Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) augalų ekstraktų fitocheminio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas

Baigiamasis magistro projektas

Meda Kazakevičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2026

Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) augalų ekstraktų fitocheminio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Meda Kazakevičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Birutė Grybaitė

Recenzentė

Kaunas, 2026

Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Meda Kazakevičiūtė

Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) augalų ekstraktų fitocheminio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;

2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąraše;

3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);

4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Meda Kazakevičiūtė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Kazakevičiūtė, Meda. Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) augalų ekstraktų fitocheminio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: antioksidacinis aktyvumas, šalavijas, rozmarinas, kaliaus kultūra, melatoninas.

Kaunas, 2026. 67 p.

Santrauka

Vaistinis šalavijas (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapusis rozmarinas (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) – tai vaistiniai augalai, plačiai naudojami dėl antioksidacinėmis, antimikrobinėmis ir kitomis naudingomis savybėmis pasižyminčių fitocheminių junginių, pavyzdžiui fenolinių junginių ir terpenų. Juos šalavijas ir rozmarinas sintetina didelėmis koncentracijomis, tačiau natūraliomis sąlygomis jų sintezė priklauso nuo įvairių biotinių ir abiotinių veiksnių. *In vitro* kaliaus kultūrų technologija yra perspektyvi bioaktyviųjų augalinių metabolitų sintezės ir antioksidacinio aktyvumo didinimui bei stabilizavimui. Tyrimo tikslas buvo nustatyti ir palyginti džiovinto vaistinio šalavijo ir džiovinto ir liofilizuoto kvapiojo rozmarino *in vivo* lapų ekstraktų bei šių augalų *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktų fitocheminį aktyvumą. Taip pat tiriama įvairių augimo reguliatorių (1-naftilacto rūgšties, 3-indolilacto rūgšties, 6-benzilaminopurino, tidiazurono, kinetino ir melatonino) derinių ir koncentracijų įtaka šių augalų *in vitro* kaliaus kultūrų fitocheminiam aktyvumui.

Spektrofotometriniais metodais nustatytas vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vivo* ir *in vitro* kultūrų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, naudojant FRAP, DPPH, ABTS ir redukcinių savybių įvertinimo metodus. Taip pat įvertintas SOD antioksidacinio fermento aktyvumas bei bioaktyviųjų metabolitų (fenolinių junginių, flavonoidų, redukuoto glutationo, *L*-prolino ir malondialdehido) koncentracijos. Agaro difuziniu metodu įvertintas ekstraktų antibakterinis aktyvumas. Šalavijo ir rozmarino lapų kultūros *in vivo* bei šalavijo *in vitro* kaliaus kultūra, auginta su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,1 μM) pasižymėjo stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu. Didžiausias SOD aktyvumas nustatytas šalavijo *in vitro* kultūroje, formuotoje su BAP (0,2 mg/L) ir NAR (0,1 mg/L). Didžiausios bioaktyviųjų metabolitų koncentracijos nustatytos *in vivo* šalavijo kultūroje bei abiejų augalų *in vitro* kaliaus kultūrose su augimo reguliatoriais TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L). Šių augimo reguliatorių ir melatonino (0,1 μM) derinys abiejų augalų *in vitro* kultūrose lėmė dideles bioaktyviųjų metabolitų koncentracijas, didžiausias malondialdehido koncentracijas bei stipriausias antibakterines savybes.

Kazakevičiūtė, Meda. Evaluation and Comparison of the Phytochemical Activity of Extracts from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: antioxidant activity, sage, rosemary, callus culture, melatonin.

Kaunas, 2026. 67.

Summary

Sage (*Salvia officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) are widely used medicinal plants that produce large amounts of phytochemical compounds, such as terpenes and phenolic compounds. These compounds possess antioxidant, antimicrobial and other valuable properties, however, under natural conditions their synthesis depends on various biotic and abiotic factors. *In vitro* callus culture technology has high potential for bioactive plant metabolite synthesis as well as antioxidant activity enhancement and stabilization. The study evaluated and compared the phytochemical activity of *in vivo* leaf extracts of dried and freeze-dried rosemary as well as dried sage in addition to *in vitro* callus culture extracts of these plants. The influence of various combinations and concentrations of growth regulators (1-naphthaleneacetic acid, 3-indoleacetic acid, 6-benzylaminopurine, thidiazuron, kinetin and melatonin) on the phytochemical activity of *in vitro* callus cultures of these plants was also determined.

The antioxidant activity of the extracts was determined by spectrophotometric methods, using FRAP, DPPH, ABTS and reducing power assays. The activity of an antioxidant enzyme SOD and the concentrations of bioactive metabolites (phenolic compounds, flavonoids, reduced glutathione, *L*-proline and malondialdehyde) were also evaluated. The antibacterial properties of the extracts were determined by agar diffusion method. *In vivo* cultures of sage and rosemary leaves and *in vitro* callus culture of sage grown with TDZ (0.5 mg/L), IAA (0.1 mg/L) and melatonin (0.1 μM) were characterized as having the highest antioxidant activity. The highest SOD activity was determined in *in vitro* culture of sage developed with BAP (0.2 mg/L) and NAA (0.1 mg/L). The highest concentrations of bioactive metabolites were observed in the *in vivo* sage culture and *in vitro* callus cultures of both plants grown with TDZ (0.5 mg/L) and IAA (0.1 mg/L). The combination of these growth regulators and melatonin (0.1 μM) in *in vitro* cultures of both plants resulted in high concentrations of bioactive metabolites, the highest concentrations of malondialdehyde and the strongest antibacterial properties.

Turinys

Lentelių sąrašas **8**
Paveikslų sąrašas **9**
Santrumpų ir terminų sąrašas **11**
Įvadas **13**
1. Literatūros apžvalga **14**
1.1. Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) botaninis apibūdinimas 14
1.1.1. Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) apibūdinimas 14
1.1.2. Kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) apibūdinimas 15
1.2. Bioaktyvieji metabolitai ir jų specifika tiriamuose augaluose 15
1.2.1. Bioaktyviųjų augalinių metabolitų antioksidacinio aktyvumo apibūdinimas 16
1.2.2. Fenoliniai junginiai 17
1.2.3. Antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys fermentai ir aminorūgštys 18
1.2.4. Glutationas 20
1.3. Kaliaus kultūros augalų biotechnologijoje 21
1.3.1. *In vitro* kaliaus kultūrų susiformavimui svarbūs veiksniai 22
1.3.2. Augalų augimo reguliatoriai *in vitro* kaliaus kultūrų susiformavime 23
1.3.3. Melatoninas kaip augimo reguliatorius *in vitro* kaliaus kultūrų formavime 24
1.4. Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) biotechnologinės panaudojimo galimybės 25
1.4.1. Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) biotechnologinės panaudojimo galimybės 25
1.4.2. Kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) biotechnologinės panaudojimo galimybės 26
1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas 27
2. Medžiagos ir tyrimų metodai **28**
2.1. Tyrimo objektas 28
2.2. Tyrimui naudoti reagentai ir aparatūra 28
2.3. Maitinamoji terpė ir augimo reguliatoriai 28
2.4. Antioksidacinio aktyvumo ir antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas 30
2.4.1. Redukcinių savybių įvertinimas 30
2.4.2. Antioksidacinių savybių įvertinimas FRAP metodu, naudojant 2,4,6-tripiridil-*s*-triaziną 31
2.4.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu 31
2.4.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu 32
2.4.5. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas 33
2.5. Bioaktyviųjų metabolitų koncentracijos įvertinimas 34
2.5.1. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas 34
2.5.2. Bendrosios flavonoidų koncentracijos įvertinimas 34
2.5.3. *L*-prolino koncentracijos įvertinimas 35
2.5.4. Redukuoto glutationo koncentracijos įvertinimas 35
2.5.5. Malondialdehido koncentracijos įvertinimas 36
2.6. Tiriamųjų ekstraktų antibakterinių savybių prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* įvertinimas 36
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas **38**
3.1. Antioksidacinio aktyvumo ir antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas 38

3.1.1. Redukcinių savybių įvertinimas 38
3.1.2. Antioksidacinių savybių įvertinimas FRAP metodu, naudojant 2,4,6-tripiridil-*s*-triaziną ... 39
3.1.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu 40
3.1.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu 42
3.1.5. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas 43
3.2. Bioaktyviųjų metabolitų koncentracijos įvertinimas 44
3.2.1. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas 44
3.2.2. Bendrosios flavonoidų koncentracijos įvertinimas 46
3.2.3. *L*-prolino koncentracijos įvertinimas 47
3.2.4. Redukuoto glutationo koncentracijos įvertinimas 48
3.2.5. Malondialdehido koncentracijos įvertinimas 50
3.3. Tiriamųjų ekstraktų antibakterinių savybių prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* įvertinimas 50
4. Rekomendacijų dalis 54
Išvados 56
Literatūros sąrašas 57

Lentelių sąrašas

1.1 lentelė. Pagrindinės biologinį aktyvumą turinčių augalinių antrinių metabolitų klasės ir jų poklasiai. Adaptuota pagal Twaij ir Hasan'as [19] 16
2.1 lentelė. Tyrimui naudoti reagentai ir medžiagos 28
2.2 lentelė. Tyrimui naudota aparatūra 28
2.3 lentelė. Tyrimo *in vitro* kaliaus kultūroms formuoti naudotos MS mitybinės terpės sudėtis [96] 29
2.4 lentelė. Tyrimui naudotos *Salvia officinalis* L. ir *Rosmarinus officinalis* L. *in vitro* kaliaus kultūros su auginimui naudota mitybine terpe ir augimo reguliatoriais 30
4.1 lentelė. Technologinės schemos dalių sąrašas 55

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. Vaistinis šalavijas (lot. *Salvia officinalis* L.) [10] 14
1.2 pav. Kvapusis rozmarinas (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) [13] 15
1.3 pav. Fenolinių junginių medijuojamas ROS neutralizavimas. a) HAT mechanizmas; b) SET mechanizmas. *AOH* žymi fenolinį junginį, *R*• – ROS laisvąjį radikalą. Adaptuota pagal Platzer *et al.* ir Zeb [25, 26] 17
1.4 pav. Pagrindinių *Rosmarinus officinalis* L. sintetinamų fenolinių junginių cheminė struktūra: karnozino rūgštis (A), karnozolis (B), kavos rūgštis (C) [7] 17
1.5 pav. Flavonoidų cheminė struktūra. A ir B žymi benzeno žiedus, C – heterociklinį žiedą, turintį deguonies atomą [36] 18
1.6 pav. Askorbato-glutationo biocheminio ciklo schema. Adaptuota pagal Hasanuzzaman'ą *et al.* ir Broad'ą *et al.* [50, 52] 20
2.1 pav. Tyrimui naudotų *in vitro* kaliaus kultūrų pavyzdžiai 30
2.2 pav. DPPH radikalo reakcijos su antioksidacine molekule (A) mechanizmas [102] 32
2.3 pav. Apibendrinta antibakterinių savybių tyrimo schema. Adaptuota pagal Jonuškienę *et al.* [100] 37
3.1 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų redukcinių savybių įvertinimo rezultatai 38
3.2 pav. Geležies(II) heptahidrato kalibracinė kreivė 39
3.3 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, įvertintas FRAP metodu, išreikštas geležies(II) jonų ekvivalentais ($Fe^{2+}E$) 40
3.4 pav. Trolokso kalibracinė kreivė 41
3.5 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, įvertintas DPPH metodu, išreikštas trolokso ekvivalentais (TE) 41
3.6 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, įvertintas ABTS metodu 42
3.7 pav. Albumino kalibracinė kreivė 43
3.8 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų antioksidacinio fermento SOD aktyvumas 44
3.9 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė 45
3.10 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų bendra fenolinių junginių koncentracija, išreikšta tanino rūgšties ekvivalentais (TRE) 45
3.11 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė 46
3.12 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų flavonoidų koncentracija, išreikšta kvercetino ekvivalentais (KE) 47
3.13 pav. *L*-prolino kalibracinė kreivė 47
3.14 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų *L*-prolino koncentracija 48
3.15 pav. Redukuoto glutationo kalibracinė kreivė 49
3.16 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų redukuoto glutationo koncentracija 49
3.17 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų malondialdehido koncentracija 50

3.18 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų bei antibiotiko ciprofloksacino antibakterinės savybės prieš *Escherichia coli* 51
3.19 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų bei antibiotiko ciprofloksacino antibakterinės savybės prieš *Bacillus subtilis* 52
3.20 pav. Stipriausią antibakterinį aktyvumą prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* turintys mėginiai. Mėginio slopinimo zonų skersmens vidurkis pažymėtas raudonai 53
4.1 pav. Aparatūrinė schema, skirta fenoliniais junginiais turtingų ekstraktų gamybai iš vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) kaliaus kultūrų..... 55

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

ABTS – 2,2‘-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninės rūgšties) diamonio druska;

aps./min – apsisukimai per minutę;

BAP – 6-benzilaminopurinas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;

DTNB – 5,5‘-ditiobis(2-nitrobenzenkarboksirūgštis);

FRAP – geležies jonų redukcijos antioksidacinė galia (*angl.* ferric ion reducing antioxidant power);

GSH – redukuotas glutationas;

HAT – vandenilio atomo pernaša (*angl.* hydrogen atom transfer);

IAR – 3-indoliacto rūgštis;

Kin – kinetinas;

LB – Luria-Bertani;

MDA – malondialdehidas;

Mel – melatoninas;

MS – Murashige ir Skoog;

NADPH – redukuotas nikotinamidadenindinukleotido fosfatas;

NAR – 1-naftilacto rūgštis;

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

s. m. – sausa masė;

SET – vieno elektrono pernaša (*angl.* single electron transfer);

SOD – superoksido dismutazė;

TDZ – tidiazuronas;

TNB – 5-tio-2-nitrobenzenkarboksirūgštis;

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-*s*-triazinas;

Tris – tris(hidroksimetil)aminometanas;

Troloksas – 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilo rūgštis;

UV – ultravioletinė.

Įvadas

Vaistinis šalavijas (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapusis rozmarinas (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) – tai visame pasaulyje paplitę *Lamiaceae* šeimos augalai, nuo seno naudojami tradicinėse praktikose dėl įvairių terapinių savybių. Mokslinės pažangos dėka žinoma, jog šiuose augaluose antioksidacines, antimikrobines, priešuždegimines ir kitas vertingas savybes lemia įvairūs sintetinami bioaktyvieji metabolitai, ypač skirtingos grupės fenolinių junginių [1, 2]. Dėl pastaruoju metu augančios natūralios kilmės kosmetikos, maisto ir vaistinių produktų bei ingredientų paklausos, šalavijas ir rozmarinas turi vis didėjančias biotechnologines pritaikymo galimybes [3].

Didžioji dalis bioaktyviųjų junginių augaluose yra antrinio metabolizmo produktai. Skirtingai nei pirminiai metabolitai, kurie yra būtini augimui, antrinius metabolitus augalai sintetina apsaugai biotinio ir abiotinio streso metu. Tad, natūraliomis sąlygos augalų bioaktyviųjų metabolitų sintezė ir kaupimasis priklauso nuo įvairių aplinkos veiksnių, kurie yra nepastovūs ir sunkiai nuspėjami. Augalų biotechnologijos srities mokslininkai ieško būdų, kaip padidinti ir stabilizuoti šių aukštos pridėtinės vertės junginių sintezę augalinėse sistemose, siekiant juos gaminti pramoniniu mastu [4]. Viena iš šiuo metu vystomų technologijų yra *in vitro* kaliaus kultūrų sistema, kurioje antrinio metabolizmo biocheminiai keliai yra indukuojami fitohormonais ir kitais augimo reguliatoriais, tokiais kaip melatoninas bei natūralūs ir sintetiniai auksinai ir citokininai. Naudojant tinkamus augimo reguliatorių derinius ir koncentracijas stebimas didesnis antioksidacinės sistemos aktyvumas bei didesnės fenolinių junginių (pvz., fenolinių rūgščių) ir kitų bioaktyviųjų metabolitų koncentracijos augalų kultūrose [4, 5]. Dėl natūraliai didelių antrinių metabolitų koncentracijų vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino augaluose, šios rūšys yra itin perspektyvūs objektai *in vitro* kaliaus kultūrų tyrimams [6, 7].

Vis dėlto molekuliniai mechanizmai, kuriais augimo reguliatoriai stimuliuoja antrinio metabolizmo biocheminis kelius, nėra gerai žinomi, todėl ši sritis reikalauja tolesnių eksperimentinių tyrimų. Be to, nepaisant šalavijo ir rozmarino biocheminio potencialo, tyrimų, nagrinėjančių įvairių augimo reguliatorių poveikį bioaktyviųjų metabolitų sintezei ir antioksidacinės sistemos veiklai *S. officinalis* L. ir *R. officinalis* L. *in vitro* kaliaus kultūrose, yra nedaug.

Darbo tikslas – nustatyti ir palyginti vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino ekstraktų, gautų iš natūraliomis sąlygomis (*in vivo*) augintų lapų ir skirtingų *in vitro* kaliaus kultūrų, fitocheminį aktyvumą.

Darbo uždaviniai:

1. nustatyti antioksidacinį aktyvumą ir antioksidacinių fermentų aktyvumą tiriamųjų augalų *in vivo* lapų ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose;
2. nustatyti bioaktyviųjų metabolitų koncentracijas tiriamųjų augalų lapų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose;
3. įvertinti tiriamųjų kultūrų ekstraktų antibakterinį aktyvumą;
4. palyginti tiriamųjų augalų *in vivo* lapų ir *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktų fitocheminio aktyvumo skirtumus bei tendencijas.

1. Literatūros apžvalga

Šiame skyriuje analizuojama mokslinė literatūra, susijusi su vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) botatinėmis, cheminėmis ir biologinėmis savybėmis. Didelis dėmesys kreipiamas į aukštos pridėtinės vertės bioaktyviuosius metabolitus ir antioksidacinį aktyvumą, kuriuo pasižymi šie augalai. Taip pat aptariamas tiriamųjų augalų panaudojimas *in vitro* kaliaus kultūrų technologijoje bei biotechnologinės pritaikymo galimybės.

1.1. Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) botaninis apibūdinimas

Vaistinis šalavijas ir kvapusis rozmarinas priklauso notrelinių (lot. *Lamiaceae*) šeimai, kuri apima apie 200 genčių ir 7756 rūšis. Šios šeimos augalai pasižymi kompleksiniu fitocheminiu profiliu ir net 13,7 % *Lamiaceae* rūšių (1059 rūšys) priskiriamos vaistiniams augalams. Šios šeimos augalai labiausiai paplitę Vidužemio jūros regione ir Azijoje ir yra naudojami vietinių kultūrų tradicinėje medicinoje, ritualinėse praktikose ir kulinarijoje. Vėliau *Lamiaceae* augalus pradėta kultivuoti visame pasaulyje ir naudoti maisto, kosmetikos bei modernios medicinos pramonėje [8, 9]. Šiame literatūros apžvalgos poskyryje plačiau aptariama tiriamųjų augalų morfologija ir kiti botaniniai ypatumai.

1.1.1. Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) apibūdinimas

Tai daugiametis viršžalis krūmiškas žolinis augalas, turintis vieną pagrindinį keturkampį plaukuotą stiebą ir daug mažų šakų (1.1 pav.). Augalas gali užaugti iki 60–70 cm aukščio. Lapai pailgi, plaukuoti, dažniausiai 2,5–6,0 cm ilgio, nuo šviesiai žalios iki sidabriškai pilkos spalvos. Lapai yra vertingiausia šio augalo dalis ir yra naudojami maisto pramonėje, kosmetikoje (išgaunant eterinį aliejų), medicinoje. Iš 900 *Salvia sp.* priklausančių rūšių, *S. officinalis* L. pasižymi didžiausia eterinio aliejaus koncentracija – iki ~2,8 % sausos masės (toliau – s. m.). Šio augalo ekstraktai nuo senų laikų naudojami įvairių uždegiminių reakcijų, medžiagų apykaitos sutrikimų bei psichikos sutrikimų gydymui [6].

1.1 pav. Vaistinis šalavijas (lot. *Salvia officinalis* L.) [10]

Augalas žydi vasaros pradžioje, jo žiedai yra baltos ir violetinės spalvos, iki 3 cm ilgio. Žiedai pasižymi nektaro gausa ir intensyviu kamparo kvapu, tad pritraukia daug vabzdžių apdulkintojų. Tai ypač svarbu, kadangi augalo reprodukcijai būdingas kryžminis apdulkinimas. Tai diploidinis augalas (2n = 14), subrandinantis 4 sėklas viename vaisiuje. Šis augalas toleruoja nepalankias aplinkos

sąlygas, tokias kaip sausrą ir uolėtą dirvožemį, tačiau geriausias augimas fiksuojamas šiltame, saulėtame klimate, šiek tiek rūgštiniame dirvožemyje. Siekiant gauti aukštos kokybės eterinį aliejų, derlių rekomenduojama nuimti prieš augalui žydint. Esant tinkamoms sąlygoms, šalavijo lapų biomasės derlius gali siekti 1750–2250 kg/ha per metus [6, 11].

1.1.2. Kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) apibūdinimas

Kvapusis rozmarinas – tai visžalis, tankus krūminis augalas, itin šakotas, dažniausiai apie 1 m aukščio, žydi violetinės-baltos spalvos žiedais (1.2 pav.). Jam būdingi 1–4 cm ilgio siauri kieti lapai, kurių viršutinė dalis tamsiai žalia, o apatinė balkšva dėl tankaus plaukelių sluoksnio. Plaukeliuose slypi liaukos, per kurias vyksta eterinio aliejaus sekrecija. Eterinis aliejus skirtas apsisaugoti nuo sausringų Vidužemio jūros regiono, iš kurio kilęs šis augalas, klimato sąlygų [12]. Istoriškai kvapusis rozmarinas naudojamas kaip maistą konservuojantis agentas, įvairių uždegiminių ir infekcinių ligų gydymui, kosmetinėms procedūroms, dažniausiai arbatos arba eterinio aliejaus pavidalu. Eterinio aliejaus koncentracija šiame augale – apie 1,8 % s. m. [1].

1.2 pav. Kvapusis rozmarinas (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) [13]

Rūšis yra diploidinė (2n = 24) ir gan polimorfiška (pvz., lapų pločiu, žiedų skaičiumi žiedyne). Nors augalas gali vykdyti savidulką, apdulkinimas dažniausiai vyksta kryžminiu būdu [14]. Augalui kultivuoti tinkamiausios sąlygos yra neutralaus pH dirvožemis, didelis kiekis saulės šviesos ir nedidelis kiekis drėgmės [12].

1.2. Bioaktyvieji metabolitai ir jų specifika tiriamuose augaluose

Bioaktyvieji metabolitai – tai natūraliai susidarantys biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai, kuriuos sintetina augalai, mikroorganizmai bei gyvūnai. Augalų bioaktyvieji metabolitai yra fitocheminiai junginiai, susidarantys kaip antrinio metabolizmo produktai (antriniai metabolitai) [15, 16]. Pirminio metabolizmo produktai, tokie kaip baltymai, angliavandeniai ir riebalai, yra bendri visoms biologinėms sistemoms, tačiau antriniai metabolitai gali būti specifiški rūšiai dėl konkrečios filogenetinės grupės evoliucijos proceso [17]. Augalai sintetina šiuos junginius apsaugai nuo patogenų ir nepalankių aplinkos sąlygų bei ekologinėms sąveikoms vykdyti (pvz., pritraukti vabzdžius apdulkintojus, vykdyti konkurencines sąveikas dėl aplinkos išteklių su kitais augalais). Tiesa, nedidelė dalis pirminio metabolizmo produktų, pavyzdžiui aminorūgštis *L*-prolinas, taip pat pasireiškia biologiniu aktyvumu [18].

Bioaktyvieji metabolitai yra naudingi žmonių sveikatai, nes geba reguliuoti ir moduliuoti įvairius metabolinius procesus – pasižymi antimikrobinėmis, antivirusinėmis, priešgrybelinėmis, priešvėžinėmis, antimutageninėmis, priešuždegiminėmis savybėmis [15, 16]. Šių junginių savybės priklauso ne tik nuo augalo rūšies, bet ir nuo cheminės struktūros. Pavyzdžiui, junginio šoninės grandinės ilgio ir sotumo laipsnio, funkcinių grupių skaičiaus ir padėties anglies skelete, stereochemijos ir kt. [17]. Pagrindinės biologinį aktyvumą turinčių antrinių metabolitų klasės ir poklasiai nurodyti 1.1 lentelėje. Įvairūs tiriamųjų augalų bioaktyvieji metabolitai, jų veikimo mechanizmai bei paplitimas *Salvia officinalis* L. ir *Rosmarinus officinalis* L. toliau aptariami šiame poskyryje.

1.1 lentelė. Pagrindinės biologinį aktyvumą turinčių augalinių antrinių metabolitų klasės ir jų poklasiai. Adaptuota pagal Twaij ir Hasan'as [19]

Bioaktyviųjų augalinių antrinių metabolitų klasės	**Bioaktyviųjų augalinių antrinių metabolitų poklasiai**
Terpenai	Monoterpenai, diterpenai, triterpenai, tetraterpenai, sesterterpenai, seskviterpenai, politerpenai
Fenoliniai junginiai	Kumarinai, ligninai, flavonoidai, izoflavonoidai, taninai, fenolinės rūgštys
Azotą turintys junginiai	Alkaloidai, cianogeniniai glikozidai, nebaltyminės aminorūgštys
Sierą turintys junginiai	Gliukozinolatai, fitoaleksinai, tioninai, defensinai

1.2.1. Bioaktyviųjų augalinių metabolitų antioksidacinio aktyvumo apibūdinimas

Antioksidacinis aktyvumas yra viena pagrindinių bioaktyviųjų metabolitų savybių, lemiančių jų terapinį poveikį, pavyzdžiui, veikimą prieš patogeninius mikroorganizmus ar uždegimines reakcijas. Antioksidacinis aktyvumas – tai gebėjimas neutralizuoti reaktyviąsias deguonies formas (toliau – ROS). Jos apima itin reaktyvius tarpinius produktus ir cheminius junginius, susidarančius iš deguonies dujų (O_2). Pagrindinės ROS yra hidroksilo radikalas (OH•), vandenilio peroksidas (H_2O_2), superoksido anijonas ($O_2^{\bullet-}$) ir singletinis deguonis ($^1O_2$) [20].

Normaliomis sąlygomis ROS susidaro kaip aerobinio kvėpavimo šalutinis produktas ląstelių organelėse – daugiausia chloroplastuose, mitochondrijose ir peroksisomose. Tačiau esant biotiniam ir/ar abiotiniam stresui, ROS gamyba padidėja ir taip pat vykdoma antrinėse vietose, tokiose kaip endoplazminis tinklas, ląstelės membrana ir ląstelės sienelė. Esant tokioms sąlygoms ląstelė patiria oksidacinį stresą – būseną, kuomet ROS sintezė viršija augalo antioksidacinių sistemų pajėgumą jas neutralizuoti. Oksidacinis stresas ląstelėje sukelia lipidų peroksidaciją, fermentų inaktyvaciją, DNR pažaidas ar net ląstelės mirtį ir gali būti stebimas vertinant atitinkamus žymenis. Pavyzdžiui, malondialdehidą (toliau – MDA), kuris yra lipidų peroksidacijos produktas ir gali indikuoti fosfolipidinių membranų pažaidas ląstelėje. ROS susidarymas taip pat sukelia baltymų potransliacines modifikacijas, sumažina fotosintezės pajėgumą bei lemia transkripcijos, transliacijos ir epigenetinius pokyčius. ROS neutralizavimui ląstelėse augalai pasitelkia fermentinius antioksidantus, kurie pašalina ROS konkrečiuose biocheminiuose keliuose, ir nefermentinius antioksidantus, kurie tiesiogiai neutralizuoja ROS arba veikia kaip ląstelės signalinių kelių moduliatoriai [20, 21, 22].

1.2.2. Fenoliniai junginiai

Šios grupės antrinių metabolitų augalai sintetina daugiausiai. Tai junginiai, turintys benzeno žiedus su viena ar daugiau hidroksilo grupių. Šiai grupei priklausantys cheminiai junginiai yra labai įvairūs – nuo gan paprastų fenolinių molekulių (pvz., kavos rūgštis) iki itin polimerizuotų junginių [23]. Šiuo metu yra žinomi septyni fenolinių junginių, kaip antioksidantų augalų ir žinduolių ląstelėse, veikimo mechanizmai [24]. Vienas pagrindinių yra tiesioginis antioksidacinis efektas, kuris gali būti dviejų rūšių (1.3 pav.). Pirmu variantu ROS prisijungia fenolinio junginio hidroksilo grupės vandenilio atomą (*angl.* hydrogen atom transfer; toliau – HAT). Kitas būdas – pirmiausia ROS prisijungia vieną elektroną, o vandenilio atomo prisijungimas vyksta prieš, po arba elektrono pernašos metu (*angl.* single electron transfer, toliau – SET). Abiejų variantų rezultatas – sąlyginai stabilus fenoksido radikalas, susidaręs dėl rezonansinės stabilizacijos. Tad, kuo daugiau hidroksilo radikalų turi fenolinis junginys, tuo stipresnės jo antioksidacinės savybės [25, 26]. Kitas gan plačiai ištirtas antioksidacinis mechanizmas – metalų chelavimas. Kai kurie fenoliniai junginiai gali chelatuoti pereinamųjų metalų jonus, pvz. Fe^{2+}, Cu^{2+}. Šie metalai yra atsakingi už ROS susidarymą Fenton'o ir Haber-Weiss'o reakcijų metu. Prisijungęs prie šių metalų jonų, antioksidantas inhibuoja ROS susidarymą, taip mažindamas ląstelės oksidacinį stresą [24].

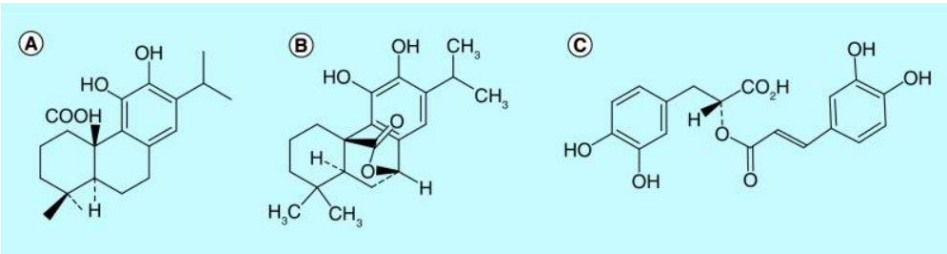
a) $AOH + R\bullet \rightarrow AO\bullet + RH$

b) $AOH + R\bullet \rightarrow AOH^{\bullet+} + R^-$

$AOH^{\bullet+} \rightarrow AO\bullet + H^+$

1.3 pav. Fenolinių junginių medijuojamas ROS neutralizavimas. a) HAT mechanizmas; b) SET mechanizmas. *AOH* žymi fenolinį junginį, *R*• – ROS laisvąjį radikalą. Adaptuota pagal Platzer *et al.* ir Zeb [25, 26]

Vaistinis šalavijas ir kvapusis rozmarinas sintetina įvairius fenolinius junginius sąlyginai dideliais kiekiais. Pavyzdžiui, pagrindiniai fenoliniai junginiai, kuriuos sintetina *Rosmarinus officinalis* L. yra rozmarino ir karnozino rūgštys bei karnozolis (1.4 pav.) [7]. Malek ir Odeh [27] *R. officinalis* L. etanolio ekstrakte nustatė 1,799 mg/g s. m. fenolinių junginių koncentraciją. Tuo tarpu Tuniso mokslininkai nustatė 137 mg GAE/g s. m. koncentraciją sausame metanolio ekstrakte [28]. El Gabbas *et al.* nustatė, jog *S. officinalis* L. etanolio ekstrakte fenolinių junginių koncentracija yra 120 mg GAE/g s. m., Farhar'as *et al.* – 161 mg GAE/g s. m. metanolio ekstrakte, o rumunų mokslininkai – 65 mg GAE/g s. m. etanolio ekstrakte [29, 30, 31].

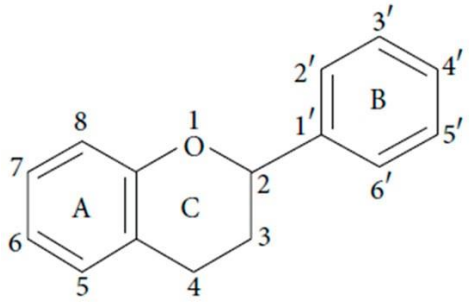


1.4 pav. Pagrindinių *Rosmarinus officinalis* L. sintetinamų fenolinių junginių cheminė struktūra: karnozino rūgštis (A), karnozolis (B), kavos rūgštis (C) [7]

Fenolinės rūgštys. Tai fenoliniai junginiai, turintys karboksilo funkcinę grupę, ir sudarantys didžiąją dalį augalų sintetinamų fenolinių junginių. Šios rūgštys retai randamos laisvoje formoje, dažniausiai

jos egzistuoja amidų, esterių arba glikozidų pavidalu. Fenolinės rūgštys yra itin lengvai pasisavinamos žarnyno ląstelių, nes yra mažos molekulinės masės lyginant su kitais fenoliniais junginiais. Dėl didelio biologinio prieinamumo bei antioksidacinių, priešuždegiminių ir kardioprotekcinių savybių jos yra plačiai tiriamos [32]. *Lamiaceae* šeimos augaluose rozmarino, karnozino ir kavos rūgštys yra sintetinamos gausiausiai [9]. Taip pat žinoma, jog *S. officinalis* L. gausiai sintetina chlorogeninę ir salvianolines rūgštis, o *R. officinalis* L. pasižymi didelėmis ursolinės ir salvianolinių rūgščių koncentracijomis [16, 28, 33].

Flavonoidai. Flavonoidai šiuo metu yra vieni plačiausiai tiriamų antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių augalinių antrinių metabolitų. Šie fenoliniai junginiai lemia augalo spalvą, kvapą bei skonį ir yra sudaryti iš dviejų benzeno žiedų, sujungtų heterocikliniu žiedu, kuris turi deguonies atomą (1.5 pav.). Pagal šią struktūrą bendra flavonoidų formulė yra C_6-C_3-C_6. Priklausomai nuo žiedų jungčių, antrojo žiedo struktūros ir visų žiedų hidroksilinimo bei glikozilinimo, flavonoidai yra skirstomi į poklasius – flavan-3-oliai, flavonai, flavonoliai, flavononai, izoflavonai ir antocianinai [34]. Pastarieji yra pigmentai, suteikiantys augalui raudoną, violetinę ar mėlyną spalvas; šiuo metu jie yra naudojami maisto pramonėje ir turi didelę ekonominę vertę [35].



1.5 pav. Flavonoidų cheminė struktūra. A ir B žymi benzeno žiedus, C – heterociklinį žiedą, turintį deguonies atomą [36]

Nors flavonoidų biologinis prieinamumas yra mažesnis, nei, pvz., fenolinių rūgščių, jie yra naudingi dėl didelės struktūrinės įvairovės ir paplitimo augaluose. Didesnė struktūrinė įvairovė reiškia įvairesnes biologines savybes, pavyzdžiui, benzeno ir heterociklinio žiedų susijungimas skirtingose pozicijose lemia lengvesnį arba sudėtingesnį elektronų ar vandenilio atomų atidavimą ROS neutralizavimui [34]. Vienas pagrindinių flavonoidų veikimo mechanizmų žmogaus organizme yra uždegiminių reakcijų slopinimas inhibuojant arachidono rūgšties sintezę. Daugelis flavonoidų gali sumažinti arachidono rūgšties gamybą ir slopinti fermentų fosfolipazės A_2, ciklooksigenazės ir azoto oksido sintazės aktyvumą. Dėl šio slopinimo organizme sumažėja pagrindinių uždegiminių junginių, tokių kaip prostaglandinai, leukotrienai ir azoto oksidas, sintezė [37]. Pagrindiniai *S. officinalis* L. sintetinami flavonoidai yra luteolinas, apigeninas, kaempferolis, rutinas ir jų dariniai [2, 30, 33]. *R. officinalis* L. pasižymi kvercetino, kaempferolio, apigenino, luteolino, genkvanino ir hesperidino sinteze [16, 28, 38].

1.2.3. Antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys fermentai ir aminorūgštys

Fermentai. Esant per didelei ROS koncentracijai augalo ląstelėje, fermentinė antioksidacinė sistema yra aktyvuojama pirmiausiai. Kone pagrindiniai fermentai šioje sistemoje yra superoksido dismutazės (toliau – SOD). Jie katalizuoja superoksido anijono ($O_2^{\bullet -}$) virsmą į deguonį ir vandenilio peroksidą (H_2O_2), vykstant disproporcijos reakcijai. Tiesa, vandenilio peroksidas, nors ir mažiau reaktyvus, vis

tiek yra kenksmingas. Šis junginys gali veikti kaip signalinė molekulė, veikianti tam tikrų genų raišką fiziologinėmis ir patologinėmis sąlygomis, taip reguliuojant signalų perdavimą uždegiminių ir kitų procesų metu [22, 39]. Be to, danų mokslininkai nustatė, jog vandenilio peroksidas taip pat gali veikti kaip užląstelinė signalinė molekulė, difunduojanti per membraninius transportinius baltymus akvaporinus [40].

Superoksido anijonas gyvuose organizmuose gali susidaryti bet kurioje ląstelės vietoje, kur yra elektronų pernašos grandinė: mitochondrijose, chloroplastuose, peroksisomose, mikrosomose, glioksisomose, apoplastuose, citozolyje. Manoma, jog chloroplastai, mitochondrijos ir peroksisomos yra svarbiausi ROS šaltiniai augaluose. Fosfolipidinės membranos, kurios gaubia šias organeles, yra nepralaidžios superoksido anijonams, todėl yra itin svarbu, kad šie toksiški radikalai būtų pašalinti organelės viduje [41]. SOD fermentai yra randami visose šiose organelėse ir turi skirtingus metalų kofaktorius, kurie veikia kaip elektronų donorai superoksido anijonui ir regeneruojasi viso katalizinio proceso metu. Vario-cinko SOD (Cu-Zn SOD) yra randama citoplazmoje, chloroplastuose, peroksisomose, ląstelės branduolyje ir membranoje. Tai pagrindinė SOD augalų ląstelėse, kurioje cinkas atlieka tik struktūrinę funkciją, o varis veikia kaip elektronų donoras. Ekstraląstelinė SOD (Ec-SOD), kurios kofaktoriai taip pat yra varis ir cinkas, yra sintetinama tarpląstelinėje matricoje ir į užląstelinę erdvę. Mangano SOD (Mn-SOD) yra produkuojama citozolyje ir signaliniais peptidais nukreipiama į mitochondrijas bei peroksisomas ir veikia jose. Ši SOD būdinga ir žmonėms, ir augalams. Geležies SOD (Fe-SOD) būdinga prokariotams ir eukariotams, augaluose randama chloroplastuose [39, 41].

Tyrimai rodo, jog *Lamiaceae* augalų preparatai skatina SOD aktyvumą žinduolių ląstelėse esant intoksikacijai. Pavyzdžiui, peles veikiant *Salvia officinalis* L. žiedų ekstraktu ir tuomet sukeliant kepenų ir inkstų pažaidas etanoliu, stebimas nepakitęs SOD aktyvumas lyginant su kontroline grupe, kurioje SOD aktyvumas sumažėjo [42].

Apart SOD, augalų fermentinėje antioksidacinėje sistemoje dalyvauja ir kiti fermentai. SOD katalizės metu susidariusį vandenilio peroksidą peroksisomose esantis fermentas katalazė suskaido iki vandens ir deguonies. Askorbato peroksidazė atlieka tą pačią funkciją, tačiau veikia esant mažesnėms vandenilio peroksido koncentracijoms ir atlieka lemiamą vaidmenį esant vidutinio lygio oksidaciniam stresui ląstelėje. Askorbato peroksidazė augalų ląstelėse randama keliomis izoformomis chloroplastuose (stromose ir tilakoiduose), mitochondrijose, citozolyje ir peroksisomose. Taip pat išskiriama glutationo peroksidazių grupė, kurios fermentai redukuoja vandenilio peroksidą ir lipidų hidroperoksidus iki netoksiškų junginių [22].

Aminorūgštys. Šioje grupėje išsiskiria baltyminė aminorūgštis *L*-prolinas. Tai žinomas augalų osmoprotektorius ir osmolitas, kaupiamas itin dideliais kiekiais esant nepalankioms aplinkos sąlygoms (sausrai, aukštam druskingumui, UV radiacijai ir kt.). Tokių sąlygų metu nukrenta augalo turgorinis slėgis, kas skatina šios aminorūgšties kaupimąsi – *L*-prolino koncentracija gali būti iki 100 kartų didesnė nei normaliomis sąlygomis. Augalas gali kaupti didelius kiekius *L*-prolino dėl šio junginio cheminių savybių – tai geriausiai vandenyje tirpstanti aminorūgštis, didžiąją laiko dalį esanti cviterjoninėje būsenoje, t. y. turinti silpnus neigiamus ir teigiamus krūvius karboksirūgšties ir amino funkcinėse grupėse atitinkamai [43]. *L*-prolinas taip pat pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Ši aminorūgštis ypač efektyviai neutralizuoja hidroksido radikalus, taip apsaugodama ląsteles nuo lipidų peroksidacijos. Taip pat veikia kaip šaperoninis baltymas, gebantis stabilizuoti baltymus streso sąlygų metu, neleidžiant jiems agreguotis ar skatindamas specifinį susilankstymą. Tokiu būdu ląstelės

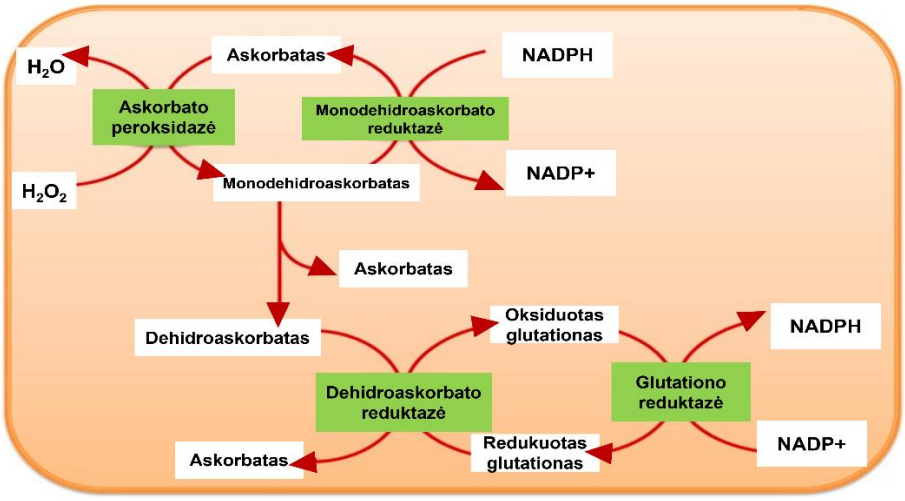
baltymai tampa atsparesni ROS poveikiui. *L*-prolinas taip pat prisideda prie superoksido anijonų neutralizavimo, aktyvuodamas SOD ir kitus antioksidacinius fermentus [44, 45]. Pavyzdžiui, *S. officinalis* L. augalas *in vivo* paveiktas didelėmis NaCl ir kobalto chlorido ($CoCl_2$) koncentracijomis, rodė didelį antioksidacinių fermentų askorbato peroksidazės ir glutationo peroksidazės aktyvumą, siejamą su dideliu prolino kaupimu [46].

Kitos aminorūgštys, kurios tiesiogiai ar netiesiogiai veikia esant oksidaciniam stresui augalo ląstelėje, yra izoleucinas ir metioninas bei nebaltyminės aminorūgštys, pvz., alfa-, beta- ir gama-aminosviesto rūgštys [47, 48]. Tiesa, tyrimų, tiriančių šių aminorūgščių veikimo mechanizmus ir savybes augaluose, yra mažiau nei *L*-prolino tyrimų.

1.2.4. Glutationas

Glutationas – tai mažos molekulinės masės tripeptidinė tiolio molekulė, sudaryta iš cisteino, glutamo rūgšties ir glicino aminorūgščių subvienetų. Tai vienas svarbiausių nefermentinių antioksidantų, randamas beveik visose augalų ląstelių organelėse ir dalyvaujantis įvairiuose ląsteliniuose procesuose – ksenobiotikų detoksikavime, ląstelės ciklo reguliavime, apoptozėje ir kt. Glutationas ląstelėje egzistuoja kaip redukuotas glutationas (toliau – GSH), kuris yra vienas svarbiausių ROS neutralizuojančių agentų, ir oksiduota disulfido forma, kuri, veikiant fermentui glutationo reduktazei, virsta GSH. Normaliomis sąlygomis GSH yra labiau paplitęs nei oksiduota jo forma [49, 50].

GSH yra tiesioginis ROS slopintojas, cisteino subviento tiolo grupei veikiant kaip elektronų donorui [51]. Netiesiogiai GSH mažina ląstelės oksidacinį stresą dalyvaudamas askorbato-glutationo biocheminame cikle. Jame skirtingais fermentiniais ir nefermentiniais antioksidantais neutralizuojamas vandenilio peroksidas, nuolat regeneruojant antioksiduojančius junginius (1.6 pav.). Pirmiausia fermentas askorbato peroksidazė naudoja askorbatą, siekiant redukuoti vandenilio peroksidą iki vandens, susidarant tarpiniam produktui monodehidroaskorbatui. Pastarasis arba tiesiogiai verčiamas atgal į askorbatą veikiant monodehidroaskorbato reduktazei ir NADPH, arba oksiduojamas į askorbatą ir dehidroaskorbatą. Tuomet pastarasis redukuojamas į askorbatą veikiant dehidroaskorbato reduktazei ir GSH. Tuomet glutationo reduktazė redukuoja oksiduotą glutationą atgal į aktyvią formą (GSH) nuo NADPH priklausomoje reakcijoje. Šis ciklas yra būtinas ląstelės oksidacijos-redukcijos homeostazei palaikyti [22, 50].



1.6 pav. Askorbato-glutationo biocheminio ciklo schema. Adaptuota pagal Hasanuzzaman'ą *et al.* ir Broad'ą *et al.* [50, 52]

Dar vienas GSH veikimo mechanizmas yra sunkiųjų metalų chelavimas ir ksenobiotinių medžiagų neutralizavimas. Metalai, įskaitant ir sunkiuosius metalus, augalų ląstelėse sukelia didelį ROS susidarymą. Beveik visi metalai stipriai jungiasi prie cisteino aminorūgšties tiolio grupės, todėl jis yra efektyvus metalų chelatorius. Tačiau prisijungus oksidaciją-redukciją gebančiam vykdyti metalui, cisteinas yra greitai oksiduojamas, o redukuotas metalas gali vykdyti Fenton'o reakciją, susidarant itin toksiškiems hidroksilo radikalams. Dėl GSH struktūros, šioje molekulėje cisteino tiolio grupė yra mažiau prieinama ir reaktyvi, todėl Fenton'o reakcijos rizika yra maža. Tad, GSH cheluoja šiuos metalus, taip pat apsaugodamas jautrius daug cisteino turinčius baltymus. Tokiu pačiu būdu GSH gali prisijungti ksenobiotines medžiagas, tokias kaip pesticidai bei sintetiniai maisto priedai, ir skatinti jų pašalinimą iš ląstelės [53].

Šiuo metu GSH sulaukia daug dėmesio maisto technologijų ir medicinos sričių tyrimuose. Dėl antioksidacinių savybių jis yra perspektyvus maisto konservantas. GSH galėtų pakeisti šiuo metu plačiai naudojamus sintetinius konservantus, tuo pačiu metu padidinant maisto funkcionalumą. Nustatyta, jog žmogui suvartojus šio junginio, jo koncentracija organizme tiesiogiai nepadidėja, bet yra skatinama GSH sintezė ląstelėse, taip pagerinant įgimtą ląstelių atsaką į oksidacinį stresą [54]. Taip pat yra nemažai tyrimų apie GSH panaudojimą vyno pramonėje, siekiant apsaugoti vyną ar vynuogių misą nuo oksidacijos keliamos žalos naudojant, pavyzdžiui, sausų mielių starterines kultūras papildytas GSH [55]. Medicinos srities tyrimuose kontempliuojamas egzogeninio GSH naudojimas plaučių, kepenų, inkstų, kraujagyslių ligų gydime, ypač lėtinių ligų atveju, didinant nuolatinio oksidacinio streso kamuojamos imuninės sistemos atsaką [54]. Pavyzdžiui, pelių, patyrusių cheminį kepenų pažeidimą, kepenų homogenatuose nustatyta sumažėjusi GSH koncentracija ir fermento glutationo reduktazės, vykdančios oksiduoto glutationo redukciją, aktyvumas. Eksperimentinės grupės, kuri prieš sukeliant kepenų pažaidas buvo veikiama rozmarino eteriniu aliejumi (10 mg/kg doze), kepenų homogenatuose stebėtas šių rodiklių atsistatymas į normalią būseną [56]. Kitame tyrime, pelės buvo veikiamos *S. officinalis* L. žiedų ekstraktu ir tuomet joms sukeliamos kepenų ir inkstų pažaidos etanoliu. Tiriamoje grupėje, prieš intoksikaciją veikiamoje šalavijo ekstraktu, stebimas lipidų peroksidacijos neutralizavimas, palaikant normalias GSH koncentracijas [42].

1.3. Kaliaus kultūros augalų biotechnologijoje

Augalų kalius – tai neorganizuota nediferencijuotų parenchiminių ląstelių masė, natūraliai susidaranti infekcijos ar žaizdos gijimo metu, kuomet paviršinės pažeisto audinio ląstelės yra stimuliuojamos dalytis. Daugelis kaliaus ląstelių yra totipotentinės, t. y. galinčios regeneruoti visą augalą. Kalius yra labai įvairus, gali būti visiškai nediferencijuotas arba pasižymėti tam tikru organų regeneracijos laipsniu (pvz., šakninis, ūglinis, embrioninis kalius). Kaliaus kultūras galima kultivuoti *in vitro* iš įvairių augalo eksplantų (pvz., lapų, šaknų, stiebo) ar net vienos ląstelės [4, 57]. Šios ląstelių kultūros *in vitro* dažniausiai kultivuojamos ant kietos terpės, o pramoniniame lygmenyje – skystoje terpėje bioreaktoriuose. Vieną *in vitro* kultūrą, reguliariai (kas 4–5 savaites) persėjant ant šviežios terpės, teoriškai galima laikyti gyvybingą neribotą laiko tarpą [3, 4].

Kaliaus kultūros *in vitro* yra perspektyvi sistema antrinių metabolitų, įskaitant ir aukštos pridėtinės vertės bioaktyviuosius metabolitus, gamybai, jų sintezę indukuojant įvairiais faktoriais. Antrinių metabolitų kaupimąsi šiose kultūrose lemia ląstelinio streso sukelta tam tikrų biocheminių kelių aktyvacija bei metabolizmo pokyčiai dėl ląstelių dediferenciacijos. Lyginant su *in vivo* augalo auginimu pramoniniams tikslams, kaliaus kultūrose tiksliniai augaliniai metabolitai yra generuojami

nepriklausomai nuo klimato sąlygų, kurios varijuoja kiekvienais metais, ar dirvožemio sudėties. Tad, gaunamas pastovesnis produktas, kas yra itin svarbu pramonėje. Taip pat *in vitro* kaliaus kultūroms negresia vabzdžių ar patogeninių mikroorganizmų atakos, kadangi jos kultivuojamos steriliomis sąlygomis; aukštos pridėtinės vertės junginius galima išskirti iš nykstančių augalų, taip nedarant neigiamos įtakos bioįvairovei. Šių kultūrų kultivavimas taip pat reikštų, jog bioaktyvieji metabolitai gaunami tvaresniu būdu, kadangi *in vitro* kaliaus kultūroms formuoti nereikalingi dirbamos žemės plotai ir didelis vandens kiekis [4].

1.3.1. *In vitro* kaliaus kultūrų susiformavimui svarbūs veiksniai

Nediferencijuotos kaliaus ląstelės neturi nusistovėjusio metabolizmo, apsauginių audinių, todėl yra itin jautrios aplinkos veiksniams. Biotechnologiniame kontekste tai yra ir iššūkis, ir privalumas. Formuojant šias ląstelių kultūras *in vitro* reikia itin atsakingai parinkti ir pritaikyti kultivavimo sąlygas. Veiksniai, tokie kaip mitybinės terpės sudėtis, temperatūra, pH, formuoja kaliaus ląstelių metabolizmą, tad ir antrinių metabolitų kiekį [4].

Vienas iš svarbiausių veiksnių yra mitybinės terpės sudėtis. Populiarios mitybinės terpės *in vitro* kaliaus kultūrų auginimui yra *Chu* (N6), *Lloyd & McCown* terpė sumedėjusiems augalams (WPM), *Gamborg* (B5) [58]. Bene plačiausiai naudojama mitybinė terpė yra Murashige ir Skoog (toliau – MS) terpė, sukurta 1962 metais. Tai itin kompleksinė terpė, apimanti makro- ir mikroelementus: N-K-Cl-Ca-S-Mg-P-Fe-Mn-B-Zn-Mo-I-Cu-Co, anglį, azotą ir fosforą (azoto ir fosforo santykis 40:1 atitinkamai) [59]. Tiesa, MS terpė dažnai optimizuojama, kadangi *in vitro* sąlygos kaliaus kultūroms auginti šiek tiek skiriasi priklausomai nuo augalo rūšies [4].

MS terpės sudėtis yra paremta daugiau nei per 100 metų sukauptomis augalų fiziologijos žiniomis. Augalams reikalingos maistinės medžiagos gali būti išskiriamos į tris grupes: pagrindinius makroelementus (N, K, P), antrinius makroelementus (Ca, Mg, S) ir mikroelementus (Fe, Mn, B, Mo, Zn, I, Cu, Co) [60]. Makroelementai yra struktūriniai komponentai bei dalyvauja įvairiose metabolinėse reakcijose. Pavyzdžiui, azotas yra pagrindinis baltymų ir kitų svarbių makromolekulių komponentas, jo koncentracija terpėje turi būti antra pagal dydį po anglies. Itin svarbi azoto cheminė forma, ypač siekiant išgauti antrinius metabolitus: didelė amonio jonų koncentracija slopina antrinių metabolitų susidarymą, o amonio azoto mažinimas jų koncentraciją didina. Aukštos pridėtinės vertės antrinių metabolitų sintezei *in vitro* kaliaus kultūrose taip pat kenkia didelė fosfatų koncentracija – ji skatina ląstelių augimą ir pirminį metabolizmą, o maža fosfatų koncentracija – antrinio metabolizmo produktų susidarymą. Kalis, nors nėra struktūrinis elementas, yra reikalingas augalų ląstelių kultūros vystymuisi. Tai itin mobilus jonas augaluose, todėl atlieka lemiamą vaidmenį reguliuojant ląstelinį transportą. Taip pat *in vitro* augalų ląstelių kultūroms, skirtingai nei *in vivo* augalams, reikalingas išorinis anglies šaltinis. Tam yra tinkami įvairūs tirpūs angliavandeniai, tačiau dažnai pasirenkama sacharozė dėl nedidelės kainos ir atsparumo autoklavavimui [4, 59].

Mikroelementai yra daugelio su hormonais ir ląsteliniu stresu susijusių procesų kofaktoriai, tad yra svarbūs, pavyzdžiui, antioksidaciniuose mechanizmuose [60]. Geležis (Fe), manganas (Mn) ir cinkas (Zn) yra vienos pagrindinių antioksidacinių fermentų grupių – superoksido dismutazių – kofaktoriai [41]. Geležis taip pat dalyvauja elektronų pernašos grandinėje fotosintezės ir kvėpavimo metu. Tačiau šis mikroelementas yra netirpus vandenyje ir dėl to yra sunkiai pasisavinamas augalų ląstelėse, todėl ląstelių kultūrose yra naudojamas cheluotu pavidalu, tokiu kaip geležies etilendiamintetraacto rūgštis (Fe-EDTA) [61]. MS terpė taip pat gali būti papildoma tam tikromis aminorūgštimis, vitaminais ir

kitais priedais, kurie kryptingai veikia ląstelių metabolizmą. Pavyzdžiui, vitaminas tiaminas yra esminis angliavandenių apykaitos kofaktorius ir tiesiogiai dalyvauja kai kurių aminorūgščių biosintezėje. Aminorūgštys, tokios kaip glicinas ir cisteinas, nėra originalios MS terpės receptūros dalis, tačiau šiais laikais dažnai naudojamos padidinti azoto kiekį terpėje. Beje, redukuotas organinis azotas aminorūgščių pavidalu yra lengviau pasisavinamas augalų ląstelėse nei neorganinis azotas [62].

Optimalus pH mitybinei terpei prieš sterilizavimą yra 5,6–5,8 ir yra gaunamas naudojant rūgštį bei šarmą. pH vertės, mažesnės nei 4,5 ir didesnės nei 7,0, stipriai slopina augalų audinių augimą ir vystymąsi *in vitro*. Terpės pH krenta po autoklavavimo (maždaug 0,3–0,5) ir nuolat kinta ląstelių kultūros kultivavimo metu dėl oksidacijos reakcijų bei ląstelėms pasisavinant ir išskiriant įvairius junginius. Jei pH nukrenta žemiau 5,0, reikalinga nauja terpė, kadangi toks pH neleidžia sustingti terpės standikliui agarui, o esant didesniam nei pH 6,0, sutrinka maistinių medžiagų įsisavinimas, pvz., bazinėje terpėje sunkiau pasisavinamas azotas amonio jonų pavidalu [62].

Taip pat verta išskirti šviesos įtaką kaliaus kultūrų kultivavimui *in vitro*. Šviesa skatina fotosintezę ir ląstelių diferenciaciją, taip pat didesnis šviesos intensyvumas gali sukelti stiprų ROS generavimą kaliaus ląstelėse, taip skatinant antrinių metabolitų formavimąsi [58, 59]. Įtakos bioaktyviųjų metabolitų sintezei turi ir šviesos bangos ilgis – pavyzdžiui, *Chicorium spp.* kaliaus kultūroje *in vitro* nustatyta didesnė flavonoidų koncentracija inkubuojant raudonoje šviesoje nei mėlynoje [63]. Tamsa, priešingai, neskatina ląstelių diferenciacijos, todėl kai kurioms augalų rūšims kaliaus iniciacijos etapas vykdomas tamsoje. Nustatyta, kad kaliaus formavimas tamsoje taip pat gali lemti plonesnių augalo ląstelių sienelių susidarymą, taip pagerinant įvairių mitybinės terpės junginių prasiskverbimą į ląstelę. Tad, priklausomai nuo augalo rūšies ir *in vitro* kultūros kultivavimo tikslo, parenkamas fotoperiodas (pvz., 16/8 val. šviesos/tamsos atitinkamai, 24 val. šviesos), šviesos intensyvumas ir bangos ilgis [58].

1.3.2. Augalų augimo reguliatoriai *in vitro* kaliaus kultūrų susiformavime

Pagrindiniai augimo reguliatoriai augaluose yra fitohormonai, t. y. augalų sintetinami cheminiai junginiai, reguliuojantys įvairius augalų augimo, vystymosi, adaptacinio atsako į stresą (įskaitant ir oksidacinį stresą) procesus. Fitohormonai veikia sintezės vietoje arba yra pernešami į kitas augalo ląstelės vietas ir, manoma, jog kontroliuoja beveik kiekvieną augalo vystymosi fazę – nuo ląstelių dalijimosi, diferenciacijos, embriogenezės iki ląstelių senėjimo. Tad nenuostabu, jog ir *in vitro* kaliaus kultūrų auginime šie junginiai turi svarbią prasmę. Klasikinius fitohormonus galima išskirti į kelias grupes – auksinai, citokininai, giberelinai ir etenas. Jie veikia kaip pagrindiniai augimą ir vystymąsi reguliuojantys agentai. Naujos kartos fitohormonai, tokie kaip abscizo rūgštis, žazmono rūgštis, stringolaktonai, dalyvauja augalų apsaugos nuo aplinkos veiksnių mechanizmuose [64].

Auksinai ir citokininai, jų pridėjus į mitybinę terpę, indukuoja daugelio augalų rūšių kaliaus susidarymą *in vitro* [65]. Auksinai – tai karboksirūgščių klasei priklausantys junginiai, susidarantys triptofano katabolizmo metu ir veikiantys visus su augalų augimu ir vystymusi susijusius procesus [66]. Pavyzdžiui, 3-indoliacto rūgštis (toliau – IAR) yra svarbi ląstelių dalijimosi, ilgėjimo bei lapų gyslotumo ir šaknų formavimosi procesuose [62, 64]. *In vitro* kaliaus kultūrų technologijoje taip pat dažnai naudojami sintetiniai auksinai. Pavyzdžiui, 1-naftilacto rūgštis (toliau – NAR) yra artimiausias sintetinis atitikmuo IAR pagal atliekamas funkcijas ir pasižymi geresniu cheminiu stabilumu lyginant

su IAR. Kiti sintetiniai natūralių auksinų analogai, tokie kaip 2,4-D ar pikloramas, gali skatinti endogeninių auksinų sintezę augalų ląstelėse [59].

Citokininai – tai adenino dariniai, skatinantys augalų ląstelių dalijimąsi, chloroplastų biogenezę, ūglių diferenciaciją bei ląstelės senėjimo lėtinimą. Augaluose citokininai daugiausia sintetinami šaknų galuose ir besivystančios stadijos sėklose [64]. *In vitro* augalų ląstelių kultūrose šie junginiai skatina ūglių ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją bei stimuliuoja antrinių metabolitų, ypač fenolinių junginių, sintezę [67]. Pavyzdžiui, bulgarų mokslininkai nustatė, jog 6-benzilaminopurinas (toliau – BAP) turėjo reikšmingą įtaką rozmarino ir kavos rūgšties susidarymui *Lamiaceae* šeimai priklausančiame *Nepeta nuda* augale, auginamame *in vitro* [68]. Tiesa, BAP yra sintetinis citokininas. Natūralūs citokininai yra brangūs ir dauguma jų yra nestabilūs, pavyzdžiui, sintetinio citokinino kinetino natūralus atitikmuo yra itin jautrus oksidazių ir dehidrogenazių poveikiui. Tad, šiais laikais *in vitro* augalų ląstelių technologijoje daugiausiai naudojami sintetiniai citokininai, o populiariausi iš jų yra BAP, kinetinas ir tidiazuronas [69].

In vitro kaliaus kultūrų formavime itin svarbus egzogeninio auksino ir citokinino santykis. Priklausomai nuo koncentracijų, jie gali veikti arba antagonistiškai, arba sinergiškai. Aukštas auksino ir citokinino santykis skatina šaknų ląstelių dauginimąsi ir diferenciaciją, susidarant šakniniam kaliui, o aukštas citokinino ir auksino santykis – ūglių regeneraciją. Optimalus auksino ir citokinino santykis skatina nediferencijuoto ir neorganizuoto kaliaus formavimąsi [57]. Tyrimų, nurodančių konkrečius šalavijo ar rozmarino *in vitro* kaliaus kultūrų auksinų-citokininų derinius ir koncentracijas, nėra daug. Nair *et al.* [70] didžiausią *Rosmarinus officinalis* L. kaliaus biomasę nustatė mitybinę terpę papildžius 0,2 mg/L BAP ir 0,2 mg/L 2,4-D. Brazilų mokslininkai tyrė įvairių auksinų-citokininų derinių ir koncentracijų įtaką šalavijo *Salvia moorcroftiana in vitro* kaliaus kultūrose. Jie nustatė, jog optimalus variantas biomasei ir fenoliniams junginiams gauti yra 1 mg/L 2,4-D auksino ir 1 mg/L BAP, taip pat pridėjus 1,5 g/L melatonino [71].

1.3.3. Melatoninas kaip augimo reguliatorius *in vitro* kaliaus kultūrų formavime

Melatoninas (N-acetil-5-metoksitriptaminas) yra indolamino neurohormonas, kuris *in vitro* augalų technologijoje veikia kaip augimo reguliatorius. Augaluose šis junginys reguliuoja cirkadinius ritmus ir *in vitro* morfogenezę. Nustatyta, jog dėl didelio struktūrinio panašumo su IAR, melatoninas atlieka svarbų vaidmenį augalų fiziologijoje, šaknų vystymosi ir ląstelių dalijimosi procesuose. Endogeninį melatonino kiekį stipriai veikia šviesa, kadangi augalai yra linkę šį junginį kaupti tamsoje [5, 72].

Egzogeninis melatoninas yra svarbus esant biotiniam ir abiotiniam stresui – mažina neigiamą šalčio, didelių druskų koncentracijų, sausros ir sunkiųjų metalų poveikį. Vadinasi, melatoninas veikia esant oksidaciniam stresui ir dalyvauja augalų antioksidaciniuose mechanizmuose. Pavyzdžiui, šis junginys didina mitochondrijų elektronų pernašos grandinės efektyvumą, taip sumažinant elektronų nutekėjimą ir laisvųjų radikalų susidarymą. Jis taip pat aktyvuoja antioksidacinių fermentų, tokių kaip askorbato peroksidazė, katalazė ir peroksidazė, aktyvumą *in vitro* ir *in vivo* augalų sistemose [73, 74]. Beje, melatoninas taip pat gali imituoti, moduliuoti ir modifikuoti auksino ir citokinino santykį *in vitro* augalų audiniuose [5].

Tyrimai su įvairių augalų *in vivo* ir *in vitro* kultūromis apsaugines melatonino funkcijas sieja su bioaktyviųjų antrinių metabolitų (ypač fenolinių junginių) kaupimusi. Tiesa, tikslūs veikimo mechanizmai nėra išsiaiškinti. *Linus album in vitro* kaliaus kultūroje, augintoje su melatoninu, stebimas fenilpropanoido biocheminio kelio fermentų aktyvumo padidėjimas ir fenolinių junginių –

fenolinių rūgščių, flavonoidų ir lignanų, koncentracijos padidėjimas. Fenilpropanoido biocheminis kelias yra vienas iš metabolinių mechanizmų, lemiančių fenolinių junginių susidarymą augalų ląstelėse. Tad, galima kelti hipotezę, jog melatoninas teigiamai veikia fenolinių junginių biocheminių kelių fermentų aktyvumą. Tame pačiame tyrime stebėtas azoto monoksido ir fitohormono salicilo rūgšties koncentracijos padidėjimas kultūrose augintose su melatoninu. Žinoma, jog abu šie junginiai, simuliuodami oksidacinį stresą, gali indukuoti fenolinių junginių formavimąsi. Tad, dar vienas melatonino veikimo mechanizmas galėtų būti fenolinių junginių sintezės ir kaupimosi skatinimas per specifinių signalinių ir stresą simuliuojančių molekulių susidarymą [75].

Tyrimai su *Lamiaceae* šeimos augalais pateikia teigiamus rezultatus. Baziliko (lot. *Ocimum basilicum* L.) *in vitro* kaliaus kultūroje, augintoje su 100 μM melatonino, stebimas reikšmingas fenolinių junginių koncentracijos padidėjimas lyginant su kontrole be melatonino. Ypač rozmarino rūgšties koncentracijos – ji padidėjo apie penkis kartus [76]. Tyrime su *Rosmarinus officinalis* L. kaliaus kultūromis, 100 μM melatonino apie tris kartus padidino rozmarino rūgšties koncentraciją, o 200 μM – dvigubai padidino kavos rūgšties koncentraciją, lyginant su kontroliniu mėginiu [77]. Tyrime su *Salvia officinalis* L. *in vitro* kaliaus kultūromis, 100 μM melatonino taip pat teigiamai veikė rozmarino rūgšties koncentraciją – fiksuotas 75 % padidėjimas, lyginant su kontrole be melatonino. Šiame tyrime taip pat stebimas kitos grupės bioaktyviųjų antrinių metabolitų – terpenų – reikšmingas koncentracijos padidėjimas kultūrose, kultivuotose su melatoninu [78].

1.4. Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) biotechnologinės panaudojimo galimybės

Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino, kaip ir daugelio *Lamiaceae* šeimos augalų, pritaikymo galimybės yra itin plačios. Tai lemia ne tik dėl aukštą pridėtinę vertę turintis cheminis profilis, bet ir paplitimas visame pasaulyje bei šiuo metu vis didėjanti natūralių produktų paklausa. Didelės vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino bioaktyviųjų metabolitų koncentracijos lemia platų spektrą farmakologinių savybių, todėl šie augalai yra vertingi vaistų ir kosmetikos pramonėje. Taip pat tam tikri šių augalų sintetinami cheminiai junginiai yra perspektyvūs ingredientai funkcionaliam maistui ir produktų konservavimui maisto pramonėje bei pesticidai žemdirbystėje [79]. Tikslios terapinės savybės, jas lemiantys junginiai ir jų pritaikymo galimybės toliau aptariami šiame poskyryje.

Kadangi bioaktyvieji metabolitai sudaro tik 1–3 % augalo sausosios masės, yra skirtingų cheminių struktūrų bei pasižymi skirtingu cheminiu ir biologiniu aktyvumu, jų išskyrimo būdas yra itin svarbus. Šiuo metu šie junginiai pramoniniams tikslams naudojami ekstraktų, eterinių aliejų arba miltelių pavidalu. Tradiciniai ekstrakcijos metodai apima maceraciją, Soxhlet'o ekstrakciją ir distiliavimą garais. Šiais metodais fitocheminiai junginiai ekstrahuojami naudojant vandenį arba organinius tirpiklius. Pažangūs ekstrakcijos metodai yra paremti ne cheminių, o fizinių veiksnių panaudojimu, pavyzdžiui, mikrobangų, ultragarso, superkritinių skysčių ekstrakcija [3]. Naudojant džiovintą vaistinių augalų biomasę miltelių pavidalu, populiarėja liofilizavimo technika. Neseniai atliktuose tyrimuose, lyginant skirtingus *Lamiaceae* augalų (tarp jų ir šalavijo bei rozmarino) biomasės džiovinimo metodus, liofilizuotose mėginiuose antioksidacinis aktyvumas buvo stipriausias [79, 80].

1.4.1. Vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) biotechnologinės panaudojimo galimybės

Visų pirma, *Salvia officinalis* L. pasižymi antibakterinėmis ir priešgrybelinėmis savybėmis. Antibakterinės savybės sulaukia itin daug dėmesio dėl visame pasaulyje aktualios atsparumo antibiotikams problemos. Šalavijo ekstraktai bei eteriniai aliejai yra veiksmingi prieš patogenines

gram-neigiamas ir gram-teigiamas bakterijas, pvz., *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* ir *Staphylococcus epidermidis* [81]. Taip pat stebimas šio augalo eterinių aliejų veikimas prieš žmogaus oportunistines mieles *Candida albicans* bei *Candida glabarata*. Beje, pastarasis mikroorganizmas yra itin atsparus įprastam priešgrybeliniam gydymui [82]. Manoma, jog pagrindiniai junginiai, suteikiantys antimikrobinį aktyvumą yra terpenai ir terpenoidai, tokie kaip kamparas ir 1,8-cineolis [81]. Antimikrobinis aktyvumas taip pat svarbus maisto pramonėje, nes suteikia konservuojančias savybes. Pavyzdžiui, tyrimo su šviežiomis kiaulienos dešrelėmis metu, vaistinio šalavijo ekstraktas ir eterinis aliejus reikšmingai sumažino lipidų oksidaciją ir mikroorganizmų augimą, tuo pačiu metu pagerinant organoleptines savybes [83].

Taip pat nustatytas teigiamas *S. officinalis* L. poveikis neurologinei sistemai. Bioaktyvieji antriniai metabolitai, tokie kaip flavonoidai ir fenolinės rūgštys (pvz., rozmarino rūgštis), turi antidepresinį, neurotropinį ir priešuždegiminį poveikius, todėl teigiamai veikia kognityvinę sistemą. Pavyzdžiui, *S. officinalis* L. bioaktyvieji metabolitai gali veikti prieš beta-amiloidus, kurie, manoma, sukelia Alzheimerio ligą [84]. Klinikiniame tyrime su Alzheimerio liga sergančiais pacientais, įvertintas vaistinio šalavijo etanolio ekstrakto veiksmingumas. Šiame tyrime pacientai vartojo po 60 lašų ekstrakto per parą ir po keturių mėnesių tiriamųjų kognityvinės funkcijos pagerėjo, vertinant pagal Alzheimerio ligos ir klinikinės demencijos vertinimo skales [85].

Vaistinio šalavijo ekstraktuose esantys flavonoidai ir kiti fenoliniai junginiai turi teigiamą įtaką medžiagų apykaitos sutrikimų, tokių kaip diabetas ir hiperlipidemija, gydime. Pavyzdžiui, etanolinis šalavijo lapų ekstraktas sumažino trigliceridų ir cholesterolio kiekį serume pelėms, sergančioms streptozotocino sukeltu antro tipo diabetu [86]. Klinikinio tyrimo su žmonėmis, sergančiais hiperlipidemija ir diabetu, metu nustatytas reikšmingas vandeninio *S. officinalis* L. lapų ekstrakto poveikis, stebint sumažėjusį trigliceridų, bendrojo cholesterolio, mažo ir labai mažo tankio lipoproteinų ir gliukozės kiekį kraujyje [87].

Salvia officinalis L. pasižymi ne tik šiame skyrelyje aptartu terapiniu poveikiu, bet ir antimutageninėmis, priešvėžinėmis, antinociceptinėmis, antivirusinėmis ir kitomis savybėmis. Šis platus farmakocheminių savybių profilis parodo puikų šalavijo pritaikomumą medicinos ir farmacijos pramonėje bei leidžia manyti, jog šis augalas nėra iki galo ištirtas ir gali būti tolimesnių tyrimų objektas [86].

1.4.2. Kvapiojo rozmarino (lot. *Rosmarinus officinalis* L.) biotechnologinės panaudojimo galimybės

Rosmarinus officinalis L. pasižymi panašiomis farmakocheminėmis savybėmis kaip *Salvia officinalis* L. Pavyzdžiui, kvapiojo rozmarino antimikrobinės, priešuždegiminės ir antioksidacinės savybės gali būti pritaikomos kosmetikos pramonėje. Vienas iš pagrindinių rozmarino privalumų odos priežiūros priemonių gamyboje yra antioksidacinis aktyvumas. Rozmarino fenoliniai junginiai neutralizuoja laisvuosius radikalus, kurie greitina odos senėjimą pažeisdami ląstelių struktūras, tokias kaip kolagenas ir elastinas. Todėl dermokosmetikos produktai, papildyti rozmarino ekstraktu, gali sumažinti smulkias raukšles ir hiperpigmentaciją, sudarant apsauginį barjerą nuo aplinkos veiksnių, pvz., UV spinduliuotės. Rozmarino priešuždegiminis poveikis yra naudingas gydant uždegimines odos ligas, tokias kaip aknė, egzema ir rožinė – fenoliniai junginiai mažina uždegiminių citokinų susidarymą, todėl stebimas odos paraudimo, tinimo ir kitų simptomų atslūgimas [88].

Rozmarino ekstraktas yra pripažintas maisto produktų konservantas. Nuo 2008 metų Europos maisto saugos tarnyba (EFSA) rozmarino ekstraktą laiko maisto priedu (žymėjimas – E392) dėl jame esančių antioksidacinių junginių, ypač fenolinių junginių karnozolio ir karnozino rūgšties. Šiuo metu jis naudojamas kaip konservantas tokiuose produktuose kaip dehidratuotas pienas, bevandeniai riebalai ir aliejai, riešutų sviestas bei mėsos gaminiai [89, 90]. Rozmarino ekstrakto kaip maisto priedo naudojimas taip pat didina maisto funkcionalumą, kadangi ekstrakte esantys priešuždegiminėmis ir lipofilinėmis savybėmis pasižymintys junginiai, pvz., alfa-pinenas, mažina virškinamojo trakto uždegimines reakcijas [91].

Susidomėjimas šiuo augalu taip pat auga žemės ūkio sektoriuje – tiriamas kvapiojo rozmarino ekstraktų poveikis prieš įvairius biotinius veiksnius. Tyrime su tabaku (lot. *Nicotiana tabacum* L.) vandeninis rozmarino ekstraktas turėjo apsauginį poveikį prieš tabako mozaikos virusą, mažinant viruso replikaciją ir transportą organizme [92]. Tiriant *R. officinalis* L. ekstraktus ir eterinius aliejus kaip insekticidus, matoma tendencija, jog eteriniai aliejai dėl neurotoksinio poveikio veikia prieš suaugusius vabzdžius, o organinių tirpiklių ekstraktai – prieš lervas [93]. Kvapiojo rozmarino ekstraktai taip pat turi teigiamą įtaką gyvulių metaboliniams procesams – baltymų ir lipidų metabolizmui ir efektyviam energijos naudojimui, todėl gali pagerinti mėsos ir pieno kokybę bei mažinti metano emisijas. Pavyzdžiui, karvių pašarą papildžius rozmarino ekstraktu, padidėjo pieno ir laktozės kiekis bei SOD aktyvumas kraujyje, o MDA koncentracija kraujyje sumažėjo [94, 95].

1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Lamiaceae šeimos augalai vaistinis šalavijas ir kvapusis rozmarinas yra perspektyvios žaliavos biotechnologiniam pritaikymui dėl biologinio aktyvumo, kurį suteikia pirminiai metabolitai, tokie kaip *L*-prolinas, bei įvairūs antriniai metabolitai, pvz., fenoliniai junginiai, redukuotas glutationas. Šie junginiai bei tam tikri fermentai, tokie kaip superoksido dismutazės, mažina oksidacinį stresą ląstelėje ir lemia antimikrobines, priešuždegimines, neuroprotekcines ir kitas naudingas savybes. Dėl jų *Salvia officinalis* L. ir *Rosmarinus officinalis* L. gali būti panaudojami medicinos, kosmetikos, maisto ar net žemės ūkio pramonėje. Taikant *in vitro* kaliaus kultūrų technologiją, šiuos aukštos pridėtinės vertės junginius galima išgauti tvariai, efektyviai bei užtikrinant produkto pastovumą. Šioje technologijoje, kaliaus formavimasis indukuojamas *in vitro* pasitelkiant augimo reguliatorius, tokius kaip auksinai, citokininai ir melatoninas, bei naudojant kompleksinę mitybinę terpę ir tinkamas apšvietimo sąlygas. Pramoniniu mastu šios ląstelių kultūros galėtų veikti kaip uždaros sterilios sistemos antrinių metabolitų gamybai.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Šiame skyriuje aprašomas tyrimo objektas, naudotos medžiagos ir aparatūra bei tyrimo metodai. Taip pat aptariama *in vitro* kaliaus kultūroms suformuoti naudotos mitybinės terpės sudėtis, įskaitant kaliaus formavimąsi skatinančius augimo reguliatorius.

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimo objektai yra vaistinis šalavijas (lot. *Salvia officinalis* L.) ir kvapusis rozmarinas (lot. *Rosmarinus officinalis* L.). Tyrimui naudojama šių augalų, augintų *in vivo*, džiovinta ir smulkinta lapų biomasė bei komercinė smulkinto liofilizuoto rozmarino lapų biomasė („SuperGarden“, Lietuva, rozmarino kilmės vieta – Europos Sąjunga). Taip pat naudojama *S. officinalis* L. ir *R. officinalis* L. augalų *in vitro* kaliaus kultūrų džiovinta ir smulkinta biomasė, užauginta „Pramoninės biotechnologijos“ laboratorijoje. *In vitro* kaliaus kultūros suformuotos, kultivuojant ant agarizuotos MS mitybinės terpės, papildytos skirtingais augimo reguliatoriais. Joms formuoti taikytas 24 val. fotoperiodas.

2.2. Tyrimui naudoti reagentai ir aparatūra

2.1 lentelė. Tyrimui naudoti reagentai ir medžiagos

Natrio fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,6; 0,2 M); $K_3[Fe(CN)_6]$ (1 %); trichloracto rūgštis (5; 10 ir 20 %); $FeCl_3$ (0,1 %); metanolis (99,9 % ir 80 %); acetato buferinis tirpalas (pH 3,6; 300 mM); TPTZ (10 mmol, ištirpintas 40 mmol/L HCl); $FeCl_3 \times 6H_2O$ (20 mmol/L); $FeSO_4 \times 7H_2O$ (2000 µmol/L); DPPH etaloninis tirpalas; troloksas; 2 mM ABTS; fosfatinis buferinis tirpalas (pH 7,4; 20 mM); 0,17 mM kalio persulfatas; K/Na fosfatinis buferis (0,066 M); ditiotritolis (1 mM); fenilmetilsulfonilfluoridas (0,5 mM); DMSO; polivinilpirolidonas; Tris-HCl buferinis tirpalas (40 mM); *L*-metioninas (10 mM); nitromėlynasis tetrazolis (54 µL); Tritonas X-100 (0,025 %); riboflavinas (0,3 µM); albuminas; Folino-Kiokalto reagentas (1 M); natrio karbonatas (7,5 %); acetonas (70 %) tanino rūgštis; aliuminio chloridas (2 %); kvercetinas; ledinė acto rūgštis; ninhidrininis reagentas; fosforo rūgštis (6 M); *L*-prolinas; natrio fosfatinis buferinis tirpalas (100 mM; pH 7,4); GSH standartinis tirpalas (1 mmol/L); Ellman’o reagentas; tiobarbitūrinė rūgštis (0,5 %, ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje); LB mitybinė terpė.

2.2 lentelė. Tyrimui naudota aparatūra

Analitinės svarstyklės „Shimadzu ATX84“;
Automatinės pipetės „Winlab“ (1000 µL) ir „Eppendorf“ (20; 200; 5000 µL);
Centrifuga „Hettich Universal 320R“;
Laminaras „Holten HV Mini 3“;
Mikrocentrifuga „Neolab D-6015“;
Spektrofotometras „Shimadzu UV-1280“;
Sukūrinis maišytuvas „Velp Scientifica ZX3“;
Termostatuojama purtyklė „Biosan ES-20“;
Termostatuojama vandens vonelė „Memmert WNB“.

2.3. Maitinamoji terpė ir augimo reguliatoriai

Iš *S. officinalis* L. ir *R. officinalis* L. eksplantų *in vitro* kaliaus kultūros formuotos agarizuotoje MS terpėje, kurios sudėtis nurodyta 2.3 lentelėje. Mitybinės terpės pH = 5,7; ji sterilizuota autoklave 0,75 atm slėgyje 15 min. [96].

2.3 lentelė. Tyrimo *in vitro* kaliaus kultūroms formuoti naudotos MS mitybinės terpės sudėtis [96]

Sudedamosios dalys	Koncentracija tirpale, mg/L	Koncentracija terpėje, mg/L
Makroelementai		
Amonio nitratas (NH_4NO_3)	33000	1650
Kalio nitratas (KNO_3)	38000	1900
Kalcio chlorido dihidratas ($CaCl_2 \times 2H_2O$)	8800	440
Magnio sulfato heptahidratas ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	7400	370
Monokalio fosfatas (KH_2PO_4)	3400	170
Mikroelementai		
Kalio jodidas (KI)	166	0,83
Boro rūgštis (H_3BO_3)	1240	6,2
Mangano(II) sulfato tetrahidratas ($MnSO_4 \times 4H_2O$)	4460	22,3
Cinko sulfato heptahidratas ($ZnSO_4 \times 7H_2O$)	1720	8,6
Natrio molibdato dihidratas ($Na_2MoO_4 \times 2H_2O$)	50	0,25
Vario(II) sulfato pentahidratas ($CuSO_4 \times 5H_2O$)	5	0,025
Kobalto(II) chlorido heksahidratas ($CoCl_2 \times 6H_2O$)	5	0,025
Geležies šaltinis		
Geležies(II) sulfato heptahidratas ($FeSO_4 \times 7H_2O$)	5560	27,8
Natrio etilendiamintetraacetato dihidratas ($Na_2EDTA \times 2H_2O$)	7460	37,3
Vitaminai		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas-HCl	100	0,5
Tiaminas-HCl	100	0,5
Glicinas	400	2
Anglies šaltinis		
Sacharozė		30000
Stingdanti medžiaga		
Agar agaras		5

Mitybinė terpė buvo papildyta skirtingais deriniais ir koncentracijomis augimo reguliatorių – naudoti auksinai IAR ir NAR; citokininai BAP, tidiazuronas (toliau – TDZ) ir kinetinas (toliau – Kin). Taip pat eksperimentuota su augimo reguliatoriumi melatoninu (toliau – Mel). Visos tyrimui naudotos *in vitro* kaliaus kultūros išvardintos 2.4 lentelėje. Kelios *in vitro* kaliaus kultūros, augintos ant MS mitybinės terpės, papildytos skirtingais augimo reguliatoriais, vaizduojamos 2.1 paveiksle.

2.4 lentelė. Tyrimui naudotos *Salvia officinalis* L. ir *Rosmarinus officinalis* L. *in vitro* kaliaus kultūros su auginimui naudota mitybine terpe ir augimo reguliatoriais

Tiriamųjų augalų *in vitro* kaliaus kultūros, auginimui naudota mitybinė terpė ir augimo reguliatoriai
Vaistinio šalavijo kalius MS + BAP (1 mg/L) + NAR (1 mg/L)
Vaistinio šalavijo kalius MS + TDZ (0,5 mg/L) + IAR (0,1 mg/L)
Vaistinio šalavijo kalius MS + BAP (0,1 mg/L) + NAR (0,2 mg/L)
Vaistinio šalavijo kalius MS + TDZ (0,5 mg/L) + IAR (0,1 mg/L) + Mel (0,1 μM)
Kvapiojo rozmarino kalius MS + BAP (1 mg/L) + NAR (1 mg/L)
Kvapiojo rozmarino kalius MS + TDZ (0,5 mg/L) + IAR (0,1 mg/L)
Kvapiojo rozmarino kalius MS + IAR (2 mg/L) + Kin (2 mg/L)
Kvapiojo rozmarino kalius MS + TDZ (0,5 mg/L) + IAR (0,1 mg/L) + Mel (0,1 μM)

2.1 pav. Tyrimui naudotų *in vitro* kaliaus kultūrų pavyzdžiai

2.4. Antioksidacinio aktyvumo ir antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas

Šiame poskyryje aprašoma metodologija, kuria buvo vadovaujamasi, siekiant įvertinti antioksidacinį aktyvumą ir antioksidacinių fermentų aktyvumą tiriamoje medžiagoje bei nuosekli atliktų eksperimentų eiga. Šiame tyrime antioksidacinis aktyvumas buvo tiriamas įvertinant tiriamos žaliavos redukcines savybes bei naudojant geležies jonų redukcijos antioksidacinės galios (toliau – FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalo (toliau – DPPH), 2,2‘-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninė rūgštis) diamonio druskos (toliau – ABTS) metodus. Taip pat įvertintas antioksidacinio fermento superoksido dismutazės aktyvumas.

2.4.1. Redukcinių savybių įvertinimas

Redukcinių savybių įvertinimas tiriamoje žaliavoje yra paremtas geležies(III) jono (Fe^{3+}) redukcija iki Fe^{2+} jono fericianido komplekse $(Fe(CN)_6]^{3-}$). Tik biologiškai aktyvūs junginiai, pasižymintys antioksidaciniu aktyvumu, veikia kaip elektronų donorai ir vykdo šią reakciją. Redukcijos galia nustatoma spektrofotometriškai, matuojant tirpalo sugertį 700 nm ilgio bangoje [97].

0,1 g augalinės medžiagos ekstrahuojama 5 mL metanolio 45 °C temperatūros vandens vonelėje 30 min. Ekstraktas centrifuguojamas 9000 aps./min. Imama po 0,5 mL supernatanto, maišoma su 1,25 mL 0,2 M fosfatinio buferio ir 1,25 mL 1 % kalio heksacianoferato(III) ($K_3[Fe(CN)_6]$). Mišinys

inkubuojamas 50 °C 20 min. Po to pridedama 1,25 mL 10 % trichloracto rūgšties, sumaišoma ir centrifuguojama 5 min. 1,25 mL nucentrifuguoto tirpalo maišoma su 1,25 mL distiliuoto vandens ir 0,25 mL 0,1 % geležies (III) chlorido ($FeCl_3$). Dėl pastarojo komponento, geltona reakcijos mišinio spalva pasikeičia į mėlyną – kuo daugiau geležies jonų redukuota, tuo intensyvesnė mėlyna spalva. Tuomet ruošiamas tuščias mėginys – 1 mL 0,2 M fosfatinio buferio sumaišoma su 1 mL 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$). Mėginiai matuojami 700 nm ilgio bangoje. Didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcines savybes [97, 98]. Atliekami 3 eksperimento pakartojimai.

2.4.2. Antioksidacinių savybių įvertinimas FRAP metodu, naudojant 2,4,6-tripiridil-*s*-triaziną

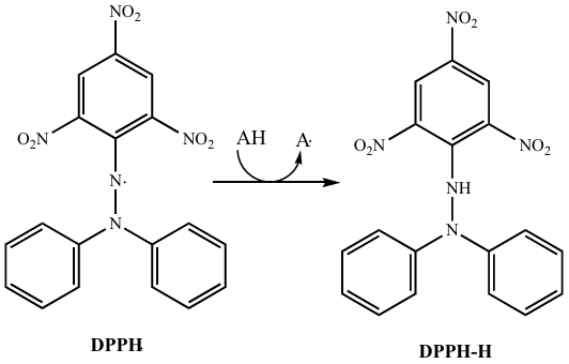
FRAP metodas pagrįstas antioksidacinių junginių gebėjimu redukuoti bespalvį geležies 2,4,6-tripiridil-*s*-triazino kompleksą $[Fe^{3+}\text{-}(TPTZ)_2]^{3+}$ iki mėlynos spalvos $[Fe^{2+}\text{-}(TPTZ)_2]^{2+}$ komplekso. Reakcijai reikalinga rūgštinė terpė, kurios pH = 3,6. Mėlynos spalvos intensyvumas registruojamas spektrofotometru 593 nm ilgio bangoje [99, 100].

0,1 g augalinės žaliavos ekstrahuojama 5 mL metanolio 45 °C temperatūros vandens vonelėje 30 min. Gautas ekstraktas centrifuguojamas 9000 aps./min 10 min. Supernatantas toliau naudojamas tyrimams. 2,4,6-tripiridil-*s*-triazino (toliau – TPTZ) tirpalas ruošiamas 10 mmol TPTZ ištirpinant 40 mmol/L HCl tirpale. Tuomet ruošiamas FRAP reagentas, sumaišant 25 mL 300 mM acetato buferio (pH = 3,6), 2,5 mL anksčiau paruošto TPTZ reagento bei 2,5 mL 20 mmol/L $FeCl_3 \times 6H_2O$ tirpalo. Į 10 µL ekstrakto įpilama 40 µL metanolio ir 1,5 mL FRAP reagento. Tuščiam mėginiui gauti sumaišoma 50 µL metanolio ir 1,5 mL FRAP reagento. Spektrofotometru matuojama gautų tirpalų šviesos sugertis 593 nm bangos ilgyje [99, 100]. Eksperimentas atliekamas 3 kartus.

Rezultatams interpretuoti sudaroma kalibracinė kreivė. Jai sudaryti pagaminami 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ir 60 µmol/L koncentracijos geležies(II) sulfato heptahidrato ($FeSO_4 \times 7H_2O$) tirpalai. Tuščias mėginys – 3 mL FRAP reagento ir 7 mL distiliuoto vandens. Gauti rezultatai apskaičiuojami pagal kalibracinę kreivę ir išreiškiami µmol Fe^{2+} E/g s. m. [100].

2.4.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

DPPH yra vienas iš nedaugelio stabilių organinių azoto radikalų – jam nebūdinga dimerizacija kaip daugumai kitų laisvų radikalų. DPPH radikalo milteliai yra tamsiai violetinės spalvos, dėl kurios, radikalą ištirpinus organiniame tirpiklyje, stebima tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje. DPPH radikalo tirpalą sumaišius su antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčiais junginiais, pastarieji veikia kaip vandenilio atomų donorai. Taip susidaro redukuota DPPH molekulė, turinti šviesiai geltona spalvą, todėl tirpalo violetinė spalva blanksta ir keičiasi į geltoną spalvą (2.2 pav.). Dėl šių DPPH radikalo savybių ir jo sąveika su antioksidacinėmis molekulėmis, antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pasitelkiant šį junginį yra itin patogus ir dažnai naudojamas [101] .



2.2 pav. DPPH radikalo reakcijos su antioksidacine molekule (A) mechanizmas [102]

0,2 g augalinės žaliavos sumaišoma su 2 mL 99,9 % metanolio ir homogenizuojama termostatuojamoje purtyklėje 220 aps./min 25 °C temperatūroje 10 min. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps./min. 0,077 mL supernatanto sumaišoma su 3 mL 1 µM DPPH tirpalo, kuris paruošiamas DPPH radikalą ištirpinus 99,9 % metanolyje. Palyginamasis mėginys ruošiamas 0,077 mL 99 % metanolio sumaišant su 3 mL DPPH etaloninio tirpalo. Paruošti mėginiai laikomi tamsoje 15 min. ir vėliau matuojami spektrofotometru 515 nm bangos ilgyje [100]. Eksperimentas kartojamas 3 kartus. Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.1) formulę:

$$Slopinimas\ (\%) = \frac{A_B - A_A}{A_B} \times 100; \quad (2.1)$$

čia A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis 515 nm bangos ilgyje; A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis 515 nm bangos ilgyje.

Paruošiama kalibracinė kreivė pagal 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilo rūgštį (toliau – troloksas). Pirmiausia paruošiamas 1,2 mM trolokso tirpalas metanolyje, tuomet naudojant šį tirpalą paruošiami 0; 0,30; 0,60; 0,75; 0,90; 1,05; 1,20 mM trolokso tirpalai metanolyje. Imama po 0,077 mL kiekvieno tirpalo ir sumaišoma su 3 mL etaloninio DPPH radikalo tirpalo. Palyginamajam tirpalui gauti vietoje trolokso tirpalo naudojamas metanolis. Mėginiai sumaišomi, laikomi tamsoje 15 min. ir matuojami spektrofotometru 515 nm bangos ilgyje. Eksperimentas kartojamas 3 kartus. Trolokso tirpalų DPPH radikalo slopinimas apskaičiuojamas pagal 2.1 formulę. Nubraižoma kalibracinė kreivė, vaizduojanti DPPH radikalo slopinimo priklausomybę nuo trolokso koncentracijos. Pagal kreivę apskaičiuojamas tiriamųjų tirpalų DPPH radikalo slopinimas, išreikštas trolokso ekvivelentais µg/g s. m. [103].

2.4.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

Šio eksperimento metu ABTS veikiamas oksidaciniais agentais, susidarant radikaliniam katijonui $ABTS^{\bullet+}$, kuris yra intensyvios mėlynai žalios spalvos. Antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys junginiai neutralizuoja ABTS radikalą, todėl tirpalo spalva nublunka. Spalvos pokytis registruojamas stebint šviesos sugertį 734 nm bangos ilgyje [104].

2 mM ABTS tirpalas ruošiamas sumaišant 2 mM ABTS su 0,17 mM kalio persulfatu ($K_2S_2O_8$), kuris yra ištirpintas 20 mM fosfatiniame buferyje (pH = 7,4), ir laikomas tamsoje 12 val. Tuomet tirpalas skiedžiamas, kol gaunama 1,5–1,7 sugertis 734 nm bangos ilgyje. Praskiestas ABTS reagentas toliau naudojamas tyrimams. Ekstraktas ruošiamas 0,1 g augalinės žaliavos sumaišant su 5 mL metanolio ir ekstrahuojant 45 °C temperatūros vandens vonelėje 30 min. Ekstraktas centrifuguojamas

9000 aps./min 10 min. ir naudojamas tyrimams. Į 0,5 mL ekstrakto pilama 1,7 mL fosfatinio buferio (20 mM) ir 0,3 mL praskiesto ABTS tirpalo. Tuščias mėginys – fosfatinis buferis (20 mM). Mėginiai analizuojami spektrofotometru 734 nm bangos ilgyje. Eksperimentas kartojamas 3 kartus. Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.2) formulę:

$$Slopinimas\ (\%) = \frac{A_B - A_A}{A_B} \times 100; \quad (2.2)$$

čia A_B – praskiesto ABTS tirpalo šviesos sugerties dydis 734 nm bangos ilgyje; A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis 734 nm bangos ilgyje [103, 104].

2.4.5. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Šio tyrimo metu šviesoje susidarę superoksido radikalai redukuoja nitromėlynąjį tetrazolį iki mėlynos spalvos junginio, tačiau superoksido dismutazė inhibuoja šio kompekso susidarymą, katalizuojant superoksido radikalų dismutaciją į vandenilio peroksidą ir deguonį. Tad, fermento aktyvumas nustatomas matuojant mėlynos spalvos reakcijos produkto susidarymo mažėjimą, stebint mėginių šviesos absorbcijos mažėjimą [100].

Pirmiausia vykdoma tirpių baltymų ekstrakcija. 0,1 g augalinės žaliavos sumaišoma su 4 mL 0,066 M kalio-natrio fosfatinio buferio (pH = 7,4), kuriame yra 1 mM ditiotritolio, 0,5 mL fenilmetilsufonilfluorido, ištirpinto dimetilsulfokside (toliau – DMSO), ir 1–3 mg polivinilpirolidono. Mėginys maišomas purtyklėje 10 min. 25 ºC ir tuomet centrifuguojamas 9000 aps./min 10 min. Supernatantas surenkamas ir 5 min. centrifuguojamas *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose [100].

Baltymų koncentracijai nustatyti taikomas Bradford'o metodas. Jis pagrįstas baltymų reakcija su Bradford'o reagente esančiu Kumasi briliantiniu mėliu, susidarant kolorimetriniam kompleksui, kuris absorbuoja šviesą 595 nm bangos ilgyje [105]. Tam įvykdyti, paimama 200 µL gauto tirpių baltymų frakcijos tirpalo ir sumaišoma su 2 mL Bradford'o reagento. Išmatuojama tirpalų šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Eksperimentas kartojamas 3 kartus. Baltymų koncentracijai nustatyti ruošiama albumino kalibracinė kreivė. 25 mg albumino ištirpinama 25 mL distiliuoto vandens. Imant atitinkamą tūrį šio tirpalo ir skiedžiant iki 10 mL distiliuotu vandeniu, gaunami 0,0 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16 ir 0,18 mg/mL koncentracijos albumino tirpalai. Į juos įpilama po 2 mL Bradford'o reagento, sumaišoma ir matuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Pagal gautą kalibracinę kreivę apskaičiuojama baltymų koncentracija tiriamuose tirpaluose [100].

Vėliau paruošiamas 2 mL tūrio SOD reakcijos mišinys, įpilant 40 µL fermentinio preparato, 400 µL 200 mM Tris-HCl buferio (pH = 7,8), 200 µl 100 mM *L*-metionino, 200 µl 540 µM nitromėlynojo tetrazolio, 500 µl 0,1 % Triton X-100, 20 µl 300 µM riboflavino ir 640 µl distiliuoto vandens. Taip pat paruošiamas kontrolinis mėginys, sudarytas iš visų minėtų reagentų, išskyrus fermentinį preparatą. Reakcija atliekama apšviečiant mėginius liuminescentinėmis lempomis 30 min. Po to matuojama mėginių šviesos sugertis 560 nm bangos ilgyje. SOD aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.3) formulę:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{log2 \times m}; \quad (2.3)$$

čia A – SOD aktyvumas (vnt/mg); E_K – kontrolinio mėginio šviesos sugertis; E_T – tiriamojo mėginio šviesos sugertis; m – baltymo masė preparato tūryje (mg/mL), t. y. baltymo koncentracija nustatyta pagal Bradford'o metodą [100].

2.5. Bioaktyviųjų metabolitų koncentracijos įvertinimas

Bioaktyvieji metabolitai, kurių koncentracijos įvertintos šio tyrimo metu, yra fenoliniai junginiai, flavonoidai, *L*-prolinas, redukuotas glutationas ir malondialdehidas. Šiame poskyryje apibūdinama minėtų junginių koncentracijų įvertinimo metodologija.

2.5.1. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas

Bendroji fenolinių junginių koncentracija nustatyta vadovaujantis Folino-Kiokalto metodu. 0,025 g augalinės žaliavos sumaišoma su 5 mL 70 % acetono tirpalo ir maišoma purtyklėje 200 aps./min 20 min. kambario temperatūroje. Gautas ekstraktas centrifuguojamas 9000 aps./min 10 min., supernatantas perkeliamas į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlius ir centrifuguojamas dar 2 min. Gautas supernatantas surenkamas ir toliau naudojamas eksperimentui. Tuomet į 30 µL gauto ekstrakto įpilama 470 µL distiliuoto vandens. Į mišinį taip pat pridedama 250 µL Folino-Kiokalto reagento (1 M) ir 1,25 mL 7,5 % natrio karbonato (Na_2CO_3) tirpalo. Tuščias mėginys – 500 µL distiliuoto vandens, 250 µL Folino-Kiokalto reagento (1 M) ir 1,25 mL 7,5 % Na_2CO_3 tirpalo. Mišinys laikomas tamsoje 40 min. ir tuomet matuojama jo šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje [100]. Eksperimentas kartojamas 3 kartus.

Fenolinių junginių koncentracijai apskaičiuoti reikalinga tanino rūgšties kalibracinė kreivė. Jai sudaryti, imama 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ir 100 µL standartinio tanino rūgšties tirpalo į skirtingus mėgintuvėlius. Mėgintuvėlių turinys praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 500 µL, gaunant nuo 1 iki 10 mg/L koncentracijos tirpalus atitinkamai. Tuščias mėginys – 500 µL distiliuoto vandens. Į tirpalus pridedama 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir inkubuojama 40 min. tamsoje kambario temperatūroje. Tuomet matuojama tirpalų šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje [100].

Bendroji fenolinių junginių koncentracija (mg/g s. m.) apskaičiuojama pagal (2.4) formulę:

$$c_x = a \times V \times \frac{100}{m}; \quad (2.4)$$

čia c_x – bendroji fenolinių junginių koncentracija (mg/g s. m.); a – tanino rūgšties koncentracija (mg/L) iš kalibracinės kreivės; V – pradinis ekstrakto tūris (L); m – augalinės žaliavos masė (g) [100].

2.5.2. Bendrosios flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Bendroji flavonoidų koncentracija nustatyta aliuminio chlorido ($AlCl_3$) kolorimetriniu metodu pagal Kolosej *et al.* metodą [106] su pakeitimais. Metodas yra paremtas aliuminio(III) jonų ir flavonoidų funkcinių grupių, gebančių cheluoti metalus, stabilių geltonos spalvos kompleksų susidarymu [107].

0,2 g augalinės žaliavos sumaišoma su 2 mL 80 % metanoliu. Ekstrakcija vykdoma maišant mėginį purtyklėje 150 aps./min kambario temperatūroje 24 val. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps./min 10 min. 0,1 mL supernatanto sumaišoma su 0,9 mL 80 % metanolio ir 1 mL 2 % $AlCl_3$. Tuščias mėginys – 1 mL 80 % metanolio ir 1 mL 2 % $AlCl_3$. Mėginiai išmatuojami spektrofotometru 415 nm bangos ilgyje. Eksperimentas kartojamas 3 kartus.

Flavonoidų koncentracijai apskaičiuoti reikalinga kvercetino kalibracinė kreivė. Kvercetinas (1 mg/mL) ištirpinamas metanolyje. Tuomet paruošiami 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 ir 40 mg/L kvercetino koncentracijos tirpalai, kvercetino tirpalą maišant su 0,075 mL 2 % $AlCl_3$ ir praskiedžiant iki 5 mL 80 % metanoliu. Tuščias mėginys – metanolis. Spektrofotometru išmatuojama tirpalų šviesos sugertis 415 m bangos ilgyje [106].

Flavonoidų koncentracija skaičiuojama pagal (2.5) formulę:

$$c_x = \frac{c_1 \times V}{m}; \quad (2.5)$$

čia c_x – bendroji flavonoidų koncentracija (mg/g s. m.); c_1 – kvercetino koncentracija (mg/mL) pagal kalibracinę kreivę; V – pradinis ekstrakto tūris (mL); m – augalinės žaliavos masė (g) [106].

2.5.3. *L*-prolino koncentracijos įvertinimas

L-prolino koncentracija tiriamoje žaliavoje nustatyta vadovaujantis Bates'o, Waldren'o ir Teare metodu [108] su pakeitimais. 0,1 g augalinės žaliavos sumaišoma su 4 mL distiliuotu vandeniu mėgintuvėlyje. Mėgintuvėlis kaitinamas 95 °C temperatūros vandens vonelėje 3 min. ir tuomet iškart atšaldomas. Ši kaitinimo procedūra kartojama dar 2 kartus. Gautas ekstraktas centrifuguojamas 9000 aps./min 10 min. Paimama 2 mL supernatanto ir paskiedžiama iki 6 mL. Tuomet imama 1 mL praskiesto ekstrakto ir į jį įpilama 1 mL ledinės acto rūgšties, 1 mL ninhidrininio reagento. Mišinys kaitinamas 45 min. 95 °C temperatūros vandens vonelėje. Pakaitinus, tirpalo šviesos sugertis matuojama 520 nm bangos ilgyje [108]. Eksperimentas kartojamas 3 kartus.

L-prolino koncentracija nustatoma pagal *L*-prolino kalibracinę kreivę. 0,0011 g *L*-prolino ištirpinama 10 mL distiliuoto vandens, gaunant 1 mM koncentracijos tirpalą. Gaminami 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15 ir 0,175 mM koncentracijos *L*-prolino tirpalai, imant atitinkamą tūrį *L*-prolino tirpalo, skiedžiant distiliuotu vandeniu iki 1 mL ir maišant su 1 mL ledinės acto rūgšties ir 1 mL ninhidrininio reagento. Tuščias mėginys – 1 mL distiliuoto vandens, 1 mL ledinės acto rūgšties ir 1 mL ninhidrininio reagento. Mėginiai kaitinami 45 min. 95 ºC vandens vonelėje, atšaldomi ir matuojami spektrofotometru 520 nm bangos ilgyje [108].

Prolino koncentracija apskaičiuojama pagal (2.6) formulę, naudojantis kalibracine kreive:

$$c_x = \frac{E \times k \times V_{bendras}}{V_{paimta} \times m}; \quad (2.6)$$

čia c_x – *L*-prolino koncentracija (µmol/g s. m.); E – tirpalo šviesos sugertis; k – *L*-prolino kiekis (µmol), gautas pagal kalibracinę kreivę; $V_{bendras}$ – bendras ekstrakto tūris (mL); V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris (mL); m – augalinės žaliavos masė (g) [108].

2.5.4. Redukuoto glutationo koncentracijos įvertinimas

GSH koncentracija įvertinta remiantis kolorimetriniu metodu pagal Ellman'ą [109] su pakeitimais. Šis metodas pagrįstas tiriamos augalinės žaliavos junginių, turinčių tiolio funkcines grupes, sąveika su chromogenine Ellman'o reagentą sudarančia 5,5′-ditiobis(2-nitrobenzenkarboksirūgštimi) (toliau – DTNB). Reakcijos produktas – 5-tio-2-nitrobenzenkarboksirūgšties (toliau – TNB) dianionas, kuris yra geltonos spalvos ir gali būti analizuojamas spektrofotometriškai [109].

0,1 g augalinės žaliavos homogenizuojama 5 mL 100 mM natrio fosfatiniame buferyje (pH = 7,4) termostatuojamoje purtyklėje 25 °C temperatūroje 10 min. Tuomet mėginiai centrifuguojami 9000 aps./min 10 min., gautas supernatantas nupilamas ir centrifuguojamas dar 5 min. *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose. Į 1 mL gauto ekstrakto pilama 0,5 mL 5 % trichloracto rūgšties ir 0,5 mL Ellman'o reagento (19,8 mg DTNB sumaišyta su 100 mL 0,1 % natrio citrato). Tuščias mėginys ruošiamas tokiu pačiu būdu kaip tiriamieji mėginiai, vietoje augalinės žaliavos ekstrakto naudojant 1 mL natrio fosfatinį buferį (pH = 7,4). Mėginiai matuojami spektrofotometru 412 nm bangos ilgyje [109, 110]. Eksperimentas pakartojamas 3 kartus.

GSH koncentracijai nustatyti ruošiama kalibracinė kreivė, naudojant standartinį GSH tirpalą (1 mmol/L). Į atskirus mėgintuvėlius paruošiami 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ir 1 mM koncentracijų GSH tirpalai, praskiedžiant standartinį GSH tirpalą atitinkamu kiekiu vandens. Tuomet į mėgintuvėlius įpilama po 0,5 mL 5 % trichloracto rūgšties ir 0,5 mL Ellman'o regento. Tirpalų šviesos sugertis matuojama spektrofotometru 415 nm bangos ilgyje [109, 110].

2.5.5. Malondialdehido koncentracijos įvertinimas

Siekiant įvertinti malondialdehido koncentraciją žaliavoje, 0,1 g augalinės žaliavos užpilama 1,5 mL 20 % trichloracto rūgštimi. Mišinys homogenizuojamas termostatuojamoje purtyklėje 25 °C temperatūroje 10 min., tuomet centrifuguojamas 9000 aps./min 10 min. 0,3 mL supernatanto sumaišoma su 1,2 mL 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi, kuri ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje. Mišinys inkubuojamas 95 °C temperatūros vandens vonelėje 30 min., tuomet atšaldomas ir centrifuguojamas 9000 aps./min 15 min. Mėginių šviesos sugertis matuojama spektrofotometru 532 nm ir 600 nm bangos ilgiuose [111]. Eksperimentas kartojamas 3 kartus. MDA koncentracija apskaičiuojama pagal (2.7) formulę:

$$c_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \times V_e \times 2}{k \times m \times V_a}; \quad (2.7)$$

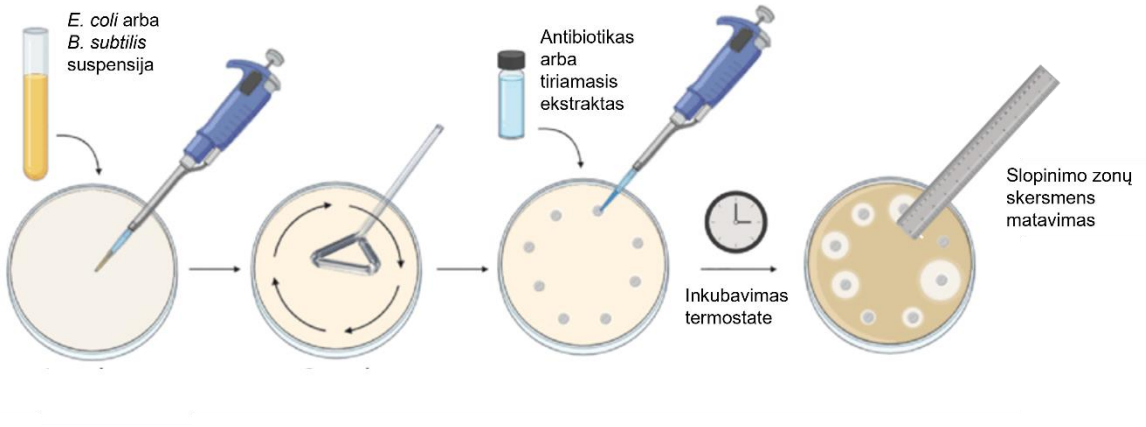
čia c_x – MDA koncentracija (µmol/g s. m.); E – mėginio šviesos sugertis atitinkamuose bangos ilgiuose; V_e – ekstrakto tūris (mL); V_a – ekstrakto tūris, paimtas analizei (mL); k – molinės ekstinkcijos koeficientas (156 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$); m – augalinės žaliavos masė (g) [111].

2.6. Tiriamųjų ekstraktų antibakterinių savybių prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* įvertinimas

Tiriamų ekstraktų antibakterinis aktyvumas įvertintas agaro difuziniu metodu. Pirmiausia paruošiamas ekstraktas 0,2 g tiriamos augalinės žaliavos sumaišant su 2 mL DMSO ir laikomas kambario temperatūroje 10 parų. Tuomet gauta suspensija centrifuguojama 9000 aps./min 10 min., supernatantas toliau naudojamas tyrimui.

Ruošiama agarizuota Luria-Bertani (toliau – LB) terpė, sudaryta iš triptono (10 g/L), mielių ekstrakto (5 g/L), natrio chlorido (10 g/L) ir agar agaro (15 g/L). Terpė išpilstoma į *Petri* lėkšteles. *E. coli* ir *B. subtilis* inokuliatai, kultivuoti skystoje LB terpėje 12 val., skiedžiami skysta LB terpe, kol gaunamas optinis tankis lygus 0,1. Po 50 µL kiekvieno inokuliato užsėjama ant kietos LB terpės inokuliacine lazdele. Ant kietos LB terpės su užsėtomis bakterijų kultūromis patalpinami 6 popieriniai diskai. Ant kiekvieno disko užlašinama po 50 µL tiriamojo ekstrakto. Kontrolinis mėginys ruošiamas tokiu pačiu būdu, vietoje ekstrakto naudojant cefalosporinų grupės antibiotiką ciprofloksaciną, kurio koncentracija yra 12,5 mg/mL. *Petri* lėkštelės su tiriamąja medžiaga inkubuojamos termostate 37 °C

temperatūroje 24 val. Antibakterinis aktyvumas vertinamas matuojant slopinimo zonų skersmenį (cm) [100]. Apibendrinta tyrimo eiga vaizduojama 2.3 paveiksle.



2.3 pav. Apibendrinta antibakterinių savybių tyrimo schema. Adaptuota pagal Jonuškienę *et al.* [100]

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

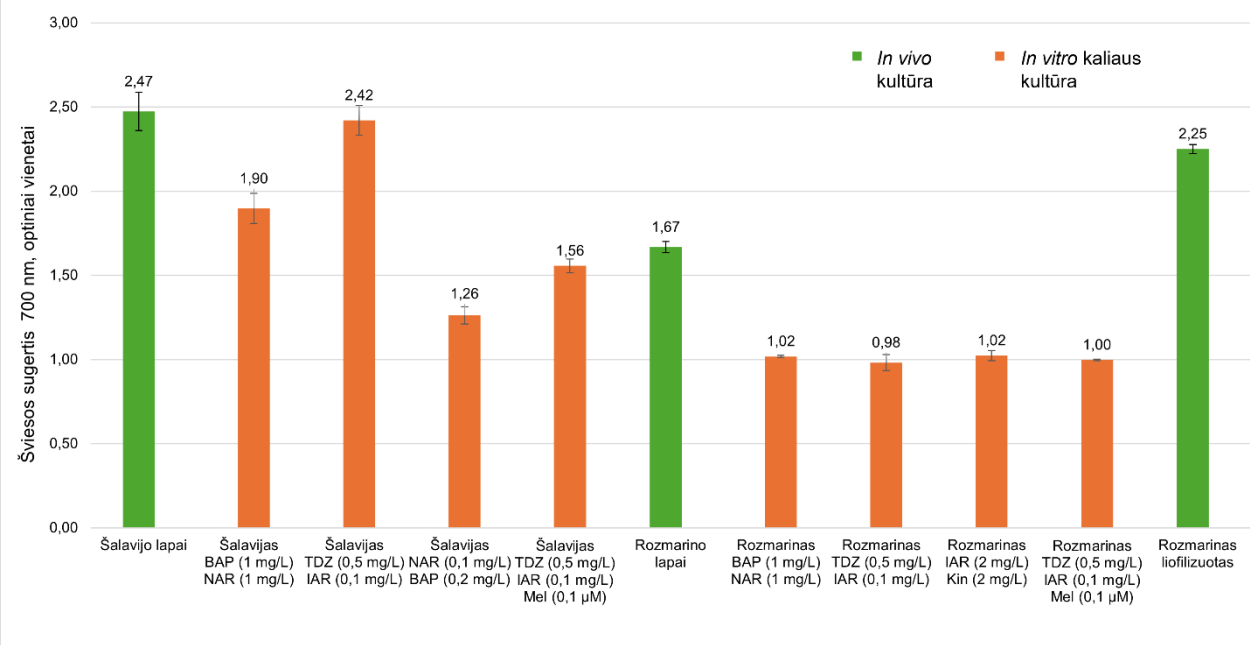
Šiame skyriuje pristatomi tyrimų rezultatai, gauti atlikus antioksidacinio aktyvumo ir antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimą, bioaktyviųjų metabolitų koncentracijų įvertinimą tiriamuosiuose ekstraktuose bei šių ekstraktų antibakterinių savybių įvertinimą. Gauti rezultatai lyginami tarpusavyje bei aptariami neseniai atliktų panašių mokslinių tyrimų kontekste. Grafikuose nurodomos reikšmės ir jų standartinio nuokrypio paklaida.

3.1. Antioksidacinio aktyvumo ir antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas

Antioksidacinis aktyvumas buvo įvertintas įvairiais metodais, siekiant geriau suprasti ir nustatyti tiriamųjų ekstraktų gebą neutralizuoti laisvuosius radikalus. Išsamesniam antioksidacinio profilio įvertinimui, taip pat nustatytas antioksidacinio fermento SOD aktyvumas tiriamuosiuose ekstraktuose.

3.1.1. Redukcinių savybių įvertinimas

Redukcinių savybių įvertinimo rezultatai vaizduojami 3.1 paveiksle. Vaistinio šalavijo kultūrose rezultatai gan išsibarstę, kas rodo selektyvią augimo reguliatorių įtaką redukcinėmis savybėmis pasižyminčių junginių sintezei ir kaupimuisi. Didžiausia redukcine galia pasižymi *in vivo* lapų mėginys, kuriame fiksuojama 2,47 optinių vienetų šviesos sugertis. Šiam rezultatui artima reikšmė (2,42 optiniai vienetai) stebima šalavijo *in vitro* kaliaus kultūros, augintos MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L), mėginyje. Išskyrus šią kultūrą, šalavijo *in vitro* mėginiai nepasižymi stipriu redukciniu pajėgumu, lyginant su natūraliomis sąlygomis augintu šalaviju.



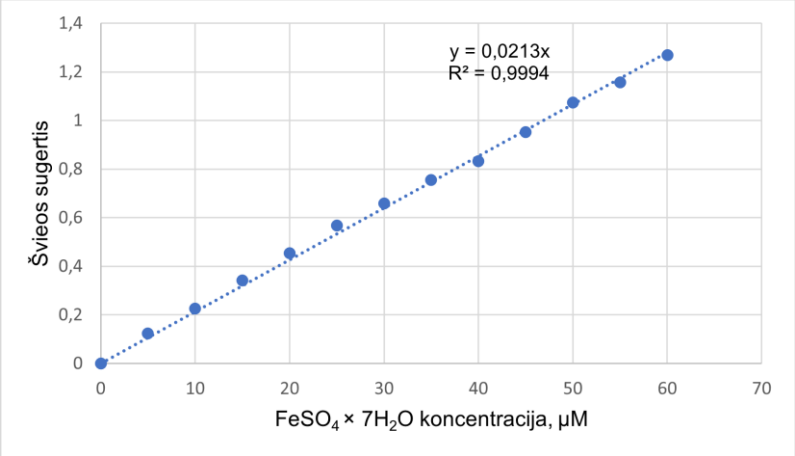
3.1 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų redukcinių savybių įvertinimo rezultatai

Kvapiojo rozmarino rezultatai labiau susigrupavę nei šalavijo mėginių – visos *in vitro* kaliaus kultūros rodo panašias ir ženkliai silpnesnes redukcines savybes (~1 optinis vienetas), lyginant su *in vivo* kultūromis. Iš to galima kelti hipotezę, jog šalavijo augalo metabolizmas yra jautresnis augimo reguliatorių keliamoms modifikacijoms *in vitro* nei rozmarino. Be to, matoma, jog rozmarino kultūros

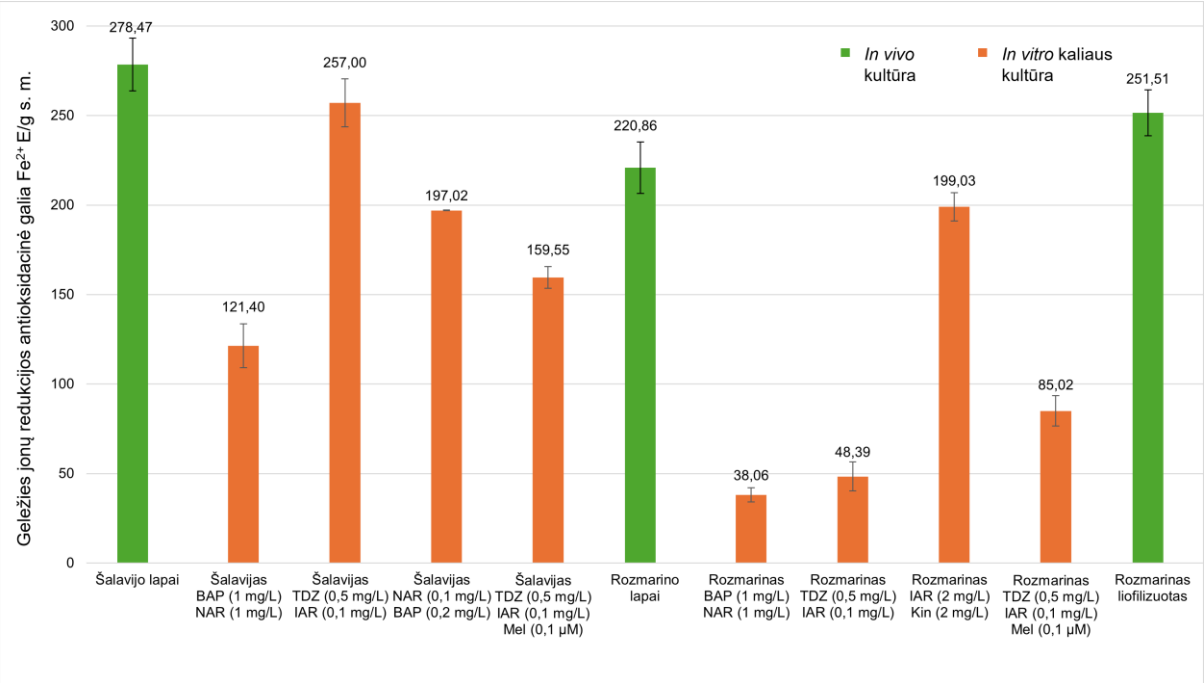
apskritai pasižymi silpnesniu redukciniu pajėgumu nei šalavijo kultūros, vadinasi, šalavijo kultūrų ekstraktuose yra daugiau molekulių, kurios gali veikti kaip elektronų donorai ir neutralizuoti laisvuosius radikalus. Rozmarino mėginiuose išsiskiria liofilizuoto rozmarino rezultatas – stebima 2,25 optinių vienetų šviesos sugertis, kuri yra ženkliai didesnė nei *in vivo* rozmarino lapų ekstraktų rezultatas (1,67 optiniai vienetai). Moksliniai tyrimai teigia, jog liofilizavimas apsaugo redukcinėmis savybėmis pasižyminčius junginius, tokius kaip fenoliniai junginiai. Kadangi liofilizavimo metu naudojama žema temperatūra, mažiau skyla karščiui jautrūs bioaktyvieji junginiai. Taip pat šio tipo džiovinime naudojama vakuuminė sublimacija, dėl kurios stipriai sumažinamas tikslinių junginių oksidacijos ir/ar fermentinės hidrolizės poveikis [112].

3.1.2. Antioksidacinių savybių įvertinimas FRAP metodu, naudojant 2,4,6-tripiridil-*s*-triaziną

Sudaryta kalibracinė kreivė, pagal kurią apskaičiuoti tyrimo rezultatai (3.2 pav.). Įvertinus antioksidacines savybes FRAP metodu (3.3 pav.), didžiausia reikšmė matoma *in vivo* šalavijo ekstrakte – 278,47 µmol Fe^{2+}E/g s. m. Verta paminėti, jog *Lamiaceae* augalų *in vivo* antioksidacinis aktyvumas gali būti gan nepastovus. Pavyzdžiui, Moshari-Nasirkandi *et al.* tyrimo metu [33] dviejų *Salvia officinalis* L. augalų, surinktų skirtingose vietose Irane, metanolio ekstraktuose stebimas skirtumas tarp FRAP rezultatų – gautos 375,98 ir 997,09 µmol Fe^{2+}E/g s. m. reikšmės. O Bianchin *et al.* [113] liofilizuotuose šalavijo ir rozmarino etanolio ekstraktuose gavo 133,99 ir 180,09 µmol Fe^{2+}E/g s. m. vertes atitinkamai. Tad, vietinės aplinkos veiksniai yra itin svarbūs antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių sintezei, o ekstrakcijos būdai bei pasirinkti organiniai tirpikliai yra svarbūs šių junginių tyrimui augaluose.



3.2 pav. Geležies(II) heptahidrato kalibracinė kreivė



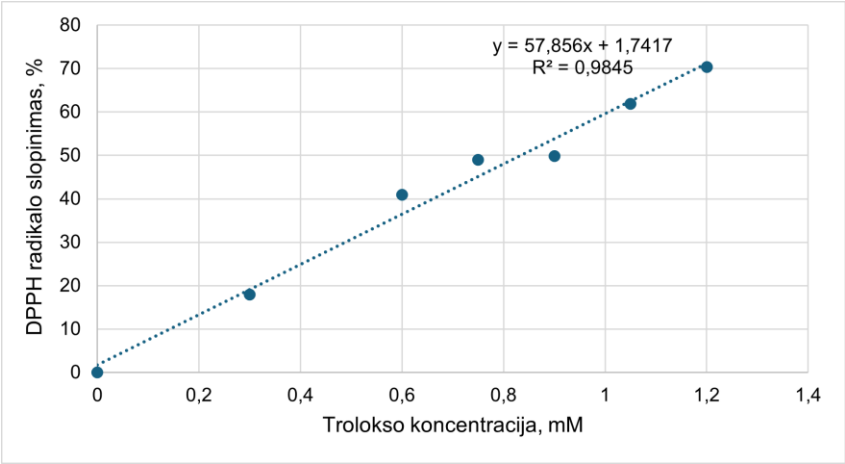
3.3 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, įvertintas FRAP metodu, išreikštas geležies(II) jonų ekvivalentais ($Fe^{2+}E$)

Apart *in vivo* šalavijo lapų, stiprus antioksidacinis aktyvumas (>200 µmol $Fe^{2+}E$/g s. m.) stebimas rozmarino *in vivo* kultūrose bei šalavijo *in vitro* kaliaus kultūroje, augintoje su augimo reguliatoriais TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L). Šie rezultatai koreliuoja su redukcinių savybių rezultatais, nes abu metodai yra paremti tuo pačiu principu – įvertina junginio gebėjimą veikti kaip elektronų donorui, redukuojant Fe^{3+} iki Fe^{2+} [97, 99]. Tiesa, dalis rezultatų nesisieja su redukcinių savybių įvertinimu. Pavyzdžiui, šiame tyrime šalavijo *in vitro* kultūra, auginta su NAR (0,1 mg/L) ir BAP (0,2 mg/L) pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis (197,02 µmol $Fe^{2+}E$/g s. m.) bei rozmarino *in vitro* kultūra, auginta su IAR (2 mg/L) ir Kin (2 mg/L) pasižymi ženkliai stipresnėmis antioksidacinėmis savybėmis (199,03 µmol $Fe^{2+}E$/g s. m.) nei kitos rozmarino *in vitro* kaliaus kultūros (iki ~90 µmol $Fe^{2+}E$/g s. m.). Tuo tarpu redukcinių savybių įvertinimo metu šie mėginiai išskirtinio antioksidacinio aktyvumo neturėjo. Nors FRAP ir redukcinių savybių vertinimo metodai panašūs, FRAP eksperimento metu geležies jonų redukcija vykdoma rūgštiniame pH (pH = 3,6), o redukcinių savybių įvertinimo metu – beveik neutraliame pH. Todėl FRAP metodas yra labiau selektyvus, jį taikant nefiksuojamas neutraliame ar baziniame pH veikiančių antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių aktyvumas, pavyzdžiui, tiolio funkcines grupes turinčių junginių, tokių kaip redukuotas glutationas [114]. Tad, remiantis gautais rezultatais galima teigti, jog augimo reguliatorių deriniai ir jų koncentracijos sąlygoja skirtingų junginių, veikiančių skirtingame pH, sintezę.

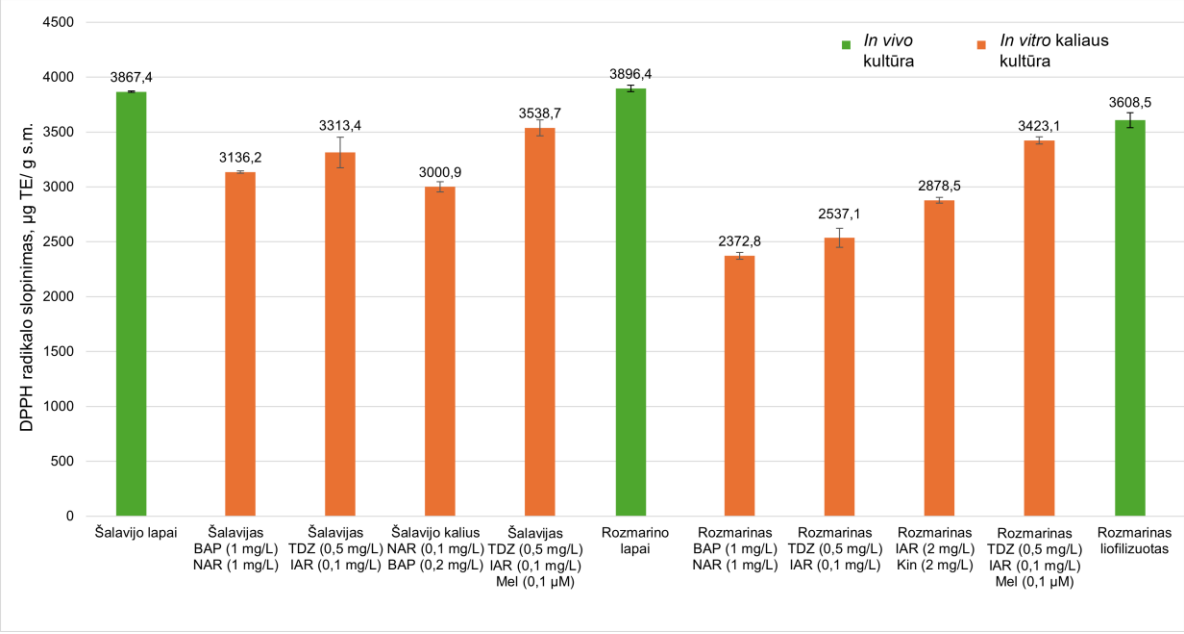
3.1.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Rezultatams apskaičiuoti, sudaryta trolokso kalibracinė kreivė (3.4 pav.). Antioksidacinio aktyvumo įvertinimo DPPH metodu rezultatai vaizduojami 3.5 paveiksle. Matomas *in vivo* kultūrų dominavimas (3608,5–3896,4 µg TE/g s. m.), tačiau taip pat išsiskiria *in vitro* kaliaus kultūros, augintos terpėje, praturtintoje sintetiniu citokininu TDZ ir natūraliu auksinu IAR. Stipriausią antioksidacinį aktyvumą iš šių kaliaus kultūrų rodo šalavijo ir rozmarino kultūros, augintos terpėje, papildytoje ne tik TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L), bet ir melatoninu (0,1 µM), esant 3538,7 ir 3423,1 µg TE/g s. m. vertėms atitinkamai. Teigiamą melatonino įtaką *Lamiaceae* augalų *in vitro*

kaliaus kultūroms aprašė Nazir *et al.* [115]. Šių mokslininkų tyrimo su baziliko (lot. *Ocimum basilicum* L.) kaliaus kultūromis, augintomis mitybinėje terpėje su melatoninu, metu fiksuotas ~10 % padidėjęs DPPH radikalo slopinimas (esant 1; 4 ir 5 mg/L melatonino koncentracijai mitybinėje terpėje) [115]. Tiesa, *in vitro* šalavijo kaliaus kultūra, auginta tik su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) augimo reguliatoriais, taip pat pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu – 3313,4 µg TE/g s. m., tačiau tokiomis pačiomis sąlygomis suformuota rozmarino *in vitro* kultūra rodo beveik ~1,5 karto mažesnį aktyvumą nei *in vivo* rozmarino ir šalavijo lapų mėginiuose.



3.4 pav. Trolokso kalibracinė kreivė



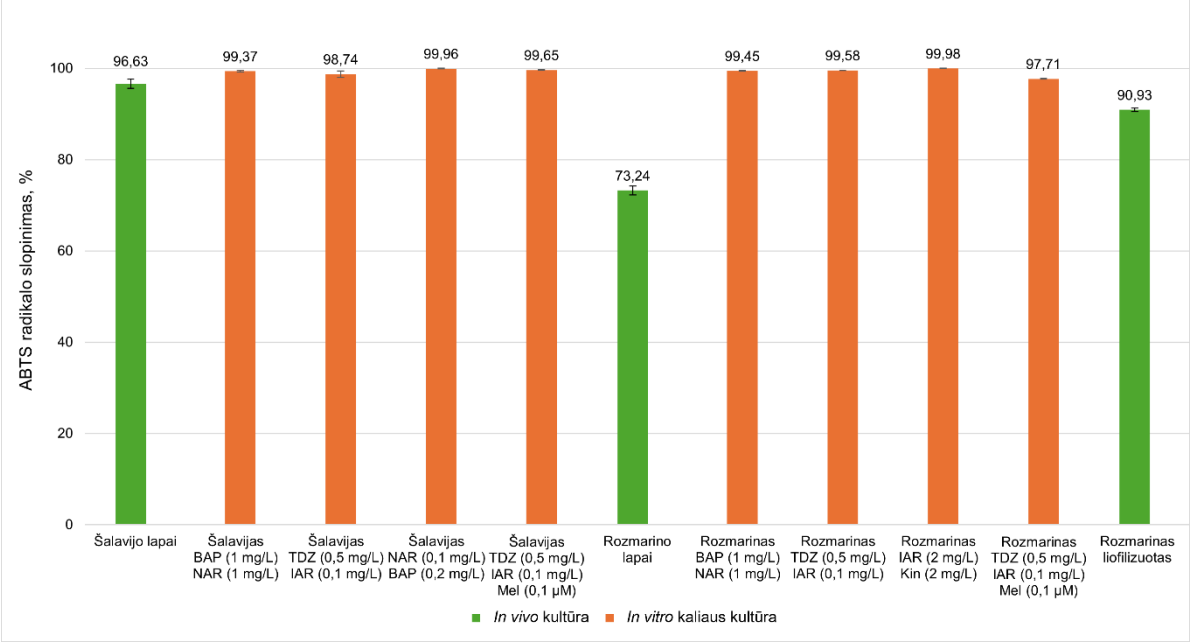
3.5 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, įvertintas DPPH metodu, išreikštas trolokso ekvivalentais (TE)

Apskritai stebimas sąlyginai panašus daugelio *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų antioksidacinis aktyvumas bei sąlyginai panašios reikšmės tarp šalavijo ir rozmarino mėginių. DPPH metodas yra selektyvesnis nei, pvz., ABTS. Viena iš priežasčių – jis yra jautresnis lipofiliniams junginiams. Taip pat DPPH radikalo neutralizavimas vyksta dviem mechanizmais – SET ir HAT, tačiau HAT yra labiau dominuojantis, todėl reakcijos tarp antioksidanto ir DPPH vyksta lėčiau ir geriausiai fiksuojamos mažos, didelį aktyvumą turinčios molekulės [116]. Taigi, galima teigti, jog ir šalavijo, ir

rozmarino *in vivo* ir *in vitro* kultūros sintetina ir kaupia panašius kiekius mažų, reaktyvių, lipofiliškumu pasižyminčių antioksidacinių junginių.

3.1.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

Antioksidacinio aktyvumo įvertinimo šiuo metodu rezultatai rodo, jog visos augalų kultūros geba veiksmingai neutralizuoti ABTS radikalą – stebimas 73,24–99,98 % ABTS radikalo slopinimas (3.6 pav.). Interpretuojant rezultatus verta atsižvelgti į tam tikrus šio metodo aspektus. ABTS radikalas yra tirpus ir vandenyje, ir organiniuose tirpikliuose bei veikia plačiame pH spektre, o ABTS radikalo neutralizavimas vyksta HAT ir SET mechanizmais. Vadinasi, šis metodas yra plataus spektro ir juo galima fiksuoti įvairaus poliariškumo antioksidantus. Taip pat reakcija su ABTS radikalu yra jautri antioksidaciniams junginiams, turintiems mažesnį aktyvumą ar žaliavoje esantiems mažesnėmis koncentracijomis [116]. *In vivo* šalavijo lapų metanolio ekstrakto rezultatai (99,63 % ABTS radikalo slopinimas) koreliuoja su Gupta *et al.* [117] rezultatais, kur šalavijo metanolio ekstrakte pasiekiamas iki ~95 % ABTS radikalo slopinimas. Tačiau Gokduman'o ir Kalay tyrime [118] *Salvia spp.* metanolio ekstrakte stebimos silpnesnės antioksidacinės savybės – 58,23 % ABTS radikalo slopinimas. Tiesa, minėtame Gupta *et al.* [117] tyrime rozmarino metanolio ekstraktas taip pat rodo iki ~95 % ABTS radikalo slopinimą, tačiau šiame tyrime reikšmė mažesnė – 73,24 %.

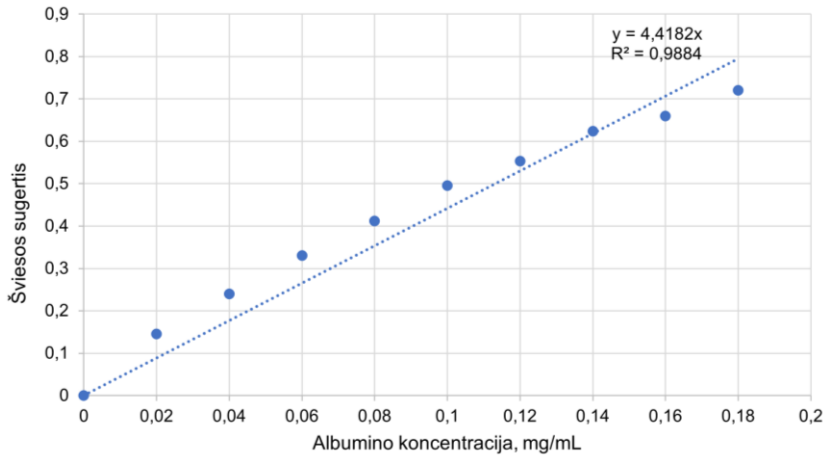


3.6 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, įvertintas ABTS metodu

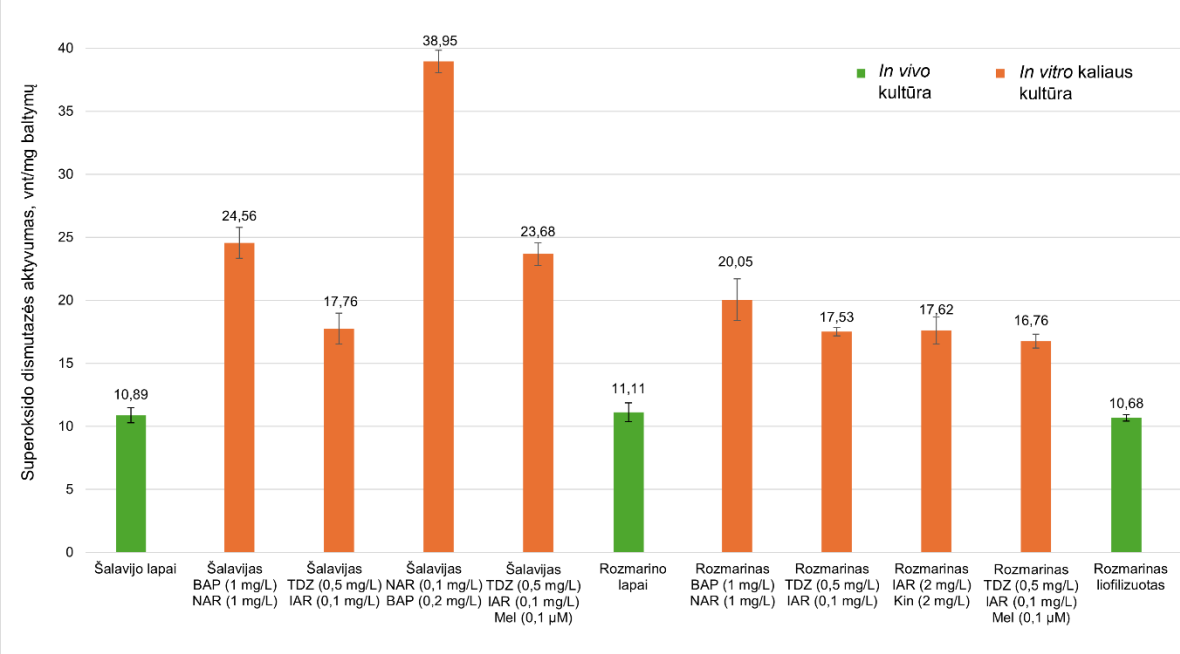
Taip pat matoma tendencija, jog *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktai efektyviau neutralizuoja ABTS radikalą nei *in vivo* kultūrų, ypač rozmarino mėginiuose, kur *in vivo* lapų ekstrakte ABTS radikalo slopinimas yra 73,24 %, o *in vitro* kaliaus kultūrų mėginiuose – iki 99,98 % (mėginyje su IAR (2 mg/L) ir Kin (2 mg/L)). Kadangi redukcinių savybių įvertinimas bei antioksidacinio aktyvumo vertinimas FRAP ir DPPH metodais rodo priešingus rezultatus, galima kelti hipotezę, jog augimo reguliatoriai *in vitro* skatina kitokių, pvz., labiau hidrofiliškų ar kitaip struktūriškai skirtingų, antioksidantų sintezę nei sintetinama natūraliomis sąlygomis augančiuose augaluose.

3.1.5. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

SOD aktyvumo įvertinimas reprezentuoja fermentinės antioksidacinės sistemos tyrimą vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino augalų kultūrose. Pirmiausia, baltymų frakcijos rezultatams apskaičiuoti, sudaryta albumino kalibracinė kreivė (3.7 pav.). Iš apskaičiuotų SOD aktyvumo rezultatų matyti, jog abiejų augalų *in vitro* kaliaus kultūrose fermentinė antioksidacinė sistema aktyvesnė nei *in vivo* mėginiuose (3.8 pav.). Matoma tendencija, jog stiprus SOD aktyvumas yra *in vitro* kultūrose, augintose su įvairiomis koncentracijomis citokinino BAP ir auksino NAR. Stipriausias aktyvumas – 38,95 vnt/mg baltymų – stebimas *in vitro* šalavijo kaliaus kultūroje, formuotoje terpėje, praturtintoje 0,2 mg/L BAP ir 0,1 mg/L NAR. Tai beveik 4 kartus didesnis rezultatas nei *in vivo* mėginyje (10,89 vnt/mg baltymų). Didesnės minėtų fitohormonų koncentracijos (po 1 mg/L) *in vitro* šalavijo ir rozmarino mėginiuose lemia apie 2 kartus didesnį SOD aktyvumą, lyginant su atitinkamomis *in vivo* lapų kultūromis. Tyrimų su kitais augalais metu taip pat nustatyta, jog BAP ir NAR skatina SOD aktyvumą augalų *in vitro* sistemose. Pavyzdžiui, Jonuškienės *et al.* [100] tyrimo su paprastosios jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) ekstraktais metu, 0,5 mg/L BAP ir 2,5 mg/L NAR lėmė ~2 kartus didesnį SOD aktyvumą, lyginant su *in vivo* sąlygomis auginto augalo ekstraktu.



3.7 pav. Albumino kalibracinė kreivė



3.8 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų antioksidacinio fermento SOD aktyvumas

Nors su TDZ ir IAR formuotų *in vitro* kaliaus kultūrų rezultatai rodė tendencingus teigiamus rezultatus antioksidacinio aktyvumo tyrimuose, SOD aktyvumas 75 % mėginių, augintų su šiais augimo reguliatoriais, yra mažiausias (~17 vnt/mg baltymų), lyginant su kitomis *in vitro* kultūromis. Vadinasi, galima daryti prielaidą, jog augimo reguliatoriai TDZ ir IAR fermentinės antioksidacinės sistemos veikimo šalavijo ir rozmarino *in vitro* kaliaus kultūrose reikšmingai nestimuliuoja.

Tarpusavyje lyginant šalavijo ir rozmarino mėginių SOD aktyvumą, didesnis aktyvumas stebimas šalavijo ekstraktuose. Tai atitinka redukcinių savybių rezultatų aptarime iškeltą prielaidą, kad didesnės ir mažiau susigrupavusios šalavijo mėginių vertės gali rodyti didesnį šio augalo kultūrų metabolizmo jautrumą fitohormonams, auginant *in vitro* sąlygomis.

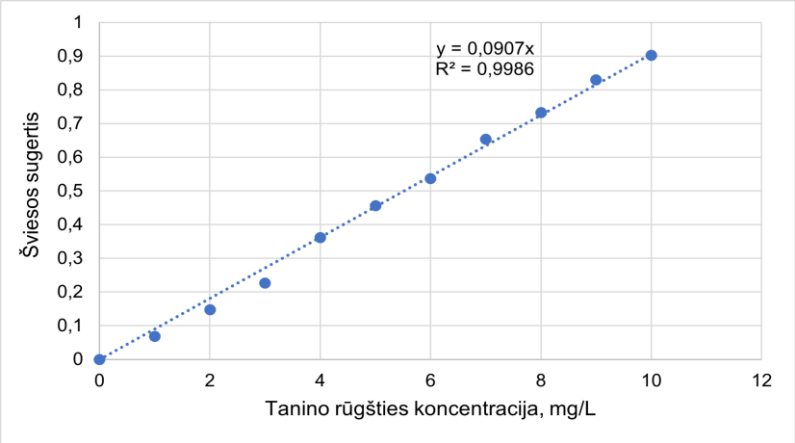
3.2. Bioaktyviųjų metabolitų koncentracijos įvertinimas

Siekiant konkrečiau išsiaiškinti, kokie junginiai lemia antioksidacinį aktyvumą tiriamų augalų kultūrų ekstraktuose, nustatyta tam tikrų bioaktyviųjų metabolitų koncentracija. Įvertinta bendra fenolinių junginių bei flavonoidų, *L*-prolino, redukuoto glutationo koncentracijos. Šių aukštos pridėtinės vertės metabolitų koncentracijų tyrimai yra vertinga medžiaga tolimesniam *in vitro* kaliaus kultūrų, kaip sistemų aukštos pridėtinės vertės junginių gamybai, tyrimui. Papildomai nustatyta malondialdehido – vieno iš oksidacinio streso rodiklių – koncentracija.

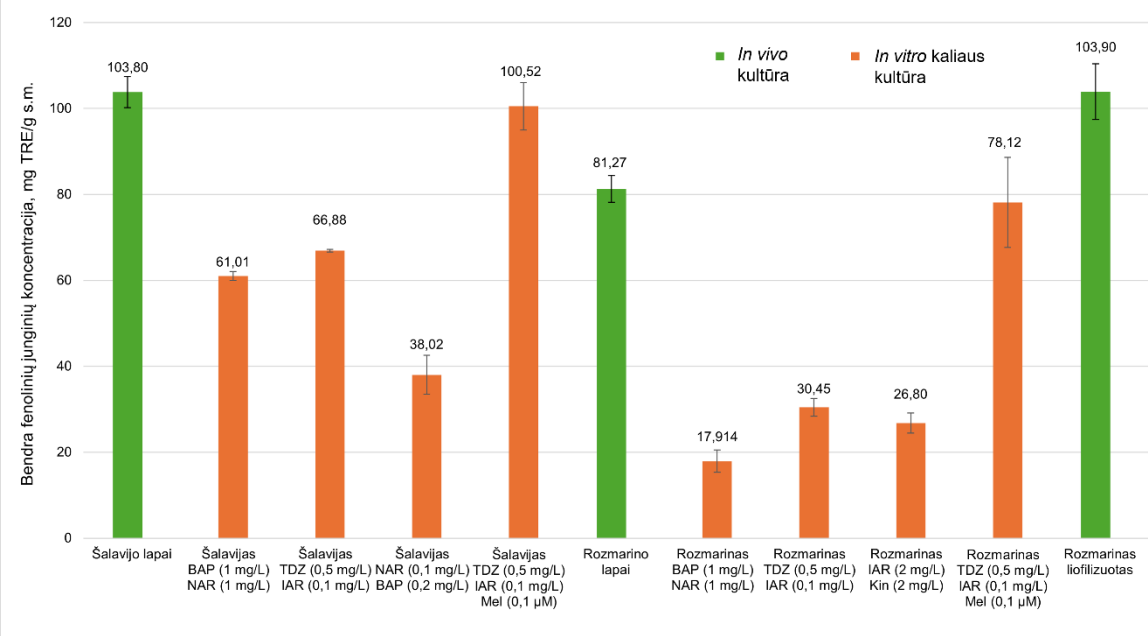
3.2.1. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas

Bendroji fenolinių junginių koncentracija apskaičiuota pagal sudarytą tanino rūgšties kalibracinę kreivę (3.9 pav.). Apskaičiuoti tyrimo rezultatai pavaizduoti 3.10 paveiksle. Didžiausia šių junginių koncentracija stebima *in vivo* šalavijo ir rozmarino augaluose bei jų *in vitro* kultūrose, augintose mitybinėje terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 m/L) ir Mel (0,1 µM) – šalavijo ekstraktuose ~100 mg TRE/g s. m., rozmarino ~80 mg TRE/g s. m. Kiti tyrimai taip pat nurodo šių augalų ir jų *in vitro* kultūrų fenolinių junginių koncentracijas, nors *in vitro* kultūrų tyrimų nėra daug. Tiesa, daugumoje tyrimų, bendra fenolinių junginių koncentracija išreiškiama ne tanino rūgšties, o galo rūgšties

ekvivalentais (toliau – GRE). *Salvia officinalis* L. *in vivo* kultūrų organinių tirpiklių ekstraktuose fenolinių junginių koncentracija varijuoja tarp 41,61–162,37 mg GRE/g s. m. [30, 113, 119]. Tuo tarpu *in vitro* kultūrose – 10–95 mg GRE/g ekstrakto [120]. Kilic *et al.* [78] taip pat aprašo reikšmingą fenolinių junginių, tokių kaip rozmarino rūgštis ir alfa-tujonas, koncentracijos padidėjimą *S. officinalis* L. *in vitro* kaliaus kultūrų mėginiuose su 100 µM melatonino, lyginant su kontrole be melatonino.



3.9 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė



3.10 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų bendra fenolinių junginių koncentracija, išreikšta tanino rūgšties ekvivalentais (TRE)

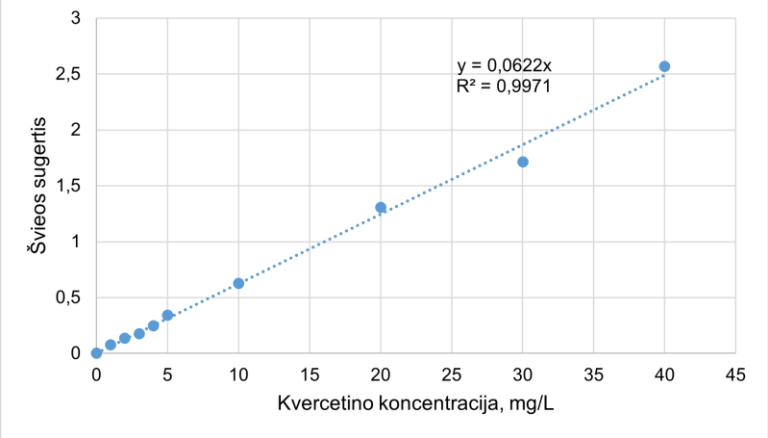
Rozmarino *in vivo* lapų organinių tirpiklių ekstraktuose fenolinių junginių koncentracija varijuoja nuo 44,56 iki 72,39 mg GRE/g s. m., o *in vitro* kaliaus kultūrose, augintose įvairiose mitybinėse terpėse ir su įvairiais augimo reguliatoriais – 20–115 mg GRE/g ekstrakto [113, 121, 122]. Coskun *et al.* [77] tyrė melatonino įtaką *Rosmarinus officinalis* L. *in vitro* kaliaus kultūroms ir nustatė, jog 100 ir 200 µM melatonino didina rozmarino ir kavos rūgščių koncentracijas. Lyginant rozmarino *in vivo* mėginius, matomas liofilizuoto rozmarino dominavimas. Kwasniewska-Karolak ir Mostowski tyrimo [123] metu, vertinta *in vivo Salvia officinalis* L. bei *Rosmarinus officinalis* L. biomasės džiovinimo metodų įtaka įvairių bioaktyviųjų metabolitų koncentracijoms. Nustatyta, jog šalavijo, džiovinto

konvekcinio džiovinimo būdu, polifenolinių junginių koncentracija buvo 1159,79 mg/100 g s. m., o liofilizuoto šalavijo – 1333,12 mg/100 g s. m. Panašūs rezultatai stebimi ir rozmarino kultūroje. Konvencinio džiovinimo mėginyje nustatyta 2019,00 mg/100 g s. m. koncentracija, o liofilizuotame – 2502,39 mg/100 g s. m. Tad, galima teigti, jog liofilizavimas apsaugo fenolinius junginius augalinės biomasės džiovinimo procese.

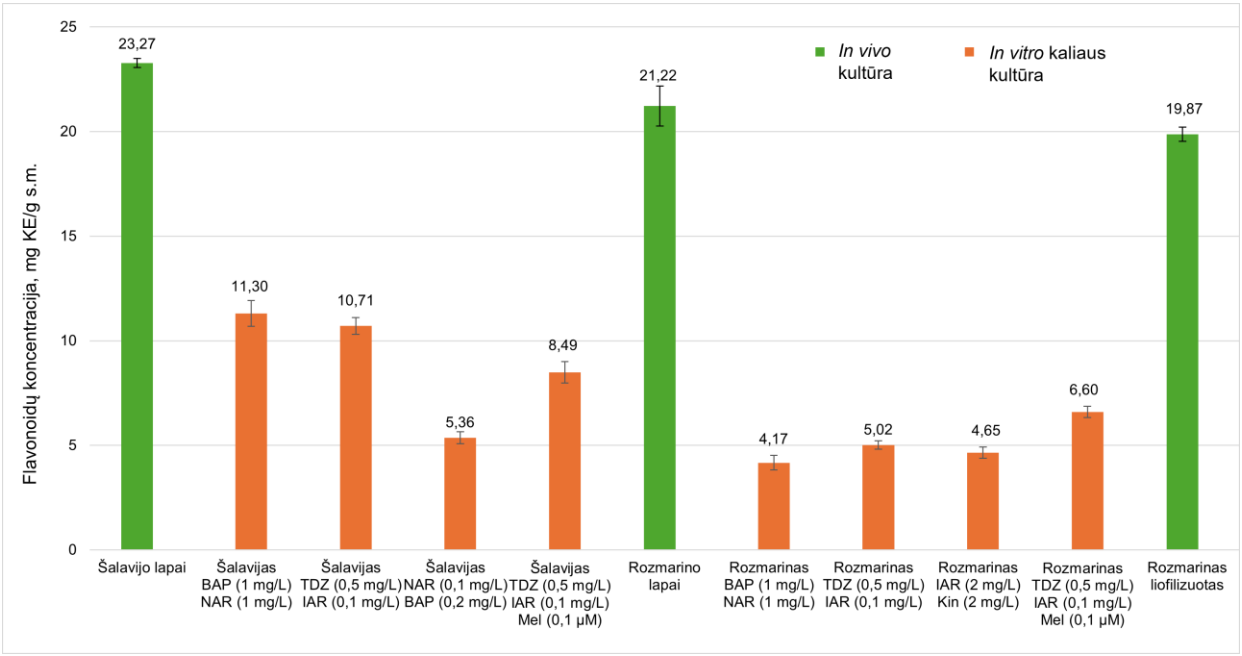
Šalavijo ir rozmarino augalų *in vitro* kaliaus kultūrose taip pat stebimos didesnės vertės naudojant TDZ ir IAR fitohormonų derinį be melatonino (66,88 ir 30,45 mg TRE/g s. m. atitinkamai), lyginant su kitais augimo reguliatorių deriniais. Tai koreliuoja su antioksidacinio aktyvumo eksperimentų metu stebėta teigiama šių priedų įtaka antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių sintezei ir kaupimuisi. Taip pat matoma tendencija, jog abiejų augalų kultūros, pasižyminčios didelėmis fenolinių junginių koncentracijomis, turi mažesnį SOD aktyvumą ir atvirkščiai. Galima kelti hipotezę, jog augalų kultūros, kurios nesintetina daug fenolinių junginių ir dėl to neturi stiprios nefermentinės antioksidacinės sistemos, tai kompensuoja aktyvesne fermentinės antioksidacinės sistemos veikla.

3.2.2. Bendrosios flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Flavonoidų koncentracijai apskaičiuoti, sudaryta kvercetino kalibracinė kreivė (3.11 pav.). Įvertinus flavonoidų koncentracijas (3.12 pav.), matoma, jog didžioji dalis rezultatų koreliuoja su bendrosios fenolinių junginių koncentracijos rezultatais. Taip yra dėl to, jog flavonoidai yra fenolinių junginių frakcija. Didžiausios flavonoidų koncentracijos matomos abiejų augalų *in vivo* kultūrose – šalavijo lapų kultūra rodo 23,27 mg KE/g s. m., o rozmarino lapų ir liofilizuoto rozmarino – 21,22 ir 19,87 mg KE/g s. m. atitinkamai. Kiti tyrimai nurodo šiek tiek mažesnes koncentracijas. Moshari-Nasirkandi *et al.* [33] dviejų *Salvia officinalis* L. mėginių metanolio ekstraktuose nustatė 11,96 ir 13,63 mg KE/g s. m. flavonoidų koncentraciją, o Bianchin *et al.* [113] liofilizuotame šalavijo ekstrakte – 15,03 mg KE/g s. m. Tuo tarpu pastarajame tyrime liofilizuotame rozmarino ekstrakte nustatyta 11,89 mg KE/g s. m. koncentracija, o Yeddes *et al.* [122] etanolio ekstrakte nustatė tik 3,20 mg KE/g s. m. koncentraciją. Šiuos skirtumus gali lemti augalų auginimo sąlygų ypatumai bei ekstrakcijos proceso variacijos.



3.11 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė

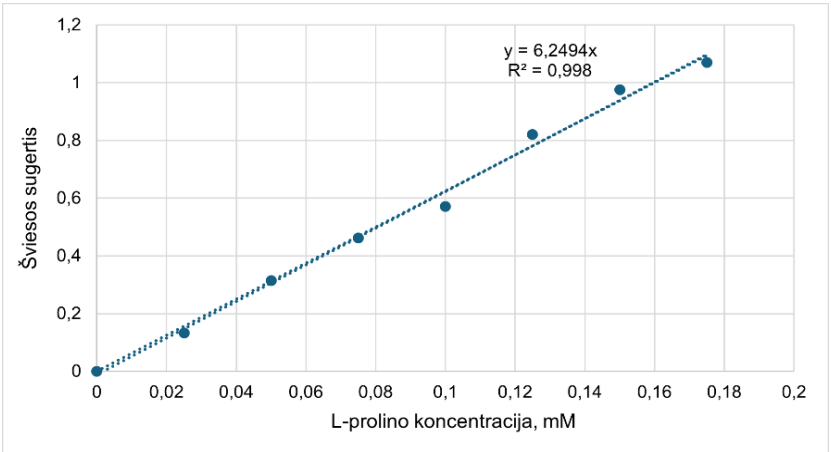


3.12 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų flavonoidų koncentracija, išreikšta kvercetino ekvivalentais (KE)

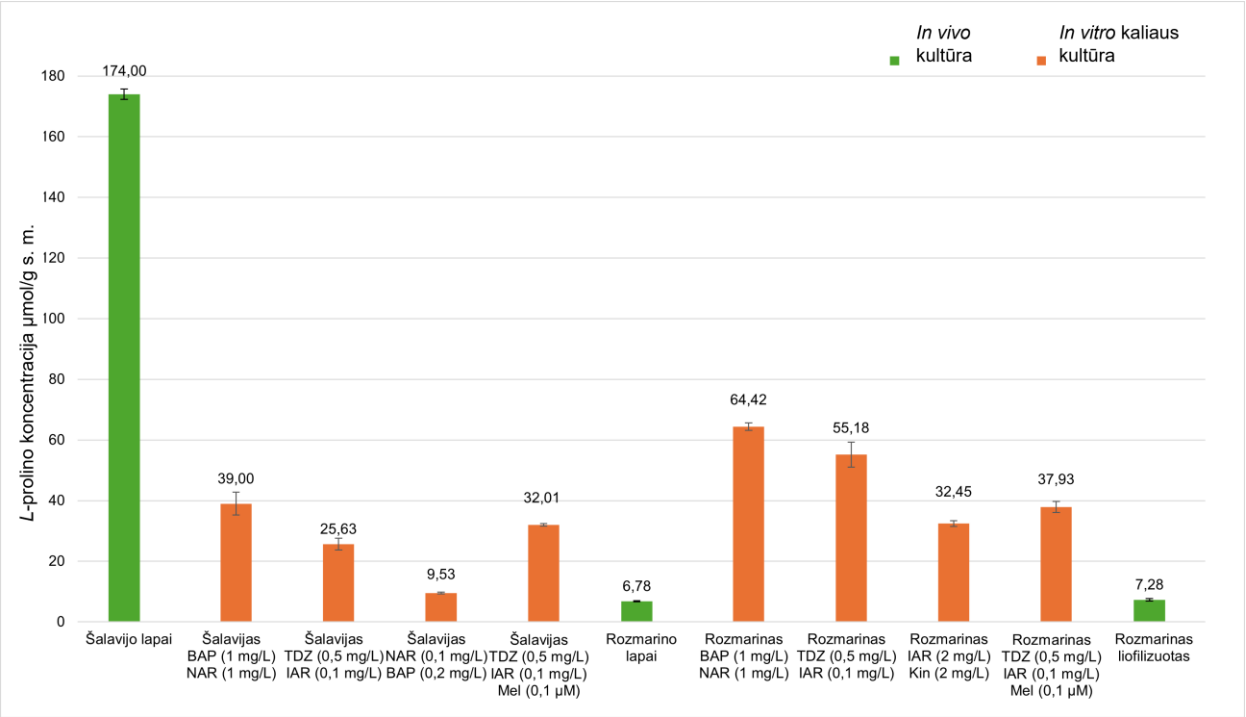
In vivo kultūros pasižymi didesniu flavonoidų kiekiu nei *in vitro* kaliaus kultūros, kuriose didžiausios flavonoidų koncentracijos yra šalavijo kultūroje, augintoje su BAP (1 mg/L) ir NAR (1 mg/L) – 11,30 mg KE/g s. m. bei šalavijo kultūroje, augintoje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) (10,71 mg KE/g s. m.). Nors didžiausios *in vitro* fenolinių junginių koncentracijos buvo mėginiuose su TDZ, IAR ir Mel, šiame tyrime taip nėra. Todėl galima kelti hipotezę, jog pastarasis augimo reguliatorių derinys skatina kitų fenolinių junginių klasių sintezę ir kaupimąsi šalavijo ir rozmarino kultūrose.

3.2.3. *L*-prolino koncentracijos įvertinimas

L-prolino kalibracinė kreivė, sudaryta rezultatams apskaičiuoti, vaizduojama 3.13 paveiksle. *L*-prolino koncentracijos ženkliai skiriasi šalavijo ir rozmarino mėginiuose (3.14 pav.). *In vivo* šalavijo variante stebima didžiausia 174,00 µmol/g s. m. koncentracija, o *in vitro* mėginiuose *L*-prolino koncentracija yra nuo 4 iki 19 kartų mažesnė. Tuo tarpu rozmarino *in vivo* kultūrose koncentracija itin maža (6,78–7,28 µmol/g s. m.), o *in vitro* kaliaus kultūrose 4–9 kartus didesnė. Šie rezultatai parodo, jog *L*-prolino kaupimasis *in vitro* kaliaus kultūrose priklauso nuo rūšies.



3.13 pav. *L*-prolino kalibracinė kreivė



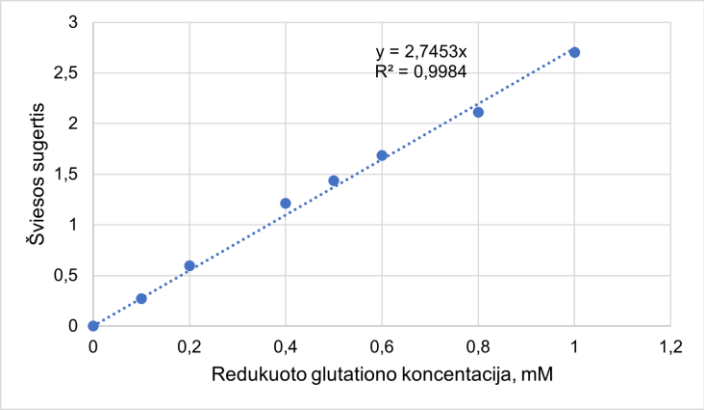
3.14 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų *L*-prolino koncentracija

L-prolino kaupimasis gali indikuoti abiotinio streso lygį augalų ląstelėse. Pavyzdžiui, tyrime su *in vivo Salvia officinalis* L. augalu, paveiktu streso veiksniais – sausros sąlygomis ir toksišku agentu putrescinu, nustatytos skirtingos *L*-prolino koncentracijos. Paveikus putrescinu šios aminorūgšties koncentracija buvo ~70 kartų didesnė nei sausros sąlygomis [124]. Taigi, *L*-prolino kaupimasis labai priklauso nuo aplinkos sąlygų. Žinant šios aminorūgšties koncentraciją *in vitro* augalų ląstelių kultūrose galima geriau suprasti, kurie augimo reguliatorių deriniai sudaro nepalankesnes sąlygas kultūros augimui. Didelės *L*-prolino koncentracijos nustatytos *in vitro* kultūrose, augintose su fitohormonų deriniu BAP (1 mg/L) ir NAR (1 mg/L) – šalavijo mėginyje stebima 39,00 µmol/g s. m. koncentracija, o rozmarino mėginyje 64,42 µmol/g s. m. Tačiau *in vitro* šalavijo variante su mažesnėmis šių augimo reguliatorių koncentracijomis (0,2 ir 0,1 mg/L atitinkamai), rezultatas beveik 4 kartus mažesnis, vadinasi, tokios koncentracijos yra per mažos indukuoti antioksidacinių junginių, kaip atsako į stresą, sintezę. Rozmarino *in vitro* kultūrų, augintų su TDZ, IAR ir su arba be melatonino, ekstraktuose stebima sąlyginai didelė *L*-prolino koncentracija (55,15 ir 37,93 µmol/g s. m.). Tai dar kartą patvirtina šio augimo reguliatorių derinio tinkamumą antioksidacinės sistemos aktyvavimui.

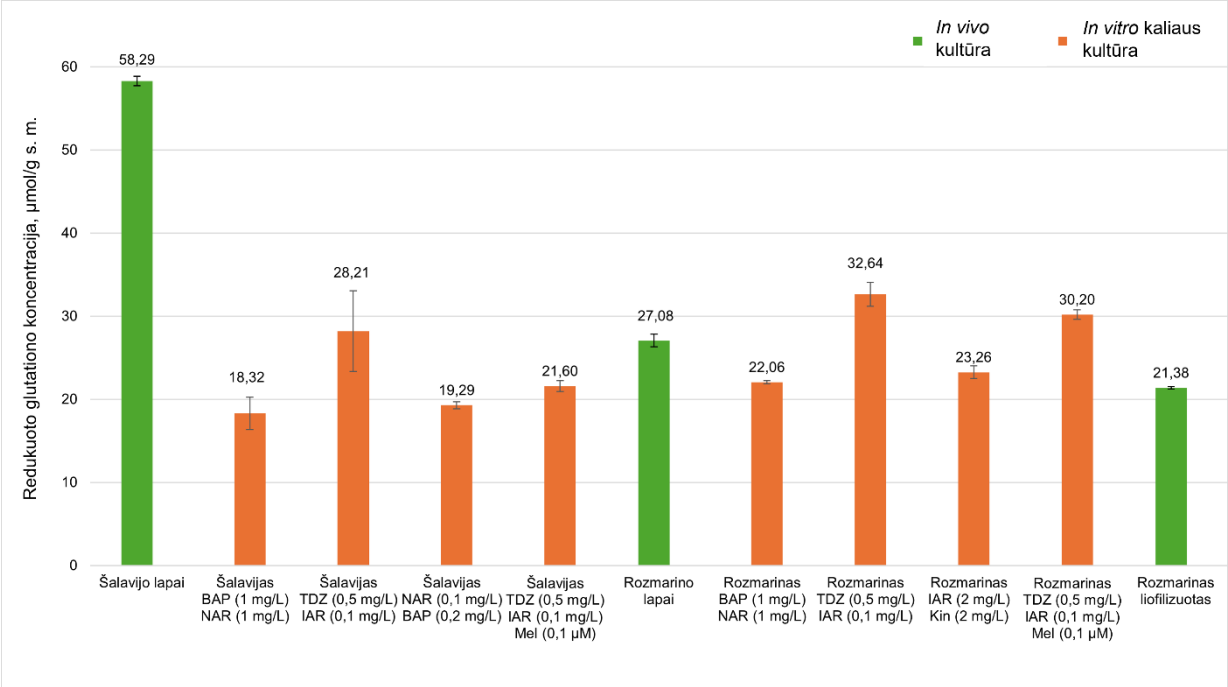
3.2.4. Redukuoto glutationo koncentracijos įvertinimas

Sudaryta GSH kalibracinė kreivė (3.15 pav.) ir tuomet įvertinta GSH koncentracija tiriamųjų augalų kultūrų ekstraktuose (3.16 pav.). Matomas aiškus *in vivo* šalavijo lapų kultūros dominavimas – 58 µmol/g s. m. GSH koncentracija. *In vivo* rozmarino mėginiuose nustatyta 2–3 mažesnė GSH koncentracija lyginant su *in vivo* šalaviju – 27,08 ir 21,38 µmol/g s. m. *in vivo* lapų ir liofilizuotame mėginiuose atitinkamai. Nepaisant mažesnių rozmarino mėginių verčių, šio augalo *in vitro* kaliaus kultūrose TDZ ir IAR augimo reguliatorių derinys su ir be melatonino paskatino GSH kaupimąsi iki verčių, viršijančių *in vivo* lapų mėginių rezultatus. Tai rodo stiprų *in vitro* metabolinį atsaką. *In vitro* rozmarino kultūroje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) pasiekta 32,64 µmol/g s. m. GSH

koncentracija, o *in vitro* kultūroje, augintoje su šiais fitohormonais ir Mel (0,1 µM), – 30,20 µmol/g s. m.



3.15 pav. Redukuoto glutationo kalibracinė kreivė

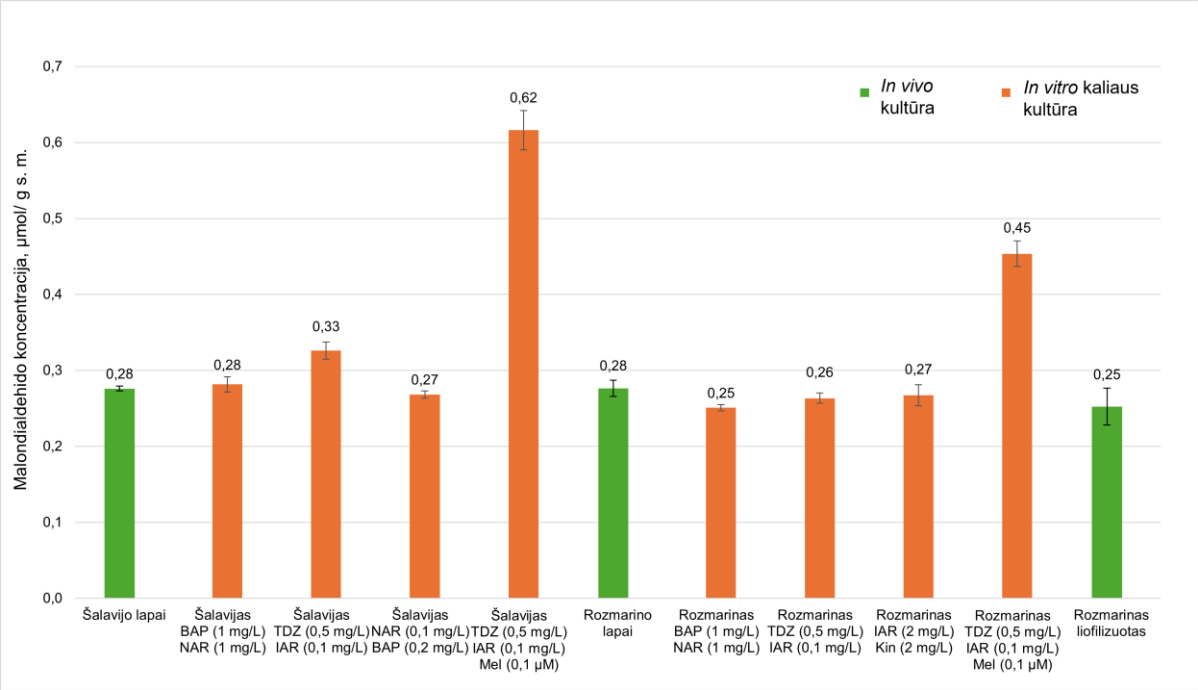


3.16 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų redukuoto glutationo koncentracija

Abiejų augalų *in vitro* kaliaus kultūros rodo didesnes GSH koncentracijas, esant TDZ ir IAR fitrohormonų deriniui su ir be melatonino. Šie rezultatai siejasi su antioksidacinio aktyvumo ir fenolinių junginių tyrimo rezultatais. Dėl šio tendencingumo galima manyti, jog šie augimo reguliatoriai tiriamose kultūrose skatina ne tik fenolinių junginių, bet ir kitų antioksidantų, tokių kaip GSH, sintezę. Tyrimų, tiesiogiai nurodančių GSH koncentraciją šalavijo ir rozmarino *in vitro* ar *in vivo* kultūrose yra itin mažai. Nepaisant to, nustatyta, jog auksinai ir citokininai tiesiogiai ir netiesiogiai veikia GSH aktyvumą augalų ląstelėse. Vienas iš mechanizmų – GSH genų raiškos indukcija. Yra žinoma, jog auksinai indukuoja *GSTU5* geno, koduojančio fermentą glutationo S-transferazę U5, raišką augalų ląstelėse. Šis fermentas dalyvauja GSH konjugacijoje su egzo- ir endogeniniais toksiškais junginiais bei turi įtakos glutationo peroksidazės aktyvumui, todėl yra svarbus esant oksidaciniam stresui ląstelėje [125, 126].

3.2.5. Malondialdehido koncentracijos įvertinimas

Antioksidacinio aktyvumo ir bioaktyviųjų metabolitų koncentracijų tyrimai suteikia informacijos apie augalų ląstelių gebėjimą apsisaugoti nuo didelio kiekio ROS, susidariusių dėl biotinio ir abiotinio streso. MDA koncentracija įvertinta siekiant išsiaiškinti oksidacinio streso pasekmes, kadangi šio junginio koncentracija kyla esant lipidų peroksidacijai, t. y. kuomet ROS pažeidžia plazminės membranos fosfolipidus [127]. Gauti rezultatai vaizduojami 3.17 paveiksle.



3.17 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų malondialdehido koncentracija

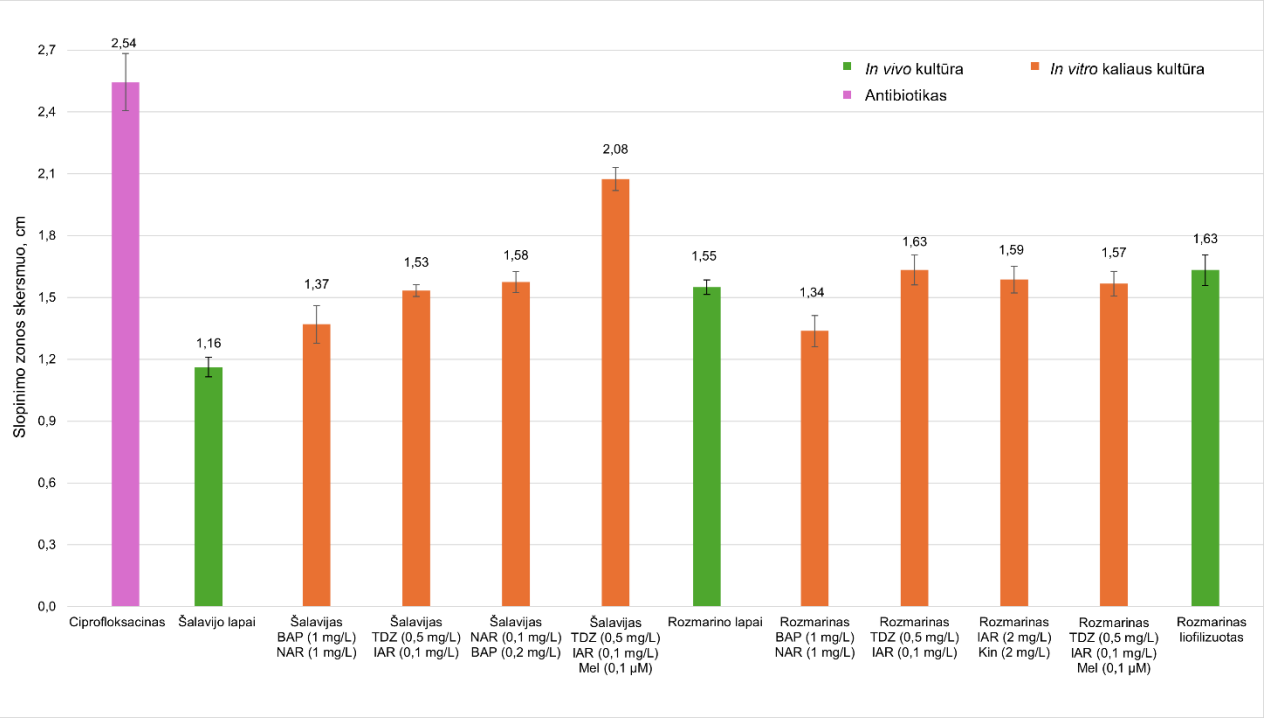
Gautos itin panašios šalavijo ir rozmarino *in vivo* MDA koncentracijos, todėl galima teigti, jog šie augalai patiria panašaus lygio lipidų peroksidaciją augdami natūraliomis sąlygomis. Verta pažymėti, jog daugumoje mėginių – tiek *in vivo*, tiek *in vitro*, stebima itin panaši MDA koncentracija (0,25–0,33 µmol/g s. m.). Tai įrodo, jog šalavijo ir rozmarino kultūrose *in vitro* sąlygos savaime nesukelia reikšmingos oksidacinės žalos.

Tik *in vitro* šalavijo ir rozmarino mėginiuose su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir Mel (0,1 µM) nustatyta apie 1,5–2 karto didesnė MDA koncentracija nei *in vivo* mėginiuose, gaunant 0,62 ir 0,45 µmol/g s. m. atitinkamai. Šie rezultatai siejasi su antioksidacinio aktyvumo, fenolinių junginių ir GSH tyrimo rezultatais, kadangi tikėtina, jog didesnis oksidacinis stresas šių augalinių kultūrų ląstelėse veikia kaip antrinio metabolizmo aktyvacijos veiksnys ir skatina antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių sintezę.

3.3. Tiriamųjų ekstraktų antibakterinių savybių prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* įvertinimas

Pirmiausia įvertintas antibakterinis aktyvumas prieš *Escherichia coli* bakterijas (3.18 pav.). Šalavijo mėginiuose prieš *E. coli*, stebimas stipresnis *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktų antibakterinis poveikis nei *in vivo* lapų ekstraktų. *In vivo* lapų ekstrakte fiksuota 1,16 cm skersmens slopinimo zona. Tuo tarpu tyrimo su *Salvia sp.* augalų *Salvia aegyptiaca* ir *Salvia lanigera in vivo* etanolio ekstraktais

metu gautos 2,2 ir 3,0 cm slopinimo zonos atitinkamai [128]. Nors pastarajame tyrime naudotos ne *Salvia officinalis* L., o kitos *Salvia sp.* rūšys, tolimesniems tyrimams galima apsvarstyti ne DMSO, o etanolio pasirinkimą ekstrakcijai. Stipriausios antibakterinės savybės matomos šalavijo *in vitro* kultūros, augintos su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir Mel (0,1 µM) ekstrakte, stebint 2,08 cm skersmens slopinimo zoną. Tai reikšmingas rezultatas, lyginant su kontrolės ciprofloksacino rezultatu – 2,54 cm – ir kitų šalavijo ir rozmarino mėginių rezultatais (iki 1,63 cm).



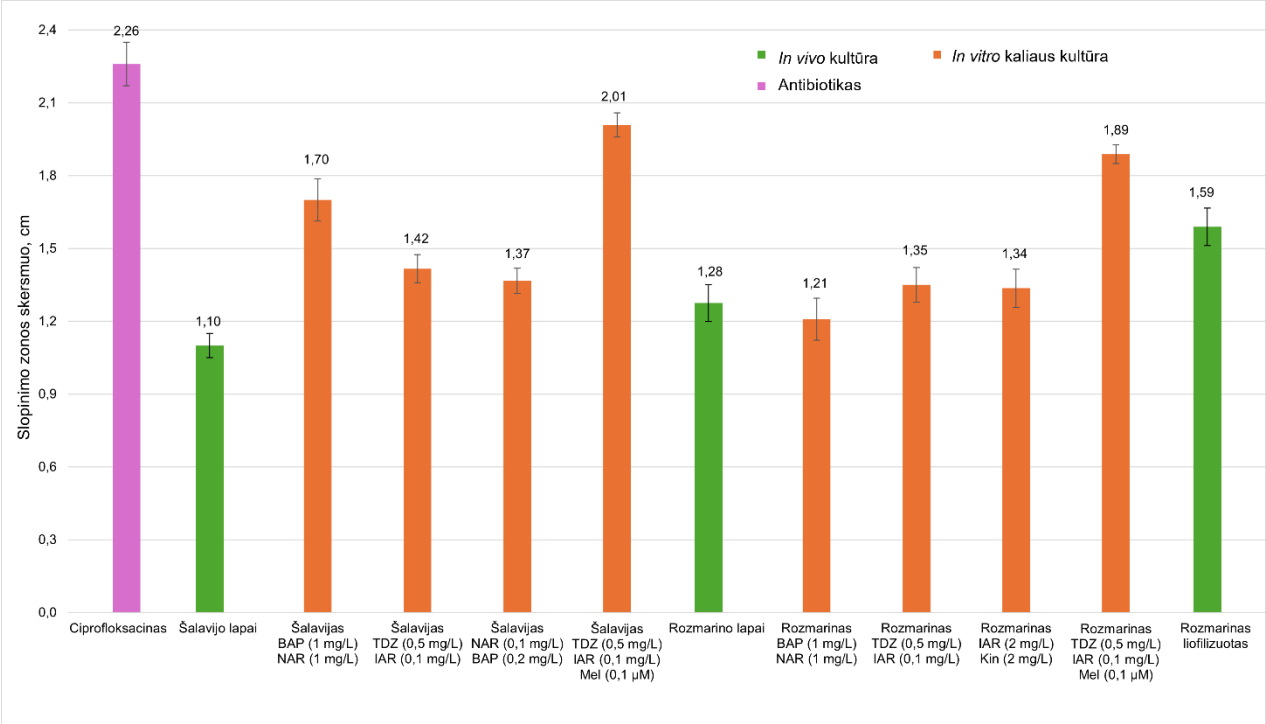
3.18 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų bei antibiotiko ciprofloksacino antibakterinės savybės prieš *Escherichia coli*

Rozmarino ekstraktų rezultatai rodo panašų antibakterinį aktyvumą prieš *E. coli* tiek *in vivo*, tiek *in vitro* kultūrose – nuo 1,34 iki 1,63 cm skersmens slopinimo zonas. Yeddes *et al.* [122] *in vivo* rozmarino kultūros etanolio ekstrakte fiksuoja panašią reikšmę – 1,38 cm slopinimo zoną. Al-jaafreh tyrime [121] su džiovinta natūraliomis sąlygomis auginta rozmarino biomase, ekstrahuojant įvairiais organiniais tirpikliais, nurodomas didesnis antibakterinis aktyvumas prieš *E. coli*. Matomos 2,18; 1,98; 17,2 ir 1,18 cm slopinimo zonos metanolio, etanolio, acetono ir etilacetato ekstraktuose atitinkamai. Nieto *et al.* [129] bei Bernardes *et al.* [130] teigia, jog rozmarino ekstrakto antimikrobinis aktyvumas atsiranda dėl rozmarino ir karnozolio rūgščių bei jų darinių, tokių kaip karnozolis, rozmanolis ir izorozmanolis, biologinio aktyvumo. Šie junginiai pasižymi lipofiliškumu, todėl gali sąveikauti su bakterijų ląstelių fosfolipidinėmis membranomis, sukeldami jų pažaidas ir ląstelinių komponentų nutekėjimą. Be to, šie bioaktyvieji junginiai gali sąveikauti su membraniniais baltymais, taip prisidedant prie plazminės membranos funkcionalumo ir struktūros ardymo.

Antibakterinio aktyvumo prieš *Bacillus subtilis* rezultatai vaizduojami 3.19 paveiksle. Šiame tyrime didžioji dalis *in vitro* kaliaus kultūrų taip pat rodo didesnį antibakterinį aktyvumą nei *in vivo* kultūros. Išsiskiria TDZ, IAR ir Mel papildytoje terpėje auginti mėginiai: *in vitro* šalavijo kaliaus kultūra, auginta su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir Mel (0,1 µM) rodo 2,01 cm slopinimo zoną, o tokiomis pačiomis sąlygomis auginta rozmarino kultūra – 1,89 cm. Šie rezultatai yra sąlyginai artimi antibiotiko ciprofloksacino kontrolei (2,26 cm). Taip pat *in vitro* šalavijo kaliaus kultūra, auginta tik

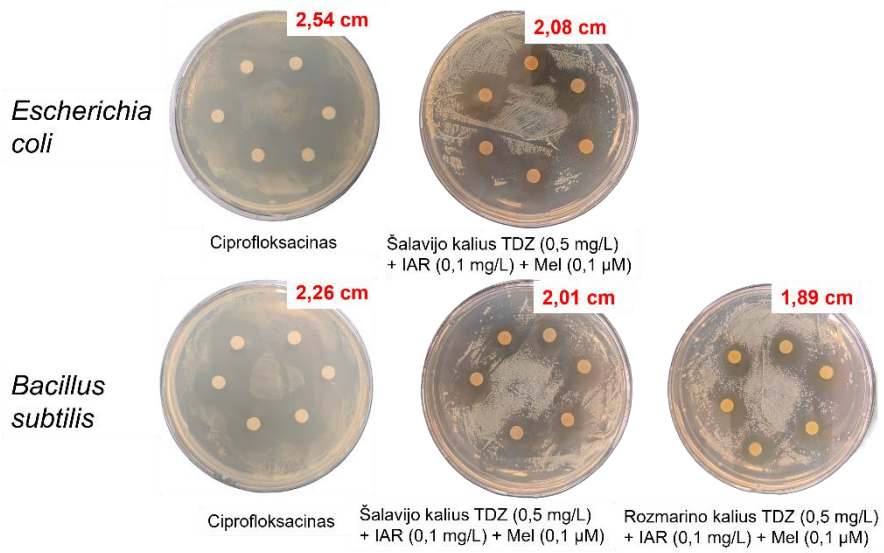
su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) rodo 1,7 cm slopinimo zoną. Šis rezultatas išsiskiria likusių *in vitro* kaliaus kultūrų kontekste, kur reikšmės vyrauja nuo 1,21 iki 1,42 cm.

Nors šiame tyrime *in vivo* šalavijo poveikis prieš *B. subtilis* yra prasčiausias – 1,1 cm – Nasr *et al.* tyrimo [128] prieš *B. subtilis* metu, naudojant *in vivo Salvia aegyptiaca* ir *Salvia lanigera* etanolio ekstraktus, fiksuotos 1,6 ir 2,0 cm skersmens slopinimo zonos. Yeddes *et al.* [122] nurodo 1,48 cm skersmens slopinimo zoną, naudojant *Rosmarinus officinalis* L. etanolio ekstraktą. Tai dalinai atitinka šio tyrimo rezultatus, kur stebima 1,28 cm skersmens slopinimo zona *in vivo* lapų mėginyje bei 1,59 cm *in vivo* liofilizuotoje kultūroje.



3.19 pav. Vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus ir *in vivo* kultūrų ekstraktų bei antibiotiko ciprofloksacino antibakterinės savybės prieš *Bacillus subtilis*

Apibendrinant, didžioji dalis šalavijo ir rozmarino *in vitro* kaliaus kultūrų turi stipresnį antibakterinį poveikį prieš *E. coli* ir *B. subtilis* nei *in vivo* kultūros. Stipriausią antibakterinį aktyvumą prieš abi tikslines bakterijas turėję mėginiai vaizduojami 3.20 paveiksle. Stipriausias antibakterinis aktyvumas prieš *E. coli* ir *B. subtilis* fiksuotas *in vitro* šalavijo kaliaus kultūros, augintos su augimo reguliatoriais TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir Mel (0,1 µM), ekstrakte. Lyginant poveikį prieš skirtingas bakterijas, *in vitro* kultūrų ekstraktais pasiektas stipresnis antibakterinis aktyvumas prieš gram-teigiamą *B. subtilis* nei prieš gram-neigiamą *E. coli* (vertinant pagal kontrolę ciprofloksaciną). Galima kelti hipotezę, jog šiuos poveikio skirtumus lemia gram-teigiamų ir gram-neigiamų bakterijų ląstelių struktūriniai skirtumai. Pavyzdžiui, gram-neigiamos bakterijos turi išorinę ir vidinę ląstelės membranas, o gram-neigiamos bakterijos turi tik vieną ląstelės membraną, todėl tiksliniams bioaktyviesiems junginiams gali būti sunkiau sukelti mirtinas ląstelės pažaidas tokioms bakterijoms kaip *E. coli* [131].

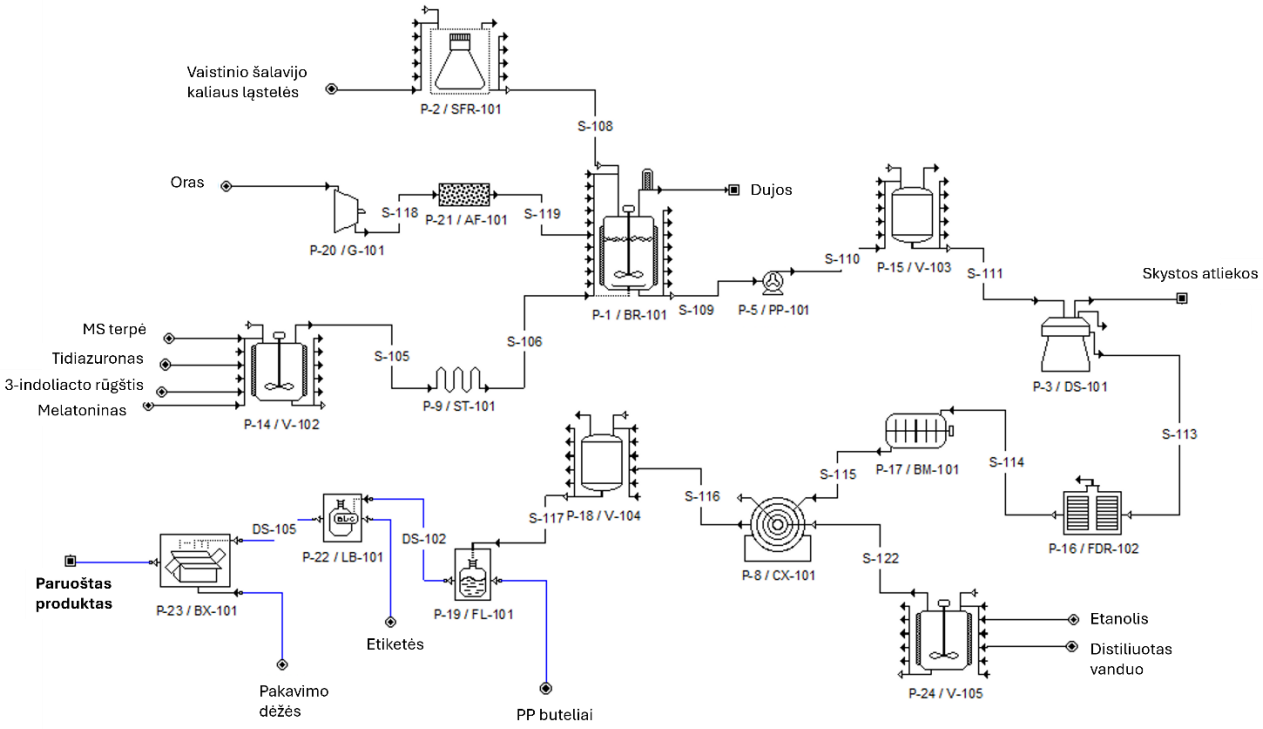


3.20 pav. Stipriausią antibakterinį aktyvumą prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* turintys mėginiai. Mėginio slopinimo zonų skersmens vidurkis pažymėtas raudonai

4. Rekomendacijų dalis

Vaistinis šalavijas sintetina ir kaupia didelį kiekį fenolinių junginių, tokių kaip rozmarino rūgštis, įvairūs flavonoidai ir fenoliniai diterpenai. Fenoliniai junginiai yra bioaktyvieji metabolitai, kurie pasižymi antioksidaciniu aktyvumu ir kitomis vertingomis savybėmis, todėl yra aukštos pridėtinės vertės junginiai [30]. Tam tikros fenolinių junginių grupės, pavyzdžiui fenolinės rūgštys, tokios kaip rozmarino ir karnozolio rūgštis, taip pat pasižymi dideliu biologiniu prieinamumu žinduolių ląstelėse ir yra itin perspektyvūs ingredientai kosmetikos ir farmacijos pramonės šakose [32].

Naudojantis kompiuterine modeliavimo programa „SuperPro Designer“, sukurta aparatūrinė schema, skirta fenoliniais junginiais turtingų vaistinio šalavijo *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktų gamybai (4.1 pav.). Pirmiausia maišymo talpoje (V-102) paruošiama skysta mitybinė terpė. Naudojama MS terpė su augimo reguliatoriais tidiazuronu, 3-indoliacto rūgštimi ir melatoninu. Šis augimo reguliatorių derinys ankstesniuose eksperimentiniuose tyrimuose lėmė dideles fenolinių junginių koncentracijas *in vitro* vaistinio šalavijo kaliaus kultūrų ekstraktuose (3.10 pav.), todėl buvo pasirinktas šio produkto modeliavimui. Sumaišyta terpė sterilizuojama naudojant šiluminę sterilizaciją (ST-101) ir perkeliama į bioreaktorių (BR-101). Kaliaus kultūros auginimui bioreaktoriuje paruošiamas inokuliantas – kaliaus ląstelės nuo kietos MS terpės inokuliuojamos į Erlenmejerio kolbą (SFR-101) ir auginamos skystoje terpėje. Paruoštas inokuliantas patalpinamas į bioreaktorių (BR-101). Į jį taip pat paduodamas oras, prieš tai suslėgtas oro kompresoriumi (G-101) ir sterilizuotas filtravimo būdu (AF-101). Pasibaigus biomasės kultivavimui, bioreaktoriaus turinys peristaltiniu siurbliu (PP-101) perkeliamas į laikymo talpą (V-103), iš jos – į centrifugą (DS-101), kurioje kieta biomasė atskiriama nuo skystos kultivavimo terpės. Biomasė džiovinama liofilizatoriuje (FDR-102). Šis džiovinimo metodas pasirinktas remiantis ankstesniais moksliniais tyrimais, rodančiais mažesnę liofilizavimo žalą bioaktyviesiems junginiams augalų kultūrose, lyginant su džiovinimu aukštesnėse temperatūrose [123]. Siekiant padidinti paviršiaus plotą ekstrakcijai, liofilizuota biomasė smulkinama rutuliniame malūne (BM-101). Tuomet paruošiamas organinis tirpiklis ekstrakcijai vykdyti – 99,8 % etanolis sumaišomas su distiliuotu vandeniu maišymo talpoje (V-105), gaunant 65 % koncentracijos etanolio tirpalą. Tirpiklis ir koncentracija pasirinkta pagal Durling *et al.* [132] tyrimą, kuriame šios koncentracijos etanolio tirpalas lėmė itin efektyvią rozmarino rūgšties bei karnozolio rūgšties ir jos darinių ekstrakciją iš vaistinio šalavijo lapų biomasės. Ekstrakcija vykdoma naudojant centrifuginį ekstraktorių (CX-101), iš kurio gautas ekstraktas nuteka į laikymo talpą (V-104). Iš pastarosios ekstraktas patenka į dozatorių (FL-101), kuris paskirsto produktą į polipropileno (PP) butelius. Tuomet buteliai su produktu ženklinami (LB-101) ir supakuojami į dėžes (BX-101).



4.1 pav. Aparatūrinė schema, skirta fenoliniais junginiais turtingų ekstraktų gamybai iš vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) kaliaus kultūrų

4.1 lentelė. Technologinės schemos dalių sąrašas

Schemos dalis	**Žymėjimas**
Maišymo talpos	V-102; V-105
Šiluminis sterilizatorius	ST-101
Bioreaktorius	BR-101
Erlenmejerio kolba	SFR-101
Oro kompresorius	G-101
Oro filtras	AF-101
Peristaltinis siurblys	PP-101
Laikymo talpos	V-103; V-104
Centrifuga	DS-101
Liofilizatorius	FDR-102
Rutulinis malūnas	BM-101
Centrifuginis ekstraktorius	CX-101
Skysčio dozatorius	FL-101
Etikečių klijavimo įrenginys	LB-101
Pakavimo įrenginys	BX-101

Išvados

1. Įvertinus vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino kultūrų *in vivo* bei kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą FRAP, DPPH, ABTS metodais ir redukcinių savybių įvertinimu, galima teigti, jog stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi abiejų augalų *in vivo* kultūros (šalavijo ir rozmarino *in vivo* lapų bei rozmarino *in vivo* liofilizuotų lapų) bei šalavijo *in vitro* kaliaus kultūra, auginta su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,1 μM). Didžiausias antioksidacinių fermentų SOD aktyvumas nustatytas šalavijo *in vitro* kaliaus kultūrose, formuotose su skirtingomis koncentracijomis BAP ir NAR augimo reguliatorių.

2. Bioaktyviųjų metabolitų – flavonoidų, fenolinių junginių, redukuoto glutationo ir *L*-prolino koncentracijų tyrimas parodė, jog *in vivo* šalavijo kultūra jų sintetina ir kaupia daugiausiai. Taip pat didelėmis koncentracijomis išsiskyrė abiejų augalų *in vitro* kaliaus kultūrų TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) augimo reguliatorių derinys su ir be melatonino (0,1 μM). Įvertinus malondialdehido koncentraciją, nustatyta, jog didžiausias oksidacinio streso pažaidas patyrė abiejų augalų *in vitro* kaliaus kultūros, augintos su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,1 μM).

3. Stipriausias antibakterinis aktyvumas nustatytas vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vitro* kaliaus kultūrose, formuotose terpėse su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,1 μM). Prieš *Escherichia coli* stipriausias antibakterinis aktyvumas stebėtas *in vitro* šalavijo kaliaus kultūros, augintos su šiais augimo reguliatoriais, ekstraktuose, o prieš *Bacillus subtilis* taip pat ir rozmarino kaliaus kultūros *in vitro* ekstrakte.

4. Antioksidacinis aktyvumas, antioksidacinių fermentų aktyvumas ir bioaktyviųjų metabolitų koncentracijos yra didesnės vaistinio šalavijo ir kvapiojo rozmarino *in vivo* ekstraktuose nei *in vitro*, tačiau taip pat stebima tendencingai teigiama augimo reguliatorių TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatonino (0,1 μM) derinio įtaka šių augalų fitocheminiam aktyvumui *in vitro* kaliaus kultūrose. Lyginant su *in vivo* kultūromis, *in vitro* kaliaus kultūros, augintos su šiuo augimo reguliatorių deriniu, turi stipresnes antibakterines savybes.

Literatūros sąrašas

1. UPADHYAY, S., et al. Rosmarinus officinalis L. *Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease* [interaktyvus]. Academic press, 2021 [žiūrėta 2026-03-05]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-819212-2.00022-0.
2. CERAMELLA, J., et al. Salvia officinalis L. leaf extracts: Chemical analysis and biological studies. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. 2025, 352, 120193 [žiūrėta 2026-03-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jep.2025.120193.
3. OZYIGIT, Ilker I., et al. Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2023, 14, 1132555 [žiūrėta 2026-04-09]. Prieiga per doi: 10.3389/fpls.2023.1132555.
4. EFFERTH, T. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering* [interaktyvus]. 2019, 5 (1), 50–59 [žiūrėta 2026-04-07]. Prieiga per doi: 10.1016/j.eng.2018.11.006.
5. ERLAND, Lauren A., A. CHATTOPADHYAY, P. Andrew Maxwell JONES, K. Praween SAXENA. Melatonin in plants and plant culture systems: variability, stability and efficient quantification. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2016, 7, 1712 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.3389/fpls.2016.01721.
6. SHARMA, Y., J. FAGAN, J. SCHAEFER. Ethnobotany, phytochemistry, cultivation and medicinal properties of Garden sage (Salvia officinalis L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* [interaktyvus]. 2019, 8 (3), 3139–3148 [žiūrėta 2026-03-05]. Prieiga per internetą: https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue3/PartAS/8-3-98-315.pdf.
7. ANDRADE, Joana M., et al. Rosmarinus officinalis L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA* [interaktyvus]. 2018, 4 (4), FSO283 [žiūrėta 2026-03-05]. Prieiga per doi: 10.4155/fsoa-2017-0124.
8. ÇELIK, G., et al. Biological activity, and volatile and phenolic compounds from five Lamiaceae species. *Flavour and Fragrance Journal* [interaktyvus]. 2021, 36 (2), 223–232 [žiūrėta 2026-03-04]. Prieiga per doi: 10.1002/ffj.3636.
9. GÜLÇIN, İ. and H. KARAGEÇILI. The Lamiaceae family plants ethnobotanical properties, ethnopharmacological uses, phytochemical studies and their utilization in public or current clinical practices: a review. *Records of Natural Products* [interaktyvus]. 2025, 19, 466–487 [žiūrėta 2026-03-04]. Prieiga per doi: 10.25135/rnp.529.2505.3521.
10. *Plant 267. Salvia officinalis L. (Lamiaceae). Common sage.* Svetainė. Prieiga per internetą: https://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/Profiles/st/Salvia. [žiūrėta 2026-03-05].
11. MAKSIMOVIĆ, M. Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric Salvia species: S. brachyodon Vandas and S. officinalis L. *Biochemical Systematics and Ecology* [interaktyvus]. 2007, 35 (8), 473–478 [žiūrėta 2026-03-05]. Prieiga per doi: 10.1016/j.bse.2007.02.005.
12. GONZÁLEZ-MINERO, Francisco J., L. BRAVO-DÍAZ, A. AYALA-GÓMEZ. Rosmarinus officinalis L. (Rosemary): an ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics. *Cosmetics* [interaktyvus]. 2020, 7 (4), 77 [žiūrėta 2026-03-05]. Prieiga per doi: 10.3390/cosmetics7040077.
13. *Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae). Rosemary.* Svetainė. Prieiga per internetą: https://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/profiles/QR/Rosmarinus. [žiūrėta 2026-03-05].

14. ZAOUALI, Y., H. CHOGRANI, R. TRIMECH, M. BOUSSAID. Genetic diversity and population structure among Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae) varieties: var. typicus Batt. and var. troglodytorum Maire. based on multiple traits. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2012, 38, 166–176 [žiūrėta 2026-03-05]. Prieiga per doi: 10.1016/j.indcrop.2012.01.011.
15. BANSAL, M., et al. Introduction on bioactive compounds, sources and their potential applications. *Bioactive Components* [interaktyvus]. Springer Nature Singapore, 2023 [žiūrėta 2026-03-06]. Prieiga per doi: 10.1007/978-981-19-2366-1_1.
16. BAPTISTA, A., et al. Unlocking the hidden potential of Rosemary (Salvia rosmarinus Spenn.): new insights into phenolics, terpenes, and antioxidants of Mediterranean cultivars. *Plants* [interaktyvus]. 2024, 13 (23), 3395 [žiūrėta 2026-03-06]. Prieiga per doi: 10.3390/plants13233395.
17. SEGNEANU, Elena A., et al. Bioactive molecules profile from natural compounds. *Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal* [interaktyvus]. InTech, 2017 [žiūrėta 2026-03-06]. Prieiga per doi: 10.5772/intechopen.68643.
18. KHARE, S., et al. Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. *Journal of Plant Biology* [interaktyvus]. 2020, 63 (3), 203–216 [žiūrėta 2026-03-06]. Prieiga per doi: 10.1007/s12374-020-09245-7.
19. TWAIJ, Munim B. and M. Nazmul HASAN. Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. *International Journal of Plant Biology* [interaktyvus]. 2022, 13 (1), 4–14 [žiūrėta 2026-03-06]. Prieiga per doi: 10.3390/ijpb13010003.
20. SUMAN, S., et al. Biotic stresses on plants: reactive oxygen species generation and antioxidant mechanism. *Frontiers in Plant-Soil Interaction* [interaktyvus]. Elsevier, 2021 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-323-90943-3.00014-6.
21. SACHDEV, S., et al. Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2021, 10 (2), 277 [žiūrėta 2026-04-06]. Prieiga per doi: 10.3390/antiox10020277.
22. CANNEA, Barbara F. and A. PADIGLIA. Antioxidant defense systems in plants: mechanisms, regulation, and biotechnological strategies for enhanced oxidative stress tolerance. *Life* [interaktyvus]. 2025, 15 (8), 1293 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.3390/life15081293.
23. LIN, D., et al. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules* [interaktyvus]. 2016, 21 (10), 1374 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules21101374.
24. AHMAD, Z., et al. Antioxidant potential of polyphenolic compounds, sources, extraction, purification and characterization techniques: a focused review. *Food Science & Nutrition* [interaktyvus]. 2025, 13 (12), e71259 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.1002/fsn3.71259.
25. PLATZER, M., et al. Radical scavenging mechanisms of phenolic compounds: a quantitative structure-property relationship (QSPR) study. *Frontiers in Nutrition* [interaktyvus]. 2022, 9, 882458 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.3389/fnut.2022.882458.
26. ZEB, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry* [interaktyvus]. 2020, 44 (9), e13394 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.1111/jfbc.13394.

27. MALEK, A. and A. ODEH. Comparative study of essential oil, phenolic content and antioxidant activity of the Rosmarinus officinalis var. prostrates and Rosmarinus officinalis plant extracts. *Research Journal of Pharmacy and Technology* [interaktyvus]. 2025, 18 (4) 1781–1788 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.52711/0974-360X.2025.00255.
28. KHEIRIA, H., et al. Total phenolic content and polyphenolic profile of Tunisian Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) residues. *Natural Drugs from Plants* [interaktyvus]. IntechOpen, 2022, [žiūrėta 2026-03-08]. Prieiga per doi: 10.5772/intechopen.97762.
29. EL GABBAS, Z, et al. Salvia officinalis, rosmarinic and caffeic acids attenuate neuropathic pain and improve function recovery after sciatic nerve chronic constriction in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2019, 2019, 1–17 [žiūrėta 2026-03-08]. Prieiga per doi: 10.1155/2019/1702378.
30. FARHAT, Ben M., et al. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of Salvia species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2013, 49, 904–914 [žiūrėta 2026-03-08]. Prieiga per doi: 10.1016/j.indcrop.2013.06.047.
31. MOCAN, A., et al. Chemical constituents and biologic activities of Sage species: a comparison between Salvia officinalis L., S. glutinosa L. and S. transsylvanica (Schur ex Griseb. & Schenk) Schur. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2020, 9 (6), 480 [žiūrėta 2026-03-08]. Prieiga per doi: 10.3390/antiox9060480.
32. KUMAR, N. and N. GOEL. Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* [interaktyvus]. 2019, 24, e00370 [žiūrėta 2026-03-08]. Prieiga per doi: 10.1016/j.btre.2019.e00370.
33. MOSHARI-NASIRKANDI, A., et al. Chemometrics-based analysis of the phytochemical profile and antioxidant activity of Salvia species from Iran. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2024, 14 (1), 17317 [žiūrėta 2026-03-08]. Prieiga per doi: 10.1038/s41598-024-68421-8.
34. DIAS, Celeste M., PINTO Diana C. G. A., SILVA Artur M. S. Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity. *Molecules* [interaktyvus]. 2021, 26 (17), 5377 [žiūrėta 2026-03-12]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules26175377.
35. FU, X., et al. Natural deep eutectic solvent enhanced pulse-ultrasonication assisted extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. *LWT* [interaktyvus]. 2021, 144, 111220 [žiūrėta 2026-03-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.lwt.2021.111220.
36. ZAGOSKINA, N., et al. Polyphenols in plants: structure, biosynthesis, abiotic stress Regulation, and practical applications (review). *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2023, 24 (18), 13874 [žiūrėta 2026-03-05]. Prieiga per doi:
37. STACHELSKA, Alicja M., P. KARPIŃSKI, B. KRUSZEWSKI. A comprehensive review of biological properties of flavonoids and their role in the prevention of metabolic, cancer and neurodegenerative diseases. *Applied Sciences* [interaktyvus]. 2025, 15 (19), 10840 [žiūrėta 2026-03-12]. Prieiga per doi: 10.3390/app151910840.
38. RIBEIRO-SANTOS, R., et al. A novel insight on an ancient aromatic plant: the rosemary (Rosmarinus officinalis L.). *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2015, 45 (2), 355–368 [žiūrėta 2026-03-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.015.

39. ZHENG, M., et al. The applications and mechanisms of superoxide dismutase in medicine, food, and cosmetics. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2023, 12 (9), 1675 [žiūrėta 2026-03-14]. Prieiga per doi: 10.3390/antiox12091675.
40. BIENERT, Gerd P., et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry* [interaktyvus]. 2007, 282 (2), 1183–1192 [žiūrėta 2026-03-14]. Prieiga per doi: 10.1074/jbc.M603761200.
41. ALSCHER, Grene R., N. ERTURK, S. Lenwood HEATH. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* [interaktyvus]. 2002, 53 (372), 1331–1341 [žiūrėta 2026-03-14]. Prieiga per doi: https://doi.org/10.1093/jxb/53.372.1331.
42. JEDIDI, S., et al. Antioxidant properties of Salvia officinalis decoction extract and mechanism of its protective effects on ethanol-induced liver and kidney injuries. *Journal of Medicinal Food* [interaktyvus]. 2022, 25 (5), 546–556 [žiūrėta 2026-04-06]. Prieiga per doi: 10.1089/jmf.2021.0134.
43. VERSLUES, Paul E., and S. SHARMA. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book* [interaktyvus]. 2010, 8, e0140 [žiūrėta 2026-03-14]. Prieiga per doi: 10.1199/tab.0140.
44. BAROT, M., S. RAHMAN, A. MODI, A. HUSEN. Understanding the roles of proline for plants tolerance and acclimatization under changing environmental situations. *Roles of Osmolytes in Changing Environment* [interaktyvus]. Elsevier, 2025 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-443-26549-5.00015-1.
45. LIANG, X., L. ZHANG, S. Kumar NATARAJAN, F. Donald BECKER. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling* [interaktyvus]. 2013, 19 (9), 998–1011 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.1089/ars.2012.5074
46. TORUN, H. Cobalt+salt-stressed Salvia officinalis: ROS scavenging capacity and antioxidant potency. *International Journal of Secondary Metabolite* [interaktyvus]. 2019, 6 (1), 49–61 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.21448/ijsm.484954.
47. DEVEIKYTĖ, J., A. BLINSTRUBIENĖ, N. BURBULIS. Amino acids as biostimulants: effects on growth, chlorophyll content, and antioxidant activity in Ocimum basilicum L. *Agriculture* [interaktyvus]. 2025, 15 (14), 1496 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/agriculture15141496.
48. DECSI, K., et al. Emerging trends in non-protein amino acids as potential priming agents: implications for stress management strategies and unveiling their regulatory functions. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2024, 25 (11), 6203 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms25116203.
49. RAI, Kumar G., et al. Antioxidant potential of glutathione and crosstalk with phytohormones in enhancing abiotic stress tolerance in crop plants. *Plants* [interaktyvus]. 2023, 12 (5), 1133 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/plants12051133.
50. HASANUZZAMAN, M., et al. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2019, 8 (9), 384 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/antiox8090384.
51. VAŠKOVÁ, J., L. KOČAN, L. VAŠKO, P. PERJESI. Glutathione-related enzymes and proteins: a review. *Molecules* [interaktyvus]. 2023, 28 (3), 1447 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules28031447.

52. BROAD, Ronan C., P. Julien BONNEAU, P. Roger HELLENS, A. T. Alexander JOHNSON. Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2020, 21 (5), 1790 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms21051790.
53. JOZEFCZAK, M., T. REMANS, J. VANGRONSVELD, A. CUYPERS. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2012, 13 (3), 3145–3175 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms13033145.
54. AL-TEMIMI, Anfal A., et al. Glutathione for food and health applications with emphasis on extraction, identification, and quantification methods: a review. *Metabolites* [interaktyvus]. 2023, 13 (4), 465 [žiūrėta 2026-04-02]. Prieiga per doi: 10.3390/metabo13040465.
55. KRITZINGER, Engela C., F. Florian BAUER, J. Wessel DU TOIT. Role of glutathione in winemaking: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2013, 61 (2), 269–277 [žiūrėta 2026-04-06]. Prieiga per doi: 10.1021/jf303665z.
56. RAŠKOVIĆ, A., et al. Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2014, 14 (1), 225 [žiūrėta 2026-04-06]. Prieiga per doi: 10.1186/1472-6882-14-225.
57. IKEUCHI, M., K. SUGIMOTO, A. IWASE. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* [interaktyvus]. 2013, 25 (9), 3159–3173 [žiūrėta 2026-04-07]. Prieiga per doi: 10.1105/tpc.113.116053.
58. LONG, Y., Y. YANG, G. PAN, Y. SHEN. New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2022, 13, 926752 [žiūrėta 2026-04-10]. Prieiga per doi: 10.3389/fpls.2022.926752.
59. PASTERNAK, Taras P. and D. STEINMACHER. Plant growth regulation in cell and tissue culture in vitro. *Plants* [interaktyvus]. 2024, 13 (2), 327 [žiūrėta 2026-04-10]. Prieiga per doi: 10.3390/plants13020327.
60. FAN, X., et al. Cross-talks between macro- and micronutrient uptake and signaling in plants. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2021, 12, 663477 [žiūrėta 2026-04-10]. Prieiga per doi: 10.3389/fpls.2021.663477.
61. GLINUSHKIN, A., et al. Preliminary study: micropropagation using five types of chelated iron and the subsequent acclimation of blue honeysuckle (Lonicera caerulea var. kamtschatica Sevast.). *Forests* [interaktyvus]. 2023, 14 (4), 821 [žiūrėta 2026-04-10]. Prieiga per doi: 10.3390/f14040821.
62. BHATIA, S. Plant tissue culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. Elsevier, 2015. [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9.
63. ABDELHAMID, Sayeda A., I. Alaa MARZOUK, S. Mohsen ASKER, M. Hattem EL SHABRAWI. RED light promotes flavonoid and phenolic accumulation in Cichorium spp. callus culture as anti-candida agent. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2025, 15 (1), 2194 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.1038/s41598-024-85099-0.
64. BHATT, D., et al. Role of growth regulators and phytohormones in overcoming environmental stress. *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress* [interaktyvus]. Wiley, 2020 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.1002/9781119552154.ch11.

65. SKOOG, F. and C. O. MILLER. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* [interaktyvus]. 1957, 11, 118–130 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per PubMed: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13486467/.
66. BATISTA-SILVA, W., et al. Auxin metabolism and the modulation of plant growth. *Environmental and Experimental Botany* [interaktyvus]. 2024, 226, 105917 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.1016/j.envexpbot.2024.105917.
67. COSTA-PÉREZ, A., A. María FERRER, A. Antonio CALDERÓN. Combined effects of cytokinin and UV-C light on phenolic pattern in Ceratonia siliqua shoot cultures. *Agronomy* [interaktyvus]. 2023, 13 (3), 621 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.3390/agronomy13030621.
68. ZHIPONOVA, M., et al. Cytokinins enhance the metabolic activity of in vitro-grown catmint (Nepeta nuda L.). *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. 2024, 214, 108884 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.1016/j.plaphy.2024.108884.
69. VYLÍČILOVÁ, H., et al. Naturally occurring and artificial N9-cytokinin conjugates: from synthesis to biological activity and back. *Biomolecules* [interaktyvus]. 2020, 10 (6), 832 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.3390/biom10060832.
70. NAIR, Nisha R., P. CHERIAN, L.R. JEESHMA, B. FATIMA. Optimization of plant growth hormone concentrations on callus induction and comparative phytochemical profiling in leaves and callus of Rosmarinus officinalis L. *Research Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. 2025, 1 (21), 288 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.25303/211rjbt2880296.
71. BANO, Aneela S., et al. Callus induction, proliferation, enhanced secondary metabolites production and antioxidants activity of Salvia moorcroftiana L. as influenced by combinations of auxin, cytokinin and melatonin. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [interaktyvus]. 2022, 65, e22210200 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.1590/1678-4324-2022210200.
72. ULLAH, Muhammad A., et al. Effect of ultraviolet-C radiation and melatonin stress on biosynthesis of antioxidant and antidiabetic metabolites produced in in vitro callus cultures of Lepidium sativum L. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2019, 20 (7), 1787 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms20071787.
73. LI, C., et al. The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research* [interaktyvus]. 2012, 53 (3), 298–306 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.00999.x.
74. NEAMAH, Shamil I. and A. Nisreen JDAYEA. Positive response of Hyoscyamus pusillus callus cultures to exogenous melatonin on biochemical traits and secondary metabolites under drought conditions. *International Journal of Agronomy* [interaktyvus]. 2022, 2022, 1–10 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.1155/2022/7447024.
75. ESMAEILI, S., et al. Exogenous melatonin induces phenolic compounds production in Linum album cells by altering nitric oxide and salicylic acid. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2023, 13 (1), 4158 [žiūrėta 2026-04-11]. Prieiga per doi: 10.1038/s41598-023-30954-9.
76. DURAN, Ragbet E., S. KILIC, Y. COSKUN. Melatonin influence on in vitro callus induction and phenolic compound production in sweet basil (Ocimum basilicum L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* [interaktyvus]. 2019, 55 (4), 468–475 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1007/s11627-019-10006-6.

77. COSKUN, Y., R. Ezgi DURAN, S. KILIC. Striking effects of melatonin on secondary metabolites produced by callus culture of rosemary (Rosmarinus officinalis L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* [interaktyvus]. 2019, 138 (1), 89–95 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1007/s11240-019-01605-7.
78. KILIC, S., R. Ezgi DURAN, Y. COSKUN, H. KAYA. Stimulating effect of melatonin on the phytochemical content of Salvia officinalis L. callus cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [interaktyvus]. 2023, 66, e23220116 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1590/1678-4324-2023220116.
79. RAMOS DA SILVA, Luiz R., et al. Lamiaceae essential oils, phytochemical profile, antioxidant, and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2021, 2021, 1–18 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1155/2021/6748052.
80. HAZRATI, S., K. LOTFI, M. GOVAHI, M. EBADI. A comparative study: influence of various drying methods on essential oil components and biological properties of Stachys lavandulifolia. *Food Science & Nutrition* [interaktyvus]. 2021, 9 (5), 2612–2619 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1002/fsn3.2218.
81. GHORBANI, A. and M. ESMAEILIZADEH. Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* [interaktyvus]. 2017 7 (4), 433–440 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jtcme.2016.12.014.
82. BADIEE, P., A. Reza NASIRZADEH, M. MOTAFFAF. Comparison of Salvia officinalis L. essential oil and antifungal agents against candida species. *journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research* [interaktyvus]. 2012, 1 (1), 7 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.7243/2050-120X-1-7.
83. ŠOJIĆ, B., et al. The effect of essential oil and extract from sage (Salvia officinalis L.) herbal dust (food industry by-product) on the oxidative and microbiological stability of fresh pork sausages. *LWT* [interaktyvus]. 2018, 89, 749–755 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.lwt.2017.11.055.
84. LOPRESTI, Adrian L. Salvia (Sage): A review of its potential cognitive-enhancing and protective effects. *Drugs in R&D* [interaktyvus]. 2017, 17 (1), 53–64 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1007/s40268-016-0157-5.
85. AKHONDZADEH, S., et al. Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial: Salvia officinalis extract in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* [interaktyvus]. 2003, 28 (1), 53–59 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1046/j.1365-2710.2003.00463.x.
86. BEN AKACHA, B., et al. Sage (Salvia officinalis L.): a botanical marvel with versatile pharmacological properties and sustainable applications in functional foods. *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. 2024, 169, 361–382 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.sajb.2024.04.044.
87. SÁ, Carla M., et al. Sage tea drinking improves lipid profile and antioxidant defences in humans. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2009, 10 (9), 3937–3950 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms10093937.
88. SAHLABGI, A., et al. The development and comparative evaluation of rosemary dydroalcoholic macerate-based dermatocosmetic preparations: a study on antioxidant,

antimicrobial, and anti-inflammatory properties. *Gels* [interaktyvus]. 2025, 11 (3), 149 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: https://doi.org/10.3390/gels11030149.

89. EL BOUKHARI, R. and A. FATIMI. Extract of rosemary as food additive: the landmark patents. *Biology and Life Sciences Forum* [interaktyvus]. 2023, 26 (1), 37. [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.3390/Foods2023-15062.
90. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Use of rosemary extracts as a food additive - scientific opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. *EFSA Journal* [interaktyvus]. 2008, 6 (7), 1–29 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.2903/j.efsa.2008.721.
91. VEENSTRA, Jacob P. and J. Jeremy JOHNSON. Rosemary (Salvia rosmarinus): health-promoting benefits and food preservative properties. *International Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2021, 6 (4), 1–10 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per PubMed: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8513767/.
92. MARTIN, Ana P., et al. Priming crop plants with rosemary (Salvia rosmarinus Spenn, syn Rosmarinus officinalis L.) extract triggers protective defense response against pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. 2023, 197, 107644 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.plaphy.2023.107644.
93. JAHANIAN, H., et al. Rosmarinus officinalis as a natural insecticide: a review. *International Journal of Pest Management* [interaktyvus]. 2024, 70 (4), 818–863 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.1080/09670874.2022.2046889.
94. KONG, F., et al. Preliminary investigation of the effects of rosemary extract supplementation on milk production and rumen fermentation in high-producing dairy cows. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2022, 11 (9), 1715 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.3390/antiox11091715.
95. KONG, F., et al. In vitro fermentation and degradation characteristics of rosemary extract in total mixed ration of lactating dairy cows. *Fermentation* [interaktyvus]. 2022, 8 (9), 461 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.3390/fermentation8090461.
96. BEKHEET, Shawky A. In vitro conservation of date palm tissue cultures. *Date Palm Biotechnology Protocols Volume II* [interaktyvus]. Springer New York, 2017 [žiūrėta 2026-04-30]. Prieiga per doi: 10.1007/978-1-4939-7159-6_2.
97. GÜLÇIN, İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* [interaktyvus]. 2006, 217 (2–3), 213–220 [žiūrėta 2026-02-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.tox.2005.09.011.
98. MINICKAITĖ, R., et al. Synthesis of novel aminothiazole derivatives as promising antiviral, antioxidant and antibacterial candidates. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2022, 23 (14), 7688 [žiūrėta 2026-02-17]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms23147688.
99. BENZIE, Iris F.F. and J.J. STRAIN. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* [interaktyvus]. 1999, 299, 15–27 [žiūrėta 2026-02-17]. Prieiga per doi: 10.1016/S0076-6879(99)99005-5.
100. JONUŠKIENĖ, I., R. STANKEVIČIENĖ, K. KANTMINIENĖ, I. TUMOSIENĖ. The influence of phytohormones on antioxidative and antibacterial activities in callus cultures of

Hypericum perforatum L. *Agriculture* [interaktyvus]. 2023, 13 (8), 1543 [žiūrėta 2026-02-17]. Prieiga per doi: 10.3390/agriculture13081543.

101. PRIOR, Ronald L., X. WU, K. SCHAICH. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, 53 (10), 4290–4302 [žiūrėta 2026-03-03]. Prieiga per doi: 10.1021/jf0502698.
102. GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* [interaktyvus]. 2020, 94 (3), 651–715 [žiūrėta 2026-03-03]. Prieiga per doi: 10.1007/s00204-020-02689-3.
103. NUTAUTAITĖ, M., et al. Evaluation of phenolic compounds and pigments in freshwater Cladophora glomerata biomass from various Lithuanian rivers as a potential future raw material for biotechnology. *Water* [interaktyvus]. 2022, 14 (7), 1138 [žiūrėta 2026-02-18]. Prieiga per doi: 10.3390/w14071138.
104. MILLER, Nicholas J., et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* [interaktyvus]. 1993, 84 (4), 407–412 [žiūrėta 2026-03-01]. Prieiga per doi: 10.1042/cs0840407.
105. BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* [interaktyvus]. 1976, 72 (1–2), 248–254 [žiūrėta 2026-03-01]. Prieiga per doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
106. KOLOSEJ, R., et al. The influence of β-alanine derivative products on spring oilseed rape yield and oil quality. *Zemdirbyste-Agriculture* [interaktyvus]. 2017, 104 (2), 139–146 [žiūrėta 2026-03-02]. Prieiga per doi: 10.13080/z-a.2017.104.018.
107. SHRAIM, Amjad M., A. Talaat AHMED, M. Mizanur RAHMAN, M. Yousef HIJJI. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: a critical evaluation. *LWT* [interaktyvus]. 2021, 150, 111932 [žiūrėta 2026-05-02]. Prieiga per doi: 10.1016/j.lwt.2021.111932.
108. BATES, L. S., R. P. WALDREN, I. D. TEARE. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* [interaktyvus]. 1973, 39 (1), 205–207 [žiūrėta 2026-03-01]. Prieiga per doi: 10.1007/BF00018060.
109. ELLMAN, George L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [interaktyvus]. 1959, 82 (1), 70–77 [žiūrėta 2026-03-01]. Prieiga per doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
110. DARCZUK, D., et al. Salivary oxidative status in patients with oral lichen planus. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* [interaktyvus]. 2016, 67 (6), 885–894 [žiūrėta 2026-03-02]. Prieiga per PubMed: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28195069/.
111. SAVICKA, M. and N. ŠKUTE. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (Triticum aestivum L.). *Ekologija* [interaktyvus]. 2010, 56 (1), 26–33 [žiūrėta 2026-03-02]. Prieiga per doi: 10.2478/v10055-010-0004-x.
112. NAKRA, S., S. TRIPATHY, P. Prakash SRIVASTAV. Drying as a preservation strategy for medicinal plants: physicochemical and functional outcomes for food and human health.

Phytomedicine Plus [interaktyvus]. 2025, 5 (2), 100762 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.phyplu.2025.100762.

113. BIANCHIN, M., et al. Antioxidant properties of lyophilized tosemary and sage extracts and its effect to prevent lipid oxidation in poultry pâtê. *Molecules* [interaktyvus]. 2020, 25 (21), 5160 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules25215160.
114. BENZIE, Iris F.F. and M. DEVAKI. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* [interaktyvus]. John Wiley & Sons Ltd, 2017, [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.1002/9781119135388.ch5.
115. NAZIR, M., et al. Interactive effect of melatonin and UV-C on phenylpropanoid metabolite production and antioxidant potential in callus cultures of purple basil (Ocimum basilicum L. var purpurascens). *Molecules* [interaktyvus]. 2020, 25 (5), 1072 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules25051072.
116. MUNTEANU, Irina G. and C. APETREI. Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2021, 22 (7), 3380 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms22073380.
117. GUPTA, Ashok K., et al. Anti-ageing activity and antioxidant activity of methanol extracts of leaves and flowers of Salvia officinalis and Rosmarinus officinalis. *Journal of Young Pharmacists* [interaktyvus]. 2023, 15 (3), 448–455 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.5530/jyp.2023.15.60.
118. GÖKDUMAN, N. and Ş. KALAY. Comparative evaluation of antioxidant capacities of aage (Salvia spp.) extracts using different solvents. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology* [interaktyvus]. 2025, 10 (4), 72–79 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.58854/jicm.1784684.
119. LUCA, Simon V., et al. Chemical profile and bioactivity evaluation of Salvia species from Eastern Europe. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2023, 12 (8), 1514 [žiūrėta 2026-05-02]. Prieiga per doi: 10.3390/antiox12081514.
120. GRZEGORCZYK, I., A. MATKOWSKI, H. WYSOKIŃSKA. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of Salvia officinalis L. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2007, 104 (2), 536–541 [žiūrėta 2026-05-02]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2006.12.003.
121. AL JAAFREH, Ahmad M. Evaluation of antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil and different types of solvent extractions. *Biomedical and Pharmacology Journal* [interaktyvus]. 2024, 17 (1), 323–339 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.13005/bpj/2860.
122. YEDDES, W., et al. Optimizing ethanol extraction of rosemary leaves and their biological evaluations. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology* [interaktyvus]. 2022, 7 (2), 85–94 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.14218/JERP.2022.00002.
123. KWAŚNIEWSKA-KAROLAK, I. and R. MOSTOWSKI. Effect of different drying processes on an antioxidant potential of three species of the Lamiaceae family. *Herba Polonica* [interaktyvus]. 2021, 67 (1), 8–17 [žiūrėta 2026-04-12]. Prieiga per doi: 10.2478/hepo-2021-0004.
124. MOHAMMADI-CHERAGHABADI, M., et al. Improving water deficit tolerance of Salvia officinalis L. using putrescine. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2021, 11 (1), 21997 [žiūrėta 2026-05-02]. Prieiga per doi: 10.1038/s41598-021-00656-1.

125. BIELACH, A., M. HRTYAN, V. TOGNETTI. Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2017, 18 (7), 1427 [žiūrėta 2026-05-02]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms18071427.
126. HERNÁNDEZ ESTÉVEZ, I. and M. RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ. Plant glutathione S-transferases: an overview. *Plant Gene* [interaktyvus]. 2020, 23, 100233 [žiūrėta 2026-05-02]. Prieiga per doi: 10.1016/j.plgene.2020.100233.
127. TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* [interaktyvus]. 2017, 524, 13–30 [žiūrėta 2026-05-02]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021.
128. NASR, A., I. YOSUF, Z. TURKI, A. ABOZEID. LC-MS metabolomics profiling of Salvia aegyptiaca L. and S. lanigera Poir. with the antimicrobial properties of their extracts. *BMC Plant Biology* [interaktyvus]. 2023, 23 (1), 340 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.1186/s12870-023-04341-5.
129. NIETO, G., G. ROS, J. CASTILLO. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (Rosmarinus officinalis, L.): a review. *Medicines* [interaktyvus]. 2018, 5 (3), 98 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.3390/medicines5030098.
130. BERNARDES, Wagner A., et al. Antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chemistry & Biodiversity* [interaktyvus]. 2010, 7 (7), 1835–1840 [žiūrėta 2026-05-01]. Prieiga per doi: 10.1002/cbdv.200900301.
131. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2004, 94 (3), 223–253 [žiūrėta 2026-05-02]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
132. DURLING, N., et al. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (Salvia officinalis) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2007, 101 (4), 1417–1424 [žiūrėta 2026-05-20]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2006.03.050.