

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
TULŪZOS UNIVERSITETAS

LINA ABROMAITIENĖ

**RETIEJI MIŠKO IR PAJŪRIO GRYBAI:
ANTIOKSIDACINIŲ IR BIOLOGINIŲ SAVYBIŲ ĮVERTINIMAS**

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, chemija (03P)

2016, Kaunas

Dvigubo laipsnio disertacija parengta 2010–2016 metais Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, Maisto mokslo ir technologijos katedroje, ir Prancūzijoje, - Nacionaliniame Tulūzos politechnikos institute, Chemijos inžinerijos ir technologijų padalinyje. Papildomi tyrimai atlikti Latvijos Žemės ūkio universitete, Maisto technologijos fakulteto, Maisto technologijos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba bei Midi-Pyrénées (Pietų Pirėnų) regiono mokslo taryba ir Tulūzos politechnikos instituto tarptautinė mainų programa.

Moksliniai vadovai:

Prof. dr. Petras Rimantas VENSKUTONIS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Dr. Thierry TALOU (Nacionalinis Tulūzos politechnikos institutas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Redagavo: Aurelija Gražina Rukšaitė (Leidykla „Technologija“).

Chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

Prof. habil. dr. Algirdas ŠAČKUS (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P) – **pirmininkas**;

Prof. dr. Daiva LESKAUSKAITĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – 05T);

Prof. Nicolas FABRE (Paul Sabatier universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P);

Dr. Herve HOSTE (Prancūzijos žemės ūkio nacionalinis mokslinių tyrimų institutas, biomedicinos mokslai – 05B);

Dr. Audrius PUKALSKAS ((Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Disertacija bus ginama viešame (mokslo krypties pavadinimas) mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 201x m. (mėnesis) (diena) d. (valanda) val. Kauno technologijos universiteto (salės pavadinimas) salėje.

Adresas: K. Donelaičio g. 73-(salės numeris), 44249 Kaunas, Lietuva.

Tel. (370) 37 300 042; faks. (370) 37 324 144; el. paštas doktorantura@ktu.lt.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2016 m. spalio 7 d.

Su disertacija galima susipažinti internetinėje svetainėje <http://ktu.edu> ir Kauno technologijos universiteto bibliotekoje (K. Donelaičio g. 20, 44239 Kaunas).

KAUNAS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
UNIVERSITY OF TOULOUSE

LINA ABROMAITIENĖ

**RARE FOREST AND COSTAL-DUNE MUSHROOM:
EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND BIOLOGICAL
PROPERTIES**

Summary of Doctoral Dissertation
Physical Sciences, Chemistry (03P)

2016, Kaunas

This joint doctoral research was carried out at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Department of Food Science and Technology and in France at the Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques de Toulouse. Part of the research was performed in Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology, Department of Food Technology. This study was supported by the Research Council of Lithuania, by Midi-Pyrénées Regional Council and the SMI (International mobility support) program of INP Toulouse.

Scientific supervisor:

Prof. Dr Petras Rimantas VENSKUTONIS (Kaunas University of Technology, Physical Sciences, Chemistry - 03P).

Co Supervisor:

Dr Thierry TALOU (University of Toulouse, Physical Sciences, Chemistry - 03P).

Editor: UAB “Synergium”

Dissertation Defence Board of Chemistry Science Field:

Prof. habil. dr. Algirdas ŠAČKUS (Kaunas University of Technology, Physical Sciences, Chemistry - 03P) – **chairman**;

Prof. dr. Daiva LESKAUSKAITĖ (Kaunas University of Technology, Technological Science, Chemical Engineering – 05T);

Prof. Nicolas FABRE (Paul Sabatier University, Physical Sciences, Chemistry - 03P);

Dr. Herve HOSTE (French National Institute for Agricultural Research, Biomedicine Science, – 05B);

Dr. Audrius PUKALSKAS (Kaunas University of Technology, Physical Sciences, Chemistry - 03P).

The official defence of the dissertation will be held at (valanda) a.m. on (diena) (mėnesis), 201x at the public meeting of Dissertation Defence Board of (mokslo krypties pavadinimas) Science Field in (salės pavadinimas) Hall at Kaunas University of Technology.

Address: K. Donelaičio St. 73-(salės numeris), 44249 Kaunas, Lithuania.
Tel. no. (+370) 37 300 042; fax. (+370) 37 324 144; e-mail doktorantura@ktu.lt.

Summary of doctoral dissertation was sent on (diena) (mėnesis), 201x.
The doctoral dissertation is available on the internet <http://ktu.edu> and at the library of Kaunas University of Technology (K. Donelaičio St. 20, 44239 Kaunas, Lithuania).

IVADAS

Grybai dėl savo metabolinio savitumo, ekologinės įvairovės, reikšmingo vaidmens gamtoje ir sudėtingo gyvybės ciklo traukia mokslininkų mikologų, chemikų, biologų, farmacininkų dėmesį įvairiais aspektais (Tkacz, 2004). Šiuo metu grybų vartojimas didėja, ir jie išlieka komerciniu požiūriu svarbia žaliava delikatesinių maisto produktų gamintojams (Nowacka et al., 2014). Kartu mokslas vis labiau koncentruojasi į visuomenės vystymąsi, įskaitant kovą su skurdu ir tvarų gamtinių išteklių naudojimą. Siekiant šių tikslų pasiektas realus progresas plėtojant grybų panaudojimą įvairiose srityse, ir ši plėtra tęsiasi toliau (Boa, 2004).

Pastaraisiais metais atliekant tyrimus su makrogrybais pavyko išskirti daug naujų antrinių metabolitų, pasižyminčių įvairiomis cheminėmis struktūromis ir įdomiomis biologinio aktyvumo savybėmis. Šios savitos molekulės yra ypač perspektyvus šaltinis sintetinti naujoms medžiagoms, kurios gali pagerinti biologines organizmo funkcijas ar sudaryti sąlygas medicinos atradimams, pavyzdžiui kaip imunomoduliuojančiu bioaktyvumu, vėžį veikiančiomis savybėmis pasižyminčios cheminės prevencinės medžiagos ir kt. Tačiau, norint pasiekti teigiamų rezultatų, reikia išspręsti daug klausimų, susijusių su veikliųjų molekulių išskyrimu iš grybų, jų identifikacija, biosintetiniu metabolizmu ir atrankos modeliais. Mokslininkai nuolat atlieka tyrimus, kurių metu bandoma iš grybų išskirti naujas veikliąsias medžiagas, tačiau šiuo metu komerciškai prieinami produktai vis dar yra labai riboti ir daugiausia gaunami apdorojant grybų žaliavą, o tai yra daug laiko ir darbo sąnaudų reikalaujantis procesas (Zhong and Xiao, 2009). Kuriant strategijas, kaip naujus antrinius metabolitus paversti pramonei naudingais natūraliais produktais, laukinės, neištirtos grybų rūšys dėl didelio paplitimo galėtų būti perspektyvus šaltinis. Be to, žinomų rūšių ir iki galo išanalizuotų grybų santykis yra labai mažas. Platus ir įvairiapusis makroskopinių grybų, biologiškai veiklių metabolitų panaudojamas etnomedicinoje, ekologinis poreikis, skatinantis grybus gaminti antrinius metabolitus, ir padidėjusios genetinės, farmakologinės bei cheminės analizės galimybės įrodė, kad grybai gali būti sėkmingai naudojami kaip natūrali vertinga žaliava (Lindequist, Niedermeyer and Julich, 2005). Ypač didelė biologiškai veikliųjų metabolitų įvairove pasižymintys makrogrybai gali būti sėkmingai panaudojami medicinoje, maisto, terapinėje ar fitochemijos pramonėje ir palengvinti naujus aukštesniųjų grybų tyrimus, siekiant išskirti juose esančias biologiškai veiklias medžiagas.

Remiantis vietinių mikologų patirtimi, Prancūzijos Pietų Pirėnų regione augantys mažiau žinomi grybai gali būti identifikuojami kaip perspektyvus biologiškai veiklių medžiagų šaltinis. Deja, iki šiol nėra pakankamai mokslinės informacijos apie kai kurių laukinių grybų rūšių išskirtus gamtinius antrinius metabolitus ir jų antioksidacines, antimikrobines bei kitas maisto produktų

apsaugines ir (arba) sveikatą gerinančias savybes. Dėl to galima iškelti hipotezę, kad laukinėse grybų rūšyse gali būti vertingų natūralių biologiškai veiklių molekulių, pasižyminčių daugeliu savybių, kurias galima pritaikyti įvairiose maisto pramonės ir medicinos srityse, pvz., kaip funkcinių maisto produktų ir nutraceutikų ingredientus. Norint šią hipotezę patvirtinti, būtina identifikuoti perspektyvias gamtines biologiškai veiklias molekules ir jas efektyviai ištirti. Tai galima padaryti optimizuojant biochemines aptikimo metodikas, siekiant pagerinti naujai atrandamų išteklių saugumą ir aktyvių molekulių biologinį prieinamumą.

Darbo tikslas

Darbo tikslas yra ištirti pasirinktų retųjų grybų rūšių antioksidacines, antimikrobines ir bioaktyvumo savybes, kad būtų galima juos panaudoti gaminant aukštos kokybės maisto produktus ir funkcinius ingredientus.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti džiovintos grybų medžiagos ekstrakciją, panaudojant didėjančio poliškumo tirpiklius, ir nustatyti ekstraktų išėigas.
2. Įvertinti grybų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, atliekant *in vitro* bandymus.
3. Įvertinti grybų ekstraktų antimikrobinį aktyvumą, panaudojant patogeninius mikroorganizmus.
4. Įvertinti atrinktų laukinių grybų rūšių citotoksiškumo savybes.
5. Išskirti ir išgryninti antrinius metabolitus iš pasirinktų grybų rūšių, panaudojant chromatografijos metodus.
6. Nustatyti išskirtų antrinių metabolitų struktūras ESI-MS, MS/MS, ¹H BMR, ¹³C BMR, HMBC, COSY ir HMQC spektroskopijos metodais.
7. Įvertinti iš atrinktų grybų rūšių išskirtų antrinių metabolitų antioksidacinį ir citotoksinį aktyvumą.
8. *In vitro* bandymais ištirti pasirinktų grybų, rinktų skirtingais derliaus nuėmimo periodais, ekstraktų ir iš jų išskirtų junginių slopinamąjį poveikį virškinamojo trakto nematodams.

Mokslinis naujumas

Parengtos daktaro disertacijos mokslinis naujumas pagrįstas šiais argumentais:

- Pirmą kartą atlikti sistemingi ir išsamūs atrinktų Pietų Pirėnų grybų rūšių ekstraktų antioksidacinį, antimikrobinį ir citotoksinį savybių tyrimai;
- Pirmą kartą iš tirtų grybų rūšių išskirti ir identifikuoti tiksliniai, niekur neaprašyti biologiškai veiklūs organiniai junginiai.

- Pirmą kartą įvertintas identifikuotų junginių slopinamasis poveikis virškinamojo trakto nematodams, jų antioksidacinis ir citotoksinis aktyvumas;
- Atrinktų grybų rūšių ekstraktai pirmą kartą aprašyti kaip antihelmininės medžiagos.

Praktinė reikšmė

Atlikti išsamūs ir sistemingi Pietų Pirėnų grybų rūšių antioksidacinių ir antimikrobinių savybių tyrimai yra svarbūs, norint šiuos grybus panaudoti praktiškai, kaip natūralius funkcinis ingredientus maisto produktams praturtinti ar kitais tikslais.

Identifikavus hispidino, hispolono ir inonotinės rūgšties metilesterio junginius ir įvertinus jų citotoksinį bei antioksidacinį aktyvumą, gauta informacija gali būti panaudojama medicinos, terapinės fitochemijos srityse ar kuriant naujas prototipines maisto struktūras.

Atliktų *in vitro* bandymų rezultatai patvirtino atrinktų grybų rūšių ir iš jų išskirtų junginių biologinį aktyvumą ir gebą slopinti virškinamojo trakto nematodus. Grybų ekstraktai gali tapti viena iš veiksmingų natūralių antihelminčių preparatų alternatyvų gyvulininkystėje atrajojantiems gyvūnams, kadangi nuolatinis sintetinių preparatų naudojimas skatina nematodų atsparumą bei sintetinių medžiagų tikimybę akumuliuoti gyvūno mėsoje ar piene.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

1. Atrinktose laukinių grybų rūšyse yra vertingų biologiškai veiklių sudėtinų junginių, tokių kaip antioksidacinės, antimikrobinės ir citotoksinės medžiagos, o tinkamas tirpiklių parinkimas leidžia išgauti frakcijas su didžiausiu biologiškai veiklių junginių kiekiu.
2. Atrinktos grybų rūšys *P. schweinitzii* ir *I. hispidus* pasižymi potencialiu *in vitro* poveikiu virškinamojo trakto nematodams; tačiau, atsižvelgiant į grybų derliaus rinkimo laikotarpį, juose esančių veiklių sudėtinų medžiagų kiekis gali kisti ir daryti įtaką antihelminčiam aktyvumui.

Darbo pripažinimas

Darbo rezultatai paskelbti 2 publikacijose: žurnale „IJMM-Indian Journal of Medical Microbiology“ (priimtas publikuoti) ir „LWT-Food Science and Technology“, esančiuose Thomson Reuters Web of Knowledge bazėje cituojamų leidinių sąrašė. Darbo rezultatai pristatyti 8 tarptautinėse konferencijose.

Disertacijos struktūra ir turinys

Daktaro disertacija yra parengta anglų kalba ir sudaryta iš šių skyrių: padėkos, santrumpų sąrašas, įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir aptarimas, išvados, literatūros šaltinių sąrašas, priedai, tezės, rezultatams aktualių publikacijų sąrašas. Disertacijos apimtis 138 puslapiai, 9 lentelės ir 41 paveikslas. Literatūros sąrašą sudaro 244 bibliografinės nuorodos.

2. MEDŽIAGOS IR METODIKA

2.1. TYRIMO OBJEKTAI

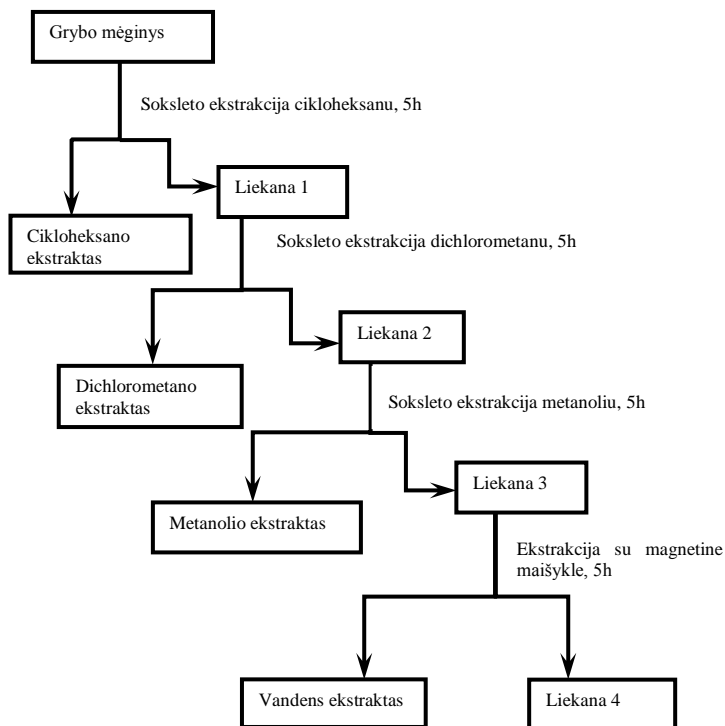
2011 m. rudenį Prancūzijos pietvakarių regione buvo surinktos dvidešimt keturios pakrantės kopų grybų rūšys. 2009 m. rudenį Prancūzijos Pietų Pirėnų regione buvo surinktos šešios miško grybų rūšys (*Phaeolus schweinitzii*, *Inonotus hispidus*, *Tricholoma columbetta*, *Tricholoma caligatum*, *Xerocomus chrysenteron*, *Hydnellum ferrugineum*). Papildomai grybų rūšis *Phaeolus schweinitzii* buvo rinkta 2011 ir 2012 metais. Taksonominė identifikacija atlikta Bordo-Akvitanijos INRA tyrimų centro padalinyje „Mikologija ir maisto sauga“ ir Tulūzos universiteto farmacijos fakulteto mikologijos draugijoje. Visi šalta išdžiovinti (liofilizacija) grybai analizei atlikti buvo laikomi popieriniuose maišeliuose, desikatoriuje kambario temperatūroje (<30 °C).

2.2. TYRIMO METODIKA

Grybai buvo frakcionuojami naudojant didėjančio poliškumo tirpiklius (HPLC grynumo): cikloheksaną, dichlormetaną, metanolį ir dejonizuotą vandenį. Nuoseklia Soksleto ekstrakcija iš grybų frakcionuojami tirpūs junginiai po kiekvieno tirpiklio buvo išdžiovinti rotaciniu garintuvu, o likučiai ekstrahuoti verdančiu vandeniu (*l pav.*).

Sistemiškai įvertintas atrinktų grybų rūšių antioksidacinis, antimikrobinis ir biologinis veiklumas. Grybų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo išsamiai įvertintas naudojant *in vitro* sistemas. Radikalų sujungimo geba taikant 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH[•]) radikalo ir 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS^{•+}) katijono radikalo blukinimo metodus. Taip pat nustatyta geležies jonų (Fe³⁺) redukavimo geba FRAP metodu bei deguonies radikalo sujungimo geba (ORAC). Bendrasis fenolinių junginių kiekis (BFJK) nustatytas Folin-Ciocalteu's metodu ir išreikštas mg galo rūgšties ekvivalentų (GRE)/g sauso ekstrakto. Ekstraktų antioksidaciniai rodikliai buvo susumuoti naudojant sumines reikšmes – ekstrakto „antioksidacinį balą“ (EAB), kuris yra lygus tuo pačiu tirpikliu visuose bandymuose gautos frakcijos reikšmių sumai. EAB išreiškiamas vadinamaisiais „palyginamaisiais suminiais vienetais“ 1 g sausos ekstrakto masės (psv/g esm). Siekiant įvertinti suminį EAB ir ekstrakto išėigos (EI) efektą, buvo įvestas „grybų antioksidacinis balas“ (GAB), kuris

išreiškiamas 1 g sauso grybo masės (psv/g gsm). O grybų ekstraktų antimikrobinis aktyvumas buvo įvertintas su gramteigiamomis (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) ir gramneigiamomis (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) bakterijomis disko difuzijos ir bioautografijos metodais. Biologinis veiklumas tirtas naudojant *Leishmania infantum* parazito amastigotus.



1 pav. Grybų ekstrakcijos schema

Įvertinus laukinių grybų frakcijų antioksidacinę, antimikrobinę ir biologinę aktyvumą *in vitro* metodais, kaip tyrimo objektas pasirinktas *P. schweinitzii*, kurio metanolinis ekstraktas pasižymėjo reikšmingu aktyvumu, palyginti su tirtų grybų rūšių ekstraktais. *P. schweinitzii* antriniai metabolitai išskirti naudojant chromatografijos metodus ir ištirti spektroskopijos metodais (masių spektroskopija (MS), tandemine masių spektroskopija (MS/MS), branduolio magnetinio rezonanso spektroskopija (BMR), protonų branduolio magnetinio rezonanso spektroskopija (^1H BMR), heterobranduoline koreliuota spektroskopija (HMBC, COSY, HMQC).

Išskirtų junginių antioksidacinis aktyvumas nustatytas ABTS⁺, DPPH[•], FRAP, ORAC metodais. Biologinis junginių genotoksiškumas įvertintas *in vitro* metodais su žmogaus limfocitais mikrobranduolyje ir sukeltant chromosomų nuokrypius nuo normos limfocituose, taip pat atlikti pirminio DNR pažeidimo ir bakterijos ląstelės mutacijos tyrimai. Iširtas antiparazitinis antrinių metabolitų aktyvumas naudojant *L. infantum* promastigotus.

Grybų, kurie buvo rinktos skirtingais metų laikotarpiais, rūšių ir iš jų išskirtų junginių antihelmintinis aktyvumas nustatytas naudojant virškinamojo trakto nematodus *H. contorus* ir *T. culumbiformis*.

Ekspirimentai buvo kartoti mažiausiai 3 kartus, vidutinės vertės ir jų standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti MS Excel 2003 programa. Tiriant antimikrobines savybes, citotoksiškumą ir biologinį ekstraktų aktyvumą, įvertinta ir paties tirpiklio, kuriuo buvo vykdoma ekstrakcija, įtaka.

3. REZULTATAI IR APTARIMAS

3.1. LAUKINIŲ GRYBŲ EKSTRAKTŲ IŠEIGA IR ANTIOKSIDACINĖS SAVYBĖS

Šios tyrimų dalies tikslas buvo nustatyti grybų rūšių ekstraktų išėigą ir antioksidacinį aktyvumą *in vitro* metodais. Siekiant tarpusavyje palyginti gautas vertes, ABTS⁺, DPPH[•], FRAP ir ORAC bandymų rezultatai išreikšti trolokso (vandenyje tirpstantis vitamino E analogas) ekvivalentais, t. y. trolokso kiekis μM, turintis panašų antioksidacinį pajėgumą, kaip 1 gramas esm. Antioksidacinis aktyvumas buvo apibendrintas naudojant ekstraktų (EAB) ir sauso grybo (GAB) „antioksidacinius balus“ ir išreikštas vadinamaisiais „palyginamaisiais suminiais vienetais“ (PSV). Buvo vertinama įvairių grybų rūšių išėiga ir antioksidacinis potencialas, taip pat skirtingų tirpiklių ir taikytų antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodų įtaka.

3.1.1. Skirtingais tirpikliais ekstrahuotų grybų ekstraktų išėiga

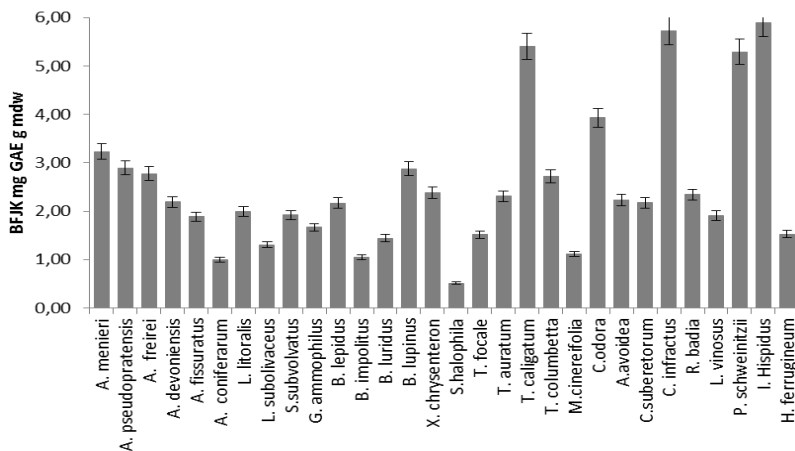
Laukiniuose grybuose esančių biologiškai veiklių junginių koncentracija stipriai skyrėsi poliniuose ir nepoliniuose tirpikliuose. Nepoliniame cikloheksane tirpios frakcijos išėiga, priklausomai nuo grybų rūšies, kito nuo 0,61 proc. (*S. halophila*) iki 5,14 proc. (*R. badia*), aprotoninio tirpiklio dichlorometano atveju išėiga kito nuo 0,52 proc. (*G. ammophilus*) iki 3,42 proc. (*T. caligatum*), protoninio metanolio – nuo 6,77 proc. (*S. halophila*) iki 41,29 proc. (*A. pseudoprattensis*). O verdančiu vandeniu iš 6 miško grybų rūšių buvo papildomai išekstrahuota nuo 2,94 proc. (*H. ferrugineum*) iki 25,29 proc. (*T. columbetta*) vandenyje tirpių junginių. Didžiausia bendra išėiga iš visų frakcijų, ekstrahuojant

visų tipų tirpikliais, buvo gauta iš *T. caligatum* (63,15 proc.), o mažiausia – iš *S. halophila* (8,54 proc.).

Palyginus gautų ekstraktų išėigas tarp ekstrahentų nustatyta, kad daugiausia tirpių junginių buvo išekstrahuota panaudojus aukšta dielektrine skvarba pasižyminčius protoninius tirpiklius, šiuo atveju – metanolį ir vandenį. Iš to galima spręsti, kad tirtuose grybuose buvo aptinkama mažai junginių, turinčių lipofilines funkcines grupes. Skirtingais tirpikliais gautos išėigos yra labai svarbi charakteristika taikant biorektifikacijos koncepciją biomedžiagoms tirti ir norint jas konvertuoti į frakcijas be atliekų.

3.1.2. Skirtingų laukinių grybų rūšių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo palyginimas

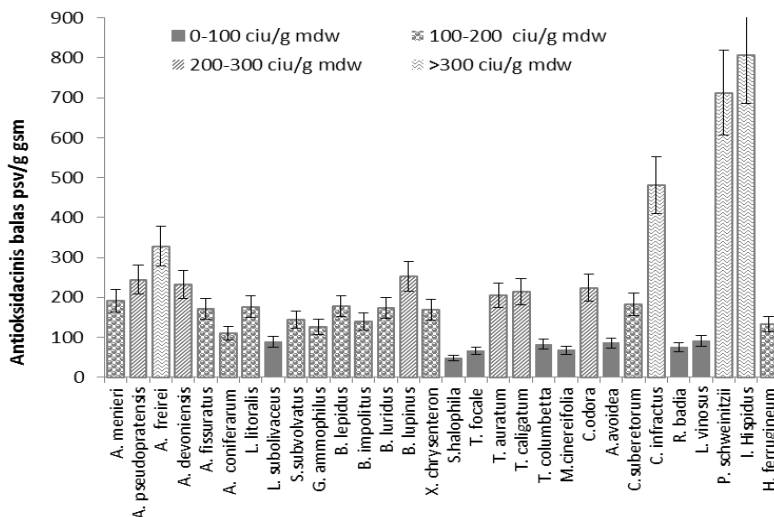
Didžiausiu antioksidaciniu potencialu pasižymėjo *I. hispidus* ir *P. schweinitzii* ekstraktai, ypač radikalo sujungimo bandymuose, o ekstraktai, išskirti iš *L. vinosus* ir *T. columbetta*, buvo silpno antiradikalinio aktyvumo šių bandymų metu. Pavyzdžiui, *I. hispidus* (3108,9 $\mu\text{M TE/g}$) ekstrakto aktyvumas naudojant ABTS^{•+} katijonų radikalo blukimo metodą buvo daugiau nei 100 kartų didesnis, palyginti su *L. vinosus* (29,3 $\mu\text{M TE/g}$). Šie skirtumai buvo mažiau pastebimi naudojant DPPH[•] radikalo ar geležies jonų (Fe^{3+}) redukavimo gebos FRAP metodus, o ORAC reikšmės kito nuo 36,0 (*S. halophila*) iki 461,9 $\mu\text{M TE/g}$ (*I. hispidus*).



2 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) grybuose

Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) kito nuo 15,17 (*A. devoniensis*) iki 84,47 mg GRE/g (*I. hispidus*). Tačiau gautų ekstraktų išėigos priklausė tiek nuo grybų rūšies, tiek nuo ekstrakcijos metu naudoto tirpiklio, todėl ekstraktų

BFJK reikšmės buvo perskaiciuotos 1 g grybo sausos masės (gsm), atsižvelgiant, kiek BFJK ekstrahuota kiekvienu tirpikliu. Šiuo būdu išreikštos BFJK reikšmės yra pavaizduotos 2 pav.: jos kito nuo 0,51 mg GRE/g gsm (*S. halophila*) iki 5,90 mg GRE/g gsm (*I. hispidus*). Daugeliu atvejų BFJK reikšmės sutapo su kitų tyrimų metu nustatytais antioksidacinio aktyvumo reikšmėmis.



3 pav. Grybų rūšių antioksidaciniai balai, gauti sumuojant antioksidacinio aktyvumo reikšmes

Atlikus visus naudotų antioksidacinių metodų palyginimą, laukinių grybų sauso grybo antioksidaciniai balai (GAB) buvo išreikšti palyginamaisiais suminiais vienetais (psv/g gsm) ir pavaizduoti 3 pav. Kelios rūšys (*I. hispidus*, *P. schweinitzii*, *C. infractus*) pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu potencialu, palyginti su didžiąja tirtų grybų dalimi; jų suminiai antioksidaciniai balai kito intervalu 481–808 psv/g gsm. O *Agaricaceae* (109–325 psv/g gsm) ir *Boletaceae* (140–253 ciu/g gsm) šeimų rūšys pasižymėjo didesniu antioksidacinių aktyvumu nei *Tricholomataceae* (47–206 psv/g gsm) ir likusios tirtos šeimos.

3.1.4. Metodo įtaka antioksidacinio aktyvumo nustatymams

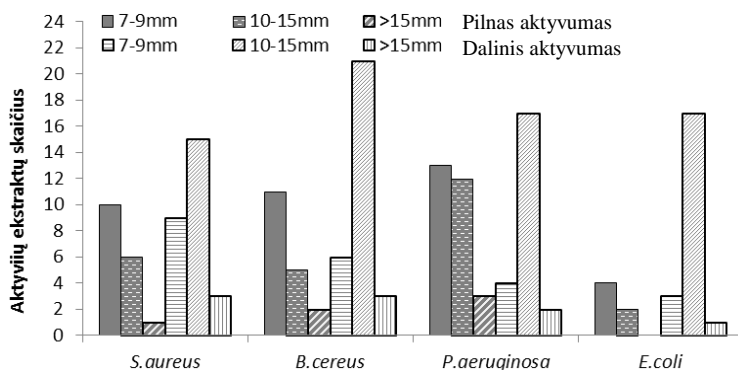
Skirtingais analizės metodais įvertinas antioksidacinis aktyvumas kito plačiu intervalu ir priklausė nuo grybo rūšies bei ekstrakto. Didžiausiu Fe^{3+} geležies jonų redukciniu aktyvumu pasižymėjo ekstraktai, kurių bendra frakcijų suma buvo nuo 128 (*M. cinereifolia*) iki 4248 μM TE/g (*I. hispidus*). $ABTS^{+}$ sujungimo geba svyravo nuo 29,3 (*L. vinosus*) iki 3109 μM TE/g (*I. hispidus*);

DPPH[•] radikalo sujungimas kito nuo 44,4 (*T. columbetta*) iki 2768 μM TE/g (*I. hispidus*), o mažiausios reikšmės buvo išmatuotos ORAC sujungimo geba – nuo 35,98 (*S. halophila*) iki 462 M TE/g (*P. schweinitzii*). Stipri koreliacija buvo tarp ABTS^{•+} ir FRAP ($R^2 = 0,9095$), taip pat DPPH[•] ir ABTS^{•+} ($R^2 = 0,9498$) metodų; Bendras fenolinių junginių kiekis ekstraktuose pasižymėjo stipria koreliacija su DPPH[•] ($R^2 = 0,9043$), FRAP ($R^2 = 0,9230$) ir ABTS^{•+} ($R^2 = 0,8842$) metodais, o tai patvirtina, kad fenolinių junginių kiekis daro įtaką frakcijų antioksidaciniam aktyvumui. Tačiau pastebėta, kad koreliacija tarp TPC ir ORAC buvo silpna ($R^2 = 0,44$).

3.2. LAUKINIŲ GRYBŲ RŪŠIŲ ANTIBAKTERINĖS IR BIOLOGINĖS SAVYBĖS

3.2.1. Grybų ekstraktų antibakterinės savybės

Laukiniuose grybuose esantys antriniai metabolitai, pasižymintys antioksidaciniu aktyvumu, taip pat gali skirtingai veikti mikroorganizmus. Šios dalies tyrimų tikslas buvo įvertinti grybų ekstraktų antimikrobinį poveikį gramteigiamoms ir gramneigiamoms bakterijoms. Tiriant 80 grybų ekstraktų didžiausiu antimikrobinio aktyvumu pasižymėjo *B. impolitus*, *B. luridus*, *G. ammophilus*, *S. halophila*, *T. caligatum*, *C. Infractus* (75–95 proc.), o *B. lepidus*, *B. lupinus*, *T. focale*, *T. auratum*, *C. odora*, *A. avoidea*, *R. badia*, *L. vinosus*, *C. suberretorum*, *M. cinereifolia* ir *Agacicaceae* šeimos rūšių aktyvumas buvo 30–50 proc.; devynių grybų rūšių ekstraktai buvo neaktyvūs.



5 pav. Ekstraktų, aktyviai veikiančių tirtus mikroorganizmus, kiekio pasiskirstymas pagal sterilumo zonas

Pastebėtos didžiausios mikroorganizmų *P. aeruginosa* ir *B. cereus* slopinimo ribos disko difuzijos metodu, kurios buvo daugiau nei 15 mm skersmens, metanolio *P. schweinitzii* ir *I. hispidus* ekstraktuose. Taip pat stipriai

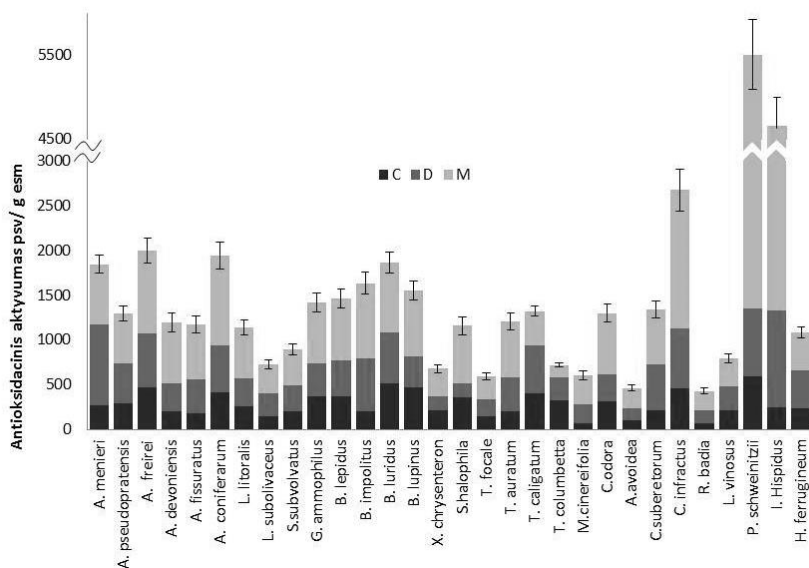
inhibiciniu poveikiu (>15 mm) pasižymėjo ir *C. infractus* metanolio ekstraktas su dalinio aktyvumo poveikiu *P. aeruginosa*. Antimikrobinio aktyvumo skirtumų tarp įvairių rūšių gali atsirasti dėl skirtingų antrinių metabolitų ir jų kiekio grybuose, taip pat skirtingai paveikti, pvz., pasižymėti stipriu aktyvumu, slopinti visas mikroorganizmų kolonijas arba turėti dalinį slopinamąjį aktyvumą aplink diską, esant pavienėms mikroorganizmų kolonijoms (5 pav.).

Didžioji dalis tirtų grybų frakcijų aktyviau veikė gramteigiamas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) nei gramneigiamas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) bakterijas. Grybų rūšys, kurioms ekstrahuoti naudotas metanolis, pasižymėjo stipriausiu slopinamuoju aktyvumu, išskyrus dichlorometano frakcijas *Agaricaceae* šeimos grybams, kurios turėjo didesnę poveikį tirtoms bakterijoms.

3.1.3. Skirtingų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo palyginimas

Panaudojant skirtingo poliškumo tirpiklius buvo įvertintas gautų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas. Rezultatai aiškiai parodo (4 pav.), kad sudedamųjų dalių, ekstrahuotų skirtingais tirpikliais, antioksidacinis aktyvumas kiekvienoje frakcijoje labai priklauso nuo grybų rūšies. Iš *I. hispidus* ir *P. schweinitzii* (didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčios rūšys) protoniniais ekstrahentais (metanolis ir vanduo) frakcionuoti ekstraktai buvo daug aktyvesni antioksidantai nei tos pačios rūšies cikloheksano ir dichlorometano ekstraktai tiriant visais metodais; kai buvo tirtos kitos grybų rūšys, didesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo ir nepoliniai ekstrahentai. Pavyzdžiui, 10 grybų rūšių (*A. freirei*, *A. devoniensis*, *A. fissuratus*, *S. subvolvatus*, *G. ammophilus*, *B. lepidus*, *B. lupinus*, *S. halophila*, *T. focale*, *C. odora*) cikloheksano ekstraktai buvo 10–30 proc. aktyvesni antioksidantai su didesne DPPH[•] radikalo sujungimo geba, ABTS^{•+} katijono radikalo ir FRAP redukciniu aktyvumu tirtais metodais, palyginti su dichlorometano ekstraktais. Naudojant visus metodus *T. columbetta* ir *X. chrysenteron* (išskyrus DPPH[•] bandymą) cikloheksano frakcijos buvo 10–40 proc. aktyvesnės nei dichlorometano frakcijos. Tačiau reiktų paminėti, kad šios rūšys buvo charakterizuotos kaip turinčios pakankamą antioksidacinį aktyvumą. Kitų 20 grybų rūšių rezultatai buvo panašūs, ir aktyvumas didėjo naudojant protoninius ekstrahentus. Įdomu pažymėti, kad *A. menieri*, *A. pseudopratisensis*, *B. luridus*, *T. caligatum* rūšių dichlorometano frakcijos pasižymėjo aktyvesne, kartais net 40 proc. didesne redukavimo geba nei metanolio frakcija, ištirta FRAP metodu, o bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) šioms frakcijoms buvo taip pat atitinkamai didesnis. *A. menieri*, *A. freirei*, *L. subolivaceus*, *B. lupinus*, *T. auratum*, *L. vinosus* cikloheksano ir dichlorometano ekstraktų deguonies radikalo sujungimo geba ORAC metodu buvo 10–50 proc. didesnė nei metanolio

ekstrakto antiradikalinis aktyvumas. Todėl galima teigti, kad šioms grybų rūšims cikloheksanas ir dichlormetanas yra tinkamas tirpiklis fenoliams ekstrahuoti.



4 pav. Grybų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo balai, gauti sumuojant antioksidacinio aktyvumo reikšmes

Atlikti tyrimai parodė, kad metanolis ir vanduo gali būti naudojami antioksidantams ekstrahuoti iš laukinių grybų rūšių, kai yra atlikta pirminė ekstrakcija poliniais organiniais tirpikliais. Vanduo yra naudojamas kaip ekstrahentas, tačiau ne visada yra pakankamai efektyvus augalo biologiškai veikliams junginiams išskirti. Pavyzdžiui, *I. hispidus* vandeninis ekstraktas buvo stipriausias antioksidantas ABTS^{•+}, FRAP ir TPC bandymų metu; tačiau jis buvo beveik 6 kartus silpnesnis taikant deguonies radikalo sujungimo ORAC metodą, palyginti su metanolium. Taip pat svarbu pažymėti, kad *I. hispidus* vandens ekstrakto išeiga buvo pastebimai didesnė nei gauta kitais tirpikliais; vandens frakcija sudarė 67 proc. visų ekstraktų. Kitų 6 tirtų miško grybų rūšių vandens ekstraktai buvo pastebimai mažiau efektyvūs atliekant ORAC bandymą, išskyrus *H. ferrugineum*, kur skirtumas tarp metanolio ir vandens frakcijų sudarė tik 14 proc. Reiktų atkreipti dėmesį ir į tai, kad vandens ekstraktai buvo gauti verdant liekanas po ekstrakcijos organiniais tirpikliais, todėl šiuo atveju ekstrakcijos medžiagoje galėjo vykti hidrolizė ir kiti cheminiai kitimai. Didžioji dalis grybų metanolio ekstraktų pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu naudojant ABTS^{•+}, DPPH[•] radikalo sujungimo, FRAP redukavimo metodus, o

dichlorometano ir cikloheksano ekstraktai buvo kelis kartus silpnesni radikalų akceptorai, išskyrus prieš tai aprašytas kelias rūšis. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad didesnis antioksidantų kiekis iš augalinės žaliavos dažniausiai išgaunamas poliniais ekstrahentais (Brahmi et al., 2012), tačiau mūsų atlikto tyrimo metu tai galiojo ne visoms laukinėms grybų rūšims (Smolskaitė et al., 2015). Suminiai antioksidacinio aktyvumo balai buvo taip pat apskaičiuoti įvertinus skirtingo poliškumo ekstrahentų efektyvumą tirtoms grybų rūšims 4 pav.

3.2.2. Junginių skirstymas iš grybų ekstraktų viršutinio agaro sluoksnio metodu

Bioautografija yra labai patogus ir paprastas metodas gamtiniams metabolitams atrinkti, ypač tiems, kurie pasižymi stipriu biologiniu poveikiu patogeniniams mikroorganizmams. Natūralių produktų išskyrimas kartais gali virsti iššūkiu, kai išskiriami kiekiai yra labai maži, dėl to dažniausiai reikia sukurti ir optimizuoti procesą, kurio metu galima aptikti mažus junginių kiekius ir nustatyti jų biologinį aktyvumą (Dewanjee et al.). Atsižvelgiant į šias problemas, bioautografinis aptikimo metodas gali būti laikomas kaip vienas iš galimų sprendimo būdų.

Šiame tyrime metanolio ekstraktai buvo frakcionuoti plonasluoksnės chromatografijos (PCh) plokštelėse bioautografijos metodu ir aktyvūs skaidrūs plotai stebėti violetiniame fone. Gyvų ląstelių mitochondrijų geltonas MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido tetra-zolis) yra redukuojamas į purpurinį formazaną. Redukcija vyksta, kai mikroorganizmų ląstelės yra vis dar gyvos, todėl skaidrūs plotai PCh plokštelėse apibūdina frakcijų efektyvumą ir žuvusias ląsteles. Antimikrobinį aktyvumą, naudojant viršutinio agaro sluoksnio metodą, galima paaiškinti kaip grybų antrinių metabolitų, tokių kaip alkaloidai, flavonoidai, buvimą ekstraktuose. 1 lentelėje pateikta 30 metanolio ekstraktų rezultatų suvestinė, kurioje 17 ekstraktų pasižymėjo antimikrobinio aktyvumu. Septynios rūšys aktyviai veikė *B. cereus*; vienuolika ekstraktų pasižymėjo antimikrobinio poveikiu *E. coli*; dvylika ekstraktų inhibavo *P. aeruginosa*.

1 lentelė Laukinių grybų rūšių PCh bioautografinis antibakterinis įvertinimas

Botaninis pavadinimas	Mikroorganizmai		
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>C. infractus</i>	+	+	++
<i>A. freirei</i>	-	+	++
<i>A. menieri</i>	-	-	+
<i>C. odora</i>	-	++	-
<i>G. ammophilus</i>	-	-	+
<i>P. schweinitzii</i>	+	++	++
<i>I. hispidus</i>	-	+	++

Botaninis pavadinimas	Mikroorganizmai		
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>H. ferrugineum</i>	-	+	-
<i>C. glaucescens</i>	+	+	+
<i>A. fissuratus</i>	+	-	++
<i>M. cinerifolia</i>	++	+	++
<i>A. coniferarum</i>	++	+	-
<i>T. auratum</i>	-	-	-
<i>S. halophila</i>	++	-	-
<i>A. ovoidea</i>	-	-	+
<i>A. devoniensis</i>	-	+	++
<i>C. suberretorum</i>	-	++	++
Kontrolinis variantas	-	-	-

+ viena aktyvi frakcija; ++ dvi aktyvios frakcijos.

Antimikrobiniu aktyvumu pasižymėję metanolio ekstraktai plonasluoksnės chromatografijos plokštelėje su vienu skaidriu plotu sudarė 54 proc., o plokštelės su dviem skaidriais plotais sudarė 47 proc. visų tirtų grybų rūšių. *P. schweinitzii* ir *I. hispidus* grybų rūšys pasižymėjo dviem reikšmingais ir skaidriais *E. coli* ir *P. aeruginosa* inhibicijos plotais plonasluoksnės chromatografijos plokštelėse. Gautus skirtingus rezultatus galėjo nulėmti mažos veikliųjų medžiagų koncentracijos, jų klasė, junginių struktūros, kurios daro tiesioginę įtaką frakcijų aktyvumui PCh plokštelėse

3.2.3. Grybų ekstraktų biologinės savybės¹

Siekiant nustatyti naujas ir veiksmingas antileišmaniozines medžiagas, šioje dalyje tirtas grybų frakcijų poveikis parazitams, naudojant *L. infantum* amastigotus. 2 lentelėje pateikta inhibicinė koncentracija 50 proc. (IC₅₀), citotoksinė koncentracija (CC₅₀), kuri 50 proc. sumažino ląstelių gyvybingumą, ir selektyvumo indeksas (SI). Kaip kontrolinis vaistas buvo vartojamas amfotericinas B. Rezultatai gauti įvertinus 80 grybų ekstraktų, iš kurių 43 frakcijos pasižymėjo aktyviu poveikiu *L. infantum* amastigotams. Dešimt ekstraktų, kurių koncentracijos mažesnės nei 10 μM, gebančių slopinti parazitų augimą 50 proc., buvo laikomi tokiais pat aktyviais, kaip ir amfotericinas B. Antileišmanioziniu aktyvumu pasižymėjo 40 proc. dichlorometano, 37 proc. cikloheksano ir 23 proc. metanolio visų tirtų grybų rūšių ekstraktų.

¹ Tyrimai buvo atlikti Tulūzos universiteto Medicinos ir biologijos tyrimų centre (Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS).

2 lentelė *In vitro* poveikis *L. infantum* amastigotams ir citotoksiškumo vertinimas

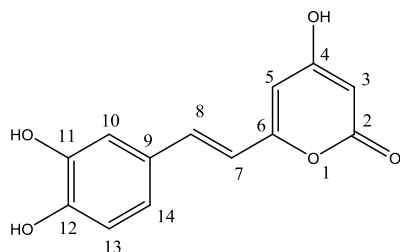
Botaninis pavadinimas	Fracija	Amastigotai (<i>L.infantum</i>) IC ₅₀ µg/ml	Macrofagai (citoloksiškumas) CC ₅₀ µg/ml	SI (selektyvumo indeksas)
<i>A. menieri</i>	C	21,83	>100	>4,58
<i>A. pseudopratisensis</i>	D	60,29	>100	>1,66
<i>A. freirei</i>	C	11,39	>100	>8,78
	D	10,89	>100	>9,18
	M	90,96	>100	>1,10
<i>A. devoniensis</i>	D	58,06	>100	>1,72
<i>A. coniferarum</i>	C	40,46	>100	>2,47
	D	31,76	>100	>3,15
<i>L. litoralis</i>	C	12,89	>100	>7,76
	D	15,17	74,25	4,89
<i>L. subolivaceus</i>	C	73,06	>100	>1,37
	D	43,20	>100	>2,31
<i>S. subvolvatus</i>	M	44,04	>100	>2,27
<i>G. ammophilus</i>	C	2,04	>100	>49,02
	D	10,18	>100	>9,82
<i>B. lepidus</i>	C	13,03	>100	>7,67
	M	12,84	>100	>7,79
<i>A. impolitus</i>	C	7,10	>100	>14,08
	D	10,21	>100	>9,79
	M	64,85	>100	>1,54
<i>A. luridus</i>	C	8,60	>100	13,21
	D	6,54	78,81	12,05
	M	8,58	>100	>11,68
<i>S. halophila</i>	C	4,37	>100	>22,88
	D	4,46	>100	>22,42
	M	46,66	>100	>2,14
<i>T. focale</i>	C	29,48	87,04	2,95
	M	14,00	>100	>7,14
<i>T. auratum</i>	D	14,08	23,12	1,64
<i>T. caligatum</i>	C	14,55	>100	>6,87
	D	20,22	>100	>4,95
	M	161,96	>100	>0,62
<i>A. odora</i>	C	17,64	>100	>5,67
	D	12,74	>100	>7,85
<i>C. suberretorum</i>	C	13,35	>100	>7,49
	D	16,59	>100	>6,03
	M	6,72	>100	>14,88
<i>C. infractus</i>	C	8,00	>100	>12,50
	D	9,81	>100	>10,19
<i>P. schweinitzii</i>	C	22,66	>100	>4,41
	D	22,72	>100	>4,40
<i>I. hispidus</i>	D	53,17	>100	>1,88
	M	61,00	>100	>1,64
<i>Amfotericinas B</i>		0,28	30,94	110,5

C: cikoheksanas; D: dichlorometanas; M: metanolis; amfotericinas B: kontrolinis vaistas; ^aIC₅₀ ir ^bCC₅₀ reikšmės pateikiamos kaip mažiausiai dviejų matavimų vidurkis (SD 10 %).

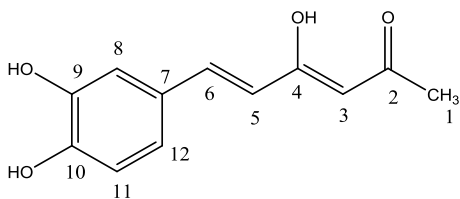
Šių bandymų metu taip pat buvo įvertintas tirtų rūšių citotoksiškumas pelės makrofagų ląstelėms. Kaip potencialus klinikinis vaistas nuo *L. infantum* amastigotų buvo atrinkti mažiau ląstelėms toksiški ekstraktai. Daugelio ekstraktų citotoksiškumo koncentracijos kito nuo 23,13 (*T. auratum*) iki daugiau nei 100 µg/ml (2 lentelė), kurios sumažino 50 proc. ląstelių gyvybingumą. Tik keturių grybų ekstraktai *T. auratum*, *L. litoralis*, *B. luridus*, *T. focale* pasižymėjo mažesniu citoksiškumu nei 100 µg/ml. Selektyvumo indeksas (SI) buvo apskaičiuotas kaip citotoksiškumo ir poveikio *L. infantum* amastigotams aktyvumo santykis. *In vitro* *G. ammophilus* cikloheksano ekstrakto terapinis indeksas (SI = 49,09) buvo selektyvesnis nei tiriant *A. blazei* vandens ekstraktą, kurio selektyvumo indeksas buvo mažesnis (SI = 41,9) *L. chagasi*. Šio grybo naudojimas siejamas su liaudies medicina gydant tokias ligas, kaip leukemija, vėžys ir arterinė hipertenzija (Valadares et al., 2012). *S. halophila* cikloheksano ir dichlorometano ekstraktai pasižymėjo du kartus mažesniu selektyvumu nei *G. ammophilus* cikloheksano ekstraktas. Kitos tirtos grybų rūšys buvo mažiau veiksmingos parazitui *L. infantum* inhibuoti dėl galimai nedidelių aktyvių junginių koncentracijų ekstraktuose.

3.3. ANTRINIŲ METABOLITŲ IŠSKYRIMAS IR IDENTIFIKAVIMAS IŠ *PHAEOLUS SCHWEINITZII* (FR.) METANOLIO EKSTRAKTO

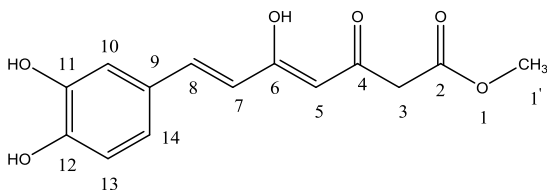
Įvertinus Prancūzijos Pietų Pirėnų regione augančių grybų antioksidacinį, antimikrobinį ir biologinį potencialus, buvo nustatyta, kad *P. schweinitzii* grybo metanolio ekstraktas pasižymėjo reikšmingu aktyvumu įvairiais tirtais metodais. Nors keletas junginių buvo identifikuoti, deja, nėra išsamios informacijos apie antrinių metabolitų biologinį, antioksidacinį aktyvumą. Šių tyrimų metu buvo siekiama išskirti aktyvius junginius iš *P. schweinitzii* metanolio ekstrakto, panaudojant preparatinės ir analizinės chromatografijos metodus.



6 pav. Hispidino (6-(3,4-dihidroksistiril)-4-hidroksi-2-pirono) struktūra



7 pav. Hispolono (6-(3, 4-dihidroksifenil)-4-hidroksiheksa-3,5-dien-2-ono) struktūra



8 pav. Inonotinės rūgšties metilesteris (7-(3,4-dihidroksi-fenil)-5-hidroksi-3-okso-hepta-4,6-dienoinės rūgšties metilesteris)

Spektroskopijos metodais (ESI-MS, MS/MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMBC, COSY, HMQC) buvo nustatyti trys junginiai: hispidinas, hispolonas ir inonotinės rūgšties metilesteris; pastarieji du junginiai buvo išskirti iš *P. schweinitzii* ir aprašyti pirmą kartą (6, 7, 8 pav.).

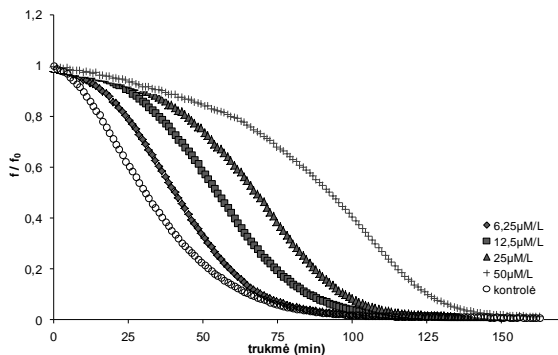
3.4. JUNGINIŲ, IŠSKIRTŲ IŠ *P. SCHWEINITZII*, ANTIOKSIDACINIO, BIOLOGINIO IR ANTIPARAZITINIO AKTYVUMO VERTINIMAS

3.4.1. Junginio hispidino antioksidacinis aktyvumas

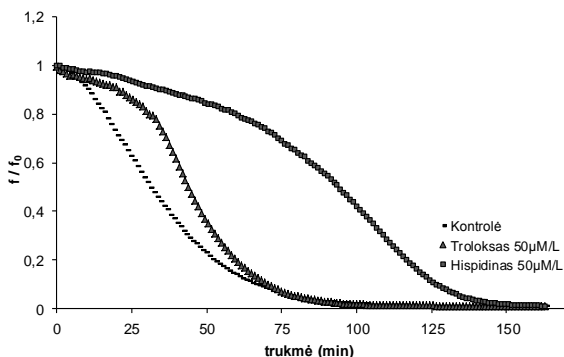
Šios tyrimo dalies tikslas – įvertinti hispidino aktyvumą antioksidacinio aktyvumo metodais (ORAC, DPPH $^{\cdot}$, ABTS $^{+\cdot}$, FRAP).

Iškirto hispidino antioksidacinis aktyvumas įvertintas deguonies radikalo sujungimo geba naudojant fluorescencinį metodą (ORAC-FL). Jo metu nustatomas santykinis antioksidacinis potencialas ir junginio aktyvumas, kuris yra prilyginamas standartui troloksui. *9 pav.* matoma fluoresceino oksidacijos peroksilo radikalų emisijos kinetika esant skirtingoms hispidino koncentracijoms (6,25–50 $\mu\text{M/L}$). *10 pav.* pavaizduotas hispidino ir trolokso koncentracijos kitimas, pastebėtas panašus apsauginis oksidacinis aktyvumas, esant vienodoms abiejų junginių koncentracijoms. 1g hispidino antioksidacinė geba išreikšta

trokso ekvivalentais (TE), kurios reikšmė ORAC metodu atitinka 2.825 ± 0.7 mM TE/g, ir yra lygi 0,706 g troloksui.



9 pav. Fluoresceino skilimas esant skirtingoms hispidino koncentracijoms (6,25–50 μM/L)

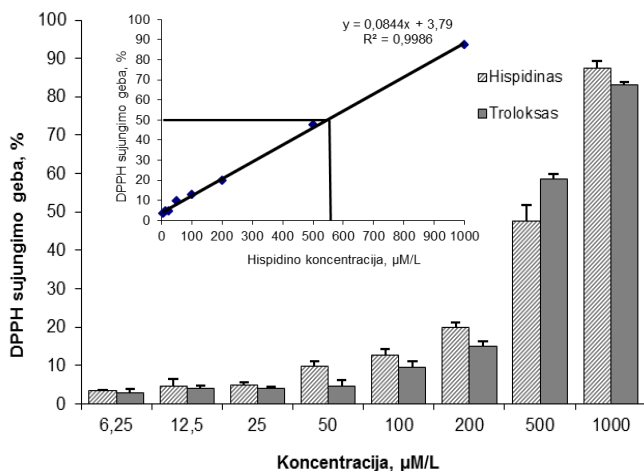


10 pav. Fluoresceino skilimas esant vienodoms trolokso ir hispidino koncentracijoms

DPPH[•] radikalų sujungimo geba išreikšta procentais ir pavaizduota 11 pav. Tyrimo metu kaip antioksidantas naudotas hispidinas, kuris buvo lyginamas su kontroliniu troloksu. Hispidino DPPH[•] radikalų sujungimo geba didėjo didėjant koncentracijai ir kito 3,32–87,53 proc.; o trolokso aktyvumas siekė 2,82–83,04 proc. Hispidinas pasižymėjo labai panašiu aktyvumu, kaip standartas, todėl jis gali būti naudojamas kaip natūralus antioksidantas. Apskaičiuota koncentracija, reikalinga 50 proc. DPPH[•] radikalams sujungti, siekė 3.66 mM, t.y. 20 proc. daugiau hispidino, nei atliktų tyrimų duomenimis norint sujungti pusę DPPH[•] radikalų (Chen et al., 2007). 1g hispidino antioksidacinė

geba išreikšta trolokso ekvivalentais (TE), kurios reikšmė DPPH[•] metodu atitinka 2.09 ± 0.04 mM TE/g, ir yra lygi 0,52 g troloksui.

Literatūros duomenimis, hispidino ir DPPH[•] radikalų sujungimo galia kito 27–75 proc. (Han et al., 2013), didesnis aktyvumas pastebėtas, kai buvo naudojami mažesnės junginio koncentracijos (25–200 μM/L) nei mūsų atliktų tyrimų metu. Tai galima paaiškinti tuo, kad stipriai skyrėsi tyrimų metu naudoti DPPH[•] radikalų ir hispidino koncentracijų santykiai.

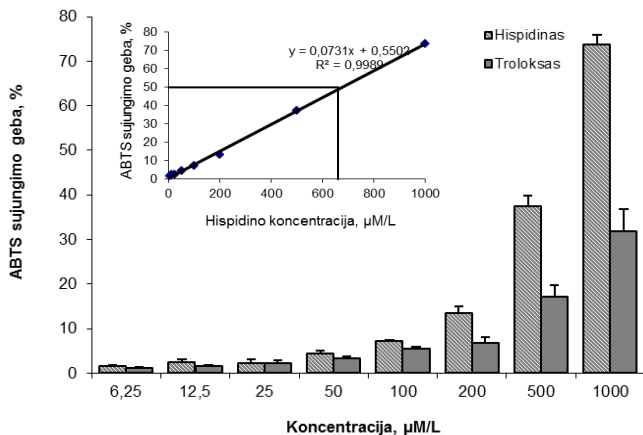


11 pav. Hispidino ir trolokso antioksidacinis aktyvumas (%) DPPH[•] radikalų. Intarpas: DPPH[•] radikalų sujungimo gebos (%) priklausomybė nuo hispidino koncentracijos

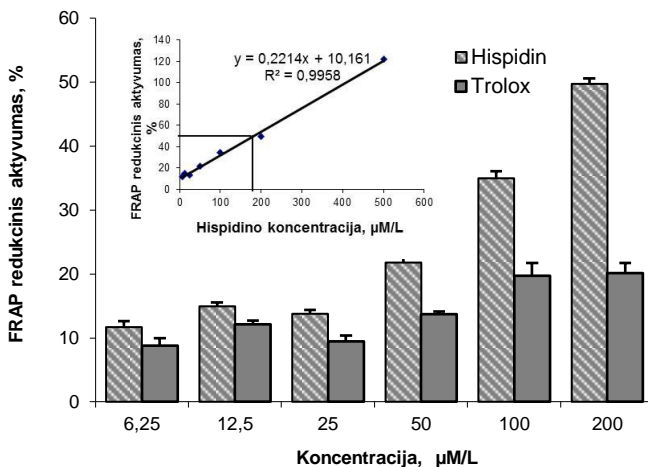
ABTS^{•+} radikalo sujungimas pagrįstas hispidino antioksidacine geba, lyginant jį su standartu troloksu. Tyrimo metu stebimas absorbcijos mažėjimas ir spalvoto ABTS^{•+} radikalo skilimas. Hispidino antioksidacinė geba (kito nuo 1,57 iki 73,83 proc.) buvo dvigubai efektyvesnė nei trolokso (kito nuo 1,20 iki 31,88 proc.), esant didesnėms junginių koncentracijoms; o naudojant mažesnes koncentracijas aktyvumas buvo panašus (12 pav.). 1g hispidino antioksidacinė geba išreikšta trolokso ekvivalentais (TE), kurios reikšmė ABTS^{•+} metodu atitinka 7.27 ± 0.03 mM TE/g, ir yra lygi 1,81 g troloksui.

FRAP bandymu buvo įvertinta išskirto junginio geba redukuoti Fe³⁺ jonus iki Fe²⁺, lyginant jį su standartu troloksu. Hispidino aktyvumas kito nuo 11,70 iki 49,71 proc., o trolokso – 8,77–20,18 proc. (13 pav.). Geležies jonų (Fe³⁺) redukcinis aktyvumas buvo dvigubai efektyvesnis tirtose koncentracijose, palyginti su troloksu. Hispidino Geležies jonų (Fe³⁺) redukcinis aktyvumas

išreikštas trolokso ekvivalentais (TE), kurio reikšmė atitinka 15.54 ± 0.2 mM TE/g.



12 pav. Hispidino ir trolokso antioksidacinis aktyvumas (%) naudojant ABTS^{•+} radikalo metoda. Intarpas: ABTS^{•+} radikalų sujungimo gebos (%) priklausomybė nuo hispidino koncentracijos



13 pav. Hispidino ir trolokso redukcinis aktyvumas (%), tirtas FRAP metodu. Intarpas: redukcinės absorbcijos priklausomybė nuo hispidino koncentracijos

Iš gautų rezultatų matyti, kad hispidino efektyvumas, palyginti su sintetiniu standartu troloksu, pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu. Hispidinas gali būti vartojamas kaip perspektyvus natūralus antioksidantas.

3.4.2. Išskirtų junginių bei *P. schweinitzii* ir *I. hispidus* ekstraktų biologinis aktyvumas

3.4.2.1. Išskirtų junginių antileišmaniozinio aktyvumo nustatymas²

Šio tyrimo tikslas buvo įvertinti iš *P. schweinitzii* išskirtų junginių poveikio parazitams aktyvumą, naudojant *L. infantum* promastigotus. Lygiagrečiai įvertintas hispidino, hispolono ir inonotinės rūgšties metilesterio citotoksiškumas graužikų ląstelėms. Kaip antileišmanioziniai kontroliniai vaistai pasirinkti miltefozinas, pentamidinas, amfotericinas B; o doksorubicinas buvo vartojamas kaip teigiamas kontrolinis mėginys citotoksiškumo tyrimams atlikti. Selektyvumo indeksas (SI) buvo apskaičiuojamas kaip citotoksiškumo ir aktyvumo veikiant *L. infantum* promastigotus santykis. Lyginant kontrolinį vaistą pentamidiną su identifikuotomis molekulėmis, hispidino selektyvumas buvo 25 proc. didesnis. O hispolono (33 proc.) ir inonotinės rūgšties metilesterio (51 proc.) selektyvumo indeksas pastebėtas mažesnis. Palyginti su kitais kontroliniais vaistais amfotericinu B ar miltefozinu, tirti junginiai mažiau aktyviai veikė *L. infantum* promastigotus. Tačiau svarbu pažymėti tai, kad šie junginiai buvo 7–12 kartų mažiau citotoksiški nei kontroliniai vaistai amfotericinas B ar pentamidinas. Atlikti tyrimai rodo, kad junginiai aktyviai veikia *L. infantum* promastigotus ir gali pasižymėti imunomoduliaciniu poveikiu, kuris pakeičia infekuotų makrofagų antiparazitinę reakciją.

3.4.2.2. Iš *P. schweinitzii* grybo išskirto hispidino išsamus biologinio aktyvumo įvertinimas³

Šiame tyrime išsamiai įvertintas iš *P. schweinitzii* išskirto hispidino genotoksinis aktyvumas. Atlikus tyrimus nustatyta, kad hispidinas nebuvo genotoksiškas analizuojant mikrobranduolių metodu (dozių intervalas 10–150 µg/ml) ir nesukėlė reikšmingo chromosominių aberacijų padidėjimo. Tačiau išskirtas junginys pasižymėjo genotoksinio poveikiu seserinių chromatidžių mainų tyrimuose ir sukėlė statistškai reikšmingą nuo dozės priklausomą chromatidžių mainų padidėjimą. Hispidinas nesukėlė genų mutacijų *Salmonella typhimurium* bakterijų ląstelėse ir nepažeidė DNR donorų limfocituose.

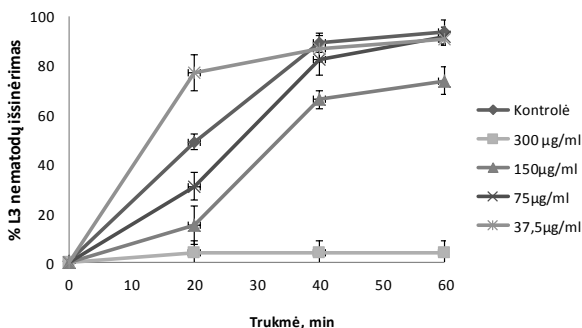
² Tyrimai buvo atlikti Tulūzos universiteto, Medicinos ir biologijos tyrimų centre (Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS)

³ Tyrimai buvo atlikti Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Botanikos ir genetikos katedroje

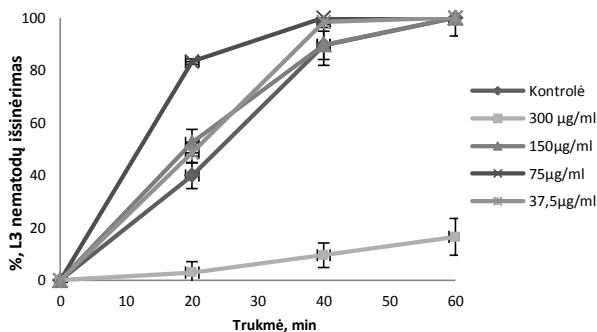
3.4.2.3. Antihelmininis poveikis virškinamojo trakto nematodams

Iš *P. schweiniztii* išskirti hispidinas ir hispolonas buvo tiriami kaip antihelminčiai preparatai nuo plačiai paplitusio virškinamojo trakto nematodo *H. contortus*, kuris yra vienas iš dažniausiai sutinkamų parazitų. O kitas pasirinktas nematodas *T. colubriformis* taip pat yra žalingas, kaip ir *Heamonchus* (Mahieu et al., 2007). Tyrimų metu taikytas nematodų nėrimosi metodas, kuriuo galima išmatuoti biologiškai veiklių junginių efektyvumą, pavėlinant arba slopinant dirbtinai sukeltą L₃ stadijos lervų išsinerimą (Bahuaud et al., 2006). Junginiai, pasižymintys antihelminčiu aktyvumu, sustabdo nematodų nėrimosi procesą, todėl lerva negali užkrėsti gyvūno; neišsinerusi lerva pašalinama iš atrajojančių gyvūnų virškinamojo trakto kartu su išmatomis (Hertzberg et al., 2002).

Ekspimento metu po dirbtinai sukulto išsinerimo (trukmė – 60 min.) tuščiuosiuose kontroliniuose bandiniuose *H. contortus* ir *T. colubriformis* nematodų gyvybingumas siekė 97–100 proc. visų lervų (14 ir 15 pav.). Hispolonas lengvai slopino *T. colubriformis* nematodų išsiritimą, kai jo koncentracija buvo 300 µg/ml; tyrimai su *H. Contortus* atlikti nebuvo. Nustatant hispidino aktyvumą (konc. 300 µg/ml) su abiem prieš tai minėtais nematodais, pastebėtas stiprus slopinamasis poveikis per 60 min. (išsinerė $16,52 \pm 7,72$ proc. *H. contortus*; 14 pav.; $3,97 \pm 2,88$ proc., *T. colubriformis*, 15 pav.). Hispidino koncentraciją atitinkamai sumažinus du ir keturis kartus, pastebėta, kad *T. colubriformis* nematodų išsinerimas nuosekliai vėlavo 40 min laikotarpiu. Tačiau naudojant *H. contortus* buvo gauti skirtingi rezultatai; užfiksuotas hispidino aktyvumas buvo silpnesnis nei *T. colubriformis* ir kito nuo 53 proc. iki 100 proc. (150 µg/ml) ir nuo 84 proc. iki 100 proc. (75 µg/ml) 60 min. laikotarpiu.

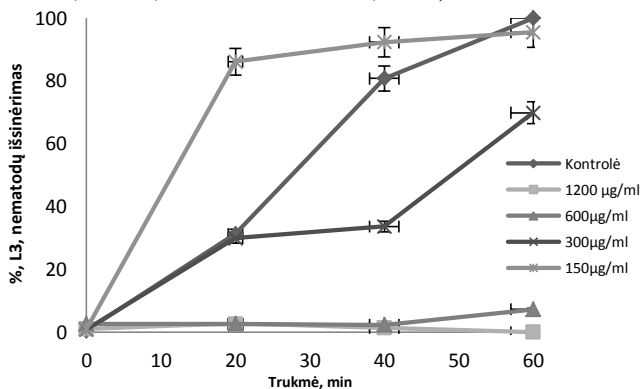


14 pav. *T. colubriformis* nematodų slopinimas esant skirtingoms hispidino koncentracijoms



15 pav. *H. contortus* nematodų slopinimas esant skirtingoms hispidino koncentracijoms

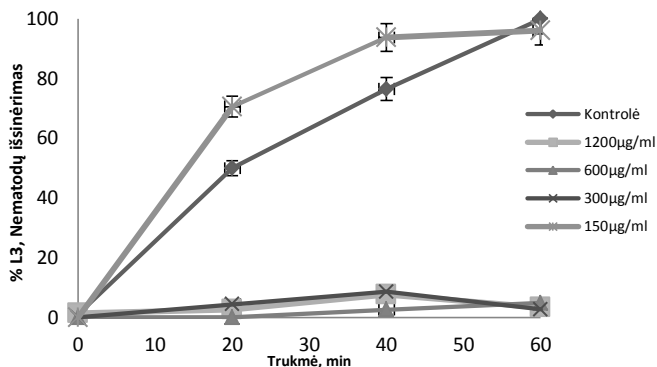
Slopinant lervų nėrimąsi, proceso efektyvumas priklauso nuo hispidino ir hispolono struktūros, junginių molekulinės masės bei nematodų ląstelių struktūros. Literatūros duomenimis, pavyzdžiui flavan-3-olių antihelminntinis aktyvumas priklauso nuo hidroksilo grupės skaičiaus molekulėje, junginių molekulinės masės bei hidroksilo padėties C žiede (Brunet and Hoste, 2006). Nors polifenolių antihelminntinės savybės ir jų poveikis yra įrodytas moksliniais tyrimais, deja, tikslus veikimo procesas nėra apibrėžtas – jų aktyvumas gali priklausyti nuo nematodo rūšies, jo vystymosi stadijos, maistinių medžiagų biocheminių savybių ir biologiškai veiklių molekulių struktūros (Paolini et al., 2003a, Paolini et al., 2003b, Athanasiadou et al., 2001).



16 pav. *H. contortus* nematodų slopinimas esant skirtingoms *I. hispidus* (2011 m.) ekstrakto koncentracijoms

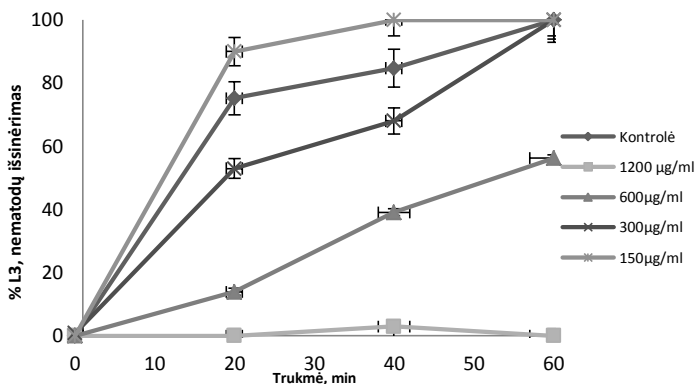
Šios tyrimų dalies tikslas buvo įvertinti *P. schweintzii* metanolio ekstraktų antihelminčių efektyvumą *H. contortus* ir *T. colubriformi* nematodams. Grybai buvo renkami skirtingu derliaus nuėmimo metu, 2011 ir 2012 metais. Taip pat buvo įvertintas ir *I. hispidus* metanolio ekstraktų antihelminčių aktyvumas, grybus renkant dvejus metus iš eilės (skirtingi derliaus nuėmimo periodai). *I. hispidus* pasirinktas, nes šio grybo antrinių metabolitų taip pat aptinkama ir *P. schweintzii*.

Tyrimo metu tuščiuosiuose kontroliniuose bandiniuose išsinerė 97–100 proc. visų *H. contortus* nematodų. Stipriu slopinamuoju poveikiu pasižymėjo *I. hispidus* (rinkti 2011 m.) ekstraktai, kai buvo vartojamos 1200 µg/ml ir 600 µg/ml koncentracijos (16 pav.). O bandymus atlikus, esant 300 µg/ml koncentracijai, pastebėta, kad dalis nematodų išsinerė. Neefektyvi buvo ir mažiausia tirta 150 µg/ml koncentracija. Panašūs rezultatai gauti ir su *I. hispidus* (rinkti 2012 m.) metanolio ekstraktu, kurio antihelminčių aktyvumas buvo aiškiai pastebimas, kai vartotos 1200 ir 600 µg/ml koncentracijos (18 pav.).

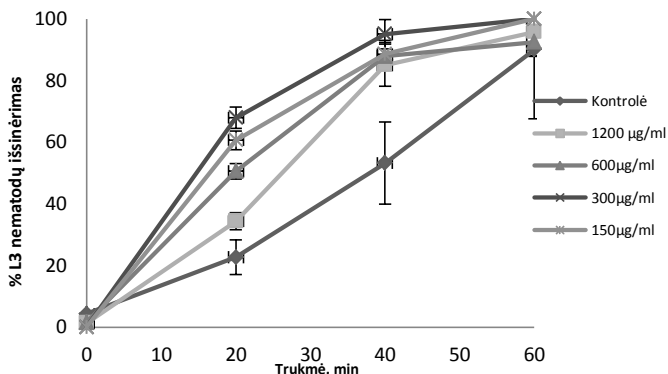


17 pav. *H. contortus* nematodų slopinimas esant skirtingoms *P. schweintzii* (2011 m.) ekstrakto koncentracijoms

P. schweintzii (rinkti 2011 m.) metanolio ekstraktas efektyviai slopino nematodų nėrimosi procesą esant 1200, 600 ir 300 µg/ml koncentracijoms, o, esant 150 µg/ml koncentracijai, pastebėtas silpnas nematodų išsinerimo slopinimas (17 pav.). *P. schweintzii* (rinkti 2012 m.) ekstraktas nepasižymėjo antihelminčių aktyvumu, o nematodų nėrimosi aktyvumas buvo toks pats arba artimas tuštiems bandiniams (19 pav.).



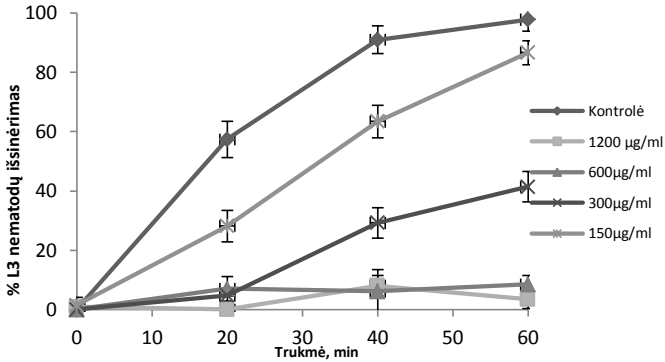
18 pav. *H. contortus* nematodų slopinimas esant skirtingoms *I. hispidus* (2012 m.) ekstrakto koncentracijoms



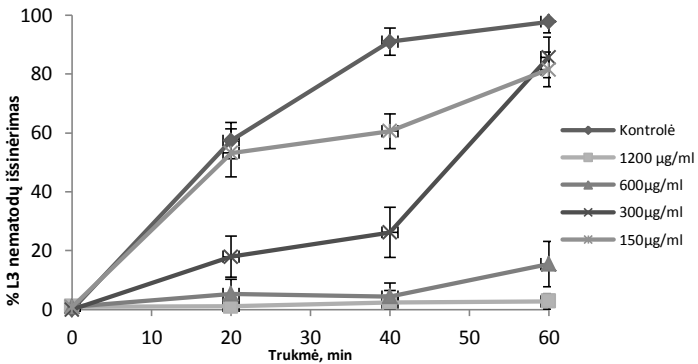
19 pav. *H. contortus* nematodų slopinimas esant skirtingoms *P. schweinitzii* (2012 m.) ekstrakto koncentracijoms

Tyrimams naudojant *T. columbiformis*, per 60 min. tuščiuose kontroliniuose bandiniuose dirbtinai išsinerė nuo 92 iki 100 proc. nematodų. *I. hispidus* (rinkti 2011 m.) metanolio ekstraktas pasižymėjo stipriu inhibiciniu poveikiu ir slopino nematodų išsinerimą esant 600 ir 1200 µg/ml koncentracijoms; o, esant 300 µg/ml koncentracijai, slopinimo aktyvumas per 60 min. sumažėjo iki 41,40 proc. (20 pav.). Skirtingi rezultatai buvo gauti naudojant 2012 m. rinktų *I. hispidus* grybų ekstraktus. Didžiausias antihelmininis aktyvumas (67,80 proc.) nustatytas, kai ekstrakto koncentracija siekė 1200 µg/ml (22 pav.). Atliekant

tyrimus su mažesnėmis ekstrakto koncentracijomis, antihelminčio aktyvumo nepastebėta.

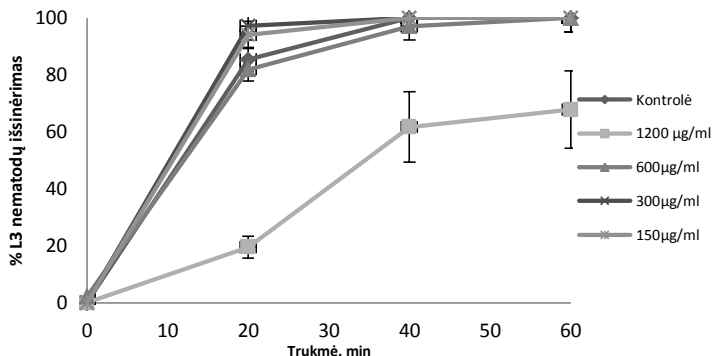


20 pav. *T. colubriformis* nematodų slopinimas esant skirtingoms *I. hispidus* (2011 m.) ekstrakto koncentracijoms

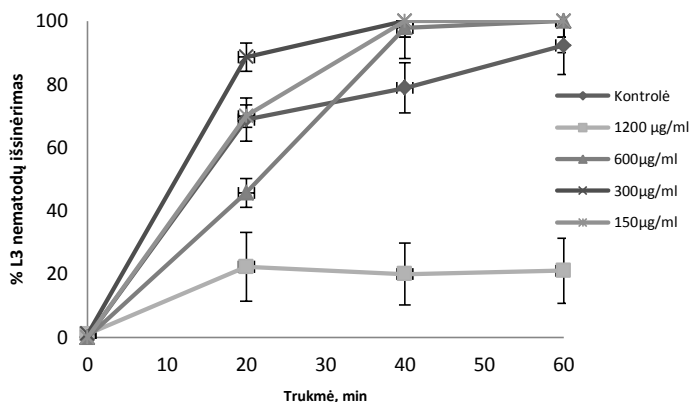


21 pav. *T. colubriformis* nematodų slopinimas esant skirtingoms *P. schweintzii* (2011 m.) ekstrakto koncentracijoms

P. schweintzii (2011 m.) ekstrakto slopinamasis poveikis *T. columbiformis* nematodams, esant 1200 ir 600 µg/ml koncentracijoms, buvo atitinkamai lygus 2,76 proc. ir 15,43 proc. (21 pav.). Inhibicinis aktyvumas esant 300 µg/ml ekstrakto koncentracijai buvo lygus 26,19 proc. per pirmąsias 40 tyrimo minučių, tačiau vėliau slopinamasis poveikis išnyko. Ekstraktas, kai naudota 150 µg/ml koncentracija, buvo neaktyvus. O *P. schweintzii* (2012 m.), esant 1200 µg/ml ekstrakto koncentracijai, pasižymėjo stipriu antihelminčiniu aktyvumu, jis tyrimo metu siekė 21,04 proc. (23 pav.). Bandymams naudojant mažesnes koncentracijas, nebuvo pastebėtas slopinamasis ekstrakto poveikis *T. columbiformis* nematodų išsinerimui.



22 pav. *T. colubriformis* nematodų slopinimas esant skirtingoms *I. hispidus* (2012 m.) ekstrakto koncentracijoms



23 pav. *T. colubriformis* nematodų slopinimas esant skirtingoms *P. schweintzii* (2012 m.) ekstrakto koncentracijoms

Gauti rezultatai patvirtino, kad *P. schweintzii* ir *I. hispidus* metanolio ekstraktai yra biologiškai aktyvūs ir gali būti vartojami kaip slopinamieji preparatai, kovojant su tirtais *H. contortus* ir *T. colubriformis* nematodais. Abiejų grybų ekstraktų poveikis tirtiems nematodams priklausė nuo derliaus rinkimo periodo. 2011 m. surinktų grybų metanolio ekstraktai pasižymėjo didesniu aktyvumu ir buvo veiksmingesni esant mažesnėms koncentracijoms. Pavyzdžiui, *P. schweintzii* (2011 m.) ekstraktai (koncentracija 1200 ir

600 µg/ml) pasižymėjo stipriu inhibiciniu poveikiu *H. contorus* ir *T. colubriformis*, kai užfiksuota mažiau nei 20 proc. išsinėrusių nematodų; panašiu aktyvumu pasižymėjo ir *I. hispidus* metanolio ekstraktas. Ne tokie aktyvūs buvo 2012 m. surinktų *P. schweintzii* ir *I. hispidus* grybų ekstraktai. Nedidelis antihelminčinis aktyvumas (21–68 proc. išsinėrusių nematodų) pastebėtas tik tuomet, kai buvo vartojamos didžiausios ekstraktų koncentracijos. Atliekant bandymus su 150 ir 300 µg/ml koncentracijomis, ekstraktų antihelminčinis aktyvumas užfiksuotas nebuvo. Gautų ekstraktų skirtumus galėjo nulemti tokie veiksniai, kaip skirtingų biologiškai veiklių komponentų sudėtis ir koncentracija grybuose, jų rinkimo periodas bei grybų amžius. Pavyzdžiui, dirvožemyje esančios druskos gali stipriai pakeisti flavonoidų sudėtį augaluose (Tattini and Traversi, 2008). Be to, ekstraktų aktyvumas tiesiogiai priklauso ir nuo biologiškai veiklių komponentų sąveikos su tam tikromis nematodų rūšimis bei nematodų ląstelių sandaros.

4. IŠVADOS

1. Nuosekliai ekstrahavus 30 laukinių grybų rūšių nustatyta, kad, didėjant naudojamam ekstrahento poliškumui, taip pat didėja ir gauto ekstrakto išeiga. Gautų cikloheksano ir dichlorometano ekstraktų išeigos buvo daug mažesnės 0,61 proc. (*S. halophila*), -5,14 proc. (*R. badia*), 0,52 proc. (*G. ammophilus*) - 3,42 proc. (*T. caligatum*) nei naudojant polinius tirpiklius, tokius kaip vanduo ir metanolis – atitinkamai 2,94 proc. (*H. ferrugineum*), -25,29 proc. (*T. caligatum*), 6,77 proc. (*S. halophila*) ir -41,29 proc. (*A. pseudopratenensis*). Didžiausia ekstraktų išeiga gauta iš *Agaricaceae*, *Tricholomataceae*, *Boletaceae* grybų šeimų.

2. ABTS⁺⁺, DPPH^{*}, FRAP ir ORAC metodais tirtų grybų antioksidacinis aktyvumas priklausė nuo kelių faktorių: tirtų grybų rūšių, šeimų ir tarp skirtingais ekstrahentais išskirtų frakcijų. *I. hispidus* (808 psv/g gsm), *P. schweinitzii* (712 psv/g gsm) ir *C. infractus* (481 psv/g gsm) pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu potencialu. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas tiriant *Agaricaceae* ir *Boletaceae* šeimas; jų suminiai antioksidaciniai balai kito nuo 109 iki 325 ir nuo 140 iki 253 psv/g gsm.

3. Dauguma tirtų grybų ekstraktų pasižymėjo antimikrobinu aktyvumu (89 proc. visų tirtų mėginių); 59 proc. visų ekstraktų buvo nustatytas dalinai slopinantis antimikrobinis poveikis tirtoms bakterijoms. Metanoliumi iš *P. schweinitzii*, *I. hispidus* ir *C. infractus* išskirtos frakcijos pasižymėjo stipriausiu antimikrobinu aktyvumu disko difuzijos (inhibicijos riba >15 mm) ir bioautografijos bandymuose. Tirtos grybų rūšys pasižymėjo didesniu antibakteriniu poveikiu gramteigiamoms (*B. cereus*, *S. aureus*) nei gramneigiamoms (*P. aeruginosa*, *E. coli*) bakterijoms.

4. Nustatyta, kad *G. ammophilus* (cikloheksano) ir *S. halophila* (cikloheksano ir dichlorometano) grybų ekstraktai aktyviai veikia *L. infantum* amastigotus; ekstraktų selektyvumo indeksas yra atitinkamai 49,09, 22,28 ir 22,42.

5. Stiprių antioksidacinių ir biologinių aktyvumu pasižymintis *P. schweinitzii* metanolio ekstraktas buvo frakcionuojamas panaudojant preparatinės ir analizinės chromatografijos metodus, tokius kaip planasluoksne ir kolonėlinė chromatografija. Tokiu būdu buvo išskirtos ir bioautografijos metodu aptiktos 2 aktyvios frakcijos.

6. Panaudojant ESI-MS, MS/MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, HMBC, COSY ir HMQC spektroskopijos metodus iš *P. schweinitzii* grybo buvo identifikuoti

hispidinas, hispolonas bei inonotinės rūgšties metilesteris; pastarieji du junginiai iš grybo *P. schweinitzii* išgryninti ir nustatyti pirmą kartą.

7. Išskirtų junginių aktyvumas buvo įvertintas panaudojant antioksidacinius ir biologinius metodus. Atliekant tyrimus ABTS⁺, DPPH^{*}, FRAP, ORAC metodais nustatyta, kad hispidinas pasižymėjo stipriu antioksidaciniu poveikiu; jo aktyvumas gali būti prilyginamas stipriam sintetiniam antioksidantui troloksui. Hispidinas nepasižymėjo genotoksiškumu, nesukėlė DNR pažeidimų ar bakterinių ląstelių mutacijos. Hispidinas, hispolonas ir inonotinės rūgšties metilesteris efektyviai slopino *L. infantum* promastigotus.

8. *P. schweintzii* ir *I. hispidus* ekstraktai pasižymėjo stipriu antihelminciniu poveikiu *H. contortus* ir *T. colubriformis* virškinamojo trakto nematodams. Skirtingais metais (2011 ir 2012 m.) rinktų grybų ekstraktai pasižymėjo skirtingu aktyvumu, kurį nulėmė nevienodos aktyvių junginių koncentracijos grybuose. Hispidinas beveik visiškai inhibavo nematodus, kai jo koncentracija siekė 300 µg/ml. O hispolonas efektyviai slopino tik *T. colubriformis* nematodus.

9. Atlikus sistemingą retų ir netyrinėtų laukinių grybų rūšių antioksidacinių ir biologinių savybių analizę, gauta mokslinė informacija gali būti sėkmingai panaudota tolimesniems tyrimams atlikti, taip pat palengvinti vykstančių procesų suvokimą ar išskiriamų biologiškai aktyvių junginių identifikavimą. Iš grybų rūšių, pasižyminčių dideliu antioksidaciniu aktyvumu, išskirti ekstraktai gali būti naudojami kaip efektyvi priemonė apsaugant gaminius nuo oksidacinio pažeidimo ar siekiant pašalinti nematodus iš gyvūnų virškinamojo trakto. Tokių natūralių gamtinių organinių junginių, kaip hispidinas, hispolonas ar inonotinės rūgšties metilesteris, pritaikymo galimybės yra ganėtinai didelės, pavyzdžiui, gaminant funkcinis ingredientus, maisto papildus ar medikamentus. Siekiant sėkmingai panaudoti biologiškai veiklius junginius vertėtų atlikti detalius tyrimus, siekiant išsiaiškinti gautų ekstraktų, frakcijų ir išskirtų biologiškai veiklių molekulių poveikį gyviesiems organizmams tiek *in vivo*, tiek *in vitro* (pvz., ląstelių kultūras) metodais.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- ATHANASIADOU, S., et al. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Veterinary Parasitology*. 2001, 99(3), 205-219. ISSN 0304-4017.
- CHEN, Y.H., et al., Identification of phenolic antioxidants from Sword Brake fern (*Pteris ensiformis* Burm.). *Food chemistry*. 2007, 105(1), 48-56. ISSN 0308-8146.
- BOA, E.R. *Wild Edible Fungi: A Global Overview of Their Use and Importance to People*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004.
- BRAHMI, F., et al. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*. 2012, 38, 146-152. ISSN 0926-6690.
- DEWANJEE, S., et al. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. (0). ISSN 2095-1779.
- HERTZBERG, H, et al. Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae in vivo and in vitro. *Parasitology*. 2002, 125(01), 65-70. ISSN 1469-8161.
- HOSTE, H., et al. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in parasitology*. 2006, 22(6), 253-261. ISSN 1471-4922.
- LINDEQUIST, U., et al. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2005, 2(3), 285-299. ISSN 1741-427.
- MAHIEU, M., et al. Evaluation of targeted drenching using Famacha© method in Creole goat: Reduction of anthelmintic use, and effects on kid production and pasture contamination. *Veterinary Parasitology*. 2007, 146(1), 135-147. ISSN 0304-4017.
- NOWACKA, N., et al. Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, 59(2, Part 1), 689-694. ISSN 0023-6438.
- PAOLINI, V, et al. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 2003b, 113(3), 253-261. ISSN 0304-4017.
- PAOLINI, V., et al. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Veterinary Research*. 2003a, 34(3), 331-339. ISSN 0928-4249.

- SMOLSKAITĖ, L et al. Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT-Food Science and Technology*. 2015, 60(1), 462-471. ISSN 0023-6438.
- TATTINI, M. and M. L. TRAVERSI. Responses to changes in Ca²⁺ supply in two Mediterranean evergreens, *Phillyrea latifolia* and *Pistacia lentiscus*, during salinity stress and subsequent relief. *Annals of botany*. 2008, 102(4), 609-622. ISSN 0305-7364.
- TKACZ, J. S. and L. LENE. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine - Springer*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York: Springer US, 2004.
- VALADARES, D. G., et al. Prophylactic or therapeutic administration of *Agaricus blazei Murill* is effective in treatment of murine visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*. 2012, 132(2), 228-236. ISSN 0014-4894.
- ZHONG, J. J. and J. H. XIAO. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009, 113, 79-150. ISSN 0724-6145.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS DISERTACIJOS TEMA

STRAIPSNIAI

Tarptautinėse duomenų bazėse esančiuose mokslo leidiniuose paskelbti straipsniai

Mokslinės informacijos instituto duomenų bazės „Thomson Reuters Web of Knowledge“ leidiniuose, turinčiuose citavimo indeksą

1. SMOLSKAITĖ, Lina; VENSKUTONIS, Petras Rimantas; TALOU, Thierry. Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 60.1: 462-471.
2. SMOLSKAITĖ, Lina; VENSKUTONIS, Petras Rimantas; TALOU, Thierry. Comprehensive Evaluation of Antioxidant Potential of Coastal Dune Mushroom Species from the South-West of France. *IJMM-Indian Journal of Medical Microbiology*, 2016, xxx:xxx-xxx

Kituose recenzuojamuose mokslo leidiniuose paskelbti straipsniai
Konferencijų pranešimų medžiagoje paskelbti straipsniai

1. SMOLSKAITĖ, L.; TALOU, T.; VENSKUTONIS, R. Antimicrobial and antioxidant agents as a potential source in wild mushrooms // *19th Symposium of the Baltic Mycologists and Lichenologist Nordic Lichen Society Meeting*, September 19-23, 2011, Vilnius, Lithuania: Programme and Abstracts / Gamtos trymų centro leidykla ISBN 978-9986-443-56-8 p. 58.

2. SMOLSKAITĖ, L.; TALOU, T.; VENSKUTONIS, R. Wild mushrooms as a potential source for antioxidant and antimicrobial agents // *ISEKI_Food 2011, Bridging training and Research for industry and the wider community*, 08 31-09 02, 2011, Italy, Milan: Book of Abstract / ISBN 9788890598906 p. 221.

3. SMOLSKAITĖ, L.; LE LAMER, A.C.; FABRE, N.; CHAVANT, L.; CARRAZ, M., VALENTIN, A.; VENSKUTONIS, R.; THIERRY, T. Mycorefinery concept applied to underutilized wild mushrooms for sequential valorization of secondary metabolites // *7th International conference on mushroom biology & mushroom products*, October 4-7, 2011, Arcachon, France: abstracts book/ p. 88.

4. SMOLSKAITĖ, L.; VENSKUTONIS, R.; ALSINA, I.; DUBOVA, A.; TALOU, T. Bioactive properties of underutilized wild mushrooms extracts // *Foodbalt 2012: 7th Baltic conference on food science and technology*, May 17-18, 2012, Kaunas, Lithuania: Conference program and abstracts / Kaunas, Technologija ISBN 978-609-02-0415-3 p. 101.

5. SMOLSKAITĖ, L.; VENSKUTONIS, R.; FABRE, N.; CHAVANT, L.; TALOU, T. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of underutilized wild mushrooms extracts // *CEFood 2012: 6th Central European congress on food*, May 23-26, 2012, Novi Sad, Srebija: abstract book / p. 112.

6. SMOLSKAITĖ, L.; VENSKUTONIS, R.; FABRE, N.; TALOU, T. Myco-refinery : underutilized mushrooms as a source of bio-active extracts for biosourced additives // *RRB-8: Renewable resources and biorefineries*, June 4-6, 2012, Toulouse, France : abstract book / p. 129.

7. SMOLSKAITĖ, L.; VENSKUTONIS, R.; THIERRY, T., LE LAMER, A.C.; Fabre, N.; Chavant, L. Antimicrobial and Antioxidant agents as a potential source in wild mushrooms // *2012 IFT Annual Meeting & Food Expo*, June 15-28, 2012, Las Vegas, Nevada, USA: Book of abstracts / Institute of food technologists ISSN 1082-1236 p. 155.

8. SMOLSKAITĖ, L.; VENSKUTONIS, R.; THIERRY, T. TLC-bioautography: a fast method for screening biological activities of wild mushrooms extracts // *EuroFoodChem XVII*, May 07-10, 2013, Istanbul, Turkey: Book of abstracts / Hacettepe University, Food Engineering Department ISBN 978-605-63935-0-1

Trumpa informacija apie autore

Lina Smolskaitė gimė 1985 m. liepos 31 d. Kaune. El. paštas: lina.smolskaite@gmail.com

Išsilavinimas:

- 1992–2004 m. Kauno Petrašiūnų vidurinė mokykla, Brandos atestatas.
2004–2008 m. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas. Chemijos inžinerijos bakalauro kvalifikacinis laipsnis.
2008–2010 m. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas. Chemijos inžinerijos magistro kvalifikacinis laipsnis
2010–2016 m. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas. Doktorantūros studijos

Mokslinės stažuotės:

- 2009 m. sausio – birželio mėn. Tulūzos universitetas (Tulūza, Prancuzija), pagal ERASMUS programą.
2010 m. sausio – liepos mėn. Tulūzos universitetas (Tulūza, Prancuzija), pagal SOCRATES ERASMUS programą.
2011 m. birželio mėn. Latvijos žemės ūkio universitetas (Jelgava, Latvija)
2012 spalio mėn. Latvijos žemės ūkio universitetas (Jelgava, Latvija)
2013 liepos mėn. Latvijos žemės ūkio universitetas (Jelgava, Latvija)
2014 m. balandžio – birželio mėn. Sidnėjaus universitetas (Sidnėjus, Australija).

INTRODUCTION

Due to the metabolic diversity, ecological variety, significant role in nature and complicated web of life cycles, fungi have attracted the attention of various scientists, mycologists, chemists, biologists and pharmacists in multiple ways (Tkacz, 2004). The level of mushroom consumption has been increasing over recent years, and they remain a commercially important sources for the producers of speciality foods (Nowacka et al., 2014). Scientific expertise is increasingly being applied to help achieve the primary development goals, which include poverty alleviation and the sustainable use of natural resources. Real progress has been and continues to be made in the roles that mushrooms play in achieving these goals (Boa, 2004).

In the past many new secondary metabolites with diversified chemical structures and various interesting bioactivity functions have been isolated from higher fungi. These molecules are likely to provide lead compounds for new substances that can improve biological body functions or medicinal discoveries, such as chemopreventive agents possessing the bioactivity of immunomodulatory, anticancer, etc. However, numerous challenges of bioactive molecules from mushrooms are encountered including bioseparation, identification, biosynthetic metabolism or screening model issues. Researchers have constantly searched for new active substances from mushrooms, however, commercial products as yet are very limited and mainly from field cultivation, which is obviously a time-consuming and labour-intensive process (Zhong and Xiao, 2009). Strategies to enhance new secondary metabolites existing as useful natural products in the wild, unknown and underinvestigated mushroom species, due to the high prevalence could be an extensive source of valuable components for industry. Moreover, among the known species the relative amount of well investigated mushrooms is very low. This fact together with the information about the great potential of microscopic fungi for the production of bioactive metabolites, the experience in ethnomedicinal use of mushrooms, the ecologic need for fungi to produce bioactive secondary metabolites and the improved opportunities for genetic, pharmacological and chemical analysis lead us to believe that mushrooms have a great potential for successful bioprospecting (Lindequist, Niedermeyer and Julich, 2005). A large, untapped, and chemically diversity resource of bioactive metabolites from wild macrofungi provide increasing opportunities for finding new lead structures for medicinal, nutritional, functional, therapeutic and phytochemical chemistry, and a new era of higher fungi secondary metabolite research has emerged (Quang, Hashimoto and Asakawa, 2006)

According to folk mycologist knowledge the lesser known wild mushrooms grown in the Midi-Pyrénées region of France might be a good source of bioactive constituents. Investigations into the scarce information on the presence of natural secondary metabolites and their properties such as antioxidants, antimicrobials and other food protecting and/or health promoting compounds on selected wild mushroom species have not been performed until now. On this basis the main hypothesis asserts that wild mushroom species may contain valuable natural bioactive molecules with multifunctional properties beneficial for various food and medicinal applications, such as ingredients of functional foods and nutraceuticals. Meanwhile, the hypothesis needs to be investigated to find promising sources of natural bioactive molecules, carrying out detail investigations into those showing potential and optimising detection techniques in biochemical studies towards the safety of newly discovered sources, and the bioavailability of active molecules.

The aim of the thesis

The main aim of this study was to investigate antioxidant, antimicrobial and other bioactivities of the selected underinvestigated wild mushroom species to obtain scientific information, which is required for their valorisation as a source for human nutrition and production of functional ingredients.

The objectives of this study:

1. To fractionate dried mushroom material using increasing polarity solvents and to determine extract yields.
2. To evaluate antioxidant activity of mushroom fractions by using several *in vitro* assays.
3. To evaluate antimicrobial activity of mushroom fractions by using various microorganisms.
4. To evaluate cytotoxicity properties of the selected wild mushrooms species.
5. To isolate and purify secondary metabolites from the selected mushrooms species using various chromatographic methods.
6. To elucidate the structures of purified metabolites using spectroscopic techniques such as ESI-MS, ESI-MS/MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, HMBC, COSY, HSQC.
7. To evaluate antioxidant and cytotoxicity activity of the main secondary metabolites, isolated from selected mushroom species.
8. To examine the influence of selected mushroom extracts collected at different mushroom harvesting periods and their isolated compounds inhibitory activity properties against gastrointestinal nematodes *in vitro*.

Scientific novelty

The scientific novelty of the research performed may be summarised by the following main points:

- Systematic and comprehensive evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of various mushroom species from the Midi-Pyrénées region of France has been performed for the first time;
- Some compounds isolated from the analysed mushroom species have been reported for the first time;
- The effects identified in some mushroom species compounds against gastrointestinal nematodes, as well as their antioxidant and cytotoxic activity, have been evaluated for the first time;
- The extracts from selected mushroom species have been reported as anthelmintic agents for the first time;

Practical significance

Wider exploration of underinvestigated bioresources, including various mushroom species, requires sound scientific evidence about their composition and properties. From this point of view comprehensive and systematic evaluation of antioxidant, antimicrobial and other properties of wild Midi-Pyrénées mushroom species may be considered as an important step for the practical valorisation of these species as a sources of natural functional ingredients to be applied in nutraceuticals, functional foods and other applications.

More specifically, the new knowledge obtained on hispidin, hispolon and inonic acid methyl ester, the compounds that were identified in mushroom extracts, and which have been characterised for their cytotoxic and antioxidant activity, may be useful for industries searching for new practical structures to be incorporated into food, nutraceutical, pharmaceutical and cosmetic products as efficient bioactive natural ingredients.

Finally, the *in vitro* assay results confirmed the potential activity of selected mushroom species and the isolated compounds that inhibit gastrointestinal nematodes. This knowledge may be applied to develop new effective preparations possessing anthelmintic activities for increasing resistance to worm populations in ruminants. For instance, mushroom extracts might be a promising natural candidate as an alternative to synthetic drugs causing residues in animal raw materials, which is an important characteristic in the production of organic livestock.

The key points of the thesis

3. Selected wild mushroom species contain valuable bioactive constituents, such as antioxidants, antimicrobial and cytotoxic agents,

while the proper selection of solvents enables the extracts to be obtained with the highest concentration of bioactive compounds that might be a valuable source of natural products for various applications.

4. The selected mushroom genus *P. schweinitzii* and *I. hispidus* have the potential *in vitro* activity against gastrointestinal nematodes; however, depending on the mushroom harvesting period, anthelmintic activity may change in terms of active constituent concentrations accumulated in the selected genus.

Structure and content of the dissertation

The dissertation is written in English. It consists of acknowledgements, a list of abbreviations, introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions, a list of references, annexes, and a list of publications relevant to the results of thesis. The dissertation has 138 pages in total, results presented in 9 tables and 41 figures. The list of references includes 244 bibliographic sources.

Approval of the work

2 scientific papers have been published on the basis of the material of this dissertation: the journal "IJMM-Indian Journal of Medical Microbiology" (accepted) and "LWT-Food Science and Technology" in the Scientific Information database "Thomson Reuters Web of Knowledge". The material of the dissertation has been presented in 8 scientific conferences.

CONCLUSIONS

1. Sequential fractionated 30 wild mushroom extract yields increased with increasing polarity of extraction solvent. The highest polarity water and methanol enabled the highest extract yields to be obtained from 2.94 (*H. ferrugineum*), 25.29% (*T. caligatum*) and from 6.77% (*S. halophila*) and 41.29% (*A. pseudopratisensis*). The yields of cyclohexane and dichloromethane extracts were remarkably lower from 0.61 (*S. halophila*), 5.14% (*R. badia*), 0.52 (*G. ammophilus*) and 3.42% (*T. caligatum*). The families possessing significant total yields were *Agaricaceae*, *Tricholomataceae* and *Boletaceae*.

2. The following factors had effects on the antioxidant capacity of mushroom extracts measured by the *in vitro* ABTS⁺, DPPH[•], FRAP, ORAC and TPC assays: mushroom family and species, solvent type and polarity and evaluation method. The highest 'antioxidant scores', which were introduced for integrating numerous antioxidant evaluation data and expressed in comparative integrated units per g of mushroom dry weight, were demonstrated by *I. hispidus*

(808 ciu/g mdw), *P. schweinitzii* (712 ciu/g mdw) and *C. infractus* (481 ciu/g mdw). In general, the species of the *Agaricaceae* and *Boletaceae* families possessed superior antioxidant potential, which was in the ranges of 109-325 and 140-253 ciu/g mdw respectively. The correlation between total phenolic and total antioxidant activity observed in our study was not as strong as may be expected, most likely due to the presence of various compound classes participating in the applied assays by different mechanisms. In general, the extracts isolated with polar solvents were characterised as possessing higher antioxidant activity.

3. The majority of mushroom extracts (89% of the total samples tested) demonstrated antimicrobial activity, 59% of them characterised as partial antimicrobial activity and not fully inhibiting microorganisms. Methanol fractions of *P. schweinitzii*, *I. hispidus* and *C. infractus* were the strongest antimicrobial agents against tested microorganisms in disc diffusion assay (inhibition zones were from 10 to >15 mm) and the bioautography method. It should be noted that the same species demonstrated the highest antioxidant potential with Gram-positive bacteria; *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* were more sensitive to mushroom extracts than Gram-negative, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

4. Cyclohexane extracts of *G. ammophilus* as well as cyclohexane and dichloromethane extracts of *S. halophila* exhibited good cytotoxic activity against the parasite *Leishmania infantum* amastigotes: the selectivity indexes (SI) indicating the ratio between cytotoxicity and activity against parasites for the above-mentioned extracts were 49.09, 22.28 and 22.42 respectively. These findings are promising for the further development of novel natural antiparasite preparations.

5. *P. schweinitzii* methanolic extract, as the substance possessing strong antioxidant capacity and antimicrobial activity, was fractionated by thin layer chromatography (TLC), column chromatography (CC) and high performance liquid chromatography (HPLC): TLC-DPPH[•] bioautography assay revealed 2 fractions exhibiting remarkable radical scavenging capacities which were purified by CC and HPLC.

6. Three principal constituents, namely hispidin, hispolon and inonotic acid methyl ester were elucidated and identified in *P. schweinitzii* by using a range of spectroscopic techniques - ESI-MS, ESI-MS/MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, HMBC, COSY, HSQC. Hispolon and inonotic acid methyl ester are reported in *P. schweinitzii* for the first time.

7. The activities of the purified principal components were tested for their antioxidant capacity and cytotoxicity. Hispidin was an effective antioxidant in

ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP, ORAC assays; in general, its activity was similar to the strong synthetic antioxidant, Trolox. The *in vitro* assessment of hispidin on human lymphocytes in the micronucleus and induction of chromosome aberrations in human lymphocytes did not reveal its genotoxicity. Also, hispidin did not induced primary DNA damage and mutation in bacterial cell. Hispidin, hispolon and inonotic acid methyl ester demonstrated an activity against promastigotes *L. infantum* and had immunomodulatory effects modifying the antiphagocytic response of infected macrophages.

8. The extracts of *P. schweinitzii* and *I. hispidus* were potent inhibitors on larvae exsheathment against *H. contortus* and *T. colubriformis* gastrointestinal nematodes; however, the effects of extracts isolated from the mushrooms collected in different years were different, indicating that active components may be present at different concentrations. Hispidin led to a strong inhibition with the highest tested concentration (300 µg/ ml) against both tested nematodes, while hispolon provoked a slightly delay against *T. colubriformis*.

9. In general, comprehensive and systematic evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of underinvestigated wild mushroom species provides important data for their further valorisation as a source of valuable ingredients. More specifically, the extracts isolated from the species possessing the strongest antioxidant potential may be promising protecting agents against oxidative damage and inhibitors of gastrointestinal nematodes. The principal components of such species, hispidin, hispolon and inonotic acid methyl ester may represent a group of new natural compounds for developing functional ingredients for nutraceuticals, functional foods, pharmaceuticals and other applications. Further research should be focused on elucidating the mechanisms of the performance of extracts, fractions and purified compounds using wider spectra of the *in vitro* (e.g. cell cultures) and *in vivo* studies.