



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus
kultūrų ekstraktų kiekybinis fitocheminių junginių ir
biologinio aktyvumo įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

Aistė Svideravičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Iona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus
kultūrų ekstraktų kiekybinis fitocheminių junginių ir
biologinio aktyvumo įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Aistė Svideravičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

M.d. dr. Ingrida Tumosienė

Recenzentė

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Aistė Svideravičiūtė

**Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus
kultūrų ekstraktų kiekybinis fitocheminių junginių ir
biologinio aktyvumo įvertinimas**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) 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 mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Aistė Svideravičiūtė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Svideravičiūtė, Aistė. Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūrų ekstraktų kiekybinis fitocheminių junginių ir biologinio aktyvumo įvertinimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: kaliaus kultūros, vaistinė medetka, fitohormonai, antioksidacinis aktyvumas, fermentai.

Kaunas, 2024. 59 p.

Santrauka

Vaistiniai augalai yra vertingas biologiškai aktyvių junginių šaltinis, plačiai naudojamas vaistuose, maisto prieduose, kosmetikos priemonėse bei nanodalelių sintezėje. Antriniai metabolitai pasižymi sudėtinga chemine struktūra ir farmakologinėmis savybėmis. Kadangi šie biologiškai aktyvūs junginiai plačiai naudojami daugelyje pramonės sektorių, atsiranda poreikis didinti antrinių metabolitų gamybą. Šiam tikslui taikomi biotechnologiniai audinių kultūrų metodai, kurie leidžia išsaugoti augalus bei pagerinti metabolitų biosintezę ir modifikuoti sintezės kelius. Tyrimo tikslas buvo nustatyti ir palyginti vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų terpėse su skirtingais fitohormonais bei priedais, ir *in vivo* ekstraktuose susidariusių fitocheminių junginių kitimus bei biologinį aktyvumą.

Tyrimas buvo atliekamas panaudojant vaistinės medetkos lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūras, kurios buvo augintos MS terpėse su skirtingais citokinais (0,5 mg/l BAP arba 0,5 mg/l TDZ) ir auksiniais (0,5 mg/l NAR arba 0,1 mg/l IAR). Siekiant gauti didesnes fitocheminių junginių koncentracijas bei stipresnį antioksidacinį ir antibakterinį poveikį, mitybinės terpės taip pat buvo papildytos 10 mg/l ZnO ir 1,25 g/l *L*-fenilalanino bei *L*-triptofano priedais. Vaistinės medetkos antioksidacinis aktyvumas buvo vertinamas DPPH, FRAP ir redukcinių savybių nustatymo metodais. Taip pat įvertintas ir antioksidacinių fermentų aktyvumas medetkos kaliaus kultūrų ekstraktuose. Gautuose rezultatuose reikšmingas skirtingų fitohormonų poveikis nenustatytas, tačiau 10 mg/l ZnO ir 1,25 g/l aminorūgščių priedai skatino didesnę kaliaus kultūrų antioksidacinį poveikį ir antioksidacinių fermentų aktyvumą. Tyrimais nustatyta, kad kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais, ekstraktuose gautos didesnės chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų, antocianinų ir *L*-prolino koncentracijos. Kaliaus kultūrų, augintų terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l, ekstraktuose nustatytos didesnės fenolinių junginių ir fenolinių rūgščių koncentracijos. Taip pat gauta, kad didesnę oksidacinę stresą patyrė vaistinės medetkos kaliaus kultūros, augintos su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais. *In vivo* ekstraktuose gautos didesnės fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų ir antocianinų koncentracijos bei askorbatperoksidazės aktyvumas, lyginant su *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktais. Stipriomis antibakterinėmis savybėmis vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktai nepasižymėjo. Didžiausias slopinamasis poveikis prieš *Escherichia coli* bakterijas nustatytas lapų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais, ekstrakto ($0,107 \pm 0,008$ cm).

Svideraivičiūtė Aistė. Quantitative Evaluation of Phytochemical Compounds and Biological Activity in Callus Cultures of *Calendula Officinalis* L. Extracts. Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: callus cultures, calendula, phytohormones, antioxidant activity, enzymes.

Kaunas, 2024. 59.

Summary

Medicinal plants are a valuable source of biologically active compounds that are widely used in pharmaceuticals, food additives, cosmetics, and nanoparticle synthesis. Secondary metabolites have complex chemical structures and pharmacological properties. The widespread use of these biologically active compounds in many industrial sectors creates a need for increased production of secondary metabolites. Biotechnological tissue culture techniques are used to preserve plants and improve metabolite biosynthesis and modify synthesis pathways. The aim of the study was to determine and compare the variation and biological activity of phytochemical compounds produced in *in vitro* callus cultures of *Calendula* grown in media with different phytohormones and additives and *in vivo* extracts.

The study was carried out using cultures of marigold leaf, stem and root callus grown in MS media supplemented with different cytokinins (0.5 mg/l BAP or 0.5 mg/l TDZ) and auxins (0.5 mg/l NAA or 0.1 mg/l IAA). To obtain higher concentrations of phytochemical compounds and stronger antioxidant and antibacterial effects, the nutrient media were also supplemented with 10 mg/l ZnO and 1.25 g/l *L*-phenylalanine and *L*-tryptophan. The antioxidant activity of *Calendula* was evaluated by DPPH, FRAP and reducing power assays. The antioxidant enzyme activity of *Calendula* callus culture extracts was also evaluated. No significant effect of the different phytohormones was detected, but the addition of 10 mg/l ZnO and 1.25 g/l amino acids promoted a higher antioxidant effect and antioxidant enzyme activity of *Calendula* cultures. Studies have shown that higher concentrations of chlorophyll *a* and *b*, carotenoids, anthocyanins, and *L*-proline were obtained in the extracts of callus cultures grown with 0.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA phytohormones. Higher concentrations of phenolic compounds and phenolic acids were detected in the extracts of callus cultures grown on media containing 0.1 mg/l IAA and 0.5 mg/l TDZ. It was also found that callus cultures grown with 0.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA phytohormones were subjected to higher oxidative stress. *In vivo* extracts showed higher concentrations of phenolic compounds, phenolic acids, flavonoids and anthocyanins, as well as ascorbate peroxidase activity, compared to *in vitro* callus culture extracts. The highest inhibitory effect against *Escherichia coli* was found in the extract of leaf callus cultures grown with 0.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA phytohormones (0.107 ± 0.008 cm).

Turinys

Lentelių sąrašas	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų ir terminų sąrašas	11
Įvadas	12
1. Literatūros apžvalga	13
1.1. Astrinių šeimos augalų charakteristika	13
1.1.1. Vaistinės medetkos (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.) charakteristika	13
1.2. Bioaktyviųjų metabolitų apibūdinimas vaistinės medetkos ekstraktuose.	14
1.2.1. Antioksidantai	14
1.2.2. Fenoliniai junginiai	15
1.2.3. Karotinoidai	16
1.3. Augalinių ekstraktų gavimo būdai	17
1.4. Vaistinės medetkos kaliaus kultūros <i>in vitro</i> augalų biotechnologijoje.	19
1.4.1. Fitohormonai	20
1.5. Vaistinės medetkos kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ekstraktų biologinis aktyvumas.	21
1.6. Vaistinės medetkos panaudojimo galimybės	22
1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	23
2. Medžiagos ir tyrimo metodai.....	24
2.1. Tyrimo objektas	24
2.2. Tyrimui naudoti reagentai	24
2.3. Tyrimams naudota aparatūra	24
2.4. Augalų sėklų sterilinimas	24
2.4.1. Vaistinės medetkos sėklų sterilinimas	24
2.5. Augimo reguliatorių paruošimas.....	24
2.6. Vaistinės medetkos antioksidacinio aktyvumo nustatymas	25
2.6.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu	25
2.6.2. Redukcinių savybių nustatymas	25
2.6.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP metodu	26
2.7. Vaistinės medetkos antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas	26
2.7.1. Superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas	26
2.7.2. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas	27
2.7.3. Katalazės aktyvumo nustatymas.....	28
2.7.4. Prolindehidrogenazės aktyvumo nustatymas.....	28
2.8. Fenolinių junginių įvertinimas	28
2.8.1. Bendras fenolinių junginių kiekybinis įvertinimas Folin-Ciocalteu‘o metodu	28
2.8.2. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas	29
2.9. Flavonoidų koncentracijos nustatymas.....	30
2.9.1. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas.....	30
2.10. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos nustatymas	31
2.11. <i>L</i> -Prolino nustatymas	31
2.12. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas.....	32
2.13. Antibakterinis aktyvumas.....	32
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	34
3.1. Vaistinės medetkos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	34
3.1.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu	34
3.1.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas redukcinių savybių nustatymo metodu	35
3.1.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu	36

3.1.4. Antioksidacinio aktyvumo tyrimų apibendrinimas	37
3.2. Vaistinės medetkos antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas	38
3.2.1. Superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas	38
3.2.2. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas	39
3.2.3. Katalazės aktyvumo įvertinimas.....	39
3.2.4. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas.....	40
3.2.5. Antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimo apibendrinimas.....	41
3.3. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas	41
3.3.1. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas	42
3.4. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas.....	43
3.4.1. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas	44
3.5. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas	45
3.6. <i>L</i> -Prolino koncentracijos įvertinimas.....	48
3.7. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas	48
3.8. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas	49
4. Rekomendacijų dalis	51
Išvados.....	53
Literatūros sąrašas.....	54
Priedai	60
1 priedas. MS maitinamosios terpės paruošimas	60
2 priedas. MS maitinamosios terpės paruošimui reikalingi reagentai	60
3 priedas. Vaistinės medetkos (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.) kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	60

Lentelių sąrašas

2.1 lentelė. Tyrimams naudota aparatūra	24
2.2 lentelė. Vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kultivavimo terpės	24
2.3 lentelė. LB maitinamosios terpės paruošimui reikalingi reagentai	32
3.1 lentelė. Vaistinės medetkos <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų antibakterinis aktyvumas prieš <i>Escherichia coli</i> bakterijas.....	49
4.1 lentelė. Technologinėje schemoje nurodytų dalių sąrašas	52

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. Vaistinė medetka (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.)	13
1.2 pav. Antioksidantų klasifikacija [16]	15
1.3 pav. Pagrindinė flavonoidų cheminė struktūra [23]	15
1.4 pav. Pagrindinių fenolinių rūgščių cheminės struktūros [26]	16
1.5 pav. Pagrindinių karotinoidų cheminės struktūros [31]	17
1.6 pav. Vaistinės medetkos biologinis aktyvumas [49]	21
2.1 pav. DPPH radikalo surišimo reakcija [62]	25
2.2 pav. Geležies sulfato kalibracinė kreivė.....	26
2.3 pav. Albumino kalibracinė kreivė	27
2.4 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė	29
2.5 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė.....	30
2.6 pav. L-Prolino kalibracinė kreivė	31
3.1 pav. DPPH radikalo slopinimas vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	34
3.2 pav. Redukcinių savybių įvertinimas vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	35
3.3 pav. Antioksidacinis aktyvumas vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	36
3.4 pav. Superoksido dizmutazės aktyvumas vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	38
3.5 pav. Askorbatperoksidazės aktyvumas vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	39
3.6 pav. Katalazės aktyvumas vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose... 40	40
3.7 pav. Prolindehidrogenazės aktyvumas vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	40
3.8 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	42
3.9 pav. Fenolinių rūgščių koncentracija vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	43
3.10 pav. Flavonoidų koncentracija vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	44
3.11 pav. Antocianinų koncentracija vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	45
3.12 pav. Chlorofilo <i>a</i> koncentracija vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	46
3.13 pav. Chlorofilo <i>b</i> koncentracija vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	46
3.14 pav. Karotinoidų koncentracija vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	47
3.15 pav. L-Prolino koncentracija vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	48
3.16 pav. MDA koncentracija koncentracija vaistinės medetkos <i>in vitro</i> kaliaus kultūrų ir <i>in vivo</i> ekstraktuose	49
3.17 pav. Vaistinės medetkos kaliaus kultūrų antibakterinis aktyvumas (A – ciprofloksacinas, B –	

visas augalas 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ, 1,25 g/l <i>L</i> -fenilalaninas, C – stiebai 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ, D – lapai 0,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAR)	50
4.1 pav. Aparatūrinė schema fenolinėms rūgštims gauti iš vaistinės medetkos (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.) kaliaus kultūrų	51

Santrumpų ir terminų sąrašas

BAP – 6-benzilaminopurinas;

NAR – 1-naftilacto rūgštis;

TDZ – 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urėja;

IAR – 3-indolilacto rūgštis;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas;

FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia;

SOD – superoksido dismutazė;

MDA – malondialdehidas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

NAD – β -nikotinamido adenino dinukleotidas;

LB – *Luria Bertani* terpė;

MS – *Murashige Skoog* terpė;

Įvadas

Augalai yra vertingas vaistinių medžiagų šaltinis, atliekantis gyvybiškai svarbų vaidmenį siekiant sumažinti bendras pasaulines sveikatos problemas. Pasaulio sveikatos organizacijos (WHO) duomenimis, daugiau nei 80 % pasaulio gyventojų naudojami tradicine liaudies medicina, kurios didžiąją dalį sudaro augalinės kilmės vaistai. Augalai kaupia daugybę biologiškai aktyviųjų medžiagų, kurios yra labai vertingos ir plačiai naudojamos ne tik vaistų, bet ir maisto, ir kosmetikos pramonėje bei turi panaudojimo perspektyvas metabolizmo inžinerijoje, optimizuojant genetinius ir reguliavimo procesus ląstelėse [1]. Šias bioaktyvias medžiagas sudaro augaluose biosintetiniai pirminiai ir antriniai metabolitai. Pirminiai metabolitai yra tarpiniai medžiagų apykaitos produktai, kurie yra būtini augalo vystymuisi ir augimui bei dalyvauja svarbiuose medžiagų apykaitos procesuose, tokiuose kaip kvėpavimas ir fotosintezė [1, 2]. Antriniai metabolitai yra pirminių metabolitų dariniai, jų vykdomi procesai nėra tiesiogiai susiję su augalų vystymuisi ir augimu, todėl jų sintetinama nedideliais kiekiais. Jie taip pat atlieka svarbias funkcijas, padeda prisitaikyti prie aplinkos sąlygų ir apsaugo augalus nuo aplinkos veiksnių [2, 3]. Antriniai metabolitai naudojami kaip agrochemikalai, vaistai, skonio ir kvapo medžiagos, maisto priedai ir pesticidai.

Sparčiai plečiantis farmacijos pramonės šakoms, priklausančioms nuo vaistiniuose augaluose biosintetinių antrinių metabolitų, kartu didėja ir šių augalų poreikis. Dėl itin sudėtingos biomolekulinės struktūros šių organinių junginių sintezė taikant cheminius ir įprastinius metodus yra sudėtingas ir brangus procesas. Todėl *in vitro* metodas augalų antrinių metabolitų gamybai yra perspektyvus ir tvarus būdas patenkinti didėjančius rinkos poreikius. Be to, augalų kaliaus kultūrų *in vitro* metodas yra veiksmingas ir geriausia alternatyva fitofarmacijos pramonei, ypač biologiškai aktyviųjų junginių tyrimuose ir gamybos bei genetikos tobulinimo srityse [4].

Astriniai (lot. *Asteraceae*) yra didžiausia pasaulyje žydinčių augalų šeima, pasižyminti plačia juose sintetinių bioaktyviųjų metabolitų įvairove [5]. Astrinių šeimai priklausanti vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.) pasižymi antibakteriniu, antivirusiniu, priešuždegiminiu, priešvėžiniu ir antioksidaciniu poveikiu bei gali būti panaudojama antrinių metabolitų gamybai kaliaus kultūrose *in vitro* [6].

Darbo tikslas - įvertinti bei palyginti kiekybinius fitocheminių junginių kitimus, biologinį aktyvumą vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktuose.

Darbo uždaviniai:

1. paruošti maitinamąsias terpes su skirtingais fitohormonais bei priedais (cinko oksidu, *L*-fenilalaninu ir *L*-triptofanu) ir suformuoti medetkos kaliaus kultūras *in vitro* steriliomis sąlygomis;
2. nustatyti ir palyginti medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, taikant DPPH, FRAP, redukcinių savybių metodus;
3. nustatyti medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktų superoksido dismutazės, katalazės, askorbatperoksidazės ir prolindehidrogenazės aktyvumą;
4. nustatyti fenolinių junginių, fenolinių rūgščių koncentracijas medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktuose;
5. nustatyti chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų, flavonoidų, antocianinų, *L*-prolino ir MDA koncentracijas medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktuose;
6. nustatyti antibakterinį aktyvumą medetkos kaliaus kultūrose *in vitro*.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Astrinių šeimos augalų charakteristika

Astrinių (lot. *Asteraceae*) šeima yra viena didžiausių žydinčių augalų šeimų, kuriai priklauso daugiau kaip 1600 genčių ir 25 000 rūšių visame pasaulyje. Jai priklauso nemažai gerai žinomų augalų rūšių: cikorija, saulėgraža, sėjamoji salota, gludas, jurginas ir margainis, taip pat nemažai medicininės reikšmės augalų, pavyzdžiui pelynas, ramunėlė, kiaulpienė ir medetka [7]. Astrinių šeimos augalai yra plačiai paplitę visuose pasaulio žemynuose, išskyrus Antarktidą. Jie randami miškuose, aukštikalnių pievose ir net žaliosiose miestų zonose, tačiau atogrąžų zonose šių augalų paplitimas yra kur kas retesnis. Astriniai taip pat pasižymi įvairia augalų morfologija. Kai kurios augalų rūšys yra medžiai, siekiantys daugiau kaip 30 m. Daugelis kitų šios augalų šeimos rūšių yra krūmai bei daugiametės arba vienmetės žolės. Patys mažiausi pavyzdžiai yra *Mnioides* genties augalai, randami Peru Anduose [8].

Daugelis Astrinių rūšių pasižymi įvairiu farmakologiniu poveikiu, kuris siejamas su jose esančiais fitocheminiais junginiais, įskaitant eterinius aliejus, lignanus, saponinus, polifenolinius junginius, fenolines rūgštis, sterolius ir polisacharidus. Šie fenoliniai ir antioksidaciniai junginiai turi biologinį aktyvumą ir padidina augalų bei juos vartojančių organizmų atsparumą stresinėms sąlygoms [8, 9]

1.1.1. Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) charakteristika

Vaistinė medetka (*Calendula officinalis* L.) – tūkstantmečius naudotas, gerai žinomas gydomasis augalas, priklausantis astrinių (*Asteraceae*) šeimai. Vaistinės medetkos žydėjimo periodas yra trumpas, Europoje jos žydi nuo birželio iki rugsėjo mėnesio. Medetkos gali užaugti iki 30–70 cm. Išskirtiniai augalo išvaizdos bruožai yra heterofilija (vieno individo apatiniai lapai yra kiaušiniški, o viršutiniai - lancetiški) ir krepšelio tipo žiedynas, sudarytas iš dviejų tipų žiedų (vadinamieji liguisti žiedai išorinėje žiedyno pusėje ir vamzdiški žiedai vidinėje žiedyno pusėje). Paprastai žiedynai būna geltonai oranžiniai, bet taip pat aptinkamos medetkų veislės su šviesiai geltonais ir tamsiai oranžiniais žiedais. Svarbu tai, kad visos augalo dalys yra padengtos daugialąsčiais liaukiniais plaukeliais, iš kurių gaminamas eterinis aliejus [10, 11].



1.1 pav. Vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.)

Vaistinė medetka (*Calendula officinalis* L.) auginama saulėtose vietovėse ir įvairiose dirvose. Natūralių medetkų augimviečių Europoje yra Viduržemio jūros regione ir artimuosiuose rytuose. Šiuo metu tai plačiai paplitęs ir vertinamas augalas, auginamas ir kitose Europos dalyse (Balkanuose, Rytų Europoje ir Vokietijoje) bei Šiaurės Amerikoje [12, 13].

1.2. Bioaktyviųjų metabolitų apibūdinimas vaistinės medetkos ekstraktuose.

Fitocheminiais tyrimais nustatyta, kad vaistinėje medetkoje yra kelių klasių cheminių junginių. Medetkos ekstrakto cheminėje sudėtyje rasta terpenoidų, chinonų, kumarinų, flavonoidų, eterinio aliejaus, karotinoidų ir aminorūgščių. Oranžinės *Calendula officinalis* rūšys turi daugiau angliavandenilių, o geltonosios – daugiausia deguoninių darinių. Pažangūs analitiniai ir fitocheminiai metodai, taikomi įvairioms augalų dalims, patvirtina, kad juose yra įvairių cheminių komponentų, tokių kaip izorhamnetinas, rutinas, kvercetas ir gliukozidas, kurie taip pat naudojami maisto ir kosmetikos pramonėje [12].

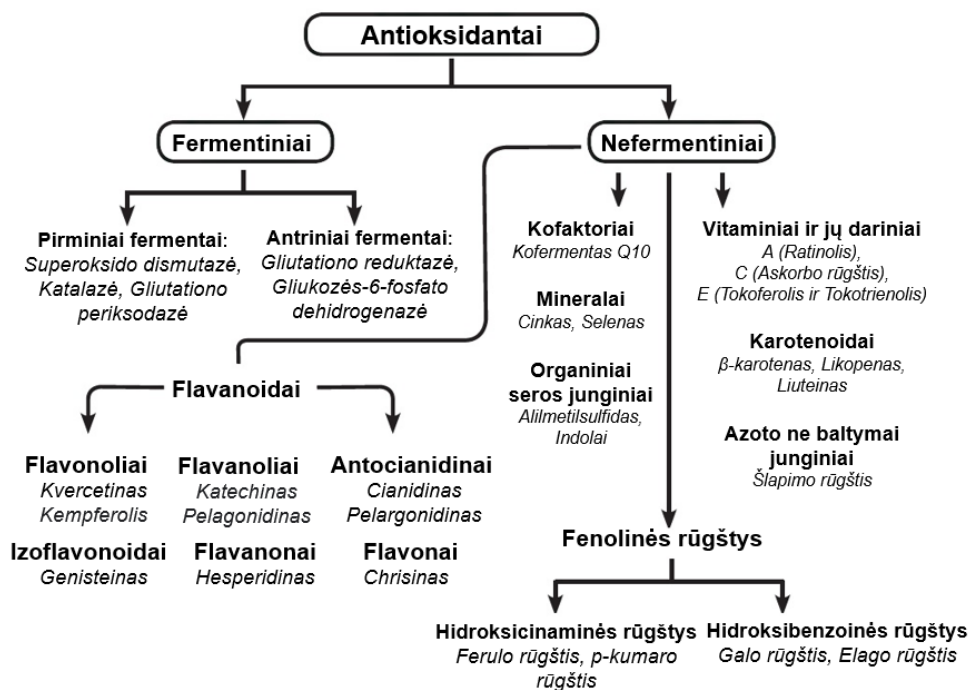
1.2.1. Antioksidantai

Antioksidantai – tai junginių grupės, neutralizuojančios ląstelėje esančius laisvuosius radikalus ir reaktyviasias deguonies formas. Antioksidantai apsaugo organizmą nuo laisvųjų radikalų žalos. Šie radikalai gali sukelti grandinines reakcijas, o kai grandininės reakcijos įvyksta ląstelėje, jos gali pažeisti ląstelę arba sukelti jos žūtį. Antioksidantai stabdo šias grandinines reakcijas, pašalindami laisvųjų radikalų tarpinius produktus ir slopindami kitas oksidacines reakcijas. Taigi, augalinės kilmės antioksidantų vartojimas padeda išvengti degeneracinių ligų, kurias sukelia oksidacinis stresas, tokių kaip vėžys, Parkinsono liga, Alzheimerio liga ar aterosklerozė [14, 15].

Antioksidantus galima suskirstyti į dvi pagrindines grupes: sintetinius ir natūralius. Natūralūs antioksidantai paprastai gaunami iš augalinių šaltinių, o jų aktyvumas skiriasi priklausomai nuo augalų rūšies, įvairovės, ekstrakcijos ir apdorojimo metodų bei auginimo sąlygų. Jų randama mikroorganizmuose, kai kurių gyvūnų audiniuose ir beveik visuose augaluose [16].

Antioksidantai klasifikuojami pagal įvairius požymius, jie gali būti skirstomi į endogeninius ir egzogeninius pagal jų šaltinius, į tirpius vandenyje ar lipiduose pagal jų tirpumą bei į fermentinius ir nefermentinius pagal jų poveikį [16].

- **Fermentiniai antioksidantai.** Fermentiniai antioksidantai veikia skaidydami ir šalindami laisvuosius radikalus. Šie antioksidaciniai fermentai šalina pavojingus oksidacinius produktus, paversdami juos vandenilio peroksidu ir vandeniu.
- **Nefermentiniai antioksidantai.** Nefermentiniai antioksidantai stabdo laisvųjų radikalų grandinines reakcijas. Pavyzdžiui, vitaminas E stabdo laisvųjų radikalų grandinę jau po penkių reakcijų [17].

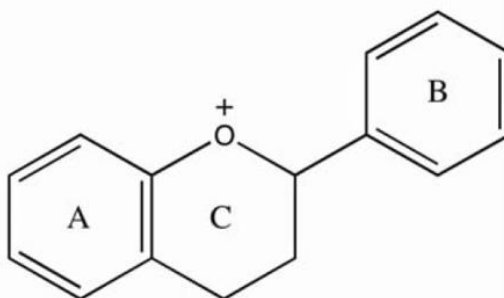


1.2 pav. Antioksidantų klasifikacija [16]

1.2.2. Fenoliniai junginiai

Fenoliniai junginiai yra antriniai metabolitai, kurių pagrindiniai sintezės pirmtakai yra fenilalaninas ir malonil-CoA, susidarantys atitinkamai šikimato kelyje ir Krebso cikle [18, 19]. Fenoliniai junginiai augaluose sintetunami kaip atsakas į ekologinį ir fiziologinį stresą, pavyzdžiui, patogenų ir vabzdžių atakas, UV spinduliuotę ir sužeidimus [20]. Pagrindinė fenolinių junginių struktūrinė ypatybė yra aromatinis žiedas su viena ar daugiau hidroksilo grupių. Augalų fenoliniai junginiai pagal fenolio grupių skaičių molekulėje skirstomi į paprastus fenolius arba polifenolius [21].

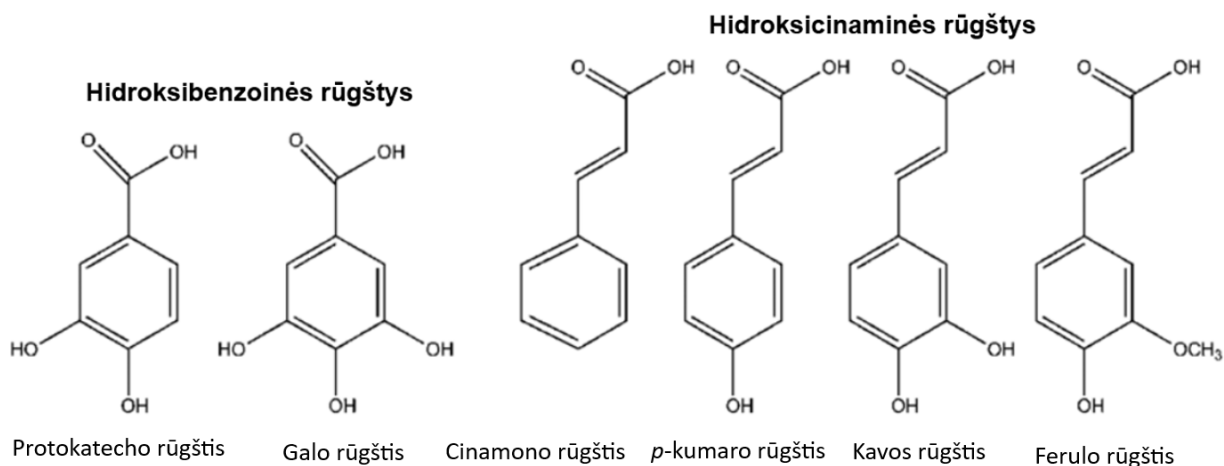
Flavonoidai. Flavonoidai yra vieni iš labiausiai paplitusių fenolinių junginių, kurie plačiai paplitę augalų audiniuose ir kartu su karotinoidais ir chlorofilais dažnai lemia mėlyną, violetinę, geltoną, oranžinę ir raudoną spalvas augaluose. Flavonoidų šeimai priklauso flavonai, flavonoliai, izoflavonoliai, antocianinai, antocianidinai, proantocianidinai ir katechinai. Visi flavonoidai yra kilę iš aromatinių aminorūgščių, fenilalanino ir tirozino, ir yra trijų žiedų struktūros. Flavonoidų struktūros skirtumai atsiranda ir priklauso nuo hidroksilinimo, prenilinimo, šarminimo ir glikozilinimo reakcijų, keičiančių pagrindinę molekulę, masto ir pobūdžio [20, 22].



1.3 pav. Pagrindinė flavonoidų cheminė struktūra [23]

Fenolinės rūgštys. Fenolinės rūgštys yra viena iš kitų pagrindinių augalų karalystės fenolinių

medžiagų klasių, jos būna esterių, glikozidų arba amidų pavidalu, tačiau retai būna laisvos formos. Fenolinės rūgštys skiriasi pagal hidroksilo grupių skaičių ir vietą aromatiniaame žiede. Fenolinės rūgštys turi dvi pirmines struktūras: hidroksicinamono ir hidroksibenzoinės rūgštį. Hidroksicinamono rūgšties dariniai yra ferulo, kavos, *p*-kumaro ir cinamono rūgštys, o hidroksibenzoinės rūgšties dariniai – galo, vanilino, siringo ir protokatecho rūgštys [24, 25].



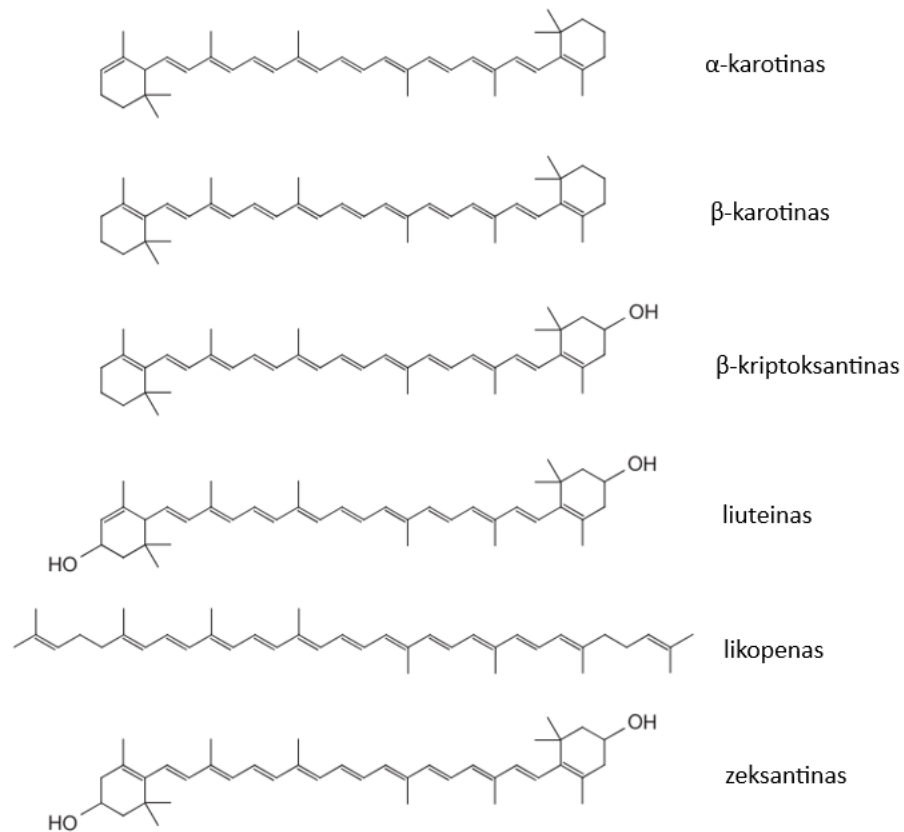
1.4 pav. Pagrindinių fenolinių rūgščių cheminės struktūros [26]

1.2.3. Karotinoidai

Karotinoidai yra gyvybiškai svarbių izoprenoidų metabolitų grupė. Tai vieni iš dažniausiai paplitusių natūralių pigmentų pasaulyje, kurių iki šiol aprašyta daugiau nei 600 skirtingų junginių. Augaluose karotinoidai yra būtini fotosintezei ir fotoprotekcijai. Jie atlieka svarbų vaidmenį kaip šviesą surenkantys pigmentai ir fotosistemų struktūriniai komponentai. Be to, karotinoidų dariniai gali veikti kaip augimo reguliatoriai arba kaip signalinės molekulės, reaguojančios į aplinkos ir vystymosi pokyčius. Karotinoidų sandaugos augalų žieduose, vaisiuose ir šaknyse nulemia jų ryškią oranžinę, geltoną ar raudoną spalvas bei turi didelę ekologinę ir agronominę vertę. Karotinoidai yra sintetinami tik augaluose, bakterijose, grybuose ir dumbliuose, o gyvūnai šiuos metabolitus pasisavina kartu su maistu [27, 28].

Karotinoidai ne tik atlieka svarbų vaidmenį augaluose, bet taip pat yra būtini žmonių mitybai ir sveikatai. Provitamino A karotinoidai, pvz., β -karotinas ir α -karotinas, yra su maistu gaunamo vitamino A pirmtakai, kuris būtinas regėjimui ir imuninei sistemai. Su maistu gaunami karotinoidai kaip antioksidantai sumažina įvairių lėtinių ligų, tokių kaip vėžys, širdies ir kraujagyslių ligos, atsiradimo riziką [28, 29].

Dauguma karotinoidų gali būti gaunami iš 40 angliavandenilių bazinės struktūros, kuri apima konjuguotų dvigubų ryšių sistemą. Pagrindinėje grandinėje gali būti ciklinių galinių grupių, kurios gali būti pakeistos deguonies turinčiomis funkcinėmis grupėmis. Pagal sudėtį karotinoidai skirstomi į dvi klases: karotinus, turinčius tik anglies ir vandenilio atomus, ir oksokarotinoidus (ksantofilus), kurie turi bent vieną deguonies atomą [27]. Karotinoidų polieno pagrindą sudarančių konjuguotų dvigubų ryšių struktūra lemia jų šviesos absorbcines savybes ir turi įtakos karotinoidų antioksidaciniam aktyvumui [30].



1.5 pav. Pagrindinių karotinoidų cheminės struktūros [31]

1.3. Augalinių ekstraktų gavimo būdai

Ekstrakcija – tai mediciniškai aktyvių augalų dalių atskyrimas naudojant selektyvius tirpiklius pagal standartinius metodus. Ekstrakcijos tikslas – atskirti tirpius augalų metabolitus, paliekant netirpius ląstelių liekanas. Šiais metodais gautuose pirminiuose neapdorotuose augalų ekstraktuose yra sudėtingas daugelio metabolitų mišinys. Kai kurie pirminiai augalų ekstraktai gali būti panaudojami kaip vaistinės medžiagos tinktūrų ar skystų ekstraktų pavidalu, tačiau kai kuriems ekstraktams yra reikalingas tolimesnis apdorojimas [32]. Biologiškai aktyvius junginius iš augalinių medžiagų galima išskirti įvairiais klasikiniiais ekstrahavimo būdais. Dauguma šių metodų pagrįsti naudojamų tirpiklių ekstrahavimo galia bei šilumos arba maišymo poveikiu [33].

Maceravimas. Tai vienas seniausių, medicininių preparatų paruošimo metodų. Maceravimas yra laikomas plačiai paplitusiu ir nebrangiu natūralių produktų gavimo iš augalinės medžiagos būdu. Maceravimas yra kietosios medžiagos skystyje ekstrakcijos metodas [32].

Šio proceso metu uždarame inde yra sumaišomi kietųjų medžiagų milteliai su pasirinktu tirpikliu. Mišinys laikomas nuo kelių valandų iki kelių dienų, turinį retkarčiais sumaišant. Tirpikliui pakanka laiko difunduoti per ląstelių sieneles ir ištirpinti augalinėje žaliavoje esančias sudedamąsias dalis. Šis procesas vyksta tik molekulinės difuzijos būdu. Po tam tikro laiko ekstraktas yra nusunkiamas, o likusios nuosėdos supresuojamos siekiant išgauti kuo didesnę ekstrakto kiekį. Kai maceravimo metu kaip tirpiklis naudojamas vanduo, o ekstrakcija trunka ilgai, galima įpilti nedidelį kiekį alkoholio, kad būtų išvengta nepageidaujamų mikroorganizmų augimo. Maceravimo metu retkarčiais supurtant mišinį yra palengvinama ekstrakcija. Taip padidėja tirpiklio difuzija per ląstelių sieneles ir nuo mėginio paviršiaus yra pašalinamas koncentruotas tirpalas, tam kad į suspensiją patektų naujo tirpiklio ir ekstrakcijos išėiga būtų didesnė [34, 35].

Perkoliacija. Šis ekstrakcijos metodas dažniausiai naudojamas veikliosioms medžiagoms išskirti ruošiant tinkūras ir skystuosius ekstraktus. Paprastai naudojamas perkolatorius – siauras, abiejuose galuose atviras, kūgio formos indas [34].

Kieta augalinė žaliava yra sudrėkinama atitinkamu tirpiklio kiekiu ir paliekama stovėti maždaug 4 valandas gerai uždarytame inde. Po to drėgna masė yra suspaudžiama ir perkolatoriaus viršus uždaromas. Į indą įpilamas papildomas tirpiklio kiekis, kad virš masės susidarytų negilus sluoksnis, ir mišinys paliekamas maceruoti uždarytame perkolatoriuje 24 h. Po paros perkolatoriaus išleidimo anga atidaroma ir leidžiama lėtai lašėti jame esančiam skysčiui. Esant poreikiui įpilamas papildomas tirpiklio kiekis, kol perkolatas sudaro maždaug tris ketvirtadalius reikiamo galutinio produkto tūrio. Ekstraktas yra presuojamas ir į perkolatą įpilamas reikalingas tirpiklio tūris. Gautas ekstraktas nuskaidrinamas filtruojant arba dekantuojant nusistovėjusią suspensiją. Procesas kartojamas tol, kol iš perkolatoriaus išgaravęs tirpiklio lašas nepalieka likučių [34, 35].

Soksleto ekstrakcija. Šis metodas, pavadintas vokiečių žemės ūkio chemiko Franzo Ritterio von Soksleto vardu. Tai geriausias metodas, leidžiantis nepertraukiamai ekstrahuoti kietąją medžiagą karštu tirpikliu. *Soksleto* aparatas yra specializuotas stiklinis refluksavimo įrenginys, dažniausiai naudojamas organinių tirpiklių ekstrakcijai. Soksleto ekstrakcija yra bendras ir gerai žinomas metodas, kuris savo veiksmingumu pranoksta kitus įprastinius ekstrakcijos metodus, išskyrus termolabilių junginių ekstrakciją, ribotose taikymo srityse [35].

Susmulkinta, miltelių pavidalo kieta augalinė medžiaga suvyniojama į filtravimo popierių, ir įdedama į *Soksleto* aparatą. Prie aparato prijungiama apvaliadugnė kolba su tirpikliu ir grįžtamasis kondensatorius. Tirpiklis kolboje švelniai užverda, garai pro šoninį kanalėlį kyla į viršų, kondensuojasi kondensatoriuje. Susikondensavę tirpiklio garai laša atgal į ekstraktorių ant bandinių ir lėtai užpildo *Soksletą*. Tirpiklio kondensatui ekstraktoriuje pasiekus sifoninio vamzdelio viršutinį lygį, skystis suteka į apvaliadugnę kolbą. Procesas kartojamas tol, kol pasiekama visiška ekstrakcija [33, 34].

Hidrodistiliacija. Tai tradicinis augalinių medžiagų ekstrakcijos metodas, kuriam nenaudojami organiniai tirpikliai. Atliekant hidrodistiliaciją, augalinė medžiaga suberiama į distiliavimo kamerą, įpilamas pakankamas kiekis vandens ir užvirinama. Alternatyviu būdu, į augalinę mėginį gali būti tiesiogiai įpurškiami garai. Karštas vanduo ir garai yra pagrindiniai veiksniai, darantys įtaką augalų audiniuose esančių biologiškai aktyvių junginių išskyrimui. Netiesioginis aušinimas vandeniu kondensuoja vandens ir aliejaus garų mišinį. Hidrodistiliacija yra potencialiai labai naudingas metodas eteriniam aliejui išgauti iš įvairių augalų ir skirtingų jų dalių. Gauta produkto išeiga priklauso nuo įvairių proceso parametrų, tokių kaip žaliavos svoris, vandens tūris, žaliavos dydis ir pobūdis. Hidrodistiliacija apima tris pagrindinius fizikinius ir cheminius procesus: hidrodifuziją, hidrolizę ir skilimą veikiant auštai temperatūrai. Esant aukštai ekstrakcijos temperatūrai gali būti prarandami kai kurie lakieji komponentai. Šis trūkumas riboja hidrodistiliacijos panaudojimą termolabilių junginių ekstrakcijai [33, 34].

Ekstrakcija mikrobangomis. Taikant šį metodą mikrobangų energija palengvina veikliųjų medžiagų atskyrimą iš augalinės medžiagos į tirpiklį. Mikrobangos turi elektrinį ir magnetinį laukus, kurie yra statmeni vienas kitam. Elektros srovė generuoja šilumą dėl dipolinio sukimosi ir joninio laidumo. Kadangi tirpiklio dielektrinė skvarba yra didelė, mėginio temperatūra greitai pakyla. Skirtingai nuo klasikinių metodų, mikrobangų pagalba atliekamoje ekstrakcijoje vienu metu

kaitinamas visas mėginys. Ekstrakcijos metu šiluma suardo silpnus vandenilinius ryšius dėl molekulių dipolinės rotacijos, o ištirpusių jonų migracija padidina tirpiklio skverbimąsi į mėginį arba matricą [35].

Ekstrakcija ultragarsu. Ekstrakcija ultragarsu apima didelio intensyvumo, aukšto dažnio garso bangų naudojimą ir jų sąveiką su medžiagomis. Tai pažangus metodas, kuriuo per trumpesnę ekstrakcijos laiką galima išgauti didelį kiekį biologiškai aktyvių junginių. Pagrindinis šio metodo privalumas yra, kad dėl akustinių kavitacijų sukeliama ląstelių sienelių suardymo padidėja tirpiklio skverbtis į matricą. Be to, tai pasiekama esant žemai temperatūrai, todėl šis metodas labiau tinka termiškai nestabiliems junginiams ekstrahuoti [35].

Veikiant ultragarsu kietosios ir skystosios dalelės vibruoja ir greitėja, todėl tirpiklis greitai difunduoja iš kietosios fazės į tirpiklį. Padidinus ultragarso intensyvumą skystyje, intramolekulinės jėgos nebegali išlaikyti nepažeistos molekulinės struktūros, todėl ji suyra ir susidaro burbulai, šis procesas vadinamas kavitacija. Burbulų suirimas gali sukelti fizikinį, cheminį ir mechaninį poveikį, kuris suardo biologines membranas ir palengvina ekstrahuojamų junginių išsiskyrimą bei pagerina tirpiklio skverbimąsi į ląsteles ir masės pernašą [36].

Ekstrakcija superkritiniu skysčiu. Veikliosioms medžiagoms išgauti gali būti naudojamos superkritinės dujos, pavyzdžiui, anglies dioksidas, azotas, metanas, etanas, etilenas, azoto oksidas, sieros dioksidas, propanas, propilenas, amoniakas ir sieros heksafluoridas. Augalinė medžiaga laikoma dujų pripildytame inde, esant kontroliuojamoms sąlygoms, pavyzdžiui, temperatūrai ir slėgiui. Dujose ištirpusios veikliosios medžiagos atsiskiria, kai temperatūra ir slėgis yra žemesni. Vienas svarbiausių šio metodo veiksnių yra tirpalo masės pernaša superkritiniame tirpiklyje. Paprastai šio proceso metu didžiausią įtaką darantys veiksniai yra temperatūra ir slėgis, tačiau slėgio poveikis yra tiesiogiškesnis. Didėjant slėgiui, pasiekiamas didesnis superkritinio skysčio tankis. Didėjant terpės tankiui didėja ir tirpiklio tirpumas. Didesnei galutinio produkto išėigai gauti, proceso parametrai turi būti optimizuoti [37, 38].

1.4. Vaistinės medetkos kaliaus kultūros *in vitro* augalų biotechnologijoje.

Terminas audinių kultūra, dar vadinamas ląstelių, auginamų *in vitro*, arba steriliomis kultūromis. Audinių kultūros turi didelę reikšmę tiek fundamentiniuose, tiek taikomuosiuose tyrimuose. Šis terminas vartojamas plačiąja prasme, apimant augalų ląstelių, audinių ir organų auginimą *in vitro* [39].

Taikant audinių kultūrų metodus augalų audiniai ar ląstelės yra kultivuojami sterilioje aplinkoje ir kontroliuojamomis sąlygomis, leidžiant reguliuoti jų augimą ir vystymąsi įvairiais tikslais. Vienu iš šių metodų, naudojant kaliaus kultūras *in vitro*, laboratorinėmis sąlygomis, bet kuriuo metu galima pagaminti norimo kiekio ir pastovios kokybės farmakologiškai aktyvias molekules [40]. Atskirų izoliuotų ląstelių kultivavimo *in vitro* metodas parodė, kad somatinės ląstelės tinkamomis sąlygomis gali diferencijuotis į visą augalą. Šis ląstelės potencialas augti ir vystytis į daugialąstelinį organizmą yra pagrindinis audinių kultūros principas ir vadinamas ląstelių totipotencija. *In vitro* kultūra yra viena iš pagrindinių augalų biotechnologijos priemonių, naudojančių augalų ląstelių totipotenciją [41]. *In vitro* kultūrų metodai yra nepakeičiami greitai dauginant retų genotipų ir ligoms atsparius augalus, transformuojant augalų genomą ir gaminant svarbios komercinės vertės augalinius metabolitus [42].

Audinių kultūroms paprastai yra naudojama MS terpė, kurią 1962 m. išrado mokslininkai Toshio Murashige'as ir Folke K. Skoog'as [39]. MS terpę sudaro visi pagrindiniai makroelementai, tokie kaip azotas, fosforas, kalis, kalcis, magnis, siera ir mikroelementai, tokie kaip geležis, manganas, cinkas, varis, boras, chloras, molibdenas ir nikelis, vitaminai (tiaminas, nikotino rūgštis, piridoksinas ir mioinozitolis), augimo reguliatoriai ir 2-3 % sacharozės, kaip anglies šaltinis. Agaras dažniausiai naudojamas ruošiant pusiau kietas arba kietas mitybines terpes, tačiau kartais naudojamos ir kitos stingdančios medžiagos: želatina, agarozė, alginatas ir gelritas. Terpės pH (5,0-6,0) paprastai yra stabilus, o geresnių rezultatų pasiekama, kai terpėje yra nitratų ir amonio jonų, kaip azoto šaltinių. Dažniausiai naudojami augalų augimo reguliatoriai yra augalų fitohormonai ir jų sintetiniai analogai [43].

1.4.1. Fitohormonai

Augalų augimą ir ląstelių ilgėjimą lemia tam tikros augale nedideliais kiekiais susidarančios ir veikliosios medžiagos, turinčios hormonų pobūdį. Fitohormonai yra biologiškai aktyvūs junginiai, gaunami augalų biosintezės būdu ir veikiantys labai mažomis koncentracijomis bei reguliuojantys įvairius ląstelių procesus bei augalų reakcijas į kintančias aplinkos sąlygas. Fitohormonai gali veikti vietiškai, jų sintezės vietoje, arba gali būti pernešami į kitas augalo dalis, kad skatintų jų augimą ir vystymąsi tiek aplinkos, tiek stresinėmis sąlygomis. Taigi fitohormonai atlieka svarbų vaidmenį tarpininkaujant augalų atsakui į abiotinį stresą [44, 45].

Labiausiai ištirti šie augaliniai hormonai: citokininai, auksinai, giberelinai, abscizo rūgštis, etilenas, brasinosteroidai ir žasmonatai. Tradiciškai manoma, kad žasmonatai ir etilenas atlieka apsauginę funkciją augaluose, o auksinai, citokininai, giberelinai ir brasinosteroidai yra susiję su augalų vystymusi. Abscizo rūgštis yra pagrindinis hormonas, reguliuojantis augalų atsaką į abiotinį stresą. Tačiau pastaraisiais metais šis sąrašas papildytas naujais junginiais, pavyzdžiui, poliaminiais, azoto oksidu ir strigolaktonu. Mokslininkai Cetin'as ir kt. [40] atliko tyrimus, kuriuose buvo siekiama nustatyti *Calendula officinalis* augalo skilčialapių eksplantų antimikrobinį poveikį kaliaus kultūrose *in vitro*. Kai kurių tyrimų rezultatai atskleidė, kad auksinai atlieka svarbų vaidmenį formuojant kaliaus kultūrą. Be to, jie parodė, kad citokininai skatino auksinų poveikį suformuojant kaliaus kultūras. Buvo nustatyta, kad daugelyje audinių kultūrų tyrimų, kuriuose buvo naudojami augalų augimo reguliatoriai, t. y. BAP iš citokininų ir NAR iš auksinų, kaliaus kultūros susidarymas buvo didelis [44, 45].

Citokininai. Natūraliai paplitę citokininai yra N6 pakeisti adenino dariniai, turintys aromatinę arba izoprenoidinę šoninę grandinę. Šis fitohormonas atlieka svarbų vaidmenį keliuose augalų augimo ir vystymosi procesuose, įskaitant citokinezę, ląstelių diferenciaciją, augimo ir ramybės būsenas, asimiliatų pernešimą ar senėjimą. Šiems procesams taip pat turi įtakos ir įvairūs kiti veiksniai (pvz., šviesa ir kiti fitohormonai). Citokininai taip pat dalyvauja reaguojant į abiotinį stresą [46, 47].

Auksinai. Auksinai reguliuoja įvairius augalų augimo ir vystymosi procesus, įskaitant gyslinių audinių diferenciaciją, šaknų formavimąsi, embriogenezę, fitotaksį ir tropinę reakciją. Todėl genai, dalyvaujantys auksino biosintezėje, pernašoje ir signalų perdavime, yra svarbūs biotechnologiniai taikiniai, skirti augalų dydžiui ir formai keisti bei išeigai didinti. 3-Indolilacto rūgštis buvo pirmasis nustatytas šios grupės fitohormonas [44, 48].

Giberelinai. Gibelerelinai sudaro didelę tetraciklinių diterpenoidinių junginių grupę, kurie yra svarbūs augalų vystymuisi, stiebo ilgėjimui, sėklų dygimui, lapų plėtimuisi ir hormonų homeostazei.

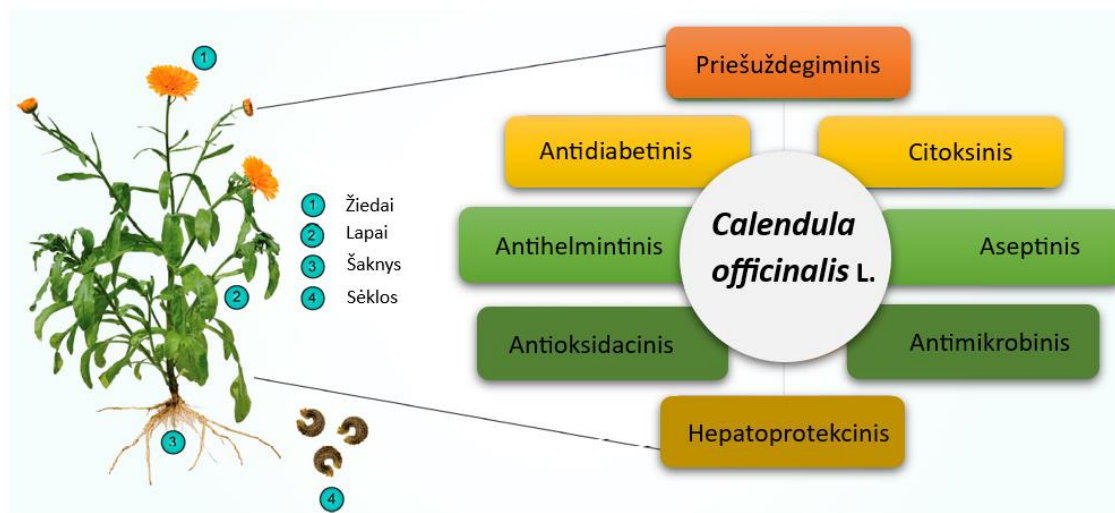
Gibelerelinų trūkumas lemia augalų stiebų bei lapų augimo apribojimus. Šie hormonai taip pat atlieka svarbų vaidmenį reaguojant į abiotinį stresą ir prisitaikant prie jo. Gibelerelinai yra itin svarbūs fitohormonai, turintys įtakos augalų dydžiui ir biomasės gamybai [44, 45].

Abscizo rūgštis. Abscizo rūgštis reguliuoja keletą augalų fiziologinių procesų ir vystymosi etapų, įskaitant sėklų ramybės būseną ir vystymąsi, embriono morfogenezę, žiotelių atsidarymą, taip pat atsarginių baltymų ir lipidų sintezę. Jis taip pat vadinamas streso hormonu, nes atlieka svarbų vaidmenį augalams reaguojant į abiotinį stresą. Abscizo rūgštis dalyvauja apsauginių baltymų, osmoprotektorių, antioksidacinių fermentų sintezėje ir yra atsakingas už turgorinio slėgio palaikymą. Abscizo rūgšties kiekis augaluose didėja reaguojant į aplinkos veiksnius [44, 45].

Etilenas. Etilenas yra dujinis fitohormonas, dalyvaujantis augalų augime ir vystymesi ypač žiedų senėjimo, vaisių brandimo, lapų ir žiedlapių abscesijos procesuose, ir yra pagrindinis augalų atsako į biotinį ir abiotinį stresą tarpininkas. Etileno signalizacijos kelias yra signalo perdavimas augalų ląstelėse, siekiant reguliuoti svarbius augimo ir vystymosi procesus. Etileno signalizacijos kelias vis dar nėra iki galo ištirtas, tačiau yra žinoma, kad jis apima etileno receptorius (ETR1/2, ERS1/2, EIN4), represorinį baltymą CTR1, baltymus EIN3/EIL1 ir etileno atsako faktorius. Šie transkripcijos veiksniai savo ruožtu atlieka esminį vaidmenį padedant augalui prisitaikyti prie stresinių sąlygų, kurias sukelia patogenai, sužalojimai, karščio ir šalčio stresas, UV spinduliai, druskingumas ir sausra [44, 45].

1.5. Vaistinės medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų biologinis aktyvumas.

Vaistinė medetka (*Calendula officinalis* L.) homeopatinėje medicinoje yra dažnai naudojamas augalas. Jis veikia kaip antimikrobinis, antioksidacinis, priešuždegiminis, antiseptinis, antivirusinis vaistas. Nustatyta, kad vaistinių medetkų ekstraktai pasižymi hepatoprotekcinėmis savybėmis, apsaugančiomis nuo anglies tetrachlorido sukulto citotoksiškumo ir oksidacinio streso. Medetkų ekstraktas didina bendrą hemoglobino kiekį, o jo konsistencija yra panaši į insulino, todėl atlikti tyrimai atskleidė, kad hidroalkoholiniam vaistinės medetkos ekstraktui būdingos antidiabetinės bei antihiperlipideminės savybės. Be to, jis pasižymi citoksininiu poveikiu ir gali slopinti navikų augimą. Vaistinėje medetkoje taip pat aptinkama saponinų, sukeliančių antihelminčių poveikį [12, 49].



1.6 pav. Vaistinės medetkos biologinis aktyvumas [49]

Antimikrobinis vaistinės medetkos poveikis buvo pirmą kartą nustatytas kartu su antioksidaciniu poveikiu ir apsauginiu poveikiu nuo UV-H₂O₂ sukeltų DNR pažeidimų. Atlikta pirminė fitocheminė analizė ir DPPH bei FRAP tyrimų rezultatai patvirtina antimikrobinį ir antioksidacinį vaistinės medetkos ekstrakto poveikį [50].

Džiovinti vaistinės medetkos lapų milteliai taip pat pasižymi antibakteriniu aktyvumu su įvairiomis bakterijų padermėmis, tokiomis kaip *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Candida albicans* ir *Escherichia coli*. Antimikrobiniais tyrimais nustatyta, kad vaistinės medetkos lapų chloroforminis, vandeninis ir etanolinis ekstraktai pasižymi antibakteriniu poveikiu *Gram* teigiamoms ir *Gram* neigiamoms bakterijoms, tuo tarpu augalo angliavandeniliniai ekstraktai nepasižymi reikšmingu antibakteriniu aktyvumu, o priešgrybelinio aktyvumo šie ekstraktai nerodo [50, 51]. Karnwal'o [52] atliktuose tyrimuose buvo siekiama nustatyti vaistinės medetkos antibakterinį potencialą. Nustatyta, kad vaistinės medetkos vandeninio ekstrakto minimali slopinamoji koncentracija buvo 3,75 % *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Listeria monocytogenes* padermėms. Tačiau mažiausia minimali baktericidinė koncentracija (1,87 %) nustatyta *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* ir *Staphylococcus aureus* atžvilgiu. Vaistinės medetkos etanolinis ekstraktas pasižymėjo mažiausia minimalia slopinamąja koncentracija ir mažiausia baktericidine koncentracija tik vienam bakteriniam patogenui, *Pseudomonas aeruginosa*, atitinkamai 3,75 % ir 1,87 %.

Vaistinių medetkų lapai ir žiedlapiai gali būti natūralus antioksidantų šaltinis. Didelis flavonoidų ir fenolinių fitocheminių medžiagų kiekis turi įtaką medetkų antioksidaciniam aktyvumui. Nustatyta, kad medetkų ekstraktas šalina hidroksilo ir superoksido radikalus, kurie susidaro dėl riboflavino fotoredukcijos [49, 53]. Pandey'o ir kt. [54] atliktuose tyrimuose buvo siekiama nustatyti vaistinės medetkos lapų ir žiedų antioksidacines savybes taikant TBA (tiobarbitūro rūgštis) ir FTC (geležies tiocianato) metodus. Rezultatai parodė, kad antioksidantų koncentracija mažėja mažėjant absorbcijos vertei. Lyginant su įprastais vitaminais C ir E, lapų ir žiedlapių vandeninis ekstraktas pasižymėjo dideliu antioksidaciniu poveikiu pagal absorbcijos rodiklius. Tai, kad žiedlapių vandeninis ekstraktas pasižymėjo mažesne absorbcija atliekant tyrimus tiek FTC, tiek TBA metodais, rodo, kad žiedlapiai pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei lapai.

1.6. Vaistinės medetkos panaudojimo galimybės

Šiuolaikinėje fitoterapijoje, kaip ir liaudies medicinoje, vaistinės medetkos žiedų ekstraktai naudojami dermatologinėms ligoms gydyti. Daugelyje mokslinių šios rūšies augalų tyrimų daugiausia dėmesio skirta priešūždegiminėms ir greitesnio žaizdų gijimo savybėms. Priešūždegiminį aktyvumą lemia terpenoidinių junginių buvimas, kuo didesnis šių junginių kiekis, tuo stipresnis augalinio ekstrakto poveikis. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad vaistinių medetkų žiedynų ekstrakto tepalo naudojamas sumažina dermatito atsiradimo atvejus krūtis vėžiu sergantiems žmonėms, kuriems taikoma radioterapija. Be to, ant odos žaizdų naudojami vaistinės medetkos ekstraktų tepalai pagreitina jų gijimą, nes padidina epidermio epitelizaciją. Nauji tyrimai rodo, kad ant žaizdų uždedami medetkų poli-ε-kaprolaktono ir gumiarabiko nanokompozitai padidina ląstelių adheziją ir proliferaciją bei pasižymi antibakteriniu poveikiu. Vaistinės medetkos žiedynų ekstraktai taip pat gali būti naudojami venų opoms, nudegimams ir kitiems sunkiai gyjantiems odos pokyčiams gydyti. Preparatai, kurių sudėtyje yra medetkų žiedų ekstraktų, gali būti naudojami neinvaziniam ir subtiliam gydymui, sunkiai gydomoms padų papulėms, skausmingiems hiperkeratoziniais pažeidimams ir „Hallux Valgus“ uždegimui [55, 56].

Vaistinė medetka yra plačiai naudojama kosmetikos pramonėje, ypač dėl moksliai įrodytų priešūždegiminių, antioksidacinių ir odos pažeidimus gydančių savybių. Medetkos dažniausiai aptinkamos kosmetikos priemonėse, pasižyminčiose raminamuoju, minkštinamuoju ir regeneruojamuoju poveikiu. Tyrimais įrodyta, kad kremas su vaistinės medetkos žiedų ekstraktu stimuliuoja odos ląstelių regeneraciją, gerina elastingumą ir didina odos drėkinimą dėl mažesnio transepiderminio vandens netekimo. Taip pat įrodyta, kad kremas su vaistinės medetkos žiedynais mažina riebalų išsiskyrimą ir šviesina odą, nes sumažina melanino kiekį joje. Medetkų ekstraktai taip pat pasižymi senėjimą stabdančiu poveikiu, kuris yra susijęs su metaloproteinazių sekrecijos kontrole. Kosmetologijoje taip pat naudojamas vaistinių medetkų aliejus. Įrodyta, kad jis stipriau nei nistatinas slopina patogeninių grybelių padermes. Naudojamas emulsijose, jis pagreitina žaizdų gijimą ir apsaugo odą nuo UV spindulių. Be to, vaistinės medetkos aliejus pasižymi stipresniu antioksidaciniu aktyvumu nei pelargonijų aliejus [55, 57].

Vaistinė medetka taip pat plačiai naudojama ir maisto pramonėje bei kulinarijoje. Džiovinti medetkų žiedai yra naudojami kaip sriubų ir pyragų prieskoniai bei yra laikomi šafrano pakaitalu. Medetkų žiedai taip pat naudojami kaip natūralūs dažikliai, jais dažomi ryžiai, margarinas ir sūriai. Medetkų žiedų naudojimo maiste saugumas yra patvirtintas Europos maisto saugos tarnybos (EFSA) dokumentuose [55].

Pastaraisiais metais mokslininkai daug dėmesio skiria veiksmingų žaliosios chemijos metodų kūrimui, skirtų metalų nanodalelių sintezei. Vienas iš perspektyviausių metodų yra augalų ekstraktų panaudojimas. Augaluose sintetamos nanodalelės yra stabilesnės ir jų sintezė vyksta greičiau nei mikroorganizmuose [58]. Baghizadeh'as ir kt. [59] atliko sidabro nanodalelių sintezę naudojant vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) sėklų ekstraktą skystoje fazėje. Hernández-Díaz'as ir kt. [60] panaudodami vaistinės medetkos ekstraktą atliko seleno nanodalelių sintezę. Susidariusios nanodalelės buvo identifikuotos įvairiais analitiniais metodais, tokiais kaip UV-VIS spektroskopija, elektronine mikroskopija, rentgeno spindulių difrakcija ir FTIR spektroskopija.

1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Mokslinėje literatūroje vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.) apibūdinama kaip stipriomis antioksidacinėmis ir antibakterinėmis savybėmis pasižymintis augalas. Šios ir kitos savybės priklauso nuo medetkoje kaupiamų bioaktyvių junginių, tokių kaip fenolinės rūgštys, karotinoidai, chlorofilai, antocianinai, flavonoidai, antioksidaciniai fermentai ir kt. Dėl itin didelio ir įvairaus veikliųjų medžiagų kiekio, vaistinė medetka yra pačiai naudojama medicinos ir kosmetikos pramonėse. Siekiant užtikrinti norimas stabilių bei farmakologiškai aktyvių molekulių koncentracijas medicininiuose augaluose, taikomi įvairūs audinių kultūrų kultivavimo metodai.

Laboratorinėmis sąlygomis užaugintos vaistinės medetkos *in vitro* ir *in vivo* kaliaus kultūros buvo tiriamos siekiant nustatyti antioksidacines ir antibakterines savybes bei jas lemiančias bioaktyviųjų metabolitų koncentracijas augale. Norint pagerinti vaistinės medetkos augimą ir padidinti veikliųjų medžiagų ir koncentracijas naudoti skirtingi fitohormonai, aminorūgščių bei mikroelementų priedai.

2. Medžiagos ir tyrimo metodai

2.1. Tyrimo objektas

Šio projekto tiriamuoju objektu buvo pasirinkta *Astrinių* šeimai priklausanti vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.). Tyrimai buvo atliekami panaudojant sudžiovintas kaliaus kultūras (iš lapų, stiebų ir šaknų), kurios buvo auginamos MS mitybinėje terpėje su skirtingais fitohormonais, aminorūgštimis ir priedais.

2.2. Tyrimui naudoti reagentai

1. Acetato buferis (pH 3,6; 300 mM);
2. Natrio fosfatinis buferis (pH 6,6; 0,2 M);
3. KCl buferis (pH 1);
4. NaOAc buferis (pH 4,5);
5. K/Na fosfatinis buferis (0,066 M);
6. K/Na fosfatinis buferis (0,05 M);
7. Karbonatinis buferis (pH 10,3);
8. Tris-HCl buferis (40 mM);
9. Fosfatinis buferis (pH 7, 0,1 M);
10. Tris-HCl (pH 7,8, 0,05 M);
11. TPTZ (10 mmol) ištirpintas HCl (40 mmol/L);
12. $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/L);
13. $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (2000 $\mu\text{mol/L}$);
14. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 %);
15. Trichloracto rūgštis (10 %);
16. Ledinė acto rūgštis;
17. H_3PO_4 ;
18. Trichloracto rūgštis (20 %)
19. Askorbo rūgštis (0,5 mM);
20. Natrio šarmas (40 g/L);
21. HCl (18 g/l);
22. Vandensilio peroksidas (0,1 mM);
23. FeCl_3 (0,1 %);
24. Acetonas (70 %);
25. Etanolis (96 %);
26. Etanolis (50 %);
27. Metanolis (80 %);
28. DPPH etaloninis tirpalas;
29. Folin-Ciocalteu reagentas
30. Ninhidrininis reagentas;
31. Arnovo reagentas;
32. Aliuminio chloridas (2 %);
33. *L*-metioninas (10 mM);
34. *L*-prolinas (0,02 M);
35. Riboflavinas (3 μM);
36. Polivinilpirolidonas;
37. Nitromėlynasis tetrazolis (54 μM);
38. Ditiotritolis (1 mM);
39. Fenilmetilsulfonilfluoridas (0,5 mM);
40. Tritonas X-100 (0,025 %);
41. Tritonas X-100 (0,05 %);
42. DMSO;
43. EDTA (0,1 mM);
44. NAD (100 mM).

2.3. Tyrimams naudota aparatūra

2.1 lentelė. Tyrimams naudota aparatūra

Prietaisas	Modelis	Gamintojas
Kratytuvas	ZX3	VELP Scientific
Laminaras	BV-100 Laminar Flow Cabinet	Telstar
Svarstyklės	ATX84	Shimadzu
pH-metras	-	WinLab
Centrifuga	UNIVERSAL 320R	HETTICH
Mikrocentrifuga	D-6015 Mini Centrifuge	neoLab
Autoklavas	CV-EL	Certoclav
Spektrofotometras	UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer	Shimadzu
Termostatinė vonelė	ULTRATHERM BWT-U	Biosan

2.4. Augalų sėklų sterilinimas

Tiriamąjį augalo sėklų sterilinimas atliekamas pašalinti sėklų paviršiuje esančius mikroorganizmus ir užtikrinti kaliaus kultūrų *in vitro* grynumą. [61].

2.4.1. Vaistinės medetkos sėklų sterilinimas

Vaistinės medetkos sėklos suberiamos į medžiaginį maišelį ir patalpinamos į stiklinę. Į stiklinę įpilama 70 % etanolio ir laikoma 1 min. Etanolis nupilamas ir sėklos užpilamos ir mirkomos 10 min 1,5 % NaOCl. Tirpalas nupilamas, sėklos plaunamos steriliu distiliuotu vandeniu tris kartus.

2.5. Augimo reguliatorių paruošimas

Kultivuojamo augalo savybėms pagerinti mitybinė terpė praturtinama skirtingomis veikliosiomis medžiagomis. Pradiniam tiriamosios medžiagos tirpalui (0,1 mg/ml) paruošti pasveriami 10 mg tiriamojo junginio. Milteliai suberiami į matavimo kolbą ir ištirpinami 2 – 5 ml distiliuoto vandens. Tiriamajam junginiui ištirpus tirpalas praskiedžiamas iki 100 ml distiliuotu vandeniu. 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).

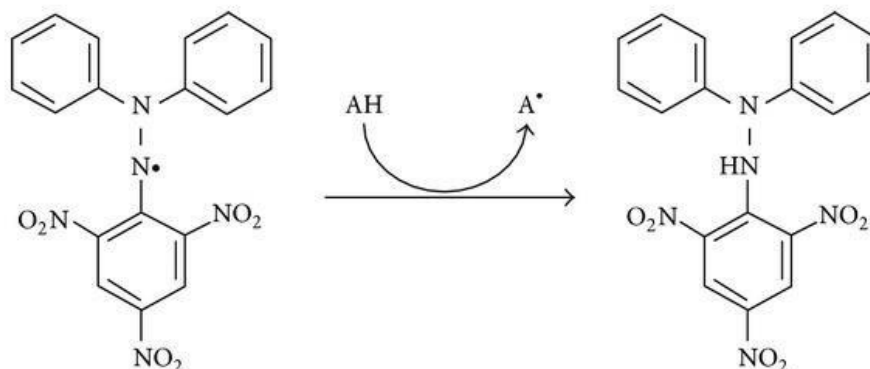
Vaistinės medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* analizei paruoštos skirtingos maitinančios terpės praturtintos fitohormonais.

2.2 lentelė. Vaistinės medetkos *in vitro* kultivavimo terpės

Maitinamoji terpė
MS+BAP (0,5 mg/l)+NAR (0,5 mg/l)
MS+BAP (0,5 mg/l)+NAR(0,5 mg/l)+ZnO (10 mg/l)
MS+IAR (0,1 mg/l)+TDZ (0,5 mg/l)
MS+IAR (0,1 mg/l)+TDZ (0,5 mg/l)+L-Fenilalaninas (1,25 g/l)
MS+IAR (0,1 mg/l)+TDZ (0,5 mg/l)+L-Triptofanas (1,25 g/l)

2.6. Vaistinės medetkos antioksidacinio aktyvumo nustatymas

2.6.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu



2.1 pav. DPPH radikalo surišimo reakcija [62]

0,2 g susmulkintos augalinės žaliavos užpilama 2 ml metanolio ir homogenizuojama 10 min kambario temperatūroje. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 minučių ir supernatantas surenkamas.

Tiriamąjį tirpalą ruošiamas. Atskirame mėgintuvėlyje sumaišoma 0,077 ml gauto supernatanto su 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir laikomas tamsoje 15 minučių.

Palyginamojo tirpalo ruošiamas. Mėgintuvėlyje sumaišoma 0,077 ml metanolio su 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.

Etaloninio DPPH tirpalo ruošiamas. 0,0024 g DPPH radikalo suberiama į 100 ml talpos matavimo kolbą ir ištirpinama metanolyje.

Tirpalų šviesos sugertis matuojama spektrofotometru 515 nm bangos ilgyje. DPPH radikalo slopinimas apskaičiuojamas pagal (2.2) formulę:

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

čia A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis, A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis [63, 64].

2.6.2. Redukcinių savybių nustatymas

0,1 g susmulkintos augalinės medžiagos ekstrahuojama metanolyje 5 ml 30 min, 45°C temperatūros vandens vonelėje. Ekstraktas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 minučių ir surinktas supernatantas naudojamas tyrimams.

Paruošiamas 0,00125 g/ml koncentracijos vaistinės medetkos ekstrakto mėginys.

0,5 ml X koncentracijos mėginio sumaišoma su 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio ir 1,25 ml 1% $K_3[Fe(CN)_6]$. Tirpalas sumaišomas ir inkubuojamas 20 min 50°C temperatūros vandens vonelėje. Po to pridedama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišoma. Tirpalas centrifuguojamas 9000 aps/min 5 min.

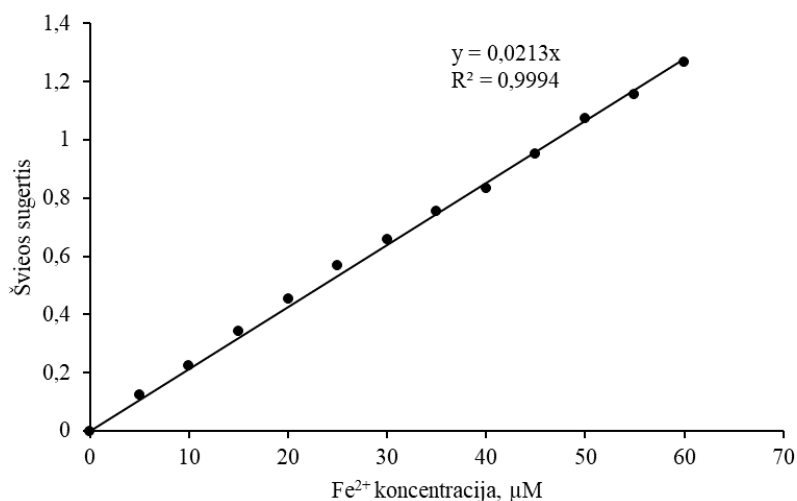
Nucentrifuguoto tirpalo 1,25 ml sumaišoma su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % FeCl₃. Tuščias mėginys ruošiamas 1 ml 0,2 M fosfatinio buferio sumaišant su 1,0 ml 1% K₃[Fe(CN)₆]. Tirpalų šviesos sugertis matuojama spektrofotometru 700 nm bangos ilgyje. Didesnė šviesos sugertis identifikuoja didesnes redukcines savybes [63].

2.6.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP metodu

0,1 g susmulkintos augalinės medžiagos ekstrahuojama metanolyje 5 ml 30 min, 45°C temperatūros vandens vonelėje. Ekstraktas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 minučių ir surinktas supernatantas naudojamas tyrimams.

FRAP reagento ruošiamas. 25 ml 300 mM acetato buferio sumaišoma su 2,5 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 2,5 ml FeCl₃ x 6H₂O (20 mmol/L).

Kalibracinės kreivės ruošiamas. FeSO₄ x 7 H₂O (5, 10, 15, 20; 25 μmol/L). Reikšmė apskaičiuojama pagal kalibracinę kreivę μmol/L Fe(II)/L. Tuščias kalibracinės kreivės mėginys bus 3 ml FRAP ir 7 ml H₂O.



2.2 pav. Geležies sulfato kalibracinė kreivė

Antioksidacinio aktyvumo nustatymas. 20 μL nucentrifuguoto supernatanto sumaišoma su 80 μL metanolio. Mėginiai yra sumaišomi su 3 ml FRAP reagentu. Tuščias mėginys ruošiamas 100 μL metanolio sumaišant su 3 ml FRAP reagento. Reakcijos mišinys matuojamas 593 nm bangos ilgyje spektrofotometriškai [63, 64].

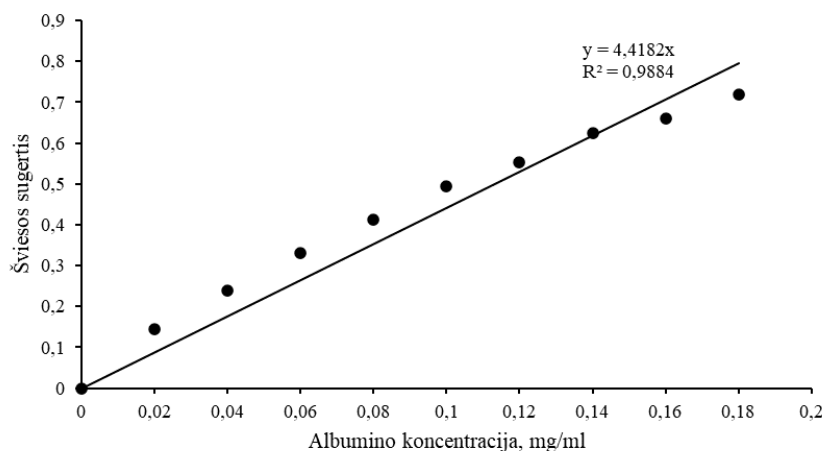
2.7. Vaistinės medetkos antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas

2.7.1. Superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas

0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos ekstrahuojama 4 ml 0,066 M K/Na fosfatinio buferio (pH 7,4), turinčiame 1 mM ditionitritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1-3 mg polivinilpirolidono. Mėginys maišomas kratytuve 10 min 25 °C temperatūroje, po to 10 min centrifuguojamas 9000 aps/min ir pakartotinai centrifuguojamas *Eppendorf* mėgintuvėliuose.

Tirpių baltymų nustatymas. 200 μl mėginio sumaišoma su 2 ml Bradfordo reagento ir išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje.

Baltymo kalibracinės kreivės sudarymas. Kalibracinės kreivės sudarymui paruoštas 1 mg/ml albumino tirpalas (25 mg albumino ištirpinama 25 ml distiliuoto vandens). Ruošti 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,12, 0,14, 0,16 ir 0,18 mg/ml koncentracijos albumino tirpalai skiesti iki 10 ml distiliuotu vandeniu.



2.3 pav. Albumino kalibracinė kreivė

Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas. Paruošiamas 2 ml reakcijos mišinys, kuriame sumaišyta 40 µl fermentinio preparato, 400 µl 200 mM Tris-HCl buferio (pH=7,8), 200 µl 100 mM L-metionino; 200 µl 540 µM nitromėlynojo tetrazolio, 500 µl 0,1 % Tritono X-100 ir 20 µl 300 µM riboflavino ir 640 µl distiliuoto vandens. Paruošiamas kontrolinis mėginys be fermentinio preparato. Reakcija atliekama apšviečiant liuminescentinėmis lempomis 30 min. Kaip kontrolė naudojamas mišinys be fermentinio preparato. Tirpalo šviesos sugertis matuojama 560 nm bangos ilgyje. Fermento aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.3) formulę:

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

čia A – SOD aktyvumas vnt/mg, E_K – šviesos sugertis kontrolinio bandinio, E_T – šviesos sugertis tiriamojo bandinio, m – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml (iš kalibracinės kreivės) [64].

2.7.2. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas

0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos sumaišoma su 4 ml 0,1 M fosfatinu buferiu (pH=7). Mėginys homogenizuojamas termostatuojamame kratytuve 10 min 25 °C ir centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min. Gautas supernatantas pakartotinai centrifuguojamas *Eppendorf* mėgintuvėliuose 5 min.

Į 200 µl gauto ekstrakto įpilami 3 ml 0,1 M fosfatinio buferio (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 mėginius 290 nm bangos ilgyje, įpilami 0,06 ml 0,1 mM vandenilio peroksido. Šviesos sugertis matuojama reakcijos pradžioje ir po 40 min inkubacijos 30°C temperatūroje. Askorbatperoksidazės aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.4) formulę:

$$A = \frac{\Delta E_{min} \times \left(\frac{V}{1000} + V_{buf} + V_{peroks}\right)}{k \times m}; \quad (2.4)$$

čia A – fermento aktyvumas, mmol/mg, $\Delta\bar{E}_{\min}$ – šviesos sugerties vidurkis, V – pavyzdžio tūris, μl , V_{buf} – buferio tūris, ml, V_{peroks} – vandenilio peroksido tūris, ml, k – molinės ekstinkcijos koeficientas 2,8 nmol/cm, m – baltymo masė preparato tūryje, mg. (Baltymo koncentracija apskaičiuojama pagal kalibracinę kreivę paruoštą pagal albuminą) [64].

2.7.3. Katalazės aktyvumo nustatymas

0,1 g susmulkinta augalinė žaliava ekstahuojama 4 ml 0,05 M K/Na fosfatinio buferio (pH=7,8). Mėginys homogenizuojamas termostatuojamame kratytuve 10 min 25 °C ir centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min. Gautas supernatantas pakartotinai centrifuguojamas *Eppendorf* mėgintuvėliuose 5 min.

100 μl gauto ekstrakto sumaišoma su 3900 μl 0,05 M K/Na fosfatinio buferio. Prieš matavimą į reakcijos mišinį įpilama 0,2 ml 0,025 M vandenilio peroksido. Šviesos sugerties matuojama reakcijos pradžioje ir po 40 min 30 °C, 240 nm bangos ilgyje. Katalazės aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.5) formulę:

$$A = \frac{1000 \times \Delta\bar{E} \times V}{k \times m}; \quad (2.5)$$

A – katalazės aktyvumas vnt/mg, $\Delta\bar{E}$ – šviesos sugerties vidurkis, V – bendras mišinio tūris, ml, k – molinės ekstinkcijos koeficientas 32,57 [64].

2.7.4. Prolindehidrogenazės aktyvumo nustatymas

0,1 g augalinės žaliavos susmulkinama ir vykdoma ekstrakcija 4 ml ekstrakcijos buferio (pH=7,8). Mėginys homogenizuojamas termostatuojamame kratytuve 10 min 25 °C ir centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min. Gautas supernatantas pakartotinai centrifuguojamas *Eppendorf* mėgintuvėliuose 5 min.

Į 400 μl gauto ekstrakto įpilami 1800 μl karbonatinio buferio pH=10,3 ir 1800 μl 0,02 M *L*-prolino. Prieš matavimą į reakcijos mišinį įpilama 100 μl 100 mM NAD. Šviesos sugerties matuojama reakcijos pradžioje ir po 3 min, 340 nm bangos ilgyje. Prolindehidrogenazės aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.6) formulę:

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

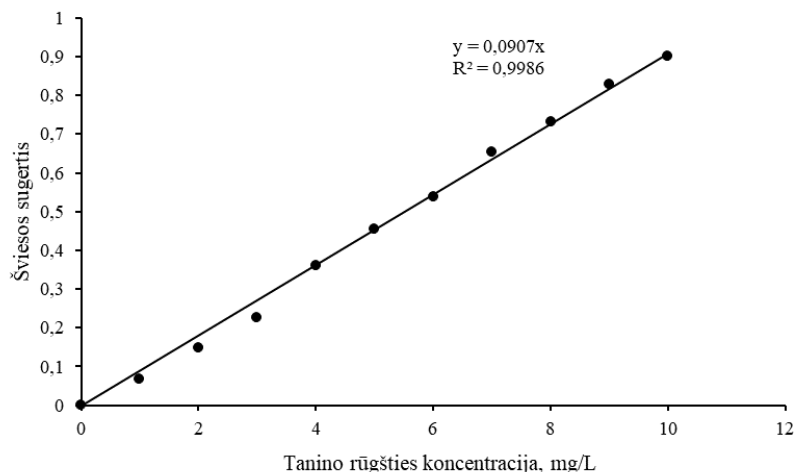
A – prolindehidrogenazės aktyvumas $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \times \text{min}$, $\Delta\bar{E}$ – šviesos sugerties pokytis po 3 min ir pradžioje, V – bendras mišinio tūris, ml, k – molinės ekstinkcijos koeficientas 6,22 $\mu\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, m – baltymo masė preparato tūryje, mg. (Baltymo koncentracija apskaičiuojama pagal kalibracinę kreivę) [65].

2.8. Fenolinių junginių įvertinimas

2.8.1. Bendras fenolinių junginių kiekybinis įvertinimas Folin-Ciocalteu'o metodu

0,05 g susmulkintos augalinės medžiagos homogenizuojama 10 ml acetono tirpalo ir maišoma kratytuve, kambario temperatūroje, 20 min. Mėginys centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min 4 °C temperatūroje bei pakartotinai centrifuguojamas 2 min *Eppendorf* mėgintuvėliuose.

Tanino rūgšties kalibracinės kreivės sudarymas. 0,0; 20; 40; 60; 80; 100, 120 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo praskiedžiama iki 500 µl. Į paruoštus 2, 3, 4, 5 ir 6 mg/L koncentracijos tirpalus pridedama 250 µl Folin-Ciocalteu'o reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir inkubuojama kambario temperatūroje 40 min tamsoje. Tirpalo šviesos sugertis matuojama 725 nm bangos ilgyje prieš tuščią mėginį.



2.4 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas. 30 µl ekstrakto praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 500 µl. Mėginys sumaišomas su 250 µl Folin-Ciocalteu'o reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Tirpalo šviesos sugertis matuojama 725 nm bangos ilgyje po 40 min laikymo tamsoje. Apskaičiuojama bendra fenolinių junginių koncentracija pagal tanino rūgšties ekvivalentą (mg/100 g) pagal (2.7) formulę:

$$x = aV \times \frac{100}{n}; \quad (2.7)$$

čia a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibracinės kreivės, mg/l, V – pradinis ekstrakto tūris l, n – augalinė masė, g [64, 66].

2.8.2. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas

0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos homogenizuojama 2,5 ml distiliuoto vandens, 30 min termostatuojame kratytuve, 25 °C temperatūroje. Tirpalas centrifuguojama 9000 aps/min 10 min ir gautas supernatantas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 5 ml.

Fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas. 1 ml ekstrakto sumaišoma su 5 ml distiliuoto vandens, 1 ml HCl (18 g/l), 1 ml Arnovo reagentu, 1 ml natrio šarmu (40 g/L) ir praskiedžiama iki 10 ml distiliuotu vandeniu. Tuščias bandinys ruošiamas be ekstrakto. Tirpalo šviesos sugertis išmatuojama 490 nm bangos ilgyje. Fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį % apskaičiuojama iš (2.8) formulės:

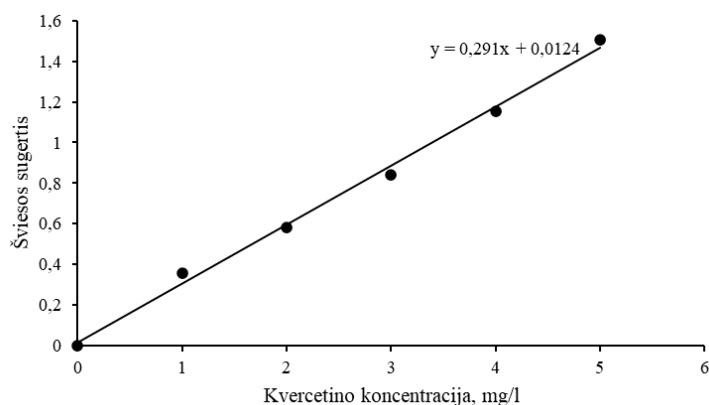
$$\% = \frac{A \times 1.7544}{m}; \quad (2.8)$$

čia A – šviesos sugerties reikšmė, m – augalinė masė, g [67].

2.9. Flavonoidų koncentracijos nustatymas

0,5 g susmulkintos augalinės žaliavos homogenizuojama 24 val., 5 ml 80 % metanolio, 150 rpm. Homogenatas nucentrifuguojamas 9000 aps/min 10 min.

Kvercetino kalibracinės kreivės sudarymas. Kalibracinės kreivės sudarymui paruoštas 1 mg/ml kvercetino tirpalas (1 mg kvercetino ištirpinama 1 ml metanolio). Ruošti 1, 2, 3, 4, 5 ir 6 mg/L koncentracijos kvercetino tirpalai su 0,15 ml 2% aliuminio chlorido bei praskiesti iki 10 ml su metanolio.



2.5 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė

Flavonoidų koncentracijos nustatymas. 0,1 ml augalinio ekstrakto praskiedžiamas iki 1 ml su 80 % metanolio. Į mišinį įpilamas 1 ml 2 % aliuminio chlorido ir paliekama stovėti 30 min. Tirpalo šviesos sugertis matuojama 415 nm bangos ilgyje. Flavonoidai apskaičiuojami pagal (2.9) formulę:

$$C = \frac{C_1 \times V}{g}; \quad (2.9)$$

čia C_1 – kvercetino koncentracija mg/ml pagal kalibracinę kreivę, V – ekstrakto pradinis tūris, ml, g – augalinė masė, g [66].

2.9.1. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas

0,2 g susmulkintos augalinės medžiagos sumaišoma su 5 ml 50 % C_2H_5OH ir homogenizuojama 25 °C temperatūroje 15 min. Suspensija centrifuguojama 10 min 9000 aps/min. Į 980 μl KCl buferį (pH 1) ir 980 μl NaOAc buferį (pH 4,5) įpilama po 1 ml ekstrakto. Abiejų tirpalų šviesos sugertis išmatuojama 510 nm ir 700 nm bangos ilgiuose. Tuščias mėginys yra 50 % C_2H_5OH . Bendroji antocianinų koncentracija apskaičiuojama pagal (2.10) formulę:

$$BAK = (A \times M \times PF) \times \frac{1000}{\epsilon}; \quad (2.10)$$

čia BAK – bendroji antocianinų koncentracija miligramai cianidin-3-gliukozido ekvivalento 100 g, A – absorbcija = $(A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 1}} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH 4,5}}$, M – molekulinė masė (449,2 g/mol), PF – praskiedimo faktorius, ϵ – cianidin-3-gliukozido (Cy_3G) molinis adsorbcijos koeficientas (26900 l/mol cm) [68].

2.10. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos nustatymas

1 g susmulkintos augalinės medžiagos sumaišoma su 20 ml 96% C₂H₅OH, po to viskas susmulkinama iki vientisos masės ir centrifuguojama 9000 aps/min 10 min. Filtratas supilamas į matavimo kiuvetę ir matavimai atliekami spektrofotometru 662 nm (chlorofilo A), 644 nm (chlorofilo B) ir 441 nm (karotinoidai) bangų ilgiuose.

Pigmentų koncentracija apskaičiuojama pagal (2.11 – 2.15) formules:

$$\text{Chlorofilo } a \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_a = 9,784D_{662} - 0,99D_{644}; \quad (2.11)$$

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_b = 21,426D_{644} - 4,65D_{662}; \quad (2.12)$$

$$C_a + C_b = 5,134D_{662} + 20,436D_{644}; \quad (2.13)$$

$$\text{Karotinoidų koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_{\text{karotinoidai}} = 4,695D_{441} - 0,268(C_a + C_b); \quad (2.14)$$

Pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuojamas:

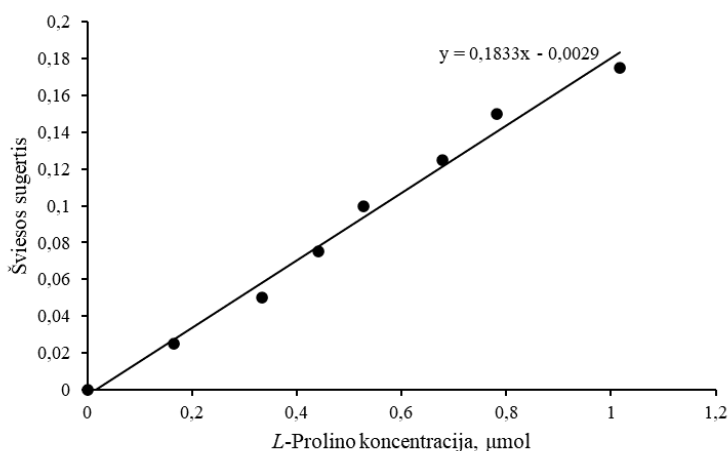
$$X = CVV_2 \times \frac{100}{nV_1} \times 1000; \quad (2.15)$$

čia *C* – pigmentų koncentracija mg/l, *V* – pradinis ekstrakto tūris, *V*₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui, *V*₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml, *n* – augalinė masė, g [66].

2.11. L-Prolino nustatymas

0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos sumaišoma su 4 ml distiliuoto vandens ir kaitinama 3 min 95 °C temperatūroje ir atšaldoma. Procesas pakartojamas du kartus ir gauta suspensija centrifuguojama 10 min 9000 aps/min. Po centrifugavimo gautas ekstraktas nupilamas ir praskiedžiamas iki 6 ml.

Prolino kalibracinės kreivės sudarymas. Kalibracinės kreivės sudarymui 0,0011 g *L*-proliino ištirpinama 10 ml H₂O (1 mM). Ruošti 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175 μmol koncentracijos *L*-proliino tirpalai ir skiedžiami iki 1 ml distiliuotu vandeniu. Į gautus tirpalus pridedama po 1 ml acto rūgšties ir ninhidrininio reagento.



2.6 pav. *L*-Prolino kalibracinė kreivė

Prolino koncentracijos nustatymas. Sumaišoma 1 ml ekstrakto, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio

reagento ir kaitinama 1 val vandens vonelėje. Kontrolinis mėginys ruošiamas be ekstrakto sumaišant 1 ml distiliuoto vandens, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir kaitinama 1 val vandens vonelėje. Šviesos sugertis matuojama 520 nm bangos ilgyje. Prolino koncentracija apskaičiuojama naudojantis kalibracine kreive (*L*-proline) pagal (2.16) formulę:

$$C_x = \frac{E \times k \times V_{bendras}}{V_{paimta} \times m}; \quad (2.16)$$

čia C_x – prolino koncentracija $\mu\text{mol/g}$, E – tirpalo šviesos sugertis, k – *L*-proline kiekis, gautas pagal kalibracinę kreivę (μmol), $V_{bendras}$ – bendras ekstrakto tūris, ml, V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml, m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g [69].

2.12. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas

0,1 g susmulkinta augalinė žaliava homogenizuojama su 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi ir maišomas kratyvuve 10 min 25 °C. Mėginys centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min 4 °C. Supernatantas sumaišomas su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi ir inkubuojamas 95 °C vandens vonelėje 30 min. Po kaitinimo mėginys atšaldomas ir centrifuguojamas 15 min 9000 aps/min. Šviesos sugertis išmatuojama 532 ir 600 nm bangos ilgiuose. Malondialdehido koncentracija apskaičiuojama pagal (2.17) formulę:

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \times V_e \times 2}{k \times m_s \times V_a}; \quad (2.17)$$

čia C_x – malondialdehido koncentracija $\mu\text{mol/g}$, E – tirpalo šviesos sugertis, 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 – bandinio masė, g [70].

2.13. Antibakterinis aktyvumas

Antibakterinio aktyvumo nustatymui *Petri* lėkštelėse paruošiama ir autoklavuojama *Luria Bertani* (LB) maitinamoji terpė (7 pH). Terpės sudėtis pateikta 2.4 lentelėje.

2.3 lentelė. LB maitinamosios terpės paruošimui reikalingi reagentai

Medžiaga	Koncentracija, g/L
Natrio chloridas	10
Triptonas	10
Mielių ekstraktas	5
Mikro agaras	10

E.coli bakterijų suspensija išmatuojama spektrofotometriškai 600 nm bangos ilgyje. Suspensija praskiedžiama maitinamąja terpe tiek, kad šviesos sugertis siektų 0,1.

0,2 g susmulkinta augalinė žaliava sumaišoma su 2 ml DMSO tirpalu ir ekstrahuojama nuo 7 iki 14 dienų. Ekstraktas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 minučių. Tyrimui naudojamas antibiotikas – ciprofloksacinas.

Petri lėkštelėse ant maitinamosios terpės paviršiaus užlašinama 50 μl *Escherichia coli* bakterijų suspensijos ir paskirstoma sterilia kilpele po visą terpę. Lėkštelėje paskirstomi 6 filtrinio popieriaus diskeliai ant kurių užlašinami 50 μl paruošto augalinio ekstrakto. Kontroliniame mėginyje ant diskelių

užlašunami 50 µl ciprofloksacino. Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūros termostate 48 valandas. Antibakterinis augalinio ekstrakto poveikis nustatomas išmatuojant skaidrią zoną aplink diskelį, kuri identifikuoja bakterijų augimo slopinimą [63, 64].

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

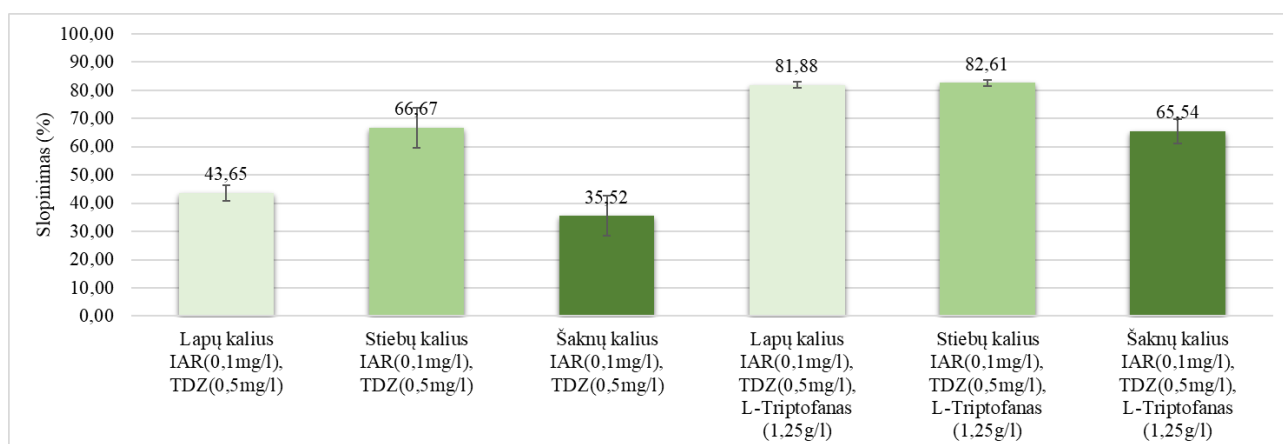
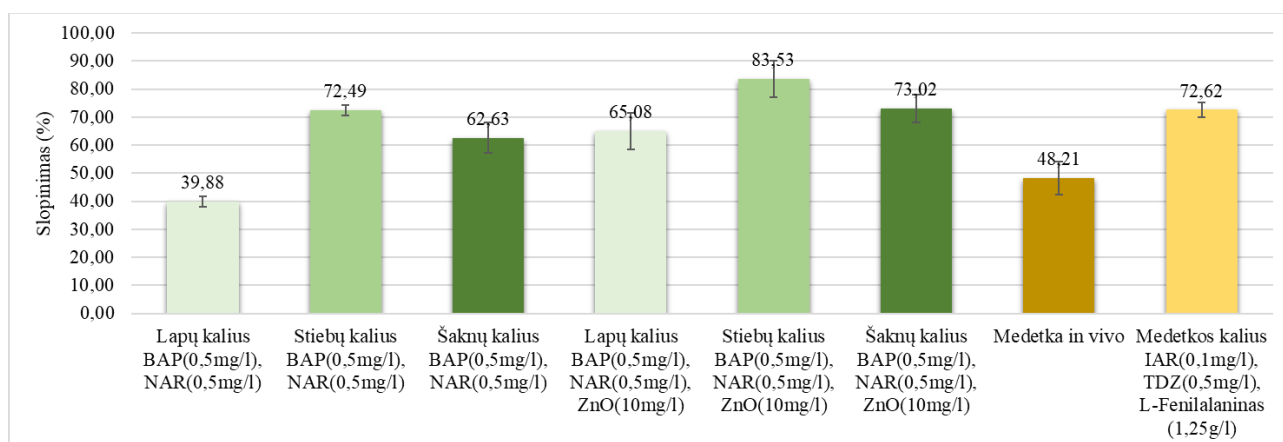
3.1. Vaistinės medetkos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui įvertinti buvo taikomi DPPH, FRAP ir redukcinių savybių nustatymo metodai.

3.1.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Atliktas DPPH tyrimas parodė, kad vaistinės medetkos eksplantai, auginti MS maitinamojoje terpėje su skirtingais fitohormonais ir aminorūgščių bei cinko oksido priedais pasižymėjo skirtingu DPPH radikalo slopinimo poveikiu. Gauti rezultatai (3.1 pav.) parodė, kad didžiausiu slopinamuoju poveikiu pasižymėjo vaistinės medetkos stiebų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais bei 10 mg/l ZnO priedu, ekstraktas (83,53±6,46 %). Mažiausias slopinamasis poveikis gautas šaknų kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais (35,52±7,61 %), ekstrakto.

Iš visų eksplantų gautų kaliaus kultūrų, augintų maitinamojoje terpėje su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ ir 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu, ekstrakto DPPH radikalo slopinimas gautas 33,61 % didesnis, nei vaistinės medetkos *in vivo* ekstrakto. Medetkos kaliaus kultūrų, augintų su 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu, ekstraktuose DPPH radikalo slopinimas nustatytas 39,89, 8,19 ir 37,10 % didesnis, nei lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrų, augintų be *L*-fenilalanino priedo, ekstraktuose.



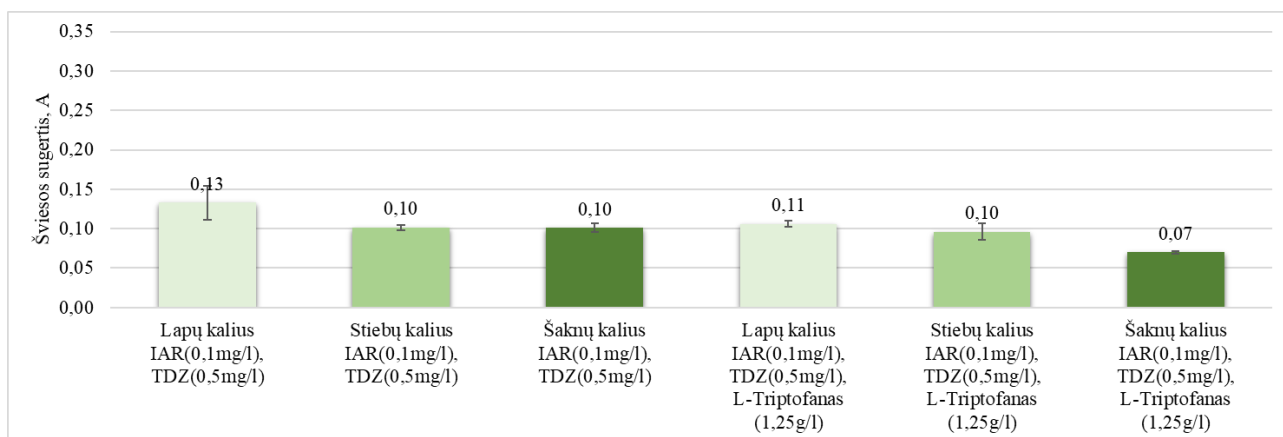
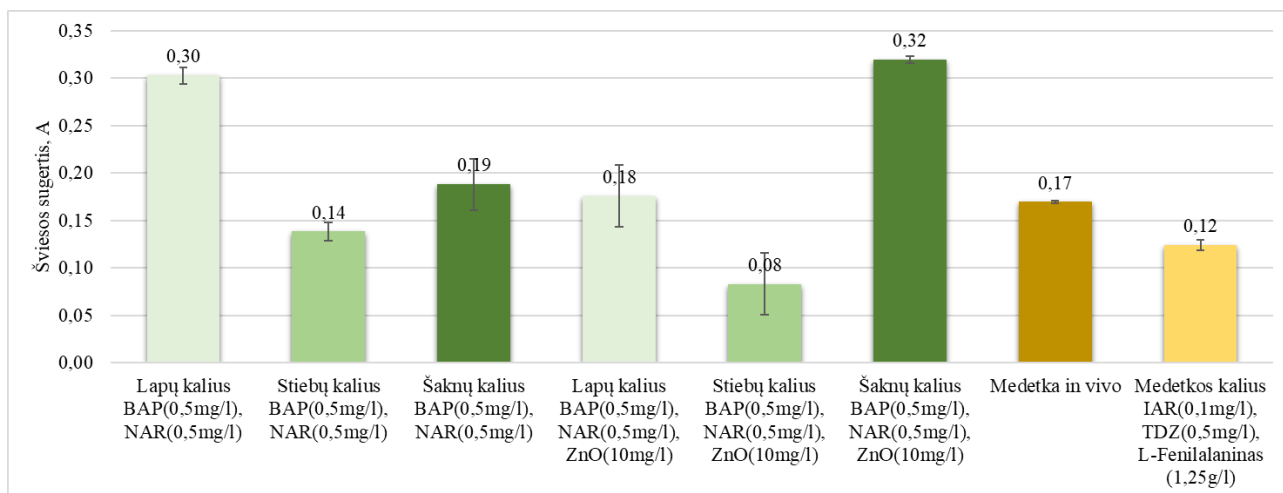
3.1 pav. DPPH radikalo slopinimas vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose
Įvertinus gautus DPPH radikalo slopinimo rezultatus, nustatyta, kad didžiausiu slopinamuoju

poveikiu pasižymėjo vaistinės medetkos eksplantai, kurie buvo auginti MS terpėje su cinko oksido ir *L*-triptofano ir *L*-fenilalanino priedais. Lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, DPPH radikalo slopinimas buvo atitinkamai 44,24, 19,29 ir 45,80 %, didesnis su 1,25 g/l *L*-triptofano priedu, nei terpėje be aminorūgščių. Taip pat lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais bei 10 mg/l ZnO priedu slopinimas buvo atitinkamai 38,72, 13,21 ir 14,22 % didesnis nei terpėje be 10 mg/l ZnO.

Taip pat gauta, kad didesniu DPPH radikalo slopinimu pasižymėjo kaliaus kultūros, kurios buvo augintos terpėse papildytose 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais, nei terpėse papildytose 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ.

3.1.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas redukcinių savybių nustatymo metodu

Redukcinių savybių nustatymo metodu įvertintose *in vivo* ir *in vitro* kaliaus kultūrose gautas skirtingas antioksidacinis aktyvumas. Didesnes redukcines bei antioksidacines savybes lėmė didesnė tiriamojo tirpalo šviesos sugertis. Gautuose rezultatuose (3.2 pav.) matyti, kad didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo šaknų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje praturtintoje 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais bei 10 mg/l ZnO priedu, ekstraktas (A – 0,32). Mažiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo šaknų kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais ir 1,25 g/l *L*-triptofano priedu, ekstraktas (A – 0,07).



3.2 pav. Redukcinių savybių įvertinimas vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

In vivo kultivuotos vaistinės medetkos redukcinės savybės nustatytos 41,18 % didesnės nei viso

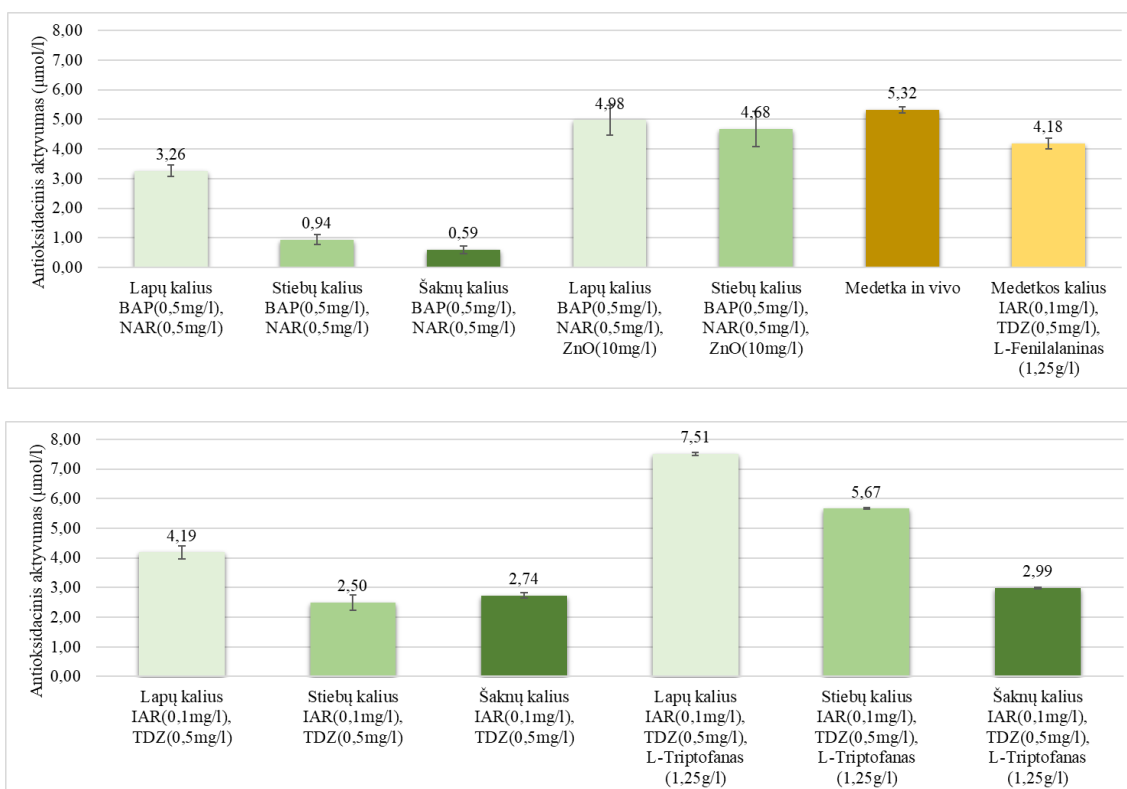
augalo kaliaus kultūrų, augintų terpėje praturtintoje 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu.

Įvertinus gautus rezultatus iširta, kad aminorūgščių ir cinko oksido priedai maitinamojoje terpėje reikšmingos įtakos kaliaus kultūrų ekstraktams, tirtiems redukcinių savybių nustatymo metodu, neturėjo. Gauti tyrimo rezultatai parodė, kad didesnis antioksidacinis aktyvumas būdingas lapų, stiebų ir šaknų *in vitro* kaliaus kultūrų, kurios buvo augintos MS terpėse praturtintose 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais (atitinkamai 56,11, 26,92 ir 46,37 %), lyginant su kaliaus kultūromis augintomis terpėse praturtintose 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais.

3.1.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Atliktus FRAP antioksidacinio aktyvumo tyrimą nustatytas skirtingas vaistinės medetkos ekstraktų gebėjimas redukuoti trivalentę geležį į divalentę, kurios koncentracija $\mu\text{mol/l}$ nusako ekstrakto antioksidacinį aktyvumą. Gauti rezultatai (3.3 pav.) parodė, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo vaistinės medetkos lapų kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l *L*-triptofano priedu, ekstraktas ($7,51 \pm 0,05 \mu\text{mol/l}$). Mažiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas šaknų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais, ekstrakto ($0,59 \pm 0,12 \mu\text{mol/l}$).

Rezultatuose taip pat gauta, kad visas vaistinės medetkos augalo, kultivuoto *in vivo*, ekstraktas, pasižymėjo 21,47 % didesnėmis antioksidacinėmis savybėmis, nei iš visų eksplantų medetkos kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu, ekstraktas. Vaistinės medetkos kaliaus kultūrų, augintų su 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu, ekstraktuose nustatytas didesnis antioksidacinis aktyvumas, lyginant su stiebų ir šaknų kaliaus kultūrų, augintų be *L*-fenilalanino, ekstraktais (atitinkamai 40,19 ir 34,44 %).



3.3 pav. Antioksidacinis aktyvumas vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Įvertinus gautus rezultatus galima teigti, kad kaliaus kultūrose, kuriose naudojami papildomi aminorūgščių ar cinko oksido priedai, antioksidacinis aktyvumas buvo didesnis nei kaliaus kultūrose augintose be šių priedų. Lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, ekstraktuose antioksidacinės savybės buvo atitinkamai 44,17, 55,80, 8,38 % didesnės su 1,25 g/l *L*-triptofano priedu, nei terpėje be aminorūgščių. Taip pat lapų ir stiebų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais bei 10 mg/l ZnO priedu, ekstraktų antioksidacinės savybės buvo atitinkamai 34,59 ir 79,93 % didesnės nei terpėje be 10 mg/l ZnO.

Palyginus *in vitro* kaliaus kultūras augintas MS terpėse praturtintose skirtingais fitohormonais matyti, kad didesnis antioksidacinis aktyvumas būdingas eksplantams kultivuotiems terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, nei su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais.

3.1.4. Antioksidacinio aktyvumo tyrimų apibendrinimas

Atliktuose vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimuose buvo gauti skirtingi rezultatai. Didžiausią antioksidacinį aktyvumą, iširtą redukcinių savybių nustatymo (0,5 mg/l BAP+0,5 mg/l NAR+10 mg/l ZnO – 0,32) metodu, rodė vaistinės medetkos šaknų kaliaus kultūrų ekstraktai. DPPH radikalo slopinimo metodu didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas stiebų kaliaus kultūrų ekstraktuose (0,5 mg/l BAP+0,5 mg/l NAR+10 mg/l ZnO – 83,53±6,46 %). FRAP metodu didžiausios antioksidacinės savybės buvo įvertintos lapų kaliaus kultūrų ekstraktuose (0,1 mg/l IAR+0,5 mg/l TDZ+1,25 g/l *L*-triptofanas – 7,51±0,05 μmol/l). Reikšmingas pokytis tarp kaliaus kultūrų, augintų terpėse papildytose skirtingais fitohormonais, ekstraktų nepastebėtas. Reikšmingas antioksidacinių savybių pokytis buvo pastebėtas *in vitro* kaliaus kultūrų, kurios buvo augintos su *L*-fenilalanino, *L*-triptofano ir cinko oksido priedais maitinamosiose terpėse, ekstraktuose.

L-triptofanas yra žinomas fiziologinis fitohormono, indolo acto rūgšties pirmtakas, o jo naudojimas atitinkamomis koncentracijomis gali turėti teigiamą poveikį augalų augimui bei antioksidaciniam aktyvumui [71]. Bakry'o ir kt. [72] atliktuose tyrimuose buvo nustatyta, kad *L*-triptofano priedas skatino didesnę antioksidacinį aktyvumą bolivinės balandos (lot. *Chenopodium quinoa* Willd.) augaluose. Tyrimų rezultatai parodė, kad DPPH radikalo slopinimas, naudojant 50 ir 75 mg/l *L*-triptofano priedus, buvo nustatytas atitinkamai 46,41±0,71 ir 54,05±0,46 %. Kontroliniame mėginyje DPPH radikalo slopinimas nustatytas 42,29±0,27 %.

Mokslinėje literatūroje minimas teigiamas *L*-fenilalanino poveikis aukštesniųjų augalų antioksidacinėms savybėms [73]. Al-Mohammad'as [73] atliko tyrimus, kuriuose buvo nustatytas *L*-fenilalanino poveikis antioksidaciniam aktyvumui salierų (lot. *Apium graveolens* var. *secalinum*) lapuose. DPPH metodu nustatyta, kad 25 ir 50 g/l *L*-fenilalanino priedas padidino antioksidacinį aktyvumą atitinkamai iki 43,7 ir 45,7 %. Kontroliniame mėginyje DPPH radikalo slopinimas nustatytas 37,7 %.

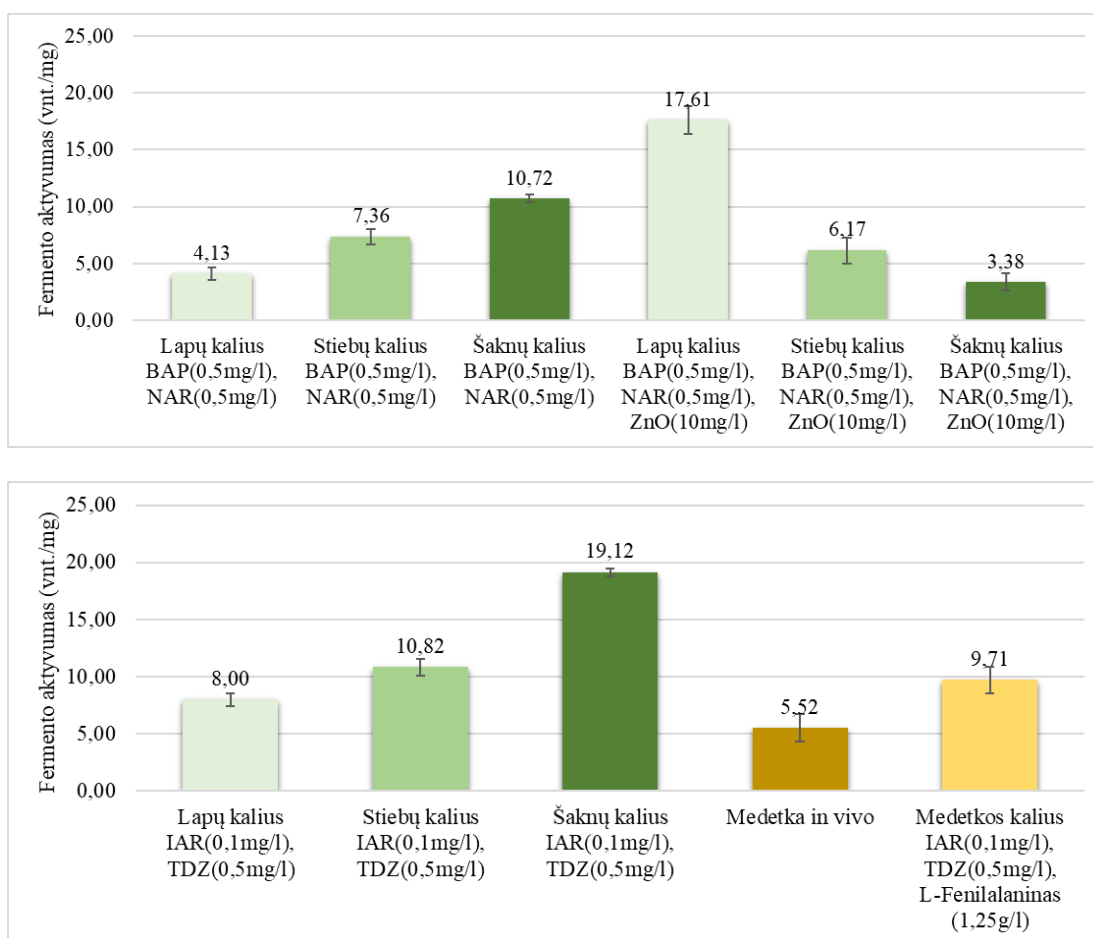
Sobati-Nasab'o ir kt. [74] atliktame tyrime įvertintas skirtingų koncentracijų (0, 0,5, 1, 1,5 ir 2 mg/l) cinko poveikis, vaistinės medetkos antioksidacinėms savybėms. DPPH ir FRAP metodais nustatyta, kad didžiausią antioksidacinį aktyvumą skatino 1 mg/l Zn priedas (atitinkamai 49,06 % ir 309,56 μmol/g). Mažiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas kontroliniuose mėginiuose (atitinkamai 9,74 % ir 184,81 μmol/g).

3.2. Vaistinės medetkos antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas

Vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktų antioksidaciniam poveikiui nustatyti buvo įvertinami superoksido dismutazės, katalazės, askorbatperoksidazės ir prolindehidrogenazės fermentų aktyvumai.

3.2.1. Superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas

Didesnis SOD fermento aktyvumas lėmė didesnes antioksidacines savybes. Gautuose rezultatuose (3.4 pav.) gauta, kad didžiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo vaistinės medetkos šaknų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje praturtintoje 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ (19,12±1,11vnt/mg), ekstraktai. Mažiausias SOD aktyvumas gautas šaknų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR ir 10 mg/l ZnO (3,38±0,75 vnt/mg), ekstrakto.



3.4 pav. Superoksido dizmutazės aktyvumas vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Iš visų eksplantų gautose kaliaus kultūrose *in vitro*, augintose MS terpėje su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ ir 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu, SOD aktyvumas buvo nustatytas 43,15 % didesnis, nei vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose.

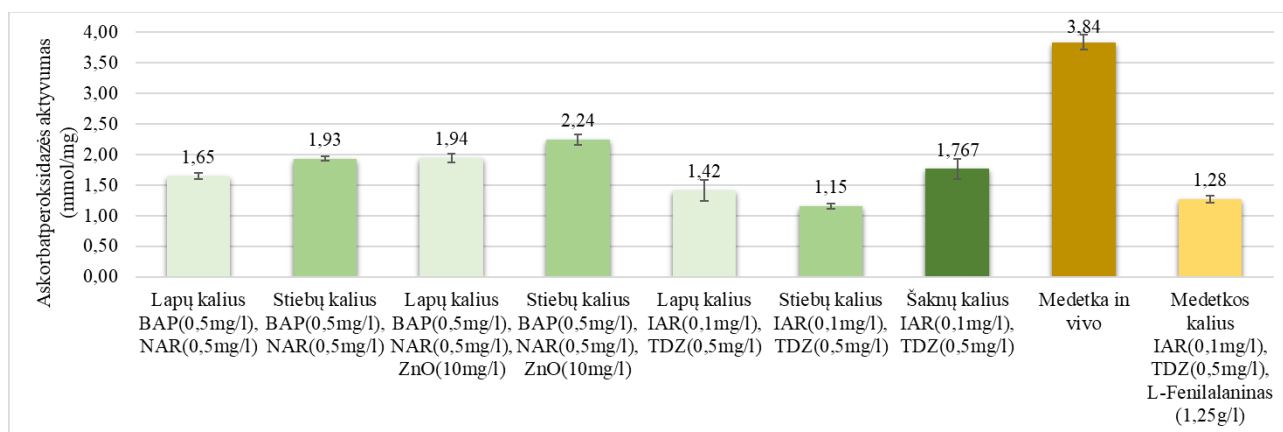
Įvertinus gautus rezultatus nustatyta, kad maitinamosios terpės papildymas 10 mg/l ZnO reikšmingos įtakos fermentiniam aktyvumui kaliaus kultūrų ekstraktuose neturėjo. Reikšmingas pokytis gautas tik lapų kaliaus kultūrų, augintų su 10 mg/l ZnO priedu, ekstrakto. SOD aktyvumas nustatytas 52,09 % didesnis, lyginant su lapų kaliaus kultūromis augintomis be 10 mg/l ZnO priedo.

Palyginus *in vitro* eksplantų kaliaus kultūrų augintų skirtingais fitohormonais praturtintose terpėse fermentinį aktyvumą, iširta, kad lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ, ekstraktai pasižymėjo didesniu (atitinkamai 48,38, 31,98 ir 43,93 %) SOD aktyvumu, lyginant su kaliaus kultūromis augintomis su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR.

3.2.2. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas

Gautuose rezultatuose (3.5 pav.) matyti, kad didžiausias fermento aktyvumas nustatytas vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose (3,84±0,12 mmol/mg). Mažiausias fermentinis aktyvumas nustatytas stiebų kaliaus kultūrose, kurios buvo kultivuojamos terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais (1,15±0,04 mmol/mg).

Vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose, askorbatperoksidazės aktyvumas buvo 66,79 % didesnis, lyginant su *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l L-fenilalanino priedu, ekstraktais.



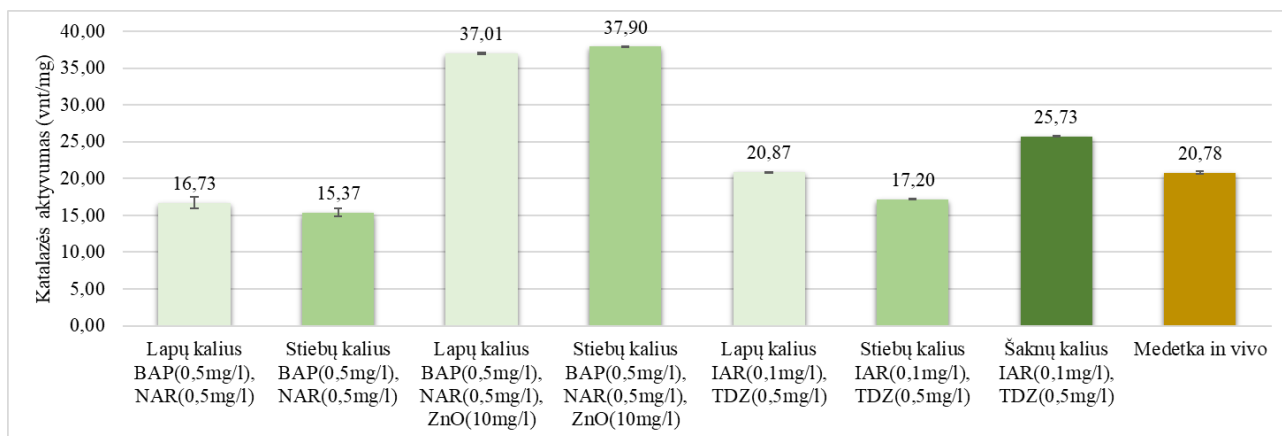
3.5 pav. Askorbatperoksidazės aktyvumas vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Askorbatperoksidazės aktyvumui teigiamos įtakos turėjo 10 mg/l ZnO priedas maitinamosiose terpėse. Lyginant fermentinį aktyvumą *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų su ir be 10 mg/l ZnO priedo, ekstraktuose, cinko oksido pridėjimas į terpes padidino askorbatperoksidazės aktyvumą lapų ir šaknų kaliaus kultūrose atitinkamai 15,24 ir 13,69 %.

Įvertinus gautus rezultatus taip pat nustatyta, kad 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonai maitinamosiose terpėse skatino didesnę antioksidacinio fermento aktyvumą *in vitro* kaliaus kultūrose. Lapų ir stiebų kaliaus kultūrose askorbatperoksidazės fermentinis aktyvumas nustatytas atitinkamai 13,97 ir 40,46 % didesnis, nei terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ.

3.2.3. Katalazės aktyvumo įvertinimas

Pateiktuose rezultatuose (3.6 pav.) matyti, kad didžiausias fermento aktyvumas nustatytas stiebų kaliaus kultūrose, kurios buvo augintos terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR bei 10 mg/l ZnO (37,90±0,03 vnt/mg). Mažiausias fermentinis aktyvumas buvo gautas stiebų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR (15,37±0,04 vnt/mg), ekstraktuose.



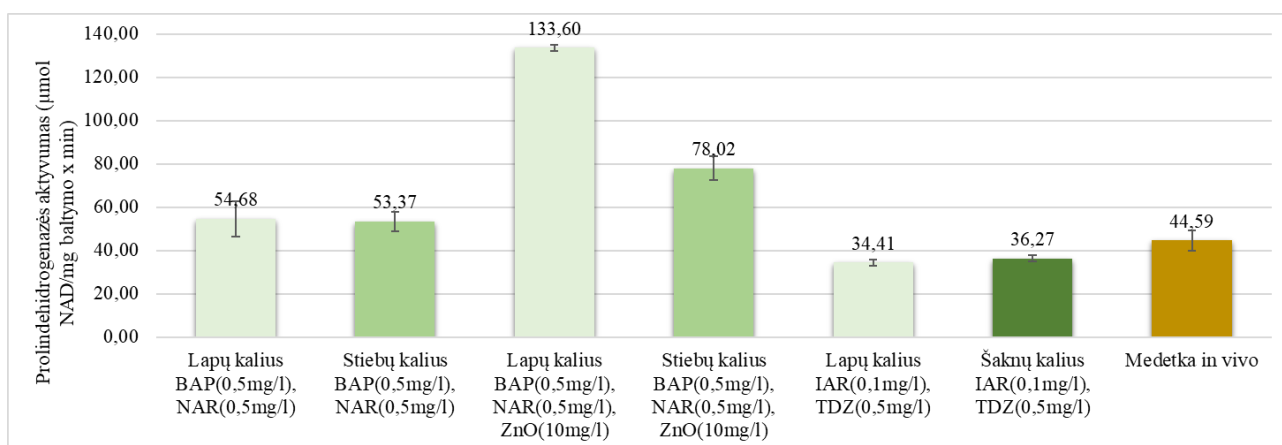
3.6 pav. Katalazės aktyvumas vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Įvertinus gautus rezultatus nustatytas žymus cinko oksido priedo poveikis katalazės fermento aktyvumui *in vitro* kaliaus kultūrose. Lapų ir stiebų kaliaus kultūrose, augintose MS terpėse praturtintose 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR bei 10 mg/l ZnO, fermentinis aktyvumas nustatytas atitinkamai 54,79 ir 59,44 % didesnis nei terpėse be 10 mg/l ZnO.

Rezultatuose matyti, kad katalazės aktyvumas buvo didesnis kaliaus kultūrų, augintų terpėse praturtintose 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, ekstraktuose. Lapų ir stiebų kaliaus kultūrose katalazės fermentinis aktyvumas buvo 19,84 ir 10,63 % didesnis, nei augintose 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais praturtintose terpėse.

3.2.4. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas

Gautuose rezultatuose (3.7 pav.) matyti, kad didžiausias fermento aktyvumas nustatytas lapų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR bei 10 mg/l ZnO ($133,60 \pm 1,50$ $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \times \text{min}$), ekstrakte. Mažiausias prolindehidrogenazės fermentinis aktyvumas nustatytas lapų kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ ($34,41 \pm 1,49$ $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \times \text{min}$), ekstrakte.



3.7 pav. Prolindehidrogenazės aktyvumas vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Pateiktuose rezultatuose matyti, kad cinko oksido pridėjimas į maitinamąsias terpes turėjo teigiamą poveikį prolindehidrogenazės fermento aktyvumui. Lapų ir stiebų kaliaus kultūrose, kurios buvo augintos terpėse su 10 mg/l ZnO, fermentinis aktyvumas nustatytas atitinkamai 59,07 ir 31,59 % didesnis nei kaliaus kultūrose, augintose be cinko oksido priedo.

Didesnis prolindehidrogenazės aktyvumas nustatytas kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonai, ekstraktuose. Lapų kaliaus kultūrose prolindehidrogenazės aktyvumas nustatytas 37,07 % didesnis, nei augintose su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ.

3.2.5. Antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimo apibendrinimas

Įvertinus antioksidacinių fermentų aktyvumo rezultatus, nustatyta, kad skirtingų fitohormonų pridėjimas mitybinėje terpėje reikšmingos įtakos neturėjo. Reikšmingas pokytis pastebimas MS terpėje su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais papildžius 10 mg/l ZnO. Cinko oksido priedas padidino vaistinės medetkos eksplantų fermentinį aktyvumą iki 59,44 %.

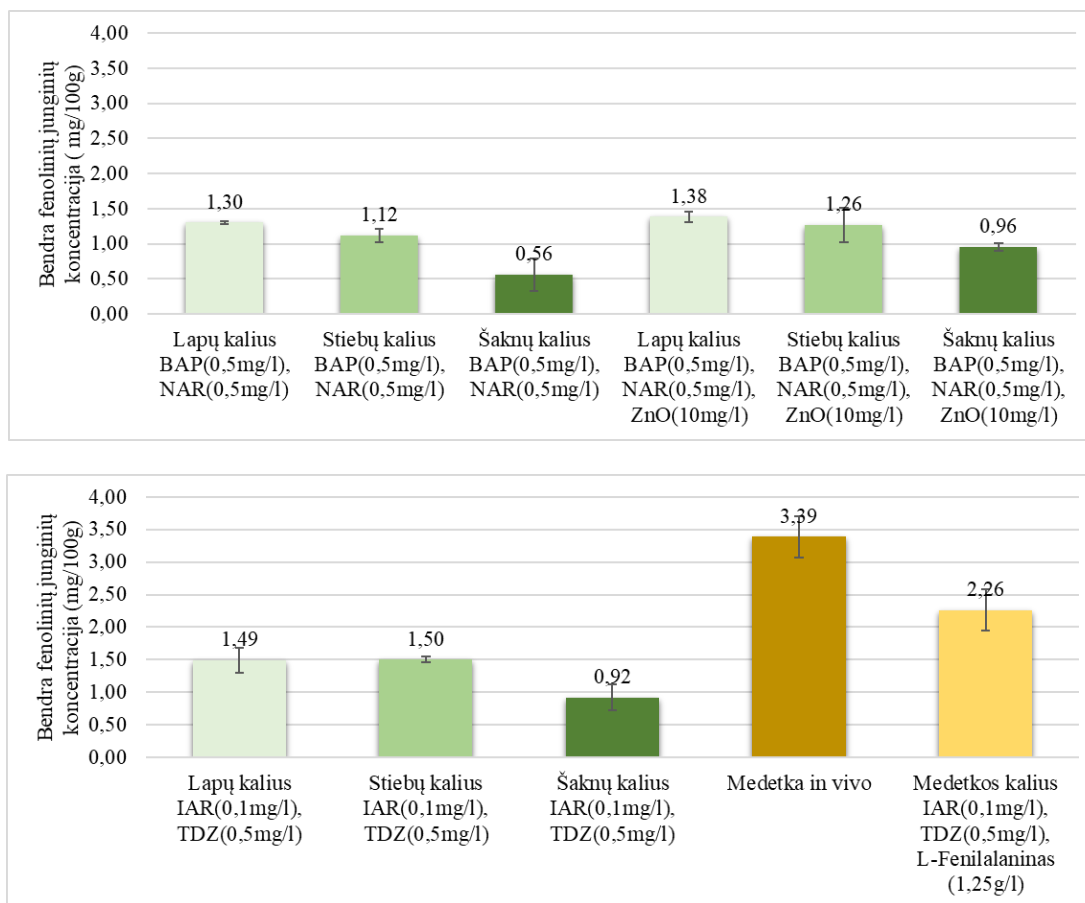
Mokslinėje literatūroje cinkas yra apibūdinamas, kaip labai svarbus mikroelementas, kuris apsaugo augalų ląsteles nuo pažeidimų ir yra svarbus kofaktorius, aktyvuojantis daugelį svarbių antioksidacinių fermentų augaluose [75].

Kavian'as ir kt. [75] tyrė cinko poveikį alavijo (lot. *Aloe vera*) augimui ir antioksidacinių fermentų aktyvumui. Tyrimui buvo naudojami 5 ir 10 mg×kg⁻¹ koncentracijų Zn priedai. Gauti rezultatai parodė, kad Zn priedas alavijo lapuose fermentų SOD, askorbatperoksidazės, katalazės ir peroksidazės aktyvumą padidino atitinkamai 10 ir 23 %, 64 ir 67 %, 66 %, 23 ir 30 %. Tavallali'as ir kt. [76] taip pat atliko tyrimus, kuriuose buvo įvertintas antioksidacinių fermentų aktyvumo pokytis pistacijos lapuose (lot. *Pistacia vera* L.) su ir be Zn priedo. Rezultatuose gauta, kad skirtingų koncentracijų Zn priedai skatino didesnę SOD, askorbatperoksidazės ir katalazės fermentų aktyvumą.

3.3. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas

Folin-Ciocalteu'o metodu buvo vertinama bendroji fenolinių junginių koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose. Gautose rezultatuose (3.8 pav.) matyti, kad didžiausia bendroji fenolinių junginių koncentracija nustatyta vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktoje (3,39±0,31 mg/100g). Mažiausia bendroji fenolinių junginių koncentracija nustatyta šaknų kaliaus kultūrų, kurios buvo kultivuotos MS maitinamojoje terpėje su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR (0,56±0,23 mg/100g), ekstraktoje.

Palyginus gautus rezultatus tarp vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktų, matyti, kad *in vivo* ekstraktuose fenolinių junginių koncentracija buvo nustatyta 33,18 % didesnė, nei kaliaus kultūrose, augintose MS terpėje su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l *L*-fenilalaninu. *L*-fenilalanino priedas maitinamojoje terpėje turėjo teigiamą poveikį didesnėms fenolinių junginių koncentracijoms susidaryti, lyginant su lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūromis (atitinkamai 34,07, 33,62 ir 59,29 %).



3.8 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Įvertinus gautus rezultatus, gauta, kad cinko oksido priedas maitinamojoje terpėje taip pat turėjo teigiamą įtaką fenolinių junginių koncentracijai didėti vaistinės medetkos kaliaus kultūrose. Lapų, stiebų ir šaknų *in vitro* kaliaus kultūrose, kurios buvo augintos MS terpėje su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR bei 10 mg/l ZnO priedu, bendroji fenolinių junginių koncentracija buvo atitinkamai 5,86, 11,63 ir 41,53 % didesnė, lyginant su kaliaus kultūromis kultivuotomis terpėje be 10 mg/l ZnO.

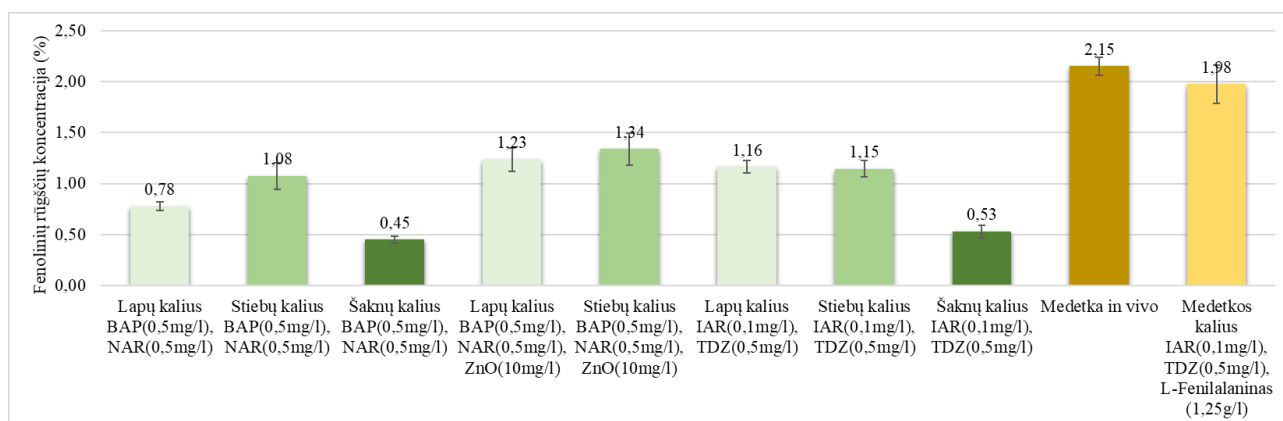
Palyginus vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūras augintas su skirtingais fitohormonų priedais, nustatyta, kad didesnės fenolinių junginių koncentracijos susidarė kaliaus kultūrose, augintose su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ. Lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrose fenolinių junginių koncentracija nustatyta atitinkamai 12,80, 25,48 ir 39,17 % didesnė, lyginant su kaliaus kultūromis augintomis terpėje praturtintoje 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR.

3.3.1. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas

Atliktame tyrime įvertinta fenolinių rūgščių koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose. Gautuose tyrimo rezultatuose (3.9 pav) matyti, kad didžiausia fenolinių rūgščių koncentracija susidarė vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose ($2,15 \pm 0,09$ %). Mažiausia fenolinių rūgščių koncentracija susidarė *in vitro* šaknų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais ($0,45 \pm 0,04$ %), ekstrakte.

Visame vaistinės medetkos augalo, augintame *in vivo*, ekstrakte susidarė 7,90 % daugiau fenolinių rūgščių, lyginant su vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų MS terpėse su su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l L-fenilalaninu, ekstraktais. L-Fenilalanino priedas, lyginant su lapų,

stiebų ir šaknų kaliaus kultūromis, kurios buvo augintos terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ, skatino didesnę fenolinių rūgščių susidarymą (atitinkamai 41,41, 41,91 ir 73,23 %).



3.9 pav. Fenolinių rūgščių koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

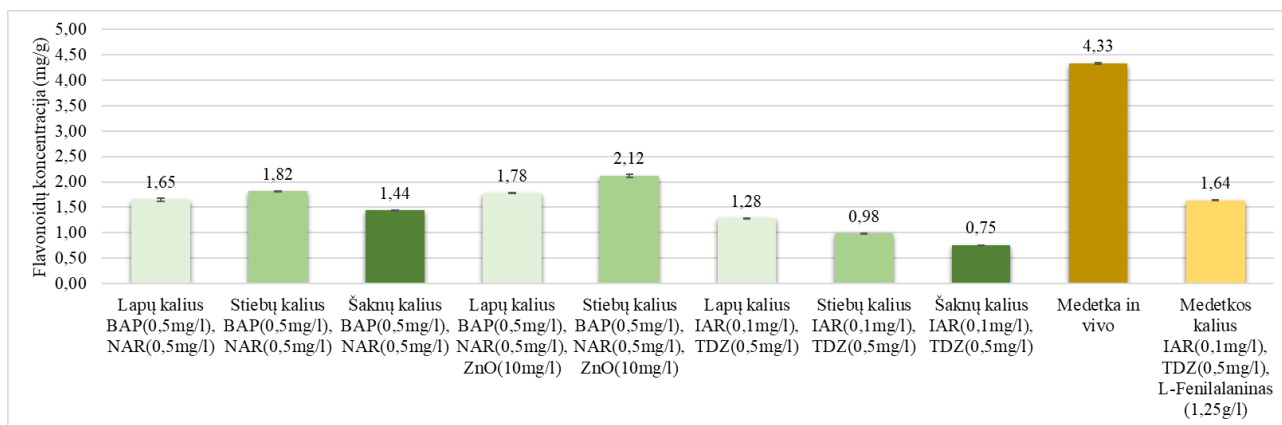
Įvertinus gautus rezultatus, nustatyta, kad cinko oksido priedas maitinamojoje terpėje taip pat turėjo teigiamą poveikį ir fenolinėms rūgštims susidaryti. Lapų ir stiebų *in vitro* kaliaus kultūrų, kurios buvo augintos MS terpėje su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais ir 10 mg/l ZnO priedu, ekstraktuose fenolinių rūgščių koncentracija nustatyta atitinkamai 36,59 ir 19,40 % didesnė, lyginant su eksplantų, kultivuotų terpėje be 10 mg/l ZnO, ekstraktais.

Palyginus vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūras, augintas su skirtingais fitohormonų priedais, didesnės fenolinių rūgščių koncentracijos nustatytos eksplantuose augintuose su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ. Lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrų ekstraktuose fenolinių rūgščių koncentracija įvertinta atitinkamai 32,76, 6,09 ir 15,09 % didesnė, lyginant su kaliaus kultūrų, augintų terpėje praturtintoje 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR ekstraktais.

3.4. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Atliktame tyrime nustatyta flavonoidų koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose. Gautuose rezultatuose (3.10 pav.) galime matyti, kad didžiausia flavonoidų koncentracija buvo nustatyta vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose ($4,33 \pm 0,01$ mg/g). Tuo tarpu, MS terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ augintų šaknų kaliaus kultūrų ekstraktuose, flavonoidų susidarymas buvo mažiausias ($0,75 \pm 0,01$ mg/g).

Vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktai pasižymėjo 62,12 % didesne flavonoidų koncentracija, lyginant su *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ ir 1,25 g/l L-fenilalanino priedu, ekstraktais. Teigiamas L-fenilalanino poveikis flavonoidų susidarymui nustatytas, lyginant koncentracijas su lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūromis. Medetkos kaliaus kultūrų, augintų su 1,25 g/l L-fenilalanino priedu, ekstraktuose flavonoidų koncentracija buvo atitinkamai 21,95, 40,24 ir 54,27 % didesnė, lyginant su kaliaus kultūrų, augintų terpėse tik su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, ekstraktais.



3.10 pav. Flavonoidų koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

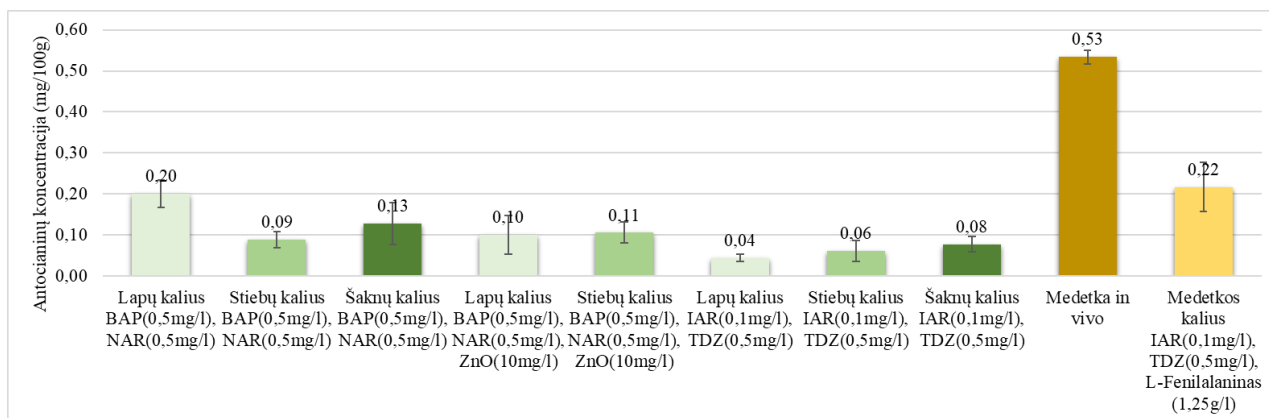
Tyrimo rezultatuose taip pat matyti, kad cinko oksido priedas maitinamojoje terpėje skatino didesnę flavonoidų susidarymą kaliaus kultūrose *in vitro*. Lapų ir stiebų kaliaus kultūrų, augintų terpėse praturtintose 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais ir 10 mg/l ZnO, ekstraktuose flavonoidų koncentracijos nustatytos atitinkamai 7,30 ir 14,15 % didesnės, lyginant su vaistinės medetkos kaliaus kultūrų, augintų terpėse be 10 mg/l ZnO, ekstraktais.

Gauti rezultatai taip pat rodo, kad vaistinės medetkos lapų, stiebų ir šaknų *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų MS terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais, ekstraktas pasižymėjo didesnėmis flavonoidų koncentracijomis (atitinkamai 22,42, 46,15 ir 47,92 %), lyginant su *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų MS terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, ekstraktu.

3.4.1. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas

Atliktame tyrime įvertinta antocianinų koncentracija vaistinės medetkos *in vivo* ir *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktuose. Pateiktuose rezultatuose (3.11 pav.) matyti, kad didžiausia antocianinų koncentracija nustatyta vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose ($0,53 \pm 0,02$ mg/100g). Mažiausia antocianinų koncentracija nustatyta vaistinės medetkos lapų kaliaus kultūrose, kurios buvo augintos MS terpėse praturtintose 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais ($0,04 \pm 0,01$ mg/100g).

Palyginus gautus rezultatus tarp vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktų, matyti, kad *in vivo* ekstraktuose antocianinų koncentracija nustatyta 59,36 % didesnė, nei kaliaus kultūrų, augintose MS terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l *L*-fenilalaninu, ekstraktuose. *L*-fenilalanino priedas skatino didesnę antocianinų susidarymą (atitinkamai 9,09, 72,72 ir 63,45 %), lyginant su lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūromis, kurios buvo augintos be 1,25g/l *L*-fenilalanino.



3.11 pav. Antocianinų koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Tyrimo rezultatuose taip pat matyti, kad cinko oksido priedas MS terpėse turėjo teigiamą poveikį antocianinams susidaryti *in vitro* kaliaus kultūrose. Lapų ir stiebų kaliaus kultūrose su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais bei 10 mg/l ZnO, antocianinų susidarė atitinkamai 55,00 ir 16,03 % daugiau, nei augintų tose pačiose terpėse tik be 10 mg/l ZnO priedo.

Tyrimo metu buvo palygintos susidariusios antocianinų koncentracijos *in vitro* kaliaus kultūrose, augintose terpėse su skirtingais fitohormonais. Pateiktuose rezultatuose gauta, kad lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrose, kultivuotose MS terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR, antocianinų koncentracijos buvo atitinkamai 80,00, 31,46 ir 39,06 % didesnės, nei terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ.

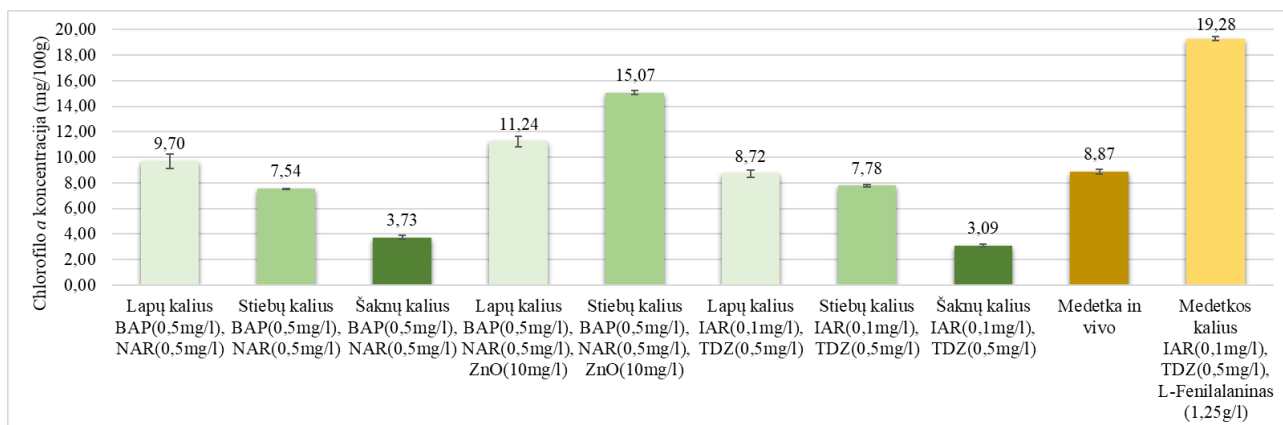
L-fenilalaninas yra augalų vystymuisi būtina aminorūgštis, kuri yra daugelio molekulių, svarbių augalų vystymuisi, dauginimuisi ir apsaugai nuo abiotinių ir biotinių stresorių pirmtakas, įskaitant fenilpropanoidus, flavonoidus, antocianinus, ligniną, taninus ir salicilatus [77]. Al-Mohammad'o [73] atliktuose tyrimuose buvo nustatyta, kad bendroji fenolinių junginių koncentracija salierų lapuose (lot. *Apium graveolens var. secalinum*), naudojant 25 ir 50 g/l *L*-fenilalanino priedus, padidėjo iki 19,6 ir 21,5 mgGAE/gDW, o flavonoidų koncentracija padidėjo iki 3,58 ir 3,71 mgRUT/gDW. Kontroliniuose mėginiuose fenolinių junginių ir flavonoidų koncentracijos nustatytos atitinkamai 13,3 mgGAE/gDW ir 3,8 mgRUT/gDW.

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

Atliktuose tyrimuose vertintos chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose. Pateiktuose rezultatuose (3.12 pav.) įvertinta chlorofilo *a* koncentracija tiriamuosiuose ekstraktuose. Nustatyta, kad didžiausia chlorofilo *a* koncentracija susidarė vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų MS terpėse praturtintose 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l *L*-fenilalaninu (19,28±0,16 mg/100g), ekstrakto. Vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose chlorofilo *a* koncentracija nustatyta 54,00 % mažesnė, lyginant su vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūromis, augintomis su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l *L*-fenilalaninu. Mažiausia chlorofilo *a* koncentracija buvo šaknų kaliaus kultūrų, kultivuotų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ (3,09±0,10 mg/100g), ekstrakto.

Taip pat nustatyta, kad cinko oksido priedas maitinamosiose terpėse skatino didesnę chlorofilo *a* susidarymą. MS terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR bei 10 mg/l ZnO lapų ir stiebų kaliaus kultūrose chlorofilo *a* koncentracijos buvo atitinkamai 13,70 ir 49,96 % didesnės, lyginant su

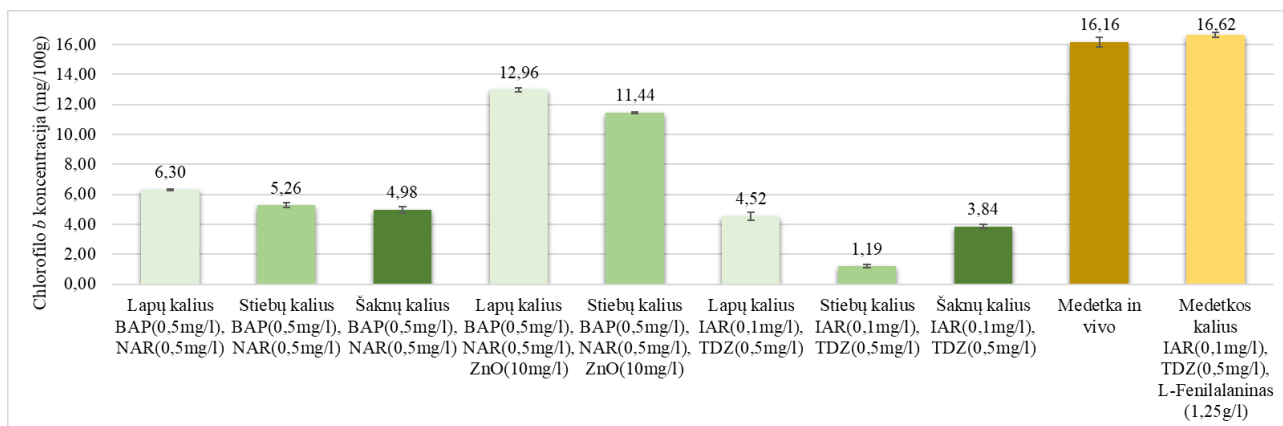
pigmentų koncentracijomis, kurios susidarė kaliaus kultūrose be 10 mg/l ZnO priedo. Rezultatuose nustatytas ir nežymus skirtumas tarp chlorofilo *a* koncentracijų, *in vitro* kaliaus kultūrose augintose su skirtingais fitohormonais. Lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrose, kultivuotose terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR, chlorofilo *a* koncentracijos buvo atitinkamai 10,10, 3,08 ir 17,15 % didesnės, nei kaliaus kultūrose augintose su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ.



3.12 pav. Chlorofilo *a* koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Tolimesniuose tyrimuose buvo vertinama chlorofilo *b* pigmentų koncentracija tiriamuosiuose ekstraktuose. Gautuose rezultatuose (3.13 pav.) matyti, kad didžiausia chlorofilo *b* koncentracija nustatyta vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l *L*-fenilalaninu ($16,62 \pm 0,15$ mg/100g), ekstrakto. Vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose chlorofilo *b* koncentracijos nustatytos tik 3,79 % mažesnės, lyginant su *in vitro* ekstraktuose susidariusių pigmentų koncentracija. Mažiausia chlorofilo *b* koncentracija susidarė stiebų kaliaus kultūrose, augintose terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ ($1,19 \pm 0,11$ mg/100g).

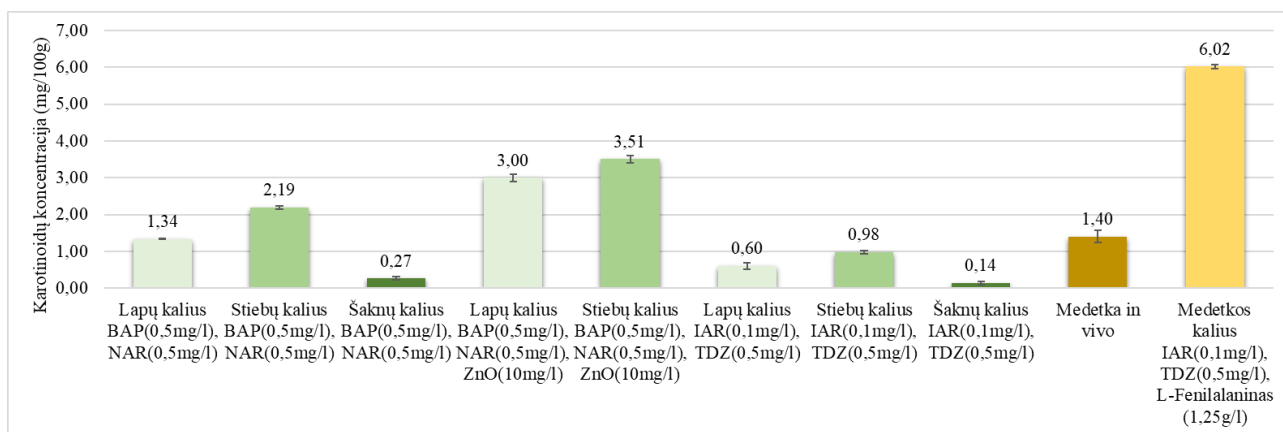
Rezultatuose taip pat nustatytas teigiamas cinko oksido poveikis chlorofilui *b* susidaryti vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktuose. Lapų ir stiebų kaliaus kultūrose, kurios buvo auginamos su 10 mg/l ZnO, chlorofilo *b* koncentracijos nustatytos atitinkamai 51,38 ir 54,02 % didesnės nei terpėse be 10 mg/l ZnO. Lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrose, augintose 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais papildytose MS terpėse, nustatytas didesnis chlorofilo *b* pigmentų susidarymas (atitinkamai 28,25, 77,37 ir 22,89 %), lyginant su kaliaus kultūromis augintomis terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ.



3.13 pav. Chlorofilo *b* koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Toliau buvo vertinami karotinoidų koncentracijos kitimai vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose. Pateiktuose rezultatuose (3.14 pav.) matyti, kad didžiausia karotinoidų koncentracija nustatyta vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l *L*-fenilalaninu (6,02±0,05 mg/100g), ekstrakto. *In vivo* vaistinės medetkos ekstraktuose karotinoidų koncentracija buvo 76,74% mažesnė, lyginant su *in vitro* kaliaus kultūromis augintomis su 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu. Mažiausia karotinoidų koncentracija nustatyta šaknų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėse praturtintose 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ (0,14±0,05 mg/100g), ekstraktuose.

Gautuose rezultatuose matyti, kad lapų ir stiebų *in vitro* kaliaus kultūrose, augintose terpėse su 10 mg/l ZnO priedu, karotinoidų susidarė daugiau (atitinkamai 37,60 ir 55,33 %), nei terpėse be 10 mg/l ZnO. Lyginant pigmentų susidarymą vaistinės medetkos eksplantuose, kurie buvo auginti terpėse su skirtingais fitohormonais, nustatytas, kad 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR skatino didesnę karotinoidų susidarymą. Lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrose pigmentų koncentracija nustatyta atitinkamai 55,22, 55,25 ir 48,14 % didesnė, lyginant su eksplantais augintais terpėse praturtintose 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ.



3.14 pav. Karotinoidų koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Įvertinus chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos rezultatus *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose nustatyta, kad didžiausios pigmentų koncentracijos susidarė vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrose, kurios buvo augintos MS terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu.

Mokslinėje literatūroje rašoma, kad cinkas augaluose skatina didesnę chloroplastų, pavyzdžiui karotinoidų ir chlorofilo, susidarymą, todėl yra svarbus ir naudingas augalų augimui ir fotosintezės sistemai [74]. Sobati-Nasab'as ir kt. [74] tyrė cinko poveikį vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) lapams, siekiant pagerinti fiziologinius ir fitocheminius parametrus. Tyrimų metu vaistinė medetka buvo auginta terpėse su skirtingomis cinko koncentracijomis (0, 0,5, 1, 1,5 ir 2 mg/l). Gauti tyrimų rezultatai, patvirtino, kad cinko pridėjimas į maitinamąsias terpes padidino chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų susidarymą, didžiausios pigmentų koncentracijos nustatytos atitinkamai 16,00, 6,28 ir 15,44 mg/g FW.

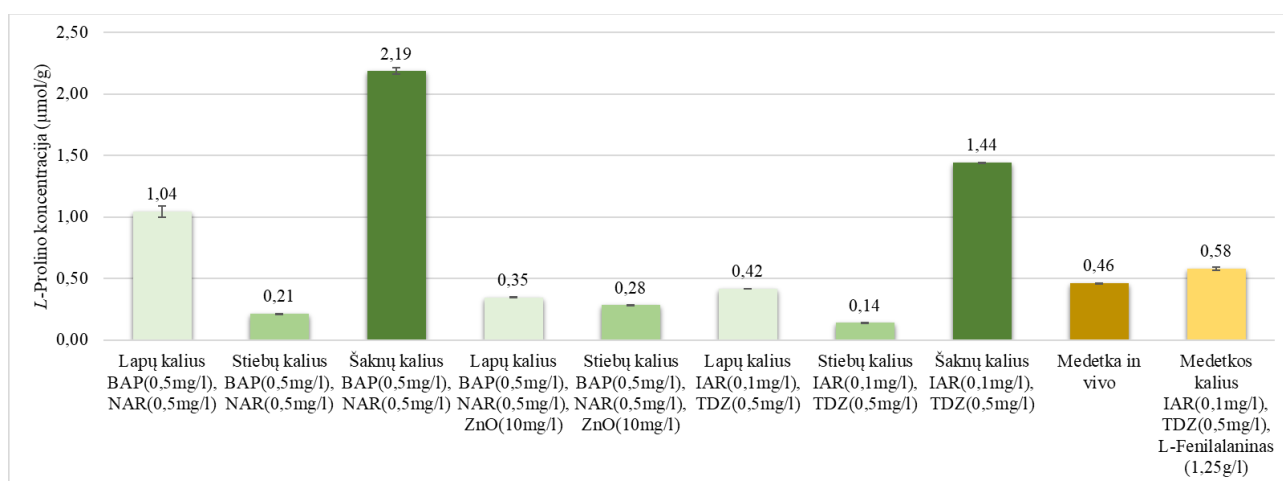
Samani'as ir kt. [78] atliko tyrimus, kuriuose buvo nustatytas teigiamas *L*-fenilalanino poveikis chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų susidarymui vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) lapuose. Nustatyta, kad terpėse su 250 ppm *L*-fenilalanino priedu, pigmentų susidarė didesnės koncentracijos (atitinkamai 4,30, 1,61 ir 0,56 µg/ml), nei kontroliniame mėginyje (atitinkamai 4,07, 1,53 ir 0,50

µg/ml).

3.6. L-Prolino koncentracijos įvertinimas

Atliktame tyrime buvo vertinama *L*-prolino koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose. Pateiktuose rezultatuose (3.15 pav.) matyti, kad didžiausios *L*-prolino koncentracijos nustatytos šaknų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR (2,19±0,03 µmol/g), ekstrakto. Mažiausia *L*-prolino koncentracija susidarė stiebų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, (0,14±0,01 µmol/g), ekstrakto.

Vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų, kultivuotų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu, ekstraktuose *L*-prolino koncentracija nustatyta 20,52 % didesnė nei *in vivo* ekstraktuose. 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedas maitinamojoje terpėje, reikšmingos įtakos *L*-prolino susidarymui neturėjo, lyginant su lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūromis, augintomis terpėse tik su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais.



3.15 pav. *L*-Prolino koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

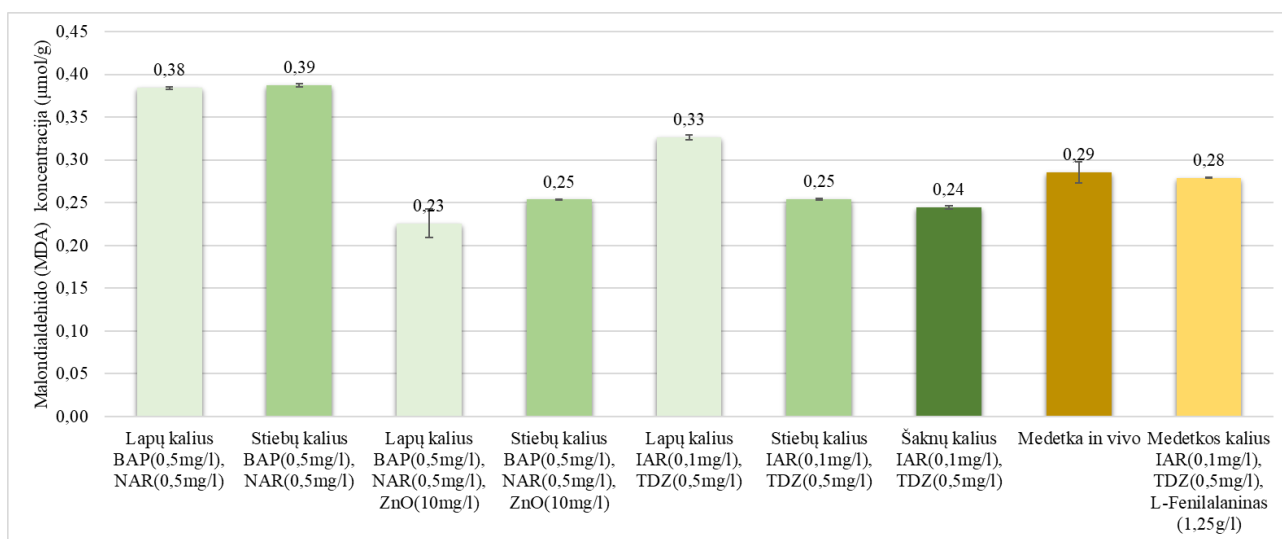
Įvertinus gautus rezultatus iširta, kad cinko oksido pridėjimas mitybinėse terpėse žymaus poveikio neturėjo *L*-prolino koncentracijos didėjimui vaistinės medetkos eksplantų *in vitro* kaliaus kultūrose. Lyginant *L*-prolino koncentracijas tarp eksplantų augintų MS terpėse su skirtingais fitohormonais matyti, kad 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais praturtintose terpėse susidarė didesnės *L*-prolino koncentracijos. Lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūrose *L*-prolino susidarė atitinkamai 59,96, 35,21 ir 34,03 % daugiau nei terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ.

3.7. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas

Atliktame tyrime įvertinta MDA koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose. Malondialdehidas naudojamas kaip lipidų peroksidacijos ir redokso lygių rodiklis augalų fiziologijos srityje ir yra vienas iš dažniausiai naudojamų oksidacinio streso biomarkerių biomedicininuose tyrimuose [79]. Didesnės MDA koncentracijos lėmė didesnę patirtą oksidacinį stresą kaliaus kultūrose. Pateiktuose rezultatuose (3.16 pav.) nustatyta, kad didžiausią oksidacinį stresą patyrė lapų ir stiebų kaliaus kultūros, augintos su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR (atitinkamai 0,38±0,01 ir 0,39±0,01 µmol/g). Mažiausią oksidacinį stresą patyrė lapų kaliaus kultūros, kurios buvo kultivuojamos su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR bei 10 mg/l ZnO (0,22±0,02 µmol/g).

Lyginant MDA koncentracijas vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR

ir 0,5 mg/l TDZ bei 1,25 g/l *L*-fenilalaninu, ir *in vivo* ekstraktuose, žymaus skirtumo oksidacinio streso atsparumui nepastebėta.



3.16 pav. MDA koncentracija koncentracija vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose

Gautuose rezultatuose taip pat nustatytas teigiamas cinko oksido poveikis maitinamosiose terpėse. Vaistinės medetkos lapų ir stiebų kaliaus kultūros, kurios buvo kultivuojamos su 10 mg/l ZnO, oksidacinį stresą patyrė atitinkamai 41,14 ir 34,36 % mažesnį, nei eksplantai auginti su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais ir be 10 mg/l ZnO priedo.

Rezultatuose matomas MDA koncentracijos skirtumas tarp vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų, kultivuotų su skirtingais fitohormonais. Lapų ir stiebų kaliaus kultūrų oksidacinio streso atsparumui teigiamos įtakos turėjo 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonai. Nustatytos MDA koncentracijos buvo atitinkamai 15,10 ir 34,37 % mažesnės, nei kaliaus kultūrose augintose su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR.

3.8. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Atliktame tyrime buvo vertintas vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų bei *in vivo* ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *Escherichia coli* bakterijas. Vaistinės medetkos antibakterinio aktyvumo tyrime antibiotiku buvo naudotas ciprofloksacinas. Pateiktuose rezultatuose (3.1 lentelė.) matyti, kad didžiausia slopinimo zona buvo nustatyta lapų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais, ekstrakto (0,107±0,008 cm). Antibakteriniu aktyvumu taip pat pasižymėjo ir stiebų bei viso vaistinės medetkos augalo kaliaus kultūrų ekstraktai, kuriuose *Escherichia coli* slopinimo zonos nustatytos atitinkamai 0,055±0,061 ir 0,067±0,052 cm. Kitose *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose antibakterinis aktyvumas nenustatytas.

3.1 lentelė. Vaistinės medetkos *in vivo* ir *in vitro* kaliaus kultūrų antibakterinis aktyvumas prieš *Escherichia coli* bakterijas

Augalo dalis	Maitinamoji terpė	Ekstrahavimo trukmė, dienos	<i>Escherichia coli</i> slopinimo zona, cm
Lapai	MS+BAP (0,5 mg/l)+NAR (0,5 mg/l)	14	0,107±0,008
Stiebai	MS+BAP (0,5 mg/l)+NAR (0,5 mg/l)	14	-

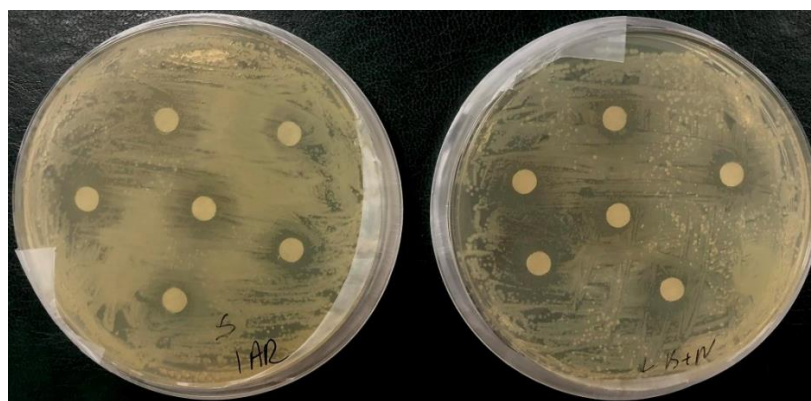
3.1 lentelės tęsinys

Augalo dalis	Maitinamoji terpė	Ekstrahavimo trukmė, dienos	<i>Escherichia coli</i> slopinimo zona, cm
Lapai	MS+BAP (0,5 mg/l)+NAR (0,5 mg/l)+ZnO (10 mg/l)	14	-
Stiebai	MS+BAP (0,5 mg/l)+NAR (0,5 mg/l)+ ZnO (10 mg/l)	14	-
Lapai	MS+IAR (0,1 mg/l)+TDZ (0,5 mg/l)	14	-
Stiebai	MS+IAR (0,1 mg/l)+TDZ (0,5 mg/l)	14	0,055±0,061
Visas augalas	MS+IAR (0,1 mg/l)+TDZ (0,5 mg/l)+L-fenilalaninas (1,25 g/l)	14	0,067±0,052
Visas augalas	<i>In vivo</i>	14	-
Atibiotikas (ciprofloksacinas)	-	-	0,228±0,013



A

B



C

D

3.17 pav. Vaistinės medetkos kaliaus kultūrų antibakterinis aktyvumas (A – ciprofloksacinas, B – visas augalas 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ, 1,25 g/l *L*-fenilalaninas, C – stiebai 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ, D – lapai 0,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAR)

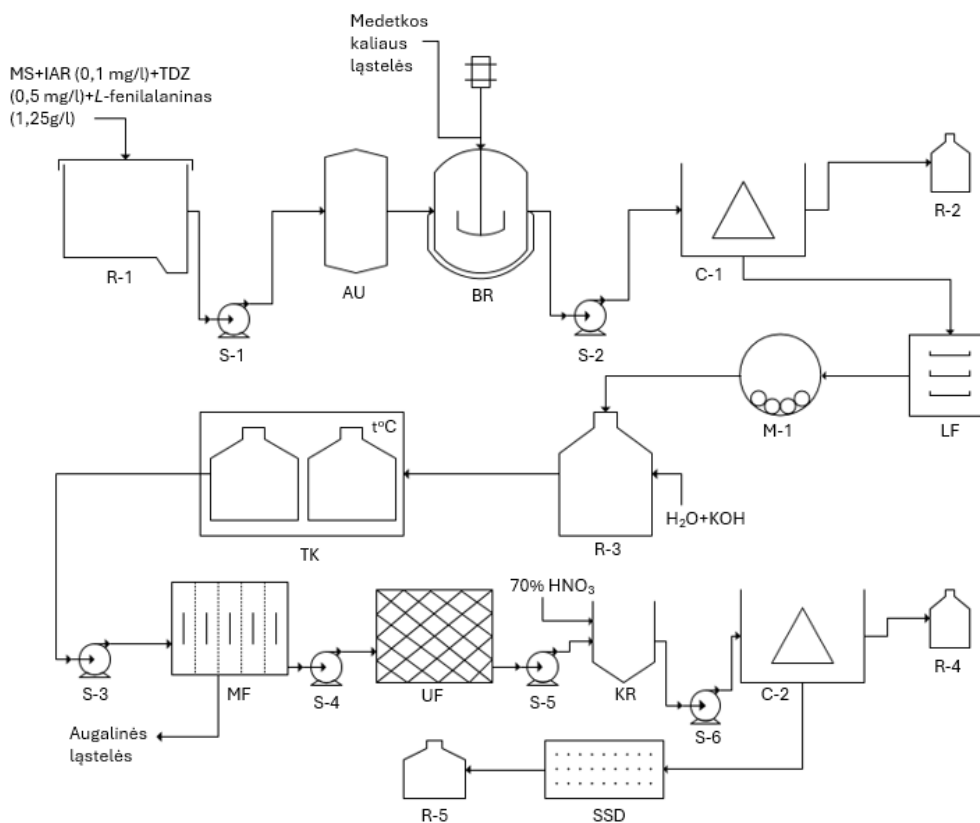
Palyginus gautus rezultatus gauta, kad cinko oksido pridėjimas į mitybines terpes teigiamos įtakos neturėjo. Žymesnis antibakterinis aktyvumas tarp skirtingais fitohormonais papildytose maitinamosiose terpėse augintų vaistinės medetkos eksplantų taip pat nenustatytas.

4. Rekomendacijų dalis

Fenolinių rūgščių išskyrimas iš vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) *in vitro* kaliaus kultūrų ir gryninimas pateiktas schemeje (4.1 pav.). Siekiant padidinti fenolinių rūgščių susidarymą, *in vitro* kaliaus kultūrų ląsteles rekomenduojama kultivuoti skystoje MS terpėje su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu.

Vaistinės medetkos kultivavimui pasirinkta maitinamoji terpė, papildyta rekomenduojamais citokiniais, auksiniais ir aminorūgščių priedais, paruošiama atskirame rezervuare (R-1). Terpė tiekama siurbliu (S-1) į autoklavą (AU) ir sterilizuojama 15 min, 120 °C temperatūroje, 0,75 – 1 atm. slėgyje. Sterili terpė ir susmulkintos medetkos kaliaus ląstelės perkeliama į bioreaktorių (BR), kuriame suspensija maišoma 100 aps/min, 25°C temperatūroje. Po 4 savaičių įpilama naujos MS + 0,1 mg/l IAR + 0,5 mg/l TDZ + 1,25 g/l *L*-fenilalanino terpės.

Po fermentacijos bioreaktoriuje, suspensijos kultūros surenkamos ir tiekiamos siurbliu (S-2) į centrifugą (C-1). Supernatantas atskiriamas nuo kietų nuosėdų atskirame rezervuare (R-2). Ląstelės perkeliama į liofilizatorių (LF) ir išdžiovininta biomasė susmulkinama rutuliniame malūne (M-1). Susmulkinta biomasė neutralizuojama KOH buferiniu tirpalu ir sumaišoma su distiliuotu vandeniu atskirame rezervuare (R-3) bei homogenizuojama termostatuojame kratytuve (TK) 30 min, 25°C temperatūroje. Biomasės suspensija tiekama siurbliu (S-3) į mikrofiltrą (MF), kuriame augalinės ląstelės atskiriamos. Gautas ekstraktas siurbliu (S-4) tiekiamas į ultrafiltrą (UF), kuriame yra sukonzentruojamas. Gauta fenolinės rūgšties druska neutralizuojama 70 % azoto rūgštimi ir kristalizuojama 5°C temperatūroje kristalizatoriuje (KR). Kristalai nuo tirpalo atskiriami centrifugoje (C-2) ir išdžiovinami skysto sluoksnio džiovyklėje (SSD).



4.1 pav. Aparatūrinė schema fenolinėms rūgštims gauti iš vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūrų

4.1 lentelė. Technologinėje schemoje nurodytų dalių sąrašas

Žymėjimas	Schemos dalis
R-1–R-5	Rezervuaras
S-1–S-6	Siurbliai
AU	Autoklavas
BR	Bioreaktorius
C-1–C-2	Centrifugos
LF	Liofilizatorius
M-1	Rutulinis malūnas
TK	Termostatinis kratytuvas
MF	Mikrofiltras
UF	Ultrafiltras
KR	Kristalizatorius
SSD	Skysto sluoksnio džiovyklė

Išvados

1. Ištyrus vaistinės medetkos antioksidacinį aktyvumą DPPH ir redukcinių savybių metodais, gauta, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas *in vitro* kaliaus kultūrose, kurios buvo augintos MS terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais. FRAP metodu didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas kaliaus kultūrose, augintose su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais. Taip pat *L*-fenilalanino, *L*-triptofano ir cinko oksido priedų panaudojimas mitybinėje terpėje skatino didesnę antioksidacinį aktyvumą kaliaus kultūrose.
2. Medetkos *in vivo* ekstraktuose buvo nustatytos didesnės fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų ir antocianinų koncentracijos bei askorbatperoksidazės aktyvumas, lyginant su *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktais.
3. Nustatyta, kad antioksidacinių fermentų aktyvumui, skirtingų fitohormonų panaudojimas reikšmingos įtakos neturėjo. Katalazės, askorbatperoksidazės ir prolindehidrogenazės aktyvumą kaliaus kultūrose padidino 10 mg/l ZnO priedas MS terpėje su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais. Įvertinus SOD aktyvumą gauta, kad reikšmingas cinko oksido poveikis nustatytas tik lapų kaliaus kultūrose.
4. Nustatyta, kad didžiausios fenolinių junginių ir fenolinių rūgščių koncentracijos gautos vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose. 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonų panaudojimas maitinamojoje terpėje skatino didesnę fenolinių junginių ir fenolinių rūgščių susidarymą. Taip pat gauta, kad 10 mg/l ZnO priedas padidino fenolinių junginių ir fenolinių rūgščių susidarymą MS terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais. 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedas padidino fenolinių junginių ir fenolinių rūgščių susidarymą MS terpėse su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais.
5. Atliktuose tyrimuose nustatyta, kad didžiausia chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracija nustatyta iš visų vaistinės medetkos eksplantų (lapų, stiebų ir šaknų) gautose kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedu, ekstraktuose. Didžiausia flavonoidų ir antocianinų koncentracija įvertinta vaistinės medetkos *in vivo* ekstraktuose. *L*-prolino didžiausia koncentracija buvo nustatyta *in vitro* šaknų kaliaus kultūrose, kurios buvo augintos su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais. Didžiausią oksidacinį stresą patyrė lapų ir stiebų kaliaus kultūros, kurios buvo augintos terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais. Lyginant su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ terpėje augintomis kaliaus kultūromis, 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonai skatino didesnę chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų, antocianinų ir *L*-prolino susidarymą. Nustatyta, kad 10 mg/l ZnO ir 1,25 g/l *L*-fenilalanino priedai terpėse padidino bioaktyviųjų junginių susidarymą ir sumažino oksidacinį stresą.
6. Įvertinus vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktų antibakterinį poveikį prieš *Escherichia coli* bakterijas, didžiausia slopinimo zona buvo nustatyta panaudojant lapų kaliaus kultūrų, augintų su 0,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR fitohormonais, ekstraktus (0,107±0,008 cm). ZnO priedas (10 mg/l) reikšmingos įtakos antibakterinėms savybėms neturėjo.

Literatūros sąrašas

1. MOHADDAB, M. ir kt. Biotechnology and *In Vitro* Culture as an Alternative System for Secondary Metabolite Production. *Molecules* [interaktyvus]. 2022, 27(22), [žiūrėta 2024-01-16]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules27228093.
2. TWAJJ, B. M. ir HASAN, M. N. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *International Journal of Plant Biology* [interaktyvus]. 2022, 13(1), 4-14 [žiūrėta 2024-01-16]. Prieiga per doi: 10.3390/ijpb13010003.
3. BERNERHOF A. A brief review on bioactive compounds in plants. *The Norwegian Academy of Science and Letters* [interaktyvus]. 2010 [žiūrėta 2024-01-16]. Prieiga per: ResearchGate.
4. FAZILI, M. A., BASHIR, I., AHMAD, M., YAQOOB, U. ir GEELANI, S. N. *In vitro* strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bulletin of the National Research Centre* [interaktyvus]. 2022, 46(1) [žiūrėta 2024-01-16]. Prieiga per doi: 10.1186/s42269-022-00717-z.
5. GAO, T., YAO, H., SONG, J., ZHU, Y., LIU, C. ir CHEN, S. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. *BMC Evolutionary Biology* [interaktyvus]. 2010, 10(1) [žiūrėta 2024-01-16]. Prieiga per doi: 10.1186/1471-2148-10-324.
6. ABDELWAHAB, S. I., TAHA, M. M. E., TAHA, S. M. E. ir ALSAYEGH, A. A. Fifty-year of Global Research in *Calendula Officinalis* L. (1971–2021): A Bibliometric Study,” *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology* [interaktyvus]. 2022, 2(4), 100059 [žiūrėta 2024-01-16]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ccmp.2022.100059.
7. NIKOLIĆ, M. ir STEVOVIĆ, S. Family *Asteraceae* as a sustainable planning tool in phytoremediation and its relevance in urban areas. *Urban Forestry and Urban Greening* [interaktyvus]. 2015, 14(4), 782-789 [žiūrėta 2024-02-11]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ufug.2015.08.002.
8. ROLNIK, A. ir 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 [žiūrėta 2024-02-11]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms22063009.
9. GÜNEŞ, A., KORDALI, Ş., TURAN, M. ir USANMAZ BOZHÜYÜK, A. Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the *Asteraceae* family from medicinal plants. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2019, 137, 208-210 [žiūrėta 2024-02-11]. Prieiga per doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.042.
10. SHARMA, S. ir KUMARI, K. AN OVERVIEW ON *CALENDULA OFFICINALIS* LINN.: (POT MARIGOLD). *Journal of Advanced Scientific Research* [interaktyvus]. 2021, 12(3), 13-18 [žiūrėta 2024-02-11]. Prieiga per: <http://www.sciensage.info>
11. SZOPA, A., KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M., JAFERNIK, K., KOC, K. ir EKIERT, H. Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) – A position in classical phytotherapy and newly documented activities. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* [interaktyvus]. 2020, 19(3), 47-61 [žiūrėta 2024-02-11]. Prieiga per doi: 10.24326/asphc.2020.3.5.
12. PATIL, K., SANJAY, C., DOGGALLI, N., DEVI, K. R. ir HARSHITHA, N. A. Review of *Calendula Officinalis* Magic in Science. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* [interaktyvus]. 2022, 16(2), 23-27 [žiūrėta 2024-02-11]. Prieiga per doi: 10.7860/jcdr/2022/52195.16024.
13. MOHAMMAD, S. M. ir kt. Pot marigold (*Calendula officinalis*) medicinal usage and cultivation. *Scientific Research and Essays* [interaktyvus]. 2012, 7(14), 1468-1472 [žiūrėta

- 2024-02-11]. Prieiga per doi: 10.5897/sre11.630.
14. LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A. ir CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. 2010, 4(8), 118-126 [žiūrėta 2024-02-13]. Prieiga per doi: 10.4103/0973-7847.70902.
 15. DONTHA, S. A. A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* [interaktyvus]. 2016, 9, 14-32 [žiūrėta 2024-02-13]. Prieiga per doi: 10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092.
 16. ZEHIROGLU, C. ir OZTURK SARIKAYA, S. B. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2019, 56(11), 4757–4774 [žiūrėta 2024-02-13]. Prieiga per doi: 10.1007/s13197-019-03952-x.
 17. MOHARRAM, H. A. ir YOUSSEF, M. M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2014, 11(1), 31-42 [žiūrėta 2024-02-13]. Prieiga per: ResearchGate.
 18. SAMANTA, A. ir DAS, S. K. Roles of flavonoids in Plants. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology* [interaktyvus]. 2011, 6(1), 12-35 [žiūrėta 2024-02-15]. ISSN: 0975-0525. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/279499208>
 19. LIN, D. ir kt. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules* [interaktyvus]. 2016, 21(10) [žiūrėta 2024-02-15]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules21101374.
 20. KHODDAMI, A., WILKES, M. A. ir ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* [interaktyvus]. 2013, 18(2), 2328–2375 [žiūrėta 2024-02-22]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules18022328.
 21. CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews* [interaktyvus]. 2012, 11(2-3), 153-177 [žiūrėta 2024-02-22]. Prieiga per doi: 10.1007/s11101-012-9242-8.
 22. AYAD, R. ir AKKAL, S. Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera. *Studies in Natural Products Chemistry* [interaktyvus]. 2019, 63, 357-414 [žiūrėta 2024-02-22]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-817901-7.00012-5.
 23. MAULANA, T. I., FALAH, S. ir ANDRIANTO, D. Total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of water and ethanol extract from Surian (*Toona sinensis*) leaves. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2024-02-22]. Prieiga per doi: 10.1088/1755-1315/299/1/012021.
 24. AL JITAN, S., ALKHOORI, S. A. ir YOUSEF, L. F. Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health. *Studies in Natural Products Chemistry* [interaktyvus]. 2018, 58, 389-417 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-444-64056-7.00013-1.
 25. GHASEMZADEH, A. ir 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 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.5897/JMPR11.1404.
 26. LOJEK, A., DENEV, P., CIZ, M., VASICEK, O. IR KRATCHANOVA, M. The effects of biologically active substances in medicinal plants on the metabolic activity of neutrophils. *Phytochemistry Reviews*. [interaktyvus]. 2014, 13(2), 499-510 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.1007/s11101-014-9340-x.
 27. STAHL, W. IR SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*.

- [interaktyvus]. 2003, 24(6), 345-351 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X.
28. SUN, T., RAO, S., ZHOU, X. IR LI, L. Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*. [interaktyvus]. 2022, 2(1) [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.1186/s43897-022-00023-2.
 29. ZAKYNTHINOS G. IR VARZAKAS, T. Carotenoids: From plants to food industry. *Current Research in Nutrition and Food Science*. [interaktyvus]. 2016, 4, 38-51 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue1.04.
 30. MASLOVA, T. G., MARKOVSKAYA, E. F. AND SLEMNEV, N. N. Functions of Carotenoids in Leaves of Higher Plants (Review). *Biology Bulletin Reviews*. [interaktyvus]. 2021, 11(5), 476-487 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.1134/s2079086421050078.
 31. ELLISON, S. L. Carotenoids: Physiology. *Encyclopedia of Food and Health*. [interaktyvus]. 2015, 670-675 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00120-3.
 32. AZWANIDA. NN. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. [interaktyvus]. 2015, 4(3) [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.4172/2167-0412.1000196.
 33. AZMIR, J. ir kt. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. [interaktyvus]. 2013, 117(4), 426-436 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
 34. RASUL, M. G. Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages. *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing*. [interaktyvus]. 2018, 2(6), [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://www.ijbsac.org>
 35. OSHADIE, G., SILVA, D., ABEYSUNDARA, A. T., MINOLI, M. ir APONSO, W. Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. [interaktyvus]. 2017, 5(2), 29-32 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://www.essencejournal.com>
 36. GUPTA, A., NARANIWAL, M. ir KOTHARI, V. MODERN EXTRACTION METHODS FOR PREPARATION OF BIOACTIVE PLANT EXTRACTS. *International Journal of Applied and Natural Sciences*. [interaktyvus]. 2012, 1(1), 8-26 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: ResearchGate.
 37. OANCEA, S. ir kt. Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of Vaccinium Corymbosum in the Perspective of Food Applications. *Procedia Engineering*. [interaktyvus]. 2012, 42, 489-495 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.proeng.2012.07.440
 38. DESHMUKH, P. ir kt. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. [interaktyvus]. 2017, 6(1) [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://www.phytojournal.com>
 39. GAURAV, N., JUYAL, P., TYAGI, M., CHAUHAN, N. IR KUMAR, A. A review on *in vitro* propagation of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. [interaktyvus]. 2018, 7(6), [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.13140/RG.2.2.22551.42401
 40. ÇETIN, B., KALYONCU, F. IR KURTULUŞ, B. Antibacterial activities of *Calendula officinalis* callus extract. *International Journal of Secondary Metabolite*. [interaktyvus]. 2017, 257-263 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.21448/ijsm.372108.
 41. KUMAR, N. AND REDDY, M. *In vitro* Plant Propagation: A Review. *Journal of Forest Science*. [interaktyvus]. 2011, 27(2), 61-72 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: ResearchGate

42. ESPINOSA-LEAL, C. A., PUENTE-GARZA, C. A. IR GARCÍA-LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. [interaktyvus]. 2018, 248(1) [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per doi: 10.1007/s00425-018-2910-1.
43. ROBINDRO SINGH, P. IR JAMES SINGH, L. *In vitro* propagation for improvement of medicinal plants: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. [interaktyvus]. 2021, 10(1) [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://www.phytojournal.com>
44. CIURA, J. IR KRUK, J. Phytohormones as targets for improving plant productivity and stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*. [interaktyvus]. 2018, 229, 32-40 [žiūrėta 2024-03-03]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jplph.2018.06.013.
45. FAHAD, S. ir kt. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*. [interaktyvus]. 2015, 75(2), 391-404 [žiūrėta 2024-03-03]. Prieiga per doi: 10.1007/s10725-014-0013-y.
46. MUKHERJEE, A. ir kt. The bioactive potential of phytohormones: A review. *Biotechnology Reports*. [interaktyvus]. 2022, 35 [žiūrėta 2024-03-03]. Prieiga per doi: 10.1016/j.btre.2022.e00748.
47. HABERER, G. IR KIEBER, J. J. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology*. [interaktyvus]. 2002, 128(2), 354-362 [žiūrėta 2024-03-03]. Prieiga per doi: 10.1104/pp.010773.
48. SPAEPEN, S. IR VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. [interaktyvus]. 2011, 3(4), 1-13 [žiūrėta 2024-03-03]. Prieiga per doi: 10.1101/cshperspect.a001438.
49. SHAHANE, K. ir kt. An Updated Review on the Multifaceted Therapeutic Potential of *Calendula officinalis* L. *Pharmaceuticals*. [interaktyvus]. 2013, 16(4) [žiūrėta 2024-03-03]. Prieiga per doi: 10.3390/ph16040611.
50. JYOTISREE, G., SRUTHI, R., BIJU, C. R. ir MENON, A. S. CALENDULA OFFICINALIS AND ECHINACAE PURPURAE AS ANTIMICROBIAL AGENT. *Journal of Applied Pharmaceutical Research*. [interaktyvus]. 2020, 8(2), 8-12 [žiūrėta 2024-03-03]. ISSN: 2348-0335. Prieiga per doi: 10.18231/j.joapr.2020.v.8.i.2.002.
51. JOHN, R. AND JAN, N. Calendula Officinalis-An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. [interaktyvus]. 2017, 93, 769-787 [žiūrėta 2024-03-03]. Prieiga per doi: 10.16943/ptinsa/2017/49126.
52. KARNWAL, A. *In vitro* antibacterial activity of Hibiscus rosa sinensis, Chrysanthemum indicum, and *Calendula officinalis* flower extracts against Gram negative and Gram positive food poisoning bacteria. *Advances in Traditional Medicine*. [interaktyvus]. 2022, 22(3), 607-619 [žiūrėta 2024-04-01]. Prieiga per doi: 10.1007/s13596-021-00562-x.
53. ASHWLAYAN, V. D., KUMAR, A., VERMA, M., GARG, V. K. IR GUPTA, S. Therapeutic Potential of *Calendula officinalis*. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*. [interaktyvus]. 2018, 6(2), 149-155 [žiūrėta 2024-04-01]. Prieiga per doi: 10.15406/ppij.2018.06.00171.
54. PANDEY, P. IR DESPANDE, B. Antioxidant Activity in the Leaves and Petals of *Calendula Officinalis* Linn. *Asian Pacific Journal of Health Sciences*. [interaktyvus]. 2022, 9(2), 130-132 [žiūrėta 2024-04-01]. Prieiga per doi: 10.21276/apjhs.2022.9.2.26.
55. SZOPA, A., KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M., JAFERNIK, K., KOC, K. ir EKIERT, H. Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) – A position in classical phytotherapy and newly documented activities. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. [interaktyvus]. 2020, 19(3), 47-61 [žiūrėta 2024-04-01]. Prieiga per doi: 10.24326/asphc.2020.3.5.

56. KHALID, K. A. ir 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(1), 12-27 [žiūrėta 2024-04-01]. Prieiga per: ResearchGate.
57. ARORA, D., RANI, A. IR SHARMA, A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy Reviews*. [interaktyvus]. 2013, 7(14), 179-187 [žiūrėta 2024-04-05]. Prieiga per doi: 10.4103/0973-7847.120520.
58. OLFATI, A., KAHRIZI, D., BALAKY, S. T. J., SHARIFI, R., TAHIR, M. B. ir DARVISHI, E. Green synthesis of nanoparticles using *Calendula officinalis* extract from silver sulfate and their antibacterial effects on *Pectobacterium caratovorum*. *Inorganic Chemistry Communications*. [interaktyvus]. 2021, 125 [žiūrėta 2024-04-05]. Prieiga per doi: 10.1016/j.inoche.2020.108439.
59. BAGHIZADEH, A. ir kt. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. *Journal of Molecular Liquids*. [interaktyvus]. 2015, 207, 159-163 [žiūrėta 2024-04-23]. Prieiga per doi: 10.1016/j.molliq.2015.03.029.
60. HERNÁNDEZ-DÍAZ, J. A. ir kt. Antibacterial activity of biosynthesized selenium nanoparticles using extracts of *calendula officinalis* against potentially clinical bacterial strains. *Molecules*. [interaktyvus]. 2021, 26(19) [žiūrėta 2024-04-23]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules26195929.
61. LINDSEY, B. E., RIVERO, L., CALHOUN, C. S., GROTEWOLD, E. ir BRKLJACIC, J. Standardized method for high-throughput sterilization of *Arabidopsis* seeds. *Journal of Visualized Experiments*. [interaktyvus]. 2017, 128 [žiūrėta 2024-04-23]. Prieiga per doi: 10.3791/56587.
62. SONALI, M. ir kt. Classification, mechanism and assay of antioxidant compounds isolated from natural sources its applications and future aspects. *Planta*. [interaktyvus]. 2021, 3, 816-829 [žiūrėta 2024-04-23]. Prieiga per: ResearchGate.
63. MINICKAITĖ, R. ir kt. Synthesis of Novel Aminothiazole Derivatives as Promising Antiviral, Antioxidant and Antibacterial Candidates. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2022, 23, 7688 [žiūrėta 2024-05-19]. Prieiga per doi.org/10.3390/ijms23147688
64. JONUŠKIENĖ, I. Ir kt. The Influence of Phytohormones on Antioxidative and Antibacterial Activities in Callus Cultures of *Hypericum perforatum* L. *Agriculture* [interaktyvus]. 2023, 13, 1543 [žiūrėta 2024-05-19]. Prieiga per doi.org/10.3390/agriculture13081543
65. AVILA, C. C. ir kt. Proteome-Wide Analysis of *Trypanosoma cruzi* Exponential and Stationary Growth Phases Reveals a Subcellular Compartment-Specific Regulation. *Genes* [interaktyvus]. 2018, 9, 413 [žiūrėta 2024-05-19]. Prieiga per doi:10.3390/genes9080413
66. NUTAUTAITĖ, M. ir kt. Evaluation of Phenolic Compounds and Pigments in Freshwater *Cladophora glomerata* Biomass from Various Lithuanian Rivers as a Potential Future Raw Material for Biotechnology. *Water* [interaktyvus]. 2022, 14, 1138 [žiūrėta 2024-05-19]. Prieiga per doi.org/10.3390/w14071138
67. TAHIROVIĆ, A. IR BAŠIĆ, N. Determination of phenolic content and antioxidant properties of methanolic extracts from *Viscum album* ssp. *album* Beck. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* [interaktyvus]. 2017, 49, 25-30 [žiūrėta 2024-05-19]. Prieiga per: <https://hemija.pmf.unsa.ba>
68. HAMILTON-AMACHREE, A. IR ETASI, N. J. Spectrophotometric Determination of Total Anthocyanin Content (TAC) in *Costus afer* Flower Extract and its Application as pH Indicator

- in Acid/Base Titrations. *Journal of the Chemical Society* [interaktyvus]. 2019, 44(2), 341-347 [žiūrėta 2024-05-19]. Prieiga per: <https://journals.chemsociety.org.ng>
69. ÁBRAHÁM, E. ir kt. Methods for Determination of Proline in Plants. *Methods in molecular biology* [interaktyvus]. 2010, 317-331 [žiūrėta 2024-05-19]. Prieiga per doi 10.1007/978-1-60761-702-0_20
 70. SAVICKA, M. IR ŠKUTE, N. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija* [interaktyvus]. 2010, 56(1-2), 26-33 [žiūrėta 2024-05-19]. Prieiga per doi: 10.2478/v10055-010-0004-x
 71. AUTHOR, C., MOHAMED, M. F., E Y, E. R. IR GOBARAH, M. E. The stimulatory effects of Tryptophan and yeast on yield and nutrient status of Wheat plants (*Triticum aestivum*) grown in newly reclaimed soil. *Middle East Journal of Agriculture Research* [interaktyvus]. 2018, 7(1), 27-33 [žiūrėta 2024-04-23]. ISSN 2077-4605 Prieiga per: <https://www.curreweb.com>
 72. EL, A., ABDEL-AZIEM, S. H., IBRAHIM, F. M. IR ABD-ELMONEIM, O. M. Effect of Banana Peel Extract or Tryptophan on Growth, Yield and Some Biochemical Aspects of Quinoa Plants under Water Deficit. *International Journal of PharmTech Research* [interaktyvus]. 2016, 9(8), 276-287 [žiūrėta 2024-04-23]. Prieiga per: ResearchGate
 73. AL-MOHAMMAD, M. Effect of Combined-Stimulants and Phenylalanine on Growth, Yield, Constituents, and Antioxidant Activity of Celery Leaves. *Medicon Agriculture & Environmental Sciences* [interaktyvus]. 2023, 4(6), 7-12 [žiūrėta 2024-05-03]. Prieiga per <https://themedicon.com>
 74. SOBATI-NASAB, Z., ALIREZALU, A. IR NORUZI, P. Improvement of physiological and phytochemical parameters of pot marigold (*Calendula officinalis*) using foliar application of zinc. *Agriculture and Natural Resources* [interaktyvus]. 2021, 55(1), 81-88 [žiūrėta 2024-05-03]. Prieiga per doi: 10.34044/j.anres.2021.55.1.11.
 75. KAVIAN, S., SAFARZADEH, S. IR YASREBI, J. Zinc improves growth and antioxidant enzyme activity in Aloe vera plant under salt stress. *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. 2022, 147, 1221-1229 [žiūrėta 2024-05-03]. Prieiga per doi: 10.1016/j.sajb.2022.04.011.
 76. TAVALLALI, V., RAHEMI, M., ESHGHI, S., KHOLDEBARIN, B. IR RAMEZANIAN, A. Zinc alleviates salt stress and increases antioxidant enzyme activity in the leaves of pistachio (*Pistacia vera* L. 'Badami') seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. [interaktyvus]. 2010, 34(4), 349-359 [žiūrėta 2024-05-03]. Prieiga per doi: 10.3906/tar-0905-10.
 77. ATTEYA, A. K. G. ir kt. Exogenously Supplemented Proline and Phenylalanine Improve Growth, Productivity, and Oil Composition of Salted Moringa by Up-Regulating Osmoprotectants and Stimulating Antioxidant Machinery. *Plants* [interaktyvus]. 2022, 11(12) [žiūrėta 2024-05-03]. Prieiga per doi: 10.3390/plants11121553.
 78. Samani, M. R. L-Phenylalanine and bio-fertilizers interaction effects on growth, yield and chemical compositions and content of essential oil from the sage (*Salvia officinalis* L.) leaves. *Industrial Crops & Products* [interaktyvus]. 2019, 137, 1-8 [žiūrėta 2024-05-03]. Prieiga per doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.019
 79. MARYAM, K. IR ABOLGHASEM, J. Challenges on Determination of Malondialdehyde in Plant Samples. *Archives of Crop Science* [interaktyvus]. 2020, 4(1) [žiūrėta 2024-05-03]. Prieiga per doi: 10.36959/718/604.

Priedai

1 priedas. MS maitinamosios terpės paruošimas

Augalų ląstelėms augti turi būti užtikrinamos optimalios aplinkos sąlygos – temperatūra, terpės pH bei šviesos šaltinis. Taip pat ląsteles būtina kultivuoti terpėje, praturtintoje būtinomis jų augimui maistinėmis medžiagomis.

Augalų ląstelių kultūroms kultivuoti paruošiama MS maitinamoji terpė, kurios pH 5,7. Terpė ląstelėms kultivuoti sudaryta iš šių komponentų: mikroelementų, makroelementų, organinių priedų, augimo hormonų, anglies ir geležies šaltinio. Maitinamoji terpė autoklavuojama 15 min 120 °C temperatūroje, nustačius 0,75 – 1 atm. slėgį, siekiant išvengti užterštumo pašaliniais mikroorganizmais.

Vaistinės medetkos kaliaus ląstelės kultivuojamos optimalioje 20-22 °C temperatūroje, fotoperiodas – 24 valandos. Kaliaus kultūros iš lapų, stiebų ir šaknų kas 3 savaites buvo perkeliamos į naują mitybinę terpę.

2 priedas. MS maitinamosios terpės paruošimui reikalingi reagentai

Reagentai	Reagentų kiekiai reikalingi 1 L terpės
Makro druskos	50 ml
Mikro druskos	5 ml
Fe-EDTA	5 ml
Sacharozė	30 g
Agaras	5 g
Organiniai priedai	5 ml

3 priedas. Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūros *in vitro*



