



**KAUNO TECHNOLOGIJOS
UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS
FAKULTETAS**

**LIETUVOS SVEIKATOS
MOKSLŲ UNIVERSITETAS
FARMACIJOS FAKULTETAS**

Miglė Bernatavičiūtė

**NANONEŠIKLIŲ ĮTAKOS RAUDONŲJŲ DOBILŲ EKSTRAKTO
KOMPONENTŲ SKVARBAI Į ODAŲ IR BIOLOGINIAM
POVEIKIUI TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas
Prof. dr. Vitalis Briedis

KAUNAS, 2018

**KAUNO TECHNOLOGIJOS
UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS
FAKULTETAS**

**LIETUVOS SVEIKATOS
MOKSLŲ UNIVERSITETAS
FARMACIJOS FAKULTETAS**

**NANONEŠIKLIŲ ĮTAKOS RAUDONŲJŲ DOBILŲ EKSTRAKTO
KOMPONENTŲ SKVARBAI Į ODAŲ IR BIOLOGINIAM
POVEIKIUI TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas

Medicininė chemija (kodas 628F10001)

Vadovas

(parašas) Prof. dr. Vitalis Briedis
(data)

Recenzentas

(parašas) Lekt. dr. Vaida Juškaitė
(data)

Projektą atliko

(parašas) Miglė Bernatavičiūtė
(data)

KAUNAS, 2018



**KAUNO TECHNOLOGIJOS
UNIVERSITETAS**

**LIETUVOS SVEIKATOS
MOKSLŲ UNIVERSITETAS**

Miglė Bernatavičiūtė

Studijų programa Medicininė chemija (kodas 628F10001)

„Nanonešiklių įtakos raudonųjų dobilų ekstrakto komponentų skvarbai į odą ir biologiniam poveikiui tyrimai“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2018 m. gegužės mėn. 30 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Miglės Bernatavičiūtės** Baigiamasis projektas tema „Nanonešiklių įtakos raudonųjų dobilų ekstrakto komponentų skvarbai į odą ir biologiniam poveikiui tyrimai“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena darbo dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymu nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	6
SUMMARY	8
SANTRUMPOS	10
ĮVADAS	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1 Raudonojo dobilo (<i>Trifolium pratense</i> L.) cheminė sudėtis ir biologinis aktyvumas	12
1.2 Vaistų pernaša per odą	14
1.2.1 Niosomų apibūdinimas	15
1.3 UVB ir UVA spinduliuotės įtaka ROS susidaryme	15
1.4 <i>C. elegans</i> modelio pasirinkimas	16
1.4.1 <i>C. elegans</i> anatomicinės savybės	18
1.4.2 Vystymosi ciklas	20
1.4.3 <i>C. elegans</i> senėjimo tyrimai	21
1.4.4 <i>C. elegans</i> modelyje naudojami aplinkos sukeliama stresą identifikuojantys molekuliniai žymekliai	23
1.5 Baigiamojo projekto temos ir uždavinių pagrindimas	23
2. TYRIMO METODIKA	24
2.1 Tyrimo objektas	24
2.2 Naudotos medžiagos ir įranga	24
2.2.1 Medžiagos	24
2.2.2 Įranga	25
2.3 Raudonųjų dobilų veiklių junginių skvarbos tyrimas <i>ex vivo</i>	26
2.3.1 Skvarbos per žmogaus odą tyrimai <i>ex vivo</i>	26
2.3.2 Efektyviosios skysčių chromatografijos metodika	27
2.4 Raudonųjų dobilų ekstrakto tyrimai pritaikant ląstelių modelį	28
2.4.1 Ląstelių sėjimas ir tankio nustatymas	28
2.4.2 Ląstelių gyvybingumo tyrimai <i>in vitro</i>	29
2.4.3 UV apsauginio poveikio tyrimai <i>in vitro</i>	30
2.5 Raudonojo dobilų ekstrakto ir formuluotės toksiškumo tyrimai naudojant <i>C. elegans</i> modelį	31
2.5.1 Nematoidų auginimas	31
2.5.2 <i>C. elegans</i> kultūros sinchronizavimas	31
2.5.3 Raudonųjų dobilų ekstraktu ir formuluote paveiktą <i>C. elegans</i> senėjimo tyrimas	32

2.5.4	Ekstrakto ir niosomų formulotės poveikis su senėjimu susijusių genų sužadinime..	33
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	34
3.1	Raudonųjų dobilų ekstrakto veikliųjų junginių skvarba per odą	34
3.2	MTT metodu nustatytas raudonųjų dobilų ekstrakto ir formulotės poveikis ląstelių gyvybingumui	35
3.2.1	Poveikis naudojant HaCaT ląstelių modelį	35
3.2.2	Poveikis naudojant 3T3 ląstelių modelį	36
3.3	UV apsauginio poveikio tyrimų rezultatai	38
3.3.1	UV apsauginio efekto vertinimas pritaikant HaCaT ląstelių modelį.....	38
3.3.2	UV apsauginio efekto vertinimas pritaikant 3T3 ląstelių modelį.....	39
3.4	Raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklio toksiškumo vertinimas naudojant <i>C.elegans</i> modelį	41
3.4.1	<i>C.elegans</i> gyvenimo trukmės pokyčiai.....	41
3.4.2	Poveikis už atsaką į stresą atsakingų <i>gst-4</i> , <i>hsp-4</i> , <i>hsp-16.2</i> ir <i>sod-3</i> genų sužadinime	43
	IŠVADOS	45
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	46
	PUBLIKACIJOS DARBO TEMA	54
	PADĖKA	55

Bernatavičiūtė, Miglė. Nanonešiklių įtakos raudonųjų dobilų ekstrakto komponentų skvarbai į odą ir biologiniam poveikiui tyrimai. *Chemijos magistro* Baigiamasis projektas / vadovas prof. dr. Vitalis Briedis; Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Farmacijos fakultetas, Klinikinės farmacijos katedra.

Mokslo kryptis ir sritis: Fiziniai mokslai, chemija

Reikšminiai žodžiai: *Trifolium pratense*, nanonešikliai, oda, UV apsauga.

Kaunas, 2018. 55 p.

SANTRAUKA

Raudonasis dobilas – pasaulyje plačiai paplitęs daugiametis žolinis augalas nuo seno naudojamas kaip vaistinis augalas. Pagrindiniai raudonųjų dobilų ekstraktą sudarantys veiklieji junginiai yra izoflavonai fitoestrogenai biochaninas A, daidzeinas, genisteinas ir formononetinas, taigi ekstraktas pasižymi estrogeniniu aktyvumu, tačiau dėl antioksidacinių, antimikrobinų, priešuždegiminių izoflavonų savybių imta vis labiau domėtis išoriniu raudonųjų dobilų panaudojimu. Saulės skleidžiama UVB ir UVA spinduliuotės yra vienas iš svarbiausių faktorių, kurie skatina odos ligų vystymąsi, todėl susidomėta augalo pritaikymu mažinti kenksmingą UV šviesos poveikį. Susiduriama su problema, kad raudonųjų dobilų ekstrakto skvarba į gilesnius odos sluoksnius yra menkai ištirta. Vaistinės medžiagos įterpimas į nanonešiklius yra viena iš galimų pernešimo sistemų. Niosomos – submikrono dydžio nejoninių paviršiaus aktyviųjų medžiagų nešikliai, kurie pasižymi transderminę veikliųjų junginių pernešimą gerinančiomis savybėmis. Raudonųjų dobilų ekstrakto įterpimas į niosomų formuluotę anksčiau nėra tirtas ir mokslinėje literatūroje neaprašytas. Tyrimo metu siekiama įvertinti transderminio nanonešiklio galimybes gerinti skvarbą per odą ir ištirti raudonųjų dobilų ekstrakto ir formuluotės biologines ir UV apsaugines savybes. Magistro baigiamojo projekto tyrimų rezultatai parodė, kad biochanino A skvarba epidermyje pagerinama $5,637 \pm 2,7318$ kartų, dermoje $12,337 \pm 5,2108$, o formononetino A skvarba epidermio odos sluoksnyje pagerėja $6,4774 \pm 1,8917$, dermoje – $10,7783 \pm 2,0813$ kartų, taigi į nanonešiklį įterpto raudonųjų dobilų ekstrakto veikliųjų junginių formononetino ir biochanino A skvarba per epidermio ir dermos odos sluoksnius yra efektyvi raudonųjų dobilų ekstrakto skvarbą gerinanti nanonešiklinė sistema. Vertinant raudonojo dobilo ekstrakto ir nanonešiklio formuluotės poveikį HaCaT ir 3T3 ląstelių gyvybingumui nustatyta, kad HaCaT modelyje, naudojant mažesnes negu $15 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto nanonešiklio formuluotės koncentracijas ir $5 \mu\text{g/ml}$ gryno ekstrakto tirpalus, citotoksiškas poveikis ląstelėms nepasireiškia. 3T3 ląstelių gyvybingumas išlieka beveik nepakitęs esant $10 \mu\text{g/ml}$ formuluotės ir $15 \mu\text{g/ml}$ gryno raudonųjų dobilų ekstrakto tirpalams, taigi mažesnių ekstrakto ir

nanonešiklio preparato koncentracijų tirpalai neveikia citotoksiškai ir gali būti naudojami ant odos. UV apsauginio poveikio tyrimų, DCFDA metodu, metu nustatyta, kad HaCaT ir 3T3 ląsteles paveikus 1–10 µg/ml raudonųjų dobilų ekstraktu ir jo formuluote bei apšvitinus UVB spinduliuote, viduląstelinių reaktyvių deguonies formų kiekis sumažėja, taigi didesnių negu 1 µg/ml koncentracijų tirpalai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. HaCaT ląsteles veikiant analogiškais nanonešiklio formuluotės tirpalais ir UVA spinduliuote reaktyvių deguonies formų taip pat sumažėja, tačiau HaCaT ląsteles paveikus raudonųjų dobilų ekstraktu, 3T3 ląsteles paveikus 1–10 µg/ml raudonųjų dobilų ekstrakto ir jo formuluotes tirpalais ir UVA šviesa reaktyvių deguonies formų kiekis padidėja, taigi tiriamieji tirpalai pasižymi UVB apsauginio poveikio savybėmis, tačiau nėra efektyvūs veikiant UVA šviesa. Atlikus raudonųjų dobilų ekstrakto ir formuluotės biologinį vertinimą naudojant *Caenorhabditis elegans* modelį nustatyta, kad 10 µg/ml ekstraktas nematoidams yra toksiškas, 1 µg/ml ir 0,5 µg/ml ekstrakto ir nanonešiklio su įterptu atitinkamu kiekiu ekstrakto tirpalai statistiškai reikšmingo poveikio *C.elegans* gyvenimo trukmei neturi, tačiau 0,1 µg/ml formuluotės tirpalas yra toksiškas, nes dominuoja nežymiai neigiamas formuluotės poveikis. Tiriant raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklių formuluotės poveikį už stresą atsakingų *gst-4*, *hsp-4*, *hsp-16.2* ir *sod-3* genų sužadinime, nustatyta, kad ekstraktas ir formuluotė nesukelia šių genų sužadinimo, taigi nėra egzogeninis toksiškumą lemiantis veiksnys.

Bernatavičiūtė, Miglė. *Nanocarriers for Red Clover Extract Components Transdermal Delivery and Analysis of Biological Effect*: Master's thesis in Chemistry / supervisor Prof. Dr. Vitalis Briedis. The Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences.

Research area in: Physical Sciences, Chemistry.

Key words: *Trifolium pratense*, transdermal, nanocarriers, UV protection

Kaunas, 2018, 55 p.

SUMMARY

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is a plant grown all around the world and long time used as a drug in alternative medicine. Extract is a rich source of flavonoids – mainly four major estrogenic isoflavones genistein, daidzein, and their derivatives biochanin A and formononetin. Isoflavones has antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, anticancer properties and could be used in skin protection from UV radiation oxidative damage. UVB and UVA are two basic types of ultraviolet light that reach the surface of earth and induce main skin diseases. For this reason, red clover extract is one of the potential plant for prevention of skin damage. No scientific data were found regarding red clover extract penetration into the skin. Extract incorporation into the nanocarriers is one of the solution. Niosomes are submicron sized vesicles formed due to self-assembly of one or more nonionic surfactants or lipid. No information were found regarding red clover extract and niosomal formulation effects as an antioxidative agent on the skin and no nanocarrier described as a effective vesicle for transdermal red clover extract delivery. Nanocarrier formulation skin penetration enhancement ratios were calculated for red clover active components biochanin A and formononetin. Epidermis penetration enhancement ratio for biochanin A was determined to be $5,637 \pm 2,7318$ and $6,4774 \pm 1,8917$ for formononetin. Dermis penetration enhancement ratio for biochanin A was determined to be $12,337 \pm 5,2108$ and $10,7783 \pm 2,0813$ for formononetin. Current study demonstrated significantly increased ($p < 0,05$) red clover extract ingredients flux values into the skin layers. The cellular toxicity of red clover extract and niosomal formulation were evaluated over 24 hours exposure by measuring mitochondrial activity. Results showed that application of nanocarrier with incorporated extract (3 %) did not exert a reduction of HaCaT cell viability within the applied concentration range of 0,5–15 $\mu\text{g/ml}$ and in 3T3 cells in range of 0,5–10 $\mu\text{g/ml}$. In comparison, crude extract did not show cell viability changes in a concentration range from 0,5–5 $\mu\text{g/ml}$ in HaCaT and 0,5–15 $\mu\text{g/ml}$ in 3T3 *in vitro* model. ROS accumulation test was assessed after application of not cytotoxic nanocarrier formulation and red clover extract solutions and UVB / UVA radiation treatment. Results with HaCaT cells treated with extract incorporated in niosomes and affected with UVB radiation shows that in 1 $\mu\text{g/ml}$ and 2 $\mu\text{g/ml}$ concentrations ROS accumulation, comparing with control, increased to $106,929 \pm 1,109$ % and $104,103 \pm 2,659$ %, respectively. After application of 3–

10 µg/ml nanocarrier solutions accumulated ROS amount decrease and at 10 µg/ml reach 75,202±3,681 %. After assesment with crude red clover extract intracellular ROS formation decrease from 98,947±7,409 % treated with 1 µg/ml to 77,173±8,784 % in 10 µg/ml solutions. Study with 3T3 cell model demonstrated antioxidative effect on both red clover extract and nanocarrier formulation solutions. Effects of red clover extract and nanocarrier formulation after UVA radiation on 3T3 and HaCaT cells were tested. Comparing with control HBSS solution, ROS activity decrease in HaCaT cells affected with niosomal formulation in the range of 1–10 µg/ml concentrations, but increase after assesment with crude red clover extract. After experiments with 3T3 cell model, the amounts of ROS detected were higher. After 60 min treatment with crude extract ROS accumulation reaches values from 141,504±12,036 % to 189,152±8,005 % in solutions 1–10 µg/ml and from 103,849±5,508 % to 152,917±24,045 % after treatment with niosomal formulation. We examined whether extract and niosomal formulation affect *C.elegans* lifespan. 10 µg/ml extract solution significantly decreased both the mean and the maximum lifespan of *C.elegans*. The lifespan extending effect identified in worms treated with 1 µg/ml extract solution (difference is not significant). The concentration of extract 0,1 µg/ml and 0,5 µg/ml are not sufficient and show no effect on *C.elegans* lifespan. Same results are identified with niosomal formulation with 1 and 0,5 µg/ml extract. At 0,1 µg/ml extract concentration incorporated in niosome we do not have positive effect because the extract concentration is to small. In this solution observed only the negative effect of niosomes ($p < 0,001$). Age related genes (*gst-4*, *hsp-16.2*, *hsp-4* and *sod-3*) expression experiment in *C.elegans* was assesed to test red clover extract and niosomal formulation possibility to promote activation of stress-responsive gene reporters during worms adulthood in non-stressing conditions. Expression of tested fluorescent markers do not show any response to red clover extract and nanocarrier formulation treatment. Results show that tested solutions are not toxic external factors.

SANTRUMPOS

DCF-DA – 2',7'-dichlorofluorescino diacetatas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas

RNR – ribonukleino rūgštis

ROS – reaktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*)

UV – ultravioletiniai spinduliai

ĮVADAS

Raudonasis dobilas – pasaulyje plačiai paplitęs daugiametis žolinis augalas nuo seno naudojamas ne tik kaip pašaras gyvūnams, bet ir vaistinis augalas. Žiedų arbatos arba etanolinės tinktūros ilgą laiką naudojamos viršutinėms kvėpavimo ligoms gydyti, gerklės skausmui bei karščiavimui mažinti, o nuovirai ir tepalai naudoti paviršinių žaizdų ir nudegimų gydyme [1]–[3]. Pagrindiniai raudonųjų dobilų ekstraktą sudarantys veiklieji junginiai yra izoflavonai fitoestrogenai biochaninas A, daidzeinas, genisteinas ir formononetinas, taigi didžioji dalis dobilų ekstrakto naudojimo yra pagrįsta estrogeniniu jo aktyvumu, tačiau dėl antioksidacinių, antimikrobinų, priešuždegiminių izoflavonų savybių imta vis labiau domėtis išoriniu raudonojo dobilo panaudojimu.

Standartizuotų ekstraktų naudojimas aprašomas JAV farmakopėjoje, PSO monografijoje, o aktyvumas įrodytas *in vivo* ir *in vitro* tyrimais, tačiau vis dar susiduriama su informacijos stoka apie raudonųjų dobilų veikliųjų junginių skvarbą ir poveikį odai.

Vaistinės medžiagos įterpimas į nanonešiklius yra viena iš galimų pernešimo sistemų. Niosomos – submikrono dydžio nejoninių paviršiaus aktyviųjų medžiagų nešikliai suformuoti iš fosfolipidų ir pasižymintys daug žadančiomis, transderminį veikliųjų junginių pernešimą gerinančiomis savybėmis. Raudonųjų dobilų ekstrakto įterpimas į niosomų formuluotę anksčiau nėra tirtas ir mokslinėje literatūroje neaprašytas. Magistro baigiamojo projekto metu siekiama iširti ir palyginti standartizuoto raudonųjų dobilų ekstrakto ir jo niosomų formuluotės skvarbą per odą, biologinį aktyvumą bei galimybes būti panaudotiems kaip UV apsauginiams agentams.

Darbo tikslas – įvertinti transderminio nanonešiklio galimybes gerinti skvarbą per odą ir iširti raudonųjų dobilų ekstrakto ir formuluotės biologines ir UV apsaugines savybes.

Darbo uždaviniai:

1. iširti raudonųjų dobilų ekstrakto nanonešiklio formuluotės skvarbą per odą *ex vivo*;
2. įvertinti raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklio poveikį HaCaT ir 3T3 ląstelių gyvybingumui;
3. nustatyti ekstrakto ir nanonešiklių formuluotės UV apsauginį poveikį naudojant HaCaT ir 3T3 ląstelių modelius;
4. atlikti raudonųjų dobilų ekstrakto ir formuluotės biologinį vertinimą naudojant *Caenorhabditis elegans* modelį.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Raudonojo dobilo (*Trifolium pratense* L.) cheminė sudėtis ir biologinis aktyvumas

Raudonasis dobilas (*Trifolium pratense* L.) priklauso pupinių (*Fabaceae*) šeimos augalams, kuriems priskiriama apie 300 rūšių, iš kurių 25 yra ypač plačiai paplitusios ir kultivuojamos visame pasaulyje. *T.pratense* yra daugiametis žolinis augalas su plona ir šakota, arti dirvos paviršiaus esančia šaknimi. Stiebas pusiau statmenas net ir vėlyvoje augimo stadijoje nesuragėjantis ir galintis išaugti iki 60–70 cm aukščio. Stiebo viršutinė dalis padengta plaukeliais, lapai trumpakočiai, su prielapiais, lakštai trilapiai, rečiau keturlapiai. Žiedyne subrandintas vaisius kiaušiniškos formos su daugiau negu viena sėkla, o augalas yra priskiriamas diploidiniams augalams [4].

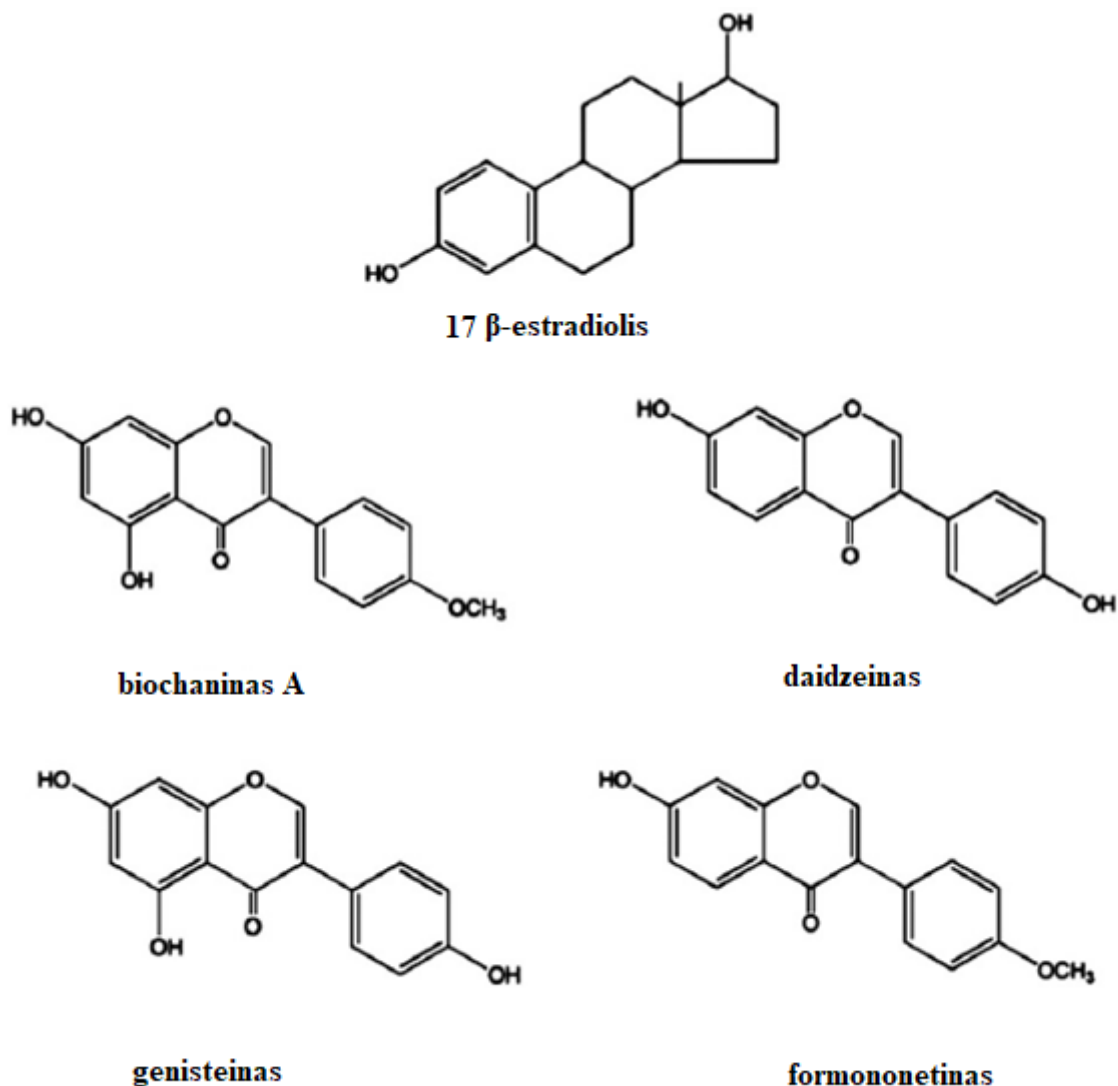
Raudonasis dobilas naudojamas ne tik kaip pašaras gyvūnams, bet nuo seno yra žinomas kaip vaistinis augalas. Žiedų arbatos arba etanolinės tinktūros ilgą laiką naudojamos viršutinėms kvėpavimo ligoms gydyti: kosuliui, astmai, bronchiniam susirgimams bei pasižymi lengvu raminamuoju poveikiu [1]. Dobilas yra Pakistane paplitusi žolė ir yra naudojama gerklės skausmui, karščiavimui mažinti, pneumonijai, meningitui gydyti [2]. Albanijos Alpėse, Kosove žolės sultys naudojamos virškinimo sutrikimams, *T.pratense* analogas *T.repens* naudotas kaip žaliava diarėjai gydyti [5]. Nuovirai ir tepalai naudoti paviršiniams odos pažeidimams - nudegimams ir žaizdoms gydyti [3].

Raudonojo dobilo vartojimas aprašomas JAV farmakopėjoje, PSO monografijoje [6] bei mokslinėse publikacijose. Monografijoje aprašoma žaliava yra raudonojo dobilo žiedyno ekstraktas, tačiau farmakologinis poveikis tirtas ne gryno ekstrakto, o atlikta atskirų iš jo išskirtų junginių analizė.

Nustatyta, kad raudonasis dobilas kaupia 35,54 % izoflavonų, 1,11 % flavonoidų, 0,06 % pterokarpanų, apie 0,03 % kumarinų ir 0,03 % tiraminų [7]. Didžioji dalis kaupiamų izoflavonų yra fitoestrogenai: biochaninas A (5,7-dihidroksi-4'-metoksiizoflavonas), daidzeinas (4',7-dihidroksiizoflavonas), genisteinas (4',5,7-trihidroksiizoflavonas) ir formononetinas (7-hidroksi-4'-metoksiizoflavonas) (1.1 pav.), todėl jo ekstraktai yra naudojami menopauzės simptomams mažinti, hiperlipidemijos gydyme kaip alternatyva hormonų terapijai, taip pat osteoporozės, prostatos hipertrofijos ir prostatos vėžio prevencijoje [1]. Didžioji dalis dobilų ekstrakto naudojimo yra pagrįsta estrogeniniu jo aktyvumu, kadangi izoflavonai dėl savo struktūrinių panašumų su 17 β-estradioliu, geba elgtis kaip selektyvūs estrogenų receptorių modulatoriai. Veiksmingumas įrodytas *in vivo* ir *in vitro* tyrimais [8], [9]. Kiekvienas raudonojo dobilo izoflavonas skirtingai veikia ir pasižymi skirtingu estrogenų receptorių antagonizmu [10].

Raudonojo dobilo ekstrakto cheminės analizės metu išskiriami 22 skirtingi junginiai, kurie priklauso nuo ekstrakcijos būdo. Priklausomai nuo to skiriasi ir estrogeninis aktyvumas [11], todėl

įprastai naudojami standartizuoti raudonųjų dobilų ekstraktai. Be izoflavonų, *T.pratense* sintetina fenolinius ir polifenolinius junginius: flavanoidai, saponinai, klovamidai (kofeino rūgšties esteriai), fenolinės rūgštys ir kiti junginiai [12].



1.1 pav. 17 β-estradiolio ir pagrindinių raudonojo dobilo izoflavonų cheminės formulės.

Izoflavonų, kaip biologiškai aktyvių junginių, veiksmingumas priklauso nuo jų koncentracijos ir junginio. Sojos augalas daugiausia sudarytas iš glikozidinių formų, o didžioji dalis raudonojo dobilo izoflavonų yra aglikonai, taigi pagrindiniai sojos izoflavonai yra daidzeinas ir genisteinas, o dobilų – metilintos izoflavonų formos biochaninas A ir formononetinas. Dėl metoksi grupės stereochemijos pastarosios dvi izoflavonų formos pasižymi mažesniu estrogeniniu aktyvumu, kadangi negali taip efektyviai jungtis prie estrogenų receptorių kaip kad pradinės jų formos, tačiau organizme gali būti metabolizuojamos ir biochaninas A virsta genisteino, o formononetinas – daidzeinu.

2016 metais Yu su kolegomis nustatė, kad isoflavonai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis – mažina ROS susidarymą ir įvairių uždegimą skatinančių moduliatorių atpalaidavimą [13]. Per

didelė reaktyvių deguonies ir azoto formų gamyba dalyvauja uždegimo ir vėžio etiologiniuose ir patofiziologiniuose susidarymo procesuose, taip pat autoimuninių, neurodegeneracinių, širdies ir kraujagyslių ligų vystymėsi [14]. *In vitro* tyrimais nustatyta, kad iš raudonųjų dobilų ekstrakto iškirtas formononetinas, daidzeino 4'-O-metil eteris turi silpną antioksidacinį poveikį [15], tačiau bendras raudonųjų dobilų ekstrakto veikimas nebuvo tirtas.

Tyrimai su krūties vėžio ląstelėmis rodo, kad ir metilintos ir nemetilintos izoflavonų formos veikia transkripciją ir mažina onkogenų ekspresiją. Ypač reikšmingas poveikis pastebėtas veikiant formononetinui ir biochaninui A, kurie mažina nuo estrogenų priklausomų onkogenų ekspresiją [16]. Taip pat svarbu paminėti, kad metilintos formos yra apie tris kartus geriau absorbuojamos, negu nemetilinti izoflavonai [17].

Išoriniam raudonojo dobilo panaudojimui svarbus raminamasis poveikis odai. Nustatyta, kad veikliosios medžiagos teigiamai veikia odos sudirgimus, tokius kaip žvynelinė ar egzema bei mažina odos niežėjimą [18]. 2013 metais atilktų tyrimų metu tirta *Trifolium* rūšies augalų gebėjimas gerinti žaizdų gijimą. Nustatyta, kad lyginant su kitų augalų ekstraktais ir kontroline grupe *Trifolium canescens* ir *Trifolium pratense* augalai pasižymi geresnėmis žaizdų gijimą skatinančiomis savybėmis. *T.pratense* ekstraktas žaizdų užsitraukimą pagerino 30,21 %, o žaizdos tamprumas pagerėjo 21,3 % [19]. Tyrimų metu pagrindiniai, ekstraktą sudarantys komponentai buvo daidzeinas, genisteinas, formononetinas ir biochaninas A, todėl manoma kad žaizdų gijime ekstrakto biologinis aktyvumas pasireiškia dėl kompleksinio šių junginių poveikio.

1.2 Vaistų pernaša per odą

Transderminis vaistų pernešimas yra sudėtinga, tačiau vis dažniau nagrinėjama tema. Vaistų pernešimas per odą yra laikomas vienu iš priimtinausių vaisto formų, nes yra neinvazinė, neskausminga ir patogi – oda turi didelį paviršiaus plotą, o vaistas vartojamas nedidelėmis dozėmis, todėl pacientams šis vartojimo būdas yra tinkamesnis ypač tada, kai reikia ilgalaikio gydymo. Lyginant su oraliniu ir parenteraliniu būdu, transderminis vaisto vartojimas yra efektyvesnė vaisto forma, nes išvengiama hepatinio metabolizmo (vaisto deaktyvinimo veikiant virškinamojo trakto arba kepenų fermentų), todėl padidėja vaisto prieinamumas ir efektyvumas, tai pat išvengiama skrandyje vykstančios degradacijos (pH, fermentų, vaisto sąveikos su maistu, gėrimais ar kitais vartojamais vaistais).

Vis dėl to, vaistų skvarba per odą yra sudėtinga, nes viršutinis epidermio sluoksnis (raginis sluoksnis) pasižymi stipriomis barjerinėmis funkcijomis ir taip stabdo vaisto pasisavinimą per odą. Dėl šios priežasties stengiamasi rasti būdų kaip pagerinti vietinį ir sisteminį vaisto pernešimą. Vaistinės medžiagos įterpimas į liposominius nešiklius yra viena iš galimų pernešimo sistemų.

Baltymų ir mažų molekulių pernešimas gali būti gerinamas naudojant lipidines nanonešiklių sistemas, tokias kaip: etosomos, transferosomos, niosomos.

1.2.1 Niosomų apibūdinimas

Niosomos pirmą kartą paminėtos 1979 metais ir apibūdintos kaip submikrono dydžio ($<1 \mu\text{m}$) nejoninių paviršiaus aktyviųjų medžiagų nešikliai [20], savo struktūra panašūs į liposomas, suformuoti iš fosfolipidų, kurie hidrofilinius vaistus inkapsuliuoja į viduląstelinę erdvę, o lipofilinius – į lipidų dvisluoksnį [21]. Nustatyta, kad dėl nejoninės prigimties niosomos yra netoksiškos, biodegraduojančios, neimunogeninės ir turi teigiamą poveikį vaistų skvarbai per odą, todėl gerina vaisto prieinamumą [22]. Lyginant su liposomomis, niosomos yra stabilesnės ir turi ilgesnį naudojimo laiką [23].

Nejoniniai surfaktantai yra pagrindiniai niosomas sudarantys komponentai. Jie yra amfifilinės molekulės su dviem skirtingais regionais, turinčiais skirtingą tirpumą, hidrofilines ir lipofilines (smarkiai hidrofobines) dalis. Pastarasis regionas yra grandinės sudarytos iš alkanų, fluoro anglies, aromatinių ar kitų nepolinių grupių. „Galvinė“ dalį sudaro hidrofilinės grupės: sulfonatai, karboksilatai, fosfonatai ar amonio dariniai [24]. Niosomų dydis, veikliosios medžiagos įterpimo efektyvumas ir stabilumas yra savybės, kurios gali būti kontroliuojamos remiantis paruošimo metodu, surfaktantų, cholesterolio sudėtimi, paviršiaus krūviu ir suspensijos koncentracija [25].

Manoma, kad vaistų absorbciją niosomos gerina dviem mechanizmais. Pirmasis – niosomos mažina transepiderminį vandens netekimą, todėl padidėja *stratum corneum* hidracija ir jis praranda būdingą kompaktišką ląstelinę struktūrą. Antrasis mechanizmas pagrįstas surfaktantų savybėmis. Surfaktantai tarnauja kaip matriksas ir nanodydžio niosomos gerina vaisto pernešimą per raginį odos sluoksnį [26].

1991 metais, naudojant elektroninę mikroskopiją, buvo nustatyta, kad po 48 val., mažos (100 nm) niosomos prasiskverbia per pirmąjį ir antrąjį žmogaus korneocitų sluoksnį, tačiau skvarba per gilesnius odos sluoksnius nebuvo nustatyta [27]. Kitų tyrimų metu pastebėta, kad niosomų skvarba priklauso nuo jų kaip nešiklio lankstumo [28], o kaip modelinę sistemą naudojant peles, rezultatai rodo, kad nešiklis pailgina vaisto atpalaidavimo laiką ir pagerina jo skvarbą per odą [29].

1.3 UVB ir UVA spinduliuotės įtaka ROS susidaryme

Laisvieji radikalai literatūroje apibūdinami kaip bet kokios rūšys turinčios vieną ar daugiau nesuporuotų elektronų. Reaktyviomis deguonies formomis (ROS) laikomi deguonies radikalai: superoksidai ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksilai (OH^{\bullet}), peroksilai (RO_2^{\bullet}), hidroperoksilai (HO_2^{\bullet}) bei oksiduojantys

agentai, tokie kaip vandenilio peroksidai (H_2O_2), hipochloro rūgštis ($HOCl$) ar ozonas (O_3), kurie tam tikromis sąlygomis nesunkiai virsta į radikalus. Ląstelėse ROS susidaro įprasto metabolizmo metu ir dalyvauja fermentinėse reakcijose, mitochondrijose elektronų pernašoje, signalų perdavime, branduolio transkripcijos faktorių aktyvavime, genų ekspresijoje ir neutrofilų bei makrofagų veikloje [30].

Didėjant oro užterštumui pažeidžiamas ozono sluoksnis, todėl susiduriama su didesniu ultravioletinės spinduliuotės kiekiu. Saulės skleidžiama UVB (290–320 nm) ir UVA (320–400 nm) spinduliuotės yra vienas iš svarbiausių faktorių, kurie skatina odos ligų vystymąsi. Veikiant spinduliuotei pažeidžiamas odos vientisumas – epidermio ląstelės apoptuoja, o tai didina riziką susirgti odos vėžiu [31]. UVA ir UVB biologinis poveikis skiriasi, tačiau abiejų bangų ilgių spinduliuotė didina ROS gamybą ląstelėse.

UVB sudaro tik 5–10 % saulės skleidžiamos ir žemę pasiekiančios UV spinduliuotės, tačiau ji yra laikoma viena pavojingiausių ir didžiausią genotoksinį poveikį turinčia spinduliuote. UVB spinduliuotė turi daugiau energijos, todėl geba tiesiogiai pažeisti odos ląstelių DNR ir sukelia odos nudegimus bei yra svarbus faktorius sergant onkologinėmis ligomis. UVB spinduliuotės sukelti odos pažeidimai gali atsirasti dėl keleto ląstelėse vykstančių mechanizmų – laisvųjų radikalų susidarymo ir lipidų peroksidacijos [32]. Ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad UVB šviesa skatina įvairių ROS susidarymą. Veikiant šiai spinduliuotei, ląstelėse didėja hidroksilo radikalų (OH^\bullet), superoksido radikalų ($O_2^{\bullet-}$), peroksilo radikalų ir jų pradinių junginių, tokių kaip vienvalentis deguonis (1O_2) ir vandenilio peroksido (H_2O_2) kiekis [33].

UVA sudaro 90–95 % spinduliuotės kuri pasiekia žemės paviršių. Ji prasiskverbia giliau į dermą ir yra siejama su odos ląstelių senėjimu, DNR pažeidimais ir raukšlių formavimusi. Vienas iš UVA, kaip ir UVB, spinduliuotės veikimo mechanizmų yra ROS gamyba ląstelėse. Veikiant UVA šviesa skatinama vienvalenčio deguonies (1O_2), superoksido radikalų ($O_2^{\bullet-}$), vandens peroksido (H_2O_2) ir hidroksilo radikalų (OH^\bullet) gamyba. ROS pažeidžia ir naikina odos ląsteles ir audinius sudarančių ląstelių komponentus, tokius kaip lipidai, baltymai, DNR. Pavyzdžiui, vienas iš UVA spinduliuotės sukeltų radikalų, 1O_2 tiesiogiai pažeidžia ląsteles, kadangi veikia ekstraląstelinio matrikso elementus, skatina metaloproteinazės-1 gamybą ir taip pažeidžia kolageną, kuris sukelia odos fotosenėjimą [34].

1.4 *C. elegans* modelio pasirinkimas

Caenorhabditis elegans yra maži, aplinkoje laisvai gyvenantys ir plačiai paplitę dirvos nematoidai (apvaliosios kirmėlės), kurios minta mikrobais, dažniausiai bakterijomis ir yra svarbi

modelinė sistema genetikos, ląstelės biologijos, neuromokslų ar senėjimo tyrimuose. Iš gyvūnų modelių, *C.elegans* yra vienas iš greičiausių, pigiausių ir veiksmingiausių sistemų.

Dirvos nematoidas *Caenorhabditis elegans* kaip modelinė sistema pirmą kartą paminėta dvidešimto amžiaus antrojoje pusėje, vystymosi ir neurobiologijos srityse [35]. Vėlesniuose tyrimuose *C.elegans* pradėtas naudoti įvairių biologinių procesų modeliavime. Tiriama apoptozė, ląstelių signalų perdavimo keliai, ląstelės ciklas, poliariškumas, genų reguliacija, metabolizmas ir senėjimas. Eksperimentų metu nustatyta, kad kirminų ir žinduolių molekuliniai ir ląsteliniai keliai yra analogiški, o žmogaus ir *C.elegans* genomo tyrimai patvirtino, kad didelė dalis žmogaus ligų genų ir ligų mechanizmų pasireiškia ir *C.elegans* [36].

Remiantis ortologinėmis duomenų bazėmis, nustatyta, kad *C. elegans* ir jo homologų genai atitinka 60–80 % žmogaus genų, o 40 % žmogaus genų susijusių su tam tikromis ligomis turi ortologus *C.elegans* genome [37]. Sukaaptos duomenų bazės leidžia spręsti koks modelinis organizmas gali būti taikomas norint tirti geno funkciją ar vaisto poveikį, tačiau dėl evoliucijos identiška seka skirtinguose organizmuose neužtikrina analogiškos funkcijos, todėl modeliniam organizmui reikalingi papildomi geno raiškos tyrimai.

C.elegans pasižymi patogios modelinės sistemos savybėmis ir tampa galingu farmacijos pramonės įrankiu. Pirmoji savybė yra lengvas kultūros auginimas, kadangi nematoidai gali būti auginami lėkštelėse su agaru arba skystose terpėse ir maitintis įvairiomis bakterijomis. Laboratorinėmis sąlygomis *C.elegans* auga maitinami *Escherichia coli*. Taip pat jie pasižymi greita reprodukcija: per 3 dienas išsivysto iš kiaušinėlio į suaugusį 1,3 mm ilgio kirminą. *C.elegans* ciklas trunka apie tris savaites: embriogenezė – 12 val., keturios lervos stadijos (L1–L4) apie 3 dienas ir brandos stadija – 15 dienų. Trumpas kartos laikas ir apie 300 palikuonių per vieną apvaisinimą suteikia galimybę hermafroditams *C.elegans* per dieną tapti kelių milijonų populiacija. Trečioji savybė yra mažas dydis. Dauguma eksperimentų gali būti vykdomi mikrolitrų talpos lėkštelėse su daugiau kaip šimtu kirminų viename šulinėlyje 96 šulinėlių lėkštelėje. Taip pat *C.elegans* turi skaidrią išorinę dangą, yra permatomi, todėl naudojant *in vivo* fluorescencinius žymeklius su augimu, embriogeneze ar riebalų metabolizmu susiję procesai gali būti stebimi gyvame organizme.

C.elegans gali būti dviejų lyčių: save apvaisinantis hermafroditas ir vyriškos lyties kirminas. Vyriškos lyties nematoidų išsivystymas yra retas reiškinys (0,1 %) atsirandantis spontinio gemalo neatsiskyrimo metu arba 50 % atvejų atsiranda dėl poravimosi ypatumų. Dėl hermafroditų gebėjimo save apvaisinti, homozigotiniai kirminai susilaukia genetiškai identiškų palikuonių, kai tuo tarpu vyriškos lyties atstovų poravimasis lemia mutavusių linijų formavimąsi ir mutacijų perdavimą palikuoniams.

Kirminų linijų kultūros ilgą laiką gali būti saugomos jas užšaldant, taip pat esant nepalankioms aplinkos sąlygoms *C.elegans* pereina į L2D lervos stadiją (dauerio lerva) ir trijų savaičių ciklas

prailginamas iki 4–8 kartų [38]. Nepaisant paprastos anatominės sandaros, nematoidai *C.elegans* geba aktyviai judėti, ieškoti maisto, maitintis, tuštintis, dėti kiaušinius, formuoti L2D lervos stadiją bei reaguoti į aplinkos sąlygas: prisilietimą, kvapą, skonį ir temperatūrą [39]. Nustatyta, kad jiems būdingas ir socialinis elgesys, mokymasis ir atmintis [40].

1.4.1 *C.elegans* anatominės savybės

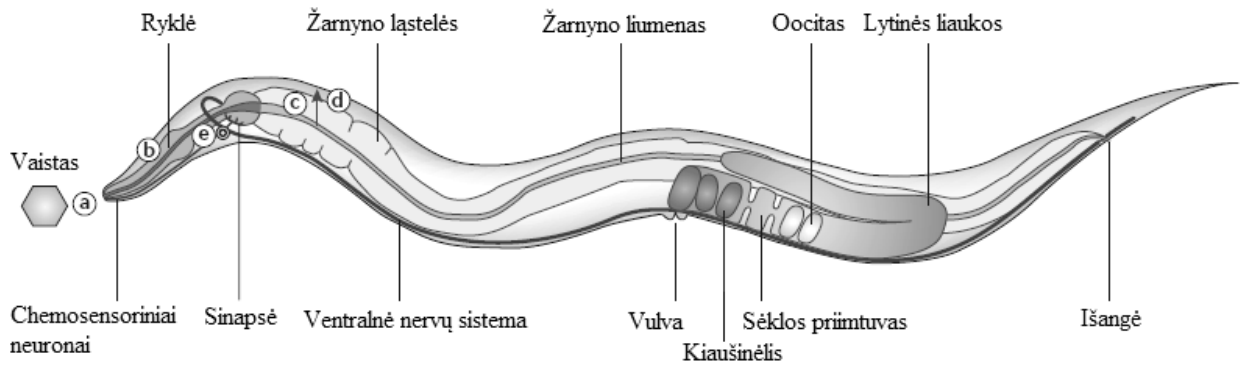
Kaip ir daugelis kitų nematoidų, *C.elegans* yra nesegmentuotos, cilindrinės formos kirminas su galuose esančiais kūginės formos suplonėjimais.

Suaugęs hermafroditas turi skirtingus organus ir audinius suformuojančius 956 somatines ląsteles. Formuojami raumenys, hipodermis (oda), žarnynas, reprodukcinė sistema, liaukos ir nervinė sistema sudaryta iš 302 neuronų [41]. Hermafroditas *C.elegans* turi aštuonis dopaminerginius neuronus: keturis cefalinius ir du priešakinius dendritus galvos dalyje ir du užpakalinius neuronus uodegoje. Vyriškos lyties kirminas uodeginėje dalyje turi šešis papildomus dopaminerginius neuronus [42].

Išorinę kirminų dalį, taip pat ryklės ir išorinės žarnos sienelės sudaro kolageninis epidermis sudarytas iš persidengiančio epidermio sluoksnio su į išorę atsiveriančiomis audinių poromis. Pilvinėje galvos dalyje randama ištekamoji pora, viduryje kūno esančioje pilvinėje dalyje atsiveria vulva, o uodegos pabaigoje – išangė. *C.elegans* nematoidų išoriniame dangale aptinkami ir į skirtingus dirgiklius reaguojantys sensoriniai neuronai. Epidermio išskiriamas hipodermis sudarytas iš specifinių „syncytia“ tipo ląstelių struktūrų, pasikartojančių koncentrinį žiedų ir penkių mažesnių „syncytia“ ląstelių galvinėje nematoido dalyje bei trijų vienbranduolių ir vienos „syncytia“ tipo ląstelės uodegoje. Šoninėse kirminų dalyse hipodermis turi tarp sluoksnių ląstelių intarpų, kurie skirtingose vystymosi stadijose formuoja epidermį.

Nematoidų struktūrai priklauso ir raumenų sistema. Raumenų ląstelės nuo neuronų ir epidermio atskiriamos pamatine membrana, o raumeninį audinį sudaro skaidulos, kurios suformuoja išilgai kūno išsidriekusias keturias kvadrato formos struktūras. Dvi struktūros išsidėstę nugarinėje ir dvi pilvinėje dalyse. Mažesnės raumenų ląstelių sancaupos randamos ryklės, vulvos, žarnyno ir tiesiosios žarnos srityse [43].

Aptariant vaisto ir jo taikinio sąveiką, svarbu apžvelgti svarbiausias morfologines kirmino struktūras (1.2 pav.). Daugeliu atvejų vaistas į organizmą patenka per vidaus organus, kartais – per odą. Norint pasiekti taikinio vietą vaistas turi pasižymėti bioprieinamumu ir prasiskverbti per žarnų membranas, taip pat pereiti ne tik taikinio ląstelinius, bet ir audinį reguliuojančius mechanizmus ir taip sukelti pastebimą farmakologinį efektą. Atsaką *C.elegans* sukels tik tos molekulės, kurios pasižymi *in vivo* aktyvumu [43].



1.2 pav. Supaprastinta suaugusio hermafrodito *C.elegans* kūno schema ir vaisto patekimas [44].

(a) maisto pasirinkimą lemia chemosensorinių neuronų veikla, jeigu vaistas turi nemalonų skonį ar kvapą jis gali būti neįsisavinamas; (b) vaistas išsiurbiamas per ryklę; (c) vaistas turi būti absorbuojamas žarnyno ląstelių; (d) vaistas greitai išnešiojamas po organizmą.

Atsižvelgiant į paprastą anatomicinę sandarą ir savybes nematoidas *C.elegans* tapo svarbia modeline sistema biomediciniuose tyrimuose ir prisidėjo prie geresnio neurodegeneracinių ligų [45], diabeto [46], depresijos [47] molekulinio ligų mechanizmo išaiškinimo bei vaistinių medžiagų toksiškumo tyrimų. Modelio naudojimo privalumas lyginant su *in vitro* ar ląsteliniais modeliais yra tai, kad vaisto – receptoriaus sąveika tiriama ne izoliuotoje sistemoje, o viso organizmo kontekste ne tik gaunant reikiamus skaitinius rezultatus, bet kartu ir stebint pačio gyvūno atsaką ir elgesį.

C.elegans modelio naudojimas remiasi trimis bendraisiais principais. Pirmasis principas yra su tiriamą ligą susijusio geno išjungimas ar įjungimas ir fenotipinių pokyčių stebėjimas bei vertinimas. Antrasis – konkretaus ląstelinio ar molekulinio su liga susijusio mechanizmo tyrimas. Trečiojo metodo metu ekspresuojamas ligą sukeliantis genas ir stebimi fenotipiniai *C.elegans* pokyčiai [48]. Trečiasis metodas plačiai naudojamas neurodegeneracinių Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono, Aminotropinės lateralinės sklerozės ligų tyrimuose [49]. Transgeninės *C.elegans* linijos gali būti kuriamos skirtingais metodais. Gali būti taikomas tradicinis mikroinjekcinis metodas, kuris yra efektyvus ir sąlyginai paprastas transgeninių kirminų kūrimo metodas. Jis yra ypač naudingas norint gauti konkretų fenotipą arba tiesioginiams sintetinių mikroRNR ar kitų molekulių įterpimui į *C.elegans* [50]. Pastaraisiais metais pradėtas naudoti ir biolistinio apšaudymo metodas. Jo metu egzogeninės DNR įvedimas į ląstelę atliekamas apšaudant ląstelę DNR padengtomis aukso mikrodalelėmis. Lyginant su mikroinjekcijomis, šis būdas yra paprastesnis ir nereikalauja specialių įgūdžių [51].

1.4.2 Vystymosi ciklas

Kaip ir daugelio kitų nematoidų, *C.elegans* vystymosi ciklas sudarytas iš embriono, keturių lervos (L1–L4) ir brandos stadijų. Kiekvienos lervos stadijos pabaigoje, nematoidams būdingas nėrimasis, kurio metu numetamas senas epidermis ir sintetinamas naujas. Šiuo momentu sustoja maitinimasis, o gyvūnas pereina į trumpą letargo stadiją.

C.elegans embriogeneze gali būti skirstoma į dvi stadijas: proliferaciją ir organogenezę / morfogenezę. Proliferacija prasideda po apvaisinimo praėjus 330–350 min 22 °C temperatūroje. Jos metu vyksta ląstelių dalijimasis ir iš vienos ląstelės susiformuoja apie 550 nediferencijuotų ląstelių [52]. Ši stadija skirstoma į kitas dvi stadijas. Pirmoji fazė (0–150 min) apima zigotos formavimąsi ir pirminių embriono ląstelių formavimąsi, antroji (150–350 min) – ląstelių dalijimąsi ir gastruliaciją, kol pasiekama organogenezės stadija [53]. Proliferacijos pabaigoje embrionas yra sferoido formos ir turi trijų sluoksnių dangą: ektoderma iš kurios vėliau formuojasi hipodermis ir neuronai, mezoderma – ryklės formavimosi pagrindas ir endoderma iš kurios toliau formuojasi gemalas ir žarnynas. Organogenezės ir morfogenezės stadijoje (5,5–6 val. iki 12–14 val.) vyksta pilnas gyvūno formavimasis. Nematoidas turi diferencijuotus audinius ir organus. Šios stadijos metu apsprendžiama gyvūno lytis. Po 150 min, hermafrodituose išnyksta galviniai lydintys neuronai, o vyriškos lyties nematoiduose išnyksta hermafroditams specifiški neuronai.

Po embrioninis vystymasis priklauso nuo išsiritusių jauniklių maitinimosi. Esant pakankamam maisto kiekiui, ląstelių dalijimasis ir vystymasis tęsiamas praėjus 3 valandoms po išsiritimo iš kiaušinėlio. Šiomis sąlygomis gyvūnas pereina visas keturias lervos stadijas (L1–L4) ir pasiekia brandos stadiją. L1–L4 lervos stadijų metu vyksta galutinis nervų ir reprodukcinės sistemos vystymasis. Esant nepalankioms aplinkos sąlygoms, pavyzdžiui, feromonų, maisto trūkumui arba netinkamai temperatūrai L2 stadijos lervų vystymasis sustoja ir pereina į L2D fazę. Priklausomai nuo aplinkos sąlygų ji gali toliau vystytis į L3 arba suformuoti dauerio lervą [54]. Dauerio stadijoje gyvūnas nesensta, sulėtėja medžiagų apykaita. Pagerėjus sąlygoms po 1 valandos, nematoidas išeina iš šios stadijos, po 3–4 valandų pradeda maitintis, o po 10 valandų pasiekia L4 stadiją. Nematoidų *C.elegans* vystymasis priklausomai nuo temperatūros nurodytas 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. *C.elegans* vystymasis skirtingose temperatūrose [55], [56].

	Vystymasis skirtingose temperatūrose		
	16 °C (16,0±0,3 °C)	20 °C (19,5±0,5 °C)	25 °C (25,0±0,2 °C)
Kiaušinėlių padėjimas	0 val.	0 val.	0 val.
Kiaušinėlių išsiritimas	16–18 val.	10–12 val.	8–9 val.
Pirmasis nėrimasis, letargas	36,5 val.	26 val.	18 val.
Antrasis nėrimasis, letargas	48 val.	34,5 val.	25,5 val.
Trečiasis nėrimasis, letargas	60 val.	43,5 val.	31 val.
Ketvirtasis nėrimasis, letargas	75 val.	56 val.	39 val.
Kiaušinėlių dėjimo pradžia	90 val.	65 val.	47 val.
Kiaušinėlių dėjimo maksimumas	140 val.	96 val.	62 val.
Kiaušinėlių dėjimo pabaiga	180 val.	128 val.	88 val.
Ilgis po pirmo nėrimosi	360 μm	370 μm	380 μm
Ilgis po antro nėrimosi	490 μm	480 μm	510 μm
Ilgis po trečio nėrimosi	650 μm	640 μm	620 μm
Ilgis po ketvirto nėrimosi	900 μm	850 μm	940 μm
Ilgis brandos metu	1150 μm	1060 μm	1110 μm
Maksimalus kiaušinėlių dėjimo dažnis	5,4/val.	9,1/val.	8,1/val.
Padėtų kiaušinėlių skaičius	275	280	170

1.4.3 *C.elegans* senėjimo tyrimai

Senėjimas yra kompleksinis procesas, kuris apima organų sistemų degeneracinius procesus. Skirtingų organų sistemų irimas gali prasidėti skirtingu laiku ir skirtingu tempu, todėl kiekvieno organizmo senėjimas yra individualus. Dėl tokio kintamumo tyrimams reikalinga didelė tiriamųjų populiacija, o skirtumai turi būti validuojami remiantis statistine analize.

Analizuojant vaistų ar vaistinių medžiagų veikimą pagal *C.elegans* modelį senėjimas yra vienas iš taikomų tyrimų. Tokie tyrimai remiasi gyvenimo trukmės nustatymu ir prasideda ketvirtoje lervos stadijoje. Privalumas yra nesudėtinga eksperimento metodika – skaičiuojami gyvi ir žuvę individai. Tiriamosios medžiagos poveikis gali pasireikšti vystymosi ir brandos, funkcinio silpnėjimo arba abiejuose perioduose, o tyrimo metu galima išmatuoti konkrečių fiziologinių funkcijų silpnėjimą, pavyzdžiui, reprodukciją ar kūno judesius [57]. Norint išvengti klaidingų rezultatų, *C.elegans*

kultūros išvalymui ir nematoidų amžiaus suvienodinimui vykdoma sinchronizacija. Sinchronizacija gali būti vykdoma naudojant balinimą hipochlorito tirpalu, tuomet iš kultūros pašalinamos bakterijos, grybai, mielės bei visi kiaušinėlio apvalkalu nepadengti nematoidai [58].

Viena iš *C. elegans* gyvenimo trukmės teorijų yra laisvųjų radikalų teorija, kuri teigia kad ROS gali pažeisti makromolekules, todėl sukelia degeneracinius senėjimo procesus [59]. Remiantis ja, manoma, kad junginiai mažinantys ROS kiekį prailgina gyvenimo trukmę. Vitaminas E, dar žinomas kaip α -tokoferolis yra antioksidantas, todėl galimai mažina ROS sukeltą žalą *in vivo* ir prailgina gyvūnų gyvenimo trukmę [60]. 1988 metais Haringtonas ir Harlis nustatė, kad laukinio tipo *C.elegans* veikiant 200 $\mu\text{g/ml}$ Vitamino E tirpalu, kirminų amžius pailgėjo 17–23 % [61], 2002 metais, nustatyta, kad veikiant eukarionu-8 ir eukarionu-134 trukmė pailgėja 54 % [62], kofermentu Q₁₀ – 18 % [63], tačiau iki galo nėra iširta ar toks poveikis yra dėl ROS pažaidų mažinimo ar dėl su oksidaciniu stresu nesusijusių mechanizmų.

ROS mažėjimo sukeltas *C. elegans* gyvenimo trukmės pailgėjimas tirtas ir su junginių mišinius sudarančiais augalų ekstraktais. Nuo seno žinoma, kad mėlynių preparatai pasižymi antioksidacinėmis ir priešuždegiminėmis savybėmis. Vilsonas su kolegomis ištyrė jų ekstrakto poveikį naudojant *C.elegans* modelį. Nustatyta, kad mėlynių ekstraktas veikdamas su amžiumi susijusias organizmo struktūras gyvenimo trukmę pailgina 28 % [64]. Norint nustatyti veikimo mechanizmą genetiniame lygmenyje mėlynių ekstraktas buvo tiriamas su skirtingas mutacijas turinčiais *C.elegans* kirminais.

Kitas gerai žinomas augalas ginkmedis yra ilgaamžis, nuo seno naudojamas tradicinėje ir modernioje medicinoje. Standartizuotas ginkmedžio lapų ekstraktas sudarytas iš ginko-flavonų glikozidų (24 %) ir terpenoidų (6 %). Kai kuriose šalyse, ginkmedžio augalas vertinamas dėl savybės mažinti su amžiumi susijusių psichologinių funkcijų silpnėjimą, todėl juo buvo susidomėta ir ekstraktas iširtas naudojant *C.elegans* modelį. Nustatyta, kad 100 $\mu\text{g/ml}$ ginkmedžio lapų ekstraktas neveikia galutinės kirminų gyvenimo trukmės, tačiau 10 % prailgina vidutinę trukmę. Vienas ekstrakto komponentas, flavanoidas tarariksetinas, amžių prailgina 28 % [65]. Tiriant iš keleto junginių sudarytus ekstraktus svarbu nustatyti ar poveikį daro konkretus komponentas ar keleto junginių mišinys. Svarbu identifikuoti veikliąją medžiagą, kadangi tik tada galima suprasti konkretų veikimo mechanizmą.

Senėjimo tyrimai *in vivo* pritaikant *C.elegans* modelį buvo panaudoti ir žalios kavos ekstrakto tyrimuose ir nustatyta, kad ekstraktas sumažina oksidacinį stresą ir taip prailgina *C.elegans* gyvenimo trukmę. Rezultatai pagrindžiami ekstraktą sudarančių polifenolinių junginių antioksidacinėmis savybėmis [35]. Taip pat nustatyta, kad didesniu veiksmingumu pasižymi junginių mišinys (ekstraktas), o ne pavieniai ekstraktą sudarantys junginiai, todėl palaikoma idėja, kad naudingesnėmis savybėmis pasižymėtų farmacinį preparatą sudarantis junginių mišinys.

1.4.4 *C.elegans* modelyje naudojami aplinkos sukeliama stresą identifikuojantys molekuliniai žymekliai

Nematoidai *C.elegans* yra trumpaamžiai ir turi žmogaus genams homologiškų sekų, todėl modelis imtas naudoti įvairių cheminių medžiagų poveikio tyrimams *in vivo*. Nematoidų naudojimas genetiniams tyrimams pagrįstas ir optiškai permatoma kūno danga bei nesudėtingu genų reporterių perkėlimu, kurie įterpti į *C.elegans* genomą gali būti itin lengvai aptinkami. Šios savybės leidžia vizualizuoti genų raišką ir analizuoti ląstelės genetines savybes *in vivo*. Manipulavimas *C.elegans* genomu laikomas nesudėtingu, nes genų išjungimas gali būti atliktas naudojant informacinę RNR arba tiesioginę mutagenezę.

Nematoidas yra pirmasis daugialąstelinis organizmas, su pilnai nuskaitytu genomu ir pasižymi konservatyvumu su aukštesniaisiais eukariotais ir žinduoliais. Net 80 % kirminų genų yra žmogaus genų homologai, todėl tokie procesai kaip apoptozė, atsakas į stresą ir daugelis biocheminių kelių gali būti tiriami naudojant *C.elegans* modelį [66]. Ankstesnių tyrimų metu nustatyta, kad nematoidus *C.elegans* veikiant aktyviais cheminiais junginiais, antioksidacinės medžiagų savybės gali būti nustatomos analizuojant glutationo-S-transferazės (GST), superoksido dismutazės (SOD) [67] bei stebint suaktyvėjusią šiluminio šoko baltymų (HSP) genų raišką [68]. Oksidacinio streso tyrimai gali būti atliekami naudojant transgenus, kurių produktas yra žaliai fluorescuojantys baltymai, o rezultatai stebimi naudojant elektroninį mikroskopą.

1.5 Baigiamojo projekto temos ir uždavinių pagrindimas

Raudonasis dobilas yra plačiai paplitęs augalas, kuris nuo seno naudojamas įvairių ligų gydyme, tačiau išorinis ekstrakto panaudojimas nėra iki galo ištirtas.

Kaip ir aptariama magistro baigiamojo projekto literatūros apžvalgoje, mokslinėje literatūroje galima rasti tyrimų, kuriuose nustatytas izoflavonų antioksidacinis poveikis, taip pat teigiama ekstrakto įtaka žaizdų gijime ar odos sudirgimo mažinime, tačiau raudonųjų dobilų ekstrakto skvarba į gilesnius odos sluoksnius yra menkai ištirta. Svarbu rasti efektyvią transderminio pernešimo sistemą kartu ištiriant ir raudonųjų dobilų ekstrakto ir formuluotės toksiškumą.

Kadangi didėjant oro užterštumui susiduriame su vis didesniu ultravioletinės spinduliuotės kiekiu, svarbu, jog oda būtų tinkamai apsaugota nuo kenksmingų ROS susidarymo, todėl baigiamajame magistro projekte taip pat tiriamos antioksidacinės raudonųjų dobilų ekstrakto ir jo nanonešiklio (niosomų) formuluotės savybės.

2. TYRIMO METODIKA

2.1 Tyrimo objektas

Tyrimuose naudojamas standartizuotas raudonųjų dobilų ekstraktas IFL40 ir jo formuluotė NioSkin™ RCL40, gauta iš Šveicarijoje įsikūrusios įmonės Linnea SA.

NioSkin™ formuluotę sudaro nanonešiklis su įterptu dobilų ekstraktu (2.1 lentelė). Pagal gamintojo informaciją ekstraktas formuluotėje sudaro 3–5 %. Eksperimentų metu laikoma, kad veikliųjų medžiagų kiekis sudaro 3 % formuluotės.

2.1 lentelė. Raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklio formuluotės sudėtis.

Raudonųjų dobilų ekstraktas	
Komponentai	Kiekis, %
Biochaninas A	22,6
Formononetinas	19,3
Genisteinas	0,8
Daidzeinas	0,4
<i>Iš viso izoflavonų: ne mažiau 40 %</i>	
Nanonešiklio formuluotė	
Vanduo	
Alyvuogių aliejaus poligliceril-6 esteris	
Glicerinas	
<i>Trifolium pratense</i> ekstraktas	
Magnololas	
Honokiolas	

2.2 Naudotos medžiagos ir įranga

2.2.1 Medžiagos

- Raudonojo dobilo ekstraktas IFL40, Linnea SA, Šveicarija
- Raudonojo dobilo formuluotė NioSkin™ RCL40 Linnea SA, Šveicarija
- Etanolis (96,6 %) Sigma-Aldrich, JAV
- Metanolis (96,6 %) Sigma-Aldrich, JAV
- 3T3 Balb/c pelės fibroblastų ląstelių linija, DSMZ, Vokietija
- HaCaT pelės keratinocitų ląstelių linija, DSMZ, Vokietija
- Dulbeko modifikuota Eagle terpė (DMEM) (1X)+GlutaMax™, Life Technologies, JAV
- Sudėtinis antibiotikų tirpalas (penicilino-streptomicino tirpalas), Sigma-Aldrich, JAV
- Tripsinas (1X), Life Technologies, JAV

- Hanko subalansuotas druskos tirpalas (HBSS), Life Technologies, JAV
- Fetalinis jaučio serumas (FBS), Life Technologies, JAV
- Triptano mėlio dažų tirpalas (0,4 %) Sigma-Aldrich, JAV
- 2',7'-dichlorofluorescino diacetatas (DCFDA, $\geq 97\%$), Sigma-Aldrich, JAV
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas (MTT), Sigma-Aldrich, JAV
- Nematoidai *C.elegans*: N2 (laukinio tipo), CL2166 (*gst-4::GFP*), CL2070 (*hsp-16.2::GFP*), ST4005 (*hsp-4::GFP*), CF1553 (*sod-3::GFP*), *Caenorhabditis* Genetics Center, JAV
- *Escherichia coli* (OP50), *Caenorhabditis* Genetics Center, JAV
- KH_2PO_4 (99,8 %), Sigma-Aldrich, JAV
- Na_2HPO_4 (99 %), Sigma-Aldrich, JAV
- NaCl (99 %), Sigma-Aldrich, JAV
- MgSO_4 (99 %), Sigma-Aldrich, JAV
- Agaras, Sigma-Aldrich, JAV
- Peptonas, Fluka Analytical, Vokietija
- CaCl_2 (99 %), Sigma-Aldrich, JAV
- NaOH, Sigma-Aldrich, JAV
- Baliklis „Eau javel concentrée“ (9,5 % natrio hipochloritas) Sea France Generic Brands, Prancūzija
- Dimetilsulfoksidas (DMSO) ($\geq 99,9\%$, (GC)), Sigma-Aldrich, JAV
- 5-fluoro-2'-deoksiuridinas (FUdR) (12,5 mg/l) Sigma-Aldrich, JAV

2.2.2 Įranga

- Kapiliarinis skysčių chromatografas ACQUITY UPLC H-Class, Waters, JAV
- Kolonėle Acquity UPLC BEH C18 (130 Å, 1,7 μm , 2,1 mm X 100 mm), Waters, JAV
- UVP MRL-58 Multiple-ray lempa, UVP, Jungtinė Karalystė
- Radiometras UVX, UVP, Jungtinė Karalystė
- Peristaltinė pompa Masterflex W L/SW, Cole-Parmer Instrument Co., JAV
- Mikroskopas Olympus CKX41, Vokietija
- Centrifuga 5810R Eppendorf, Vokietija
- Ultragarso vonelė USC-THD, VWR, Jungtinė Karalystė
- Analitinės svarstyklės ABT 100-5M, Kern & Sohn GmbH, Vokietija
- Laminaras Herasafe KS, Thermo Scientific, JAV
- Hemocitometras Neubauer, Vokietija
- Spektrofotometras Lambda 25, PerkinElmer, JAV

- Fluorimetras Fluoroscant Ascent, Thermo Fisher Scientific, JAV
- Centrifuga Mega Star 600/600R, VWR, Jungtinė Karalystė
- 15 °C, 20 °C, 25 °C inkubatoriai Sanyo MIR153, Japonija
- Šviesinis mikroskopas Leica MZ6, Vokietija
- Lemputė Gasprofi 2 SCS, WLD Tech, Vokietija
- Fluorescencinis mikroskopas Leica M205 FCA, Vokietija
- Inkubatorius Memmert Ivf Co2, Vokietija
- Vandens vonelė Polytest 20, Bioblock Scientific, Prancūzija

2.3 Raudonųjų dobilų veikliųjų junginių skvarbos tyrimas *ex vivo*

2.3.1 Skvarbos per žmogaus odą tyrimai *ex vivo*

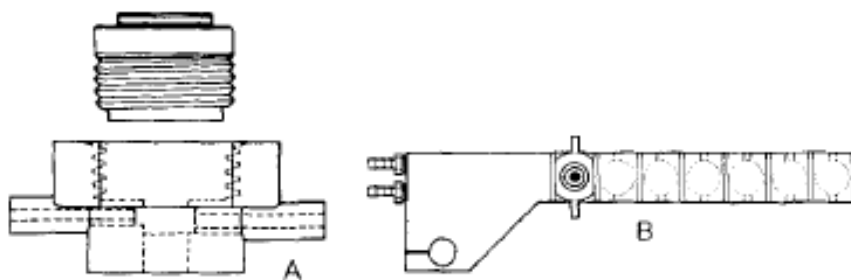
Bendras skvarbo per odą tyrimas *in vitro* aptiriamas OECD gairėse [69]. Standartinės difuzinės celės sudarytos iš donorinių ir akceptorinių dalių atskirtų odos mėginiu ar atitinkama membrana [70]. Skvarba įvertinama nustačius junginio patekimą per membraną per tam tikrą laiką iš donorinės terpės į akceptorinę. Difuzinės celės turi būti: inertiškos, leisti naudoti skirtingų storių membranas ar odos mėginius, užtikrinti pastovią temperatūrą, membranos vientisumą, kontaktą tarp membranos ir akceptorinės terpės bei leisti patogiai imti mėginius.

1985 metais Bronaugh su kolegomis teigė, kad difuzinės celės (2.1 pav.) gali veikti esant nuolatiniam receptorinės terpės atsinaujinimui ir jas pavadino pratakėmis difuzinėmis celėmis [70]. Tokios celės turi privalumų, kadangi leidžia iš receptorinės terpės imti pavyzdžius realiu laiku, taip pat sunkiai tirpstantis tiriamasis junginys nenusėda receptorinėje terpeje, todėl sudaromos palankesnės sąlygos tikslesniems eksperimentų duomenims.

Eksperimentas *ex vivo* atliekamas naudojant modifikuotas pratakias Bronaugh tipo difuzines celes. Eksperimentai su žmogaus oda patvirtinti Kauno regiono bioetikos komiteto. Oda gauta po abdominoplastinės operacijos iš 25–40 metų amžiaus moterų prieš tai gavus jų sutikimą. Nuo odos pašalinami papildomi riebalai, ji užšaldoma ir sandėliuojama ne ilgiau nei 6 mėnesius –20 °C temperatūroje.

Akceptorinė terpė cirkuliuojama peristaltine pompa (MasterflexW L/SW, Cole-Parmer Instrument Co., JAV). Žmogaus oda lėtai atšildoma, sukarpoma į mažas dalis ir įtvirtinama į difuzines celes (difuzijos plotas 0,64 cm²). Palaikoma pastovi sistemos temperatūra 37±1 °C. Oda 1 val. kalibruojama po ja cirkuliuojant akceptorinei terpei (0,9 % NaCl + 0,005 % NaN₃). Kontroliniu mėginiu laikomas glicerolyje ištirpintas raudonųjų dobilų ekstraktas (3 % ekstrakto glicerolyje 24 val. maišoma magnetinėje maišyklėje). Tyrime donorinėms terpėms naudojamas kontrolinis mėginys ir nanonešiklio formulotė (Linnea SA, Šveicarija). Kiekvienai sąlygai tiriami septyni odos mėginiai.

Ant odos dedamas ne mažesnis nei 0,2 g tiriamosios medžiagos kiekis. Akceptorinės terpės tėkmės greitis 0,6 ml/min. Po 24 val. nuo odos paviršiaus atsargiai pašalinamas likęs donorinis tirpalas ir 2 kartus praplaunamas 0,5 ml etanolu (96,3 %) ir 3 kartus 0,5 ml distiliuotu vandeniu. Ant įkaitusios plytelės pakaitinus tirtus odos mėginius skalpeliu atsargiai atskiriamas epidermis ir derma. 30 min ultragarso vonelėje vykdoma ekstrakcija (USC-THD, VWR, Jungtinė Karalystė), o tirpalai po ekstrakcijos bei donorinės ir akceptorinės terpės analizuojamos efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.



2.1 pav. Pratakios difuzinės celės blokas [71].

(A) Oda įtvirtinama ant atbrailos ir pritvirtinama užsukant suktuką. (B) Aliuminis laikymo blokas. Fiziologinės temperatūros palaikymui iš vandens vonelės pumpuojamas šiltas vanduo.

Raudonųjų dobilų veikliųjų junginių skvarba į odą vertinama atsižvelgiant į odos mėginių masę ir pagal gautus rezultatus apskaičiuavus srautą bei junginių kiekį prasiskverbusį į epidermį ir dermą. Junginio srautas apskaičiuojamas: 1 μg junginio 1 g dermos / epidermio. Remiantis gautais duomenimis apskaičiuojama kiek kartų nanonešiklis pagerina raudonųjų dobilų ekstrakto skvarbą per odą. Reikšmės gaunamos nustatant santykį tarp prasiskverbusių junginių kiekio pro epidermį ar dermą iš niosomų formulotės lyginant su kontroline grupe ir iš gautų rezultatų išvedamas vidurkis. Rezultatų patikimumas vertinamas naudojant Microsoft Excel ANOVA Single-factor metodu (Microsoft Excel 2013).

Žmogaus oda po eksperimento užšaldoma skystame lede, įvyniojama į aliuminio foliją ir iki utilizavimo sandėliuojama $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.2 Efektyviosios skysčių chromatografijos metodika

Raudonųjų dobilų ekstrakto analizei efektyviosios skysčių chromatografijos metodu pasirinkti du pagrindiniai veiklieji junginiai – metilintos izoflavonų formos biochaninas A ir formononetinas, kurie remiantis aptarta literatūra pasižymi estrogeniniu, antioksidaciniu, odos sudirgimą mažinančiu poveikiu.

Analizė atlikta 254 nm detekcijos bangos ilgyje naudojant chromatografą ACQUITY UPLC H-Class (Waters, USA) su kolonėle Acquity UPLC BEH C18 (130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 100 mm) (Waters, JAV). Tirpiklį A sudaro acetonitrilas, o tirpiklį B – 0,1 % (v/v) trifluoroacetinė rūgštis vandeniniame tirpale. Mobilioji fazė 5 min. linijiškai keliama nuo 70 % iki 10 % tirpiklio A, nuo 30 % iki 90 % tirpiklyje B. Injekcijos kiekis 1 µl. Kolonėlėje palaikomas 0,5 ml/min tėkmės greitis ir 30 °C temperatūra. Gautas išplautų medžiagų sulaikymo laikas lyginamas su etalonų sulaikymo laiku. Metodo validavimas aprašytas ankstesniuose kolegų darbuose [72].

2.4 Raudonųjų dobilų ekstrakto tyrimai pritaikant ląstelių modelį

2.4.1 Ląstelių sėjimas ir tankio nustatymas

Eksperimentui naudojami imortalizuoti žmogaus keratinocitai HaCaT ir Balb/c 3T3 ląstelių kultūra – imortalizuoti pelės fibroblastai.

Ląstelių kultivavimas atliekamas steriliomis sąlygomis laminare (Thermo Scientific, JAV). 10 % ląstelių auginimo terpės sudaro FBS – fetalinis jaučio serumas (Life Technologies, JAV), 1 % sudėtinis (penicilino-streptomicino) antibiotikų tirpalas (10000 IU/ml–10000 µg/ml) (Sigma-Aldrich, JAV) ir DMEM terpė (Dulbeko modifikuota Eagle terpė) su gliutamatu (Life Technologies, JAV). Keičiant terpę ląstelės praplaunamos 1–3 ml HBSS tirpalu (Hanko subalansuotas druskos tirpalas) (Life Technologies, JAV).

Ląstelės yra adhezuojančios, todėl norint atkelti nuo flakono dugno paveikiamos 1,5–3,5 ml tripsino fermentu (1X) (Life Technologies, JAV), kuris tarp ląstelių suardo tarpląstelines jungtis. Naudojamas tripsino kiekis priklauso nuo flakono, kuriame auginamos ląstelės dydžio. Tripsinavimo sąlygos pasiekiamos ląsteles laikant inkubatoriuje (Mettler Ivf Co2, Vokietija) 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂ kiekiui, tripsinavimo laikas HaCaT ir 3T3 ląstelių kultūroms atitinkamai yra 13 ir 5 min. Tripsinas deaktyvuojamas ant atkibusių ląstelių ir tripsino tirpalo užpilant dvigubą kiekį terpės. Mišinys centrifuguojamas centrifugoje 5810R (Eppendorf, Vokietija) 5 min esant 1000 aps/min greičiui.

Po veikimo tripsinu ir centrifugavimo supernatantas nupilamas, ląstelės užpilamos 1 ml terpės, suspenduojamos ir skaičiuojamas ląstelių tankis. Skaičiavimas atliekamas naudojant hemocitomerą Neubauer (Vokietija) sumaišius 20 µl ląstelių suspensijos ir 20 µl triptano mėlio dažų tirpalo (0,4 %) (Sigma-Aldrich, JAV). Ląstelės nenusidažiusios mėlynai yra laikomos gyvybingomis. Mėlyna ląstelių spalva reiškia, kad ląstelių membrana buvo pažeista, todėl ląstelės žuvo. Skaičiuojami keturiuose atsitiktiniuose langeliuose esančios gyvybingos ląstelės.

Ląstelių kiekis 1 ml apskaičiuojamas:

$$n = (a + b + c + d) \cdot 4 \cdot 2 \cdot 5000$$

n – ląstelių skaičius 1 ml;

a, b, c, d – ląstelių skaičius keturiuose langeliuose;

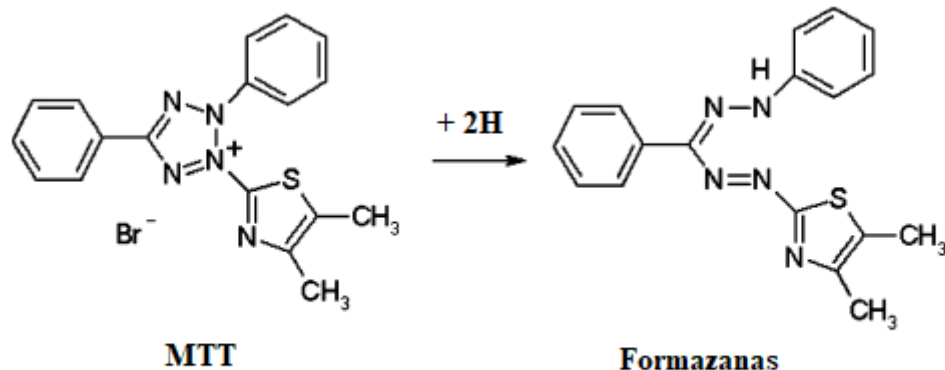
4 – padauginus gaunamas ląstelių kiekis visuose hematocitometro kameros langeliuose;

2 – skiedimų skaičius;

5000 – konstanta

2.4.2 Ląstelių gyvybingumo tyrimai *in vitro*

Ląstelių gyvybingumo tyrimas atliekamas naudojant 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromido (MTT) testą, kuris paremtas medžiagų citotoksiškumo nustatymu kolorimetriniu metodu. Tyrimo metu nustatomas gyvose ląstelėse esantis mitochondrijų dehidrogenazės aktyvumas: nuo NAD(P)H priklausomos oksoreduktazės veikia geltonos spalvos MTT dažą, kuris virsta netirpiais purpurinės spalvos formazano kristalais ((E, Z)-5-(dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazanas) (2.2 pav.). Prieš matuojant tirpalų absorbciją formazano kristalai ištirpinami organiniame dimetilsulfoksido (DMSO) tirpiklyje (Sigma-Aldrich, JAV).



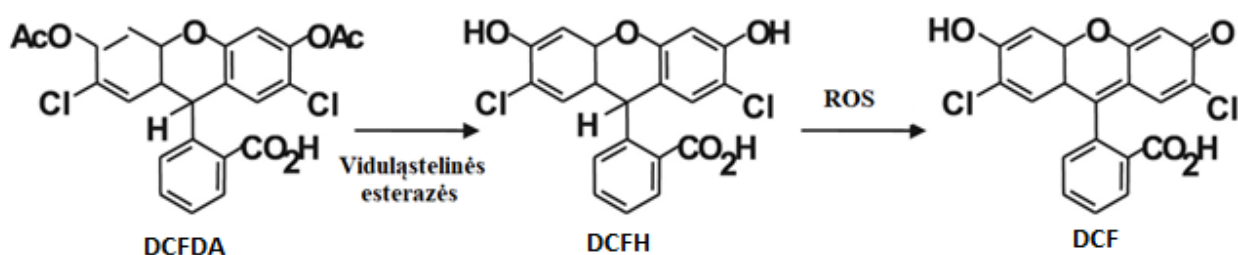
2.2 pav. MTT redukcijos reakcija.

Eksperimentui naudojamos 96 šulinėlių lėkštelės, kurių kiekviename šulinėlyje užsėjama 20 tūkst. HaCaT / 3T3 ląstelių. Ląstelės 24 val. auginamos inkubatoriuje 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂ atmosferos sąlygomis. Po 24 val. ląstelės veikiamos tiriamaisiais 50–0,5 μg/ml raudonųjų dobilų ekstrakto ir niosomų formulotės tirpalais. Ląstelės laikomos tomis pačiomis sąlygomis dar 24 val. Tyrimo metu nuo ląstelių nupilama terpė, o šulinėliai perplaunami juos pripildant 100 μl HBSS tirpalo. Procedūra kartojama du kartus. Tirpalas pašalinamas nuo ląstelių ir kiekvienas šulinėlis pripildomas 180 μl HBSS tirpalu ir 20 μl 5 mg/ml MTT dažų (Sigma-Aldrich, JAV) ištirpintu HBSS

tirpale. Tyrimas atliekamas saugant MTT dažą nuo šviesos. Po 2 val. inkubacijos tamsoje 37 °C temperatūroje, HBSS ir MTT tirpalas pašalinamas jį nupilant, o susidarę formazano kristalai ištirpinami 100 µl DMSO tirpale. Praėjus 15 min inkubacijos tamsoje, rezultatai gaunami matavimus atliekant spektrofotometru Lambda 25 (Perkin Elmer, JAV). Absorbcija matuojama esant 550 ir 620 nm bangos ilgiui. Eksperimentas kartojamas tris kartus. Ląstelių gyvybingumas apskaičiuojamas naudojant Microsoft Excel programą (Microsoft Excel 2013). Rezultatų patikimumas nustatomas ANOVA Single-factor metodu.

2.4.3 UV apsauginio poveikio tyrimai *in vitro*

ROS nustatymui naudojamas 2',7'-dichlorofluorescino diacetatas (DCFDA) (Sigma-Aldrich, JAV). DCFDA yra nefluorescuojantis, lipofilinis, nejoninis junginys, kuris difuzijos būdu prasiskverbia per ląstelės membraną į citoplazmą. Nustatyta, kad naudojant šį dažą galima aptikti ne tik H₂O₂, bet ir peroksilo ir hidrokslo radikalus [73]. Metodas pagrįstas į ląsteles patekusio DCFDA deacetiliniu veikiant viduląstelinėmis esterazėmis. Deacetilinus junginį, jis tampa nefluorescuojančiu 2',7'-dichlorofluorescinu (DCFH), tačiau ląstelės viduje yra veikiamas ROS ir oksidacijos reakcijos metu virsta į fluorescuojantį 2,7-dichlorofluoresceiną (DCF) (2.3 pav.). Padidėjus viduląstelinėms ROS koncentracijai fluorescencijos intensyvumas padidėja, o sumažėjus stebimas intensyvumo sumažėjimas.



2.3 pav. ROS nustatymas naudojant DCFDA dažą.

Tyrimas atliekamas HaCaT / 3T3 ląsteles užsėjant 96 šulinėlių lėkštelėse po 20 tūkst. kiekviename šulinėlyje. Ląstelės 24 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂ aplinkoje.

Paruošiamas 2,5 mg/ml koncentracijos dažas DMSO tirpiklyje. Dažo apsaugai nuo skilimo, tyrimai vykdomi tamsoje. 20 µl 2,5 mg/ml DCFDA dedama į 10 ml HBSS tirpalą šviesai nepralaidžiamame mėgintuvėlyje ir laikoma 10 min. Ląstelės praplaunamos 100 µl HBSS tirpalu, užpilamos 200 µl paruoštu DCFDA / HBSS tirpalu ir ląstelėms įprastomis sąlygomis inkubuojamos 45 min. Po inkubacijos dažo tirpalas pašalinamas, o ląstelės užpilamos 200 µl necitotoksinų

raudonųjų dobilų ir nanonešiklių formuluotės koncentracijų tirpalais (1–10 µg/ml). Ląstelės inkubuojamos 60 min.

Išmatuojama susidariusio 2',7'-dichlorofluorescino fluorescencija prieš veikimą spinduliuote. Naudojamas fluorimetras Fluorocan Ascent (Thermo Fisher Scientific, JAV) tyrimui pasirinkus 485 nm sužadavimo ir 538 nm emisijos filtrus. Po inkubacinio laikotarpio naudojant lempą UVP MRL-58 (UVP, Jungtinė Karalystė) ląstelės veikiamos 2,5 J/cm² UVA ir matuojama fluorescencija po švitinimo praėjus 0, 5, 15, 30 ir 60 min. Analogiškas tyrimas atliekamas veikiant 50 mJ/cm² UVB spinduliuote. Eksperimentas kartojamas tris kartus. Ląstelių gyvybingumas apskaičiuojamas naudojant Microsoft Excel programą (Microsoft Excel 2013). Rezultatų patikimumas nustatomas ANOVA Single-factor metodu.

2.5 Raudonojo dobilų ekstrakto ir formuluotės toksiškumo tyrimai naudojant *C.elegans* modelį

2.5.1 Nematoidų auginimas

Nematodai *C.elegans* auginami Petri lėkštelėse (Sarstedt, Vokietija) nematoidų auginimo (NGM, angl. *Nematoid Growth Medium*) terpėje, kuri ruošama remiantis IBMM (angl. *Institute of Biomolecules Max Mousseron*) instituto (Monpeljė, Prancūzija) protokolu. 1 litro tirpalui paruošti naudojama: 3 g NaCl, 20 g agarų, 2,5 g peptono ir 975 ml vandens. Tirpalas autoklavuojamas. Po autoklavavimo tirpalui atvėsus iki 55 °C temperatūros papildoma 1 ml 1 M CaCl₂, 1 ml 5 mg/ml etanoliniu cholesterolio tirpalu, 1 ml 1 M MgSO₄ ir 25 ml 1 M KH₂PO₄ (pH = 6). Paruošta terpė paskirstoma į Petri lėkšteles ir kambario temperatūroje paliekama stingti. Sustingus terpei lėkštelės papildomos *E.coli* bakterijų kultūra ir saugomos 37 °C temperatūros inkubatoriuje (Memmert, Vokietija).

2.5.2 *C.elegans* kultūros sinchronizavimas

Tyrimui naudojami vienodo amžiaus laukinio tipo (N2) nematoidai (Institute of Biomolecules Max Mousseron, Prancūzija), todėl atliekamas *C.elegans* sinchronizavimas. Sinchronizavimas vykdomas steriliomis sąlygomis, naudojant M9 tirpalą. M9 tirpalas ruošiamas remiantis IBMM (angl. *Institute of Biomolecules Max Mousseron*) instituto (Monpeljė, Prancūzija) protokolu. 1 litro tirpalui paruošti naudojama: 3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 ml MgSO₄ ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 1 l. Paruoštas tirpalas sterilizuojamas autoklavuojant.

Petri lėkštelė su joje augančiais įvairaus amžiaus nematoidais du kartus užpildoma 5 ml M9 tirpalu, o turinys perkeliamas į 15 ml centrifuginį mėgintuvėlį. Antro plovimo metu nematodai ir jų kiaušinėliai atkeliami naudojant stiklinę lazdelę. Turinys 3 min centrifuguojamas centrifugoje (VWR, Jungtinė Karalystė) esant 1600 rpm apsisukimų greičiui. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos iki 7 ml žymos užpilamos M9 tirpalu. Procedūra pakartojama dar du kartus – centrifuguojant 2 min ir taip pašalinant *E.coli* bakterijas. Po trečiojo centrifugavimo kartu su nuosėdomis paliekama 3,5 ml supernatanto. Likęs tirpalas (nuosėdose esantys nematodai ir jų kiaušinėliai) užpilamas 0,5 ml 5 M NaOH tirpalu ir 1 ml baliklio (9,5 % natrio hipochlorito tirpalas). Maksimalus sinchronizavimo balikliu laikas yra 5 min. Balinimas vykdomas 3 min švelniai vartant mėgintuvėlį ir 2 min centrifuguojant esant 1600 rpm. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos plaunamos mėgintuvėlį pripildant iki 7 ml M9 tirpalo ir centrifuguojant 2 min 1600 rpm. Centrifugavimas kartojamas du kartus. Paskutinio plovimo metu paliekama 0,2 ml supernatanto. Turinys homogenizuojamas ir po 100 µl perkeliama į naujai paruoštas Petri lėkšteles su mitybine NGM terpe ir *E.coli* bakterijomis.

Sinchronizavimo metu išgyvena tik *C.elegans* kiaušinėliai, taip pat balinimas išvalo nematoidų kultūrą nuo pašalinių medžiagų. Išdžiūvus į Petri lėkštelę įkeltai nematoidų kultūrai, lėkštelės perkeliama į inkubatorių (Sanyo, Japonija) ir auginamos kol pasieks reikiamos stadijos brandą. Auginimo temperatūra priklauso nuo norimo nematoidų vystymosi greičio (žr. 1.4.2).

2.5.3 Raudonųjų dobilų ekstraktu ir formuluote paveiktų *C.elegans* senėjimo tyrimas

Paruošiami tiriamieji dobilų ekstrakto ir nanonešiklių formuluotės tirpalai. Gaminamas 200 µg/ml raudonojo dobilo ekstrakto tirpalas. 0,01 g ekstrakto ištirpinama 100 µl DMSO ir steriliu S-bazės tirpalu pripildomas iki 50 ml žymos. DMSO kiekis tirpale siekia 0,2 %. Ruošiamas pradinis 4 mg/ml į niosomas inkorporuoto ekstrakto tirpalas. Pasveriamas 0,667 g formuluotės preparato ir steriliu S-bazės tirpalu praskiedžiama iki 5 ml. Paruošti pradiniai tirpalai naudojami *C.elegans* senėjimo eksperimentų tiriamiesiems tirpalams paruošti.

S-bazinis tirpalas pagaminamas remiantis IBMM (angl. *Institute of Biomolecules Max Mousseron*) instituto (Monpeljė, Prancūzija) protokolu. 1 litro tirpalui paruošti naudojama 5,9 g NaCl ir 50 ml 1 M kalio fosfato, o likęs tūris užpildomas vandeniu. Tirpalas autoklavuojamas. Po autoklavavimo tirpalui atvėsus iki 55 °C temperatūros įpilamas 1 ml 5 mg/ml etanolinio cholesterolio tirpalo.

C. elegans senėjimo eksperimentai atliekami 96 šulinėlių lėkštelėse. Vieno šulinėlio galutinis tūris 200 µl. Tirpalą sudaro 16 µl nematoidų mitybai reikalingų *E.coli* bakterijų (*Caenorhabditis* Genetics Center, JAV), kurių dauginimasis stabdomas 2 val. šildant 65 °C temperatūros vonelėje (Bioblock Scientific, Prancūzija), nematoidų augimą stabdantis 2,5 µl (1X) 5-fluorodeoksiuridinas

(FudR) (Sigma-Aldrich, JAV) ir paruošti atitinkami raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklio formuluotės tirpalai. Tiriama 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml ir 0,1 µg/ml ekstrakto bei nanonešiklio formuluotės tirpalai atitinkantys 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml ekstrakto koncentracijas. Į lėkštelės šulinėlius pilamas atitinkamas kiekis tiriamojo tirpalo, o likęs tūris užpildomas S-baze. Kontroliniame mėginyje naudojamas S-bazinis tirpalas ir didžiausios tiriamos koncentracijos (10 µg/ml) paruošimui naudojamas DMSO kiekis (0,25 µl). Paruošti skirtingų koncentracijų tirpalai išpilstomi į 10 šulinėlių, o į kiekvieną jų įkeliami penki L4 stadijos nematoidai *C.elegans*. Kiekvienos koncentracijos tirpalams tirti naudojama 50 nematoidų.

Sumažinti garavimui, lėkštelės sutvirtinamos parafilmu juosta ir laikomos 20 °C temperatūros inkubatoriuje. Kiekvieną dieną skaičiuojami išgyvenę nematoidai. Rezultatų patikimumui užtikrinti eksperimentas kartojamas tris kartus. Duomenys analizuojami naudojant XLSTAT programą (Addinsoft, JAV) Kaplan-Meier (KM) metodu.

2.5.4 Ekstrakto ir niosomų formuluotės poveikis su senėjimu susijusių genų sužadinime

Tyrimui naudojamos keturios nematoidų *C.elegans* linijos (*Caenorhabditis* Genetics Center, JAV) turinčios pakeistą *gst-4::GFP* (CL2166), *hsp-16.2::GFP* (CL2070), *hsp-4::GFP* (ST4005) ar *sod-3::GFP* (CF1553) už stresą atsakingą geną, kuris esant nepalankioms sąlygoms aktyvuojamas ir stebima fluorescencija. Prieš tyrimą nematoidai sinchronizuojami ir kultivuojami kol pasiekia L4 arba ankstyvos brandos stadiją.

Paruošiami pradiniai 200 µg/ml ekstrakto ir 4 mg/ml nanonešiklio formuluotės tirpalai (žr. 2.5.3). Eksperimento metu tiriama 0,1 µg/ml, 1 µg/ml raudonųjų dobilų ekstrakto ir analogiškas ekstrakto koncentracijas turinčio nanonešiklio preparato tirpalai.

Stresinėmis sąlygomis sužadintų genų tyrimas atliekamas 12 šulinėlių lėkštelėse (Falcon, JAV). Galutinis tirpalo tūris šulinėlyje 4 ml. Tirpalą sudaro 320 µl *E.coli* bakterijų, 4 µl nematoidų vystymąsi stabdantis FudR (1x), atitinkamas kiekis tiriamojo tirpalo, o likęs tūris iki 4 ml užpildomas S-bazės tirpalu. Tyrime naudojamas kontrolinis mėginys – S-bazinis tirpalas. Kiekvienam mėginiui tirti į tirpalus įkeliami 50 nematoidų *C.elegans*. Bandymas atliekamas su kiekviena pakeistą geną turinčia nematoidų linija. Paruošiami du analogiški bandymai rezultatams fiksuoti po 4 ir 7 dienų. Rezultatai stebimi UV šviesoje naudojant mikroskopą Leica M205 FCA (Vokietija).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Raudonųjų dobilų ekstrakto veikliųjų junginių skvarba per odą

Skvarbos tyrimų metu buvo siekiama nustatyti raudonųjų dobilų ekstrakto veikliųjų junginių formononetino ir biochanino A skvarbą per odą naudojant niosomų formuluotę. Kontroliniu mėginiu naudotas 3 % ekstraktas glicerolyje.

Tyrimų su žmogaus oda *ex vivo* ir HPLC analizės metu nustatyta, kad niosomos pagerina raudonųjų dobilų izoflavonų skvarbą per odą. Po 24 val., naudojant nanonešiklio formuluotę, srautas ir skvarba į epidermį ir dermą buvo didesni nei kontroliniuose mėginiuose. Masės balansas atsižvelgiant į nustatytą tiriamų junginių kiekį nebuvo prarastas daugiau kaip 10 %.

Tiriant niosomų formuluotės skvarbą per odą, apskaičiuotas formononetino srautas epidermyje yra $0,9078 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o kontroliniame mėginyje $0,1384 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dermoje nustatytas srautas naudojant nanonešiklį siekia $3,1275 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, kai kontroliniame mėginyje kiekis buvo mažesnis už identifikacijos ribas. Nustatytas skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$). Atitinkami formononetino skvarbos rezultatai nurodyti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Formononetino skvarba į odą naudojant niosomų formuluotę.

Nešiklis	Epidermis		Derma	
	Srautas, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Kiekis, $\mu\text{g}/\text{mg}$	Srautas, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Kiekis, $\mu\text{g}/\text{mg}$
Niosomų formuluotė	$0,9078 \pm 0,3538$	$0,1458 \pm 0,0621$	$3,1275 \pm 2,2146$	$0,0066 \pm 0,0042$
Kontrolė	$0,1384 \pm 0,0198$	$0,0161 \pm 0,0043$	-	-

Tyrimų metu nustatytas raudonųjų dobilų izoflavono biochanino A srautas epidermyje naudojant niosomų formuluotę siekia $1,051 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o kontroliniame mėginyje – $0,2341 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dermoje biochanino A srautas naudojant nanonešiklį siekia $3,1384 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tuo tarpu kontroliniame mėginyje – $0,1775 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p < 0,05$) (3.2 lentelė).

Remiantis gautais skvarbos į odą tyrimais ir atlikus HPLC analizę apskaičiuota kiek kartų niosomų formuluotė gerina tiriamų raudonųjų dobilų izoflavonų skvarbą per odą. Reikšmės gaunamos nustatant santykį tarp prasiskverbusių junginių kiekio pro epidermį ar dermą naudojant niosomų formuluotę lyginant su kontroline grupe. Nustatyta, kad biochanino A skvarba epidermyje pagerinama $5,637 \pm 2,7318$ kartų, dermoje $12,337 \pm 5,2108$, o formononetino A skvarba epidermio odos sluoksnyje pagerėja $6,4774 \pm 1,8917$, dermoje – $10,7783 \pm 2,0813$ kartų.

3.2 lentelė. Biochanino A skvarba į odą naudojant niosomų formuluotę.

Nešiklis	Epidermis		Derma	
	Srautas, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Kiekis, $\mu\text{g}/\text{mg}$	Srautas, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Kiekis, $\mu\text{g}/\text{mg}$
Niosomų formuluotė	1,0510±0,2773	0,1712±0,0705	3,1384±2,1911	0,0067±0,0042
Kontrolė	0,2341±0,0873	0,0276±0,0096	0,1775±0,0235	-

2008 metais Zih-Rou Huang su kolegomis tyrė daidzeino ir genisteino skvarbą per odą *in vitro*. Tyrimai atlikti su pelės ir kiaulės oda parodė, kad genisteinas yra geriau absorbuojamas negu daidzeinas [74], tačiau magistro baigiamajame projekte gautos junginių skvarbos reikšmės yra paklaidų ribose, taigi metilintos daidzeino ir genisteino formos biochaninas A ir formononetinas pasižymi panašiu skvarbos profiliu.

3.2 MTT metodu nustatytas raudonųjų dobilų ekstrakto ir formuluotės poveikis ląstelių gyvybingumui

3.2.1 Poveikis naudojant HaCaT ląstelių modelį

Ekspertimentų metu buvo tiriamas raudonųjų dobilų ekstrakto ir jo niosomų formuluotės poveikis HaCaT ląstelių gyvybingumui. HaCaT ląstelių linija yra imortalizuoti žmogaus keratinocitai, taigi modelis yra pritaikytas epidermio homeostazės tyrimams.

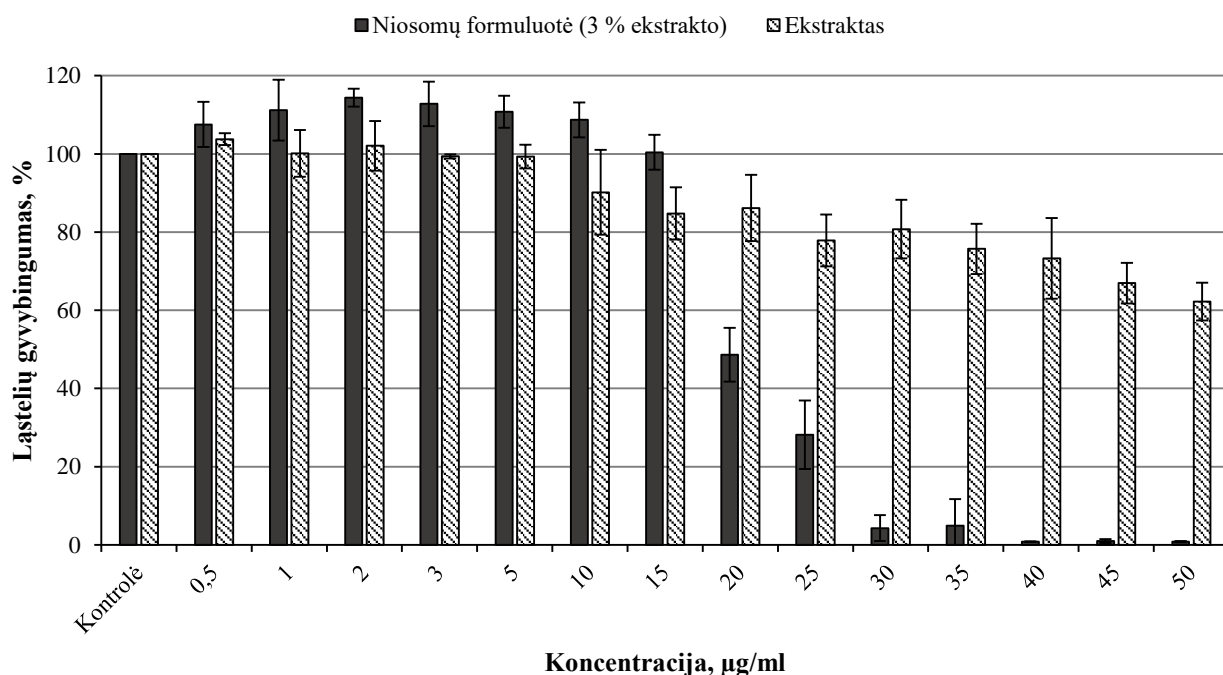
Pirminių tyrimų metu (duomenys nepateikti) buvo nustatytos koncentracijų ribos, kuriose raudonųjų dobilų ekstraktas ir jo nanonešiklio formuluotė neigiamai veikia ląstelių gyvybingumą, taip pat koncentracijos, kuriose išgyvena 100 % ląstelių. Tyrimai tęsti tiriant keturiolika skirtingų koncentracijų. Tiriami 0,5–50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklio formuluotės tirpalai. Rezultatai pateikiami ląstelių gyvybingumą išreiškiant procentais nuo kontrolės. Laikoma, kad nanonešiklio formuluotė sudaro 3 % gryno standartizuoto raudonųjų dobilų ekstrakto.

Ląsteles paveikus 0,5–15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ niosomų formuluotės su įterptu dobilų ekstraktu tirpalu, gyvybingų ląstelių skaičius po 24 val. siekia 100 % ir daugiau. Lyginant su kontroliniu tirpalu, nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) ląstelių gyvybingumo padidėjimas ląsteles paveikus 2–10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentracijos nanonešiklių tirpalais. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ formuluotės koncentracijoje 48,6 % ląstelių yra gyvybingos, o 25–50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentracijų ribose, lyginant su kontroliniu tirpalu, gyvybingumas sumažėja iki 28,2–0,8 % ($p < 0,05$) (3.1 pav.).

Tiriant gryną raudonųjų dobilų ekstraktą, nustatyta, kad HaCaT ląstelėms toksiškas poveikis nepasireiškia esant 0,5–5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ekstrakto koncentracijai, o 10–50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentracijų ribose gyvybingumas pamažu mažėja kol 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentracijos tirpale pasiekia 62,2 %. Statistiškai

reikšmingas sumažėjimas nustatytas HaCaT ląsteles veikiant 15-50 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijomis, o esant 0,5 $\mu\text{g/ml}$ tirpalui ląstelių gyvybingumas statistiškai reikšmingai padidėja ($p < 0,05$).

Ankstesniuose tyrimuose buvo tirti tik atskiri ekstraktą sudarantys veiklieji junginiai. 2013 metais Tae-Gyu Lim su kolegomis nustatė, kad 10–80 μM (2,8–22,7 $\mu\text{g/ml}$) koncentracijos raudonųjų dobilų izoflavonas biochaninas A nėra toksiškas HaCaT ląstelėms. Tyrimų metu ląstelių gyvybingumas siekia 80–100 % [75]. Analogiški rezultatai gauti ir dabartinių eksperimentų metu. Ląstelių gyvybingumas šių koncentracijų ribose siekia daugiau kaip 80 % (3.1 pav.).



3.1 pav. MTT metodu nustatytas raudonųjų dobilų ekstrakto ir niosomų formuluotės poveikis HaCaT ląstelių gyvybingumui.

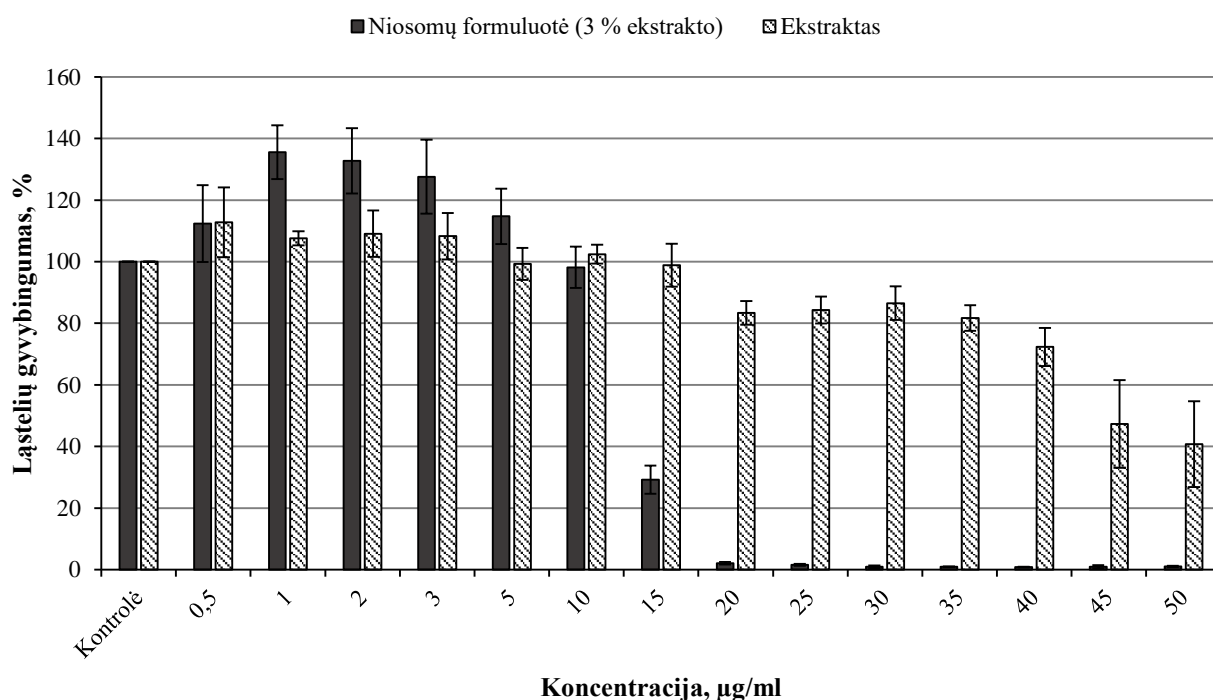
3.2.2 Poveikis naudojant 3T3 ląstelių modelį

Raudonųjų dobilų ekstrakto ir jo formuluotės toksiškumas Gilesniems odos sluoksniams tirtas naudojant imortalizuotus pelės fibroblastus. Tyrimui naudotas 3T3 ląstelių modelis.

Eksperimentas atliekamas analizuojant analogiškas koncentracijas kaip ir tyrimuose su HaCaT ląstelių linija. Tyrimų metu nustatyta, kad 0,5–10 $\mu\text{g/ml}$ niosomų formuluotės koncentracijose ląstelių gyvybingumas siekia 98 % ir daugiau, o esant 1–5 $\mu\text{g/ml}$ tiriamiesiems tirpalams nustatytas statistiškai reikšmingas ląstelių gyvybingumo padidėjimas. Esant 15 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijai, tiriamojo tirpalo toksiškumas smarkiai padidėja, o 3T3 ląstelių gyvybingumas sumažėja iki 29 %. Didesnėse koncentracijose (20–50 $\mu\text{g/ml}$) formuluotė yra toksiška ląstelėms. Lyginant su kontroliniais

mėginiais, šiomis sąlygomis išgyvena tik 1–2 % ląstelių (3.2 pav.). Ląstelių gyvybingumo sumažėjimas nustatytas kaip statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$).

Lyginant su niosomų formuluote, gryno dobilų ekstrakto toksiškumas yra mažesnis. 0,5–15 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijose ląstelių gyvybingumas yra 98–136 %, o 20–40 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijų ribose vis dar siekia 87–72 %. Esant 50 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakto tirpalui ląstelių gyvybingumas lyginant su kontroliniu tirpalu nukrenta iki 41 % gyvybingų ląstelių. 20–50 $\mu\text{g/ml}$ tiriamieji ekstrakto tirpalai ląstelių gyvybingumą sumažina statistiškai reikšmingai, o 1 $\mu\text{g/ml}$ tirpalas jį statistiškai reikšmingai padidina ($p < 0,05$).



3.2 pav. MTT metodu nustatytas raudonųjų dobilų ekstrakto ir niosomų formuluotės poveikis 3T3 ląstelių gyvybingumui.

Literatūroje neaptikta tyrimų, kuriuose būtų nagrinėjamas raudonųjų dobilų ekstrakto su keliomis veikliosiomis medžiagomis poveikis 3T3 ląstelių linijai, tačiau 2008 metais Agata Rucinska su kolegomis analizavo veikliojo junginio – genisteino įtaką 3T3 ląstelių gyvybingumui. Tyrimai parodė, kad esant 5 μM (1,35 $\mu\text{g/ml}$) genisteino koncentracijai, ląstelių gyvybingumas lyginant su kontroliniu tirpalu siekia 90 % ir didėjant koncentracijai mažėja, kol 180 μM (48,64 $\mu\text{g/ml}$) koncentracijoje gyvybingumas sumažėja iki 5 % [76].

3.3 UV apsauginio poveikio tyrimų rezultatai

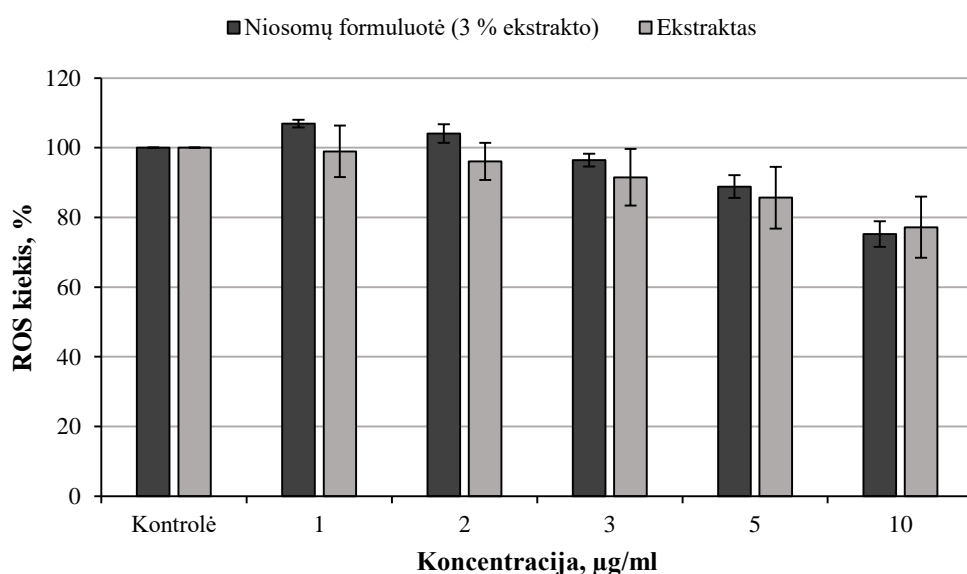
3.3.1 UV apsauginio efekto vertinimas pritaikant HaCaT ląstelių modelį

Tyrimas atliktas norint įvertinti raudonųjų dobilų ekstrakto ir niosomų formuluotės UV apsauginį poveikį.

Ekperimentai atlikti naudojant HaCaT ląstelių liniją veikiant 50 mJ/cm^2 UVB ir $2,5 \text{ J/cm}^2$ UVA spinduliuotėmis, o viduląsteliniai ROS įvertinami matuojant pro ląstelių membraną prasiskverbusio DCFDA dažo fluorescenciją. Fluorescencija matuojama po 0, 5, 15, 30 ir 60 min, tačiau duomenys pateikiami praėjus 60 min.

Raudonųjų dobilų ekstrakto ir jo niosomų formuluotės antioksidantinio aktyvumo tyrimo rezultatai pateikti 3.3 ir 3.4 paveiksluose. Tirtos penkios HaCaT ląstelėms necitotoksiškos tiriamųjų tirpalų koncentracijos, kurios buvo nustatytos ankstesnių tyrimų metu (žr. 3.2.1). Duomenys pateikiami procentais nuo kontrolės (HBSS tirpalas).

Nustatyta, kad iš tirtų 1, 2, 3, 5 ir 10 $\mu\text{g/ml}$ raudonųjų dobilų ir niosomų formuluotės koncentracijų ir veikiant 50 mJ/cm^2 UVB spinduliuote, didžiausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymi 10 $\mu\text{g/ml}$ tirpalai. Po 1 val. veikimo 10 $\mu\text{g/ml}$ gryno ekstrakto tirpalu, lyginant su kontroliniu tirpalu susidariusių ROS kiekis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėja iki $77,173 \pm 8,784 \%$, o veikiant tokia pačia koncentracija niosomų formuluotės, kurią sudaro 3 % ekstrakto, ROS lygis nukrenta iki $75,202 \pm 3,681 \%$ ($p < 0,05$). Mažėjant koncentracijai, antioksidacinis poveikis HaCaT ląstelėms mažėja – viduląstelinių ROS lygis didėja. Paveikus 1 $\mu\text{g/ml}$ raudonųjų dobilų ekstraktu ROS pasiekia $98,947 \pm 7,409 \%$, o niosomų formuluote – statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) padidėja iki $106,929 \pm 1,109 \%$.

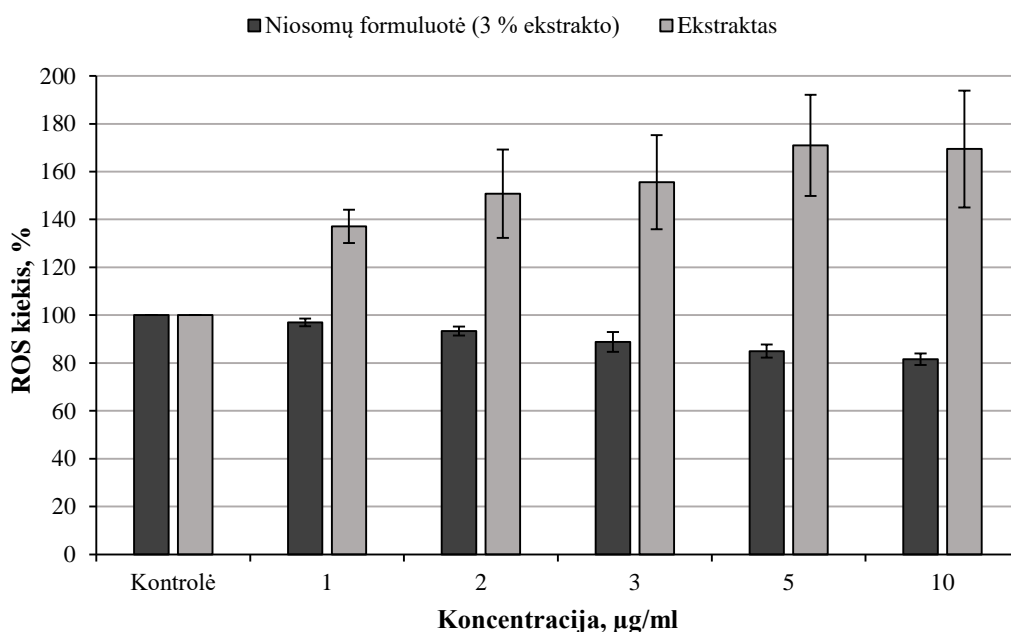


3.3 pav. ROS kiekis HaCaT ląstelėse paveikus 50 mJ/cm^2 UVB spinduliuote.

Praėjus 1 val. po HaCaT ląstelių veikimo raudonųjų dobilų ekstraktu bei niosomų formuluote ir paveikus $2,5 \text{ J/cm}^2$ UVA spinduliuote, gauti rezultatai skiriasi lyginant su susidariusiu ROS kiekiu po veikimo 50 mJ/cm^2 UVB šviesa.

HaCaT ląsteles paveikus grynu ekstraktu ir UVA šviesa, viduląstelinų ROS kiekis didėjant koncentracijai didėja ir viršija 100 % (3.4 pav.). $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ koncentracijos raudonųjų dobilų ekstraktas ROS kiekį padidina iki $137,067 \pm 6,952 \%$, o esant $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ tirpalui ROS lygis pakyla iki $169,459 \pm 24,412 \%$, taigi HaCaT ląsteles veikiant $2,5 \text{ J/cm}^2$ UVA spinduliuote grynas ekstraktas antioksidaciniu poveikiu nepasižymi. Nustatytas statistiškai reikšmingas pokytis ($p < 0,05$).

Tyrimai su raudonųjų dobilų ekstrakto formuluote ir veikimu UVA šviesa rodo priešingus rezultatus. $1\text{--}10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ niosomų formuluotės tirpalai statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) mažina ROS kiekį, taigi turi antioksidacinių savybių. 1 val. ląsteles veikiant $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ niosomų formuluotės tirpalu ROS lygis yra $97,001 \pm 1,589 \%$, o koncentraciją padidinus iki $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ROS lygis sumažėja iki $81,590 \pm 2,400 \%$.



3.4 pav. ROS kiekis HaCaT ląstelėse paveikus $2,5 \text{ J/cm}^2$ UVA spinduliuote.

3.3.2 UV apsauginio efekto vertinimas pritaikant 3T3 ląstelių modelį

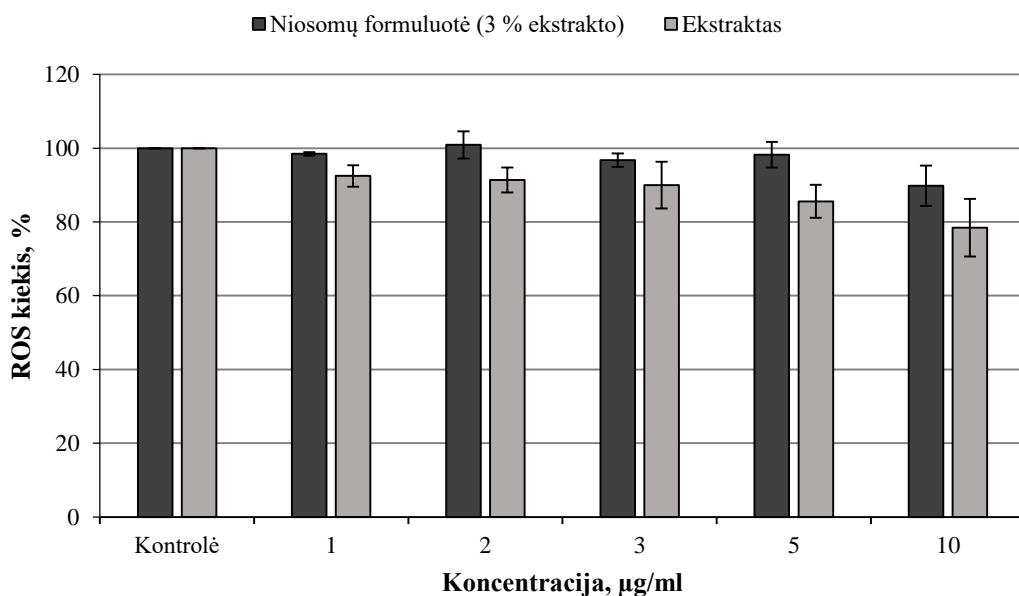
Raudonųjų dobilų ekstrakto ir niosomų formuluotės UV apsauginio poveikio tyrimas atliktas ir su 3T3 ląstelių linija.

Ląstelės po 1 val. inkubacijos tiriamuosiuose tirpaluose buvo veikiamos 50 mJ/cm^2 UVB ir $2,5 \text{ J/cm}^2$ UVA šviesa, o susidarę ROS įvertinami spektrofotometriškai, tyrimui naudojant DCFDA

dažą. Tyrimas analogiškas apsauginio poveikio vertinimui naudojant HaCaT ląstelių modelį: paveikus spinduliuote duomenys registruojami po 0, 5, 15, 30 ir 60 min, o rezultatai pateikiami esant pastoviam ROS kiekiui (po 60 min).

Po 1 val. 3T3 ląstelių inkubacijos su niosomų formuluotės tirpalais ir veikimo 50 mJ/cm² UVB spinduliuote, lyginant su kontrole, didėjant tiriamojo tirpalo koncentracijai ROS kiekis mažėja. Veikiant 1 µg/ml koncentracijos niosomų formuluotės tirpalu ROS kiekis siekia 98,446±0,480 %, o lyginant su kontroliniu tirpalu, koncentracijai padidėjus iki 10 µg/ml viduląstelių ROS gamyba sumažėja iki 89,805±5,447 % (3.5 pav.). Remiantis rezultatais, galima teigti, kad naudojant 3T3 ląstelių modelį 1–10 µg/ml koncentracijų ribose niosomų formuluotė su įterptu dobilų ekstraktu pasižymi nedideliu antioksidaciniu poveikiu. Statistiškai reikšmingas ROS kiekio pokytis nustatytas tik ląsteles paveikus 1 µg/ml ir 10 µg/ml tiriamaisiais nanonešiklio formuluotės tirpalais.

3T3 ląsteles veikiant grynu raudonųjų dobilų ekstraktu, lyginant su niosomų formuluote, nustatytas didesnis antioksidacinis poveikis. Ląsteles paveikus 1 µg/ml ekstrakto tirpalu ROS kiekis sumažinamas iki 92,470±2,932 %, o esant 10 µg/ml koncentracijai lyginant su kontrole ROS gamyba siekia 78,458±7,824 % (p < 0,05).

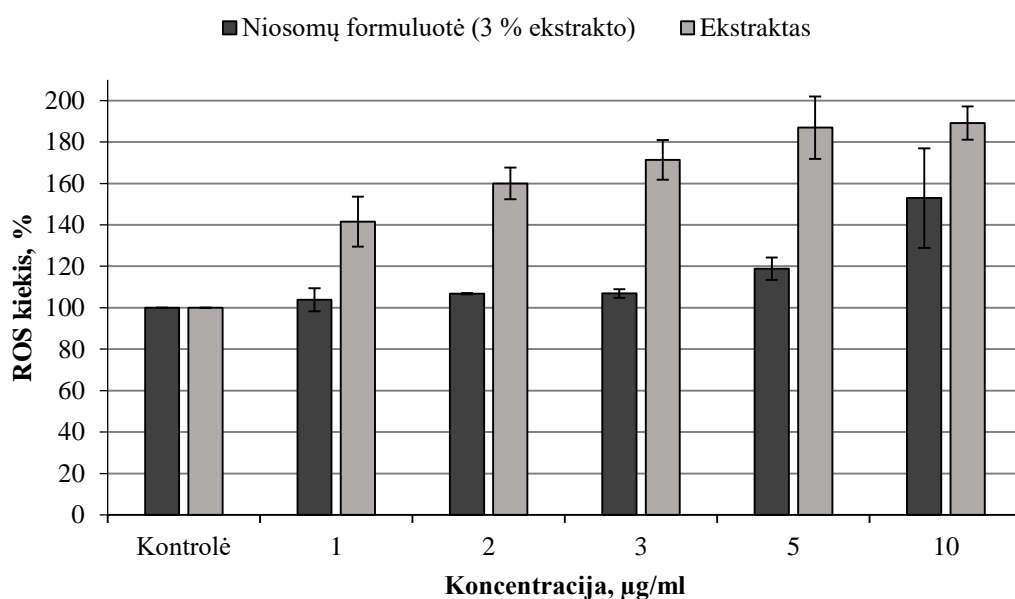


3.5 pav. ROS kiekis 3T3 ląstelėse paveikus 50 mJ/cm² UVB spinduliuote.

3T3 ląsteles veikiant 2,5 J/cm² UVA spinduliuote raudonųjų dobilų ekstraktas ir jo niosomų formuluotė antioksidaciniu aktyvumu nepasižymi. Tyrimų metu nustatyta, kad lyginant su kontroliniu tirpalu viduląstelių ROS kiekis padidėja. Ląsteles 1 val. veikiant 1 µg/ml koncentracijos niosomų formuluotės tirpalu po veikimo šviesa nustatytas ROS kiekis yra 103,849±5,508 %, o

didėjant koncentracijai ROS lygis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) taip pat kyla. Esant $10 \mu\text{g/ml}$ niosomų tirpalui ROS kiekis lyginant su kontroliniu tirpalu siekia $189,152 \pm 24,045 \%$.

Gryno raudonųjų dobilų ekstrakto antioksidacinių savybių tyrimai parodė, kad veikiant $2,5 \text{ J/cm}^2$ UVA spinduliuote ir naudojant 3T3 ląsteles $1\text{--}10 \mu\text{g/ml}$ koncentracijų tirpalai taip pat nepasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Didėjant koncentracijai ROS lygis kyla ir viršija 100% . Esant $1 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijai, lyginant su kontrole ROS kiekis yra $141,504 \pm 12,036 \%$, o 3T3 ląsteles veikiant $10 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto tirpalu ir UVA spinduliuote viduląstelių ROS lygis pakyla iki $189,152 \pm 8,004 \%$ ($p < 0,05$) (3.6 pav.).



3.6 pav. ROS kiekis 3T3 ląstelėse paveikus $2,5 \text{ J/cm}^2$ UVA spinduliuote.

3.4 Raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklio toksiškumo vertinimas naudojant *C.elegans* modelį

3.4.1 *C.elegans* gyvenimo trukmės pokyčiai

Nematoidų *C.elegans* gyvenimo trukmės tyrimų metu stebimas raudonųjų dobilų ekstrakto ir jo nanonešiklio formuluotės poveikis gyvūniniame modelyje *in vivo*. Eksperimentas vykdomas siekiant įvertinti nanonešiklio toksiškumą. Veikiant preparatais, *C.elegans* N2 gyvenimo trukmė gali būti prailginta, sutrumpinta arba neturėti jokie poveikio.

Tyrimo metu analizuoti $10 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, $0,5 \mu\text{g/ml}$ ir $0,1 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto bei niosomų formuluotės tirpalai atitinkantys $1 \mu\text{g/ml}$, $0,5 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijas. Kontroliniu tirpalu laikomas S-bazinis tirpalas. Gauti nematoidų *C.elegans* gyvenimo trukmės rezultatai pateikiami 3.3 lentelėje. Kontroliniame tirpale augusių N2 nematoidų vidutinė gyvenimo trukmė

siekia $17,840 \pm 0,962$ dienas ir atitinka kitų autorių darbuose gautus rezultatus, kuriuose S-baziniame tirpale nematoidai vidutiniškai išgyvena $17,94 \pm 3,87$ dienas [77].

Gauti duomenys rodo, kad $10 \mu\text{g/ml}$ raudonųjų dobilų ekstraktas vidutinę gyvenimo trukmę statistiškai reikšmingai ($p < 0,0001$) sutrumpina iki $11,220 \pm 0,670$, o galutinė gyvenimo trukmė sutrumpėja nuo 35 iki 25 dienų. Remiantis gautais rezultatais, galime teigti, kad $10 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto tirpalas nematoidams *C.elegans* yra toksiškas.

Tiriant mažesnių raudonųjų dobilų ekstrakto koncentracijų tirpalus neigiamas ekstrakto poveikis nenustatytas, o esant $1 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto tirpalui, matomas nežymus (statistiškai nereikšmingas) teigiamas poveikis vidutinei gyvenimo trukmei. Vidutinis išgyvenamumas lyginant su kontroliniu mėginiu pailgėja iki $19,918 \pm 1,185$ dienų, tačiau galutinė trukmė nekinta.

3.3 lentelė. Tiriamaisiais tirpalais paveiktų *C.elegans* gyvenimo trukmė ($p < 0,0001$).

Tiriamasis tirpalas		Gyvenimo trukmė (dienos)	
		Vidutinė ¹ ±SD	Ilgiausia ²
Kontrolė	S-bazė	$17,840 \pm 0,962$	35
Ekstraktas	$10 \mu\text{g/ml}$	$11,220 \pm 0,670$	25
	$1 \mu\text{g/ml}$	$19,918 \pm 1,185$	35
	$0,5 \mu\text{g/ml}$	$19,308 \pm 1,048$	33
	$0,1 \mu\text{g/ml}$	$16,880 \pm 1,015$	32
Nanonešiklio formulotė	$33,3 \mu\text{g/ml}$ ($1 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto)	$15,472 \pm 0,853$	34
	$16,7 \mu\text{g/ml}$ ($0,5 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto)	$17,020 \pm 1,047$	32
	$3,3 \mu\text{g/ml}$ ($0,1 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto)	$13,041 \pm 0,508$	20

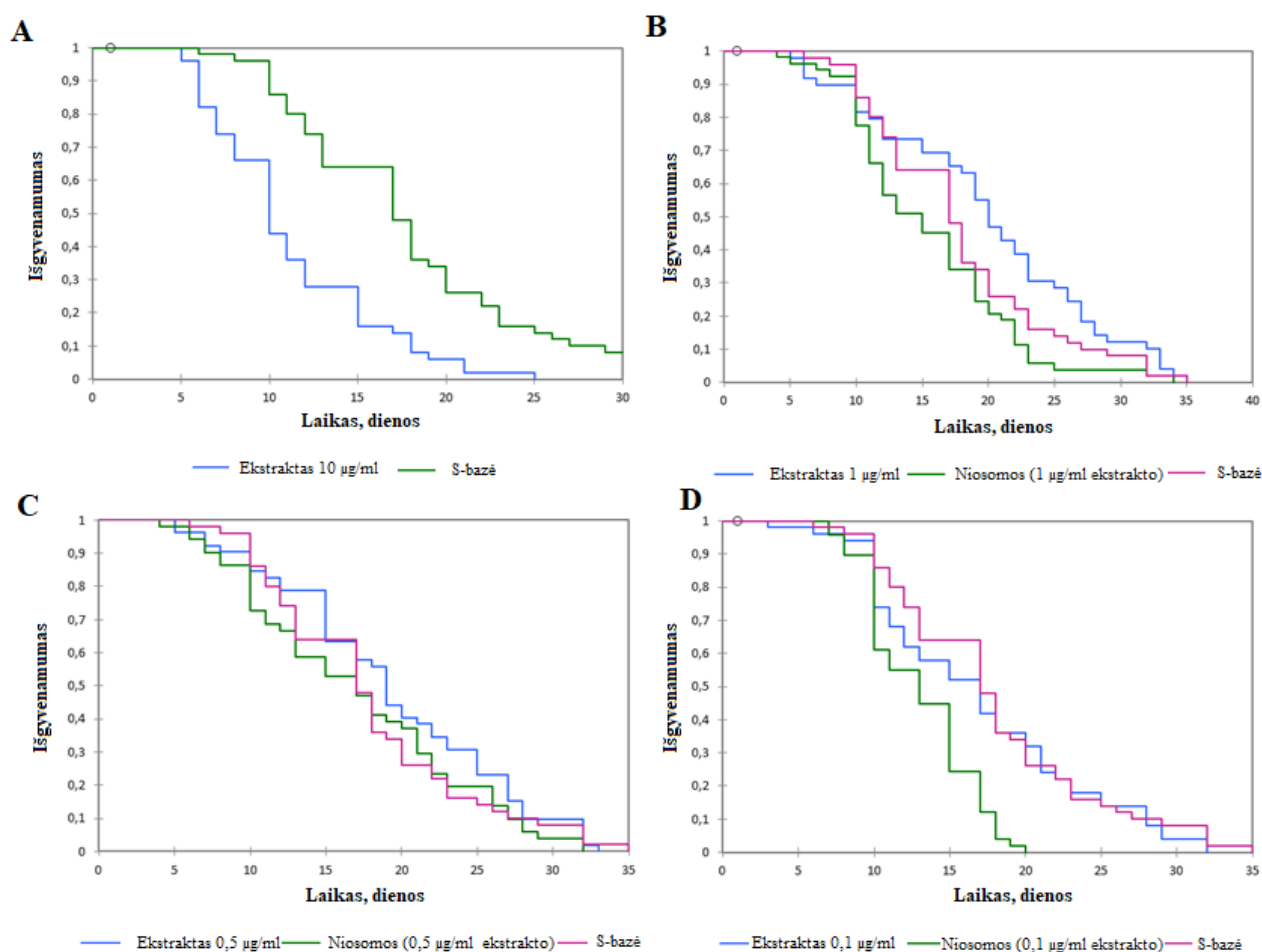
¹ Vidutinė gyvenimo trukmė – diena, kai 50 % nematoidų yra gyvybingi.

² Ilgiausia gyvenimo trukmė – diena, kurią miršta paskutinis nematoidas.

Norint ištirti niosomų toksiškumą, atliktas raudonųjų dobilų ekstrakto ir jo niosomų formulotės palyginamieji tyrimai. Ruošiant tiramuosius tirpalus, pasirinktos tokios nanonešiklio preparato koncentracijos, kurios atitinka $1 \mu\text{g/ml}$, $0,5 \mu\text{g/ml}$ ir $0,1 \mu\text{g/ml}$ ekstrakto koncentracijas. Palyginamieji grafikai pateikti 3.7 paveiksle.

Tarp tiriamų $1 \mu\text{g/ml}$, $0,5 \mu\text{g/ml}$ ir kontrolinio tirpalo poveikio nematoidams, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta, tačiau $0,1 \mu\text{g/ml}$ raudonųjų dobilų ekstraktą atitinkantis niosomų formulotės tirpalas yra toksiškas. Lyginant su kontroliniu tirpalu nematoidų gyvenimo trukmė sumažėja iki $13,041 \pm 0,508$ dienų, o ilgiausia šiomis sąlygomis nustatyta gyvenimo trukmė sutrumpėja iki 20 dienų ($p < 0,0001$) (3.7, D pav.). Kadangi atitinkamos koncentracijos grynas ekstraktas toksiškumu nepasižymi, toks poveikis gali būti paaiškintas maža į niosomas įterpto

ekstrakto koncentracija. Šiuo atveju tiriamajame tirpale dominuoja ne teigiamą poveikį turintys raudonųjų dobilų ekstrakto veiklieji junginiai, o niosomų formuluotė ir ją sudarantys komponentai.



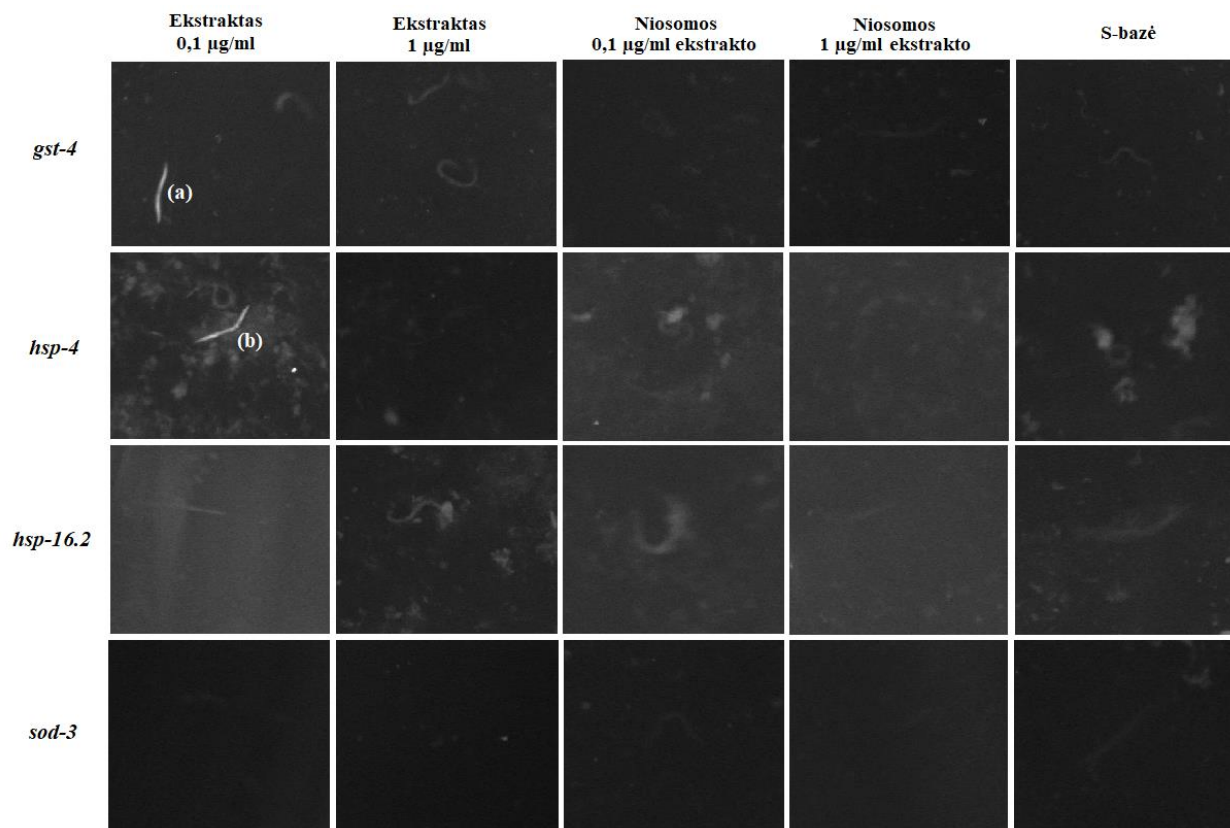
3.7 pav. Skirtingais raudonųjų dobilų ekstrakto ir niosomų formuluotės tirpalais paveiktų nematoidų *C.elegans* gyvenimo trukmės palyginimas (A-D). Kontroliniams mėginiams naudotas S-bazinis tirpalas.

3.4.2 Poveikis už atsaką į stresą atsakingų *gst-4*, *hsp-4*, *hsp-16.2* ir *sod-3* genų sužadinime

Eksperimento metu siekiama ištirti raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklių formuluotės poveikį už stresą atsakingų genų sužadinime.

Tirti *gst-4*, *hsp-4*, *hsp-16.2* ir *sod-3* genai. Rezultatai analizuojami po 4 ir 7 dienų. Tiriamuosiuose 0,1 µg/ml, 1 µg/ml ir atitinkamuose nanonešiklio tirpaluose esantys gyvi nematoidai lyginami su kontroliniame S-baziniame tirpale esančiais nematoidais. Tirpaluose esančius *C.elegans* stebint UV šviesoje, fluorescencija nenumatyta (3.8 pav.), taigi neveikiant išoriniais stresiniais veiksniais raudonųjų dobilų ekstraktas ir niosomų formuluotė nėra stresą sukeltantys veiksniai.

3.8 paveiksle, (a) ir (b) žuvę nematoidai su žymekliniais *gst-4* ir *hsp-4* genais fluorescuoja, nes žūtis metu yra suaktyvinami ir išsiskiria didelis kiekis ROS.



3.8 pav. Raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklio formuluotės tirpalų poveikis už atsaką į stresą atsakingų genų sužadinime (po 7 dienų). S-bazinis tirpalas naudojamas kaip kontrolinis mėginys. (a) ir (b) žymi nuo tiriamųjų tirpalų nepriklausomai žuvusius nematoidus, kurių žūtis metu aktyvinami ROS, todėl matoma fluorescencija.

IŠVADOS

1. Tyrimų rezultatai parodė, kad į nanonešiklį įterpto raudonųjų dobilų ekstrakto veikliųjų junginių formononetino ir biochanino A skvarba į epidermio ir dermos odos sluoksnius yra efektyvi raudonųjų dobilų ekstrakto skvarbą gerinanti nanonešiklinė sistema.
2. Vertinant raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklio formulotės poveikį HaCaT ir 3T3 ląstelių gyvybingumui nustatyta, kad HaCaT modelyje, naudojant mažesnes negu 15 µg/ml nanonešiklio formulotės koncentracijas ir 5 µg/ml gryno ekstrakto tirpalus, citotoksiškas poveikis ląstelėms nepasireiškia. 3T3 ląstelių gyvybingumas išlieka beveik nepakitęs esant 10 µg/ml formulotės ir 15 µg/ml gryno raudonųjų dobilų ekstrakto tirpalams, taigi mažesnių ekstrakto ir nanonešiklio preparato koncentracijų tirpalai neveikia citotoksiškai ir gali būti naudojami ant odos.
3. UV apsauginio poveikio tyrimų metu nustatyta, kad HaCaT ir 3T3 ląsteles paveikus 1–10 µg/ml raudonųjų dobilų ekstraktu ir jo formulote bei apšvitinus UVB spinduliuote, viduląstelinių reaktyvių deguonies formų kiekis sumažėja, tačiau UVA šviesa reaktyvių deguonies formų kiekį didina, taigi tiriamieji tirpalai pasižymi UVB apsauginio poveikio savybėmis, tačiau nėra efektyvūs veikiant UVA šviesa.
4. Atlikus raudonųjų dobilų ekstrakto ir formulotės biologinį vertinimą naudojant *Caenorhabditis elegans* modelį nustatyta, kad 10 µg/ml ekstraktas nematoidams yra toksiškas. Mažesnės koncentracijos tirpalai statistiškai reikšmingo poveikio *C.elegans* gyvenimo trukmei neturi, tačiau 0,1 µg/ml formulotės tirpalas yra toksiškas, nes dominuoja nežymiai neigiamas formulotės poveikis. Tiriant raudonųjų dobilų ekstrakto ir nanonešiklių formulotės poveikį už stresą atsakingų *gst-4*, *hsp-4*, *hsp-16.2* ir *sod-3* genų sužadinime, nustatyta, kad ekstraktas ir formulotė nesukelia šių genų sužadinimo, taigi 0,1–1 µg/ml tirpalai nėra egzogeninis toksiškumą lemiantis veiksnys.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. SABUDAK, T., GULER, N. Trifolium L. – A Review on its Phytochemical and Pharmacological Profile. *Phyther Res.* [interaktyvus]. 2009, 23(June), 439-446 [žiūrėta 2017-11-02] ISSN 1001-5302. Prieiga per doi:10.1002/ptr.
2. KHAN, SW., KHATOON S. Ethnobotanical studies on some useful herbs of haramosh and Bugrote Valleys in Gilgit, Northern Areas of Pakistan. *Pakistan J Bot.* [interaktyvus]. 2008, 40(1), 43-58, ISSN 0556-3321.
3. ÇÖLGEÇEN, H., KOCA, U., BÜYÜKKARTAL HN. Use of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) Seeds in Human Therapeutics. *Nuts Seeds Heal Dis Prev.* [interaktyvus]. 2011, 975-980 [žiūrėta 2017-11-02]. Prieiga per doi:10.1016/B978-0-12-375688-6.10115-X.
4. ULLOA, O., ORTEGA, F., CAMPOS, H. Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers. *Genome.* [interaktyvus]. 2003, 46(4), 529-535 [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per doi:10.1139/g03-030.
5. MUSTAFA, B., HAJDARI, A., KRASNIQI, F., et al. Medical ethnobotany of the Albanian Alps in Kosovo. *J Ethnobiol Ethnomed.* [interaktyvus]. 2012, 8(1), 6 [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per doi:10.1186/1746-4269-8-6.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Selected Medicinal Plants Vol. 4. *Essent Med Heal Prod Inf Portal A World Heal Organ Resour.* [interaktyvus]. 2005, 4, 381-399 [žiūrėta 2017-11-10]. ISBN 978 92 4 154705 5. Prieiga per: apps.who.int.
7. BOOTH, NL., OVERK, CR., YAO, P., et al. The chemical and biologic profile of a red clover (*Trifolium pratense* L.) phase II clinical extract. *J Altern Complement Med.* [interaktyvus]. 2006, 12(2), 133-139 [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per: doi:10.1089/acm.2006.12.133.
8. LIU, J., BURDETTE, JE., XU, H., et al. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem.* [interaktyvus]. 2001, 49(5), 2472-2479 [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per: doi:10.1021/jf0014157.
9. BECK, V., UNTERRIEDER, E., KRENN, L., KUBELKA, W., JUNGBAUER, A. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. In: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [interaktyvus]. Vol 84, 2003, 259-268 [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per: doi:10.1016/S0960-0760(03)00034-7.
10. BOLEGO, C., POLI, A., CIGNARELLA, A., PAOLETTI, R. Phytoestrogens: pharmacological and therapeutic perspectives. *Curr Drug Targets* [interaktyvus]. 2003, 4(1), 77-87 [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per: doi:10.2174/1389450033347000.

11. PIERSEN, CE., BOOTH, NL., SUN, Y., et al. Chemical and biological characterization and clinical evaluation of botanical dietary supplements: a phase I red clover extract as a model. *Curr Med Chem.* [interaktyvus]. 2004, 11(11), 1361-1374 [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per: doi:10.2174/0929867043365134.
12. OLESZEK, W., STOCHMAL, A., JANDA, B. Concentration of isoflavones and other phenolics in the aerial parts of *Trifolium* species. *J Agric Food Chem.* [interaktyvus]. 2007, 55(20), 8095-8100 [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per: doi:10.1021/jf072024w.
13. YU, J., BI, X., YU, B., CHEN, D. Isoflavones: Anti-inflammatory benefit and possible caveats. *Nutrients* [interaktyvus]. 2016, 8(6) [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per: doi:10.3390/nu8060361.
14. SORG, O. Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus - Biol.* [interaktyvus]. 2004, 327(7), 649-662 [žiūrėta 2017-11-10]. Prieiga per: doi:10.1016/j.crv.2004.05.007.
15. RUFER, CE., KULLING, SE. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *J Agric Food Chem.* [interaktyvus]. 2006 54(8), 2926-2931 [žiūrėta 2017-11-15]. Prieiga per: doi:10.1021/jf053112o.
16. LIN, CC., TSAI, YL., HO, CT., TENG, SC. Determination of the differential estrogenicity of isoflavonoids by E2-ER-ERE-dependent gene expression in recombinant yeast and MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem.* [interaktyvus]. 2008, 108(2), 719-726 [žiūrėta 2017-11-15]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.020.
17. ALMEIDA IM, RODRIGUES F, SARMENTO B, ALVES RC, OLIVEIRA MB. Isoflavones in food supplements: chemical profile, label accordance and permeability study in Caco-2 cells. *Food Funct.* [interaktyvus]. 2015, 6(3), 938-946 [žiūrėta 2017-11-15]. Prieiga per: doi:10.1039/c4fo01144a.
18. DWECK, AC. The internal and external use of medicinal plants. *Clin Dermatol.* [interaktyvus]. 2009, 27(2), 148-158 [žiūrėta 2017-11-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.clindermatol.2008.01.007.
19. RENDA, G., YALÇIN, FN., NEMUTLU, E., et al. Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium* L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients. *J Ethnopharmacol.* [interkatyvus]. 2013, 148(2), 423-432 [žiūrėta 2018-01-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jep.2013.04.031.
20. HANDJANI-VILA, RM., RIBIER, A., RONDOT, B., VANLERBERGHIE, G. Dispersions of lamellar phases of non-ionic lipids in cosmetic products. *Int J Cosmet Sci.* [interaktyvus]. 1979, 1(5), 303-314 [žiūrėta 2018-01-15]. Prieiga per: doi:10.1111/j.1467-2494.1979.tb00224.x.

21. TU, YS., SUN, DM., ZHANG, JJ., et al. Preparation and characterisation of andrographolide niosomes and its anti-hepatocellular carcinoma activity. *J Microencapsul.* [interaktyvus]. 2014 31(4), 307-316 [žiūrėta 2018-01-15]. Prieiga per: doi:10.3109/02652048.2013.843727.
22. ZIDAN, AS., HABIB, MJ. Maximized mucoadhesion and skin permeation of anti-AIDS-loaded niosomal gels. *J Pharm Sci.* [interaktyvus]. 2014, 103(3), 952-964 [žiūrėta 2018-01-15]. Prieiga per: doi:10.1002/jps.23867.
23. MOGHASSEMI, S., HADJIZADEH, A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *J Control Release* [interkatyvus]. 2014, 185(1), 22-36 [žiūrėta 2017-01-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.015.
24. ROTELLO, VM. Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry By Jonathan W. Steed (Durham University, U.K.), David R. Turner (Monash University, Australia), and Karl J. Wallace (University of Southern Mississippi). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2007. *J Am Chem Soc.* [interaktyvus]. 2007, 129(46), 14524 [žiūrėta 2018-02-10]. Prieiga per: doi:10.1021/ja0769853.
25. VERMA S, SINGH SK, SYAN N, MATHUR P, VALECHA V. Nanoparticle vesicular systems: A versatile tool for drug delivery. *J Chem Pharm Res.* [interaktyvus]. 2010, 2(2), 496-509 [žiūrėta 2018-02-10]. ISSN 0975-7384. Prieiga per: www.jocpr.com.
26. ABDELKADER. H., ALANI, AWG., ALANY, RG. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations. *Drug Deliv.* [interaktyvus]. 2014, 21(2), 87-100 [žiūrėta 2018-02-10]. Prieiga per: doi:10.3109/10717544.2013.838077.
27. JUNGINGER, HE., HOFLAND, HEJ., BOUWSTRA, JA. Interactions of liposomes and niosomes in the skin. *Dtsch Apotheker Zeitung* [interaktyvus]. 1991, 131(4), 132-135 [žiūrėta 2018-02-10]. ISSN 00119857.
28. VAN HAL, DA., JEREMIASSE, E., DE VRINGER, T., JUNGINGER, HE., BOUWSTRA, JA. Encapsulation of lidocaine base and hydrochloride into non-ionic surfactant vesicles (NSVs) and diffusion through human stratum corneum in vitro. *Eur J Pharm Sci.* [interaktyvus]. 1996, 4(3), 147-157 [žiūrėta 2018-02-10]. Prieiga per: doi:10.1016/0928-0987(95)00043-7.
29. SHAHIWALA A, MISRA A. Studies in topical application of niosomally entrapped Nimesulide. *J Pharm Pharm Sci.* [interaktyvus]. 2002, 5(3), 220-225 [žiūrėta 2018-02-10]. ISSN 14821826. Prieiga per MEDLINE.
30. BAYR, H. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine* [interaktyvus]. 2005, 33(12), S498-S501 [žiūrėta 2018-05-16]. Prieiga per: doi: 10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12.

31. CHEN, H., WENG, QY., FISHER, DE. UV signaling pathways within the skin. *J Invest Dermatol.*[interaktyvus]. 2014, 134(8), 2080-2085 [žiūrėta 2018-02-11]. Prieiga per: doi:10.1038/jid.2014.161.
32. LIU, XJ., SHI, ST., YE, JL., LIU, LQ., SUN, M., WANG, CB. Effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on UVB-induced ROS/NF-κB/COX-2 activation and apoptosis in HaCaT cells. *J Photochem Photobiol B Biol.* [interaktyvus]. 2009, 96(2), 109-116 [žiūrėta 2018-02-11]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.010.
33. PETEJOVA, N., MARTINEK, A. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2013 Jun; 157(2). *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* [interaktyvus]. 2013 157(2), 105-113 [žiūrėta 2018-02-11]. Prieiga per: doi:10.5507/bp.2013.048.
34. WLASCHEK, M., BRIVIBA, K., STRICKLIN, GP., SIES, H., SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J Invest Dermatol.* [interaktyvus]. 1995, 104(2), 194-198 [žiūrėta 2018-02-25]. Prieiga per: doi:10.1111/1523-1747.ep12612751.
35. BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* [interaktyvus]. 1974, 77(1), 71-94 [žiūrėta 2018-02-25]. Prieiga per: doi:10.1002/cbic.200300625.
36. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* (80-) [interaktyvus]. 1998, 282(5396), 2012-2018 [žiūrėta 2018-02-25]. Prieiga per: doi:10.1126/science.282.5396.2012.
37. KUWABARA, PE., O'NEIL, N. The use of functional genomics in *C. elegans* for studying human development and disease. *J Inherit Metab Dis.* [interaktyvus]. 2001, 24(2), 127-138 [žiūrėta 2018-02-25]. Prieiga per: doi:10.1023/A:1010306731764.
38. CASSADA, RC., RUSSELL, RL. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* [interaktyvus]. 1975, 46(2), 326-342 [žiūrėta 2018-02-27]. Prieiga per: doi:10.1016/0012-1606(75)90109-8.
39. RANKIN, CH. From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet.* [interaktyvus]. 2002, 3(8), 622-630 [žiūrėta 2018-02-27]. Prieiga per: doi:10.1038/nrg864.
40. DE BONO, M. Molecular approaches to aggregation behavior and social attachment. *J Neurobiol.* [interaktyvus]. 2003, 54(1), 78-92 [žiūrėta 2018-02-27]. Prieiga per: doi:10.1002/neu.10162.
41. WHITE, JG., SOUTHGATE, E., THOMSON, JN., BRENNER, S. The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.*

- [interaktyvus]. 1986, 314(1165), 1-340 [žiūrėta 2018-02-27]. Prieiga per: doi:10.1098/rstb.1986.0056.
42. DEHAY, B., BEZARD, E. New animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord.* [interaktyvus]. 2011, 26(7), 1198-1205 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per: doi:10.1002/mds.23546.
43. BIRD, AF., BIRD, J. *The Structure of Nematodes* Vol 115. [interaktyvus]. 1991 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per: doi:10.1002/9781444395105.fmatter.
44. KALETTA, T., HENGARTNER, MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov.* [interaktyvus]. 2006, 5(5), 387-399 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per: doi:10.1038/nrd2031.
45. MA, L., ZHAO, Y., CHEN, Y., CHENG, B., PENG, A., HUANG, K. *Caenorhabditis elegans* as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases. *Eur J Pharmacol.* [interaktyvus]. 2017, 819 (October 2017), 169-180 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per: doi:10.1016/j.ejphar.2017.11.051.
46. YAN, F., CHEN, X., ZHENG, X. Protective effect of mulberry fruit anthocyanin on human hepatocyte cells (LO2) and *Caenorhabditis elegans* under hyperglycemic conditions. *Food Res Int.* [interaktyvus]. 2017, 102, 213-224 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodres.2017.10.009.
47. XIAO, H., HAPIAK, VM., SMITH, KA., et al. SER-1, a *Caenorhabditis elegans* 5-HT₂-like receptor, and a multi-PDZ domain containing protein (MPZ-1) interact in vulval muscle to facilitate serotonin-stimulated egg-laying. *Dev Biol.* [interaktyvus]. 2006, 298(2), 379-391 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per: doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.044.
48. KAYMAK, E., FARLEY, BM., HAY, SA., et al. Efficient generation of transgenic reporter strains and analysis of expression patterns in *Caenorhabditis elegans* using library MosSCI. *Dev Dyn.* [interaktyvus]. 2016, 245(9), 925-936 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per: doi:10.1002/dvdy.24426.
49. LINK, CD. *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: Lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* [interaktyvus]. 2006, 41(10), 1007-1013 [žiūrėta 2018-02-28]. Prieiga per: doi:10.1016/j.exger.2006.06.059.
50. BERKOWITZ, LA., KNIGHT, AL., CALDWELL, GA., CALDWELL, KA. Generation of Stable Transgenic *C. elegans* Using Microinjection. *J Vis Exp.* [interaktyvus]. 2008, (18) [žiūrėta 2018-02-28]. doi:10.3791/833.
51. FERGUSON, AA., CAI, L., KASHYAP, L., FISHER, AL. Improved vectors for selection of transgenic *caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol.* [interaktyvus]. 2013, 940, 87-102 [žiūrėta 2018-03-05]. Prieiga per: doi:10.1007/978-1-62703-110-3_8.

52. DEPPE, U., SCHIERENBERG, E., COLE, T., et al. Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [interaktyvus]. 1978, 75(1), 376-380 [žiūrėta 2018-03-05]. Prieiga per: doi:10.1073/pnas.75.1.376.
53. BUCHER, EA., SEYDOUX, G. Gastrulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Semin Dev Biol.* [interaktyvus]. 1994, 5(2), 121-130 [žiūrėta 2018-03-05]. Prieiga per: doi:10.1006/sedb.1994.1016.
54. RIDDLE, DL. 12 The Dauer Larva. In: *The Nematode Caenorhabditis Elegans* [interaktyvus]. 1988 [žiūrėta 2018-03-05]. Prieiga per: doi:10.1101/087969307.17.393.
55. BYERLY, L., CASSADA, RC., RUSSELL, RL. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* [interaktyvus]. 1976, 51(1), 23-33 [žiūrėta 2018-03-05]. Prieiga per: doi:10.1016/0012-1606(76)90119-6.
56. CHOW, DK., GLENN, CF., JOHNSTON, JL., GOLDBERG, IG., WOLKOW, CA. Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan. *Exp Gerontol.* [interaktyvus]. 2006, 41(3), 252-260 [žiūrėta 2018-03-05]. Prieiga per: doi:10.1016/j.exger.2005.12.004.
57. HUANG, C., XIONG, C., KORNFELD, K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci.* [interaktyvus]. 2004, 101(21), 8084-8089 [žiūrėta 2018-03-05]. Prieiga per: doi:10.1073/pnas.0400848101.
58. STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* [interaktyvus]. 2006 (1999), 1-11 [žiūrėta 2018-03-05]. Prieiga per: doi:10.1895/wormbook.1.101.1.
59. COLLINS, JJ., EVASON, K., KORNFELD, K. Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol.* [interaktyvus]. 2006, 41(10), 1032-1039 [žiūrėta 2018-03-06]. Prieiga per: doi:10.1016/j.exger.2006.06.038.
60. DRIVER, C., GEORGEOU, A. Variable effects of vitamin E on *Drosophila* longevity. *Biogerontology* [interaktyvus]. 2003, 4(2), 91-95 [žiūrėta 2018-03-06]. Prieiga per: doi:5115366 [pii].
61. HARRINGTON, LA., HARLEY, CB. Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* [interaktyvus]. 1988, 43(1), 71-78 [žiūrėta 2018-03-06]. Prieiga per: doi:10.1016/0047-6374(88)90098-X.
62. KEANEY, M., MATTHIJSENS, F., SHARPE, M., VANFLETEREN, J., GEMS, D. Superoxide dismutase mimetics elevate superoxide dismutase activity in vivo but do not retard aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med.* [interaktyvus]. 2004, 37(2), 239-250 [žiūrėta 2018-03-06]. Prieiga per: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.005.

63. ISHII, N., SENOO-MATSUDA, N., MIYAKE, K., et al. Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress. *Mech Ageing Dev.* [interaktyvus]. 2004, 125(1), 41-46 [žiūrėta 2018-03-09]. Prieiga per: doi:10.1016/j.mad.2003.10.002.
64. WILSON, MA., SHUKITT-HALE, B., KALT, W., INGRAM, DK., JOSEPH, JA., WOLKOW, CA. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* [interaktyvus]. 2006, 5(1), 59-68 [žiūrėta 2018-03-09]. Prieiga per: doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00192.x.
65. WU, Z., SMITH, JV., PARAMASIVAM, V., et al. Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* [interaktyvus]. 2002, 48(6), 725-731 [žiūrėta 2018-03-09]. ISSN 0145-5680. Prieiga per MEDLINE.
66. AMIGONI, L., STUKNYTĖ, M., CIARAMELLI, C., et al. Green coffee extract enhances oxidative stress resistance and delays aging in *Caenorhabditis elegans*. *J Funct Foods* [interaktyvus]. 2017, 33, 297-306 [žiūrėta 2018-03-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jff.2017.03.056.
67. SHANMUGAM, G., MOHANKUMAR, A., KALAISELVI, D., et al. Diosgenin a phytosterol substitute for cholesterol, prolongs the lifespan and mitigates glucose toxicity via DAF-16/FOXO and GST-4 in *Caenorhabditis elegans*. *Biomed Pharmacother* [interaktyvus]. 2017, 95, 1693-1703 [žiūrėta 2018-03-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.biopha.2017.09.096.
68. SANGHA, JS., FAN, D., BANSKOTA, AH., et al. Bioactive components of the edible strain of red alga, *Chondrus crispus*, enhance oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Funct Foods* [interaktyvus]. 2013, 5(3), 1180-1190 [žiūrėta 2018-03-16]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jff.2013.04.001.
69. OECD. Skin Absorption: in vitro Method. *Test* [interaktyvus]. 2004, (April), 1-8 [žiūrėta 2018-03-16]. Prieiga per: doi:10.1787/9789264071087-en.
70. MOSER, K., KRIWET, K., NAIK, A., KALIA, YN., GUY, RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Pharm Biopharm.* [interaktyvus]. 2001, 52(2), 103-112 [žiūrėta 2018-03-16]. Prieiga per: doi:10.1016/S0939-6411(01)00166-7.
71. BRONAUGH, RL., STEWART, RF. Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. *J Pharm Sci.* [interaktyvus]. 1985, 74(1), 64-67 [žiūrėta 2018-03-16]. Prieiga per: doi:10.1002/jps.2600740117.
72. DŪDONIS, P. Raudonųjų dobilų ekstrakto įterpimas į gelius ir bigelius bei jų biofarmacinis vertinimas [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2018-04-18]. prieiga per: <http://repository.lsmuni.lt/handle/1/33723>.

73. GOMES, A., FERNANDES, E., LIMA, JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* [interaktyvus]. 2005, 65(2-3), 45-80 [žiūrėta 2018-05-29]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003.
74. HUANG, ZR., HUNG, CF., LIN, YK., FANG, JY. In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. *Int J Pharm.* [interkatyvus]. 2008, 364(1), 36-44 [žiūrėta 2018-04-18]. Prieiga per: doi:10.1016/j.ijpharm.2008.08.002.
75. LIM, TG., KIM, JE., JUNG, SK., et al. MLK3 is a direct target of biochanin A, which plays a role in solar UV-induced COX-2 expression in human keratinocytes. *Biochem Pharmacol.* [interaktyvus]. 2013, 86(7), 896-903 [žiūrėta 2018-04-18]. Prieiga per: doi:10.1016/j.bcp.2013.08.002.
76. RUCINSKA, A., ROSZCZYK, M., GABRYELAK, T. Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells. *Cell Biol Int.* [interaktyvus]. 2008, 32(8), 1019-1023 [žiūrėta 2018-04-18]. Prieiga per: doi:10.1016/j.cellbi.2008.04.004.
77. SCHLERNITZAUER, A., OIRY, C., HAMAD, R., et al. Chicoric acid is an antioxidant molecule that stimulates AMP kinase pathway in L6 myotubes and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* [interaktyvus]. 2013, 8(11) [žiūrėta 2018-04-18]. Prieiga per: doi:10.1371/journal.pone.0078788.

PUBLIKACIJOS DARBO TEMA

1. „11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology“, stendinis pranešimas tema: Analysis of Red Clover Extract and Niosomes Penetration into Human Skin *ex vivo* and Effects *in vitro*. M. Bernatavičiūtė, V. Čižinauskas, V. Briedis. Granada, Ispanija, 2018.
2. „4th International Health Sciences Conference“ žodinis pranešimas tema: Analysis of Red Clover Extract and Niosomal Formulation Cytotoxic and Antioxidative Effects *in vitro*. M. Bernatavičiūtė, V. Čižinauskas, V. Briedis. Kaunas, Lietuva, 2018.

PADĖKA

Už suteiktas kokybiškas darbo sąlygas, įvairiapusę pagalbą ir materialinę bazę rengiant baigiamąjį projektą nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui prof. dr. Vitaliui Briedžiui.

Už pagalbą bei patarimus atliekant mokslinius tyrimus dėkoju LSMU Klinikinės farmacijos katedros doktorantui Vyčiui Čižinauskui ir visam Klinikinės farmacijos katedros kolektyvui.

Dėkoju Monpeljė universiteto darbuotojams prof. dr. Simon Galas ir dr. Myriam Richaud už galimybę naudotis materialine baze, pagalbą ir palaikymą atliekant tyrimus naudojant *C.elegans* modelį taip pat LSMU Neuromokslų institutui už sėkmingą bendradarbiavimą atliekant tyrimus su ląstelių kultūromis.

Dėkoju įmonei Linnea SA už tyrimams skirtą raudonųjų dobilų ekstraktą ir nanonešiklių formuluotę bei finansinę paramą dalyvaujant tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology“ (2018, Granada, Ispanija).