



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Agnė Jonelytė

**PAPRASTOSIOS JONAŽOLĖS (*HYPERICUM PERFORATUM* L.)
KALIAUS KULTŪRŲ AUGINIMO *IN VITRO* OPTIMIZAVIMAS,
ANTIOKSIDACINIO IR ANTIBAKTERINIO AKTYVUMO BEI
ANTRINIŲ METABOLITŲ ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**PAPRASTOSIOS JONAŽOLĖS (*HYPERICUM PERFORATUM* L.)
KALIAUS KULTŪRŲ AUGINIMO *IN VITRO* OPTIMIZAVIMAS,
ANTIOKSIDACINIO IR ANTIBAKTERINIO AKTYVUMO BEI
ANTRINIŲ METABOLITŲ ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

Vadovė
Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Recenzentė
dr. Ingrida Tumosienė

Projektą atliko
Agnė Jonelytė

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

(Fakultetas)

Agnė Jonelytė

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Paprastosios jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų auginimo *in vitro* optimizavimas, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo bei antrinių metabolitų įvertinimas“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2018-06-01

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Agnės Jonelytės**, Projektas tema „Paprastosios jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų auginimo *in vitro* optimizavimas, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo bei antrinių metabolitų įvertinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	6
SUMMARY	7
SANTRUMPOS	8
IŽANGA	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Paprastosios jonažolės charakteristika	10
1.2. Paprastosios jonažolės panaudojimas	11
1.3. Galimi šalutiniai poveikiai	12
1.4. Antriniai metabolitai	12
1.4.1. Naftodiantronai	13
1.4.2. Florogliucinoliai	14
1.4.3. Fenoliniai junginiai	15
1.4.4. Karotinoidai	15
1.5. Paprastosios jonažolės antioksidacinis poveikis	16
1.6. Paprastosios jonažolės antibakterinis poveikis	17
1.7. Paprastosios jonažolės <i>in vitro</i> ląstelių kultūros	18
1.7.1. Elicitavimas	19
1.7.2. Bendras elicitorių veikimo mechanizmas	20
1.8. Ateities perspektyvos	21
1.9. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	22
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	23
2.1. Tyrimuose naudotos įrangos sąrašas	23
2.2. Sėklų sterilinimas	23
2.3. Augimo reguliatorių paruošimas	23
2.4. Maitinimo terpių paruošimas	24
2.5. Paprastosios jonažolės antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	25
2.5.1. Antioksidacinio aktyvumo prieš DPPH įvertinimas	25
2.5.2. Redukcinių savybių įvertinimas	26
2.5.3. FRAP metodas naudojant TPTZ	27
2.6. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų nustatymas	28
2.7. Bendras fenolinių junginių nustatymas naudojant Folino-Kiokalto metodą	28

2.8. Flavonoidų kiekybinis nustatymas	30
2.9. Antibakterinis aktyvumas prieš <i>Escherichia coli</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i> ir <i>Xanthomonas campestris</i>	31
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	33
3.1. Antioksidacinių tyrimų įvertinimas	35
3.1.1. Salicilo rūgšties poveikis paprastosios jonažolės antioksidacinėms savybėms	35
3.1.2. Gamborg B ₅ ir kinetino poveikis paprastosios jonažolės antioksidacinėms savybėms	37
3.1.3. Metilžasmonato poveikis jonažolės antioksidacinėms savybėms	38
3.1.4. Manitolio poveikis jonažolės antioksidacinėms savybėms	40
3.2. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų įvertinimas.....	41
3.3. Fenolinių junginių įvertinimas.....	44
3.4. Flavonoidų nustatymas	46
3.5. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas	46
4. REKOMENDACIJŲ DALIS	50
IŠVADOS	53
LITERATŪROS SĄRAŠAS	54
PRIEDAI	60
1 priedas.....	60

Jonelytė, Agnė. Paprastosios jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų auginimo *in vitro* optimizavimas, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo bei antrinių metabolitų įvertinimas. *Magistro* projektas / vadovas doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijų mokslai, Biotechnologijos

Reikšminiai žodžiai: *in vitro*, optimizavimas, paprastoji jonažolė, kaliaus kultūros, antioksidacinis, antibakterinis

Kaunas, 2018. 60 p.

SANTRAUKA

Paprastoji jonažolė (*Hypericum perforatum* L.) nuo seno yra viena iš populiariausių vaistažolių, pasižyminti antidepresinėmis, priešuždegiminėmis, antioksidacinėmis ir antibakterinėmis savybėmis. Tokį platų jos panaudojimą lemia jonažolės sintetiniai antriniai metabolitai. Norint užtikrinti pastovią ir kokybišką antrinių metabolitų sintezę reikia optimizuoti *in vitro* kaliaus kultūrų augimą. Efektyviausias metodas tai padaryti yra elicitavimas. Naudojant elicitorius bei augalų augimą skatinančius hormonus yra bandoma padidinti kaliaus prieaugį bei norimų pirminių ar antrinių metabolitų koncentracijas jonažolėje.

Tyrimo metu buvo paruošta 14 terpių, kurios skyrėsi savo hormonų bei elicitorių sudėtimi ir koncentracija. Jose augusių *in vitro* jonažolių savybės buvo lyginamos su *in vivo* jonažolės aktyvumu. Iš rezultatų buvo galima matyti, kad geriausiai kaliaus kultūros formavosi iš paprastosios jonažolės šaknų. Tai efektyviausiai vyko MS terpėje su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) hormonais. Toje pačioje terpėje buvo ir didžiausias kaliaus kultūrų vidutinis prieaugis. Antioksidacinis *in vitro* jonažolės aktyvumas skyrėsi tarp naudotų metodų: DPPH metodo metu didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo jonažolė, augusi MS terpėje su manitolium (10 g/l), naudojant FRAP metodą efektyviausia buvo MS terpė su salicilo rūgštimi (150 μmol/l), o redukcinis metodas parodė, kad geriausia MS terpė jonažolės antioksidacinėms savybėms skatinti buvo su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) hormonais. Daugiausiai fenolinių junginių sintetino jonažolė, augusi terpėje su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) hormonais. Karotinoidų ir chlorofilo sintezė labiausiai buvo skatinama jonažolėje, augusioje terpėje su 5 g/l manitolio. Geriausiomis antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo jonažolė, augusi MS terpėje su manitolium (10 g/l).

Jonelytė, Agnė. *Optimization of St. John's Wort (Hypericum perforatum L.) Callus Culture Growth In Vitro, Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activity and Secondary Metabolites: Master's thesis in Industrial Biotechnology / supervisor assoc. doc. dr. Ilona Jonuškienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Research area and field: Technological sciences, Biotechnology

Key words: *in vitro*, optimization, St. John's Wort, callus cultures, antioxidation, antibacterial

Kaunas, 2018. 60 p.

SUMMARY

St. John's Wort is a popular medicinal herb known for its antidepressant, anti-inflammatory, antioxidative and antimicrobial effect. This wide range of use is due to its large selection of secondary metabolites. To assure a constant and qualitative secondary metabolite synthesis, optimization of *in vitro* callus culture growth is necessary. The most efficient method for this is elicitation. Elicitors and plant growth hormones are used to quantify wanted primary and secondary metabolite concentrations in St. John's Wort.

14 media with different growth hormones and elicitors in different concentrations were prepared for this assay. The efficiency of *in vitro* St. John's Wort plant, grown in these media was compared with *in vivo* plant activity. The results showed that St. John's Wort roots were the most efficient part of the plant for callus culture formation. The best medium for that was MS with (2.5 mg/l) + NAR (0.5 mg/l) hormones. The biggest callus culture mass growth was noticed in the same medium. Antioxidative activity of *in vitro* St. John's Wort plants was different between three methods used: the best antioxidants, by using DPPH method, were plants grown in MS medium with mannitol (10 g/l). Using FRAP method the most efficient medium was MS with salicylic acid (150 μ mol/l) and adapting the reduction method, results showed that the best medium for enhancing St. John's Wort antioxidant properties was MS with 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0.2 mg/l) hormones. Plants grown in MS medium with BAP (2.5 mg/l) + NAR (0.5 mg/l) hormones were shown to have the biggest concentrations of phenolic compounds. Plants, grown in MS medium with 5 g/l of mannitol, were the most efficient in inducing carotenoid and chlorophyll synthesis. The best antimicrobial activity was noticed in plants grown in MS medium with mannitol (10 g/l).

SANTRUMPOS

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

BAP – 6-benzilaminopurinas

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas

FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia

LB – Luria-Bertani terpė

MS – Murashige ir Skoogterpė

NAR – 1-naftilacto rūgštis

ROS – reaktyvios deguonies formos

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas

IŽANGA

Medicinos pramonė nuolat tobulėja ir plečiasi, todėl yra ieškoma ne tik naujų cheminių medžiagų sintezės ir panaudojimo būdų, bet ir plačiau tiriami jau seniai žinomi ir taikomi natūralūs metodai bei preparatai, siekiant geriau juos suprasti ir efektyviau panaudoti vis didėjančiam šiuolaikiniam susidomėjimui bei paklausai. Liaudies medicinos augalai jau seniai taikomi įvairiems nusiskundimams gydyti. Viena populiariausių bei geriausiai žinomų vaistažolių yra *Hypericum perforatum* L., geriau žinoma kaip paprastoji jonažolė. Ji plačiai naudojama įvairioms žaizdoms, skausmui bei neurologiniams sutrikimams gydyti [1]. Paprastoji jonažolė nuo seno kėlė susidomėjimą dėl savo antidepresinių savybių [2], o dabar didelis dėmesys yra skiriamas jos antibakterinėms [3] ir antioksidacinėms savybėms [4].

Tokį platų jonažolės panaudojimą lemia gausi jos sintetinamų antrinių metabolitų įvairovė. Pagrindiniais antriniais metabolitais yra laikomi naftodiantroni, florogliucinoliai bei flavonoidai. Jie yra ne tik atsakingi už jonažolės vaistines savybes, bet kartu veikia ir kaip augalo apsaugos mechanizmas nuo herbicidų, vabzdžių ar žolėdžių [5].

Atsiradus dideliame susidomėjimui ir poreikiui, atsirado ir atitinkami standartai bei pageidavimai. Natūraliai gamtoje auganti jonažolė ne visada pasižymi pastovia ir pakankama norimų aktyvių medžiagų gamyba. Taip pat nepatogumų sukelia ir ilgas augimo periodas bei augalo sezoniškumas, todėl norint optimizuoti jonažolės efektyvumą, neatsilikant nuo rinkos reikalavimų, yra ieškoma biotechnologinių antrinių metabolitų gavimo būdų naudojant augalų ląstelių bei organų kultūras. Tokia *in vitro* strategija leidžia bet kada ir bet kur atlikti norimus tyrimus bei užtikrina pastovią ir patikimą metabolitų sintezę [1].

Tyrimo tikslas – optimizuoti paprastosios jonažolės (*H. perforatum* L.) kaliaus kultūrų auginimą *in vitro* ir įvertinti jos antioksidacines, antibakterines savybes bei antrinius metabolitus.

Tyrimo uždaviniai:

1. suformuoti ir optimizuoti paprastosios jonažolės kaliaus kultūras *in vitro*;
2. įvertinti paprastosios jonažolės kaliaus kultūrų antioksidacinį aktyvumą remiantis DPPH, FRAP bei redukciniu metodais bei palyginti jį su *in vivo* jonažolės antioksidaciniu aktyvumu;
3. įvertinti paprastosios jonažolės *in vivo* ir *in vitro* chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų kieki;
4. nustatyti paprastosios jonažolės *in vivo* ir *in vitro* fenolinių junginių kieki;
5. įvertinti paprastosios jonažolės *in vivo* ir *in vitro* antibakterines savybes;
6. pateikti flavonoidų išskyrimo aparatūrinę schemą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Paprastosios jonažolės charakteristika

Jonažolė pagal pasaulinę klasifikaciją priklauso *Magnoliophyta* skyriui, *Magnoliopsida* klasei, *Dilleniidae* poklasiui, *Theales* eilei, *Clusiaceae* šeimai, *Hypericum* genčiai [6]. Galima išskirti apie 450 rūšių augalų. Didžioji dalis jonažolės genties atstovų priklauso *herbaceous perennials* augalų grupei – tai daugiamečiai augalai, kurie žydi kiekvieną pavasarį ir vasarą, o rudenį ir žiemą numeta lapus iki kito sezono. Pasitaiko ir vienmečių rūšių. Šis augalas yra kilęs iš Europos ir Azijos, tačiau dabar yra paplitęs ir kituose pasaulio regionuose, kur dažnai yra laikomas agresyvia piktžole. Jonažolė dažniausiai auga saulėtuose pakalnėse, sausose pievose ir laukuose, miškų proskynose, pakelėse ir panašiuose arealuose [7].

Viena iš labiausiai paplitusių ir geriausiai žinomų jonažolės rūšių yra paprastoji jonažolė – *H. perforatum* L. Tiesus jos stiebas yra dvibriaunis ir siekia iki 1 m aukščio. Jos lapai yra bekočiai, siauri, ovalios formos, išsidėstę vienas priešais kitą. Žiedas sudarytas iš penkių geltonos spalvos žiedlapių [7] (žr. 1.1 pav.).



1.1 pav. Paprastoji jonažolė (*Hypericum perforatum* L.)

H. perforatum yra labai įvairi rūšis. Yra atpažįstami bent trys porūšiai atsižvelgiant į jų lapų morfologiją ir nors dažniausiai šis augalas yra tetraploidas, yra žinomi ir skirtingą chromosomų skaičių turintys augalai. Nelytiškai besidauginantys individai gali būti tetraploidai, heksaploidai, diploidai ir aneuploidai [7]. Toks chromosomų skaičiaus nepastovumas susijęs su specifiniu dauginimosi būdu – tarprūšine hibridizacija ir fakultatyvine apomikse – dauginimosi būdu be gametų susiliejimo, kada susidaro sėklos. Palikuonys gauti apomiksės būdu yra tiksli

motininio augalo kopija [8]. Manoma, kad paprastoji jonažolė kilo susikryžminus diploidams *H. maculatum* Crantz ir *H. attenuatum* L [9].

Jonažolėms būdingos įvairios sekrecinės struktūros kaip tamsiosios ir permatomosios liaukos bei įvairūs sekreciniai kanalai. Tamsiosios liaukos matomos kaip juodi ar tamsiai raudoni daugialąsteliniai mazgeliai, kuriuos galima pamatyti ant lapų kraštų, stiebo, žiedlapių ir kuokelio. Šie mazgeliai susideda iš didelių ląstelių branduolio, apsupto keliais sluoksniais riebalinių ląstelių. Kai kuriose žiedo vietose tamsiosios liaukos gali formuoti pailgus tamsius kanalus. Dėl permatomų liaukų paprastosios jonažolės lapai atrodo lyg subadyti. Iš to ir kilęs jonažolės lotyniškas pavadinimas (*perforatum* – skylėtas). Permatomosios liaukos randamos taurėlapuose ir žiedlapiuose taip pat ir lapuose, kur jie yra išsimėtę per visą lapo laminą [7].

1.2. Paprastosios jonažolės panaudojimas

Paprastoji jonažolė yra tradicinės medicinos augalas, kuris jau kelis šimtmečius naudojamas liaudies medicinoje įvairiems nusiskundimams gydyti. Tai yra viena iš dažniausiai skiriamų ir labiausiai tyrinėjamų medicininių augalų rūšių [7].

Šiais laikais paprastoji jonažolė yra ekonomiškai svarbiausias natūralus antidepresantų šaltinis. Ji efektyviai naudojama ne tik lengvos ir vidutinės, bet ir pradedamas tirti jų poveikis gydant sunkias depresijos formas [10, 11]. Tai viena iš pagrindinių šio augalo savybių, kuri nulėmė jo ekonominę svarbą bei populiarumą vaistažolių pramonėje. Gydimui yra vartojami jonažolės alkoholiniai ekstraktai iš žydinčio augalo antžeminės dalies. Keli atlikti tyrimai parodė, kad jonažolės ekstraktai yra tokie pat efektyvūs kaip ir sintetiniai antidepresantai, bet turi mažiau šalutinių poveikių [11].

Ši vaistažolė taip pat pasižymi priešūždegiminėmis, antioksidacinėmis, diuretinėmis, raminamomis bei žaizdas gydančiomis savybėmis [12]. Ji naudojama gydant egzemą, virškinimo trakto sutrikimus, periferinių nervų skausmus bei neurologinius sutrikimus ir traumas, kaip nerimą, per didelį jaudrumą, menopauzinę neurozę bei sezoninius sutrikimus [2]. Jonažolės priešūždegiminiai, antivirusiniai, antibakteriniai bei priešnavikiniai poveikiai yra atidžiai tyrinėjami [13, 14] ir yra siūloma ją naudoti priklausomybei nuo alkoholio gydyti [15].

1.3. Galimi šalutiniai poveikiai

Nors paprastosios jonažolės ekstraktai yra toleruojami pakankamai gerai, dažniausiai pasireiškiantys šalutiniai poveikiai yra pykinimas, išbėrimas bei jautrumas šviesai [16]. Tai ypač pastebima gyvuliuose, kurie buvo maitinami dideliais jonažolės kiekiais. Paveikus tokius gyvulius ryškia saulės šviesa ant jų odos atsiranda į nudegimines žaizdeles panašios pūslelės bei pradeda reikštis psichomotoriniai sujaudinimai. Yra užfiksuoti keli ekstremalūs atvejai, kada gyvuliams išsivystė sunki hemolizė, epilepsija ir netgi ištiko mirtis.

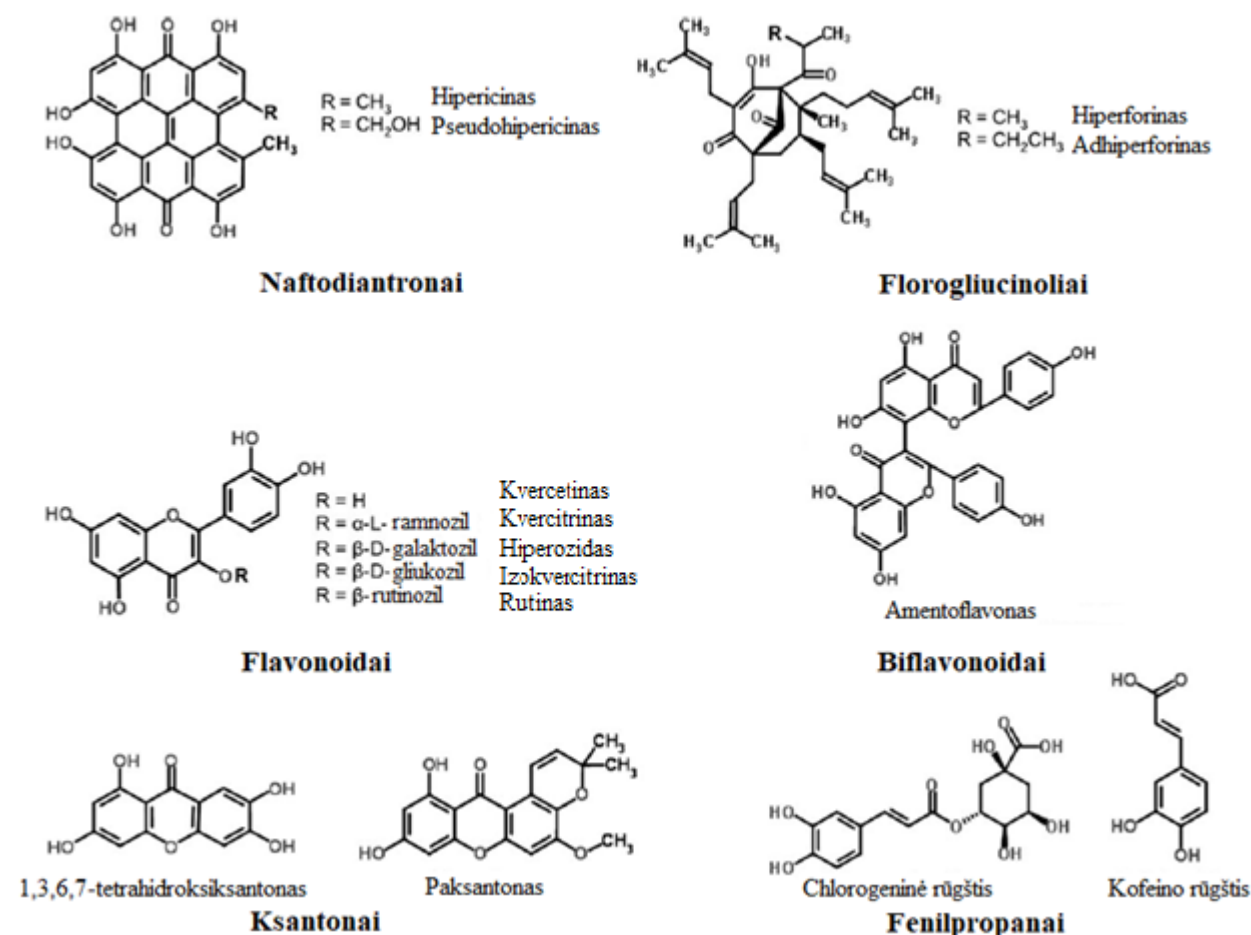
Žmonėms šie simptomai pasireiškia žymiai rečiau. Yra žinomi keli atvejai, kada dėl jonažolių ekstrakto ar žolelių arbatos perdozavimo išsivystė padidėjęs jautrumas šviesai, fotodermatitas bei pastovus odos niežulys apšviestoje vietoje, tačiau šie simptomai išnyko nutraukus vaistažolės vartojimą. Pagal atliktus tyrimus tiek su gyvūnais, tiek su žmonėmis buvo nustatyta, kad reikėtų 30±50 kartų didesnės nei rekomenduojama *Hypericum* dozės, kad žmogui išsivystytų sunkios fototoksinės reakcijos. Taip pat šios komplikacijos gali būti išvengiamos pacientą nors savaitę saugant nuo visų ultravioletinių spindulių [17].

Kitas nepageidaujamas šios vaistažolės poveikis yra jų polinkis reaguoti su kitais medikamentais, kas gali pakeisti tiek pačios jonažolės tiek ir kito naudojamo vaisto efektyvumą bei poveikį organizmui. Tai tikriausiai yra susiję su *H. perforatum* citochromo P450 izofermentų indukcija, kas lemia plazmos koncentracijos ir pačio medikamento efektyvumo sumažėjimą. Tokia jonažolės ekstraktų sąveika buvo pastebėta su per burną vartojamais antikoaguliantais (varfarinu), kontraceptikais (etinilestradioliu, desogestreliau), širdies glikozidais (digoksinu), imunosupresoriais (ciklosporinu), proteazių inhibitoriais (indinaviru), broncholitikais ir vaistais nuo kosulio, bei antidepresantais (amitriptilinu, nortriptilinu, nefazodonu, paroksetinu, sertraliniu). Todėl paprastosios jonažolės nerekomenduojama naudoti su šiais bei kitais tuo pačiu būdu metabolizuojamais vaistais [18].

1.4. Antriniai metabolitai

Augalai gamina daug medžiagų, kurios nėra tiesiogiai reikalingos jų augimui ir vystymuisi, tačiau turi svarbų vaidmenį jų išlikimui ir prisitaikymui prie aplinkos. Šie antriniai metabolitai pasižymi įvairiomis biologinėmis savybėmis ir turi didelį potencialą ir platų pritaikymą tiek chemijos, tiek vaistų pramonėje kaip medikamentai, agrochemikalai, biopesticidai, maisto papildai, skonio, spalvos, kvapo priedai [5].

Paprastoji jonažolė turi didelę įvairovę biologiškai aktyvių antrinių metabolitų, kurie priklauso skirtingoms cheminėms grupėms. Alkoholiniai antžeminės jonažolės dalies ekstraktai (60 % etanolio arba 80 % metanolio) turi 6 plačias natūralių produktų grupes: naftodiantronus, florigliucinolius, flavonoidus, biflavonus, fenilpropanus ir ksantonus (žr. 1.2 pav.). Taip pat buvo nustatyti maži kiekiai taninų, eterinių aliejų bei aminorūgščių. Pagrindiniais aktyviais antriniais junginiais yra laikomi florigliucinoliai (hiperforinas), naftodiantroni (hipericinas) ir flavonoidai. Cheminės sudėtinės dalys daugiausiai kaupiasi jonažolės žieduose [3].



1.2 pav. Pagrindinės *H. perforatum* L. randamos antrinių metabolitų grupės

1.4.1. Naftodiantroni

Naftodiantroni yra *Hypericum* genčiai būdinga ryškiai raudonos spalvos junginių grupė, pasižyminti fototoksinėmis savybėmis. Šios junginių grupės didžiąją dalį sudaro hipericini, tačiau pagrindinis naftodiantronas randamas jonažolėje yra pseudohipericinas – hipericino pirmtakas. Priklausomai nuo augalo, jo randama 2–4 kartus daugiau nei hipericino. Taip pat paprastojoje jonažolėje yra aptinkama protohipericino ir jo pirmtako – protopseudohipericino. Didžiausias hipericinų ir pseudohipericinų kiekis yra aptinkamas jonažolės žiedlapiuose ir

kuokeliuose (1–14 %), nemaža dalis randama lapuose (0,03–0,3 %). Šie junginiai kaupiami tamsiosiose liaukinėse augalų struktūrose dėl savo galimo toksiškumo jų audiniams. Augalai jį naudoja kaip apsauginį mechanizmą nuo žolėdžių ir augalinių patogenų. Būtent hipericinas yra atsakingas už jonažolės fototoksines savybes [3, 7]. Dėl savo fotodinamiškumo hipericinas yra naudojamas kaip fluorescuojantis diagnostinis įrankis aptinkant navikines ląsteles [19] ir yra tyrinėjama jo nauda fotodinaminėje terapijoje, naikinant navikus [20]. Pseudohypericinas fototoksinėmis savybėmis nepasižymi.

Naftodiantronai pasižymi ribotu tirpumu beveik visuose tirpikliuose: grynai junginiai, ypač hipericinas, yra beveik netirpūs vandenyje esant kambario temperatūrai. Nepaisant to, daugiau nei 40 % naftodiantronų (apie 35 % pseudohypericinų ir 6 % hipericinų) yra išgaunami iš žalios neapdirbtos vaistažolės ruošiant arbatą su karštu 60–80 °C temperatūros vandeniu. Šis tirpumo padidėjimas leidžia manyti, kad augalinėje medžiagoje yra kofaktorių, kurie reguliuoja naftodiantronų tirpumą. Hipericinų ir pseudohypericinų kalio druskos yra laikomos kaip tirpūs *Hypericum* genties pigmentai [3].

1.4.2. Florogliucinoliai

Pagrindiniai florogliucinoliai randami jonažolėje yra hiperforinai, kurie sudaro apie 2–4,5 % bendro florogliucinolių kiekio, ir jų homologai – adhiperforinai, kurie sudaro apie 0,2–1,9 %. Jų biosintetiniai tarpiniai junginiai yra hiperfirinas ir adhiperfirinas bei jų homologai – sekohiperforinas ir sekoadhiperforinas, kurie taip pat yra aptinkami paprastojoje jonažolėje mažais kiekiais. Didžiausia hiperforinų koncentracija yra aptinkama jonažolių žieduose (6,9 %), ypač piestelėse bei vaisiuose. Nemažos jų koncentracijos aptinkamos lapuose (1,5 %). Jie kaupiami permatomose liaukų ląstelėse, o sintetinami parenchiminėse sekrecinėse ląstelėse. Šių junginių nauda augalui nėra iki galo aiški, kadangi tai yra gana nestabilus junginys, kurio negalima ilgai laikyti šviesoje, aukštoje temperatūroje ar deguonyje, bet manoma, kad jie atlieka apsaugos funkciją nuo žolėdžių bei kitų kenkėjų [3, 7].

Iš farmakologinės pusės hiperforinas yra gana įdomus junginys, nors jo poveikis iki galo nėra išaiškintas. Pats hiperforinas gali slopinti ar bent reguliuoti kelias *in vitro* neurotransmiterių sistemas. Jis yra efektyvus serotonino, dopamino ir noradrenalino įsisavinimo inhibitorius, kurio pusė maksimalios slopinimo koncentracijos vertės yra apie 0,5 mg/l⁻¹ sinaptosominiuose preparatuose. Tai patvirtina jo galimą vaidmenį jonažolės antidepresiniame veikime [3]. Šis junginys yra intensyviai tiriamas kaip naujas priešvėžinis agentas [21]. Hiperforinas taip pat turi antimalerinį aktyvumą ir yra aktyvus prieš *Plasmodium falciparum* [22].

1.4.3. Fenoliniai junginiai

Fenolinius junginius jonažolės bei kiti augalai gamina kaip atsaką į įvairius ekologinius bei fiziologinius veiksnius kaip patogenus, vabzdžių užpuolimus, UV radiaciją ir fizikinius pažeidimus. Fenoliai yra sudaryti iš aromatinio žiedo, turinčio vieną ar kelias hidroksilo grupes. Augalų fenoliniai junginiai yra klasifikuojami į paprastus fenolius ir polifenolius pagal fenolinių grupių kiekį molekulėje, todėl jie apima fenolius, komarinius, ligninus, lignanus, kodensuotus ir hidrolizuojamus taninus, fenolines rūgštis bei flavonoidus. Yra įrodyta, kad didelis fenolinių junginių kiekis žmogaus mityboje mažina riziką susirgti lėtinėmis ligomis, nes jie pasižymi antioksidantinėmis savybėmis ir taip apsaugo ląsteles oksidacinio streso metu [23, 24]. Žinoma nemažai fenolinių junginių, kurių antioksidantinis aktyvumas yra daug didesnis nei kitų gerai žinomų antioksidantų [23].

Flavonoidai yra dažniausiai aptinkami fenoliniai junginiai. Jie yra plačiai pasiskirstę per visus augalo audinius ir dažniausiai kartu su karotinoidais ir chlorofilu yra atsakingi už augalo spalvas [25]. Flavonoidai sudaro didžiąją biologiškai aktyvių paprastosios jonažolės junginių dalį [3]. Norint atlikti flavonoidų ekstrakciją geriausia yra naudoti išdžiovintus, liofilizuotus arba užšaldytus mėginius. Sausi mėginiai yra susmulkinami, o norint užtikrinti vienodą dalelių dydį, susmulkinta žaliava gali būti persijojama norimo dydžio sietu. Poliniai flavonoidai tirpsta alkoholyje arba alkoholio-vandens mišinyje, o mažiau poliniai – chloroforme, dietileteryje, dichlormetane [26].

1.4.4. Karotinoidai

Karotinoidai kartu su fenoliniais junginiais yra atsakingi už augalų raudonas, oranžines ir geltonas spalvas. Šie pigmentai, randami chloroplastų ir chromoplastų membranose. Audiniuose, kuriuose vyksta fotosintezė, karotinoidų spalvos nėra matomos dėl chlorofilo, tačiau vėlesnėse augalo vystymosi stadijose jie prisideda prie ryškių augalo žiedų ir vaisių spalvų susidarymo. Jie taip pat apsaugo fotosintetinančius organizmus nuo žalingų fotooksidacinių procesų [27]. Šių junginių klasė veikia kaip antioksidantai. Jie apsaugo ląstelių membranas bei lipoproteinus nuo laisvųjų radikalų, atsiradusių lipidų peroksidacijos metu, poveikio bei stabdo senėjimo procesą [28].

1.5. Paprastosios jonažolės antioksidacinis poveikis

Reaktyvios deguonies formos (ROS) susidaro dėl įvairių redukcinių procesų, vykstančių aerobinių ląstelių metabolizmo metu. Šios deguonies formos yra pavojingos ląstelėms ir nepašalintos iš organizmo gali pažeisti tokias svarbias molekules kaip baltymus, DNR ir lipidus [29]. Laisvieji radikalai kaip superoksido anijonas (O_2^-) ar vandenilio peroksidas (H_2O_2) gali sukelti ląstelės mirtį [30]. Oksidacinis stresas prisideda prie įvairių pataloginių sutrikimų kaip kardiovaskulinių bei neurologinių ligų, aterosklerozės, uždegimų ir kancerogenezės [4].

Ląstelės turi keletą apsaugos mechanizmų, kurie padeda apsisaugoti nuo ROS žalingo poveikio, tačiau šių endogeninių sistemų dažnai nepakanka visiškai nukenksminti ROS. Tam yra reikalingi tam tikri kiekiai egzogeninių antioksidantų, kurie palaikytų tinkamą balansą tarp antioksidantų ir ROS [31]. Tyrimai parodė, kad augalų ekstraktai ir produktai kaip fenoliniai junginiai bei flavonoidai turi gerą antioksidacinį poveikį [29].

Paprastosios jonažolės etanoliniai ekstraktai turi daug polifenolinių junginių, daugiausia flavonoidų ir fenolinių rūgščių. Tai rodo, kad jonažolė turi geras antioksidacines savybes. Šios vaistažolės produktai, hipericinas ir hiperforinas, yra atsakingi už antidepresines jonažolės savybes. Jie padidina serotonino kiekį, kuris turi apsauginį poveikį prieš oksidacinius neuroninių ląstelių pažeidimus [32]. Šie ekstraktai veikia kaip galimas agentas neuronų apsaugai nuo oksidacinio streso, sukkelto vandenilio peroksido, žmogaus neuroblastomos ląstelių linijoje SK-N-MC [33].

Susidomėjimas natūraliais antioksidantais nuolat didėja dėl sintetinių antioksidantų pašalinio poveikio. Augalų ekstraktų antioksidacinės savybės negali būti iki galo įvertintos naudojant vieną tyrimo metodą dėl sudėtingos fitochemikalų prigimties, todėl norint gauti tikslesnius rezultatus reikia atlikti keletą aktyvumo tyrimų [34].

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas) yra stabilus radikalas dažnai naudojamas antioksidaciniam aktyvumui nustatyti. Šiam laisvajam radikalui būdinga absorbcija ties 517 nm bangos ilgiu (violetinė spalva). Ji sumažėja kada radikalas yra paveikiamas radikalų „gautytojais“ ir spalva pasikeičia į gelsvą. Reakcijos metu antioksidantas atiduoda vandenilį, kuris pereina prie DPPH. Kuo absorbcija pasidaro mažesnė, tuo radikalų „gautytojų“ aktyvumas yra didesnis. Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas įvertinamas matuojant kiek procentų stabilaus DPPH radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai. Laisvasis DPPH radikalas nereikalauja jokio specialaus paruošimo. Jis gali būti ištirpinamas tik organiniuose tirpikliuose ir ypač gerai tirpsta etanolyje. Šis metodas pasižymi puikiu atkuriamumu esant atitinkamoms tyrimo sąlygoms ir yra greitas, nebrangus ir paprastas [35].

FRAP (geležies redukcijos antioksidacinė galia) metodas paremtas nespecifine Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) komplekso redukcija į ryškiai mėlyną Fe^{2+} -TPTZ kompleksą esant rūgštinei aplinkai. Absorbcijos padidėjimas ties 593 nm bangos ilgiu rodo gerą augalo antioksidacinį aktyvumą. Rezultatai yra pateikiami kaip Fe^{2+} mg/1 g sausos frakcijos – tai parodo kiek 1 g paprastosios jonažolės gali redukuoti Fe^{3+} . Prieš interpretuojant rezultatus reikia žinoti kelis faktus. Pirma, šis metodas matuoja mėginio gebėjimą dalyvauti vieno elektrono redoksinėse reakcijose. Tai reiškia, kad antioksidantai turintys kitokį veikimo modelį (kaip karotinoidai, kurie veikia kaip radikalų „gaudytojai“) nebus ignoruojami. Antra, šioje reakcijoje reaguos tik vandenyje tirpūs antioksidantai, kadangi tyrimas yra atliekamas vandeniniame tirpale. Trečia, redukcinės galimybės nebūtinai atspindės antioksidacinį aktyvumą, t.y. apsaugos pajėgumą. FRAP metodas yra nebrangus, paprastas, neilgas, o jo rezultatai yra lengvai atkartojami [36].

1.6. Paprastosios jonažolės antibakterinis poveikis

Antibakterinis jonažolės poveikis buvo pastebėtas 1959 ir 1971 metais rusų mokslininkų. Slopinamasis poveikis prieš gram-teigiamas bakterijas buvo priskirtas hiperforinui. Mokslininko C.M. Schempp atliktame tyrime buvo pastebėta, kad naudojant hiperforiną visų gram-teigiamų bakterijų augimas buvo nuslopintas, tačiau jis neturėjo jokio poveikio prieš gram-neigiamas bakterijas. Penicilinui ir meticilinui atspari *Staphylococcus aureus* taip pat buvo jautri hiperforinui [37]. Molochko ir kitų mokslininkų atliktame tyrime buvo nustatyta, kad prieš *S. aureus* ir dar kelias *Staphylococcus* bakterijas geriausiai veikė vandens, alkoholio ir glicerolio jonažolės ekstraktai [38]. Šiuos rezultatus patvirtino ir kitų mokslininkų tyrimai. 2002 metais mokslininkai G.E. Meral ir N.U. Karabay pranešė apie paprastosios jonažolės ekstraktų aktyvumą tiek prieš gram-teigiamas (*S. aureus*, *S. epidermidis* ir *E. faecalis*), tiek prieš gram-neigiamas (*P. aeruginosa*, *E. cloacae* ir *E. coli*) bakterijas, tačiau aktyvumas prieš gram-teigiamas bakterijas buvo didesnis [39, 40].

Daugumoje tyrimų hiperforinas buvo išskiriamas kaip vienintelis aktyvus junginys, atsakingas už paprastosios jonažolės antibakterines savybes. Tačiau buvo pabrėžta, kad jo veikimas buvo pastebimas tik naudojant jį didelėmis koncentracijomis. P. Avato kartu su kitais mokslininkais nustatė, kad geriausiai veikiantys ekstraktai buvo etilacetato sub-ekstraktai, o pagrindiniai junginiai šiame ekstrakto buvo flavonoidai, hipericinai ir hiperforinai [37]. Be jų ksantonai taip pat pasižymi kaip patogenų augimą mažinantys junginiai [41].

1.7. Paprastosios jonažolės *in vitro* ląstelių kultūros

Komeraciniai paprastosios jonažolės preparatai pasižymi nepastoviu bioaktyvių junginių kiekiu bei įvairumu, todėl tai gali sukelti abejonių dėl tokių produktų saugumo bei veiksmingumo. Hipericinų ir hiperforinų kiekis ekstraktuose, paruoštuose iš laukuose ar šiltnamiuose augintų jonažolių, stipriai priklauso nuo daugybės faktorių kaip derliaus nuėmimo laiko, jonažolės kilmės vietos, biotinių ir abiotinių teršalų buvimo bei augalo genetikos. Bioaktyvių junginių kiekiui taip pat įtakos turi įvairūs aplinkos faktoriai kaip CO₂ koncentracija, temperatūra, vandens prieinamumas, azoto bei šviesos kiekiai [7].

In vitro kultūrų auginimo metodas yra alternatyvi jonažolės gamybos strategija, siekiant užtikrinti pageidaujamą natūralių preparatų kiekį bei pastovumą [7]. Šio metodo privalumai yra: a) tai yra patvari ir ekologiška sistema, kuri leidžia išgauti sudėtingas chemines struktūras iš retų ir nykstančių augalų rūšių; b) norimas produktas gali būti auginamas bet kurioje pasaulio vietoje; c) galima užtikrinti aktyvių medžiagų kokybę ir kiekybę; d) jonažolės augimas nebepriklauso nuo geografinių bei ekologinių svyravimų; e) yra garantuojamas neužterštas produktas, kadangi augalo ląstelės nebuvo veikiamos mikroorganizmais, herbicidais, pesticidais ar fungicidais; f) išvengiamas augalo išnykimo pavojus; g) augimo laikas yra sutrumpinamas nuo kelių metų iki kelių savaičių ar mėnesių [5].

Norint pritaikyti *in vitro* ląstelių kultūrų metodus didelio masto antrinių metabolitų gamybai iš pradžių reikia nustatyti kaliaus biomasės gavimo iš labiausiai produktyvių jonažolės genotipų protokolus. Kalius, kuris daugiausiai formuojasi iš kamieninių ląstelių, turi neribotą augimo pajėgumą ir gali sintetinti tokius pačius junginius kaip ir pradinis augalas. Iš jo gautos ląstelių suspensijos iš pradžių yra auginamos mažais kiekiais, o vėliau yra perkeliamos į bioreaktorius. Visuose proceso žingsniuose ląstelių kultūrų laikymo sąlygos bei aplinkos ir fizikiniai faktoriai turi būti optimizuojami, norint pasiekti aukštos kokybės bei efektyvią produkciją. To siekiant reikia tirti naujas terpes, hormonų kombinacijas bei anglies šaltinius [42].

Ekspozicinėje jonažolės ląstelių kultūrų augimo stadijoje dauguma metabolitų yra gaminami labai mažais kiekiais arba visai negaminami, kadangi jų pirminių metabolitų pirmtakai yra reikalingi biomasės formavimui. Antrinių metabolitų gamybos suaktyvinimas yra efektyviausias stacionarioje augimo fazėje, todėl geriausia strategija būtų sukurti dviejų stadijų kultūrą, kada iš pradžių augalo ląstelės būtų laikomos terpėje optimizuotoje biomasės formavimui, o paskui perkeltos į terpę, kuri stimuliuotų antrinių metabolitų gamybą. Šios strategijos privalumas yra tas, kad tai leidžia pridėti elicitorių bei biosintetinių pradinių medžiagų, kurios galėtų maksimizuoti išeią [43, 44].

Svarbių bioaktyvių molekulių gausinimas ir naujų junginių gavimas yra pagrindiniai dabartiniai *H. perforatum* biotechnologijos aspektai. Augalinių ląstelių kultūrų sistemų ir molekulinės biologijos vystymas leido atrasti daugybę būdų kaip pagerinti šių junginių produkcija. Ląstelių linijų atranka, ląstelių imobilizacija, pralaidumo padidinimas, pradinių medžiagų pridėjimas, bioreaktorių inžinerija, sintetinė biologija bei elicitavimas yra vieni iš jų [45].

1.7.1. Elicitavimas

Vienas iš produktyviausių augalų antrinių metabolitų produkcijos metodų yra elicitavimas. Elicitoriai – tai medžiagos ar kiti aplinkos faktoriai, kurie stimuliuoja augalo gynybinį mechanizmą, aktyvuodami signalo perėjimo kaskadą, kuri paveikia genų, atsakingų už antrinių metabolitų biosintezę, ekspresiją. Pagal savo kilmę šie dirgikliai gali būti skirstomi į biotinius – biologinės kilmės, ir abiotinius – nebiologinės kilmės medžiagas, arba tiesiog į biologinius, cheminius ir fizikinius [5, 45]. Dauguma biologinių elicitorių yra mikrobinių ląstelių sienelių dalys (chitinas, chitozanas, gliukanas) ir tokie angliavandeniai kaip poli- ir oligosacharidai, gauti iš augalo ląstelės sienelių (pektinas, pektino rūgštis, celiuliozė) [46]. Į cheminius dirgiklius įeina sunkieji metalai, metalų jonai bei metalų oksidai [47]. Fizikiniai elicitoriai yra šaltinio šokas, UV, ozonas, osmosinis ar vandens stresas [48]. Biotiniai stimulatoriai yra daugiau ištyrinėti ir geriau suprantami. Vykdamas elicitavimą metaboliniai pokyčiai aktyvuoja augalo imuninę sistemą ir paruošia augalą stresui [45].

Elicitavimo metu paprastojoje jonažolėje aktyvinami junginiai daugiau priklauso nuo pasirinktos kultūros nei nuo atrinktų elicitorių. Hipericinų gamybos aktyvinimui dažniausiai naudojamos sodinukų ir ūglių kultūros, tikriausiai dėl to, kad jie turi hipericino mazgelius. Ląstelių suspensijos, kaliuso ir šaknų kultūros daugiausiai yra naudojamos flavonoidų ir ksantonų aktyvavimui. Mažesnę reikšmę elicitavimo efektyvumui turi pats elicitorius, jo koncentracija, inkubacijos sąlygos ir trukmė (žr. 1.1 lentelę) [45].

1.1 lentelė. *H. perforatum* kultūros ir elicitoriai, naudojami antrinių metabolitų gamybai

Kultūros tipas	Elicitorius	Aktyvuojamo junginio gamyba
Ląstelių suspensija	Cinko nano-oksidas	Hipericinas ir hiperforinas
	Chitinas	Fenoliniai junginiai, flavanoliai, hipericinas ir pseudohipericinas
	Žasmonatas	Fenoliniai junginiai, flavanoliai, hipericinas ir pseudohipericinas
	Metilžasmonatas	Flavonoidai
	Salicilo rūgštis	Ksantonai, flavonoidai, hipericinas ir pseudohipericinas
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ksantonai
Kaliumas	Salicilo rūgštis	Hipericinas ir pseudohipericinas
Šaknys	Metilžasmonatas	Hipericinas
	Chitozanas	Ksantonai
Ūgliai	Salicilo rūgštis	Hipericinas ir pseudohipericinas
	Pektinas	Hipericinas ir pseudohipericinas
	Sacharozė + metilžasmonatas	Hipericinas ir hiperforinas
Sodinukai	Chromas	Protopseudohipericinas, hipericinas ir pseudohipericinas
	<i>Rhizophagus intraradices</i>	Hipericinas ir pseudohipericinas

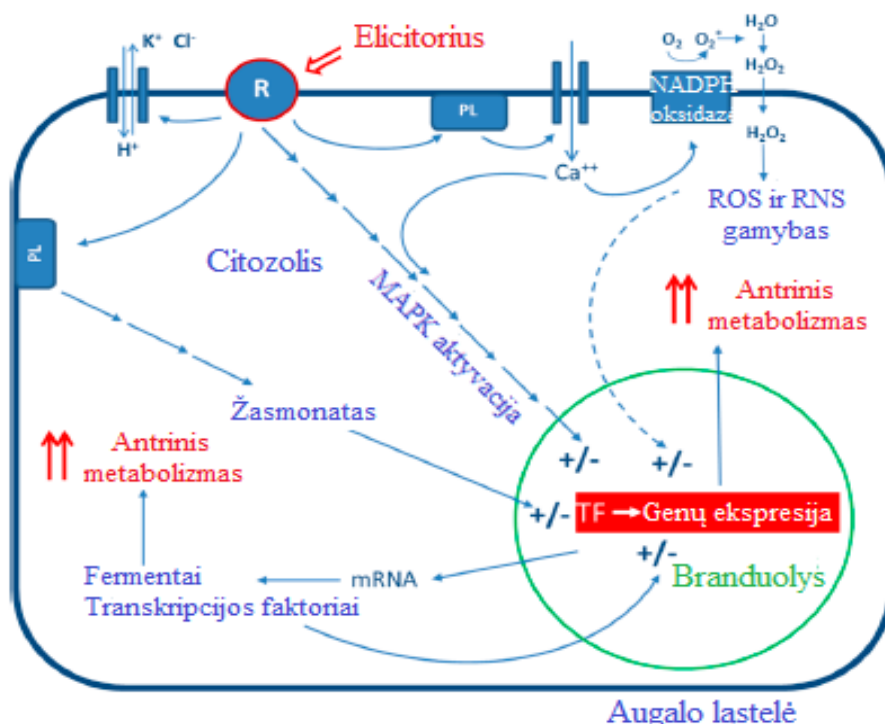
1.7.2. Bendras elicatorių veikimo mechanizmas

Elicitavimo veikimo mechanizmas yra labai sudėtingas, kadangi vienu metu vyksta daugybė persidengiančių reakcijų. Augalo atsakas į dirgiklio sukeltą stresą paprastai prasideda ląstelės plazminėje membranoje, kur yra nustatytos kelios elicitorius surišančios vietos. Jos reaguoja į skirtingų cheminių struktūrų dirgiklius. Šiame žingsnyje yra svarbūs R ir avr genų produktai [49].

Receptorių užfiksuotas elicatorių perdavimo signalas sukelia antrinių signalinių molekulių aktyvavimą, kas sustiprina signalą tolimesniems žingsniams. Toliau seka vienas po kito einantys apsauginio atsako etapai: receptoriaus sureagavimas į elicitorius; grįžtama plazminės membranos ir citozolio baltymų fosforilizacija ir defosforilizacija; citozolinio $[Ca^{2+}]$ padidinimas; Cl^- ir K^+ išsiurbimas ir H^+ įsiurbimas – užląstelinis šarmėjimas ir citoplazminis rūgštėjimas; mitogenu

aktyvuojamo baltymo kinazės (MAPK) aktyvacija; NADPH oksidazės aktyvacija bei reaktyvių deguonies ir azoto formų (ROS ir RNS) gamyba; išankstinio apsauginio geno ekspresija; žasmonanto gamyba; vėlyvo apsauginio geno ekspresija ir galiausiai antrinio metabolito kaupimas (žr. 1.3 pav.). Šis sisteminis augalų atsakas taip pat leidžia gamintis tokiems antimikrobiniais junginiais kaip fitoaleksinams ir su patogenezė susijusiems baltymams, kurie kartu turi svarbų vaidmenį patogeno atmetimui [5, 50].

Taigi elicitorių signalo perdavimas yra iš daug etapų sudarytas tinklas, kuris sukuria efektyvų apsaugos mechanizmą. Šie žingsniai gali vykti vienu metu arba persipinti tarpusavyje [5].



1.3pav. Augalo ląstelės galimas atsakas į elicitavimą. R – receptorius; PL – fosfolipazė; MAPK – mitogenu aktyvuojama baltymo kinazė; ROS – reaktyvios deguonies formos; RNS – reaktyvios azoto formos; TF – transkripcijos faktoriai

1.8. Ateities perspektyvos

Be jau minėtų elicitorių, atsiranda nauja stimuliatorių klasė – nanodalelės. *H. perforatum* atveju tyrimai parodė, kad cinko ir geležies nano-oksidadai stimuliuoja hipericinų ir hiperforinų gamybą ląstelių suspensijų kultūrose [51, 52]. Naudojant metalų daleles kaip elicitorius, tokie signaliniai junginiai kaip žasmonatas, metilžasmonatas ir salicilo rūgštis gali būti įkapsuliuojami į tokius biologiškai skaidomus polimerus kaip nanodalelės. Tai gali būti išnaudojama ilgalaikiui signalinių junginių išleidimui į kultūros terpę, kas gali praversti ilgalaikiai nepertraukiamai antrinių metabolitų gamybai nepaveikiant kultūros augimo. Elicitavimas, kartu naudojant

frakcionavimo pagal bioaktyvumą metodą, taip pat gali būti naudojama naujų vaistų atradime [45].

Nepaisant galimybės skatinti įvairiausių bioaktyvių junginių gamybą paprastosios jonažolės ląstelių ir audinių kultūrose naudojant elicitavimo metodą, pramoninis antrinių metabolitų gamybos farmacinių savybių išnaudojimas yra tikrai pradinėse stadijose. Pagrindinis uždavinys yra pakankamas biomasės kiekio užtikrinimas. Jau yra pradedami naudoti mažo dydžio bioreaktoriai aktyvių junginių gamybai *in vitro* kultūrose. Svarbiausi faktoriai tolimesniam šios srities plėtojimui yra teisingų kultūrų ir egzogeninių signalų parinkimas *in vitro* biomasės gamybai ir optimizavimui [45].

1.9. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Paprastoji jonažolė pasižymi įvairiomis medicininėmis savybėmis, kurios priklauso nuo jos gaminamų antrinių metabolitų. Šie metabolitai taip pat yra atsakingi ir už augalo apsauginį mechanizmą bei prisitaikymą prie aplinkos. Norint neatsilikti nuo rinkos reikalavimų bei standartų yra ieškoma būdų kaip užtikrinti pakankamą kiekį kokybiško produkto. Todėl dažniausiai yra naudojamas elicitavimo metodas, kuris yra pagrįstas jonažolės apsauginio mechanizmo nuo išorinių dirgiklių ir kartu antrinių metabolitų sintezės skatinimu.

Šis tyrimas buvo atliekamas tam, kad būtų optimizuojamos sąlygos *in vitro* jonažolės kaliaus kultūrų formavimui ir tam tikrų metabolitų kaupimui. *In vivo* jonažolė ne visada pasižymi vienodu ir pakankamu aktyvių medžiagų kiekiu bei kokybe, todėl reikia sukurti standartus, kuriuos galima būtų taikyti pramonėje.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Tyrimuose naudotos įrangos sąrašas

Autoklavas „*CertoClav*“

Centrifuga „*Hettich Universal 320R*“

Laminaras „*Telstar BV – 100*“

pH-metras „*WinLab*“

Spektrofotometras „*Shimadzu UV – 1280*“

Svarstyklės „*Shimadzu*“

Termostatas „*Binder*“

Termostatas „*Memmert IN55*“

Termostatuojama vandens vonelė „*Biosan BWT – U*“

Termostatuojamas kratytuvas „*ES – 20*“

2.2. Sėklų sterilinimas

Jonažolės sėklos buvo sterilinamos jas mirkant 5 s 70 % etanolyje ir 20 min 1,5 % NaClOH. Po to jos 3 kartus plautos steriliu distiliuotu vandeniu. Sėklos į petri lėkšteles sodintos laminaro sąlygomis. Laminaras buvo sterilinamas ultravioletiniais spinduliais bei 70 % etanoliu [53].

2.3. Augimo reguliatorių paruošimas

Pradinio tiriamosios medžiagos 0,1 mg/ml tirpalo paruošimas: 10 mg tiriamojo junginio buvo suberta į matavimo kolba ir ištirpinta 2–5 ml distiliuotame vandenyje. Visiškai ištirpus milteliams tirpalas praskiestas iki 100 ml. Reikalingas paimti tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris apskaičiuotas pagal 1 formulę:

$$X = \frac{C_{gal} \times V}{C_{pr}} \quad (1)$$

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

C_{gal} – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;

V – praskiedimo tūris, l;

C_{pr} – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamąja medžiaga, koncentracija, mg/ml.

2.4. Maitinimo terpių paruošimas

Augalų ląstelių kultivavimui yra būtina maitinamoji terpė, optimali temperatūra bei apšvietimas. Kultivuojant augalų ląsteles *in vitro* maitinamoji terpė buvo sudaryta iš makroelementų, mikroelementų, geležies šaltinio, organinių priedų, anglies šaltinio bei augimo hormonų.

Jonažolės sėklų auginimui buvo ruošta Murashige ir Skoog (MS) terpė, kurios sudėtis nurodyta 1 priede. Tai viena plačiausiai naudojamų audinių kultūroms skirtų maitinamųjų terpių. Svarbus jos bruožas – aukštos nitrato, kalio ir amonio jonų koncentracijos. Maitinamoji terpė sterilizuota autoklave 120 °C, esant 0,75–1 atm. slėgiui 15 min.

Ekspimento metu optimali kultivavimo temperatūra buvo 20–22 °C, fotoperiodas – 24 val, MS terpės pH 5,7–5,8. Eksplantai reguliariai perkelti į šviežią maitinamąją terpę kas mėnesį. MS terpės pH reguliuotas su 0,1 N NaOH ir 0,1 N H₂SO₄ [53].

Tyrimui buvo ruošta 14 terpių, kurios tarpusavyje skyrėsi augimo hormonų sudėtimi bei koncentracija.

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

Reagentai	Reagentų kiekiai, reikalingi 1 l terpės
Makroelementai	50 ml
Mikroelementai	5 ml
Fe-EDTA	5 ml
Organiniai priedai	5 ml
Sacharozė	30 g
Agar-agaras	5 g

2.2 lentelė. Tyrimui paruoštų terpių sudėtis

Terpė	Terpės sudėtis
1 terpė	MS + 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) + NAR (0,1 mg/l)
2 terpė	MS + 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) + NAR (0,1 mg/l) + Salicilo rūgštis (50 μmol/l)
3 terpė	MS + 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) + NAR (0,1 mg/l) + Salicilo rūgštis (100 μmol/l)
4 terpė	MS + 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) + NAR (0,1 mg/l) + Salicilo rūgštis (150 μmol/l)
5 terpė	MS + 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l)
6 terpė	Gamborg B5 (3,16 g/l) + 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) + Sacharozė (30 g/l) + Agar-agaras (5 g/l)
7 terpė	MS+ 2,4-D (0,5 mg/l) + Kinetinas (0,5 mg/l)
8 terpė	MS+ 2,4-D (0,25 mg/l) + Kinetinas (1 mg/l)
9 terpė	MS + 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l)
10 terpė	MS + 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) + Metilžasmonatas (50 μmol/l)
11 terpė	MS + 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) + Metilžasmonatas (100 μmol/l)
12 terpė	MS + BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l)
13 terpė	MS + BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) + Manitolis (5 g/l)
14 terpė	MS + BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) + Manitolis (10 g/l)

2.5. Paprastosios jonažolės antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

2.5.1. Antioksidacinio aktyvumo prieš DPPH įvertinimas

Reagentai:

- DPPH etaloninis tirpalas;
- Metanolis

Augalų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas prieš DPPH buvo įvertintas matuojant kiek procentų stabilus DPPH radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai. Reakcijos metu antioksidantas atiduoda vandenilį ir taip išaktyvina laisvuosius radikalus. Susidaro stabilus DPPH-H tipo junginys.

Etaloninio DPPH tirpalo gamyba: metanolyje ištirpinta 0,0024 g DPPH. Ištirpęs mišinys praskiestas tuo pačiu metanoliu iki 100 ml.

Tiriamąo mėginio gamyba: 0,2 g susmulkintos augalinės žaliavos užpiltos 2 ml metanoliu ir centrifuguotos 10 min 9000 aps/min. Į mėgintuvėlį buvo pilta 77 µl surinkto supernatanto bei 3 ml etaloninio DPPH tirpalo ir 15 min laikyta tamsoje.

Palyginamojo mėginio gamyba: Į mėgintuvėlį pilta 77 µl metanolio bei 3 ml etaloninio DPPH tirpalo ir 15 min laikyta tamsoje.

Tiriamąo bei palyginamojo mėginių tirpalai matuoti spektrofotometru 515 nm bangoje. Apskaičiuotos redukcinės mėginio savybės pagal 2 formulę [54]:

$$\frac{A(\text{palyginamasis}) - A(\text{tiriamasis})}{A(\text{palyginamasis})} \times 100 \% \quad (2)$$

A – tiriamąo tirpalo šviesos sugertis

2.5.2. Redukcinių savybių įvertinimas

Reagentai:

- Natrio fosfatinis buferis (0,2 M) (pH = 6,6);
- $K_3[Fe(CN)_6]$ (1 %);
- Trichloracto rūgštis (10 %);
- $FeCl_3$ (0,1 %).

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g išdžiovintos augalinės medžiagos ekstrahuotos 5 ml metanolyje ir inkubuotos 30 min 45 °C. Mėginiai centrifuguoti 5 min 9000 aps/min. Iš supernatanto paruošti kelių koncentracijų tirpalai, kurie vėliau skiesti metanoliu iki 1 ml.

Redukcinių savybių įvertinimas: į paruoštus tiriamuosius tirpalus įpilta 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio ir 1,25 ml 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$. Tirpalai sumaišyti ir inkubuoti 20 min 50 °C vandens vonelėje. Į pašildytus tirpalus pridėta 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties, viskas sumaišyta ir centrifuguota 10 min 9000 aps/min. 1,25 ml viršutinio tirpalo sumaišyta su 1,25 ml distiliuotu vandeniu bei 0,25 ml 0,1 % $FeCl_3$.

Mėginiai matuoti spektrofotometru 700 nm bangoje. Optinis tankis tiesiogiai atspindi tiriamosios medžiagos redukcinį aktyvumą [55].

2.5.3. FRAP metodas naudojant TPTZ

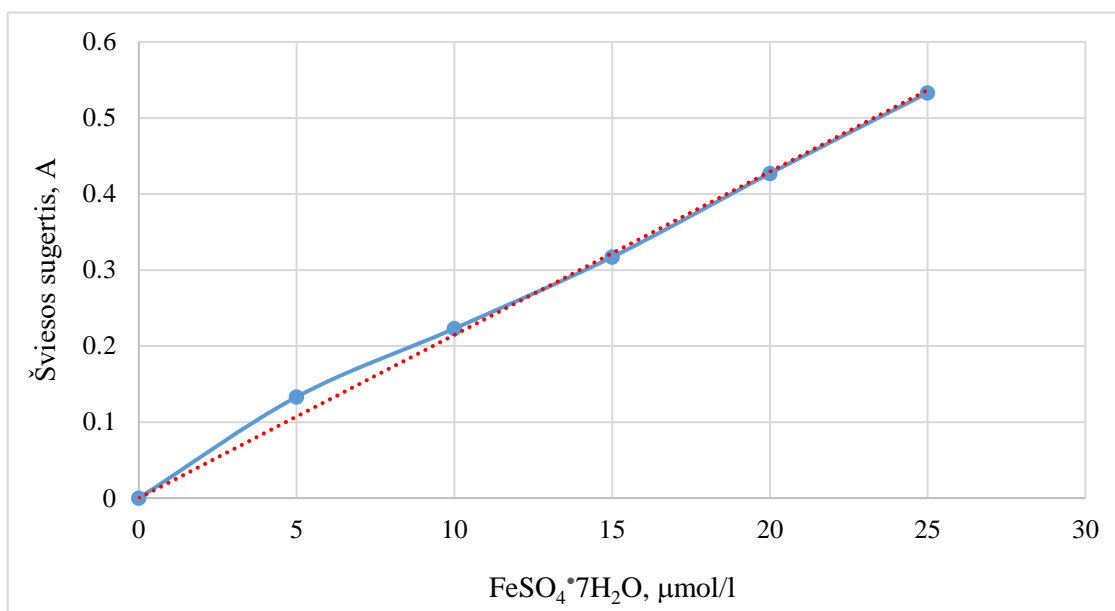
Reagentai:

- Metanolis;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 40 mmol/l HCl;
- 300 mM acetato buferis (pH 3,6);
- 10 mmol/l TPTZ, ištirpintas 40 mmol/l HCl;
- 20 mmol/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- FRAP reagentas ruošiamas iš 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol/l TPTZ ir 2,5 ml 20 mmol/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g augalinės žaliavos ekstrahuota 5 ml metanolyje, inkubuota 30 min. 45 °C ir centrifuguota 10 min 9000 aps/min.

100 μl paruošto ekstrakto mėginiai buvo sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu. Reakcijos mišinys matuotas spektrofotometru 593 nm bangoje. Reikšmė apskaičiuota pagal FRAP kalibracijos kreivę.

Kalibracijos kreivės paruošimas: ruošti 5; 10; 15; 20 ir 25 $\mu\text{mol/l}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tirpalai – atitinkamas kiekis $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sumaišytas su 3 ml FRAP reagentu ir praskiestas su vandeniu iki 10 ml. Tirpalai matuoti spektrofotometru 593 nm bangoje (žr. 2.1 pav.) [56].



2.1 pav. FRAP kalibracinė kreivė

2.6. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas

Reagentai:

- Etanolis (50 %).

Karotinoidų bei chlorofilo *a* ir *b* nustatymas vaistinių augalų audiniuose paremtas šviesos sugerties nustatymu esant atitinkamiems bangos ilgiams.

Ekstrakto paruošimas: grūstuvėje susmulkinta 0,1 g augalinės žaliavos ir užpilta 10 ml etanolio. Viskas sumaišyta iki vientisos masės ir centrifuguota 10 min 9000 aps/min. Ekstrakto tūris išmatuotas cilindru. Optinis tankis matuotas esant 662 nm bangos ilgiui. Jei jis viršijo 0,8 mišinys skiestas etanolio.

Chlorofilas *a* matuotas 662 nm, chlorofilas *b* – 644 nm, o karotinoidai – 441 nm bangose. Pigmentų koncentracijos apskaičiuota pagal formules [57]:

$$C_{\text{(chlorofilas a (mg l}^{-1}\text{))}} = 9,784 \times D_{662} - 0,99 \times D_{644} \quad (3)$$

$$C_{\text{(chlorofilas b (mg l}^{-1}\text{))}} = 21,426 \times D_{644} - 4,65 \times D_{622} \quad (4)$$

$$C_{\text{(chlorofilas a + chlorofilas b)}} = 5,134 \times D_{662} + 20,436 \times D_{644} \quad (5)$$

$$C_{\text{(karotinoidai (mg l}^{-1}\text{))}} = 4,695 \times D_{441} - 0,268 \times C_{\text{(chlorofilas a + chlorofilas b)}} \quad (6)$$

Apskaičiuotas pigmentų kiekis mg/100 ml:

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

C – pigmentų koncentracija, mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g

2.7. Bendras fenolinių junginių nustatymas naudojant Folino-Kiokalto metodą

Reagentai:

- 1 N Folino-Kiokalto reagentas – komercinis 2 N Folino-Kiokalto reagentas sumaišytas su vandeniu 1:1 santykiu;
- Standartinis tanino rūgšties tirpalas 0,1 mg/ml – 0,025 g tanino rūgšties ištirpinta 25 ml vandens. 1 ml tirpalo praskiesta 10 ml vandeniu;

- 20 % natrio karbonatas – 20 g natrio karbonato ištirpinta 100 ml vandenyje;
- 70 % acetonas.

Ekstrakto paruošimas: 0,05 g augalinės žaliavos buvo sumaišyta su 10 ml 70 % acetonu termostatiniame kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Mišinys centrifuguotas 10 min 4 °C 9000 aps/min. Supernatantas laikytas ant ledo.

Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas: 50 ir 100 µl paruošto ekstrakto praskiesta distiliuotu vandeniu iki 500 µl. Pridėta 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Viskas sumaišyta ir laikyta tamsoje 40 min.

Bendras fenolinių junginių kiekis mg/100 mg apskaičiuotas pagal 8 formulę:

$$X = \frac{a \times V \times 100}{n \times V_{sk}} \quad (8)$$

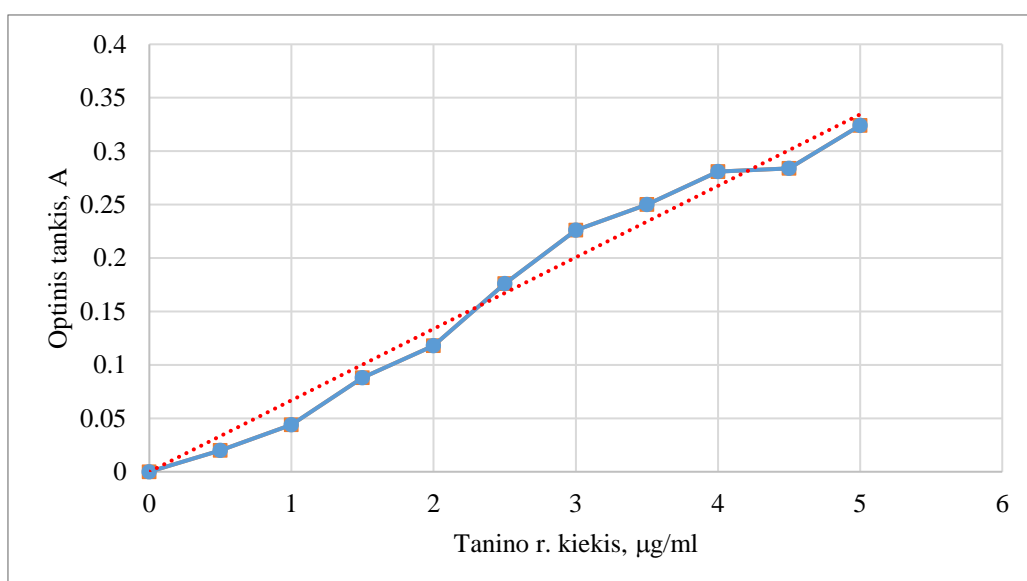
a – tanino rūgšties koncentracija, paimta iš kalibracinės kreivės, mg;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, mg;

V_{sk} – pradinis ekstrakto tūris, paimtas skiedimui, ml

Kalibravimo kreivės paruošimas: paimta 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo. Jis buvo praskiestas su distiliuotu vandeniu iki 500 µl. Į šį tirpalą pridėta 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Viskas sumaišyta ir laikyta tamsoje 40 min. Matuota prieš tuščią mėginį 725 nm bangoje (žr. 2.2 pav.) [58].



2.2 pav. Fenolinių junginių kalibracinė kreivė

2.8. Flavonoidų kiekybinis nustatymas

Reagentai:

- Acetonas;
- HCl (28 %);
- Etilo acetatas;
- Aliuminio chloras (20 g/l);
- Acto rūgštis;
- Metanolis.

Ekstrakto paruošimas: į apvaliadugnę kolbą įdėta 2 g augalinės žaliavos ir užpilta 20 ml acetono bei 2 ml 28 % HCl. Virinta 30 min su grįžtamuju šaldytuvu ant verdančios vandens vonelės. Atvėsęs hidrolizatas filtruotas. Nuosėdos gražintos į kolbą ir vėl užpiltos 20 ml acetono. Virinta 10 min ir filtruota į tą pačią kolbą. Kolboje esantis tirpalas buvo praskiestas acetonu iki 100 ml.

Viršutinės fazės atskyrimas: 20 ml ekstrakto buvo praskiesta 20 ml vandeniu ir ekstrahuota etilo acetatu: 1 kartą 15 ml ir 3 kartus po 10 ml. Atskirtos viršutinė ir apatinė fazės. Sujungtos viršutinės fazės 2 kartus praplautos 40 ml vandeniu. Mišinys filtruotas į kolbą ir skiestas etilo acetatu iki 50 ml.

Tiriamąjį tirpalą paruošimas: į 20 ml pagrindinio tirpalo pilta 2 ml 20 g/l aliuminio chlorido ir praskiesta 1:19 acto rūgšties ir metanolio mišiniu iki 25 ml. Tirpalas laikytas tamsoje 30 min.

Palyginamojo tirpalo paruošimas: 10 ml pagrindinio tirpalo buvo skiesta 1:19 acto rūgšties ir metanolio mišiniu iki 25 ml. Tirpalas laikytas tamsoje 30 min.

Tirpalai kelis kartus matuoti spektrofotometru esant 426 nm bangai.

Flavonoidų kiekis apskaičiuotas pagal 9 formulę [57]:

$$\frac{A \times 1,25}{n} \quad (9)$$

A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis;

n – augalinė masė, g;

1,25 – perskaičiavimo koeficientas hiperozidui.

2.9. Antibakterinis aktyvumas prieš *Escherichia coli*, *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris*

Reagentai:

- DMSO (dimetilsulfoksidas)

Ekstrakto paruošimas: 0,5 g augalinės žaliavos buvo užpilta 5 ml DMSO tirpalu ir centrifuguota 10 min. 9000 aps/min.

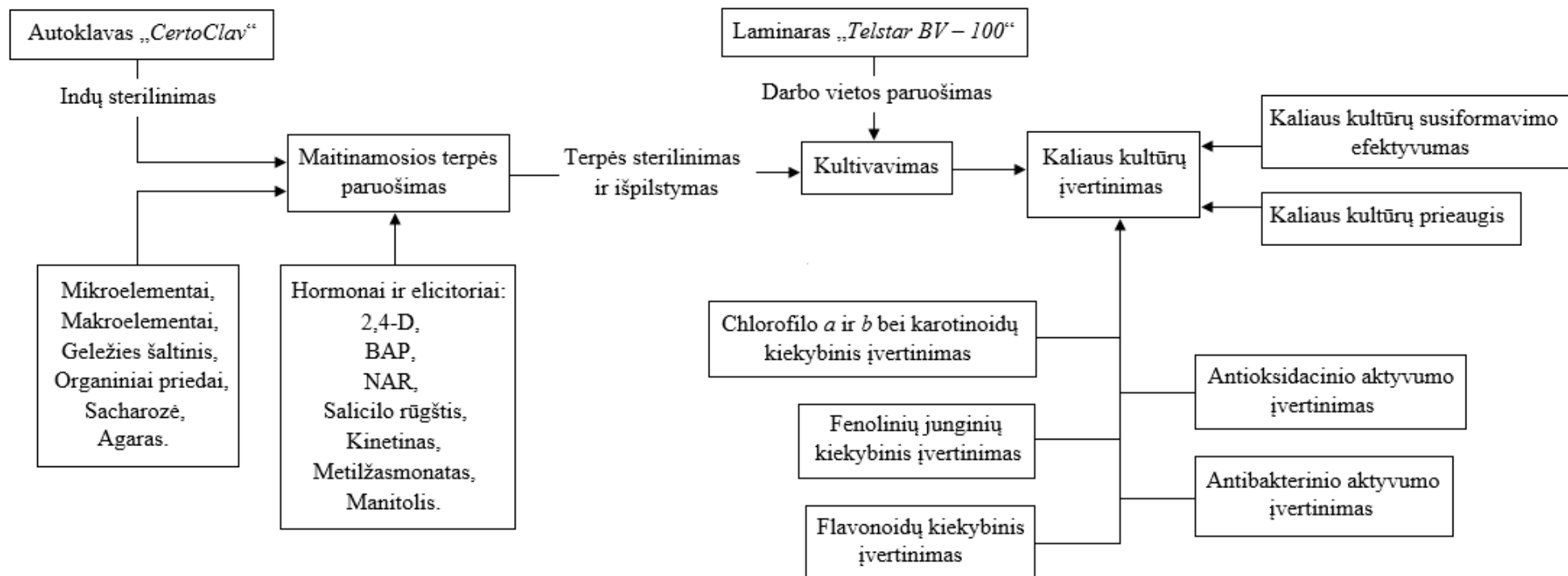
Gaminta Luria-Bertani (LB) terpė (žr. 2.3 lentelė), kurios pH 7,2. Jis reguliuotas su 1 N NaOH ir 1 N H₂SO₄.

2.3 lentelė. LB terpės reagentų kiekis

Reagentai	Reagentų kiekiai, reikalingi 1 l terpės
NaCl	10 g
Triptonas	10 g
Mielių ekstraktas	5 g
Agar-agaras	10 g

Bakterijų optinis tankis matuotas esant 600 nm bangos ilgiui.

Ant LB terpės įlašinta 50 µl bakterijų (*Escherichia coli*, *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*) ir jos išsklaidytos po petri lėkštelę. Į lėkštelę įdėti 6 popieriniai diskeliai ant kurių užlašinta 25 µl paruošto jonažolių ekstrakto. Lėkštelės su bakterijomis inkubuotos 24 val 37 °C. Po inkubacijos matuotas atstumas nuo diskelių iki bakterijų priaugio [59].



2.3 pav. *In vitro* paprastosios jonažolės paruošimo schema

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Tyrimai atlikti su 14 *H. perforatum* L. kaliaus kultūrų, augusių *in vitro*. Terpės tarpusavyje skyrėsi elicitorių kiekiu bei sudėtimi (žr. 2.2 lentelė). Palyginimui buvo naudota *in vivo* augusi jonažolė. Tyrimui į MS terpę pasodinta 500 sterilizuotų jonažolės sėklų, iš kurių išdygo apie 91 %. Persodinant išdygusius jonažolės daigus į kaliaus terpę augalai buvo išskirstyti į tris dalis: stiebus, lapus bei šaknis. Nustatyta, kad daugiausiai kaliaus kultūrų susiformavo iš šaknų (98,81 %) ir stiebų (95,60 %), o mažiausiai iš lapų (76,19 %) (žr. 3.1 lentelė).

3.1 lentelė. *In vitro* jonažolės kaliaus kultūrų susidarymo efektyvumas bei vidutinis prieaugis

Terpė	Jonažolės dalis	Kaliaus susidarymas, %	Vidutinis kaliaus kultūrų prieaugis*, g
2,4-D (1 mg/l) BAP (0,5 mg/l) NAR (0,1 mg/l)	Šaknys	100	1
	Stiebai	90	
	Lapai	56,67	
Salicilo rūgštis (50 μmol/l)	Šaknys	100	0,86
	Stiebai	100	
	Lapai	66,67	
Salicilo rūgštis (100 μmol/l)	Šaknys	95	0,84
	Stiebai	95	
	Lapai	66,67	
Salicilo rūgštis (150 μmol/l)	Šaknys	95	0,7
	Stiebai	95	
	Lapai	53,33	
2,4-D (1 mg/l) BAP (1 mg/l)	Šaknys	100	1,14
	Stiebai	100	
	Lapai	80	
Gamborg B5	Šaknys	93	0,21
	Stiebai	63,33	
	Lapai	60	
Kinetinas (0,5 mg/l)	Šaknys	100	0,73
	Stiebai	100	
	Lapai	90	
Kinetinas (1 mg/l)	Šaknys	100	1,18
	Stiebai	100	

	Lapai	92,5	
2,4-D (1 mg/l) BAP (0,2 mg/l)	Šaknys	100	1,03
	Stiebai	100	
	Lapai	86,67	
Metilžasmonatas (50 µmol/l)	Šaknys	100	1,36
	Stiebai	100	
	Lapai	76,67	
Metilžasmonatas (100 µmol/l)	Šaknys	100	1
	Stiebai	95	
	Lapai	47,5	
BAP (2,5 mg/l) NAR (0,5 mg/l)	Šaknys	100	1,97
	Stiebai	100	
	Lapai	100	
Manitolis (5 g/l)	Šaknys	100	1,85
	Stiebai	100	
	Lapai	95	
Manitolis (10 g/l)	Šaknys	100	1,95
	Stiebai	100	
	Lapai	95	

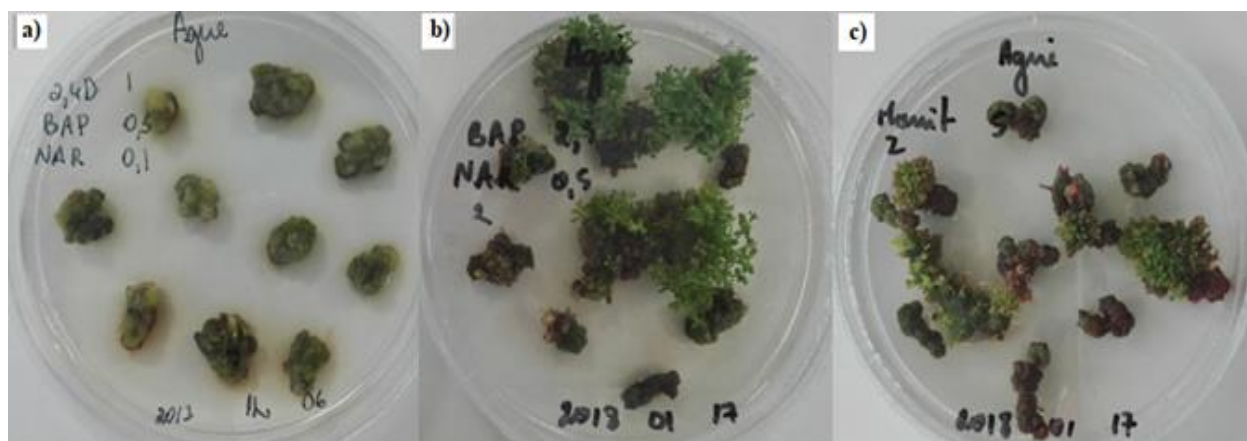
*prieaugis nurodomas vienoje petri lėkštelėje (iš 10 sėklų) per 1 mėnesį

3.1 lentelėje matoma, kad daugiausiai jonažolės kaliaus kultūrų susiformavo MS terpėje su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) hormonais. Joje kaliaus kultūras suformavo 100% eksplantų. Panašius rezultatus davė terpės su 5 ir 10 g/l manitolium, kuriose kaliaus kultūros susiformavo iš 100% šaknų ir stiebų bei 95% lapų. Mažiausiai kaliaus kultūrų susidarė Gamborg B₅ terpėje. Taip pat pastebėtas kaliaus kultūrų skaičiaus sumažėjimas didinant salicilo rūgšties bei metilžasmonato koncentracijas.

Kaliaus susiformavimo priklausomybę nuo pasirinktos augalo dalies patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimai. Kinų mokslininkai, tyrę metilžasmonato įtaką paprastosios jonažolės ląstelių kultūroms, nustatė, kad daugiausiai kaliaus kultūrų susidarė iš jonažolės stiebų [60]. Visiškai kitokius rezultatus pastebėjo Irano ir Turkijos mokslininkai. Jų tyrimuose buvo lyginamas kaliaus susiformavimas iš jonažolės lapų ir stiebų. Rezultatai parodė, kad efektyviausi eksplantai kaliaus kultūrų susidarymui buvo jonažolės lapai, o optimaliam kaliaus formavimui yra reikalingi atitinkami auksinų ir citokininų deriniai [61, 62]. Toks rezultatų nepastovumas tarp tyrimų ir galėjo būti dėl pasirinktų skirtingų auksinų ir citokininų derinių.

Augalinės masės priaugio rezultatai atspindėjo kaliaus kultūrų genezės procentinį efektyvumą. Apskaičiavus vidutinį kaliaus masės priaugį per mėnesį didžiausias priaugis buvo pastebėtas MS terpėse su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) bei su 5 ir 10 g/l manitolium, o mažiausias – Gamborg B₅ terpėje (žr. 3.1 lentelė).

Po mėnesio persodinant jonažolės kaliaus kultūras tolimesniam jų formavimui buvo atrinkti tik žaliausi, daugiausiai kaliaus suformavę augalai. Kitos kultūros buvo sudžiovintos ir paliktos tolimesniems tyrimams.

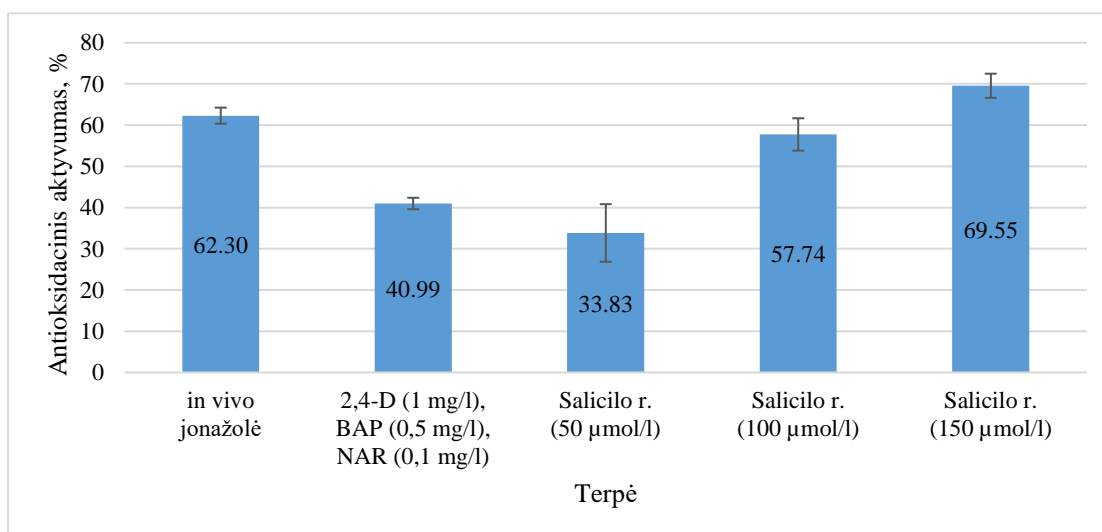


3.1 pav. Jonažolės kaliaus kultūros *in vitro* po mėnesio: a) 1 mg/l 2,4-D; 0,5 mg/l BAP ir 0,1 mg/l NAR terpėje; b) 2,5 mg/l BAP ir 0,5 mg/l NAR terpėje; c) 5 g/l manitolio terpėje

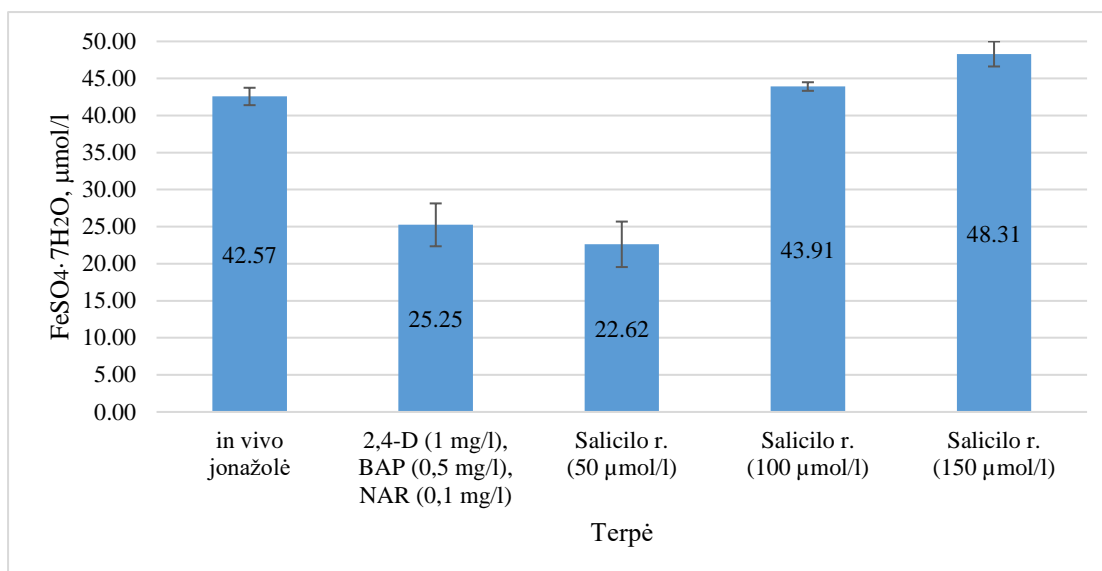
3.1. Antioksidacinių tyrimų įvertinimas

Lyginant atliktus antioksidacinius tyrimus galima pastebėti, kad geriausi rezultatai matomi tose pačiose terpėse, nors didžiausias antioksidacinis aktyvumas pasireiškia vis kitoje terpėje.

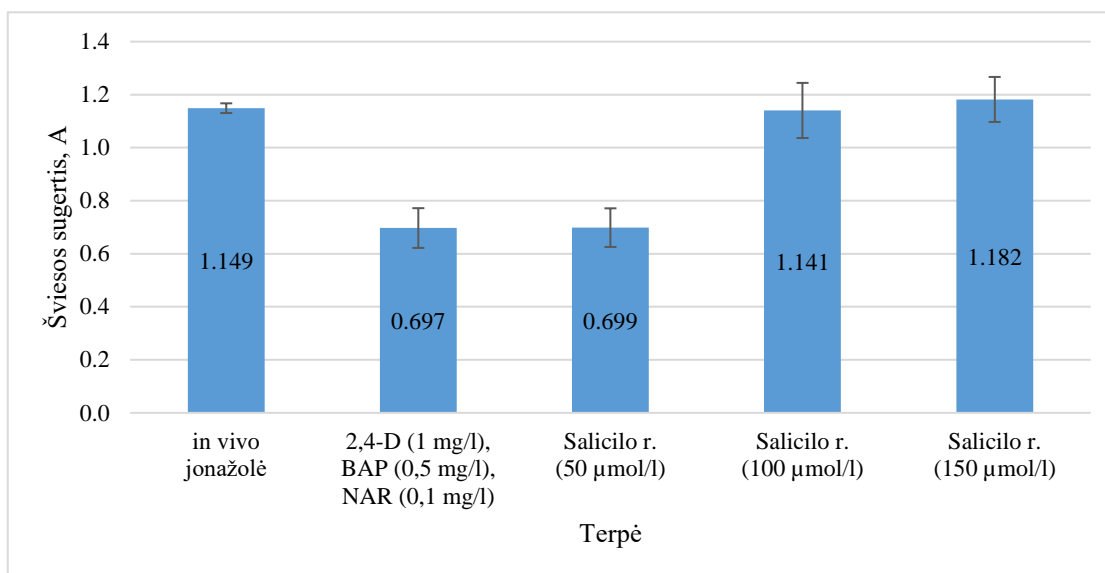
3.1.1. Salicilo rūgšties poveikis paprastosios jonažolės antioksidacinėms savybėms



3.2 pav. Salicilo rūgšties poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant DPPH metodą



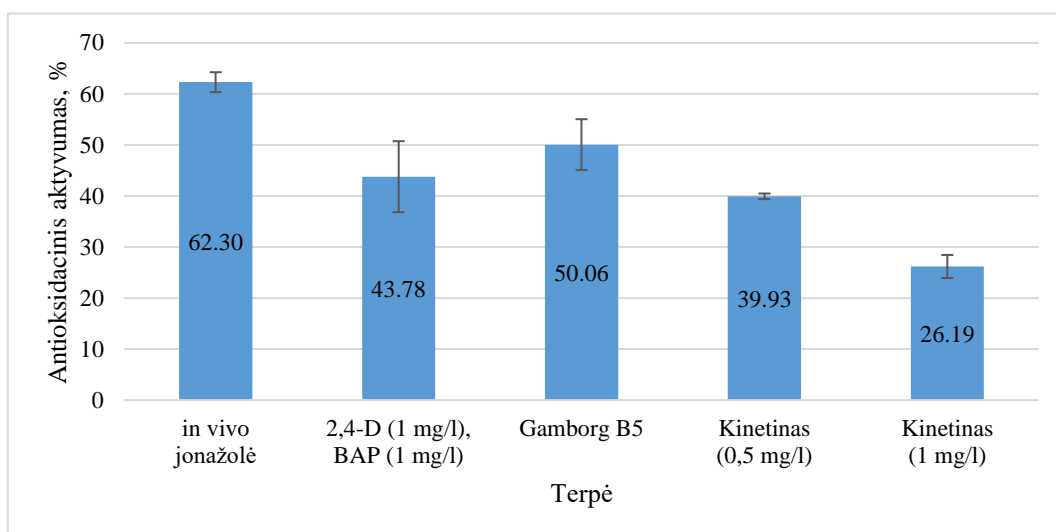
3.3 pav. Salicilo rūgšties poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant FRAP metodą



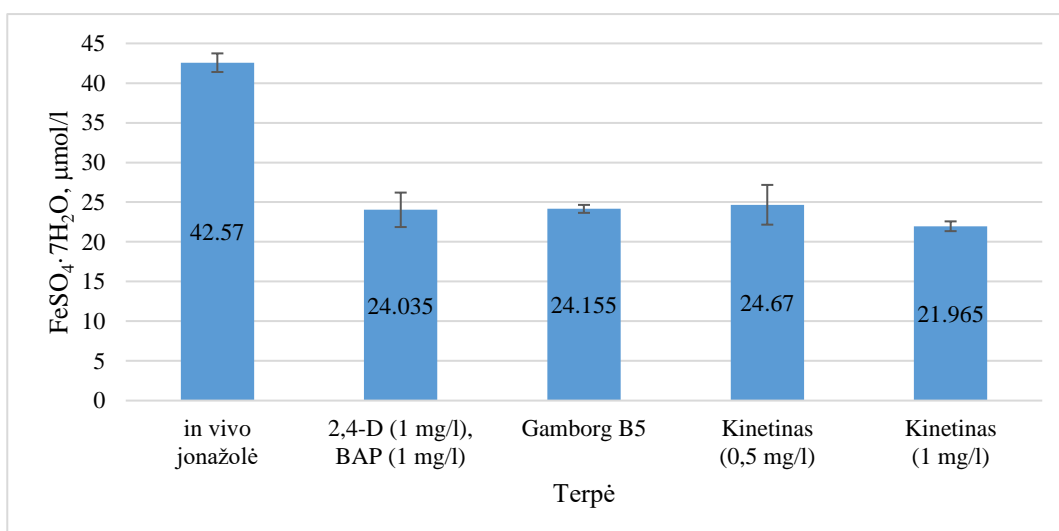
3.4 pav. Salicilo rūgšties poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant redukcinį metodą

Visų metodų metu buvo matoma, kad jonažolė, augusi MS terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) + NAR (0,1 mg/l) hormonais, nepasižymėjo geru antioksidaciniu aktyvumu. Į šią terpę pridėjus nedidelį salicilo rūgšties kiekį reikšmingo pokyčio nebuvo pastebėta, tačiau padidinus rūgšties koncentraciją nuo 50 iki 100 µmol/l jonažolės antioksidacinis aktyvumas išaugo 39–46 %. Toliau didinant rūgšties koncentraciją iki 150 µmol/l antioksidacinis aktyvumas augo žymiau lėčiau ir nors visų metodų metu *in vitro* jonažolė, augusi terpėje su 150 µmol/l salicilo rūgštimi, turėjo geresnes antioksidacines savybes už *in vivo* jonažolę, statistiškai reikšmingi skirtumai buvo pastebėti tik DPPH ir FRAP metoduose.

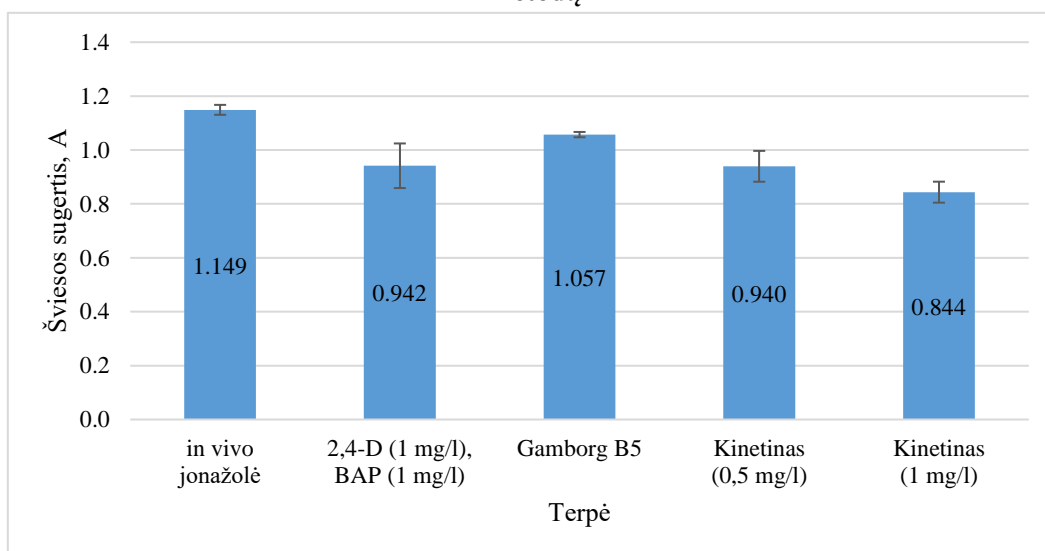
3.1.2. Gamborg B₅ ir kinetino poveikis paprastosios jonažolės antioksidacinėms savybėms



3.5 pav. Gamborg B₅ ir kinetino poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant DPPH metoda



3.6 pav. Gamborg B₅ ir kinetino poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant FRAP metoda

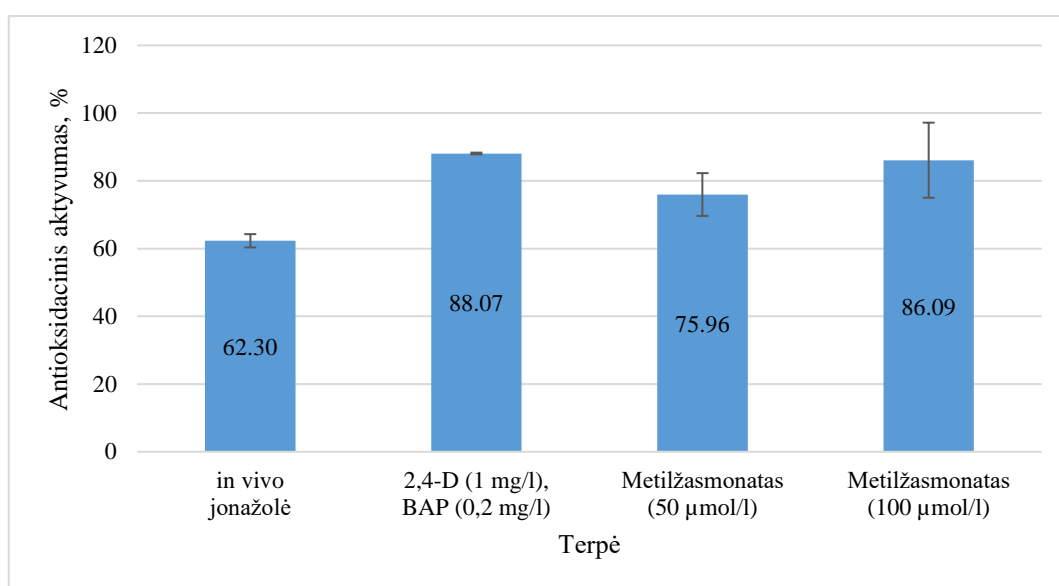


3.7 pav. Gamborg B₅ ir kinetino poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant redukciniį metoda

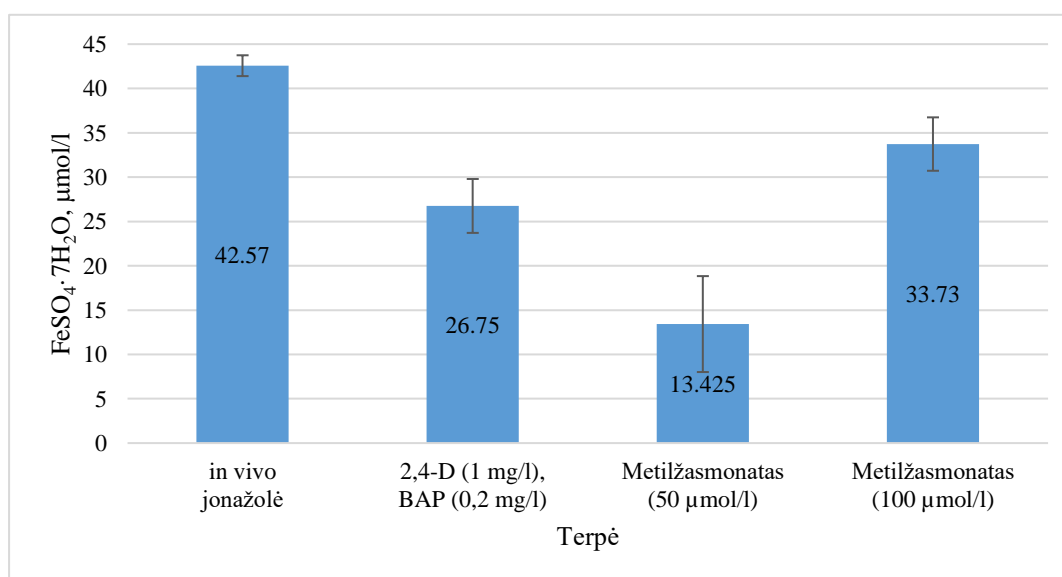
Nei MS, nei Gamborg B₅ terpė su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) hormonais neturėjo teigiamo poveikio jonažolės antioksidacinėms savybėms lyginant su *in vivo* jonažole. Tarp metodų šių terpių efektyvumai neišsiskyrė: geresniu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo jonažolė, augusi Gamborg B₅ terpėje, tačiau statistiškai reikšmingas skirtumas tarp jų buvo tik redukcinio metodo metu.

Didinant kinetino koncentraciją terpėje visų 3 tyrimų metu buvo pastebėtas neigiamas poveikis jonažolės antioksidacinėms savybėms.

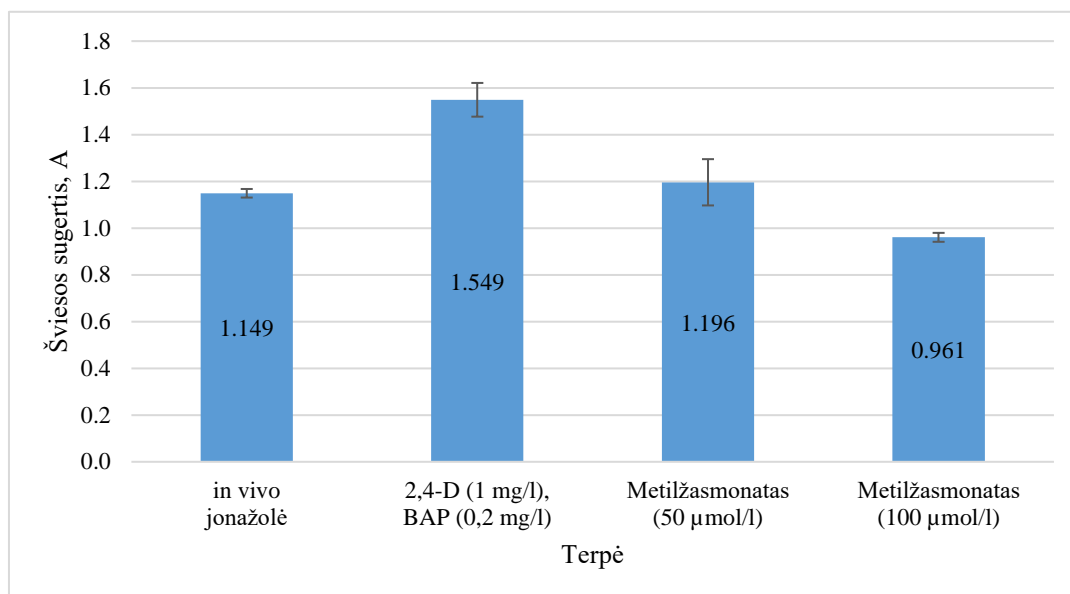
3.1.3. Metilzasmonato poveikis jonažolės antioksidacinėms savybėms



3.8 pav. Metilzasmonato poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant DPPH metodą



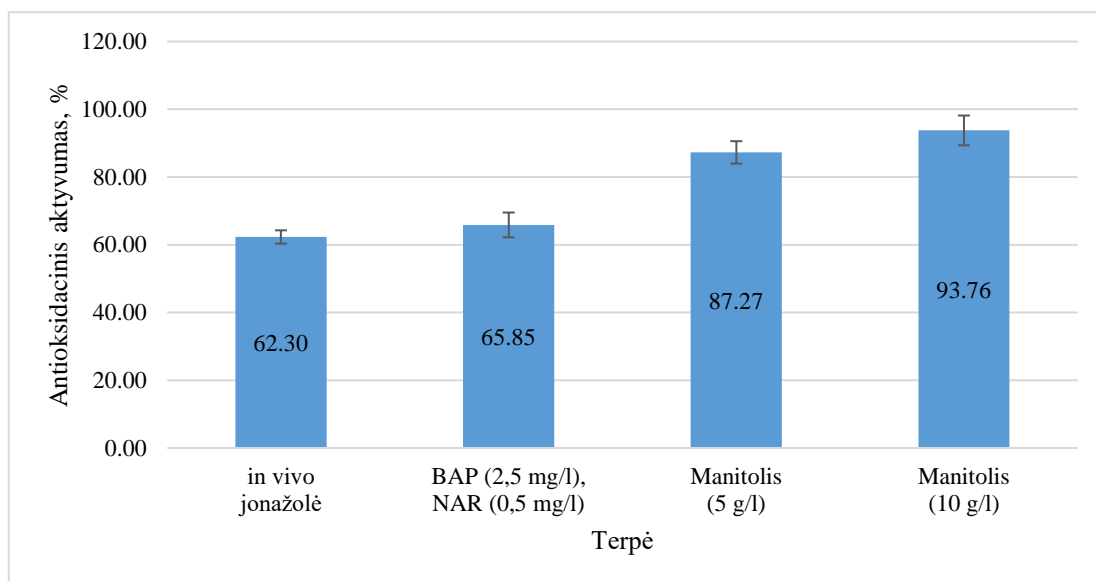
3.9 pav. Metilzasmonato poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant FRAP metodą



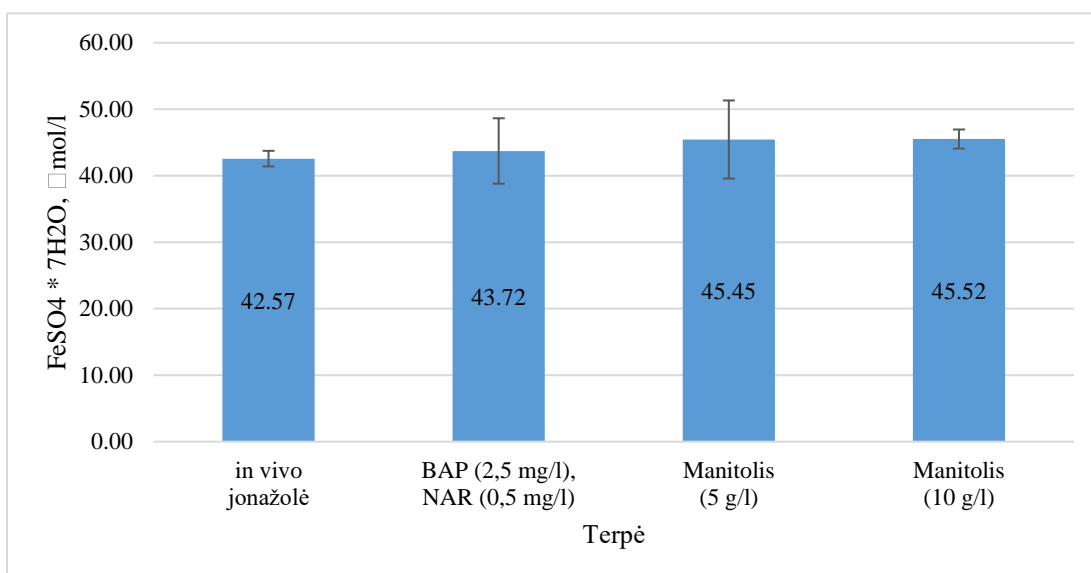
3.10 pav. Metilžasmonato poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant redukcinį metodą

Jonažolių, augusių MS terpėse su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) ir metilžasmonatu rezultatai tarp metodų išsiskyrė. Naudojant DPPH ir redukcinį metodus jonažolė, augusi terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) hormonais, pasižymėjo vienu iš geriausių antioksidaciniu aktyvumu, pasiekus 88,07 % (DPPH) ir 1,549 A (redukcinis) lyginant su *in vivo* jonažolės 62,3 % ir 1,149 A atitinkamai. Tačiau FRAP metodo metu šios terpės efektyvumas buvo beveik trečdaliu mažesnis nei *in vivo* jonažolės. Pridėjus 50 μmol/l metilžasmonato, jonažolės antioksidacinis aktyvumas statistiškai reikšmingai sumažėjo visų tyrimų metu, tačiau didinant jo koncentraciją rezultatai vėl išsiskyrė. Naudojant DPPH ir FRAP metodus didesnė metilžasmonato koncentracija (100 μmol/l) turėjo teigiamą poveikį jonažolės antioksidaciniam aktyvumui, kuris pasiekė 86,09 % ir 33,73 μmol/l atitinkamai. Taikant redukcinį metodą didesnė metilžasmonato koncentracija turėjo priešingą poveikį. Statistiškai reikšmingas metilžasmonato koncentracijos didinimo poveikis buvo pastebėtas tik FRAP ir redukcinio metodų metu.

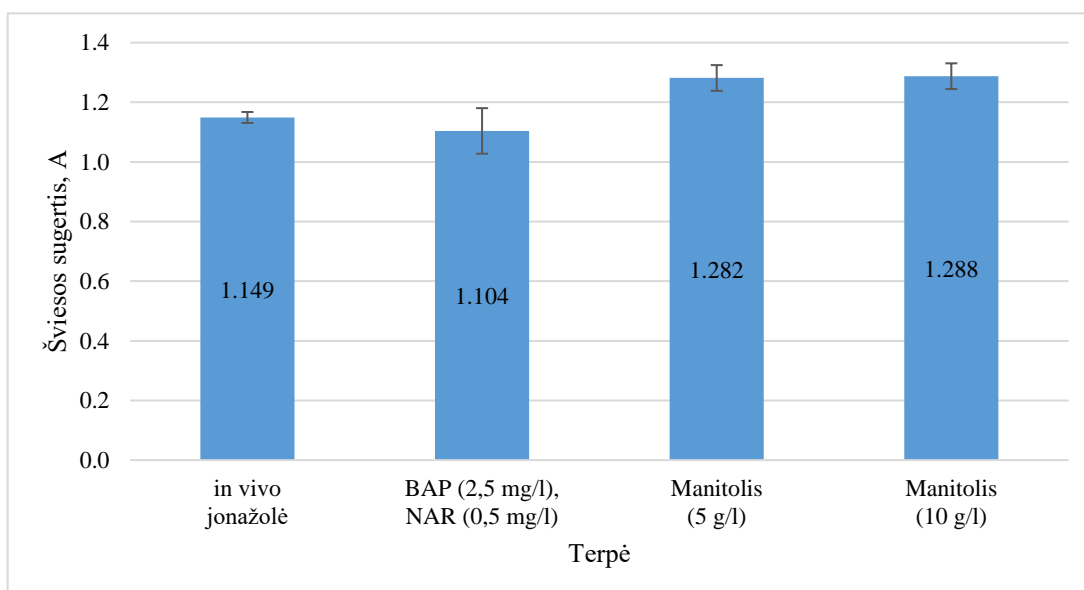
3.1.4. Manitolio poveikis jonažolės antioksidacinėms savybėms



3.11 pav. Manitolio poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant DPPH metodą



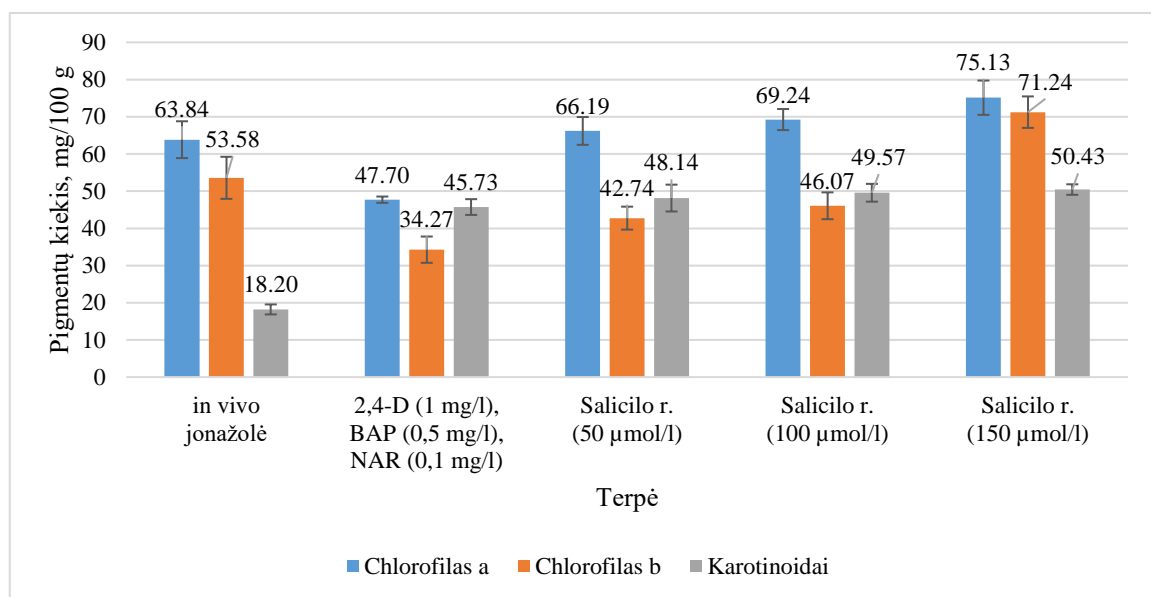
3.12 pav. Manitolio poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant FRAP metodą



3.13 pav. Manitolio poveikis jonažolės antioksidaciniam aktyvumui naudojant redukcinį metodą

Jonažolės, augusios MS terpėje su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) ir manitoliu, turėjo vieną iš didžiausių antioksidacinių aktyvumų. *In vitro* jonažolės, augusios terpėje tik su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l), antioksidacinis aktyvumas buvo panašus į *in vivo* jonažolės visuose metoduose. Pridėjus manitolio buvo pastebėtas teigiamas poveikis, kuris ryškiausiai matėsi naudojant DPPH metodą. Didinant manitolio koncentraciją MS terpėje didėjo ir jonažolės antioksidacinės savybės tačiau šis pokytis nebuvo reikšmingas. Remiantis šiais rezultatais galima teigti, kad šis hormonų derinys yra efektyvus jonažolės antioksidacinių savybių optimizavimui.

3.2. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų įvertinimas



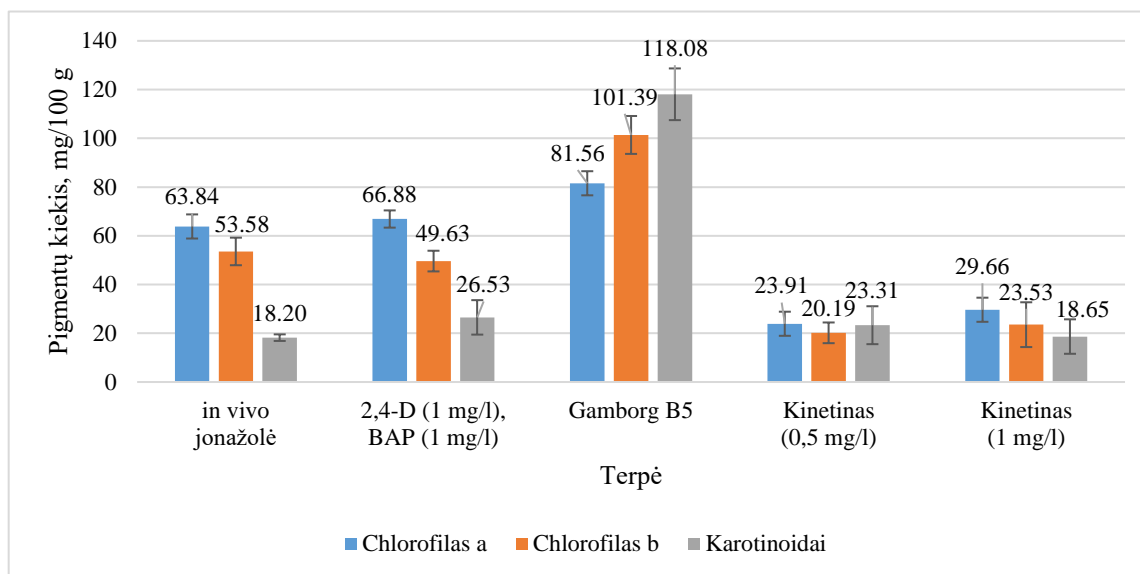
3.14 pav. Salicilo rūgšties poveikis chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijai jonažolėje

Iš rezultatų, pateiktų 3.14 pav., galima pastebėti, kad MS terpė su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) + NAR (0,1 mg/l) nėra efektyvi chlorofilo *a* ir *b* gamybai skatinti, tačiau pridėjus salicilo rūgšties, šių pigmentų koncentracijos reikšmingai kilo. Chlorofilo *a* ir *b* koncentracija statistiškai reikšmingai buvo didesnė už *in vivo* jonažolės pridėjus 150 μmol/l salicilo rūgšties.

Apskaičiavus karotinoidų kiekį galima pastebėti, kad *in vitro* augusi jonažolė pasižymi patikimai didesniu karotinoidų kiekiu nei jonažolė *in vivo*. Nors didinant salicilo rūgšties koncentraciją terpėje kilo ir karotinoidų kiekis jonažolės kaliaus kultūrose, tačiau šis padidėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas.

Tyrimai, atlikti su kitais augalais, parodė, kad salicilo rūgštis turi teigiamą poveikį karotinoidų koncentracijai, tačiau jos poveikis chlorofilui ne visada yra vienodas. S.E.A Khodary atliktame tyrime su kukurūzų augalais buvo pastebėta, kad salicilo rūgštis padidino tiek

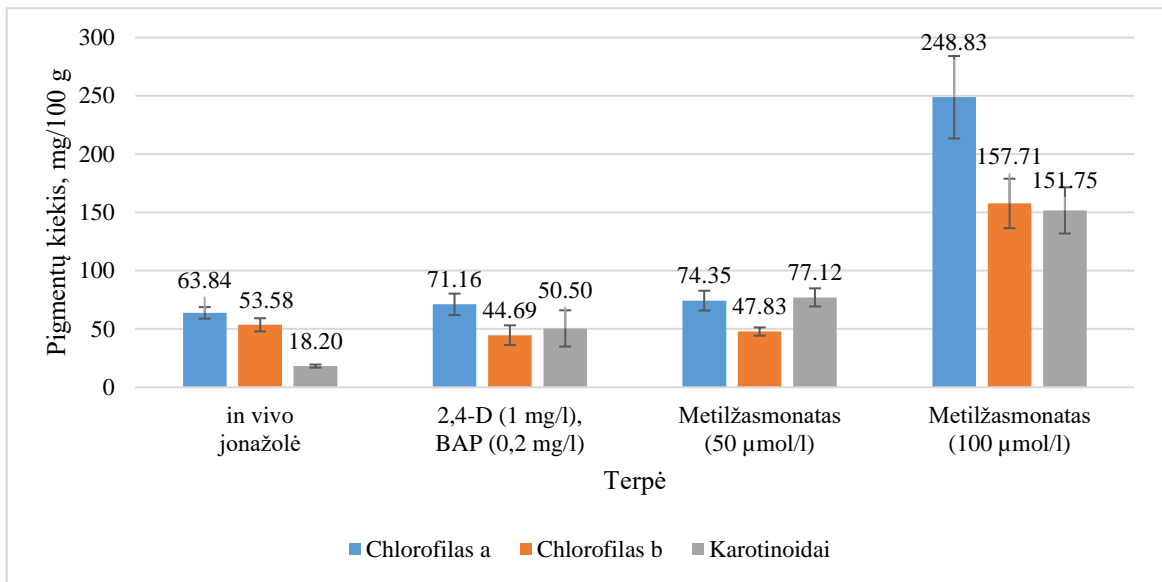
chlorofilo *a* ir *b*, tiek karotinoidų koncentracijas [63], tačiau kitas tyrimas su kviečiais, kurį atliko mokslininkas S.T. Moharekar su kolegomis parodė, kad salicilo rūgštis turėjo neigiamą efektą chlorofilo koncentracijoms [64].



3.15 pav. Gamborg B₅ ir kinetino poveikis chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijai jonažolėje

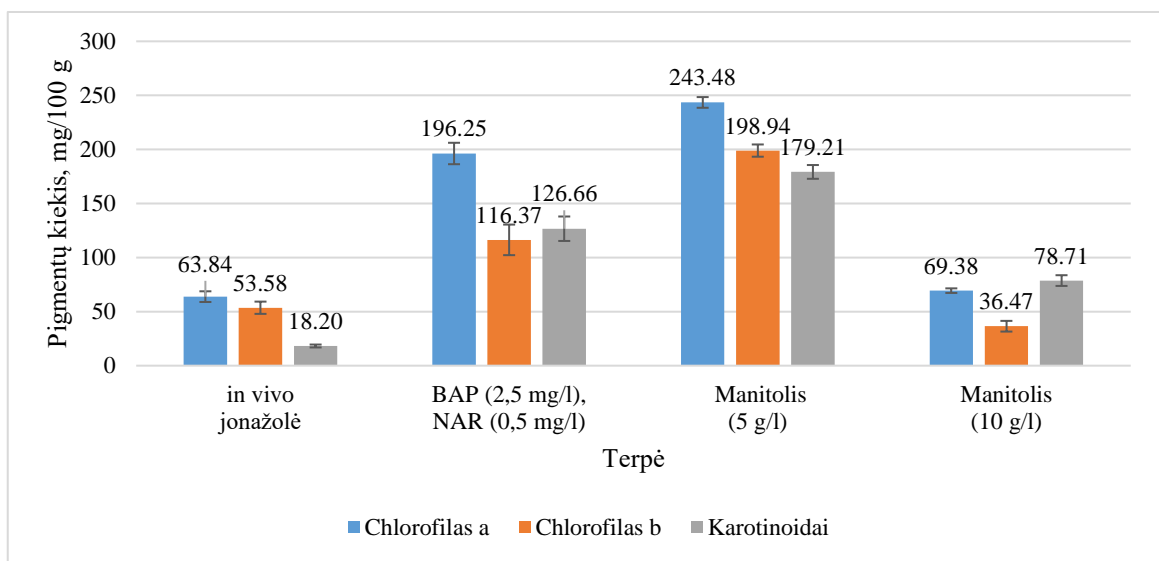
Lyginant MS ir Gamborg B₅ terpes pastebėta, kad Gamborg B₅ terpė yra efektyvesnė tiek chlorofilo, tiek karotinoidų gamybai skatinti. Jonažolės, augusios MS terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) hormonais, chlorofilo ir karotinoidų kiekis reikšmingai nesikeitė nuo *in vivo* jonažolės, tačiau Gamborg B₅ terpėje buvo pastebėtas aiškus tirtų pigmentų pagausėjimas. Taip pat įdomu pastebėti, kad Gamborg B₅ terpė buvo vienintelė iš visų tirtų terpių variantų, kurioje chlorofilo *b* ir karotinoidų koncentracija buvo patikimai didesnė už chlorofilo *a*.

MS terpė su kinetinu turėjo neigiamą poveikį chlorofilo *a* ir *b* koncentracijoms *in vitro* jonažolėje. Nors šis elicitorius ir padidino karotinoidų kiekį *in vitro* lyginant su *in vivo*, tačiau šis pokytis nebuvo patikimas. Didinant kinetino koncentraciją reikšmingų pokyčių neįvyko. Kitokie rezultatai buvo gauti Indijos mokslininko S. Singh, kuris tyrė *Solanum melongena* L. sodinukus. Jo tyrimo metu kinetinas padidino ne tik karotinoidų, bet ir chlorofilo *a* ir *b* koncentracijas [65].



3.16 pav. Metilzasmonato poveikis chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijai jonažolėje

Metilzasmonato poveikis tiriamų fotosintezės pigmentų gamybai buvo teigiamas. Ypač veiksminga buvo 100 µmol/l metilzasmonato koncentracija, su kuria buvo gautas didžiausias kiekis chlorofilo *a*.

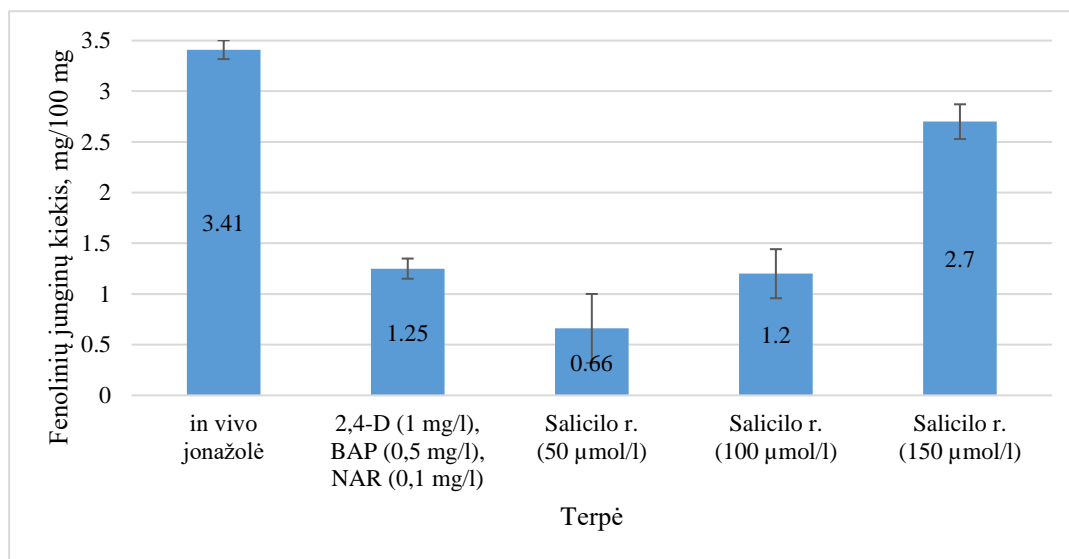


3.17 pav. Manitolio poveikis chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijai jonažolėje

BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) hormonai statistiškai reikšmingai pagerino jonažolės chlorofilo ir karotinoidų sintezę. Į šią terpę pridėjus 5 g/l manitolio jonažolės pigmentų kiekis toliau patikimai kilo. Jonažolėje, augusioje MS terpė su 5 g/l manitoliumi, buvo pasiektas didžiausias chlorofilo *b* ir karotinoidų kiekis ir antra pagal dydį chlorofilo *a* koncentracija. Nepaisant to, buvo pastebėta, kad didinant šio elicitoriaus koncentraciją toliau, tiek chlorofilo, tiek karotinoidų kiekis sparčiai sumažėjo.

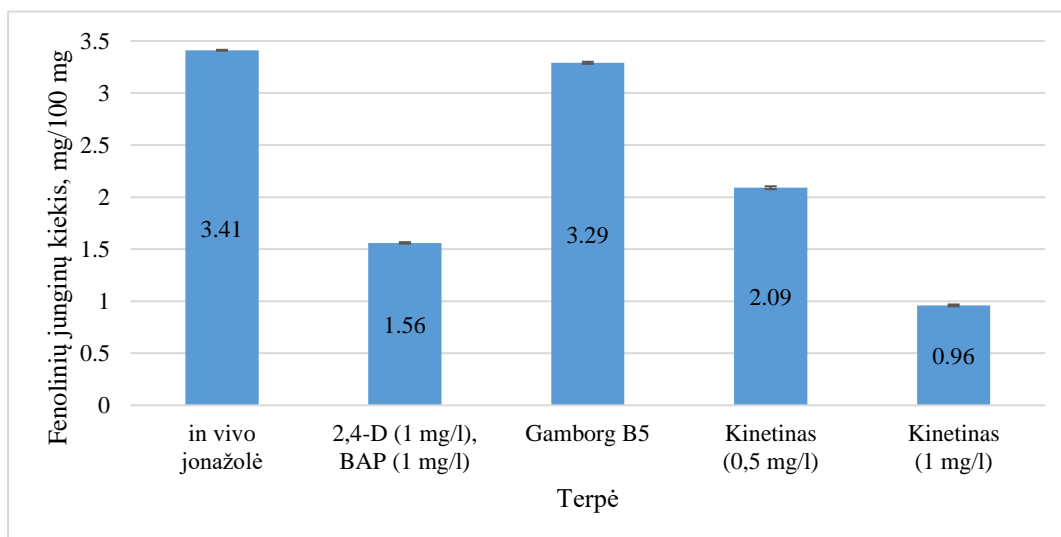
3.3. Fenolinių junginių įvertinimas

Fenolinių junginių koncentracija buvo apskaičiuota iš kalibracinės kreivės pagal tanino rūgšties kiekį (žr. 2.2 pav.). Tyrimo rezultatai parodė, kad tik keletas terpių variantų reikšmingai padidino bendrą fenolinių junginių koncentraciją, lyginant su *in vivo* jonažole. MS terpėse su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) (žr. 3.21 pav.) bei metilžasmonatu (100 μmol/l) (žr. 3.20 pav.) augusios jonažolės sukaupte atitinkamai 24,05 % ir 20,82 % daugiau fenolių junginių nei *in vivo* augęs augalas.



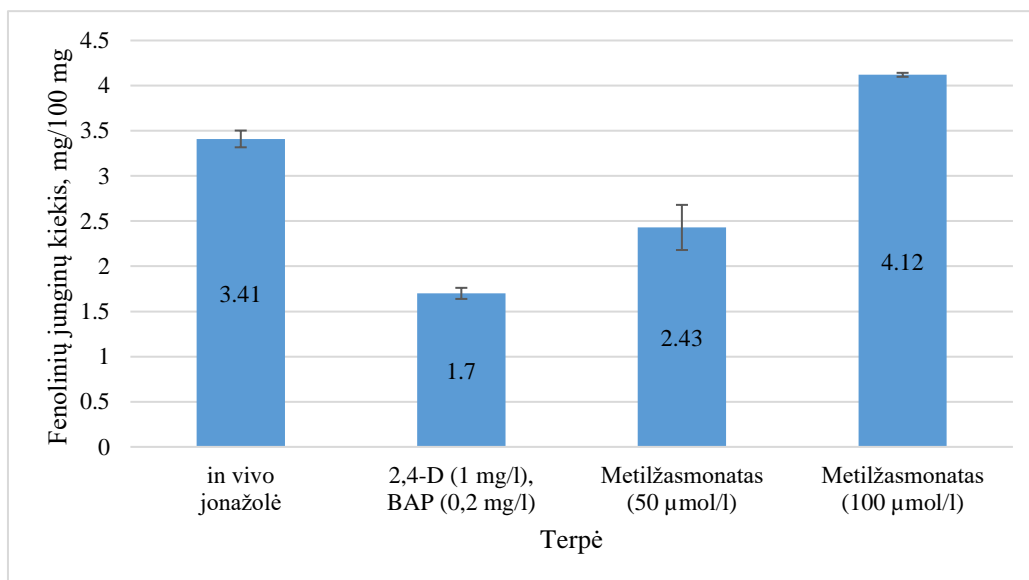
3.18 pav. Salicilo rūgšties poveikis fenolinių junginių kiekiui jonažolėje

Iš rezultatų, pateiktų 3.18 pav., buvo pastebėta, kad MS terpė su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) + NAR (0,1 mg/l) hormonais yra visiškai neefektyvi fenolinių junginių susidarymo skatinimui. Į šią terpę pridėjus nedidelį kiekį salicilo rūgšties fenolinių junginių kiekis toliau mažėja, tačiau didinant rūgšties koncentraciją didėja ir fenolinių junginių rodikliai. Galima teigti, kad salicilo rūgštis yra efektyvi tik naudojant ją didelėmis koncentracijomis.



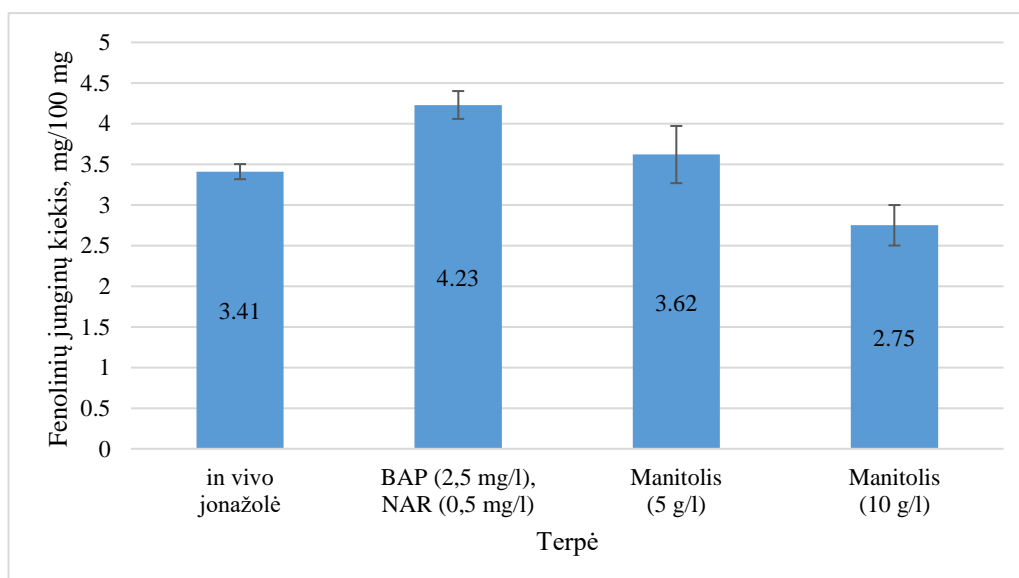
3.19 pav. Gamborg B₅ ir kinetino poveikis fenolinių junginių kiekiui jonažolėje

Jonažolė, augusi Gamborg B₅ terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) hormonais, sukaupė dvigubai daugiau fenolinių junginių negu jonažolė, augusi MS terpėje su tais pačiais hormonais, tačiau nei viena iš jų statistiškai reikšmingai nepralenkė *in vivo* jonažolės. Kinetinas taip pat turėjo neigiamą poveikį: didinant jo koncentraciją fenolinių junginių mažėjo.



3.20 pav. Metilžasmonato poveikis fenolinių junginių kiekiui jonažolėje

MS terpė su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) hormonais per pusę sumažino fenolinių junginių kiekį *in vitro* jonažolėje lyginant su *in vivo*, tačiau pridėjus net ir mažą metilžasmonato kiekį, priešingai nei su salicilo rūgštimi, fenolinių junginių kiekis iš karto pradėjo augti. Terpė, kurioje metilžasmonato koncentracija siekė 100 μmol/l, pasižymėjo vienu efektyviausiu fenolinių junginių gamybos skatinimu.



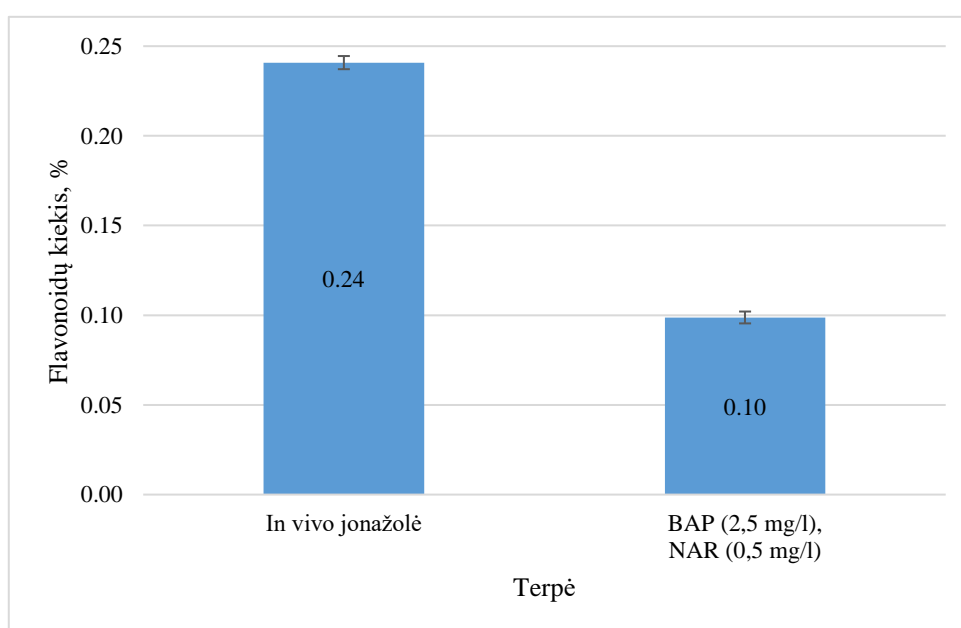
3.21 pav. Manitolio poveikis fenolinių junginių kiekiui jonažolėje

Jonažolė, augusi terpėje su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l), sintetino daugiausiai fenolinių junginių buvo. Į ją pridėjus manitolio šis efektyvumas sumažėjo. Todėl, nepaisant to, kad jonažolė, augusi MS terpėje su 5 g/l manitolio, pasižymėjo viena iš didesnių fenolinių junginių koncentracijų, manitolis kaip medžiaga nėra labai tinkamas fenolinių junginių sintezės skatinimui.

3.4. Flavonoidų nustatymas

Tiriant augalų augimo hormonų bei elicitorių įtaką paprastosios jonažolės flavonoidų gamybai, tiriamosios medžiagos pakankamai užaugo tik MS terpėje su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) hormonais. Ši terpė nebuvo veiksminga jonažolės flavonoidų sintezės skatinimui (3.22 pav.).

Mokslininko Jing Wang atlikto tyrimo metu buvo nustatyta, kad metilzasmonato bei salicilo rūgšties elicitoriai, nors ir neigiamai paveikė jonažolės ląstelių kultūrų augimą, tačiau veiksmingai skatino flavonoidų gamybą. Veiksmingiausia buvo 100 $\mu\text{mol/l}$ metilzasmonato koncentracija [60].

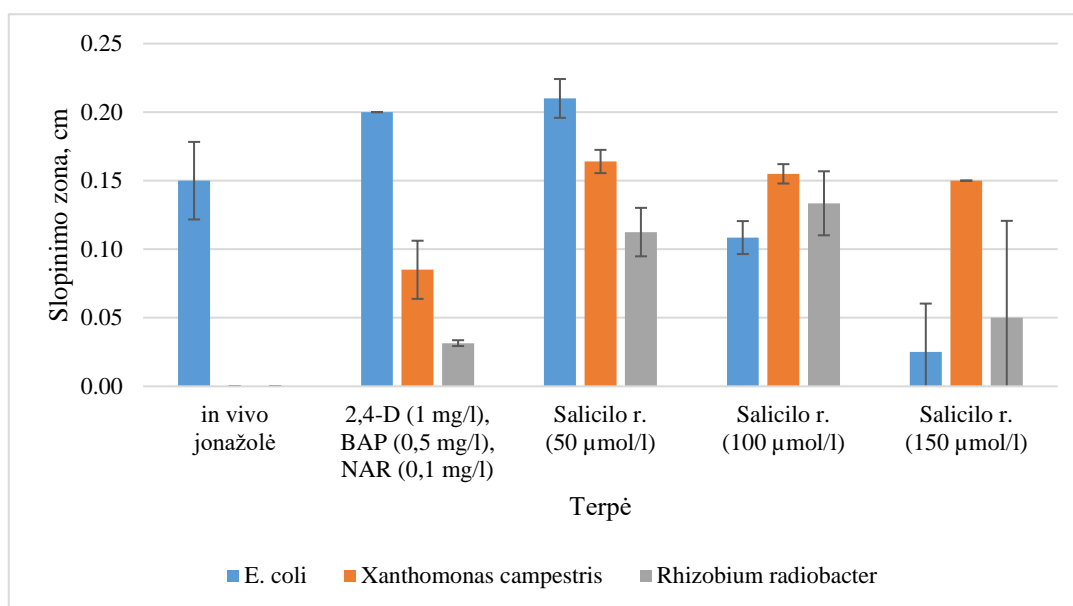


3.22 pav. Flavonoidų kiekis paprastojoje jonažolėje *in vivo* ir *in vitro*

3.5. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas

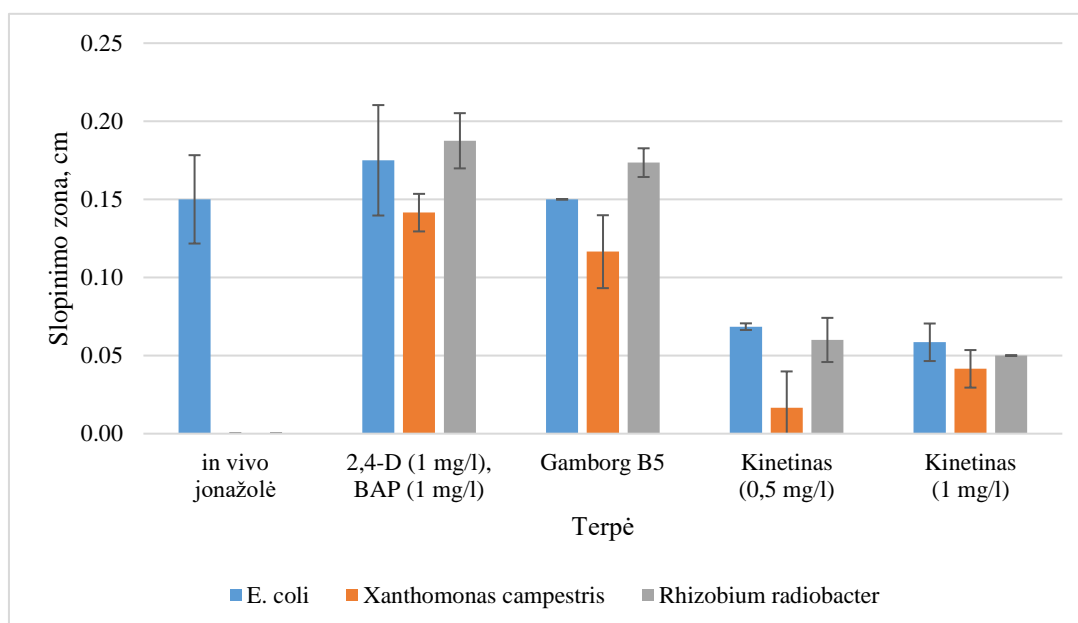
In vivo jonažolė pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu tik prieš *E. coli* bakteriją. *In vitro* sąlygomis augusios jonažolės tapo atsparesnės *Rhizobium radiobacter* bei *Xanthomonas*

campestris bakterijoms, tačiau kai kurių *in vitro* jonažolių antibakterinės savybės prieš *E. coli* sumažėjo, nors daugumoje terpių jonažolė išliko prieš ją aktyviausia.



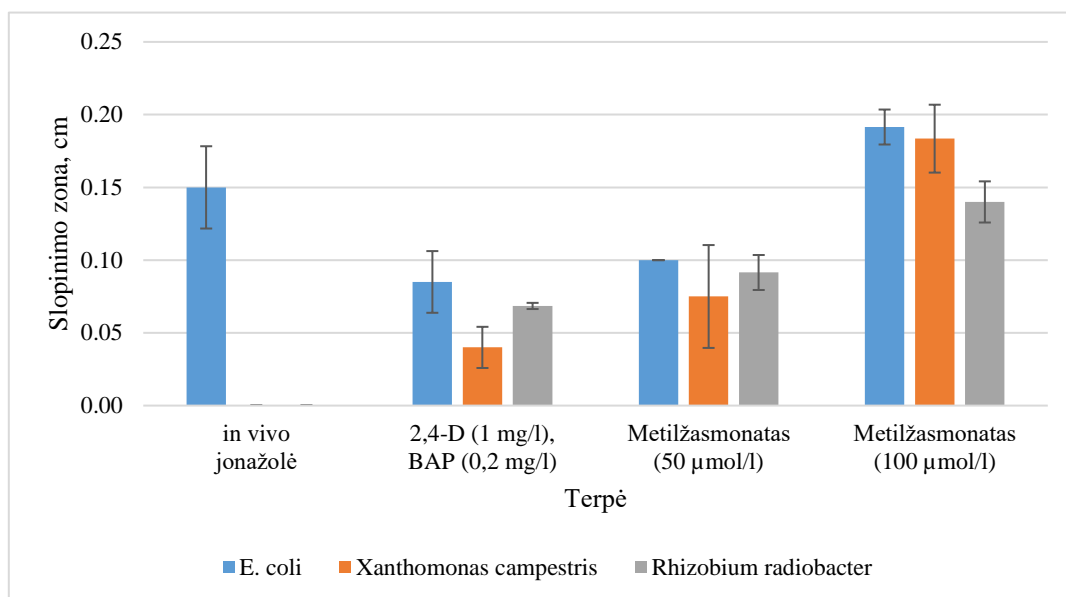
3.23 pav. Salicilo rūgšties poveikis jonažolės antibakterinėms savybėms

Jonažolė, augusi MS terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) + NAR (0,1 mg/l) hormonais, pasižymėjo geresnėmis antibakterinėmis savybėmis prieš visas 3 tirtas bakterijas nei *in vivo* jonažolė. Pridėjus nedidelę salicilo rūgšties koncentraciją į terpę jonažolės antibakterinis aktyvumas prieš visas bakterijas padidėjo, tačiau toliau didinant rūgšties koncentraciją buvo matomas neigiamas efektas, ypač prieš *E. coli* bakterijas.



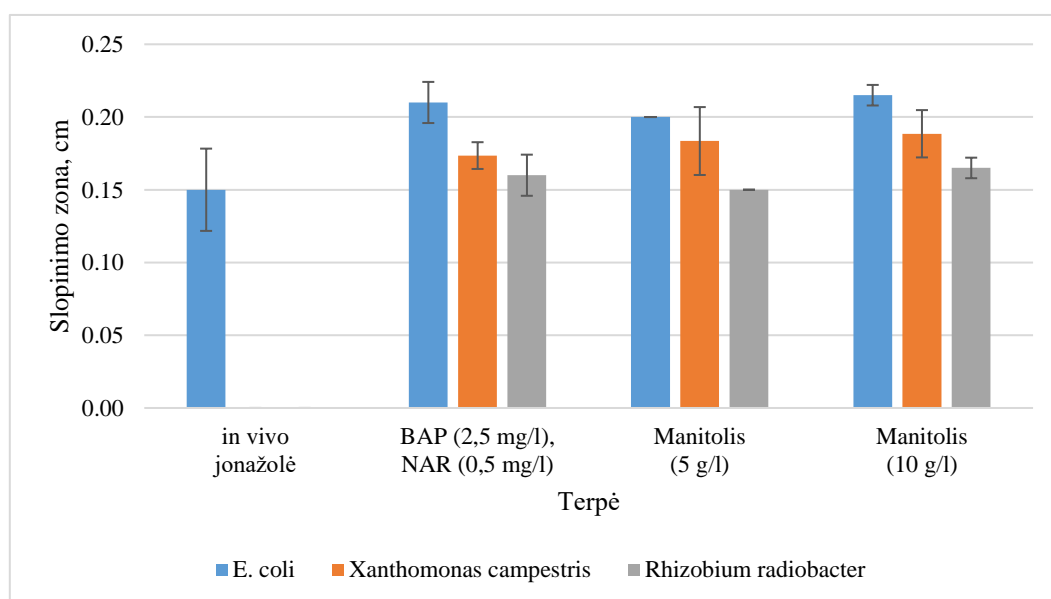
3.24 pav. Gamborg B₅ ir kinetino poveikis jonažolės antibakterinėms savybėms

Tiek Gamborg B₅, tiek MS terpė su tais pačiais hormonais turėjo didelę teigiamą įtaką jonažolės antibakterinėms savybėms prieš *Xanthomonas campestris* ir *Rhizobium radiobacter* bakterijas, tačiau statistiškai reikšmingų pokyčių tarp jų nebuvo. Kinetinas nebuvo labai veiksmingas ir jo koncentracijos pokyčiai neturėjo reikšmingos įtakos jonažolės antimikrobiniam aktyvumui.



3.25 pav. Metilžasmonato poveikis jonažolės antibakterinėms savybėms

Jonažolė, augusi MS terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) hormonais, buvo šiek tiek efektyvesnė prieš visas 3 bakterijas nei terpė su kinetinu. Į šią terpę pridėjus 50 μmol/l metilžasmonato jonažolės aktyvumas taip pat padidėjo prieš visas bakterijas, tačiau statistiškai reikšmingas pokytis buvo tik prieš *Rhizobium radiobacter*. Didinant metilžasmonato koncentraciją patikimai didėjo ir jonažolės antibakterinės savybės.



3.26 pav. Manitolio poveikis jonažolės antibakterinėms savybėms

Jonažolės, augusios terpėse su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) hormonais bei manitoliu, pasižymėjo vienu iš geriausių antibakteriniu aktyvumu. Rezultatų skirtumai nebuvo statistiškai patikimi, todėl galima teigti, kad manitolis neturi didelės įtakos jonažolės antimikrobiniam aktyvumui.

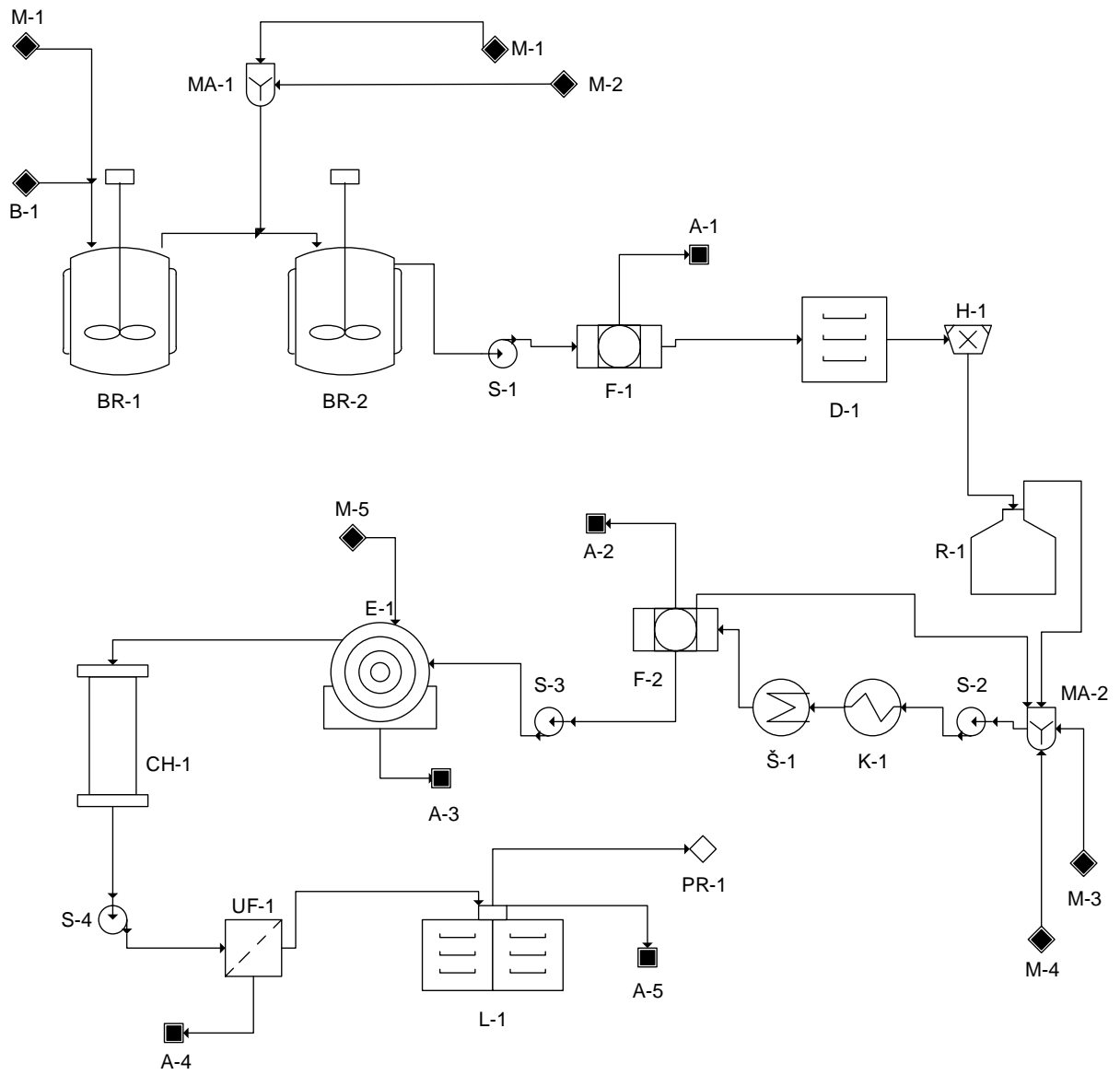
Visos trys tirtos bakterijos yra gram-neigiamos. Atliktas ne vienas tyrimas, įrodantis gerą paprastosios jonažolės antibakterinį aktyvumą prieš gram-teigiamas bakterijas ir nors yra tyrimų, kurių rezultatai parodė, kad jonažolė gali veikti ir prieš gram-neigiamas bakterijas, šis veikimas yra daug silpnesnis [39, 40] ir ne visada pakartojamas. S. Trifunovic ir kitų mokslininkų atliktame tyrime, naudojant paprastosios jonažolės etanolio ekstraktus, nebuvo užfiksuota jokio jos antibakterinio poveikio prieš *E. coli* [66]. Tokius pačius rezultatus gavo ir G. Franklin tirdamas *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* ir *E. coli* gyvybingumą. Šios bakterijos buvo kultivuojamos su *H. perforatum* ląstelėmis. Rezultatai parodė, kad po 24 val *Agrobacterium* gyvybingumas buvo visiškai nuslopintas, tačiau *E. coli* išliko nepaveikta [67].

4. REKOMENDACIJŲ DALIS

Flavonoidų išskyrimas iš *in vitro* augintos paprastosios jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) (žr. 4.1 pav.).

Biomasės auginimas vyksta dviem etapais: iš pradžių paprastosios jonažolės sėklos yra pasodinamos bioreaktoriuje (BR1) su maitinamąja MS terpe. Tada *in vitro* sudygusios sėklos yra perkeliamos į kitą bioreaktorių (BR2), kurioje yra maitinamoji terpė su atitinkamais augalų augimo hormonais bei elicitoriais.

Užaugintos paprastosios jonažolės kaliaus kultūros su išcentrinio siurbliu (S1) praleidžiamos pro filtrą (F1) ir džiovinamos džiovinimo kameroje (D). Sausa biomasė yra susmulkinama homogenizatoriuje (H) ir laikoma rezervuare (R). Sukaupus pakankamai medžiagos, susmulkintos jonažolės kaliaus kultūros yra perkeliamos į maišytuvą (MA2). Jame žaliava yra sumaišoma su acetonu ir HCl santykiu 10:1. Mišinys toliau tiekiamas į kaitinamąją kamerą (K). Tirpalas atvėsinamas aušinimo kameroje (Š) ir tiekiamas į rotacinį vakuuminį filtrą (F2). Iš filtro jos gražinamos į maišytuvą (MA2), kuriame nuosėdos vėl praplaunamos acetonu. Filtratai yra tiekiami į ekstraktorių (E) išcentrinio siurblio (S2) pagalba. Jame acetono tirpalas yra kelis kartus ekstrahuojamas etilacetatu. Surinktos viršutinės fazės yra tiekiamos į chromatografinę kolonėlę (CH). Išvalytas tirpalas išcentrinio siurbliu (S3) paduodamas į ultrafiltrą (UF) ir pakartotinai išvalytas tirpalas tiekiamas į liofilizatorių (L), kuriame yra išgarinamas tirpiklis ir gaunamas sausas produktas.



4.1 pav. Flavonoidų išskyrimo technologinė schema

4.1 lentelė. Technologinės schemos medžiagų žymėjimai ir pavadinimai

Medžiagos žymėjimas	Medžiagos pavadinimas
B-1	Biomasė
M-1	MS terpė
M-2	Atitinkamos hormonų ir elicitorių kombinacijos
M-3	Acetonas
M-4	Druskos rūgštis
M-5	Etiloacetatas
A-1 – A-5	Atliekos
PR-1	Produktas

4.2 lentelė. Technologinės schemos prietaisų žymėjimai ir pavadinimai

BR-1 – BR-2	Bioreaktoriai
MA-1 – MA-2	Maišytuvai
S-1 – S-4	Išcentriniai siurbliai
F-1 – F-2	Filtrai
D-1	Džiovinimo kamera
H-1	Homogenizatorius
R-1	Rezervuaras
K-1	Kaitinimo kamera
Š-1	Aušinimo kamera
E-1	Ekstraktorius
CH-1	Chromatografinė kolonėlė
UF-1	Ultrafiltras
L-1	Liofilizatorius

IŠVADOS

1. Intensyviausiai kaliaus kultūras suformavo *in vitro* paprastosios jonažolės šaknys. Didžiausias kaliaus vidutinis prieaugis buvo pastebėtas MS terpėje su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) hormonais.
2. Tiriant antioksidacines paprastosios jonažolės savybes trimis metodais, rezultatai tarp jų buvo skirtingi. Didžiausią antioksidacinį aktyvumą DPPH metodu parodė jonažolė, augusi MS terpėje su 10 g/l manitolium (93,76 %). Naudojant FRAP metodą didžiausias antioksidacinis poveikis buvo pastebėtas jonažolėje, augusioje terpėje su 150 µmol/l salicilo rūgštimi (48,31 µmol/l), o redukcinio metodo metu intensyviausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo jonažolė, augusi su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) hormonais (1,549 A).
3. Efektyviausia terpė karotinoidų bei chlorofilo gavimui iš paprastosios jonažolės buvo MS terpė su 5 g/l manitolium (179,21 mg/100g).
4. Tyrimo rezultatai parodė, kad tik keletas *in vitro* augalų, padidino bendrą fenolinių junginių koncentraciją, lyginant su *in vivo* jonažole. Jonažolės, augusios MS terpėse su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) bei metilžasmonatu (100 µmol/l), sukaupė atitinkamai 24,05 % ir 20,82 % daugiau fenolinių junginių nei *in vivo* augalai.
5. Bakterijų *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris* augimą stabdė visi *in vitro* augusių jonažolių ekstraktai. Poveikis prieš *Escherichia coli* bakterijas buvo įvairus. Jonažolės, augusios MS terpė su 10 g/l manitolium, pasižymėjo vienu iš geriausių antibakteriniu aktyvumu.
6. Pasiūlyta flavonoidų išskyrimo technologinė schema, kuria remiantis rekomenduojama išskirti flavonoidus iš *in vitro* jonažolių, augusių tirtose terpėse.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. TUSEVSKI O et al. Callus cultures of *Hypericum perforatum* L. a novel and efficient source for xanthone production. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2016, 125 (2), 309–19. ISSN: 0167-6857.
2. BARNES J, ANDERSON LA, PHILLIPSON JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2001, 53 (5), 583–600. ISSN: 0022-3573.
3. SADDIQA Z, NAEEM I, MAIMOONA A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology.* 2010, 131 (3), 511–21. ISSN: 0378-8741.
4. FATHI H, EBRAHIMZADEH MA. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Hypericum perforatum* L. (st.John'swort). *Int. J. Forest, Soil and Erosion.* 2013, 3 (2), 68-72. ISSN 2251-6387.
5. RAMIREZ-ESTRADA K et al. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules.* 2016, 21 (2), 182. ISSN: 1420-3049.
6. TAKHTADZHIAN Armen. *Flowering plants* 2nd ed. New York: Springer 2009. ISBN 9781402096099.
7. KARPPINEN Katja. Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) – Precursors and genes involved. University of Oulu, Finland. 2010. ISBN 9789514263101.
8. CHANDRA K, PANDEY A. Apomixis: A Boon to Plant Breeding. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 2017, 6 (12), 2619–26. ISSN: 2319-7706.
9. CICCARELLI D, ANDREUCCI AC, PAGNI AM. The black nodules of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum*: Morphological, anatomical, and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Israel Journal of Plant Sciences.* 2001, 49, 33–40. ISSN: 2223-8980.
10. LAAKMANN G et al. St. John's Wort in Mild to Moderate Depression: The Relevance of Hyperforin for the Clinical Efficacy. *Pharmacopsychiat.* 1998, 31, 54-9. ISSN: 0176-3679.
11. *Hypericum Depression Trial Study Group.* Effect of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) in Major Depressive Disorder: A Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 2002, 287 (14), 1807-14. ISSN: 0098-7484.

12. BUTTERWECK V. Mechanism of Action of St John's Wort in Depression: What is Known? *CNS Drugs*. 2003, 17 (8), 539–62. ISSN: 1172-7047.
13. SCHEMPP CM et al. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *British Journal of Dermatology*. 2000, 142 (5), 979–84. ISSN: 0007-0963.
14. MEDINA MA et al. Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound? *Life Sciences*. 2006, 79 (2), 105–11. ISSN: 0024-3205.
15. UZBAY TI. *Hypericum perforatum* and substance dependence: a review. *Phytotherapy Research*. 2008, 22 (5), 578–82. ISSN: 0951-418X.
16. RUSSO E et al. *Hypericum perforatum*: Pharmacokinetic, Mechanism of Action, Tolerability, and Clinical Drug-Drug Interactions. *Phytotherapy Research*. 2014, 28 (5), 643–55. ISSN: 0951-418X.
17. ERNST E et al. Adverse effects profile of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Eur J Clin Pharmacol*. 1998, 54, 589-94. ISSN: 0031-6970.
18. BEHNKE K et al. *Hypericum perforatum* versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression. *Advances in Therapy*. 2002, 19 (1), 43–52. ISSN: 0741-238X.
19. THONG PSP et al. Clinical application of fluorescence endoscopic imaging using hypericin for the diagnosis of human oral cavity lesions. *British Journal of Cancer*. 2009, 101 (9), 1580–4. ISSN: 0007-0920.
20. KACEROVSKA D et al. Photodynamic Therapy of Nonmelanoma Skin Cancer with Topical *Hypericum perforatum* Extract—A Pilot Study. *Photochemistry and Photobiology*. 2008, 84 (3), 779–85. ISSN: 0031-8655.
21. SCHEMPP CM et al. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*. 2002, 21 (8), 1242–50. ISSN: 0950-9232.
22. VETOTTA L et al. In vitro antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure–activity study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007, 17 (6), 1544–8. ISSN: 0960-894X.
23. HUANG W-Y, CAI Y-Z, ZHANG Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*. 2009, 62 (1), 1–20. ISSN: 0163-5581.
24. LEE J et al. Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects. *British Journal of Nutrition*. 2005, 93 (06), 895-9. ISSN: 0007-1145.

25. KHODDAMI A, WILKES M, ROBERTS T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 2013, 18 (2), 2328–75. ISSN: 1420-3049.
26. ANDERSEN, Øyvind M ir MARKHAM, Kenneth R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor & Francis, 2006. ISBN 0849320216.
27. BARTLEY GE, SCOLNIK PA. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *American Society of Plant Physiologists*. 1995, 7, 1027-38.
28. RAINHA N et al. Antioxidant properties, total phenolic, total carotenoid and chlorophyll content of anatomical parts of *Hypericum foliosum*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, 5 (10), 1930-40. ISSN: 1996-0875.
29. BENEDI J et al. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. *Life Sciences*. 2004, 75 (10), 1263–76. ISSN: 0024-3205.
30. BUTTERFIELD D. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2001, 122 (9), 945–62. ISSN: 0047-6374.
31. DEHPOUR AA et al. Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas y Aceites*. 2009, 60 (4), 405–12. ISSN: 0017-3495.
32. PARK JW et al. Protective effect of serotonin on 6-hydroxydopamine- and dopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes and PC12 cells. *Neurochemistry International*. 2002, 40 (3), 223–33. ISSN: 0197-0186.
33. JANG M-H et al. Protective effect of *Hypericum perforatum* Linn (St. John's wort) against hydrogen peroxide-induced apoptosis on human neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters*. 2002, 329 (2), 177–80. ISSN: 0304-3940.
34. GIOTI EM et al. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chemistry*. 2009, 117 (3), 398–404. ISSN: 0308-8146.
35. KEDARE SB, SINGH RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 2011, 48 (4), 412–22. ISSN: 0022-1155.
36. WOJDYLO A, OSZMIANSKI J, CZEMERYYS R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 2007, 105 (3), 940–9. ISSN: 0308-8146.

37. AVATO P et al. A. Extracts from St John's wort and their antimicrobial activity. *Phytotherapy Research*. 2004, 18 (3), 230–2. ISSN: 0951-418X.
38. MOLOCHKO VA et al. The antistaphylococcal properties of plant extracts in relation to their prospective use as therapeutic and prophylactic formulations for the skin. *Vestn Dermatol Venerol*. 1990, (8), 54–6. ISSN: 0042-4609.
39. REICHLING J, WESELER A, SALLER R. A Current Review of the Antimicrobial Activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. 2001, 34 (1), 116–8. ISSN: 0176-3679.
40. MERAL GE, KARABAY NU. In vitro antibacterial activities of three *Hypericum* species from west Anatolia. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*. 2002, 6-10.
41. FRANKLIN G et al. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry*. 2009, 70 (1), 60–8. ISSN: 0031-9422.
42. CUSIDO RM et al. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnology Advances*. 2014, 32 (6), 1157–67. ISSN: 0734-9750.
43. CUSIDO RM et al. Improved Paclitaxel and Baccatin III Production in Suspension Cultures of *Taxus media*. *Biotechnology Progress*. 2002, 18 (3), 418-23. ISSN: 1520-6033.
44. MALIK S et al. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochemistry*. 2011, 46 (1), 23–34. ISSN: 1359-5113.
45. SHAKYA P et al. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017. ISSN: 0022-3573.
46. ZHAO J, DAVIS LC, VERPOORTE R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2005, 23 (4), 283–333. ISSN: 0734-9750.
47. SHARAFI E et al. Improvement of Hypericin and Hyperforin Production Using Zinc and Iron Nano-oxides as Elicitors in Cell Suspension Culture of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Advances in Therapy*. 2013, 19 (1), 43-52. ISSN: 0741-238X.
48. AKULA R, RAVISHANKAR GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2011, 6 (11), 1720–31. ISSN: 1559-2316.
49. GARCIA-BRUGGER A et al. Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *MPMI*. 2006, 19 (7), 711–24. ISSN: 0894-0282.

50. FERRARI S. Biological Elicitors of Plant Secondary Metabolites: Mode of Action and Use in the Production of Nutraceuticals. *MPMI*. 2006, 19 (7), 711–24. ISSN: 0894-0282.
51. TIRILLINI B et al. Induction of hypericins in *Hypericum perforatum* in response to chromium. *Fitoterapia*. 2006, 77 (3), 164–70. ISSN: 0367-326X.
52. GHORBANPOUR M, HADIAN J. Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Saturejakhuzestanica* grown in vitro. *Carbon*. 2015, 94, 749–59. ISSN: 0008-6223.
53. HALL R D. *Plant cell culture protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press. 1999. ISBN 0896035492.
54. SILVA BA et al. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*. 2005, 90 (1–2), 157–67. ISSN: 0308-8146.
55. YANG J, GUO J, YUAN J. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*. 2008, 41 (6), 1060–6. ISSN: 0023-6438.
56. MAŽEIKIENĖ I et al. Obelų pradinės dauginamosios medžiagos palaikymas ir genofondo virusologinė būklė Sodininkystės ir daržininkystės institute. *Sodininkystė ir dažininkystė*. [interaktyvus]. 2012, 31 (3–4). [žiūrėta 2018-05-10]. ISSN: 02364212.
57. DAUNORAS G. *Farmokopėjos straipsnių rinkinys*. Kaunas, Kauno medicinos universitetas, 2001. 203 p.
58. MAKKAR H P S, SIDDHURAJU P, BECKER K. Plant secondary metabolites. *Humana Press Inc.*, 2007, 74–9. ISBN: 9781461248286.
59. GARG N, GARG K L, MUKERJI K G. *Laboratory manual of food microbiology*. New Delhi: International publishing house. 2010. ISBN 9789380578019.
60. WANG J et al. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2015, 2:5. ISSN: 2197-4365.
61. ABDOLLAHPOOR M et al. In Vitro Shoot Proliferation of *Hypericum Perforatum* L. through Indirect and Direct Plant Regeneration. *Journal of Medicinal Plants and By-products*. 2017, 1, 81-89. ISSN: 2588-3739.
62. AYAN AK, ÇIRAK C, KEVSERO K. Effects of Explant Types and Different Concentrations of Sucrose and Phytohormones on Plant Regeneration and Hypericin Content in *Hypericum Perforatum* L. *Turk J Agric For*. 2005, 29, 197-204. ISSN: 1303-6173.
63. KHODARY, SEA. Effect of Salicylic Acid on the Growth, Photosynthesis and Carbohydrate Metabolism in Salt Stressed Maize Plants. *International journal of agriculture & biology*. 2004, 6 (1), 5-8. ISSN: 1560–8530.

64. MOHAREKAR ST et al. Effect of Salicylic Acid on Chlorophyll and Carotenoid Contents of Wheat and Moong Seedlings. *Photosynthetica*. 2003, 41 (2), 315–17. ISSN: 0300-3604.
65. SINGH S, PRASAD SM. Growth, Photosynthesis and Oxidative Responses of Solanum Melongena L. Seedlings to Cadmium Stress: Mechanism of Toxicity Amelioration by Kinetin. *Scientia Horticulturae*. 2014, 176, 1–10. ISSN: 1879-1018.
66. TRIFUNOVIC S et al. Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*. 1998, 49 (5), 1305–10. ISSN: 0031-9422.
67. FRANKLIN G et al. *Hypericum perforatum* plant cells reduce *Agrobacterium* viability during co-cultivation. *Planta*. 2008, 227 (6), 1401–8. ISSN: 0032-0935.

PRIEDAI

1 priedas. Maitinamosios Murashige ir Skoog terpės sudėtis

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

a – 50 ml tirpalo į terpę; b – 5 ml tirpalo į terpę