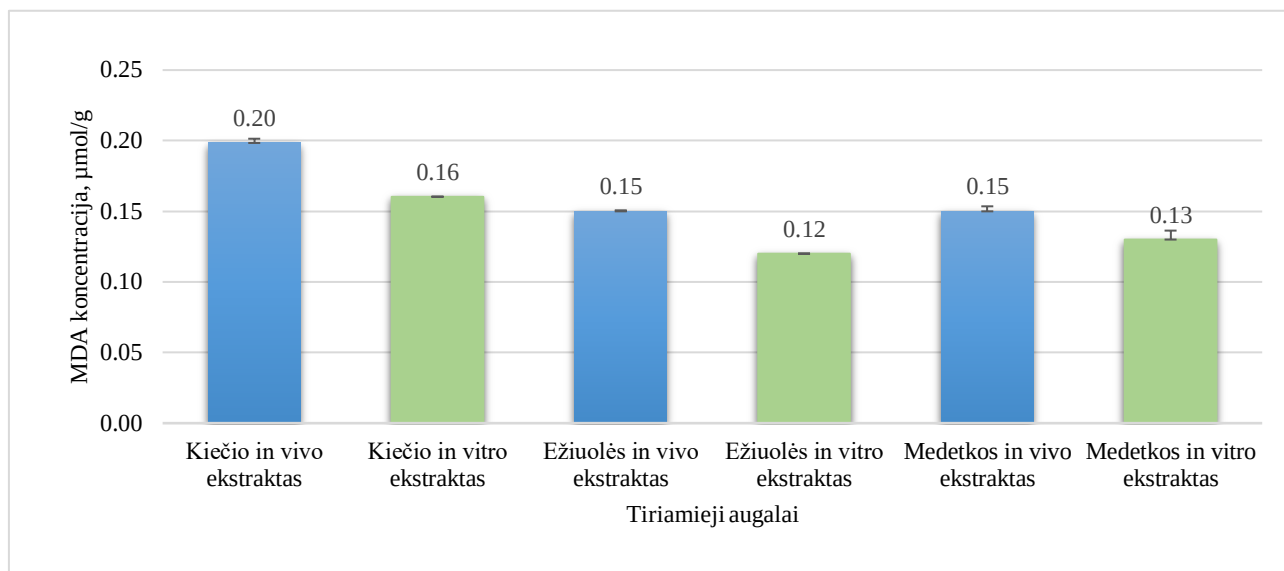


3.12 pav. Katalazės aktyvumo įvertinimas (vnt/mg) astrinių *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose

3.4. Metodai, charakterizuojantys oksidacinį stresą augaluose

3.5. Malondialdehido koncentracijos įvertinimas

Malondialdehidas rodo oksidacinį stresą augaluose, kuo didesnė šio junginio koncentracija, tuo didesnis ląstelių oksidacinis stresas. MDA koncentracijai nustatyti naudojamas metodas, kai MDA reaguoja su tiobarbitūriniu rūgštimi, sudarydamas kompleksą, kuris nustatomas 532 nm bangos ilgyje [105].



3.13 pav. Malondialdehido koncentracijos ($\mu\text{mol/g}$) įvertinimas astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

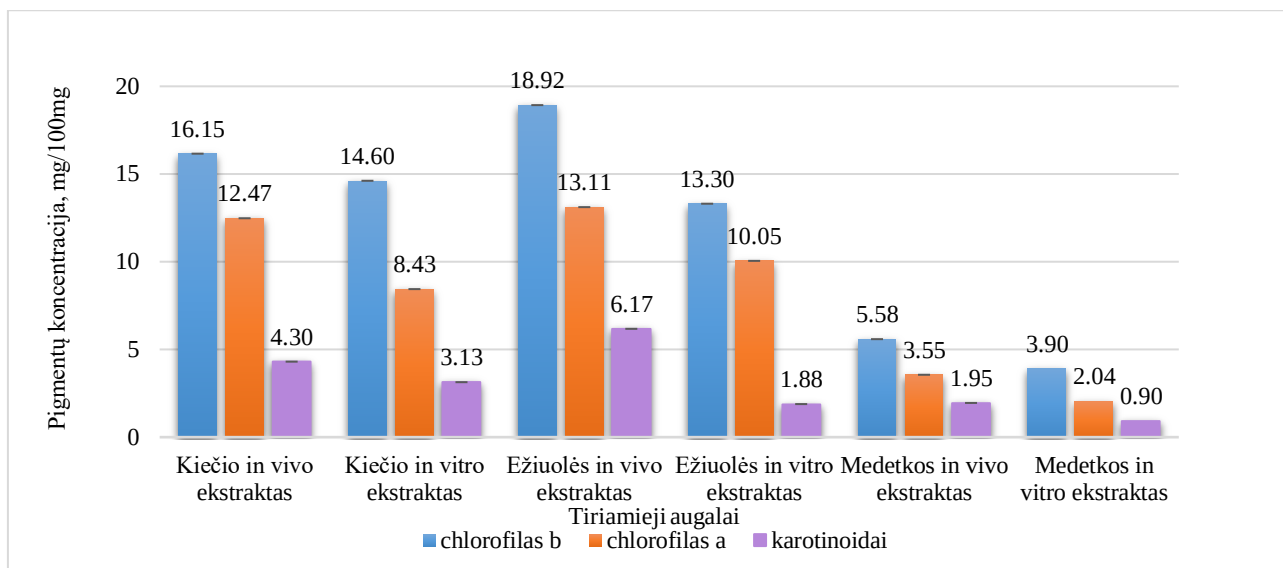
Iš pateiktų rezultatų (3.13 pav.) mažiausios šio junginio koncentracijos nustatytos rausvažiedės ežiuolės *in vitro* ekstrakte ($0,12 \mu\text{mol/g}$) bei vaistinės medetkos *in vitro* ekstrakte ($0,13 \mu\text{mol/g}$). Šių vaistinių augalų *in vivo* ekstraktuose nustatyta vienoda MDA koncentracija – $0,15 \mu\text{mol/g}$. Labai panašiomis MDA koncentracijomis pasižymėjo vaistinio kiečio kaliaus kultūros BAP ($2,5 \text{ mg/l}$) + NAR ($0,5 \text{ mg/l}$) ekstraktas, kurio reikšmė buvo $0,16 \mu\text{mol/g}$. Didžiausia koncentracija aptikta vaistinio kiečio *in vivo* ekstrakte – $0,20 \mu\text{mol/g}$. Tai gali reikšti, kad augalas patyrė oksidacinį stresą vystymosi ar augimo laikotarpiu.

3.6. Biologiškai aktyviųjų junginių koncentracijos įvertinimas

3.6.1. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas

Karotinoidai pasižymi įvairiomis biologinėmis savybėmis, įskaitant dalyvavimą ląstelių fotoapsaugoje, fotosintezėje bei kvėpavime. Šie pigmentai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, nes apsaugo lipoproteinus bei ląstelių membranas nuo laisvųjų radikalų poveikio ir stabdo senėjimo procesą [106].

Chlorofilas *a* ir *b* yra du pagrindiniai pigmentai, dalyvaujantys fotosintezėje. Chlorofilas *a* yra pagrindinis fotosintezės pigmentas, sulaikantis šviesos energiją ir skleidžiantis didelės energijos elektronus į dvi fotosistemas – P_{680} ir P_{700} . Chlorofilas *b* – papildomas pigmentas, sulaikytą energiją perduodantis chlorofilui *a* [107]. Mokslinėje literatūroje nustatyta, kad šie fotocheminiai junginiai pasižymi antioksidaciniu pajėgumu pašalinant laisvuosius radikalus ir užkertant kelią lipidų oksidacijai augaluose [106].



3.14 pav. Chlorofilo a ir b bei karotinoidų koncentracijos (mg/100 g) įvertinimas astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

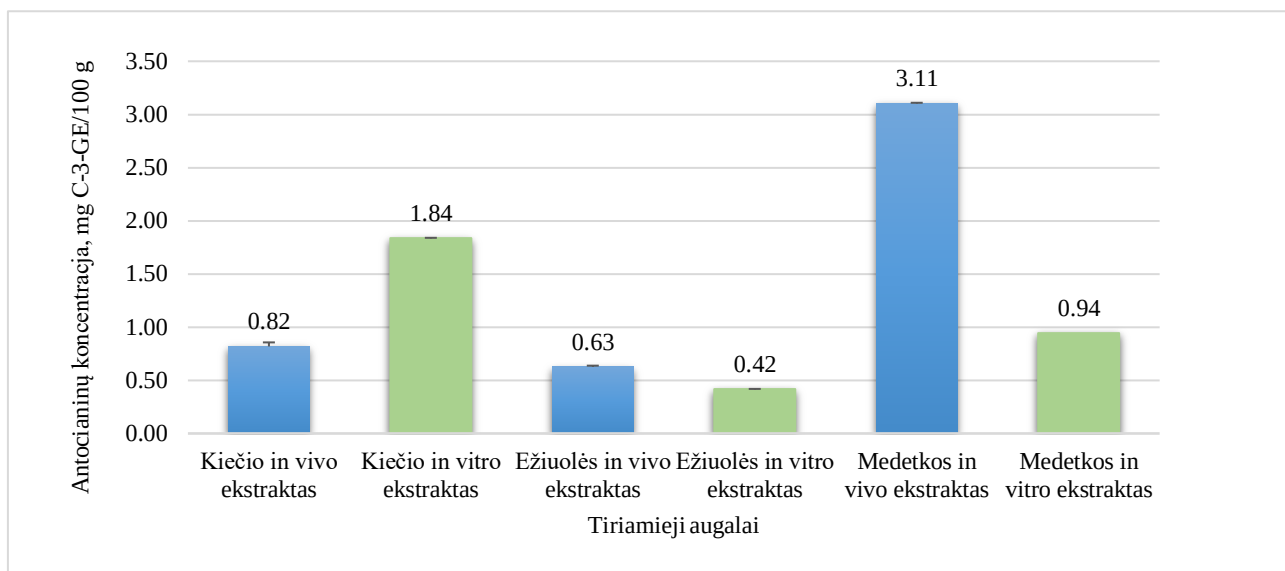
Tyrimo metu nustatyta, kad didžiausiomis chlorofilo *a* koncentracijomis pasižymėjo rausvažiedės ežiulės *in vivo* ekstraktas (13,11 mg/100 g) ir vaistinio kiečio *in vivo* ekstraktas (12,47 mg/100 g), o mažiausiomis – vaistinės medetkos *in vivo* (3,55 mg/100 g) ir *in vitro* (2,04 mg/100 g) ekstraktai. Didžiausia chlorofilo *b* koncentracija nustatyta rausvažiedės ežiulės *in vivo* ekstraktoje, ji buvo 18,92 mg/100 g – 5,62 mg/100 g didesnė už rausvažiedės ežiulės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) ekstraktoje užfiksuotą šio pigmento koncentraciją, kuri buvo 13,30 mg/100 g. Mažiausios chlorofilo *b* koncentracijos nustatytos vaistinės medetkos *in vivo* ir *in vitro* ekstraktoje, kurios atitinkamai buvo 5,58 mg/100 g ir 3,90 mg/100 g. Didžiausiomis karotinoidų koncentracijomis taip pat pasižymėjo rausvažiedės ežiulės *in vivo* ekstraktas – 6,12 mg/100 g, kurio vertė buvo 3 kartus didesnė už gautą rausvažiedės ežiulės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) ekstraktą (1,88 mg/100 g). Vaistinės medetkos kaliaus kultūros IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) ekstraktoje nustatyta mažiausia karotinoidų koncentracija – 0,90 mg/100 g. Lyginant tiriamųjų augalų *in vivo* ir *in vitro* kultūrų ekstraktus, didesnės chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos nustatytos *in vivo* augalų ekstraktuose.

3.6.2. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas

Antocianinai – raudonai mėlyni pigmentai, kurie priklauso flavonoidams ir veikia kaip antioksidantai. Šie bioaktyvūs junginiai dalyvauja keliuose gynybiniuose procesuose, įskaitant augalų apsaugą nuo didelio UV šviesos intensyvumo. Dėl didelio antioksidacinio pajėgumo šie flavonoidai dalyvauja visose reakcijose, kurios mažina oksidacinį stresą augaluose, kurį sukelia abiotinis stresas (vandens ir maisto medžiagų trūkumas, karštis). Be to, antocianinai taip pat dalyvauja reakcijoje į biotinį stresą (vabzdžių užkrėtimą ar grybelinę infekciją) [108].

Eksperimento metu didžiausia bendra antocianinų koncentracija nustatyta vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktoje – 3,11 mg C-3-GE/100 g. Ši koncentracija buvo 3 kartus didesnė už vaistinės medetkos kaliaus kultūros *in vitro*, kuri buvo 0,94 mg C-3-GE/100 g. Vaistinio kiečio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstraktoje antocianinų koncentracija (1,82 mg C-3-GE/100 g) 2 kartus didesnė už vaistinio kiečio *in vivo* ekstraktoje (0,82 mg C-3-GE/100 g). Mažiausia šių pigmentų koncentracija nustatyta rausvažiedės ežiulės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l)

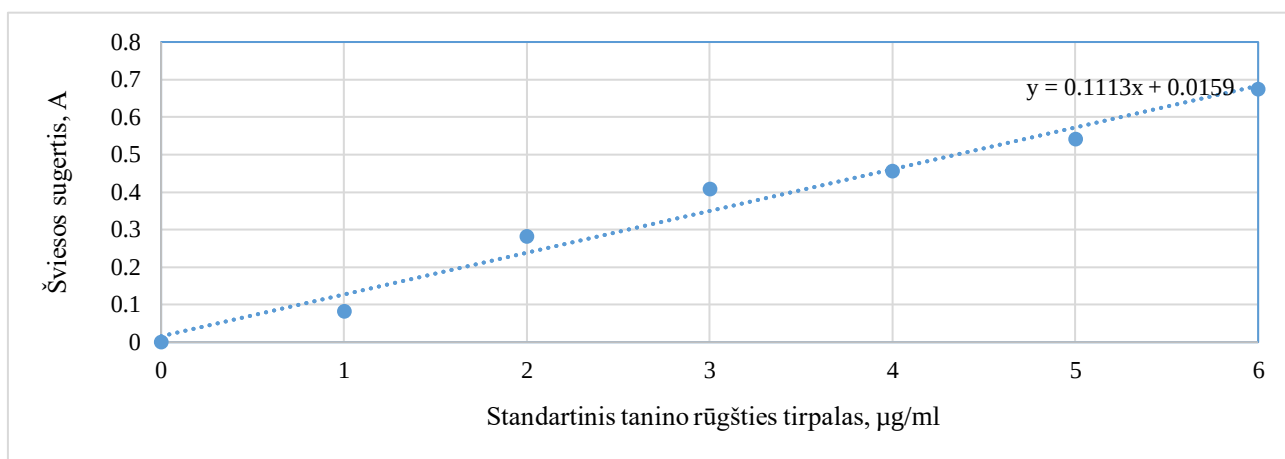
ekstrakte (0,42 mg C-3-GE/100 g), kuri buvo mažesnė 0,21 mg C-3-GE/100 g už rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ekstrakte. Mitybinės terpės papildymas augimo hormonais, formuojant vaistinės medetkos bei rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūras *in vitro*, antocianinų kaupimą kaliaus kultūroje veikė neigiamai. Rezultatai pateikti 3.15 paveiksle.



3.15 pav. Bendrosios antocianinų koncentracijos (mg C-3-GE/100 g) įvertinimas astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose. C-3-GE – Cianidin-3-gliukozidas

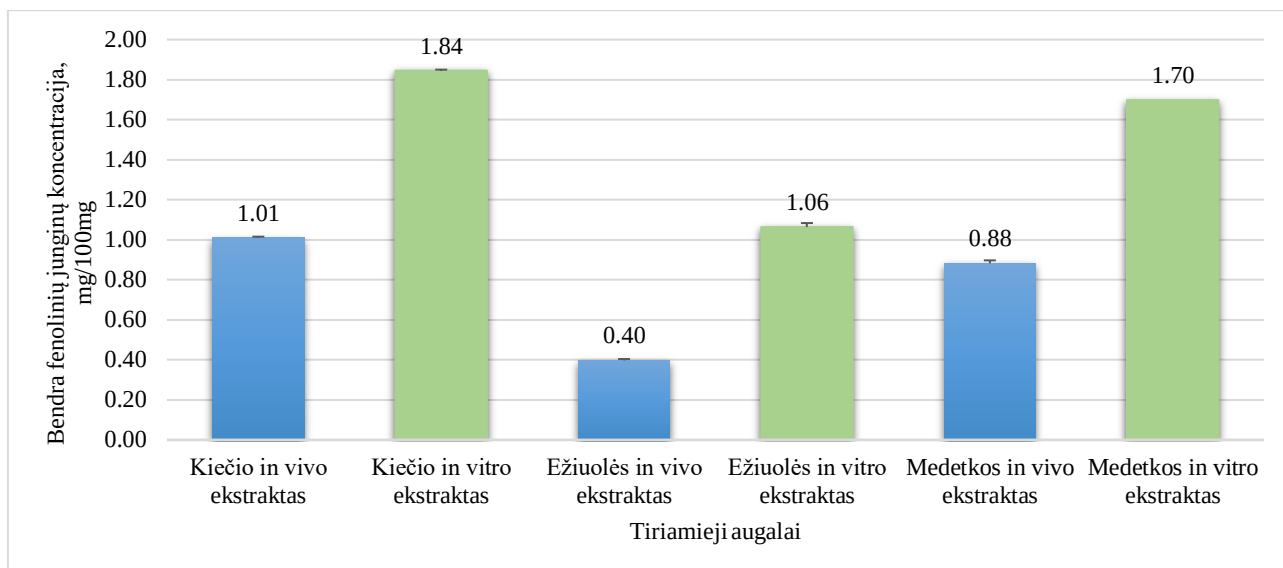
3.6.3. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

Bendroji fenolinių junginių koncentracija buvo įvertinta Folino-Kiokalto metodu. Augalų ekstraktuose esantys fenoliniai junginiai reaguoja su specifiniais redokso reagentais (Folino-Kiokalto reagentu), sudarydami mėlyną kompleksą, kurį galima įvertinti spektrofotometriškai. Reakcijos metu susidaro mėlynas chromoforas, sudarytas iš fosfovolframo-fosfomolibdeno komplekso, kuriame didžiausia chromoforų absorbcija priklauso nuo šarminio tirpalo ir fenolinių junginių koncentracijos [109].



3.16 pav. Standartinio tanino rūgšties tirpalo (µg/ml) kalibracinė kreivė

Pagal standartinį tanino rūgšties tirpalą (3.16 pav.) sudaryta kalibracinė kreivė fenolinių junginių koncentracijai įvertinti ir išvesta tiesinė lygtis ($y = 0,1113x - 0,0159$), kuria apskaičiuota bendroji fenolinių junginių koncentracija (mg/100 g) tiriamuosiuose augaluose.



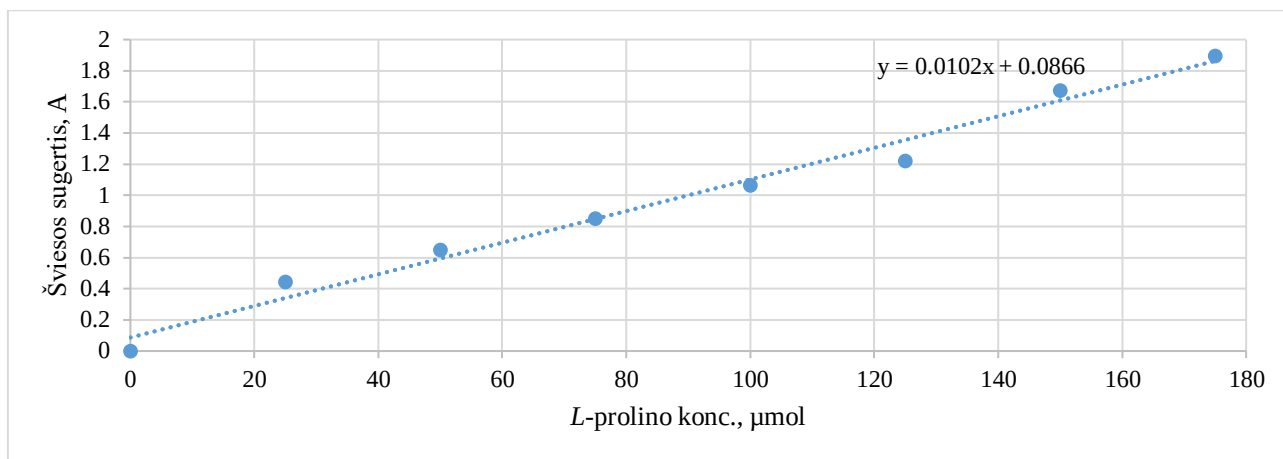
3.17 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija (mg/100 mg) astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

Tyrimo metu, nustatyta, kad didžiausia bendra fenolinių junginių koncentracija pasižymėjo vaistinio kiečio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstraktas (1,84 mg/100 mg). Už šią koncentraciją beveik 2 kartais mažesnė koncentracija nustatyta vaistinio kiečio *in vivo* ekstrakte – 1,01 mg/100 mg. Vaistinės medetkos kaliaus kultūros IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) ekstrakte aptikta bendra fenolinių junginių koncentracija (1,70 mg/100 mg) – 2 kartus didesnė lyginant su vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktu (0,88 mg/100 mg). Mažiausia šių junginių koncentracija nustatyta rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ekstrakte (0,40 mg/100 mg), kuri buvo 2,5 karto mažesnė už rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) ekstrakte (1,06 mg/100 mg). Lyginant tiriamųjų augalų *in vivo* ir *in vitro* kultūrų ekstraktus, didesnėmis bendrosiomis fenolinių junginių koncentracijomis pasižymėjo *in vitro* kultūros. Tyrimo rezultatai pateikti 3.17 paveiksle.

3.6.4. L-prolino koncentracijos įvertinimas

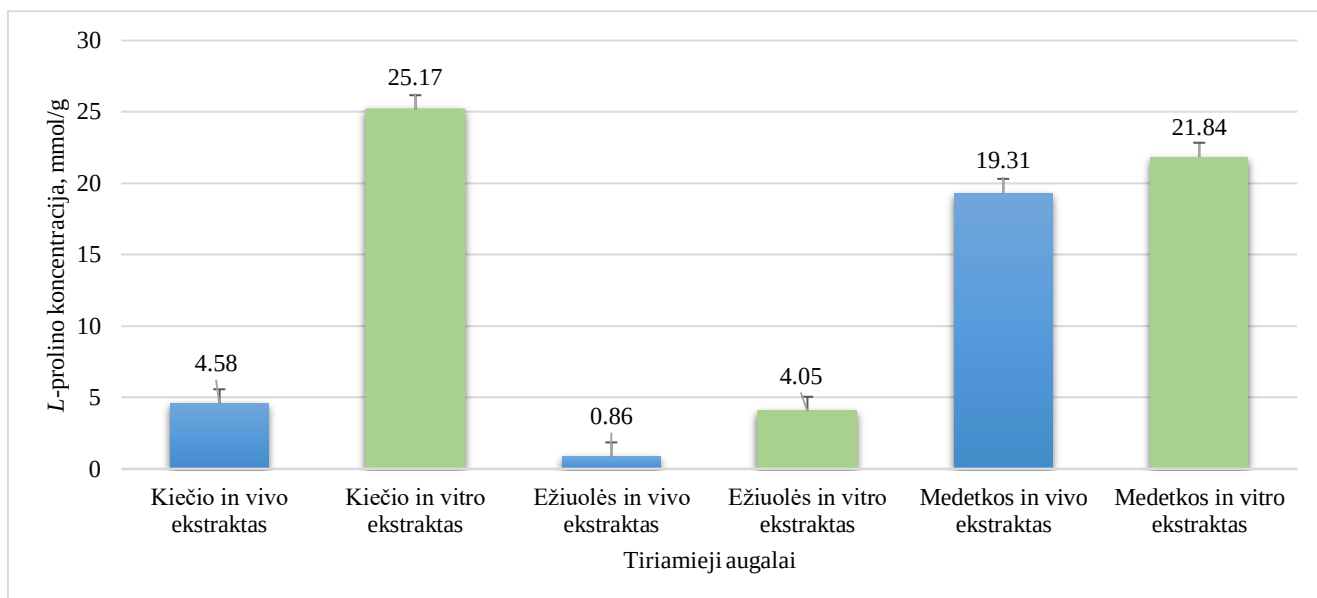
L-prolino – aminorūgštis, atliekanti svarbų vaidmenį augaluose. Ši aminorūgštis apsaugo augalus nuo abiotinio ir biotinio streso bei jų sukeltų padarinių, taip pat padeda augalams greičiau atsigauti po oksidacinio streso, pašalindamas susidariusius laisvuosius radikalus bei RDR. Įprastomis sąlygomis augaluose L-prolinas kaupiasi vakuolėse, o esant abiotiniam stresui, citozolyje aptinkamas didelės L-prolino koncentracijos. Be to, esant įvairioms nepalankioms sąlygoms, L-prolinas sudaro iki 80 % viso laisvųjų aminorūgščių fondo, palyginti su mažiau nei 5 %, esant normaliomis sąlygomis. Šis didesnis prolino kaupimasis streso sąlygomis yra susijęs su padidėjusia biosinteze ir ribotu šios molekulės skaidymu [110].

L-prolino koncentracijai nustatyti sudaryta kalibracinė kreivė pagal L-proliną (3.18 pav.), iš kurios išvesta tiesinė lygtis ($y = 0,0102x - 0,0866$).



3.18 pav. L-prolino kalibracinė kreivė

Apžvelgiant 3.19 paveiksle pavaizduotus duomenis, matyti, kad astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose *L*-prolino koncentracija kito labai plačiose ribose: nuo 0,86 mmol/g iki 25,17 mmol/g. Šio junginio koncentracija išsiskyrė vaistinio kiečio *in vitro* ir vaistinės medetkos *in vitro* kultūros ekstraktai. Didžiausia *L*-prolino koncentracija nustatyta vaistinio kiečio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstrakto (25,17 mmol/g). Ši koncentracija 5,5 kartus viršijo vaistinio kiečio *in vivo* ekstrakto aptiktą šio junginio koncentraciją, kurios vertė buvo 4,58 mmol/g. Panašiomis *L*-prolino koncentracijomis pasižymėjo vaistinės medetkos *in vivo* ir *in vitro* ekstraktai, kurių vertės atitinkamai buvo 19,31 mmol/g ir 21,84 mmol/g. Mažiausia koncentracija nustatyta rausvažiedės ežiulės *in vivo* ekstrakto, kuri buvo 0,86 mmol/g. Ši vertė 4,7 kartus mažesnė lyginant su rausvažiedės ežiulės kaliaus *in vitro* ekstraktu.

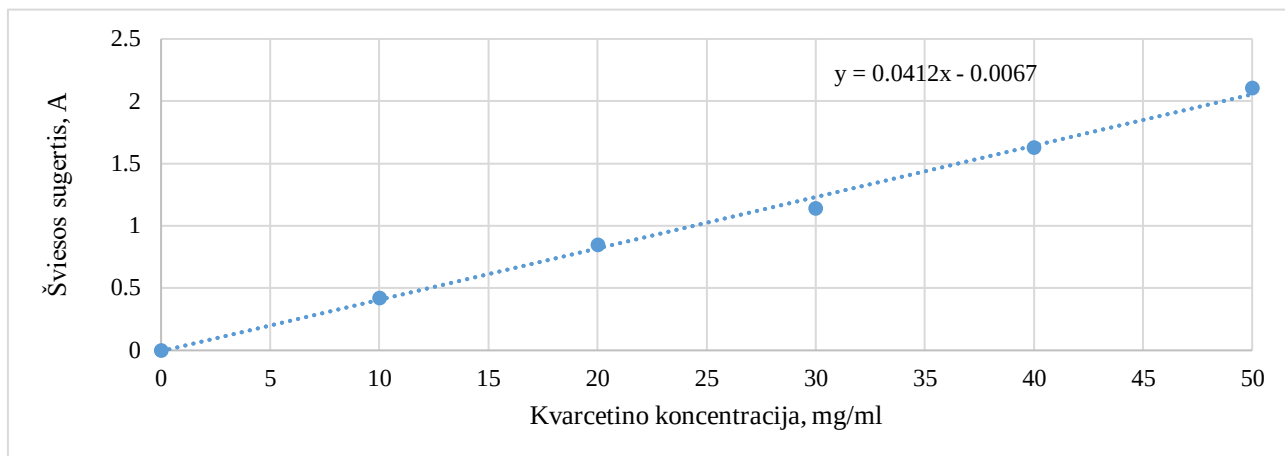


3.19 pav. *L*-prolino koncentracija (mmol/g) astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

Įvertinę *L*-prolino koncentraciją, pasirinktų astrinių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, ne tik nustatyta, kad mitybinės terpės papildymas augimo hormonais padidino *L*-prolino sintezę kaliaus kultūrose, bet ir tai, kad yra koreliacija tarp prolindehidrogenazės aktyvumo, kuri reguliuoja *L*-prolino koncentraciją augaluose.

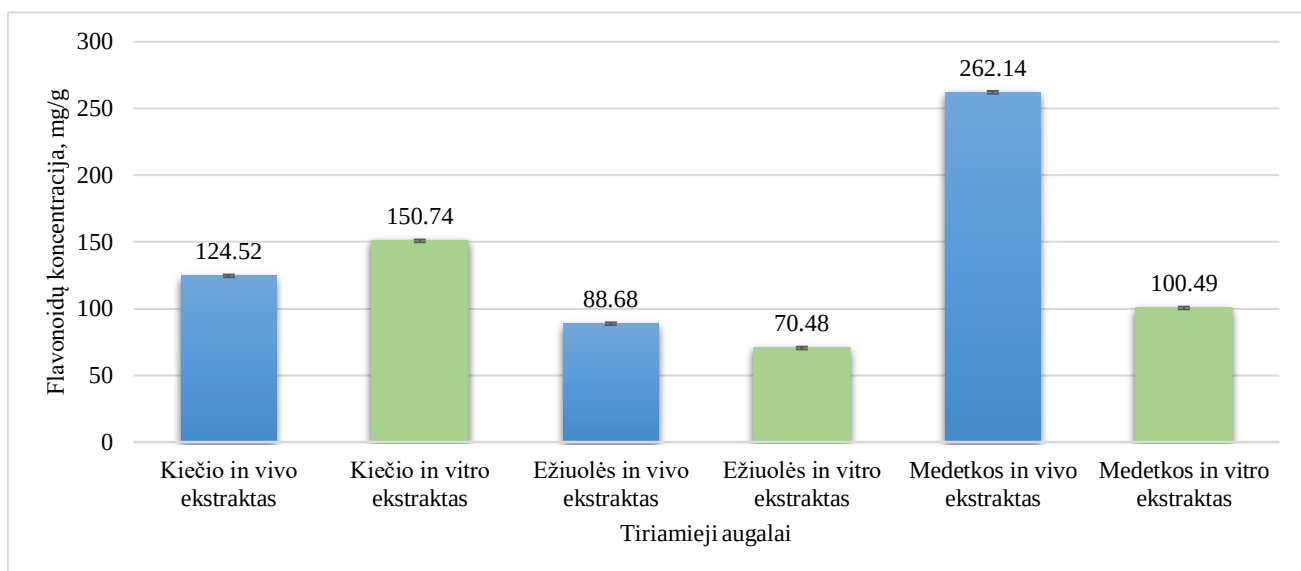
3.6.5. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas augaluose

Bendra flavonoidų koncentracija tiriamųjų augalų ekstraktuose buvo nustatyta naudojant aliuminio chloridą kolorimetriniu metodu [86]. Flavonoidų koncentracijai nustatyti buvo suformuota kalibracinė kreivė pagal kvarcetino tirpalą (3.20 pav.) ir išvesta tiesinė lygtis ($y = 0,0412x - 0,0067$), pagal kurią buvo apskaičiuoti reikalingi dydžiai, norint nustatyti flavonoidų koncentraciją (mg/g) tiriamuosiuose augaluose.



3.20 pav. Kvarcetino kalibracinė kreivė

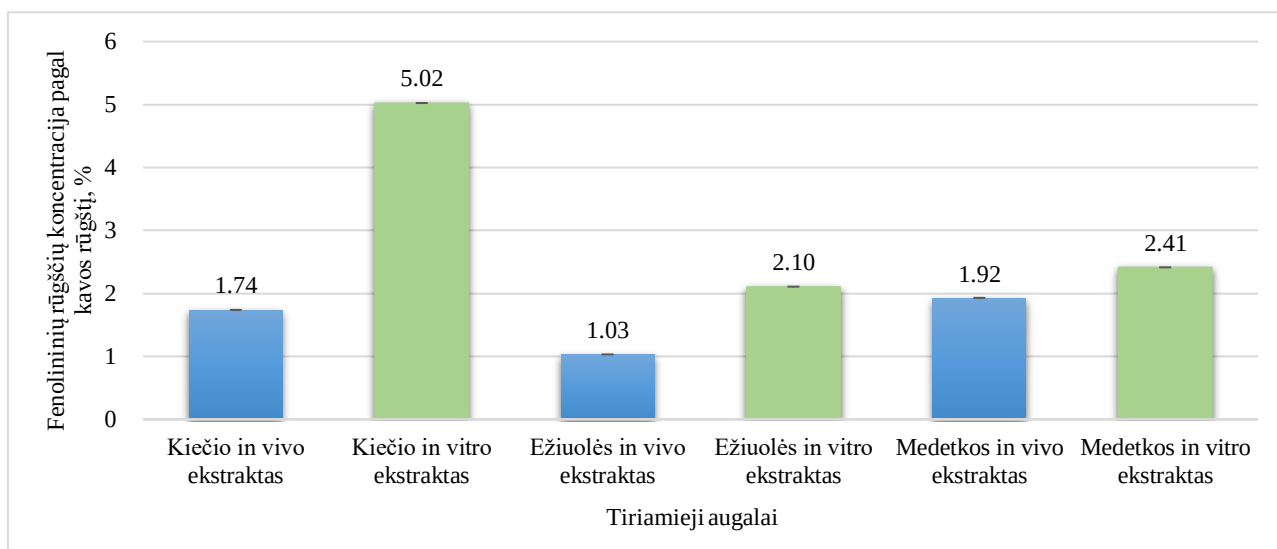
Didžiausia flavonoidų koncentracija nustatyta vaistinės medetkos *in vivo* ekstrakte – 262,14 mg/g. Vaistinio kiekio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstrakte (150,74 mg/g) šių junginių koncentracija 26,22 mg/g didesnė už vaistinio kiekio *in vivo* ekstrakte (124,52 mg/g). Mažiausia flavonoidų koncentracija nustatyta rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros BAP (3mg/l) + IAR (0,5 mg/l) ekstrakte (70,48 mg/g), kuri buvo 18,2 mg/g mažesnė už rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ekstrakte (88,68 mg/g). Tyrimo duomenys pateikti 3.21 paveiksle.



3.21 pav. Flavonoidų koncentracija (mg/g) astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

3.6.6. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje

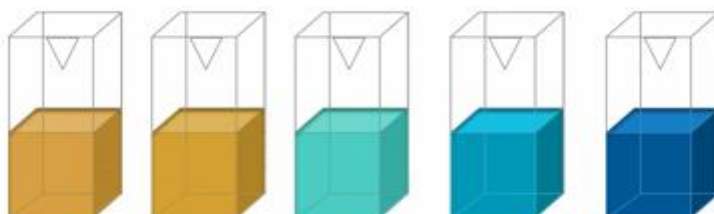
Atlikus bendros fenolinių rūgščių koncentracijos pagal kavos rūgštį tyrimą (3.22 pav.), nustatyta, kad didžiausia koncentracija pasižymėjo vaistinio kiego kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstraktas – 5,02 %. Ši koncentracija buvo beveik 3 kartus didesnė už vaistinio kiego *in vivo* ekstrakte, kuri buvo 1,74 %. Vaistinės medetkos kaliaus kultūros IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) (2,41 %) ir rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) (2,10 %) ekstraktai pasižymėjo panašiomis bendrosiomis fenolinių rūgščių koncentracijomis. Mažiausia koncentracija užfiksuota rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ekstrakte – 1,03 %.



3.22 pav. Bendroji fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį (%) astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

3.6.7. Baltymų koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje

Žinoma, kad laisvuosius radikalus ląstelėse gali neutralizuoti įvairūs fitocheminiai junginiai, tačiau tą pačią funkciją atlieka ir antioksidaciniai fermentai (superoksido dismutazė, katalazės ir askorbatperoksidazės). Skirtingi antioksidaciniai baltymai turi skirtingus antioksidacinius mechanizmus. Bradfordo metodo tyrimas – greitas ir gana jautrus metodas, kuris skirtas bendrai baltymų koncentracijai nustatyti. Jis pagrįstas Bradfordo reagento absorbcijos maksimumo poslinkiu nuo 465 iki 595 nm po to, kai jis prisijungia prie denatūruotų baltymų tirpale [111]. Baltymų koncentracija tiriamuosiuose augalų ekstraktuose įvertinta naudojant tris skirtingus ekstrahuojančius buferinius tirpalus (gliciną – HCl; (pH 2,6); 0,1 M natrio acetatą (pH 4,0); 0,1 M Tris – HCl (pH 8,0)).



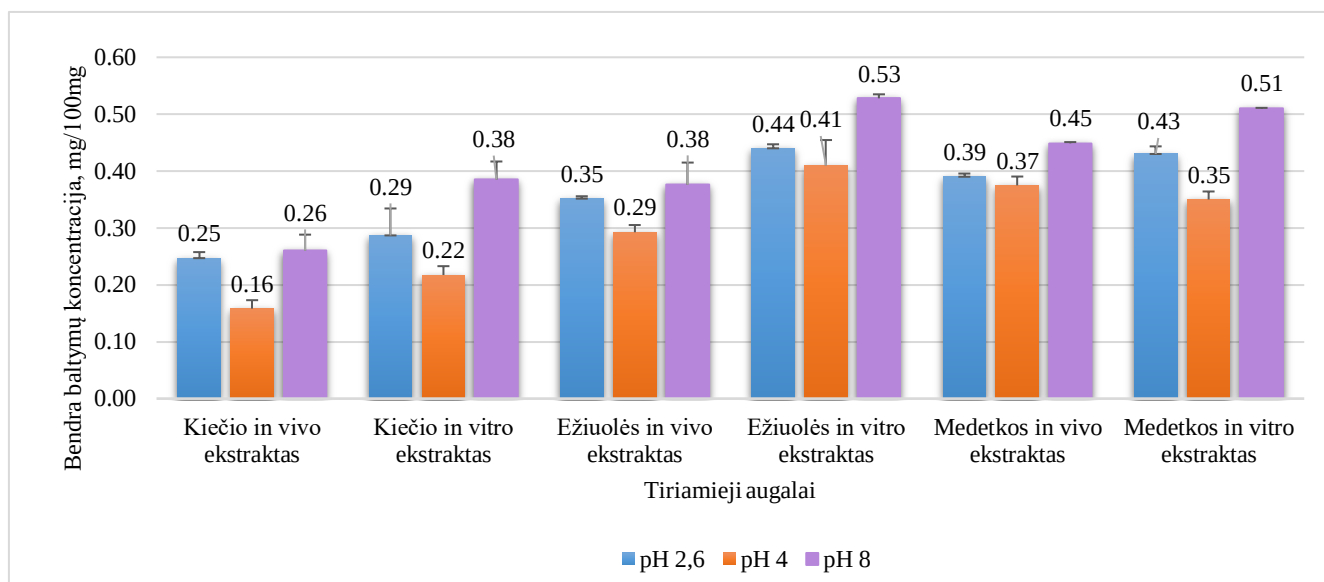
3.23 pav. Tirpalo spalvos kitimas, priklausomai nuo baltymų koncentracijos tirpale

Pagal gautus duomenis, didžiausia bendra baltymų koncentracija, naudojant glicino – HCl buferinį tirpalą, kurio pH 2,6, pasižymėjo rausvažiedės ežiulės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) (2,10 %) ekstraktas – 0,44 mg/100 mg. Vaistinės medetkos kaliaus kultūros (IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) ekstrakte buvo nustatyta labai panaši baltymų koncentracija (0,043 mg/100 mg). Mažiausia koncentracija užfiksuota vaistinio kiekio *in vivo* ekstrakte, kuri buvo 0,25 mg/100 mg.

Didžiausia bendra baltymų koncentracija, naudojant natrio acetato buferinį tirpalą, kurio pH 4,0, nustatyta rausvažiedės ežiulės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) (2,10 %) ekstrakte – 0,41 mg/100 mg. Ši koncentracija buvo 2 kartus didesnė už vaistinio kiekio *in vivo* (0,16 mg/100 mg) ir kaliaus kultūros *in vitro* (0,22 mg/100 mg) ekstraktuose nustatytas reikšmes. Vaistinės medetkos *in vivo* ir *in vitro* ekstraktai pasižymėjo labai panašiomis baltymų koncentracijomis, kurių vertės atitinkamai buvo 0,37 mg/100 mg ir 0,35 mg/100 mg.

Rausvažiedės ežiulės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) (2,10 %) ir vaistinės medetkos kaliaus kultūros IAR (0,1 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) ekstraktuose nustatyta didžiausia bendra baltymų koncentracija, naudojant Tris – HCl buferinį tirpalą (pH 8,0), kurių vertės atitinkamai buvo 0,53 mg/100 mg ir 0,51 mg/100 mg. Mažiausia koncentracija užfiksuota vaistinio kiekio *in vivo* ekstrakte, kuri buvo 0,26 mg/100 mg.

Apibendrinant ir lyginant rezultatus, iš tiriamųjų astrinių augalų, rausvažiedės ežiulės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) (2,10 %) ekstrakte nustatytos didžiausios baltymų koncentracijos naudojant skirtingus ekstrahuojančius buferinius tirpalus. Tris – HCl buferinis tirpalas, kurio pH 8,0, yra tinkamiausias išekstrahuoti baltymus iš augalinės žaliavos, nes visuose tirčiuose ekstraktuose baltymų koncentracija buvo didesnė lyginant su kitais naudotais buferiniais tirpalais. Tyrimo duomenys pateikti 3.24 paveiksle.



3.24 pav. Baltymų koncentracija (mg/100 mg) astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

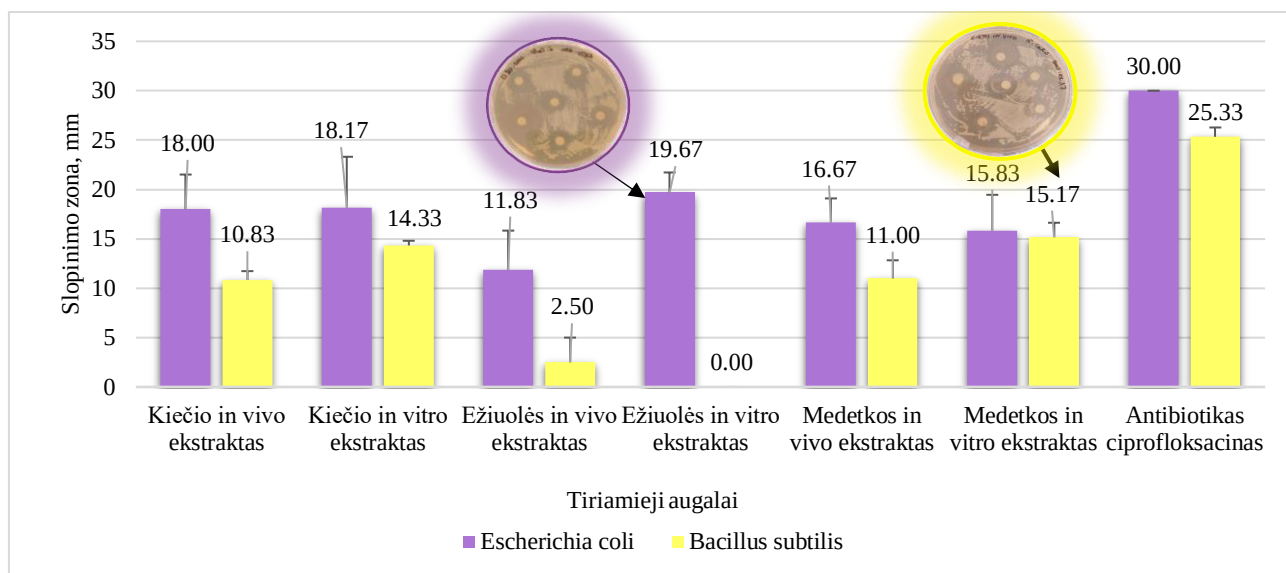
3.7. Augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas agar difuziniu metodu

Antibakterinis aktyvumas įvertintas naudojant difuzijos į agarą metodą, kuris yra pagrįstas tiriamosios medžiagos gebėjimu difunduoti mitybinėje terpėje. Antibakteriniam aktyvumui nustatyti,

tirtos skirtingų struktūrų bakterijos – gramneigiama, *Escherichia coli*, ir viena gramteigiama, *Bacillus subtilis*, siekiant įvertinti, ar skiriasi DMSO ištraukų antibakterinis aktyvumas bakterijų atžvilgiu. Tyrimas taip pat palygintas su antibiotiku – ciprofloksacinu.

Didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* pasižymėjo rausvažiedės ežiuolės kaliaus *in vitro* ekstraktas, kurio slopinimo zona – 19,67 mm. Šis aktyvumas buvo 7,84 mm didesnis nei rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ekstrakto (11,83 mm). Labai panašiu bakterijų augimo slopinimu pasižymėjo vaistinio kiekio *in vivo* ir *in vitro* ekstraktas, slopinimo vertės atitinkamai 18 mm ir 18,17 mm. Vaistinės medetkos *in vitro* (15,83 mm) ekstraktas pasižymėjo mažesnėmis antibakterinėmis savybėmis, lyginant su vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktu (16,67 mm).

Didžiausias antibakterinis aktyvumas prieš *Bacillus subtilis* nustatytas vaistinės medetkos *in vitro* ekstrakto (15,17 mm). Šis aktyvumas buvo 4,17 mm didesnis nei vaistinės medetkos *in vivo* ekstrakto (11 mm). Vaistinio kiekio kaliaus kultūros BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ekstraktas (14,33 mm) pasižymėjo geresnėmis antibakterinėmis savybėmis už *in vivo* ekstraktą (10,83 mm). Rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) ekstraktas neparodė jokio slopinamojo poveikio *Bacillus subtilis* bakterijų augimui.



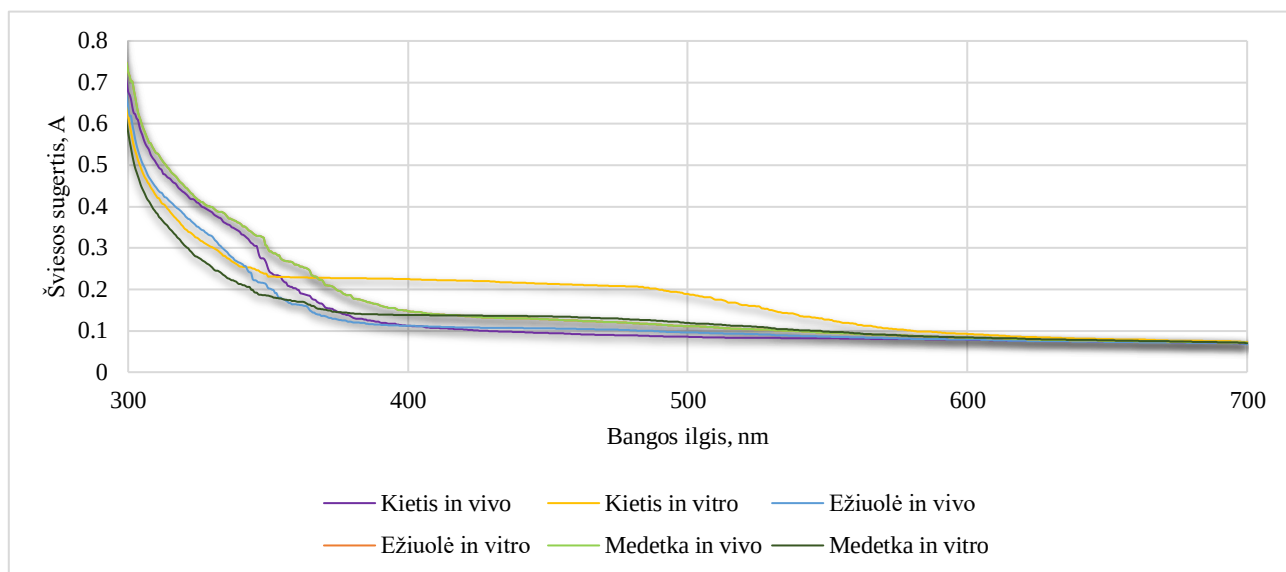
3.25 pav. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose

Apibendrinant ir lyginant rezultatus, ciprofloksacino antibiotikas pasižymėjo geresnėmis antibakterinėmis savybėmis už tirtų astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktus. Tiriamųjų astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktai pasižymėjo geresniu antibakteriniu poveikiu prieš gramneigiamą *Escherichia coli* bakteriją, lyginant su gramteigiama *Bacillus subtilis*. Jautrumo augalų ekstraktams skirtumai tarp gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų susiję su jų ląstelių paviršiaus savybių ir struktūrų skirtumais.

3.8. Sidabro nanodalelių sintezė iš augalų ekstrakto ir jų savybių įvertinimas

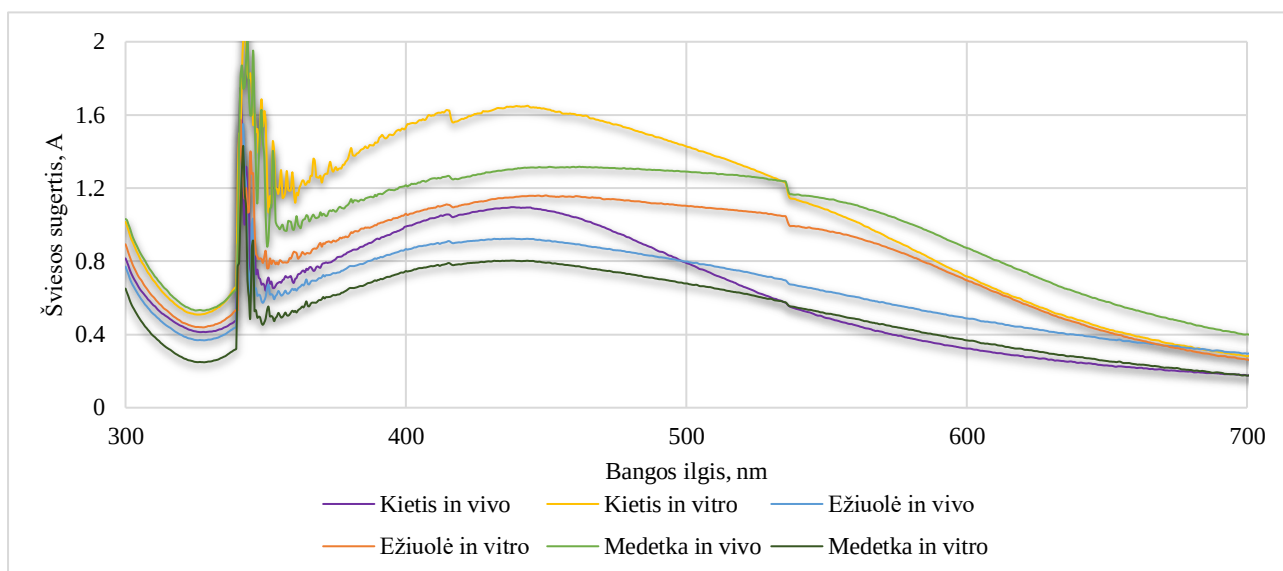
UV-Vis spektrofotometrinė analizė yra patikrintas nanodalelių analizės metodas. Sidabro nanodalelių biosintezę galima patvirtinti vizualiai stebint ir išmatuojant paviršiaus plazmoninio rezonanso (PPR) juostą, naudojant absorbcijos spektrą [112].

Į tiriamuosius augalų ekstraktus įpylus vandeninio AgNO_3 tirpalo, tirpalo reakcijos spalva lėtai pasikeitė iš geltonos spalvos į tamsiai raudoną, o tai rodo sidabro nanodalelių susidarymą. Spalvos pasikeitimas gali būti priskiriamas paviršiaus plazmoninių virpesių sužaditimui nanodalelėse ir sidabro jonų redukcijai [113].



3.26 pav. AgND, susintetintų iš augalų ekstraktų, UV spektras 300–700 nm bangos ilgiuose, po 0 min

Siekiant patvirtinti žaliosios sintezės metu biosintetintų AgND susidarymą tirpale, šviesos sugerties matavimo dinamika registruota pradžioje ir po 24 val. 300–700 nm bangos ilgyje. Sidabro nanodalelių sintezės pradžioje užrašytas UV spektras atskleidė, kad tiriamųjų astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose AgND nespėjo susiformuoti, todėl 400–500 nm diapazone plazmono rezonanso smailės pikas neužfiksuotas (žr. 3.26 pav.).



3.27 pav. AgND, susintetintų iš augalų ekstraktų, UV spektras 300–700 nm bangos ilgiuose, po 24 val

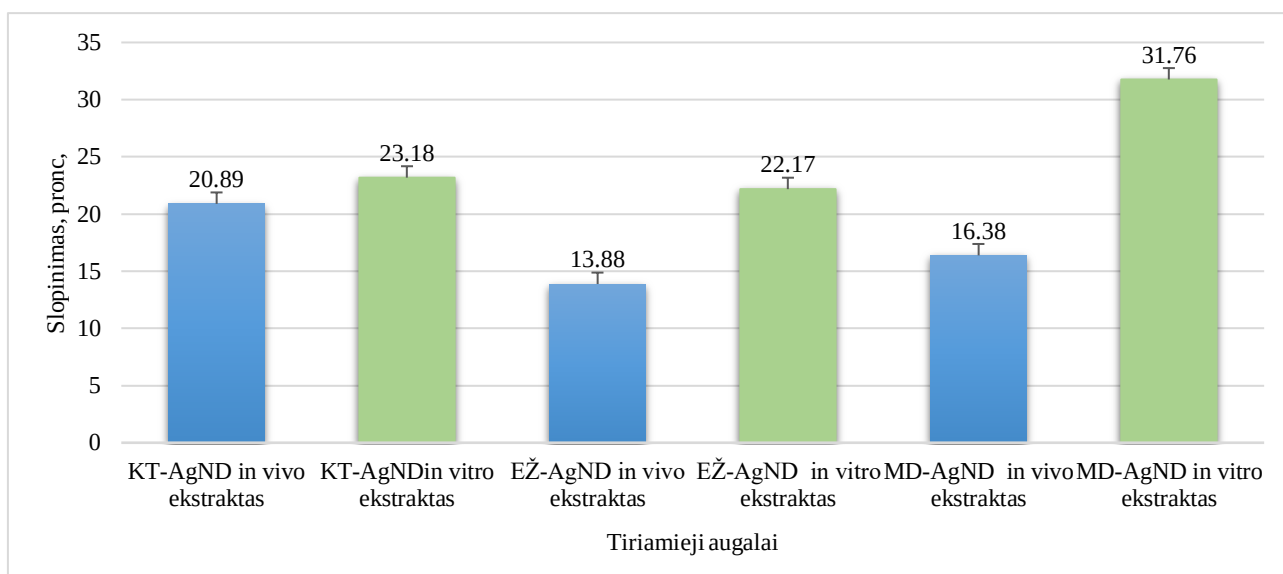
Po 24 val. užrašytas tiriamųjų astrinių augalų *in vivo* ir kaliaus *in vitro* UV spindulių sugerties spektras parodė stiprias absorbcijos smailes, kurių pikas yra apie 450 nm, o tai rodo sidabro nanodalelių susidarymą (žr. 3.27 pav.). Ši absorbcija yra artima absorbcijos smailėms, apie kurias pranešė

mokslininkai, sintetinę sidabro nanodaleles žaliosios sintezės metodu. Iš rausvažiedės ežiuolės ekstrakto susintetintų sidabro nanodalelių absorbcijos pikas nustatytas 481 nm bangos ilgyje, vaistinės medetkos ekstrakto – 410 nm bangos ilgyje, vaistinio kiekčio ekstrakto – 437 nm bangos ilgyje [112][114][115]. Stiprios absorbcijos juostos atsiradimas spektriniame modelyje atsiranda dėl lokalizuotų paviršiaus plazmonų sužadavimo, sukeliančių stiprią šviesos sklaidą elektriniu lauku bangos ilgyje, kuriame vyksta rezonansas. Paviršiaus plazmonų sugertis labai priklauso nuo dalelių dydžio, dielektrinės terpės formos ir fitocheminių medžiagų, supančių vandenyje išsklaidytas AgND [112]. Gautos plačios absorbcijos smailės, esant dideliui bangos ilgiui, rodo, kad susintetintos didelės arba agreguotos sidabro nanodalelės.

Daugiausia sidabro nanodalelių buvo susintetinta iš vaistinio kiekčio *in vitro* ekstrakto (šiam rašto darbe ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad vaistinio kiekčio kaliaus kultūra turi didelę fenolinių junginių koncentraciją). Tai parodo, kad yra koreliacija tarp fenolinių junginių koncentracijos ir AgND sintezės.

3.8.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Daugelis sidabro nanodalelių, susintetintų iš augalų ekstrakto, pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Sidabro nanodalelių biosintetintų iš augalų ekstraktų, antioksidacinis pajėgumas dažnai lyginamas su pačiu augalo ekstrakto aktyvumu. Nanodalelės, susidarantys žaliosios sintezės būdu, gali turėti sustiprintą antioksidacinį aktyvumą, tai siejama su bioaktyvių ekstrakto junginių absorbcija ant nanodalelių paviršiaus. Už nanomedžiagų antioksidacinį aktyvumą atsakingi keli mechanizmai, tačiau AgND ar kitų metalų nanodalelių atveju vyrauja katalazės imitacinis mechanizmas. Remiantis moksline literatūra, sidabro nanodalelės savo paviršiuje gali suskaidyti vandenilio peroksidą į vandenį ir deguonį. Tai yra pagrindinė priežastis, kodėl dauguma biologiškai susintetintų AgND pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Tyrimuose pastebėta, kad sidabro nanodalelių antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo ekstrakto fitocheminės sudėties ir paprastai pagerėja didėjant AgND koncentracijai. Tačiau kai kuriuose atliktuose tyrimuose nustatyta, kad sidabro nanodalelės, susintetintos iš augalų, pasižymi mažesniu antioksidaciniu poveikiu, lyginant su augalų ekstraktu [116].

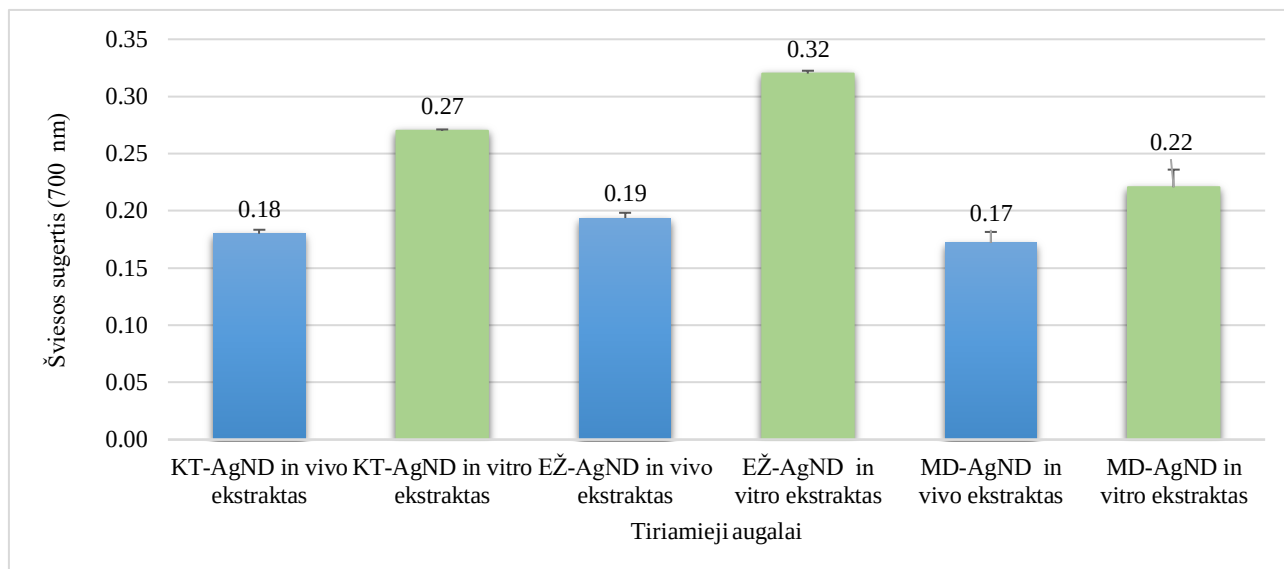


3.28 pav. DPPH slopinimo įvertinimas sidabro nanodalelių, susintetintų iš astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstrakto

Atlikus DPPH tyrimą, iš gautų rezultatų (3.28 pav.) matyti, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo MD-AgND *in vitro* ekstraktas – 31,76 %, šis aktyvumas buvo 15,38 % didesnis nei MD-AgND *in vivo* ekstrakto (16,38 %). Mažiausias aktyvumas nustatytas EŽ-AgND *in vivo* ekstrakto, kurio vertė 13,88 %. Ši vertė buvo 8,29 % mažesnė lyginant su EŽ-AgND kaliaus *in vitro* ekstraktu. KT-AgND *in vivo* ir *in vitro* ekstraktai pasižymėjo panašiomis DPPH• radikalo slopinimo savybėmis, kurių vertės atitinkamai 20,89 ir 23,18 %. Nors iš gautų rezultatų matyti, kad susintetintų biokonjugatų antioksidacinis aktyvumas yra mažesnis lyginant su augalų ekstraktais, tačiau jie pasižymėjo šiomis savybėmis. Taip pat nustatyta, kad geresniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo tiriamųjų augalų kaliaus kultūros *in vitro*, lyginat su *in vivo* augalų ekstraktais.

3.8.2. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas

Pagal gautus rezultatus (3.29 pav.) matyti, kad didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo sidabro nanodalelės, sintetintos iš rausvažiedės ežiuolės *in vitro* ekstrakto – 0,32 A, šis aktyvumas buvo 15,7 % didesnis nei EŽ-AgND *in vivo* ekstrakto (0,27 A). Mažiausia šviesos sugertis buvo nustatyta MD-AgND *in vivo* ekstrakto – 0,21 A. Iš vaistinio kiekio *in vivo*, rausvažiedės ežiuolės *in vivo* ir vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktų susintetinti biokonjugatai, pasižymėjo panašiomis redukcinėmis savybėmis. Kaip ir naudojant DPPH metodą, susintetintų biokonjugatų *in vitro* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas yra didesnis lyginant su augalų ekstraktais *in vivo*. Ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad tiriamųjų astrinių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktai turi didelę fenolinių junginių koncentraciją. Tai patvirtina, kad sidabro nanodalelių antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo ekstrakto fitocheminės sudėties, ypač fenolinių junginių.



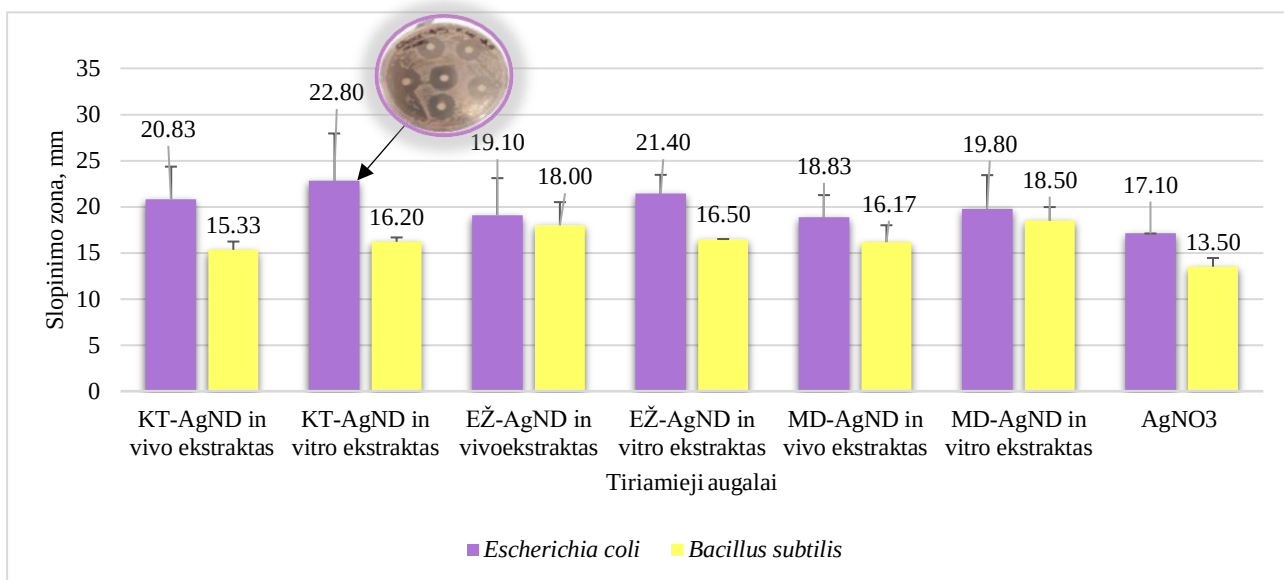
3.29 pav. Sidabro nanodalelių, susintetintų iš astrinių *in vivo* ir *in vitro* augalų ekstrakto, redukcinių savybių įvertinimas

3.8.3. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas difuzijos į agarą metodu

Pagal pateiktus tyrimo rezultatus matyti, kad didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* pasižymėjo KT-AgND *in vitro* ekstraktas, kurio slopinimo zona – 22,80 mm, šis aktyvumas buvo 2 mm didesnis nei KT-AgND *in vivo* ekstrakto (20,83 mm). Mažiausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo MD-AgND *in vivo* ekstraktas (18,83 mm), jo slopinimo zona buvo mažesnė 1 mm, lyginant su MD-AgND *in vitro* ekstraktu (19,80 mm).

Didžiausias antibakterinis aktyvumas prieš *Bacillus subtilis* nustatytas MD-AgND *in vitro* ekstrakte (18,50 mm), šis aktyvumas buvo 1,8 mm didesnis nei vaistinės medetkos *in vivo* ekstrakto (11 mm). KT-AgND *in vivo* ekstraktas (15,33 mm) pasižymėjo mažiausiu antibakteriniu aktyvumu. EŽ-AgND *in vivo* ekstraktas pasižymėjo 1,5 mm didesnėmis slopinimo vertėmis (18,0 mm) lyginant su *in vitro* ekstraktu (16,17 mm). Tačiau biosusintetintos AgND stipriai pagerino rausvažiedės ežiuolės kaliaus kultūros BAP (3 mg/l) + IAR (0,5 mg/l) ekstrakto antibakterinį aktyvumą, nes ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad šis ekstraktas neparodė jokio slopinamojo poveikio *Bacillus subtilis* bakterijų augimui

Apibendrinant ir lyginant rezultatus, vandeninis AgNO₃ tirpalas, kuris naudotas kaip kontrolė, pasižymėjo mažesniu antibakteriniu aktyvumu, lyginant su tiriamųjų astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* sidabro nanodalelių ekstraktais. Tai rodo, kad antibakterinis aktyvumas priklauso ne tik nuo sidabro jonų, bet ir biosintetintų AgND. Tiriamųjų astrinių augalų KT-AgND, EŽ-AgND bei MD-AgND *in vivo* ir *in vitro* ekstraktai pasižymėjo geresniu antibakteriniu poveikiu prieš gramneigiamą *Escherichia coli* bakteriją, lyginant su gramteigiamą *Bacillus subtilis*. Skirtingas sidabro nanodalelių antibakterinis poveikis gramneigiamoms ir gramteigiamoms bakterijoms parodo, kad sidabro nanodalelių įsisavinimas yra svarbus antibakteriniam poveikiui.

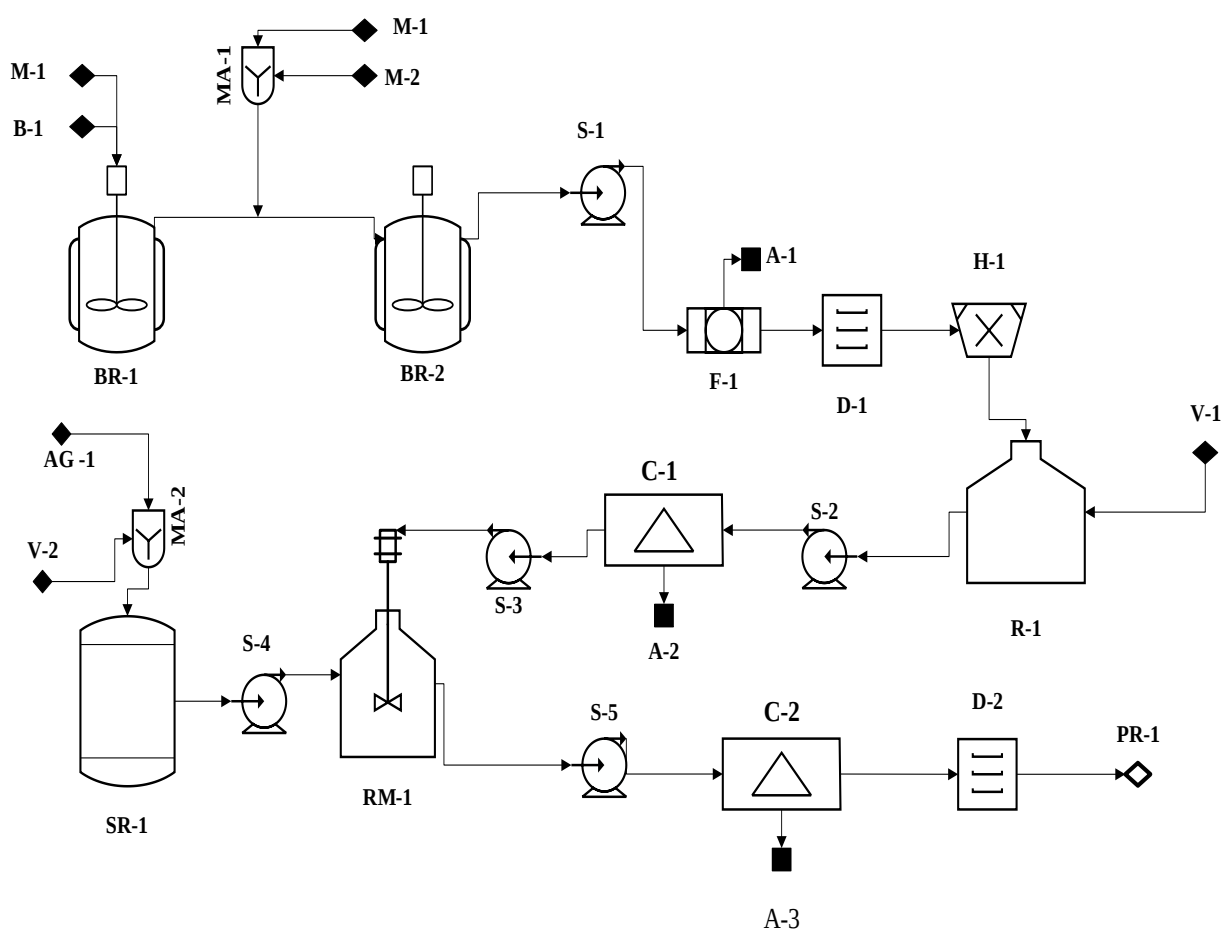


3.30 pav. Sidabro nanodalelių, susintetintų iš astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstrakto, antibakterinio aktyvumo įvertinimas

4. Rekomendacijų dalis

Sidabro nanodalelių gamybą rekomenduojama išgauti iš vaistinio kiečio (*Artemisia dracunculus* L.) kaliaus *in vitro* kultūrų, užaugintų mitybinėje terpėje, papildytoje augimo hormonais. Rekomenduojama principinė aparatūrinė schema, skirta sidabro nanodalelėms išskirti iš vaistinio kiečio *in vitro* kultūrų, pateikiama 4.1 paveiksle.

Pirmajame aparatūrinės schemos bioreaktoriuje (BR-1) užauginami vaistinio kiečio augalai, kurie perkeliama į antrąjį bioreaktorių (BR-2), kuriame mitybinė MS terpė papildoma atitinkamais augimo hormonų deriniais. Užaugintos vaistinio kiečio kaliaus kultūros išcentrinis siurbliu (S-1) praleidžiamos pro filtrą (F-1) ir išdžiovinamos džiovavimo kameroje (D-1). Sausa biomasė susmulkinama homogenizatoriuje (H-1) ir laikoma rezervuare (R-1). Sukaupus pakankamai susmulkintos vaistinio kiečio kaliaus kultūros medžiagos, išcentrinis siurbliu (S-2) tiekiamas į rezervuarą su maišykle (RM-1). Į tą patį rezervuarą su maišykle (RM-1) patenka vandeninis AgNO_3 tirpalas rezervuaras, kuris buvo laikomas AgNO_3 tirpalo rezervuare (SR-1). Į rezervuarą su maišykle (RM-1) vandeninis AgNO_3 tirpalas tiekiamas išcentrinis siurbliu (S-4). Mėginiai intensyviai maišyti 25 °C temperatūroje, kol tirpalas nusidažė tamsiai raudona spalva ir nusėdo sidabro nanodalelės. Toliau tirpalas centrifuguotas centrifugoje (C-2). Nucentrifuguotos sidabro nanodalelės patenka į džiovinimo kamerą (D-2), kurioje yra išdžiovinamas galutinis produktas – sidabro nanodalelės.



4.1 pav. Sidabro nanodalelių gamybos principinė aparatūrinė schema

4.1 lentelė. Principinėje aparatūrinėje schemoje pavaizduoti medžiagų žymėjimai ir jų pavadinimai

Medžiagų žymėjimas	Medžiagos pavadinimas
B-1	Biomasė
M-1	MS terpė
M-2	Reikiami fitohormonų ir elicitorių deriniai
A-1, A-2, A-3	Atliekos
V-1, V-2	Vanduo
AG-1	Sidabro nitratas
PR-1	Produktas

4.2 lentelė. Principinės aparatūrinės schemos prietaisų žymėjimai ir pavadinimai

Prietaiso žymėjimas	Prietaiso pavadinimas
BR-1, BR-2	Bioreaktoriai
MA-1, MA-2	Maišytuvas
S-1, S-2, S-3, S-4, S-5	Išcentriniai siurbLIAI
F-1	Filtrai
D-1, D-2	Džiovinimo kamera
H-1	Homogenizatorius
R-1	Rezervuaras
C-1, C-2	Centrifuga
RM-1	Rezervuaras su maišykle
SR-1	AgNO ₃ tirpalo rezervuaras

Išvados

1. Įvertinus trimis skirtingais metodais tiriamųjų astrinių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, nustatyta, jog didesnėmis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo tiriamųjų augalų *in vitro* ekstraktai. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo vaistinio kiekio *in vitro*, auginto MS terpėje su BAP (2,5 mg/l) ir NAR (0,5 mg/l) augimo hormonais, ekstraktas. Pagal DPPH metodą – 88,74 %, pagal redukcinių savybių įvertinimą – 1,79 A, pagal FRAP metodą – 60,55 $\mu\text{mol/l}$.
2. Tyrimo metu nustatyta, kad pasirinkti augimo reguliatoriai efektyviai padidino antioksidantinių fermentų aktyvumą kaliaus kultūrose *in vitro*. Didžiausiu superoksido dismutazės aktyvumu (0,46 vnt/mg) pasižymėjo vaistinės medetkos *in vitro* ekstraktas, didžiausiu prolindehidrogenazės (946,21 $\mu\text{mol NAD/mg}$) ir askorbatperoksidazės aktyvumu (0,39 mmol/mg) pasižymėjo vaistinio kiekio *in vitro* ekstraktas, o didžiausias katalazės aktyvumas (210 vnt/mg) nustatytas rausvažiedės ežiulės *in vitro* ekstrakto.
3. Mažiausia malondialdehido koncentracija nustatyta rausvažiedės ežiulės *in vitro* ekstrakto (0,12 $\mu\text{mol/g}$).
4. Atlikti tyrimo rezultatai parodė biologiškai aktyvių junginių kitimą tiriamųjų augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose:
 - pasirinktų augimo reguliatorių pridėjimas į mitybinę terpę veikė neigiamai chlorofilo *a* bei chlorofilo *b* ir karotinoidų koncentraciją tiriamųjų augalų kaliaus kultūrose *in vitro*. Didžiausia chlorofilo *a* (13,11 mg/100 mg) bei chlorofilo *b* (18,92 mg/100 mg) ir karotinoidų (6,17 mg/100 mg) koncentracija nustatyta rausvažiedės ežiulės *in vivo* ekstrakto. Taip pat nustatytos mažesnės antocianinų ir flavonoidų koncentracijos vaistinės medetkos ir rausvažiedės ežiulės *in vitro* ekstraktuose, lyginant su *in vivo* ekstraktais.
 - mitybinės terpės papildymas efektyviai padidino fenolinių junginių sintezę vaistinio kiekio (44,2 %), rausvažiedės ežiulės (62,3 %) ir vaistinės medetkos (48,24 %) kaliaus kultūrose *in vitro*. Taip pat padidino *L*-prolino, fenolinių rūgščių ir baltymų sintezę bei kaupimą kaliaus kultūrose. Didžiausia *L*-prolino (25,17 mmol/g) ir fenolinių rūgščių (5,02 %) koncentracija – nustatyta vaistinio kiekio *in vitro* ekstrakto. Didžiausia baltymų ekstrakcija koncentracija buvo gauta, kai ekstrakcijos pH buvo 8. Didžiausia koncentracija pasižymėjo rausvažiedės ežiulės *in vitro* ekstraktas – 0,53 mg/100 mg.
5. Nustatyta, kad pasirinktų augimo reguliatorių pridėjimas į mitybinę terpę pagerino tiriamųjų augalų *in vitro* kultūrų antibakterinį aktyvumą. Didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* pasižymėjo rausvažiedės ežiulės kaliaus *in vitro* ekstraktas (19,67 mm), o prieš *Bacillus subtilis* vaistinės medetkos *in vitro* ekstraktas (15,17 mm). Tiriamųjų astrinių augalų *in vivo* ir *in vitro* ekstraktai pasižymėjo intensyvesniu antibakteriniu poveikiu prieš gramneigiamą *Escherichia coli* bakteriją, lyginant su gramteigiama *Bacillus subtilis*.
6. Sidabro nanodalelių daugiausia buvo susintetinta iš vaistinio kiekio *in vitro* ekstrakto. Didžiausiomis antioksidacinėmis savybėmis pagal DPPH metodą (31,76 %) pasižymėjo vaistinės medetkos *in vitro*, o pagal redukcinių savybių įvertinimą – rausvažiedės ežiulės (0,32 A) *in vitro* koloidiniai tirpalai su sidabro nanodalelėmis. Didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* pasižymėjo vaistinio kiekio *in vitro* (22,80 mm), o prieš *Bacillus subtilis* – vaistinės medetkos *in vitro* (18,50 mm) koloidiniai tirpalai su sidabro nanodalelėmis.

Literatūros sąrašas

1. ROLNIK, A., OLAS, B. The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2021. 22 (6), 1–10 p. [žiūrėta 2023-02-23]. Prieiga per: [/pmc/articles/PMC7999649/](https://pmc/articles/PMC7999649/).
2. FAUSTINO, M. V. et al. Calendula L. species polyphenolic profile and in vitro antifungal activity. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. 2018. 45 (March 2017), 254–267 p. [žiūrėta 2023-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.013>.
3. KENNY, O. et al. Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014. 161 (1), 79–86 p. [žiūrėta 2023-02-25]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.126>.
4. BESSADA, S.M.F. et al. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2015. 76 (228), 604–615 p. [žiūrėta 2023-02-25]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.073>.
5. ACHIKA, J.I. et al. A Review on the Phytoconstituents and Related Medicinal Properties of Plants in the Asteraceae Family. *IOSR Journal of Applied Chemistry* [interaktyvus]. 2014. 7 (8), 2278–5736 p. [žiūrėta 2023-02-26]. Prieiga per: www.iosrjournals.org.
6. GARCIA-OLIVEIRA, P. et al. Traditional plants from Asteraceae family as potential candidates for functional food industry. *Food and Function* [interaktyvus]. 2021. 12 (7), 2850–2873 p. [žiūrėta 2023-02-26]. Prieiga per: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/FO/D0FO03433A>.
7. VERMA, P.K. et al. Phytochemical ingredients and pharmacological potential of Calendula officinalis Linn. *Pharmaceutical and Biomedical Research* [interaktyvus]. 2018. 4 (2), 1–17 p. [žiūrėta 2023-02-26]. Prieiga per: http://pbr.mazums.ac.ir/files/site1/user_files_88c428/dr pawankv-A-10-92-3-4a6323d.pdf.
8. KHALID, K. a, TEIXEIRA DA SILVA, J. a Biology of Calendula officinalis Linn.: Focus on Pharmacology, Biological Activities and Agronomic Practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* [interaktyvus]. 2012. 6, 12–27 p. [žiūrėta 2023-02-26]. Prieiga per: [http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/MAPSB_6\(1\)12-27o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/MAPSB_6(1)12-27o.pdf).
9. ABDELWAHAB, S.I. et al. Fifty-year of Global Research in Calendula Officinalis L. (1971–2021): A Bibliometric Study. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology* [interaktyvus]. 2022. 2 (4), 100059 p. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ccmp.2022.100059>.
10. ARORA, D. et al. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus Calendula. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. 2013. 7 (14), 179–187 p. [žiūrėta 2023-02-27]. Prieiga per: 10.4103/0973-7847.120520.
11. PATIL, K. et al. A Review of Calendula Officinalis Magic in Science. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* [interaktyvus]. 2022. 16 (2), 23–27 p. [žiūrėta 2023-02-27]. Prieiga per: 10.7860/jcdr/2022/52195.16024.
12. JOHN, R., JAN, N. Calendula Officinalis-An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proceedings of the Indian National Science Academy* [interaktyvus]. 2017. 83 (4), 769–787 p. [žiūrėta 2023-02-27]. Prieiga per: 10.16943/ptinsa/2017/49126.
13. SILVA, D. et al. Anti-inflammatory activity of calendula officinalis l. Flower extract. *Cosmetics* [interaktyvus]. 2021. 8 (2), 1–7 p. [žiūrėta 2023-02-27]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020031>.

14. ANDERSEN, F.A. et al. Final report of the cosmetic ingredient review expert panel amended safety assessment of calendula officinalis-derived cosmetic ingredients. *International Journal of Toxicology* [interaktyvus]. 2010. 29 (6), [žiūrėta 2023-02-27]. Prieiga per: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1091581810384883>.
15. KOUL, B., TAAK, P. The Artemisia Genus: A Review on Traditional Uses, Phytochemical Constituents, Pharmacological Properties and Germplasm Conservation. *Journal of Glycomics & Lipidomics* [interaktyvus]. 2018. 07 (01), 1–7 p. [žiūrėta 2023-02-28]. Prieiga per: 10.4172/2153-0637.1000142.
16. DŁUGOŃSKA, H. The Nobel Prize 2015 in physiology or medicine for highly effective antiparasitic drugs. *Annals of parasitology* [interaktyvus]. 2015. 61 (4), 299–301 p. [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per: https://annals-parasitology.eu/archive_2001_2022/2015-61-4_299.pdf.
17. OBOLSKIY, D. et al. Artemisia dracunculus L. (tarragon): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2011. 59 (21), 11367–11384 p. [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf202277w>.
18. AGLAROVA, A.M. et al. Biological characteristics and useful properties of tarragon (Artemisia dracunculus L.) (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* [interaktyvus]. 2008. 42 (2), 81–86 p. [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11094-008-0064-3>.
19. JAHANI, R. et al. Evaluation and comparison of the antidepressant-like activity of Artemisia dracunculus and Stachys lavandulifolia ethanolic extracts: An in vivo study. *Research in Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2019. 14 (6), 544–553 p. [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per: https://journals.lww.com/rips/Fulltext/2019/14060/Evaluation_and_comparison_of_the.8.aspx.
20. ZAREZADE, V. et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of Artemisia dracunculus against CCl4-induced hepatotoxicity in rats. *Avicenna journal of phytomedicine* [interaktyvus]. 2018. 8 (1), 51–62 p. [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29387574> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5787997>.
21. KHAYYAT, M.H. Tarragon (Artemisia dracunculus L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* [interaktyvus]. 2020. 92, 813–817 p. [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124166417000924>.
22. MUMIVAND, H. et al. Antioxidant properties and principal phenolic phytochemicals of Iranian tarragon (Artemisia dracunculus L.) accessions. *Horticulture Environment and Biotechnology* [interaktyvus]. 2017. 58 (4), 414–422 p. [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13580-017-0121-5>.
23. KARA, A., ÇAĞLAK, E. Phytochemical Research and Evaluation of Tarragon (Artemisia dracunculus L.) as a Food Additive. *Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* [interaktyvus]. 2022. 3 (2), 50–60 p. [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/2591669>.
24. SOCACIU, M.I. et al. Formulation and characterization of antimicrobial edible films based on whey protein isolate and tarragon essential oil. *Polymers* [interaktyvus]. 2020. 12 (8), 1–21 p. [žiūrėta 2023-03-03]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/8/1748>.
25. BURLOU-NAGY, C. et al. Echinacea purpurea (L.) Moench: Biological and Pharmacological Properties—A Review. *Plants* [interaktyvus]. 2022. 11 (9), 1244 p. [žiūrėta 2023-03-03]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9102300/>.

26. ATTARZADEH, M. et al. Improving growth and phenolic compounds of *Echinacea purpurea* root by integrating biological and chemical resources of phosphorus under water deficit stress. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2020. 154 (June), 112763 p. [žiūrėta 2023-03-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112763>.
27. BRUNI, R. et al. Analytical methods for the study of bioactive compounds from medicinally used *Echinacea* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [interaktyvus]. 2018. 160 443–477 p. [žiūrėta 2023-03-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.044>.
28. MANAYI, A. et al. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. 2015. 9 (17), 63–72 p. [žiūrėta 2023-03-03]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4441164/>.
29. HUDSON, J.B. Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (purple coneflower) in infectious diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [interaktyvus]. 2012. 2012 (1), 1–16 p. [žiūrėta 2023-03-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155/2012/769896>.
30. PAGARE, S. et al. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* [interaktyvus]. 2015. 9 (3), 293–304 p. [žiūrėta 2023-03-06]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7123774/>.
31. BABENKO, L.M. et al. Phenolic compounds in plants: Biogenesis and functions. *Ukrainian Biochemical Journal* [interaktyvus]. 2019. 91 (3), 5–18 p. [žiūrėta 2023-03-06]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.15407/ubj91.03.005>
32. IGNAT, I. et al. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2011. 126 (4), 1821–1835 p. [žiūrėta 2023-03-06]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.
33. HA, L.T.N. Phenolic compounds and health benefites. *Faculty of Food Science and Technology, Vietnam National University of Agriculture* . 2016. 14 (7), 1107–1118 p. [žiūrėta 2023-03-06].
34. HELENO, S.A. et al. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2015. 173 501–513 p. [žiūrėta 2023-03-07]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>.
35. BLAGA, L. Hplc Determination of Polyphenols From *Calendula Officinalis*. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology* [interaktyvus]. 2017. XXI (2), 97–101 p. [žiūrėta 2023-03-09]. Prieiga per: <https://sciendo.com/article/10.1515/auaft-2017-0020>.
36. BAI, J. et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy* [interaktyvus]. 2021. 133 (November 2020), 110985 p. [žiūrėta 2023-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985>.
37. MONTEIRO ESPÍNDOLA, K.M. et al. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology* [interaktyvus]. 2019. 9 (JUN), 3–5 p. [žiūrėta 2023-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>
38. SAEED, M. et al. The use of chicoric acid from *Echinacea purpurea* as a feed additive in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal* [interaktyvus]. 2017. 74 (1), 69–78 p. [žiūrėta 2023-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1017/S0043933917001027>
39. DEMIRCI, T. Determination of secondary metabolite production efficiency in *Echinacea purpurea* callus, shoot, and root in vitro cultures with methyl jasmonate applications. *Acta Physiologiae Plantarum* [interaktyvus]. 2022. 44 (12), 1–12 p. [žiūrėta 2023-03-09]. Prieiga per:

<https://doi.org/10.1007/s11738-022-03468-6>.

40. DIAS, M.C. et al. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules* [interaktyvus]. 2021. 26 (17), 1–16 p. [žiūrėta 2023-03-10]. Prieiga per: 10.3390/molecules26175377.
41. MOTTA, D.N. et al. The role of phenolic compounds in metabolism and their antioxidant potential. *Research, Society and Development* [interaktyvus]. 2022. 11 (10), 1–12 p. [žiūrėta 2023-03-10]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i10.31750%0AThe>.
42. GHASEMZADEH, A., GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plant Research* [interaktyvus]. 2011. 5 (31), 6697–6703 p. [žiūrėta 2023-03-11]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/266585165%0AFlavonoids>.
43. ULLAH, A. et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules* [interaktyvus]. 2020. 25 (5243), 1–39 p. [žiūrėta 2023-03-11]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR11.1404>
44. LOSADA-BARREIRO, S. et al. Biochemistry of Antioxidants: Mechanisms and Pharmaceutical Applications. *Biomedicines* [interaktyvus]. 2022. 10 (12), 3051 p. [žiūrėta 2023-03-11]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10123051>.
45. NIMSE, S.B., PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances* [interaktyvus]. 2015. 5 (35), 27986–28006 p. [žiūrėta 2023-03-11]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1039/c4ra13315c>.
46. ANSARI, M.F. et al. The Role of Antioxidants in Biological System. *International Journal of Research in Engineering and Science (IJRES)* [interaktyvus]. 2022. 10 (5), 48–51 p. [žiūrėta 2023-03-12]. Prieiga per: <https://www.ijres.org/papers/Volume-10/Issue-5/Ser-7/H10054851.pdf>.
47. AYOUB, Z. et al. MEDICINAL PLANTS AS NATURAL ANTIOXIDANTS: A REVIEW. *Journal of Botanical Society, University of Saugor*, [interaktyvus]. 2018. 48 (1), 100–7 p. [žiūrėta 2023-03-13]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/327573857_MEDICINAL_PLANTS_AS_NATURAL_ANTIOXIDANTS_A_REVIEW.
48. ŠKROVÁNKOVÁ, S. et al. Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2012. 75–139 p. ISBN 9780123945983.
49. OLENNIKOV, D.N., KASHCHENKO, N.I. New isorhamnetin glycosides and other phenolic compounds from calendula officinalis. *Chemistry of Natural Compounds* [interaktyvus]. 2013. 49 (5), 833–840 p. [žiūrėta 2023-03-13]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-013-0759-x>.
50. BALCIUNAITIENE, A. et al. Sustainable–Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Hyssopus officinalis and Calendula officinalis Extracts and Their Antioxidant and Antibacterial Activities. *Molecules* [interaktyvus]. 2022. 27 (22), 7700 p. [žiūrėta 2023-03-20]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27227700>.
51. ESMAIL, A. et al. Iraqi medicinal plants with antibacterial effect-A review. *Researchgate.Net* [interaktyvus]. 2019. 9 (8), 22–103 p. [žiūrėta 2023-03-21]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/profile/Ali-Al-Snafi/publication/335082748_Iraqi_Medicinal_Plants_with_Antibacterial_Effect-A_Review/links/5d4dae5092851cd046afd4dd/Iraqi-Medicinal-Plants-with-Antibacterial-Effect-A-Review.pdf.

52. GOOCH, J.W. Antimicrobial Agent. *Encyclopedic Dictionary of Polymers* [interaktyvus]. 2011. 8 (2), 43–43 p. [žiūrėta 2023-03-21]. Prieiga per: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-6247-8_699.
53. AL-SNAFI, A.E. Therapeutic Properties of Medicinal Plants: a Review of Their Antibacterial Activity (Part 1). *International Journal of Pharmacy & Therapeutics* [interaktyvus]. 2015. 6 (3), 137 p. [žiūrėta 2023-03-22]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/0976-0342>.
54. JAFARI, B., AHMADIZADEH, C. The in vitro study of antimicrobial effect of Marigold (*Calendula officinalis*) extract on infectious microorganisms. *Electronic Journal of Biology* [interaktyvus]. 2017. 13 (4), 348–352 p. [žiūrėta 2023-03-24]. Prieiga per: <https://ejbio.imedpub.com/the-in-vitro-study-of-antimicrobial-effect-of-marigoldcalendula-officinalis-extract-on-infectious-microorganisms.php?aid=21459>.
55. EKIERT, H. et al. *Artemisia dracunculus* (Tarragon): A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology* [interaktyvus]. 2021. 12 (1), 567 p. [žiūrėta 2023-04-01]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3389/FPHAR.2021.653993/BIBTEX>.
56. SHARIFI-RAD, M. et al. Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytotherapy Research* [interaktyvus]. 2018. 32 (9), 1653–1663 p. [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6101>.
57. SOLUTION, H. et al. Chemical Characterization and Antimicrobial Properties of the Hydroalcoholic Solution of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. and Propolis from Northern Italy. *Molecules* [interaktyvus]. 2023. 28 (3), 1380 p. [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28031380> %0A Free PMC article.
58. KAKAKHEL, M.A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles and their shortcomings, animal blood a potential source for silver nanoparticles: A review. *Journal of Hazardous Materials Advances* [interaktyvus]. 2021. 1 (June), 100005 p. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2021.100005>.
59. DAS, C.G.A. et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [interaktyvus]. 2020. 27 101593 p. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101593>.
60. RAFIQUE, M. et al. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* [interaktyvus]. 2017. 45 (7), 1272–1291 p. [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>.
61. KESHARI, A.K. et al. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* [interaktyvus]. 2020. 11 (1), 37–44 p. [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.11.003>.
62. MLADENOVA, B. et al. Plant mediated synthesis of silver nanoparticles using extracts from *Tilia cordata*, *Matricaria chamomilla*, *Calendula officinalis* and *Lavandula angustifolia* flowers. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* [interaktyvus]. 2018. 53 (4), 623–630 p. [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: https://journal.uctm.edu/node/j2018-4/1_18-37_p_623-630.pdf.
63. LAKSHMANAN, G. et al. Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles using fruit extract of *Cleome viscosa* L.: Assessment of their antibacterial and anticancer activity. *Karbala International Journal of Modern Science* [interaktyvus]. 2018. 4 (1), 61–68 p. [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2017.10.007>.
64. URNUKHSAIKHAN, E. et al. Antibacterial activity and characteristics of silver nanoparticles biosynthesized from *Carduus crispus*. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2021. 11 (1), 1–12 p. [žiūrėta 2023-04-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00520-2>.

65. AHMED, R.H., MUSTAFA, D.E. Green synthesis of silver nanoparticles mediated by traditionally used medicinal plants in Sudan. *International Nano Letters* [interaktyvus]. 2020. 10 (1), 1–14 p. [žiūrėta 2023-04-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s40089-019-00291-9>.
66. RAJORIYA, P. et al. Green Silver Nanoparticles: Recent Trends and Technological Developments. *Journal of Polymers and the Environment* [interaktyvus]. 2021. 29 (9), 2711–2737 p. [žiūrėta 2023-04-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02071-z>.
67. ALHARBI, N.S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* [interaktyvus]. 2022. 15 (3), 109–124 p. [žiūrėta 2023-04-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2022.06.012>.
68. SIDDIQI, K.S. et al. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology* [interaktyvus]. 2018. 16 (1), [žiūrėta 2023-04-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>.
69. ROY, A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles: Biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances* [interaktyvus]. 2019. 9 (5), 2673–2702 p. [žiūrėta 2023-04-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/c8ra08982e>.
70. FRANCI, G. et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* [interaktyvus]. 2015. 20 (5), 8856–8874 p. [žiūrėta 2023-04-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>.
71. YIN, I.X. et al. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *International Journal of Nanomedicine* [interaktyvus]. 2020. 15 (1), 2555–2562 p. [žiūrėta 2023-04-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>.
72. ANEES AHMAD, S. et al. Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review. *Materials Science for Energy Technologies* [interaktyvus]. 2020. 3 756–769 p. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.09.002>.
73. NORONHA, V.T. et al. Silver nanoparticles in dentistry. *Dental Materials* [interaktyvus]. 2017. 33 (10), 1110–1126 p. [žiūrėta 2023-04-05]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.002>.
74. GULZAR, B. et al. Plant tissue culture: Agriculture and industrial applications. *Transgenic Technology Based Value Addition in Plant Biotechnology INC*, 2020. 25–49 p. ISBN 9780128186329.
75. ESPINOSA-LEAL, C.A. et al. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* [interaktyvus]. 2018. 248 (1), 1–18 p. [žiūrėta 2023-04-05]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29736623/>.
76. KUMAR, N., REDDY, M.P. In vitro Plant Propagation: A Review. *Journal of Forest Science* [interaktyvus]. 2011. 27 (2), 61–72 p. [žiūrėta 2023-04-08]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/263638941_In_vitro_Plant_Propagation_A_Review#fullTextFileContent.
77. EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering* [interaktyvus]. 2019. 5 (1), 50–59 p. [žiūrėta 2023-04-12]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>.
78. IKEUCHI, M. et al. Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* [interaktyvus]. 2013. 25 (9), 3159–3173 p. [žiūrėta 2023-04-13]. Prieiga per: www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.113.116053.

79. VYLÍČILOVÁ, H. et al. Naturally occurring and artificial n9-cytokinin conjugates: From synthesis to biological activity and back. *Biomolecules* [interaktyvus]. 2020. 10 (6), [žiūrėta 2023-04-13]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/biom10060832>.
80. ARLOTA KAŅUKOVÁ, KLAUDIA LENKAVSKÁ, M.G. and J.K. Suspension Culture of Stem Cells Established from *Calendula officinalis* L. *Preprints* [interaktyvus]. 2023. 1 (April) [žiūrėta 2023-04-13]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.20944/preprints202304.0758.v1>
81. ÇETIN, B. et al. Antibacterial activities of *Calendula officinalis* callus extract. *International Journal of Secondary Metabolite* [interaktyvus]. 2017. 4 (1), 257–263 p. [žiūrėta 2023-04-13]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.21448/ijsm.372108>.
82. IBRAHIM, A.K. et al. Efficient callus induction, plant regeneration and estragole estimation in tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Journal of Essential Oil Research* [interaktyvus]. 2011. 23 (4), 16–20 p. [žiūrėta 2023-04-14]. . Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2011.9700463>.
83. TANUR ERKOYUNCU, M., YORGANCILAR, M. Optimization of callus cultures at *Echinacea purpurea* L. for the amount of caffeic acid derivatives. *Electronic Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. 2021. 51 (1), 17–27 p. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/J.EJBT.2021.02.003>.
84. COSKUN, Y., TASLIDERE, F. Influence of biotic and abiotic elicitors on artemisinin, quercetin, caffeic acid and essential oil production in *Artemisia dracunculus* L. *Flavour and Fragrance Journal* [interaktyvus]. 2022. 37 (5), 322–330 p. [žiūrėta 2023-04-16]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.3715>.
85. PARSONS, J.L. et al. Echinacea biotechnology: Advances, commercialization and future considerations. *Pharmaceutical Biology* [interaktyvus]. 2018. 56 (1), 485–494 p. [žiūrėta 2023-04-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1501583>.
86. ARYAL, S. et al. Total Phenolic content, Flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western Nepal. *Plants* [interaktyvus]. 2019. 8 (4), 96 p. [žiūrėta 2023-04-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants8040096>.
87. ALICI, E.H., ARABACI, G. Determination of SOD, POD, PPO and cat enzyme activities in *Rumex obtusifolius* L. *Annual Research and Review in Biology* [interaktyvus]. 2016. 11 (3), 1–7 p. [žiūrėta 2023-04-15]. Prieiga per: <https://journalarrb.com/index.php/ARRB/article/view/25917/48507>.
88. LEBRETON, S. et al. Appropriate Activity Assays Are Crucial for the Specific Determination of Proline Dehydrogenase and Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Activities. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2020. 11 (December), 1–9 p. [žiūrėta 2023-04-17] Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.602939>
89. KUMAR, P. Measurement of Ascorbate Peroxidase Activity in Sorghum. *Bio-Protocol* [interaktyvus]. 2022. 12 (20), 1–7 p. [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.4531>.
90. FAUZIAH, P.N. et al. Optimized steps in determination of malondialdehyde (MDA) standards on diagnostic of lipid peroxidation. *Padjadjaran Journal of Dentistry* [interaktyvus]. 2018. 30 (2), 136 p. [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.24198/pjd.vol30no2.18329>.
91. MALINAUSKAITĖ, R. Šarminio jonizuoto vandens įtaka paprastojai lęšio Smėlinukai morfofiziologiniams rodikliams. Žmogaus ir gamtos sauga. ASU, 2015, 1822–1824 p. ISSN 1822-1823.
92. INÁCIO, M.R.C. et al. Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea*

- Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2013. 136 (3–4), 1160–1164 p. [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.046>.
93. CHAMANSARA, R. et al. Comparison of Commercial *Calendula officinalis* L. Samples with Pharmacopeial Drug: Antiradical Activities and Chemical Profiles. *Journal of Research in Pharmacy* [interaktyvus]. 2022. 26 (4), 809–819 p. [žiūrėta 2023-04-20]. Prieiga per: https://jrespharm.com/uploads/pdf/pdf_MPJ_1065.pdf.
94. MANUSCRIPT, A. Methods for Determination of Proline in Plants. *Researchgate* [interaktyvus]. 2010. 639 (March), 1–14 p. [žiūrėta 2023-04-21]. Prieiga per: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-702-0>.
95. LI, G. et al. Spectrophotometric determination of flavonoids content in leaves of *fagopyrum cymosum* complex. *Asian Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2013. 25 (13), 7575–7578 p. [žiūrėta 2023-04-23]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.14233/ajchem.2013.15265>.
96. NALEWAJKO-SIELIWONIUK, E. et al. Comparative analysis of phenolic compounds in four taxa of *Erigeron acris* s. l. (Asteraceae). *Biologia* [interaktyvus]. 2019. 74 (12), 1569–1577 p. [žiūrėta 2023-04-25]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.2478/s11756-019-00332-w>.
97. BRADFORD, M. m. Protein Extraction & Protein estimation by Bradford method. *Analytical Biochemistry* [interaktyvus]. 1976. 72 248–254 p. [žiūrėta 2023-04-26] Prieiga per: http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf.
98. BALOUIRI, M. et al. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [interaktyvus]. 2016. 6 (2), 71–79 p. [žiūrėta 2023-04-26]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
99. MOHAMMADI, M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Zingiber officinale* and *Thymus vulgaris* extracts : characterisation , cell cytotoxicity , and its antifungal activity against *Candida albicans* in comparison to fluconazole. *IET Nanobiotechnology Research* [interaktyvus]. 2019. 13 (2), 114–119 p. [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5146>.
100. NITHYA, P., MADHAVI, C. Antioxidant activity of 3-arylidene-4-piperidones in the 1 , 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging assay. *Integrative Medicine Research* [interaktyvus]. 2018. 11 (1), 40–45 p. [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.007>.
101. KATANIĆ, J. et al. Original article : ACTIVITIES OF DIFFERENT FRACTIONS OF *GENTIANA ASCLEPIADEA* L . ROOTS EXTRACT. *EXCLI Journal* [interaktyvus]. 2013. 12 (1), 807–823 p. [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4662184/>.
102. WOJTUNIK-KULESZA, K.A. Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes. *Molecules* [interaktyvus]. 2020. 25 (22), 1–11 p. [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/MOLECULES25225267>.
103. YOUNUS, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International Journal of Health Sciences* [interaktyvus]. 2018. 12 (3), 88 p. [žiūrėta 2023-04-22]. Prieiga per: <http://pmc/articles/PMC5969776/>.
104. ZHANG, L., BECKER, D.F. Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2015. 6 (1), 1–8 p. [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00552>.

105. NANDI, A. et al. Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [interaktyvus]. 2019. [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1155/2019/9613090>.
106. AKBARI, B. et al. Modeling and optimization of malondialdehyde (MDA) absorbance behavior through response surface methodology (RSM) and artificial intelligence network (AIN): An endeavor to estimate lipid peroxidation by determination of MDA. *Journal of Chemometrics* [interaktyvus]. 2023. 37 (1), 1–23 p. [žiūrėta 2023-04-29]. Prieiga per: <http://doi.org/10.1002/cem.3468>.
107. PÉREZ-GÁLVEZ, A. et al. Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2020. 9 (6), 1–39 p. [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9060505>.
108. TANAKA, R., TANAKA, A. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* [interaktyvus]. 2011. 1807 (8), 968–976 p. [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.01.002>.
109. MANNINO, G. et al. Anthocyanins: Biosynthesis, distribution, ecological role, and use of biostimulants to increase their content in plant foods—a review. *Agriculture (Switzerland)* [interaktyvus]. 2021. 11 (3), 1–25 p. [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture11030212>.
110. BLAINSKI, A. et al. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L. *Molecules* [interaktyvus]. 2013. 18 (6), 6852–6865 p. [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18066852>.
111. HOSSEINIFARD, M. et al. Contribution of Exogenous Proline to Abiotic Stresses Tolerance in Plants: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2022. 23 (9), 5186 p. [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23095186>.
112. STAUDACHER, V. et al. Redox-sensitive GFP fusions for monitoring the catalytic mechanism and inactivation of peroxiredoxins in living cells. *Redox Biology* [interaktyvus]. 2018. 14 (July 2017), 549–556 p. [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.017>.
113. KHSHAN, K.T., ALKAFAJE, H.A. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Calendula officinalis (L.) Extract and Evaluating their Antioxidant Activity. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [interaktyvus]. 2021. 735 (1), [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/735/1/012073>
114. BAHARARA, J. et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles using Achillea biebersteinii Flower Extract and Its Anti-Angiogenic Properties in the Rat Aortic Ring Model. *Molecules* [interaktyvus]. 2014. 19 (1), 4624–4634 p. [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules1904462>
115. OMIDI, S. et al. Biosynthesis of silver nanocomposite with Tarragon leaf extract and assessment of antibacterial activity. *Journal of Nanostructure in Chemistry* [interaktyvus]. 2018. 8 (2), 171–178 p. [žiūrėta 2023-04-30]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s40097-018-0263-8>.
116. GECER, E.N. et al. Green synthesis of silver nanoparticles from Echinacea purpurea (L.) Moench with antioxidant profile. *Particulate Science and Technology* [interaktyvus]. 2022. 40 (1), 50–57 p. [žiūrėta 2023-05-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/02726351.2021.1904309>.
117. BEDLOVICOVÁ, Z. et al. A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles. *Molecules* [interaktyvus]. 2020. 25 (14), 1–24 p. [žiūrėta 2023-05-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules25143191>