



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) kaliaus  
kultūrų *in vitro* ir augalų *in vivo* bioaktyvumo tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Arūnas Grigėnas**

Projekto autorius

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) kaliaus  
kultūrų *in vitro* ir augalų *in vivo* bioaktyvumo tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Arūnas Grigėnas**

Projekto autorius

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

**Lekt. dr. Kazimieras Anusevičius**

Recenzentas

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Arūnas Grigėnas

## **Rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalų *in vivo* bioaktyvumo tyrimai**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Arūno Grigėno, baigiamasis projektas tema „Rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalų *in vivo* bioaktyvumo tyrimai“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

Arūnas Grigėnas

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Grigėnas, Arūnas. Rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalų *in vivo* bioaktyvumo tyrimai. 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: *rausvasis katarantas, kaliaus kultūros, in vitro, antriniai metabolitai, alkaloidai, antioksidantinis.*

Kaunas, 2020. 52 p.

## Santrauka

Rausvasis katarantas (lot. *Catharanthus roseus* L.) yra stepukinių šeimos augalas, pasižymintis antioksidantinėmis, priešvėžinėmis, antibakterinėmis, antivirusinėmis, antimutageninėmis ir priešuždegiminėmis savybėmis bei savo sudėtyje turintis vertingus alkaloidus – vinkristiną ir vinblastiną. Šio tyrimo metu buvo užaugintas rausvasis katarantas *in vivo* ir jo kaliaus kultūros *in vitro* ant *Murashige&Skoog*, *Linsmaier&Skoog* ir *Gamborg* maitinamųjų terpių. Intensyviausiai rausvojo kataranto kaliaus kultūras *in vitro* suformavo augalo lapai. Didžiausias rausvojo kataranto kaliaus kultūros vidutinis prieaugis buvo nustatytas *Murashige&Skoog* terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l). Buvo atlikta kiekybinė analizė bei įvertintas augalo bioaktyvumas. Spektrofotometriškai nustatyta, kad didžiausiu antioksidantinių fermentų (didžiausia vertė prolino dehidrogenazės – 11,34 (μmol NAD/mg baltymo x min) ir superoksido dismutazės – 1,305 vnt/mg) aktyvumu pasižymėjo augalo kaliaus kultūros, augusios *Murashige&Skoog* terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l). Didžiausią baltymų koncentraciją (11,81 mg/100 g) sukaupė rausvojo kataranto kaliaus kultūros, augusios *Gamborg* terpėje su 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l). Didžiausia *L*-prolino koncentracija (1567,32 μmol/g) buvo nustatyta rausvame katarante *in vivo*. Daugiausiai chlorofilo *a* (213,71 mg/100 g) ir *b* (127,09 mg/100 g) bei karotinoidų (70,49 mg/100 g) sukaupė rausvojo kataranto kaliaus kultūros, augusios *Murashige&Skoog* terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l). Didžiausią fenolinių junginių koncentraciją (16,947 mg/100 g) sukaupė rausvasis katarantas *in vivo*, o didžiausią fenolinių junginių koncentraciją (11,653 mg/100 g) susintetino rausvojo kataranto kaliaus kultūros, augusios *Murashige&Skoog* terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l). Aktyviausiomis antioksidantinėmis savybėmis pasižymėjo tiriamojo augalo *in vivo* žiedai. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu taip pat pasižymėjo kaliaus kultūros, augusios *Murashige&Skoog* terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l). Tyrimo metu nustatyta, kad lapų kaliaus kultūroms *in vitro* geriausia auginti yra *Murashige&Skoog* terpė, stiebų – *Linsmaier&Skoog* terpė, o šaknų kaliui – *Gamborg* terpė.

Grigėnas, Arūnas. Bioactivity Studies of *Catharanthus roseus* Callus Cultures *in Vitro* and Plants *in Vivo*. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: *Catharanthus roseus*, callus cultures, *in vitro*, secondary metabolites, alkaloids, antioxidant.

Kaunas, 2020. 52 pages.

### Summary

*Catharanthus roseus* L. is a plant of the family *Apocynaceae* with antioxidant, anticancer, antibacterial, antiviral, antimutagenic and anti-inflammatory properties and contains valuable alkaloids – vincristine and vinblastine. In this study, *Catharanthus roseus* was grown *in vivo* and its callus cultures *in vitro* on Murashige & Skoog, Linsmaier & Skoog and Gamborg media. *Catharanthus roseus* callus cultures were most intensively formed *in vitro* by plant leaves. The highest mean growth of *Catharanthus roseus* callus culture was found in Murashige & Skoog medium with 1-naphthylacetic acid (1 mg/l) and kinetin (0.1 mg/l). Quantitative analysis was performed and plant bioactivity was assessed. The highest activity of antioxidant enzymes (maximum value of proline dehydrogenase – 11.34 ( $\mu\text{mol NAD/mg protein} \times \text{min}$ ) and superoxide dismutase – 1.305 units/mg) was observed spectrophotometrically. The highest protein concentration (11.81 mg/100 g) was accumulated in *Catharanthus roseus* callus cultures grown in Gamborg medium with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (1 mg/l) and kinetin (0.1 mg/l). The highest concentration of *L*-proline (1567.32  $\mu\text{mol/g}$ ) was found in *Catharanthus roseus in vivo*. Chlorophyll a (213.71 mg/100 g) and b (127.09 mg/100 g) and carotenoids (70.49 mg/100 g) were accumulated the most in cultures of *Catharanthus roseus* callus grown in Murashige & Skoog medium with 1-naphthylacetic acid (1 mg/l) and kinetin (0.1 mg/l). The highest concentration of phenolic compounds (16.947 mg/100 g) was accumulated by *Catharanthus roseus in vivo*, and the highest concentration of phenolic compounds (11.653 mg/100 g) was synthesized in cultures of *Catharanthus roseus* callus grown in Murashige & Skoog medium with 1-naphthylacetic acid (1 mg/l) and kinetin (0.1 mg/l). The most active antioxidant properties were observed in the *in vivo* flowers. Callus cultures grown in Murashige & Skoog medium with 1-naphthylacetic acid (1 mg/l) and kinetin (0.1 mg/l) also showed the highest antioxidant activity. This study showed that Murashige & Skoog's medium was the best medium for *in vitro* cultivation of leaf callus, Linsmaier & Skoog medium for stems and Gamborg medium for root callus.

## Turinys

<b>Lentelių sąrašas .....</b>	<b>7</b>
<b>Paveikslų sąrašas .....</b>	<b>8</b>
<b>Santrumpų ir terminų sąrašas .....</b>	<b>9</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Literatūros apžvalga .....</b>	<b>11</b>
1.1. Rausvojo kataranto (lot. <i>Catharanthus roseus</i> L.) apibūdinimas.....	11
1.2. Augalų antriniai metabolitai .....	12
1.2.1. Fenoliniai junginiai .....	13
1.2.2. Flavonoidai .....	13
1.2.3. Eteriniai aliejai .....	14
1.2.4. Alkaloidai.....	14
1.2.5. Laisvieji radikalai .....	18
1.3. Rausvojo kataranto kaliaus kultūros <i>in vitro</i> .....	19
1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....	20
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....</b>	<b>21</b>
2.1. Naudotos medžiagos ir darbo priemonės.....	21
2.2. Tyrimo metodai .....	21
2.2.1. Sėklų sterilinimas.....	21
2.2.2. Augimo reguliatorių paruošimas .....	22
2.2.3. Maitinamųjų terpių paruošimas .....	22
2.2.4. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas <i>C. roseus</i> žaliavoje.....	22
2.2.5. <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas <i>C. roseus</i> žaliavoje .....	24
2.2.6. Prolino dehidrogenazės aktyvumo įvertinimas <i>C. roseus</i> žaliavoje .....	25
2.2.7. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> , karotinoidų įvertinimas <i>C. roseus</i> žaliavoje .....	26
2.2.8. Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas <i>Folin-Ciocalteu</i> metodu <i>C. roseus</i> žaliavoje .....	26
2.2.9. Antioksidantinių savybių <i>C. roseus</i> žaliavoje nustatymo metodai: .....	28
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas .....</b>	<b>31</b>
3.1. Rausvojo kataranto kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> suformavimas .....	31
3.2. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas <i>C. roseus</i> žaliavoje .....	33
3.3. <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas <i>C. roseus</i> žaliavoje .....	34
3.4. Prolino dehidrogenazės aktyvumo įvertinimas <i>C. roseus</i> žaliavoje.....	35
3.5. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> , karotinoidų įvertinimas <i>C. roseus</i> žaliavoje.....	35
3.6. Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas <i>Folin-Ciocalteu</i> metodu <i>C. roseus</i> žaliavoje .....	37
3.7. Redukcinių (antioksidantinių) savybių įvertinimas <i>C. roseus</i> žaliavoje .....	38
3.8. Antioksidantinių savybių <i>C. roseus</i> žaliavoje įvertinimas. DPPH metodas.....	39
3.9. Antioksidantinių savybių <i>C. roseus</i> žaliavoje įvertinimas. ABTS metodas.....	40
3.10. Antioksidantinių savybių <i>C. roseus</i> žaliavoje įvertinimas. FRAP metodas .....	41
<b>4. Rekomendacijų dalis .....</b>	<b>43</b>
<b>Išvados .....</b>	<b>44</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>45</b>
<b>Priedai .....</b>	<b>51</b>

## Lentelių sąrašas

<b>1.1 lentelė.</b> Rausvosios žiemos sudėtyje esantys alkaloidai .....	17
<b>2.1 lentelė.</b> Naudotų reagentų ir medžiagų sąrašas .....	21
<b>2.2 lentelė.</b> Naudotų priemonių ir įrangos sąrašas .....	21
<b>3.1 lentelė.</b> Užauginti tiriamieji bandiniai – rausvojo kataranto kaliaus kultūros <i>in vitro</i> .....	31
<b>1 lentelė.</b> Maitinamosios <i>Murashige &amp; Skoog</i> (MS) terpės sudėtis .....	51
<b>2 lentelė.</b> Maitinamosios <i>Linsmaier &amp; Skoog</i> (LS) terpės sudėtis .....	52
<b>3 lentelė.</b> Maitinamosios <i>Gamborg</i> (B <sub>5</sub> ) terpės sudėtis.....	52

## Paveikslų sąrašas

<b>1.1 pav.</b> Rausvasis katarantas (lot. <i>Catharanthus roseus</i> L.) [75] .....	11
<b>1.2 pav.</b> <i>C. roseus</i> sėklos, vaizdas priartintas su optiniu mikroskopu [74] .....	12
<b>1.3 pav.</b> Pirminės alkaloidų struktūros [24] .....	15
<b>2.1 pav.</b> Albumino kalibracinė kreivė .....	23
<b>2.2 pav.</b> <i>L</i> -prolino kalibracinė kreivė .....	24
<b>2.3 pav.</b> Albumino kalibracinė kreivė .....	25
<b>2.4 pav.</b> Tanino rūgšties kalibracinė kreivė.....	28
<b>2.5 pav.</b> FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O kalibracinė kreivė.....	30
<b>3.1 pav.</b> <i>C. roseus</i> šaknų kaliaus kultūros <i>in vitro</i> , auginant ant B <sub>5</sub> terpės .....	32
<b>3.2 pav.</b> <i>C. roseus</i> lapų kaliaus kultūros <i>in vitro</i> , auginant ant MS terpės.....	32
<b>3.3 pav.</b> <i>C. roseus</i> stiebų kaliaus kultūros <i>in vitro</i> , auginant ant LS terpės .....	32
<b>3.4 pav.</b> Baltymų koncentracija <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 %.....	33
<b>3.5 pav.</b> Fermento superoksido dismutazės aktyvumas <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 %.....	34
<b>3.6 pav.</b> <i>L</i> -prolino koncentracija <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 %.....	34
<b>3.7 pav.</b> Fermento prolino dehidrogenazės aktyvumas <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 %.....	35
<b>3.8 pav.</b> Chlorofilo <i>a</i> koncentracija <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 % .....	36
<b>3.9 pav.</b> Chlorofilo <i>b</i> koncentracija <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 % .....	36
<b>3.10 pav.</b> Karotinoidų koncentracija <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 % .....	37
<b>3.11 pav.</b> Bendra fenolinių junginių koncentracija <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 % .....	38
<b>3.12 pav.</b> Reducinių savybių įvertinimas <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 % .....	39
<b>3.13 pav.</b> Antioksidantinis ekstraktų aktyvumas DPPH metodu <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 %.....	40
<b>3.14 pav.</b> Antioksidantinis ekstraktų aktyvumas ABTS metodu <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 %.....	41
<b>3.15 pav.</b> Antioksidantinis ekstraktų aktyvumas FRAP metodu <i>C. roseus</i> kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> ir augalo <i>in vivo</i> ekstraktuose, SSN ≤ 5 %.....	42
<b>4.1 pav.</b> Vinkristino ir vinblastino išskyrimo aparatūrinė schema iš rausvojo kataranto kaliaus kultūrų .....	43



## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

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

B<sub>5</sub> – *Gamborg* terpė;

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

FRAP – geležies jonų redukcijos antioksidantinė galia;

Kinetinas – 6-furfurilaminopurinas;

LS – *Linsmaier* ir *Skoog* terpė;

NAD – Nikotinamido adenino dinukleotidas;

NAR – 1-naftilacto rūgštis;

MS – *Murashige* ir *Skoog* terpė;

TAE – tanino rūgšties ekvivalentas;

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas.

### Terminai:

**Diferenciacija** – tai procesas, per kurį ląstelės arba ląstelių klonai įgyja morfologinių ir fiziologinių skirtumų. Dėl diferenciacijos susidaro galutinės ląstelės, iš kurių formuojasi įvairūs organai arba audiniai.

***In vitro*** – procesas (bandymas ar tyrimas), atliekamas arba stebimas dirbtinėje sistemoje (pvz., mėgintuvėlyje).

***In vivo*** – procesas (bandymas ar tyrimas), atliekamas arba stebimas gyvame organizme.

## Įvadas

Įvairių rūšių ir stadijų vėžys yra nuo neatmenamų laikų viena sudėtingiausių ir didžiausių riziką žmogaus sveikatai keliančių ligų. Tai piktybinis auglys, kuriam būdingas nekontroliuojamas ir greitas ląstelių dauginimasis, vadinamas ląstelių nemirtingumu. Kuomet besidaugindamos ląstelės užima sveikųjų ląstelių vietą ir jas naikina. Nekontroliuojamos vėžio ląstelės yra pajėgios plisti tiek krauju, tiek ir limfa po visą žmogaus organizmą. Išoriniai veiksniai tokie, kaip tabako dūmai, dulkės, alkoholis, raudonos mėsos vartojimas, virusai, nutukimas, jonizuojančioji spinduliuotė, ultravioletiniai spinduliai ir įvairūs hormonai bei paveldimumas yra pagrindinė ląstelių mutacijos (t. y., genetinės medžiagos pakitimo) priežastis, nes sutrikus ląstelių dauginimo reguliavimui išsivysto piktybinės ląstelės. Vėžį sunku gydyti dėl jo nenuspėjamumo (t. y., kiekvieno tipo vėžiui yra būdingas savitas augimo ir plitimo greitis). Tačiau šiai dienai yra sukurta ir pritaikyta nemažai metodų: chirurginis gydymas (pašalinant navikinius audinius operacijos metu); radioterapija (apšvitinant vėžines ląsteles jonizuojančiais spinduliais); hipertermija (vėžines ląsteles veikiant aukšta temperatūra) bei gydymas priešvėžiniais vaistais (pvz., chemoterapija ar hormonų terapija). Iš šių išvardytų metodų plačiausiai medicinoje yra taikoma chemoterapija, kai yra naudojami citostatikai vėžinėms ląstelėms naikinti, tačiau jie taip pat pažeidžia ir sveikas ląsteles. Dažniausi citostatikai naudojami medicinoje – vinkristinas ir vinblastinas – yra gaunami sintetiniu būdu, sintetinant tarpusavyje vindoliną su katarantinu. Tačiau mokslininkai, atlikdami tyrimus, aptiko gamtoje biosintetinamus junginius rausvojo kataranto sudėtyje. Buvo bandyta pramonėje išekstrahuoti šiuos junginius, tačiau buvo pastebėta, jog vinkristino ir vinblastino gryninimas iš augalo *in vivo* reikalauja didelių kaštų, nes išgrynintos medžiagos išeiga buvo labai maža. Todėl buvo pradėti tyrimai šių sudėtinių komponentų sintetinimui paskatinti ir išeigai padidinti. Pradėtas taikyti kaliaus kultūrų auginimas *in vitro*, ieškant optimalios terpės ir fitohormonų koncentracijos, kurios leistų padidinti vinkristino ir vinblastino pagaminimo išeigą. Šiuo baigiamojo magistro projektu siekiama įvertinti, kaip kaliaus kultūrų *in vitro* auginimui naudojamos maitinamosios terpės ir augimo reguliatoriai, paveikia augalo biosintetinamų junginių kiekybę bei kokybę.

**Tyrimo tikslas** – nustatyti tinkamiausią maitinamąją terpę rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) kaliaus kultūrų auginimui *in vitro*, įvertinti sudėtyje esančius antrinius metabolitus, antioksidantines savybes, bei palyginti su augalo *in vivo* savybėmis.

### Tyrimo uždaviniai:

1. suformuoti rausvojo kataranto kaliaus kultūras *in vitro*;
2. įvertinti rausvojo kataranto *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose esančių fermentų (pvz., superoksido dismutazės ir prolino dehidrogenazės) aktyvumą;
3. nustatyti rausvojo kataranto *in vivo* ir *in vitro* ekstraktuose ištirpusių bioaktyviųjų junginių (pvz., baltymų, L-prolino, chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų bei polifenolinių junginių) koncentracijas;
4. įvertinti rausvojo kataranto kaliaus kultūrų antioksidantinį aktyvumą remiantis redukciniu, ABTS, FRAP ir DPPH metodais bei palyginti jį su rausvojo kataranto *in vivo* antioksidantiniu aktyvumu;
5. pateikti alkaloidų (vinblastino ir vinkristino) išskyrimo aparatūrinę schemą.

## 1. Literatūros apžvalga

Šiame skyriuje bus aptariamas tiriamasis objektas rausvasis katarantas (lot. *Catharanthus roseus* L.), jo kaupiamos aktyviosios medžiagos (pvz., fenoliniai junginiai, flavonoidai, eteriniai aliejai, alkaloidai ir antioksidantai) bei jų funkcinės savybės tiek pačiam augalui, tiek ir žmogaus organizmui, kaliaus kultūrų auginimas *in vitro*, joms auginti reikalingos priemonės ir sąlygos.

### 1.1. Rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) apibūdinimas

Rausvasis katarantas (žr. 1.1 pav.), dar vadinamas rožine žieme (lot. *Catharanthus roseus* L.) – tai stepukinių (*Apocynaceae*) šeimos daugiametis puskrūmis (kuomet apatinė stiebo dalis yra sumedėjusi, o viršutinė – žolė), kilęs iš Madagaskaro ir labai populiarus dekoratyvinis augalas pasaulyje.



1.1 pav. Rausvasis katarantas (lot. *Catharanthus roseus* L.) [75]

Vertikaliai į viršų augantis augalas būna 30–100 cm aukščio. Stiebai yra apvalūs ir pailgi (cilindriniai), išilgai išlenkti arba siaurai sparnuoti, žali arba tamsiai raudoni, jauni stiebai būna plaukuoti. Jų yra blizgūs pailgi tamsiai žali lapai, 2,5–9,0 cm ilgio ir 1,0–3,5 pločio, elipsės formos su mažu koteliu, dažniausiai paviršius nėra padengtas plaukeliais [74]. Lapai auga poromis vienas priešais kitą. Žiedynai yra ovalo formos, plokšti penkialapiai vainiklapiai [75]. Dekoratyvinių augalų pasaulyje galima rasti įvairių spalvų vainiklapių derinius: oranžinės, rausvos, raudonos, violetinės arba baltos spalvos. Neseniai rinkoje atsirado juodos spalvos „Jams 'N Jellies Blackberry“ augalo veislė, kurios spalvą nulemia susintetinta nauja antocianinų rūšis (peonidin-3-robinobiozidas) ir aukšta jų koncentracija žiedlapiuose, taip pat padidėjęs vandenilio potencialas (pH = 6,1) ir antocianinų vakuolinių tarpų susidarymas [1]. Augalas dažniausiai žydi nuo gegužės iki spalio mėnesio, o šiltesnėse klimato zonose žydi ištiesus metus [76]. Dažniausiai vabzdžiai (drugiai, plaštakės) apdulkina augalo žiedus, tačiau retu atveju įvyksta ir savaiminis apsidulkinimas. Pirmieji žiedai pasirodo per 6–8 savaites po daigumo [76]. Vaisiai yra 2,0–4,7 cm ilgio folikulai (t. y., sausi vaisiai, turintys tik vieną atveriamąjį angą), turintys daug mažų juodų sėklų (žr. 1.2 pav.) [74]. Sėklos gali būti ramybės stadijoje kelias savaites po brandos. Sėklos yra gyvybingos 3–5 metus. Jų optimali daigumo temperatūra yra 20–25 °C temperatūros, o daigumas paprastai yra didesnis nei 95 %.



**1.2 pav.** *C. roseus* sėklos, vaizdas priartintas su optiniu mikroskopu [74]

Dažniausiai *C. roseus* galima rasti uolėtose atogrąžų vietose, kelio takuose sausoje savanoje, atvirose erdvėse ir dekoratyviniuose namų darželiuose [74]. *C. roseus* labai toleruoja druskingą ir sausringą dirvožemį, mėgsta tiesioginę saulės šviesą, tačiau nepakelia aukštos temperatūros [76].

**Panaudojimas.** Visos *C. roseus* morfologinės dalys yra labai nuodingos žmogaus organizmui. Tačiau, atliktais klinikiniais tyrimais buvo įrodyta, jog augalo dalyse esantys alkaloidai turi gydomųjų savybių, todėl pradėta šaknis ir augalo žolę naudoti vaistų gamyboje. *C. roseus* yra šimtmečius naudojamas tradicinėje kinų ir filipinų liaudies medicinoje antidepresantu, priemone cukrinio diabeto kontrolei ar net sudirgintų akių plovimui [74,77]. Atliktais moksliniais tyrimais, taip pat, buvo įrodytas augalo tinkamumas cukrinio diabeto prevencijai, tačiau naminiai šio augalo preparatai nėra tinkami gydymui [77]. Rausvosios žiemos sudėtyje esantys alkaloidai – vinkristinas ir vinblastinas – yra vienas iš pagrindinių vėžiui gydyti skirtų preparatų sudedamųjų dalių [74]. Kadangi augalas yra labai nuodingas, visi šio augalo preparatai turi būti naudojami tik griežtai prižiūrint gydytojams, nes gali pasireikšti šalutinis poveikis – apsigimimo defektų sukėlimas, cukraus kiekio kraujyje sumažėjimas, pykinimas ir vėmimas, klausos praradimas, neuropatija, galvos svaigimas, traukuliai, kepenų pokyčiai, hipoglikemija ir net mirtis. *C. roseus* preparatai sąveikauja su ličio ir cukraus kiekį reguliuojančiais preparatais, todėl nėra vartotini kartu [79]. Džiovinta šaknis yra pramoninis ajmalicino šaltinis, kuris padidina kraujo tekėjimą smegenyse ir periferinėse kūno dalyse. Ajmalicino ir serpentinio preparatai naudojami kaip antihipertenziniai ir raminamieji junginiai [2], taip pat psichologinėms ir elgesio problemoms, susijusioms su senumo, jutimo sutrikimų (galvos svaigimas, spengimas ausyse), galvos traumų ir jų neurologinėms komplikacijoms gydyti [76].

## **1.2. Augalų antriniai metabolitai**

Vaistiniai augalai – biologiškai veikliąsias medžiagas kaupiantys ir gydomosiomis savybėmis pasižymintys augalai, dar kitaip vadinami aromatiniais, nes jie sintetina lakiuosius junginius metabolizmo metu. Iš jų gaunami eteriniai aliejai naudojami kosmetikos, parfumerijos ir farmacijos pramonėje [3]. Augalų metabolitai (veikliosios medžiagos) – tai metabolizmo metu augalų ląstelėse, audiniuose ir organuose susintetinami organiniai junginiai. Pirminiai metabolitai – riebalai, baltymai, aminorūgštys, chlorofilas, nukleorūgštys ir sacharidai – augalų ląstelėms yra gyvybiškai svarbūs

junginiai. Antriniai metabolitai – tai tarpiniai ir galutiniai metabolizmo metu susidarę produktai [4]. Svarbiausi vaistiniame augale esantys antriniai metabolitai – polifenoliniai junginiai, flavonoidai, alkaloidai, pigmentai (chlorofilas, karotinoidai), pektinai, vitaminai, mineralinės medžiagos, organinės rūgštys, steroidai, glikozidai, terpenai, saponinai bei eteriniai aliejai, kurie kaupiasi visose augalo morfologinėse dalyse. Jų kiekis priklauso nuo įvairių aplinkos faktorių (augalo rūšies, augimvietės, surinkimo laiko, džiovavimo bei laikymo sąlygų) [3]. Šie antriniai metabolitai pasižymi gebėjimu surišti laisvuosius radikalus, t. y., pasižymi antioksidantiniu aktyvumu. Augalų biotechnologijoje siekiama kuo pigiau iš augalo išskirti didžiausią galimą kiekį veikliųjų medžiagų *in vitro* būdu, nepaveikiant jų sudėties [4]. Augalai yra vertingas antrinių metabolitų, iš kurių yra gaminami farmaciniai produktai, agrochemikalai, skonio stiprikliai, kvapiosios medžiagos, dažikliai, biopesticidai ir maisto priedai, šaltinis [5]. Augalai gamina antrinius metabolitus tam, kad apsisaugotų nuo žolėdžių, kenkėjų ir patogenų [6].

### 1.2.1. Fenoliniai junginiai

Fenoliniai junginiai yra atsakingi už augalo apsauginę funkciją – saugo augalą nuo žaizdų, infekcijų, UV spindulių ir kitų aplinkos stresinių faktorių. Visų fenolinių junginių bendras bruožas – fenolinė grupė: aromatinis žiedas su prisijungusiu bent vienu hidroksilo radikalu. Į fenolinių junginių grupę įeina tokie junginiai kaip fenoliai, fenolinės rūgštys, kumarinai, flavonoidai ar hidrolizuoti ir kondensuoti taninai bei ligninai [7]. Fenolinės rūgštys – tai aromatiniai augalo antriniai metabolitai, kurių struktūroje egzistuoja vienas karboksirūgšties radikalas [6]. Polifenoliai, kuriems priklauso flavonoidai, turi mažiausiai du fenolio radikalus; junginiai, turintys tris ar daugiau fenolio radikalus, vadinami taninais. Netirpūs fenoliai yra pasiskirstę ląstelių sienelėse, o tirpūs yra suskaidyti augalo ląstelių vakuolėse. Fenolinių rūgščių vaidmuo augaluose: maistinių medžiagų įsisavinimas, baltymų sintezė, fermentinis aktyvumas, fotosintezė, statybinės augalo medžiagos ir alelopatija. Žmogaus organizmui fenoliniai junginiai yra naudingi dėl keletos biologinių ir farmakologinių savybių: priešuždegiminių, antioksiduojančių, antimutageninių ir antikancerogeninių [8].

Pagrindiniai fenoliniai junginiai randami rausvojo kataranto ekstraktų sudėtyje: 2,3-dihidroksibenzoinė rūgštis, salicilo rūgštis, benzoinė rūgštis, gliukovanilinas, vanililo alkoholis, cinamono rūgštis, galo rūgštis, vanilino rūgštis, hidroksitiroolis, ferulo rūgštis, chlorogeno rūgštis, kempferolis, kvercetas, malvidinas, petunidinas, hirsutidinas [9,10].

### 1.2.2. Flavonoidai

Flavonoidai – tai didžiausia fenolinių (biologiškai aktyvių) junginių grupė, sintetinama iš aromatinių aminorūgščių – fenilalanino, malonato ir tirozino. Flavonoidų grupę sudaro: flavanonai, flavanonoliai, flavonoliai, izoflavonai, flavan-3-oliai, flavonai, antocianinai ir antocianidinai [11]. Flavonoidai suteikia vaisiams ir daržovėms natūralias spalvas (geltoną, oranžinę ir kt.), o vaistiniam augalui – skonį ir aromatą. Taip augalas gali veiksmingai pritraukti vabzdžius. Be šių svarbių funkcijų, flavonoidai augalui suteikia gynybinę funkciją nuo parazitų; veikia kaip fotosintezės šviesos fazės katalizatoriai ar kaip jonų kanalų reguliatoriai, veikiantys fosforilinimą; saugo nuo reaktyvių deguonies formų, kurios susidaro fotosintezės elektronų pernašos metu; saugo augalą nuo kenksmingų ultravioletinių spindulių ir atpalaiduoja UV spinduliuojančias reaktyviosios deguonies formas [8]. Žmogaus organizmui flavonoidai yra naudingi lėtinių uždegimų, diabeto, oksidacinio streso, neurodegeneracinių ir kraujagyslių ligų prevencijai ir gydymui [12,13]. Naringeninas ir hesperidinas, yra efektyvūs antioksidantai užkertant kelią neurodegeneracinėms ligoms [14].

### 1.2.3. Eteriniai aliejai

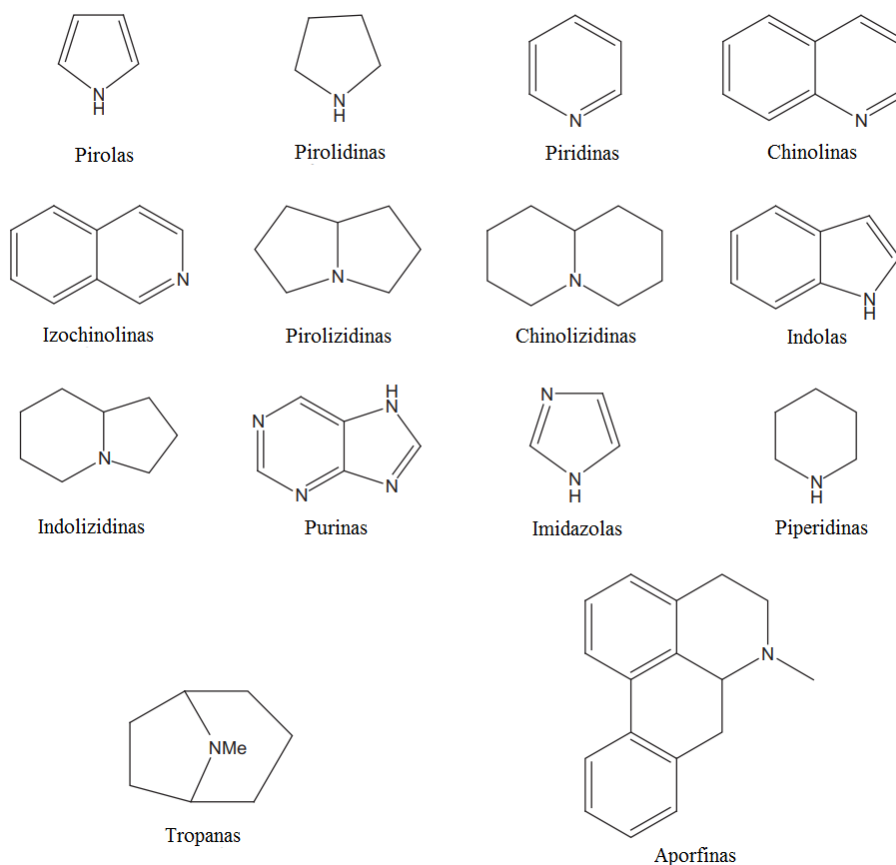
Eteriniai aliejai – natūralūs, skystos agregatinės būsenos, lakieji, kompleksiniai junginiai, kurių bendras tankis yra mažesnis nei vandens, skleidžiantys stiprų ir unikalų kvapą bei tirpstantys organiniuose tirpikliuose [15]. Jie yra sintetinami augaluose kaip antriniai metabolitai, į kurių sudėtį įeina alifatiniai ir cikliniai junginiai, terpenai (pvz., limonenas, terpinenas, kamfenas) ir terpenų dariniai (pvz., alkoholiai, aldehydai, eteriai, ketonai, rūgštys ir esteriai), benzeno dariniai (pvz., benzil benzoatas, benzil acetatas) [16]. Gamtoje eteriniai aliejai atlieka gynybinę augalų funkciją, saugo nuo grybelių, bakterijų, virusų, parazitų ir žolėdžių, o esant poreikiui, jie gali pritraukti kai kuriuos vabzdžius, kad būtų lengviau išnešiojamos žiedadulkės ir sėklos [17]. Tokie lakieji junginiai kaip limonenas, linalolis, eugenolis ir  $\alpha$ -pinenas pasižymi stipriu antimikrobiniu aktyvumu, o anetolis, mentolis ir timolis – slopina mielių bei patogeninių bakterijų augimą maisto produktuose [18]. Eteriniai aliejai yra vienodai svarbūs ir medicinoje, nes pasižymi žaizdų granuliaciją stimuliuojančiu, hipereminiu, spazmolitiniu (plečia kraujagysles), priešūždegiminiu, antiseptiniu (naikina bakterijas ir grybelius) poveikiu, tai pat padidina sekreto išsiskyrimą viršutiniuose kvėpavimo takuose, skatina šlapimo išsiskyrimą [19].

Rausvojo kataranto eteriniuose aliejuose rasta virš 50 skirtingų lakiųjų junginių, iš jų didžiausios koncentracijos buvo nustatytos:  $\alpha$ -linoleno rūgšties etilo esteris, stearino rūgštis, fitolis, palmitino rūgštis, limonenas, 1-dodekanolis, geraniolis, ir citralis [20].

### 1.2.4. Alkaloidai

Alkaloidai – junginiai, turintys azoto grupę, kuriuos gamina augalai tam, kad apsisaugotų nuo gyvūnų ar vabzdžių. Alkaloidai – labiausiai potencialiai aktyvios cheminės rausvosios žiemos sudedamosios dalys. Iki šiol rausvajame katarante yra rasta daugiau nei 400 alkaloidų [21]. Atlikus *C. roseus* tyrimus buvo nustatyta, kad augalas pagamina daugiau kaip 100 monoterpenoidinių indolo alkaloidų (žr. 1.1 lentelę), kurių sudėtyje rasti 2 pagrindiniai vėžio chemoterapijoje naudojami citotoksiniai dimeriniai alkaloidai – vinkristinas ir vinblastinas [22]. Vinblastinas ir vinkristinas – pagrindinės *C. roseus* bioaktyviosios medžiagos Hodžkino limfomai ir leukemijai gydyti. Mokslininkai nustatė, kad šie junginiai yra biosintezuojami jungiant augalų alkaloidus katarantiną ir vindoliną [77]. Taip pat nustatyta, kad *C. roseus* yra geras antioksidantų šaltinis [22].

Alkaloidai – tai augalo antriniai metabolitai, organiniai junginiai, savo struktūroje turintys azoto grupę (žr. 1.3 pav.), kuri suteikia alkaloidams šarminių savybių [23].



**1.3 pav.** Pirminės alkaloidų struktūros [24]

Dažniausiai alkaloidai iš augalų yra išskiriami amorfinių, kristalinių, nelakujų ir bekvapių junginių pavidalu, o alkaloidai, savo struktūroje neturintys deguonies atomo – skystoje formoje. Dauguma alkaloidų yra kartaus skonio ir bespalviai, išskyrus berberiną, betainą, kanadiną, kolchiciną ir sangvinariną [24]. Alkaloidų kartumas padeda augalui apsisaugoti nuo žolėdžių, vabzdžių, parazitų ar kitų stresinių faktorių [25]. Žmogaus organizme alkaloidai pasižymi antibakteriniu, antimitotiniu, priešuždegiminiu, psichotropiniu ir priešnavikiniu aktyvumu bei naudojami kaip analgetikai ir vietiniai anestetikai [25]. Alkaloidus žmogus pasisavina su maistu (pvz., bulvėse – solaninas, pomidoruose – tomatinas) arba gėrimais (pvz., kakavos sėklose – teobrominas ir kofeinas, kavos sėklose ir gaiviuosiuose gėrimuose – kofeinas, arbatos lapuose – teofilinas ir kofeinas) [25].

Chininas maisto pramonėje yra naudojamas kaip karčioji medžiaga toniko gėrimuose. Tačiau alkaloidai gali būti naudojami ir kaip nuodai, pvz., strichninas, meskalinas, tubokurarinas, ar narkotinės medžiagos, pvz., heroinas, LSD, kokainas [25].

Grynos alkaloidų formos gerai tirpsta nepoliniuose organiniuose tirpikliuose (pvz., chloroforme, eteryje, metileno chloride), tačiau nėra tirpios vandenyje, išskyrus kofeiną ir efedriną [26]. Todėl alkaloidai augalų audiniuose egzistuoja vandenyje tirpių druskų (cukrų, esterių, taninų ar organinių rūgščių) pavidalu, o ne kaip laisvieji elementai [27]. Šiomis alkaloidų tirpumo savybėmis yra remiamasi farmacijos pramonėje atliekant alkaloidų gryninimą (ekstrahavimą) iš augalų audinių [24].

Alkaloidai klasifikuojami į alkaloidus (gaunami iš  $\alpha$ -aminorūgščių pirmtakų) ir pseudoalkoidus (terpenai ir steroidai), dėl vėlai vykstančio aminizacijos proceso, atidavus azoto atomą iš aminorūgšties šaltinio [23]. Alkaloidai gaunami iš aminorūgščių, turinčių L-konfigūraciją (baltymų



aminorūgštys), ir iš neproteininių aminorūgščių (pvz., ornitino). Alkaloidai metaboliniais keliais (pvz., acetato, šikimato ir mevalonato) gali būti sintetinami tiesiogiai iš aminorūgščių pirmtakų (pvz., šikimo rūgšties, acetilkoenzimo A ir mevalono rūgšties) [28]. Acetilkoenzimo A metaboliniu keliu (acetato kelias) yra susintetinami piperidino alkaloidai, šikimato – chinolinas, o mevalonato – steroidiniai ir terpenoidiniai junginiai [28]. Alkaloidai gali būti tiek heterocikliniai (t. y., savo heterociklinėje struktūroje turintys azoto atomą), tiek ir neheterocikliniai. Pagrindinės heterociklinių alkaloidų grupės: L-triptofanas, L-lizinas, L-histidinas, L-fenilalaninas, L-ornitinas ir glicino/asparto rūgštis [7]. Šios grupės net ir mažomis dozėmis turi didelį biologinį aktyvumą. Neheterocikliniams alkaloidams priklauso junginiai, kurie savo struktūroje neturi heterociklinio azoto fragmento (pvz., kapsicinas, meskalinas ir efedrinas) [29].

Indolo branduolį turintys alkaloidai, gaunami iš aminorūgšties L-triptofano, tačiau sintezės metu gali įvykti transformacija į chinolino branduolį, nuo to priklausys koks alkaloidas bus susintetintas. Vinblastinas, harminas, katarantinas, rezerpinas, ajmalicinas, vindolinas, vinkristinas, strichininas, chininas, ergotaminas ir daugelis kitų alkaloidų turi indolo branduolį. Indolo alkaloidai yra skirstomi į paprastuosius indolo alkaloidus (pvz., psilocinas, serotoninas, triptaminas), skalsių alkaloidus (pvz., ergotaminas), chinolino alkaloidus (pvz., chininas),  $\beta$ -karbolino alkaloidus (pvz., harminas), pirolindolo alkaloidus (pvz., eserinas) ir terpenoidinius indolus (pvz., katarantinas, ajmalicinas) [28].

Vertingiausi *C. roseus* fitocheminėje sudėtyje esantys alkaloidai – vinkristinas ir vinblastinas – yra L-triptofano dariniai, dar vadinami indolo alkaloidais (t. y., savo sudėtyje turintys indolo skeletinę formulę) [22,30]. Mokslininkai nustatė, kad šie junginiai yra biosintezuojami jungiant augalų alkaloidus katarantiną ir vindoliną [77][31]. Pakeitimas iš vindolino į vinblastiną yra pagrįstas NADH fermento aktyvumu [28]. Tai struktūriškai labai panašūs alkaloidai, tik skiriasi tuo, kad vinkristinas turi prie azoto radikalo prijungtą aldehido grupę, o vinblastinas toje pačioje vietoje turi metilo grupę [28]. Sudarius palankias sąlygas, vinblastiną galima oksiduoti į vinkristiną. Farmacijoje šie *C. rosues* sudėtyje esantys citostatikai yra gryninami iš augalo lapų ir naudojami chemoterapijoje. Vinblastinas pasižymi įvairiomis farmakologinėmis savybėmis: ląstelės ciklo inhibitorius mitozės stadijoje (slopina mikrotubulių formavimąsi M fazėje) [32]; antineoplastinės (priešvėžinės) savybės (pvz., plaučių, sėklidžių, šlapimo pūslės bei smegenų vėžį, Hodžkino limfomą ir melanoma) [26,33]. Efektyvesnis vinblastino veikimas fiksuojamas vaistą vartojant kartu su bleomicinu.

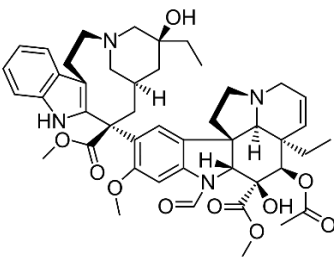
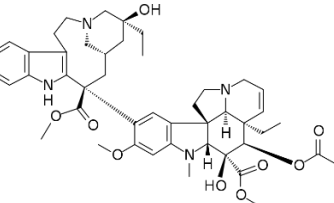
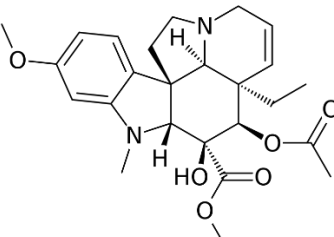
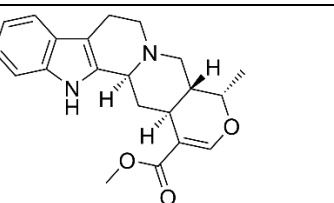
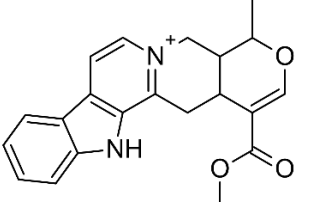
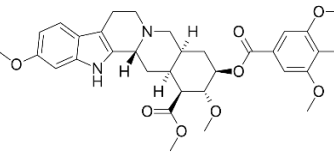
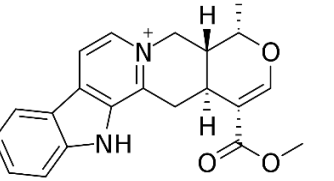
Vinkristinas yra mitozės inhibitorius metafazėje (jungiasi prie tubulino ir slopina dimerų polimerizaciją, sudarydamas mikrotubules) [34]. Todėl jis priskiriamas prie ląstelės fazei specifinių vaistų, kuomet paveikia ląsteles, esančias tik tam tikrose ląstelės ciklo fazėse, bet neveikia ląstelių, esančių ramybės fazėje. Dar vinkristinas turi citostatinių savybių (slopina vėžinių ląstelių dauginimąsi), todėl yra naudojamas gydant limfomą, leukemiją, neuroblastomą, nefroblastomą, Hodžkino ligą ir naikinant minkštųjų audinių navikus (dažnai vartojamas kartu su deksametazonu) [79] [24]. Prekyboje parduodami pavadinimais „Velban<sup>®</sup>“ (vinblastinas) ir „Oncovin<sup>®</sup>“ (vinkristinas) [35].

Tačiau šie alkaloidai turi nemažai šalutinių poveikių: vinblastinas sukelia sunkias alergines reakcijas, skrandžio, kaulų, galvos skausmus, galias opas, sunkų kraujavimą, kaulų čiulpų toksiškumą, hematuriją (t. y., kuomet šlapimo sudėtyje randama kraujo), infekcijas, staigų dusulį, vidurių užkietėjimą [26], vėmimą, apetito praradimą [78], o vinkristinas – periferinę neuropatiją (dizesteziją, sutrikusią neuromuskulinę transmisiją), hiponatremiją, plaukų slinkimą, vidurių užkietėjimą [79] [2,5]. Vinkristinas, lyginant su vinblastinu, yra neurotoksiškesnis [36].



Be šių vertingiausių alkaloidų, vinkristino ir vinblastino, *C. roseus* yra nustatyta daugiau nei 130 skirtingų biologiškai aktyvių indolo (*Vinca*) alkaloidų [37]. Pagrindiniai alkaloidai – alstoninas, ajmalicinas ir rezerpinas, katarantinas, serpentinas, vindolinas ir kt. (žr. lentelė 1.1) [38,39].

**1.1 lentelė.** Rausvosios žiėmės sudėtyje esantys alkaloidai

Alkaloidas	Struktūrinė formulė	Savybės	Šaltiniai
Vinkristinas		Priešvėžinės	[40]
Vinblastinas		Priešvėžinės	[40]
Vindolinas		Hipoglikeminis poveikis	[40]
Ajmalicinas		Antihipertenzinis, raminamasis poveikis	[38,40]
Alstoninas		Neuroleptikas	[38]
Rezerpinas		Hipertenzinis poveikis	[39]
Serpentinas		Antihipertenzinis, raminamasis poveikis	[40]

Kiekviena alkaloidų grupė turi savo ekstrahavimo ir nustatymo metodus. Natūraliai ekstrahuojant *C. roseus* galima išgauti mažesnę nei 0,0003 % vinkristino išeigą [41]. Todėl pramonėje sintetinio vinkristino gamybai pasitelkiami alternatyvūs metodai. Dažniau yra jungiami katarantinas ir vindolinas siekiant susintetinti *Vinca* grupės alkaloidus [42].

Pagrindinės reakcijos alkaloidams nustatyti augalinėje žaliavoje, kurių metu iškrenta nuosėdos yra: atliekant su Dragendorff'o (oranžinės nuosėdos gaunamos sumaišius su kalio bismuto jodidu), Mayer'io (baltos nuosėdos gaunamos sumaišius su kalio tetrajodomerkurato (II) tirpalu), Hager'io (geltonos nuosėdos gaunamos sumaišius su sočiuoju pikrino rūgšties vandeniniu tirpalu) ir Wagner'io (rausvos nuosėdos gaunamos sumaišius jodu ar kalio jodidu) reagentais [24]. Taip pat yra taikoma kalorimetrija, fluorescencija, fotometrija, elektrofotometrija, spektrometrija, plonasluoksnė chromatografija, didelio efektyvumo skysčių chromatografija (HPLC), dujų chromatografija, dujų chromatografija-masių spektrometrija, branduolių magnetinis rezonansas, rentgeno tyrimas [43].

Taip pat farmacijos pramonėje norint sukurti naujus vaistus yra taikomas cheminis alkaloidų modifikavimas – tai junginio struktūros ar konfigūracijos pakeitimas, kuomet yra pakeičiamas ir alkaloido biologinis aktyvumas [44]. Alkaloidų modifikavimas gali būti atliekamas cheminiu (kai pokyčiai apima visų galimų junginio dalių struktūrinius pokyčius), biocheminiu (kuomet yra modifikuojamas fermento aktyvumas) ir biomolekuliniu (kuomet yra manipuluojama biologiniais faktoriais alkaloido viduje) būdu [45].

#### **1.2.5. Laisvieji radikalai**

Laisvieji radikalai – labai reaktyvios ir nestabilios, neporinį elektroną turinčios molekulės, kurios dėl tam tikrų priežasčių gali priimti ar atiduoti vieną elektroną (t. y., oksidatoriai ar reduktoriai) [46]. Jie susiformuoja oksidacijos metu, kuri gali įvykti metabolizmo metu dėl aplinkos teršalų, cigarečių dūmų, ultravioletinių spindulių, radiacijos ar nesveiko maisto. Reakcijos, kuriose dalyvauja laisvieji radikalai, gali branduolyje ir ląstelių membranose pažeisti biologiškai svarbias molekules, pvz., DNR, baltymus, lipidus ar angliavandenius, ir taip gali sukelti žmogaus organizmui pavojingas ligas (pvz., Alzheimerio ligą), sukelti raumenų, audinių uždegimus bei pagreitinti organizmo senėjimą. Svarbiausi ligas sukeliantys aktyviausias deguonies formas turintys radikalai: hidroksilo radikalai, superoksido anijonų radikalai, vandenilio peroksidas, hipochlorito rūgšties radikalai, azoto oksido radikalai ir peroksinitrito radikalai ir kt. [47]. Laisvieji radikalai pažeidžia tas makromolekules, dėl kurių atsiranda ląstelių pažeidimai ir homeostaziniai sutrikimai. Tačiau aprūpindami organizmą pakankamu kiekiu antioksidantų, padedame jam įveikti laisvuosius radikalus.

Antioksidantai – stabilios molekulės, gebančios elektroną paversti laisvuju radikalumu ir jį neutralizuoti, taip jį nukenksmindamos. Mažos molekulinės masės antioksidantai atiduoda elektroną laisvajam radikalui ir nutraukia grandininę reakciją prieš paveikiant gyvybiškai svarbias molekules. Nukenksminus laisvuosius radikalus, antioksidantai pasišalina iš organizmo. Tokius antioksidantus kaip glutationą, ubichinolį ir šlapimo rūgštį organizmas pasigamina metabolizmo metu. Kitą dalį antioksidantų, pvz., vitaminą E ( $\alpha$ -tokoferolis), vitaminą C (askorbo rūgštis) ir  $\beta$ -karoteną, gauname su maistu [48]. Daug antioksidantų turi džiovinti vaisiai, uogos (alyvuogės, slyvos, citrusai, vyšnios, mėlynės), žalioji ir juodoji arbata, šviežios daržovės (morkos, bulvės, brokoliai, pomidorai, ankštiniai augalai, špinatai), granatai, raudonas vynuogės, kakavos pupelės. Epidemiologiniais tyrimais buvo nustatytos antioksidantų antiaterosklerozinės, antibakterinės, antivirusinės, antimutageninės, priešuždegiminės ir priešvėžinės savybės [47].

### 1.3. Rausvojo kataranto kaliaus kultūros *in vitro*

Augalo kalius – tai neorganizuotos augalo parenchiminių (t. y., plonasienių ląstelių, kuriose vyksta pagrindiniai biologiniai procesai) ląstelių masė, kuri uždengia augalo sužeistą vietą (pvz., įpjovą, įtrūkimą, poskiepį). Jie yra unikalūs tuo, kad kalijų galima užauginti iš vienos diferencijuotos augalo ląstelės, o daugelis kaliaus ląstelių yra totipotentinės, t. y., gebančios regeneruoti visus augalo organus [49]. Tam tikromis sąlygomis kaliaus kultūros gali patirti somatinę embriogenezę – procesą, kurio metu iš suaugusių somatinių ląstelių susidaro embrionai. Todėl yra manoma, kad kai kurios kaliaus formavimosi formos apima ląstelių diferenciaciją. 1939 metais atradus tai, jog kaliaus kultūros gali būti auginamos dirbtiniu būdu ant maitinamųjų terpių (*in vitro*) ir parinkus atitinkamas augalų augimo hormonų (auksino ir citokinino) koncentracijas, galima nulemti kaliaus kultūrų diferenciacijos tipą ir augalo susintetinamų junginių kiekį, buvo pradėtas kaliaus kultūrų *in vitro* auginimas tiek laboratoriniams tyrimams, tiek ir pramonėje [50]. Tai tapo plačiai naudojamu alternatyviu būdu įvairioms augalų rūšims auginti bei atsirado galimybė užtikrinti natūralių augalo preparatų pastovumą ir kiekį [51]. Taip pat auginimas *in vitro* sutrumpina augalo augimo laiką, nepriklausomai kuriame pasaulio regione yra auginama, taip pat yra gera prevencija retoms ir nykstančioms augalų rūšims, išvengiama parazitų pavojaus bei yra galimybė iš augalų išgauti sudėtingų struktūrų junginius [52].

Kalių kultūroms *in vitro* auginti yra naudojami donorinių augalų, užaugintų optimaliomis sąlygomis *in vivo*, eksplantai (pvz., lapai, stiebai, šaknys ar kitos augalo morfologinės dalys). Nuo izoliuoto augalo *in vivo* eksplanto dydžio ir amžiaus priklausys kaliaus kultūros *in vitro* produktyvumas – kuo jaunesnis ir didesnis eksplantas, tuo geresnis kaliaus kultūrų *in vitro* augimas. Prieš įdedant augalų eksplantus į Petri lėkštelėje esančią maitinamąją terpę, jų paviršius yra nuplaunamas steriliu vandeniu, apdorojamas fungicidais (t. y., pesticidais augalų ligas sukeliantiems grybams naikinti, pvz., bavistinas ar benomilas), plovikliais (pvz., polisorbato Tween-20) ir sterilinamas etanoliu bei 0,1 % HgCl<sub>2</sub> tirpalu [53,54]. Geras augalo sterilinimas, apsaugo augančias kaliaus kultūras *in vitro* nuo pelėsio ir kitų patogeninių mikroorganizmų. Augalų ląstelių kultūros kultivavimui svarbu parinkti tinkamos sudėties maitinamąją terpę bei suteikti optimalias išorinės aplinkos sąlygas (t. y., šviesą ir optimalią temperatūrą). Taip pat yra svarbūs komponentai maitinamųjų terpių paruošimui, norint inicijuoti kaliaus formavimąsi ir kultivuoti augalų ląsteles *in vitro*: mikroelementai, makroelementai, anglies ir geležies šaltiniai, organiniai priedai (pvz., gliukozė) bei augimo hormonai (pvz., auksinai, citokininai, giberelinai).

Vienos populiariausių maitinamųjų terpių rausvojo kataranto kaliaus kultūroms auginti: *Murashige & Skoog* (MS), *Linsmaier & Skoog* (LS) ir *Gamborg* (B5) [55,56]. Maitinamosios terpės skiriasi savo sudėtiniais komponentais bei jų koncentracijomis. Augalų augimo hormonai – tai sintetiniai junginiai, kurie reguliuoja augalo diferenciaciją ir morfogenezės procesus, pvz., auksinai, citokininai. Citokininai yra augalų fitohormonai, skatinantys augalo ląstelių dalijimąsi, chlorofilo biosintezę ir diferenciacijos procesus. Pagrindiniai citokininai naudojami maitinamosiose terpėse: kinetinas, 6-benzilaminopurinas (BAP) ir zeatinas [57]. Citokininas veikia kartu su auksinu, papildant vienas kitą, paprastai jie turi priešingą poveikį augalui. Auksinai yra gyvybiškai svarbūs augalų fitohormonai, kurie augalui yra būtini net ir mažiausiomis koncentracijomis. Auksinai sužadina šaknų ar stiebų pradmenų (*in vitro*) diferenciaciją, skatina ląstelių dalijimąsi bei slopina augalo lapų senėjimą. Auksinai gali būti natūralūs (pvz., 3-indolilacto rūgštis (IAR)) ir sintetiniai (pvz., 1-naftilacto rūgštis (NAR), 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D)) [58].

#### 1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Rausvasis katarantas pasižymi įvairiomis medicininėmis savybėmis, kurios priklauso nuo augalo biosintetinių antrinių metabolitų. Jie yra atsakingi už augalo apsauginę funkciją ir prisitaikymą prie aplinkos sąlygų. Rausvojo kataranto sudėtyje esantis vinkristinas ir vinblastinas yra plačiai naudojamas įvairių formų vėžiui ir kitoms ligoms gydyti. Tačiau šių alkaloidų gryninimas vis dar yra brangus, dėl mažų išeigų augalo ekstraktuose. Todėl siekiant padidinti vinkristino ir vinblastino kiekį augalo sudėtyje, buvo pradėtas taikyti kaliaus kultūrų *in vitro*, bandant įvairias maitinamąsias terpes ir augimo hormonų kombinacijas. Daugiausia tyrimų buvo atlikta Indijos mokslininkų, nes katarantas yra plačiai naudojamas indų liaudies medicinoje. Bet, iki šiol, dar viskas yra tyrimų lygmenyje ir nėra surasta optimalaus metodo alkaloidų sintezei skatinti. Yra ieškomi būdai ir atliekami moksliniai tyrimai siekiant užtikrinti pakankamą kiekį kokybiško produkto. Šis tyrimas buvo atliekamas siekiant nustatyti optimalias laboratorines sąlygas *in vitro* rausvojo kataranto kaliaus kultūrų *in vitro* formavimui ir kaliaus bioktyvumui nustatyti.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Šiame skyriuje bus aptariama tiriamosios medžiagos (t. y., *C. roseus* augalinės žaliavos) paruošimas, naudotos medžiagos, reagentai, įranga, priemonės bei aptariami tyrimo metodai.

**Augalinė žaliava.** Analizei naudojama rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) *in vivo* ir *in vitro* būdu laboratorijoje išauginta augalinė žaliava. Užaugintų augalų morfologinės dalys (t. y. lapai, žiedai, šaknys ir stiebai) buvo atskirtos viena nuo kitos ir džiovinamos kambario temperatūroje.

### 2.1. Naudotos medžiagos ir darbo priemonės

#### 2.1 lentelė. Naudotų reagentų ir medžiagų sąrašas

Metanolis (99,9 %); acetonas (100 %); etanolis (96%); natrio fosfatinis buferis (0,2 M, pH=6,6);  $K_3[Fe(CN)_6]$  (1 %); trichloracto rūgštis (10 %);  $FeCl_3$  (0,1 %); acetatinis buferis (300 mM, pH=3,6); TPTZ (10 mmol); HCl (40 mmol/l);  $FeCl_3 \times 6H_2O$  (20 mmol/l);  $FeSO_4 \times 7H_2O$ ; DPPH; standartinis tanino rūgšties tirpalas (0,1 mg/ml); *Folin-Ciocalteu* fenolinis reagentas (2 N); natrio karbonatas (99,8 %); albuminas (25 mg); Bradfordo reagentas; K/Na fosfatinis buferis (0,066 M); ditiotritolis (DTT, 1 mM); fenilmetilsufonilfluoridas (PMSF, 0,5 mM); DMSO; polivinilpirolidonas; Tris-HCl buferis (40 mM); *L*-metioninas (10 mM); nitromėlynasis tetrazolis (54  $\mu$ M); riboflavinas (3  $\mu$ M); Tris-HCl (0,05 M, pH=7,8); EDTA (1 mM); tritonas X-100; Karbonatinis buferis (pH=10,3); *L*-prolinas (0,02 M); NAD (100 mM); ledinė acto rūgštis (99,9 %); Ninhidrinas;  $H_3PO_4$ ; *L*-prolinas (1mM); fosfatinis buferis (20 mM, pH=7,4); ABTS (10 mg); kalio persulfatas (0,17 mM); maitinamosios terpės (MS, LS, B<sub>5</sub>); gliukozė; NAR; kinetinas; 2,4-D.

#### 2.2 lentelė. Naudotų priemonių ir įrangos sąrašas

Analitinės svarstyklės „Shimadzu“;  
Centrifuga „Hettich Universal 320R“;  
Autoklavas „CertoClav“;  
Purtyklė „Vortex-Genie“;  
Spektrofotomeras „Shimadzu UV – 1280“ (1 cm diametro plastikinės kiuvetės);  
Vandens vonelė „Biosan BWT – U“;  
Laminaras „Telstar BV – 100“;  
Orbitalinė purtyklė „ES – 20“;  
pH-metras „WinLab“;  
*Microsoft Office* 2016 paketo *Excel* programa – statistiniams skaičiavimams ir grafikams braižyti;  
*Edraw Max 9.1* programa – technologinėms schemoms braižyti;  
Automatinės pipetės (10, 100, 200, 1000, 5000  $\mu$ l) su antgaliais „Eppendorf Research“.

### 2.2. Tyrimo metodai

Šiame poskyryje yra pateiktos baigiamajame magistro projekte naudotos metodikos *C. roseus* kaliaus kultūroms *in vitro* ir augalo *in vivo* auginti ir fitocheminiams tyrimams atlikti.

#### 2.2.1. Sėklų sterilinimas

*C. roseus* sėklų sterilinimas atliktas naudojant 2 skirtingų tirpalų rinkinius:

- Pirmuoju atveju sėklos mirkomos 30 s 70 %  $C_2H_5OH$ , 10 min 0,1 %  $HgCl_2$ , 10 min 1,5 %  $NaClO$  tirpaluose ir 3 kartus plaunamos steriliu distiliuotu vandeniu.
- Antruoju atveju sėklos mirkomos 8 min 0,1 %  $AgNO_3$ , nuplaunamos steriliu distiliuotu vandeniu, tada vėl mirkomos 1 min 70 %  $C_2H_5OH$  ir galiausiai 3 kartus plaunamos steriliu distiliuotu vandeniu.

Išsterilintos sėklos yra sodinamos į *Petri* lėkšteles aseptinėmis sąlygomis laminare. Laminaras yra apšviečiamas UV lempa 15 min, po to jo paviršius yra valomas 70 % etanoliu.

### 2.2.2. Augimo reguliatorių paruošimas

Pradinio tiriamosios medžiagos 0,1 mg/ml tirpalo paruošimas: 10 mg augimo hormono suberiama į matavimo kolbą ir ištirpinama 5 ml distiliuotame vandenyje, tirpalas praskiedžiamas iki 100 ml žymos. Tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris, reikalingas tirpalų paruošimui, apskaičiuojamas pagal lygtį ir praskiedžiamas iki 100 ml, kad gauti reikiamą koncentraciją (mg/l):

$$X = \frac{A \times B}{C}$$

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

A – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;

B – praskiedimo tūris, l;

C – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamąja medžiaga, koncentracija, mg/ml.

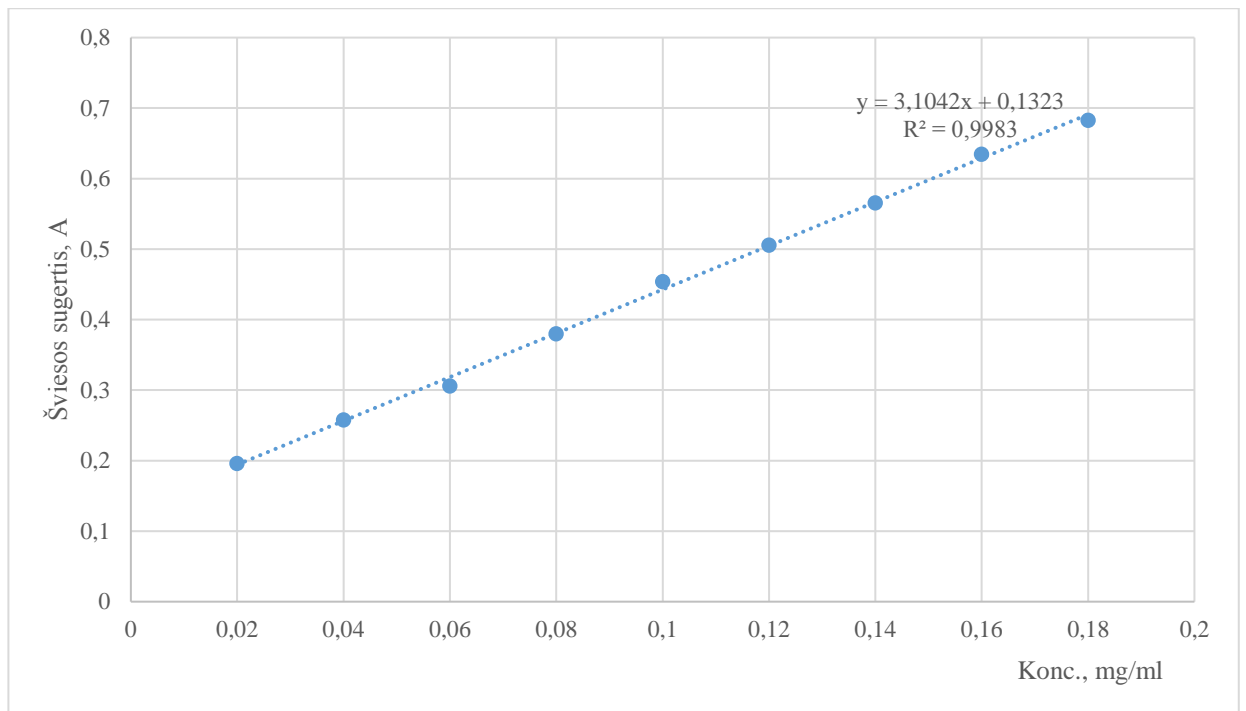
### 2.2.3. Maitinamųjų terpių paruošimas

Rausvojo kataranto sėkloms auginti buvo paruoštos *Murashige & Skoog* (MS – viena plačiausiai naudojamų terpių audinių kultūroms auginti, pasižyminti didelėmis kalio ir amonio bei nitratų koncentracijomis), *Linsmaier & Skoog* (LS) ir *Gamborg* (B<sub>5</sub>) maitinamosios terpės, kurių sudėtis pateikta 1 priede. Maitinamosios terpės 15 minučių sterilizuojamos autoklave, režimu – 121,1 °C temperatūra, 0,75–1 atm. slėgis. Sudaromos optimalios kultivavimo sąlygos: 20–22 °C temperatūra, fotoperiodas – 24 valandos, eksperimento metu naudojama MS, LS ir B<sub>5</sub> terpė (pH = 5,7–5,8). Eksplantai reguliariai kas 3 savaites perkeliama į šviežių maitinamąją terpę. Terpių pH reguliuojamas su 0,1 N NaOH ir 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tirpalais.

### 2.2.4. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas *C. roseus* žaliavoje

Fermento superoksido dismutazės aktyvumui įvertinti [59] buvo pagaminti *C. roseus* 0,025 g/ml buferiniai ekstraktai: pasveriami po 0,1 g (± 0,0002 g) grūstuvėlyje susmulktos augalinės žaliavos ir tirpių baltymų ekstrakciją vykdome žaliavą užpildami 4 ml 0,066 M K/Na fosfatiniu buferiu (pH = 7,4), į kurio sudėtį įeina 1 mM ditiotritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsufonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1–3 mg polivinilpirolidono tirpalai. Bandiniai 10 min. (25 °C temperatūroje, prie 200 rpm greičio) inkubuojami orbitalinėje purtyklėje. Tada centrifuguojama 10 min. 9000 aps/min greičiu. 400 μl gauto supernatanto dar kartą centrifuguojama *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose 10 min. 10000 aps/min greičiu.

Iš gauto supernatanto pirmiausia yra nustatoma baltymų koncentracija tirpale. Baltymų koncentracija nustatoma Bradfordo metodu [60]. Metodas pagrįstas specifine baltymų sąveika su *Coomassie* briliantiniu mėliu ir susidariusio komplekso aptikimu spektrofotometriškai ties 595 nm bangos ilgiu. Mėginiams pagaminti yra paimama 200 μl ekstrakto ir užpilama 2 ml Bradfordo reagento bei išmatuojama šviesos sugertis spektrofotometru 595 nm bangos ilgyje. Spektrofotometro kalibracijai yra naudojamas 0,066 M K/Na fosfatinis buferis. Gauti duomenys įvertinami pagal albumino (0,02–0,18 mg/ml) kalibracinio grafiko (žr. 2.1 pav.) tiesinės regresijos lygtį:  $y = 3,14042x + 0,1323$ ;  $R^2 = 0,9983$ .



**2.1 pav.** Albumino kalibracinė kreivė

Superoksido dismutazės aktyvumui nustatyti yra gaminamas reakcijos mišinys: 40  $\mu$ l pagaminto ekstrakto maišoma su 200  $\mu$ l 540  $\mu$ M nitromėlynojo tetrazolio, 400  $\mu$ l 200 mM Tris-HCl buferio (pH = 7,8), 200  $\mu$ l 100 mM L-metionino, 20  $\mu$ l 300  $\mu$ M riboflavino, 500  $\mu$ l 0,1% Tritono X-100 ir 620  $\mu$ l dejonizuoto vandens. Taip pat yra paruošiamas kontrolinis mėginys be ekstrakto (t. y., fermentinio preparato). Mėginiai yra 30 min. apšviečiami liuminescencinėmis lempomis ir po inkubacijos, spektrofotometru pamatuojama mėginių šviesos sugertis 560 nm bangos ilgyje. Spektrofotometro kalibracijai yra naudojamas 0,066 M K/Na fosfatinis buferis. Matavimai kartojami 3 kartus. Baltymų koncentracija (mg/ml) apskaičiuojama pritaikius lygtį:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1}$$

Kur:  $a$  – baltymo koncentracija, gauta iš albumino kalibracinės kreivės, mg/ml;

$V$  – pradinis ekstrakto tūris, ml;

$V_1$  – pradinis ekstrakto tūris, paimtas praskiedimui, ml;

$n$  – augalinė masė, naudota ekstrakto gamybai, mg.

Superoksido dismutazės aktyvumas (vnt/mg) apskaičiuojamas pritaikius lygtį:

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

Kur:  $A$  – SOD aktyvumas, vnt/mg;

$E_K$  – kontrolinio bandinio šviesos sugertis;

$E_T$  – tiriamojo bandinio šviesos sugertis;

$m$  – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml.

### 2.2.5. *L*-proolino koncentracijos įvertinimas *C. roseus* žaliavoje

*L*-proolino koncentracijai [61] nustatyti buvo pagaminti *C. roseus* 0,025 g/ml vandeniniai ekstraktai. Pasveriami po 0,1 g ( $\pm 0,0002$  g) grūstuvėlyje susmulkintos augalinės žaliavos ir užpilama 4 ml dejonizuotu vandeniu. Mėgintuvėlis su augaline žaliava 3 min. kaitinamas verdančio vandens vonelėje ir atšaldomas po šalta vandens srove. Procedūrą pakartojus dar du kartus, ekstraktas centrifuguojamas 10 min. 9000 aps/min. Nuo nuosėdų atskirtas centrifugatas yra praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 6 ml. Bandiniams paruošti į kitą mėgintuvėlį įpilama 1 ml gauto vandeninio ekstrakto, 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento. Mėgintuvėliai patalpinami verdančio vandens vonelėje 1 valandai. Kontrolinis mėginys, naudojamas spektrofotometro kalibracijai, gaminamas vietoj ekstrakto įpilant 1 ml dejonizuoto vandens. Mėgintuvėliai yra atvėsunami ir šviesos sugertis matuojama spektrofotometru 520 nm bangos ilgyje. Matavimai kartojami 3 kartus. Gauti duomenys įvertinami pagal *L*-proolino (0,0125–0,6 mM) kalibracinio grafiko (žr. 2.2 pav.) tiesinės regresijos lygtį:  $y = 4,8829x + 0,2358$ ;  $R^2 = 0,9582$ .

*L*-proolino koncentracija (mg/ml) apskaičiuojama pritaikius lygtį:

$$C_x = \frac{E \times k \times V_{bendras}}{V_{paimta} \times m}$$

Kur:  $C_x$  – proolino koncentracija,  $\mu\text{mol/g}$ ;

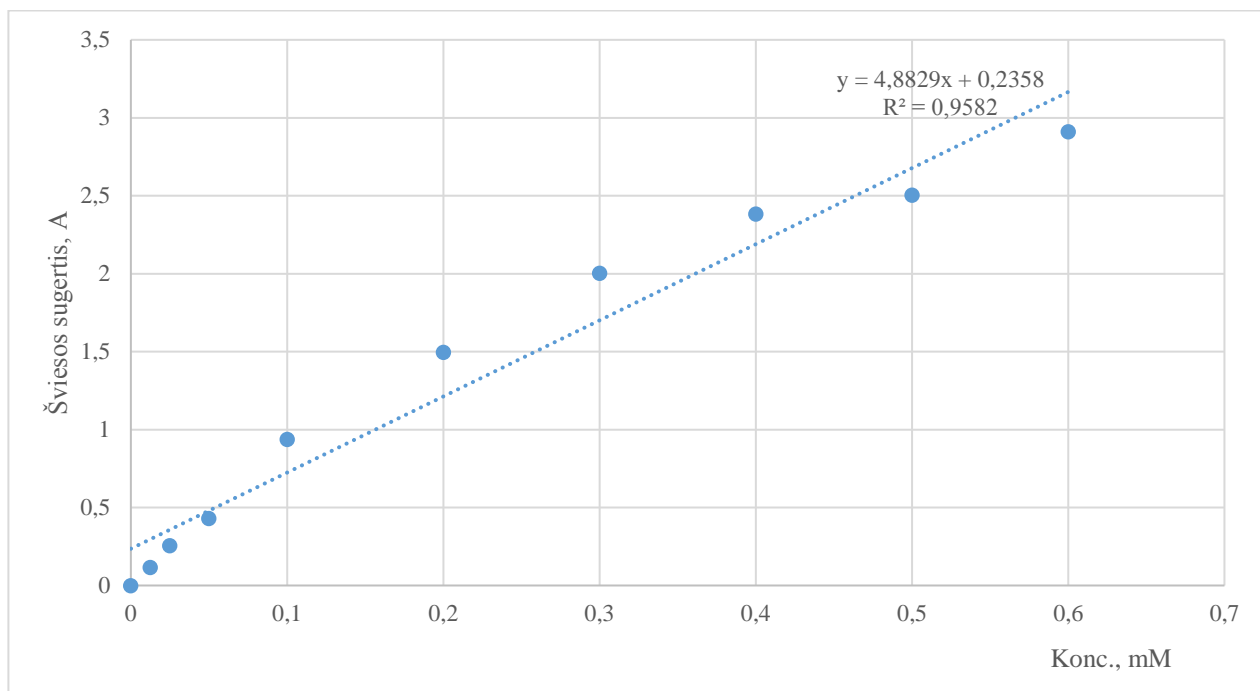
$E$  – tirpalo šviesos sugertis;

$k$  – *L*-proolino kiekis, gautas pagal kalibracinę kreivę,  $\mu\text{mol}$ ;

$V_{bendras}$  – bendras ekstrakto tūris, ml;

$V_{paimta}$  – paimto ekstrakto tūris, ml;

$m$  – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g.



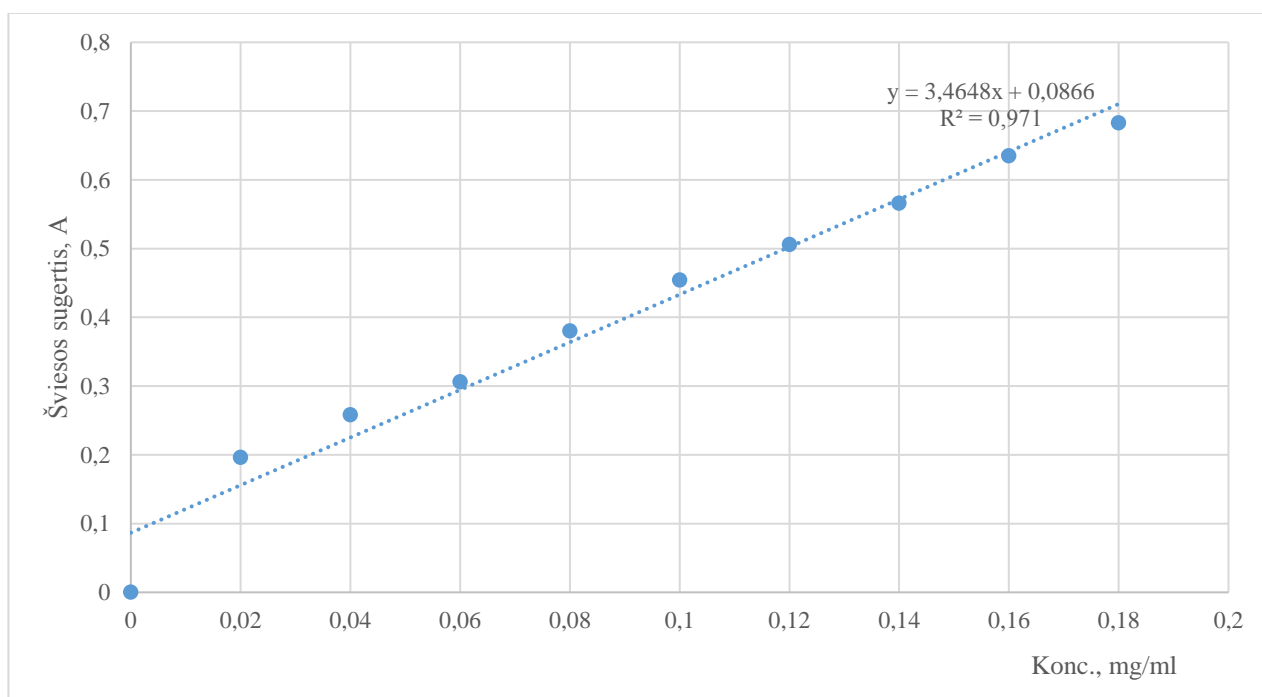
2.2 pav. *L*-proolino kalibracinė kreivė



**L-prolino kalibracinės kreivės paruošimas.** Pasveriami *L*-prolino 0,0011 g ir ištirpinama 10 ml H<sub>2</sub>O (1 mM). Imami atitinkami *L*-prolino kiekiai iš pradinio tirpalo į mėgintuvėlius: 0; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 ml ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1 ml žymos. Skiediniai yra maišomi su 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento bei paliekami 1 val. verdančio vandens vonelėje.

### 2.2.6. Prolino dehidrogenazės aktyvumo įvertinimas *C. roseus* žaliavoje

Baltymų koncentracijai ir prolino dehidrogenazės aktyvumui nustatyti [62] buvo pagaminti *C. roseus* 0,025 g/ml buferiniai ekstraktai: pasveriami po 0,1 g ( $\pm$  0,0002 g) grūstuvėlyje susmulkintos augalinės žaliavos ir vykdoma ekstrakcija ekstrakcijos buferyje (pH = 7,8) 4 ml tūryje, turinčiame 0,05 M Tris-HCl (pH = 7,8), 1 mM EDTA, 0,5 % Tritono X-100. Bandiniai 10 min. (25 °C temperatūroje, prie 200 rpm greičio) įstatomi į orbitalinę purtyklę. Mėginiai centrifuguojami 10 min. 9000 aps/min greičiu. Su pipete perpilama 800  $\mu$ l supernatanto į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlius ir bandiniai dar kartą centrifuguojami 10 min. 10000 aps/min greičiu. Baltymų koncentracijai nustatyti į mėgintuvėlį įpilama 200  $\mu$ l ekstrakto ir 2 ml Bradfordo reagento bei išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Spektrofotometro kalibracijai yra naudojamas 200  $\mu$ l ekstraktinio buferio ir 2 ml Bradfordo reagento tirpalas. Gauti duomenys įvertinami pagal albumino (0,02–0,18 mg/ml) kalibracinio grafiko (žr. 2.3 pav.) tiesinės regresijos lygtį:  $y = 3,4648x + 0,0866$ ;  $R^2 = 0,971$ .



2.3 pav. Albumino kalibracinė kreivė

Prolino dehidrogenazės aktyvumui nustatyti atliekamas papildomas centrifugato skiedimas su karbonatiniu buferiu, santykiu 1:4. Tada į kitą mėgintuvėlį įpilama 400  $\mu$ l praskiesto ekstrakto, 1800  $\mu$ l karbonatinio buferio (pH = 10,3), 1800  $\mu$ l 0,02 M *L*-prolino ir sumaišome purtykle. Prieš matavimą spektrofotometru į reakcijos mišinį įpilama 100  $\mu$ l 100 mM NAD tirpalo. Šviesos sugertis registruojama 340 nm bangos ilgyje matavimo pradžioje, o po 3 min. registruojamas absorbcijos pokytis. Spektrofotometro kalibracijai yra naudojamas karbonatinis buferis (pH = 10,3). Matavimai kartojami 3 kartus. Fermento aktyvumui apskaičiuoti ( $\mu$ mol NAD/mg baltymo x min) yra pritaikoma lygtis:

$$A = \frac{1000 \times \Delta\bar{E} \times V}{k \times m}$$

Kur:  $A$  – prolino dehidrogenazės aktyvumas,  $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \times \text{min}$ ;

$\Delta\bar{E}$  – šviesos sugerties pokytis po 3 min ir pradžioje;

$V$  – bendras mišinio tūris, ml;

$k$  – molinės ekstinkcijos koeficientas ( $6,22 \mu\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ );

$m$  – baltymo masė preparato tūryje, mg.

### 2.2.7. Chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų įvertinimas *C. roseus* žaliavoje

Pigmentų (t. y., chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų) koncentracijai nustatyti buvo pritaikytas D. Wettstein' o metodas [63]. Pagaminti *C. roseus* 0,01 g/ml etanoliniai ekstraktai: pasveriami po 0,1 g ( $\pm 0,0002$  g) grūstuvėlyje susmulkintos augalinės žaliavos ir užpylus 10 ml 96 %  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  homogenizuojama iki vientisos masės. Gautas homogenatas yra filtruojamas per filtrinį popierių. Filtrato tūris yra išmatuojamas cilindru. Ekstraktų šviesos sugertis yra spektrofotometriškai išmatuojama ties 662 nm (chlorofilo *a*) bangos ilgiu. Išmatuota šviesos sugertis turi patekti 0,1–0,8 A ribose, jei reikia, ekstraktai yra praskiedžiami 96 % etanoliumi. Matavimo kiubetėse ( $l = 1$  cm) supilti ekstraktai yra papildomai išmatuojami spektrofotometru 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidai) bangų ilgiuose. Spektrofotometro kalibracijai yra naudojamas 96 % etanolio tirpiklis. Matavimai kartojami 3 kartus. Pigmentų ir karotinoidų koncentracijoms (mg/l) apskaičiuoti yra taikomos lygtys:

**Chlorofilo *a*** koncentracija (mg/l):  $C_a = 9,784D_{662} - 0,99D_{644}$

**Chlorofilo *b*** koncentracija (mg/l):  $C_b = 21,426D_{644} - 4,65D_{662}$

$$C_a + C_b = 5,134D_{662} + 20,436D_{644}$$

**Karotinoidų** koncentracija (mg/l):  $C_{karotinoidai} = 4,695D_{441} - 0,268(C_a + C_b)$

Tada atskiro pigmentinio junginio koncentracija (mg/l) yra perskaičiuojama į kitus matavimo vienetus (mg/100g sausos žaliavos):

$$X = \frac{C \times V \times V_2 \times 100}{n \times V_1 \times 1000}$$

Kur:  $C$  – pigmentų koncentracija, mg/l;

$V$  – pradinis ekstrakto tūris, ml;

$V_1$  – pradinis ekstrakto tūris paimtas praskiedimui, ml;

$V_2$  – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

$n$  – augalinė masė, g.

### 2.2.8. Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas *Folin-Ciocalteu* metodu *C. roseus* žaliavoje

Bendrai fenolinių junginių koncentracijai nustatyti buvo pagaminti *C. roseus* 0,005 g/ml acetoniniai ekstraktai. Pasveriami po 0,025 g ( $\pm 0,0002$  g) grūstuvėlyje susmulkintos sausos augalinės žaliavos. Žaliava sudedama į plastikinius centrifuginius mėgintuvėlius ir užpilama 5 ml 70 % acetono tirpalu. Bandiniai 20 min. ( $25^\circ\text{C}$  temperatūroje, prie 200 rpm greičio) įstatomi į orbitalinę purtyklę. Praėjus

laikui, ekstraktai centrifuguojami 10 min. 9000 aps/min 4 °C. Supernatantas surenkamas ir laikomas 4 °C temperatūroje.

Fenolinių junginių kiekybinei analizei buvo naudojamas modifikuotas [64] *Folin-Ciocalteu* kolorimetrinis metodas [65], kuomet spektrofotometriškai nustatyta ekstraktų šviesos sugertis yra matematiškai perskaičiuojama į matavimo vienetus, išreiškiančius junginių kiekį ekstraktuose. Tiriamiesiems bandiniams pagaminti yra paimamas atitinkamas kiekis paruošto ekstrakto, šiuo atveju 30 µl, ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 500 µl. Tada į gautus skiedinius yra įpilama 250 µl Folino reagento ir 1,25 ml 7,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalo. Purtyklėje sumaišomas gautas tirpalas ir po 40 minučių inkubacijos tamsoje (25 °C temperatūroje) spektrofotometru pamatuojama tirpalo šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje. Spektrofotometro kalibracijai yra naudojamas 70 % acetono tirpiklis. Matavimai kartojami 3 kartus.

Kalibracinei kreivei parengti į mėgintuvėlius yra įpilama 0,1 mg/ml standartinio tanino rūgšties tirpalo (0,0–130 µl) į mėgintuvėlius ir dejonizuotu vandeniu praskiedžiama iki 500 µl žymos. Papildomai įpilama 250 µl Folino reagento ir 1250 µl 7,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalo. Bandiniai sumaišomi purtykle ir inkubuojami tamsoje 40 min. (25 °C temperatūroje). Praėjus laikui, matuojama kiekvieno bandinio šviesos absorbcija 725 nm bangos ilgyje. Kontrolinis mėginys, naudojamas spektrofotometro kalibracijai, gaminamas vietoj tanino rūgšties įpilant 1 ml dejonizuoto vandens. Iš gautų matavimų brėžiama ne mažiau kaip 5 koncentracijos taškus turinti kalibracinė kreivė. Iš gautos (tanino rūgšties) kalibracinės kreivės nustatoma fenolinių junginių koncentracija ekstraktuose. Gauti duomenys įvertinami pagal tanino rūgšties (0,5 – 6,5 mg/ml) kalibracinio grafiko (žr. 2.4 pav.) tiesinės regresijos lygtį:  $y = 0,0986x + 0,0105$ ;  $R^2 = 0,9957$ .

Apskaičiuojama bendra fenolinių junginių koncentracija (mg TAE/100 g sausos žaliavos) pagal lygtį:

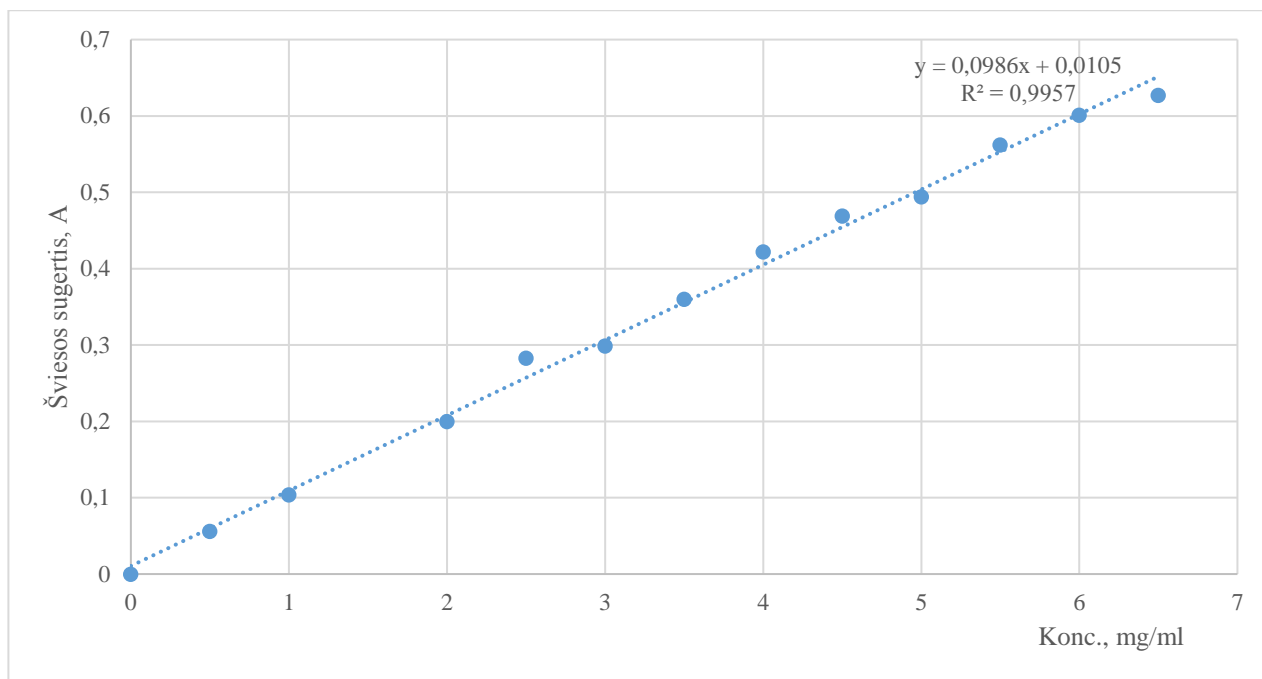
$$X = \frac{a \times V \times 100}{n \times V_1}$$

Kur:  $a$  – tanino rūgšties koncentracija iš kalibracinės kreivės, mg/ml;

$V$  – pradinis ekstrakto tūris, ml;

$V_1$  – pradinis ekstrakto tūris paimtas praskiedimui, ml;

$n$  – augalinė masė, mg.



2.4 pav. Tanino rūgštis kalibracinė kreivė

## 2.2.9. Antioksidantinių savybių *C. roseus* žaliavoje nustatymo metodai:

**Redukcinių (antioksidantinių) savybių įvertinimas *C. roseus* žaliavoje.** Bendram redukcinių savybių aktyvumui įvertinti [66] buvo pagaminti *C. roseus* 0,02 g/ml metanoliniai ekstraktai. Pasveriami po 0,1 g ( $\pm 0,0002$  g) grūstuvėlyje susmulkintos augalinės žaliavos, užpilama 5 ml 100 % metanolio tirpikliu ir 30 min. patalpinama 45 °C temperatūros vandens vonelėje. Po ekstrakcijos, bandiniai centrifuguojami 10 min. 9000 aps/min greičiu.

Iš gauto centrifugato atliekami (0,025–0,02 g/ml) skiedimai: į mėgintuvėlius įpilama 0,5, 0,25, 0,125 ir 0,0625 ml gauto ekstrakto ir praskiedžiama 100 % MeOH tirpikliu iki 0,5 ml žymos. Į skiedinius yra įpilama 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 1,25 ml  $K_3[Fe(CN)_6]$  tirpalo. Bandiniai sumaišomi purtykle ir inkubuojami 20 min. 50 °C temperatūros vandens vonelėje. Po inkubacijos, įpilama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgštis, sumaišoma ir centrifuguojama 10 min. 9000 aps/min greičiu. 1,25 ml centrifugato sumaišoma su 1,25 ml dejonizuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 %  $FeCl_3$  tirpalu. Spektrofotometru pamatuojama bandinių šviesos sugertis 700 nm bangos ilgyje. Spektrofotometro kalibracijai yra naudojamas 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 1,25 ml 0,1 %  $FeCl_3$  tirpalas. Matavimai kartojami 3 kartus. Šiame metode šviesos sugertis yra tiesiogiai proporcinga redukcinėms savybėms, kuo didesnė šviesos sugertis, tuo stipresnės redukcinės savybės.

**DPPH metodas.** Radikalų surišimo aktyvumas nustatomas augalo metanoluose ekstraktuose spektrofotometriškai, panaudojant modifikuotą [67] Brand-Williamso ir kt. metodą [68]. *C. roseus* ekstraktų antiradikalinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai, kurie, siekdami inaktyvinti laisvuosius radikalus, atiduoda vandenilį ir radikalas tampa stabiliu junginiu (DPPH-H).

Pasveriami po 0,1 g ( $\pm 0,0002$  g) grūstuvėlyje susmulkintos *C. roseus* augalinės žaliavos, užpilama 5000  $\mu$ l 100 % metanolio tirpikliu ir 10 min. homogenizuojama iki vientisos masės. Homogenatas 10 min. centrifuguojamas 9000 aps/min greičiu ir supernatantas surenkamas tyrimui. Tada į mėgintuvėlį įpilama 3000  $\mu$ l 0,1 M radikalo (DPPH) reagento (jis yra ruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant

100 ml 100 % metanolyje) ir į jį įleidžiama 77 µl ekstrakto, o į palyginamąjį tirpalą vietoje ekstrakto yra įpilama 77 µl 100 % MeOH tirpiklio. Bandiniai sumaišomi apverčiant mėgintuvėlį 2 kartus ir inkubuojami 15 min tamsioje vietoje 25 °C temperatūroje. Įvykus reakcijai, tirpalas pilamas į kiuvetę bei spektrofotometru pamatuojama šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje. Spektrofotometro kalibracijai naudojamas 100 % MeOH tirpiklis. Matavimai kartojami 3 kartus. Radikalų slopinimas (%) yra apskaičiuojamas lygtimi:

$$\% \text{ slopinimas} = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100$$

Kur:  $A_B$  – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;

$A_A$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

**ABTS metodas.** ABTS metodas paremtas radikalo anijono slopinimu [69]. Radikalo anijonų slopinimo aktyvumui įvertinti buvo pagaminti *C. roseus* 0,02 g/ml metanoliniai ekstraktai. Pasveriami po 0,1 g ( $\pm$  0,0002 g) grūstuvėlyje susmulkintos augalinės žaliavos, užpilama 5 ml 100 % metanolio tirpikliu ir 30 min. patalpinama 45 °C temperatūros vandens vonelėje. Po ekstrakcijos, bandiniai centrifuguojami 10 min. 9000 aps/min greičiu.

Paruošiamas 2 mM ABTS motininis tirpalas: sumaišoma 2 mM ABTS su 0,17 mM kalio persulfatu, kuris yra ištirpinamas 20 mM fosfatiniame buferyje (pH = 7,4), ir laikoma 16 val. tamsioje vietoje kambario temperatūroje. Įvykus reakcijai, radikalo anijonas nudažė tirpalą mėlynai-žalia spalva. Šis motininis ABTS tirpalas yra skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 0,700 A šviesos sugerties, kuomet pradinė ABTS tirpalo šviesos sugerties vertė buvo virš 2,700 A.

Tada į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlį įpilama 2 ml praskiesto 2 mM ABTS tirpalo, įleidžiama 20 µl ekstrakto ir gautas tirpalas sumaišomas purtykle. Kontrolinis mėginys yra gaminamas vietoje ekstrakto į 2 ml ABTS tirpalą įleidžiant 20 µl 100 % metanolio tirpiklio. Mėginiai inkubuojami 5 min. 25 °C temperatūroje ir spektrofotometru pamatuojama šviesos sugertis 734 nm bangos ilgyje. Spektrofotometro kalibracijai yra naudojamas 100 % metanolio tirpiklis. Matavimai kartojami 3 kartus. *C. roseus* ekstraktų antiradikalinis aktyvumas ABTS metodu įvertinamas matuojant, kiek procentų radikalinių anijonų neutralizuoja fenoliniai junginiai. Radikalų anijonų slopinimas (%) yra apskaičiuojamas lygtimi:

$$\% \text{ slopinimas} = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100$$

Kur:  $A_B$  – praskiesto ABTS tirpalo šviesos sugerties dydis;

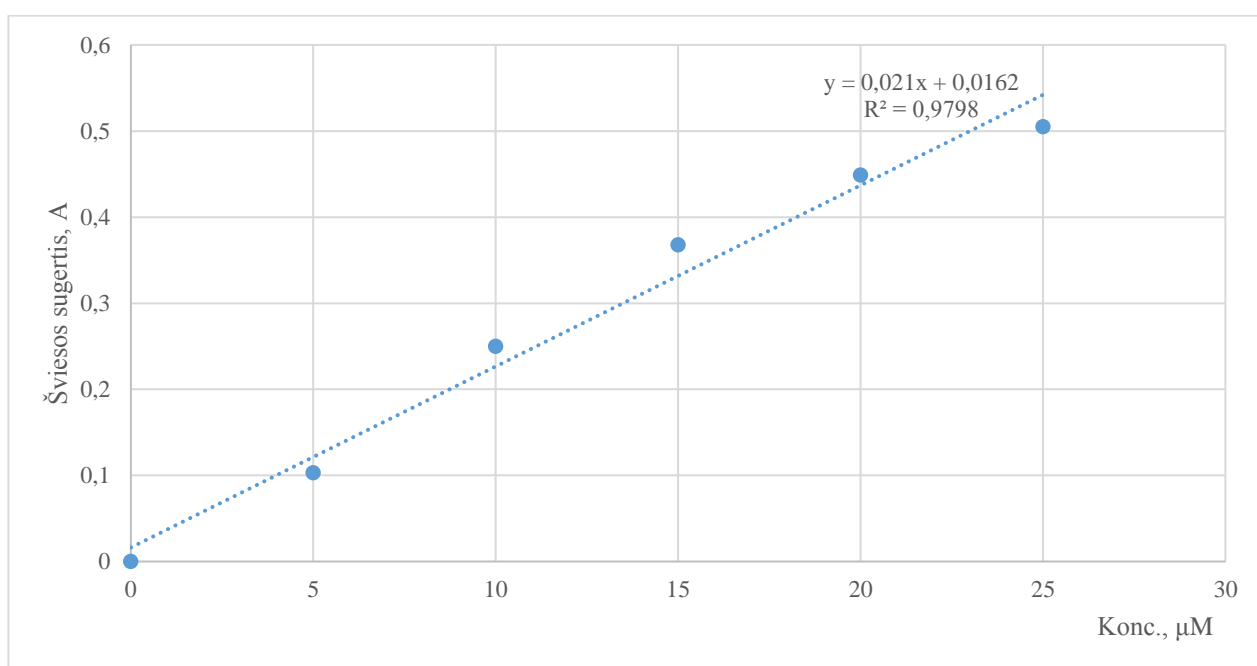
$A_A$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

**FRAP metodas.** FRAP metodas paremtas  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ pavirtimu į  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, kuomet tirpalo spalva nusidažo mėlynai [70]. Augalo antioksidantiniam aktyvumui įvertinti buvo pagaminti *C. roseus* 0,02 g/ml metanoliniai ekstraktai. Pasveriami po 0,1 g ( $\pm$  0,0002 g) grūstuvėlyje susmulkintos augalinės žaliavos, užpilama 5 ml 100 % metanolio tirpikliu ir 30 min. patalpinama 45 °C temperatūros vandens vonelėje. Po ekstrakcijos, bandiniai centrifuguojami 10 min. 9000 aps/min greičiu.

Paruošiamas FRAP reagentas: 25 ml 300 mM acetato buferio (pH = 3,6) sumaišoma su 2,5 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas, ištirpintas 40 mmol/l HCl) ir 2,5 ml 20 mmol/l  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ .

Tada į mėgintuvėlį įpilama 3 ml FRAP reagento, įleidžiama 100 μL gauto ekstrakto ir gautas tirpalas sumaišomas purtykle. Spektrofotometro kalibracijai 3 ml FRAP reagentas yra maišomas su 100 μl 100 % metanolio tirpikliu. Spektrofotometru pamatuojama mėginių šviesos sugertis 593 nm bangos ilgyje. Matavimai kartojami 3 kartus.

Kalibracinei kreivei parengti yra naudojamas 2 mM FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O tirpalas. Ruošiami, ne mažiau 5, FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O koncentracijų (5–25 μmol/l) skiediniai: į mėgintuvėlius įpilama 25, 50, 75, 100, 125 μl ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 7000 μl žymos. Į skiedinius įpilama 3000 μl FRAP reagento ir mėginiai sumaišomi purtykle. Spektrofotometru pamatuojama kiekvieno bandinio šviesos absorbcija 593 nm bangos ilgyje. Spektrofotometro kalibracijai 3000 μl FRAP reagento sumaišoma su 7000 μl dejonizuotu vandeniu. Iš gautų matavimų brėžiama ne mažiau kaip 5 koncentracijos taškus turinti kalibracinė kreivė. Gauti tyrimo duomenys įvertinami pagal FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O kalibracinio grafiko (žr. 2.5 pav.) tiesinės regresijos lygtį:  $y = 0,021x + 0,0162$ ;  $R^2 = 0,9798$ .



**2.5 pav.** FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O kalibracinė kreivė

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Baigiamojo projekto metu buvo išaugintos rausvojo kataranto *in vivo* (natūralioje žemėje) ir *C. roseus* kaliaus kultūros *in vitro* (ant skirtingos sudėties maitinimo terpių). Iš augalo ir kaliaus sausos žaliavos buvo pagaminti tiriamieji mėginiai įvairių ekstraktų būdu, taikant tirpiklį, pvz., etanolį, metanolį ir acetoną, siekiant išekstrahuoti antrinius metabolitus, t. y., augalo veikliąsias medžiagas. Šie tirpikliai buvo pasirinkti dėl jų mažo poliškumo (mažesnio nei vandens), tai leidžia ištirpinti polines medžiagas esančias augalo sudėtyje.

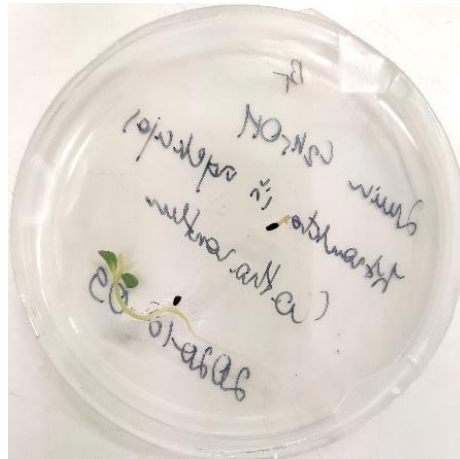
#### 3.1. Rausvojo kataranto kaliaus kultūrų *in vitro* suformavimas

Tyrimai atlikti su 9 (žr. 3.1 lentelė) *C. roseus* kaliaus kultūromis, augusiomis *in vitro* sąlygomis. Atliktas skirtingų augalo dalių (lapų, stiebų ir šaknų) kaliaus auginimas ant terpių, kurios skyrėsi savo sudėtiniais komponentais. Palyginimui buvo naudota *C. roseus*, auginto *in vivo* sąlygomis, išdžiovinti lapai ir žiedai.

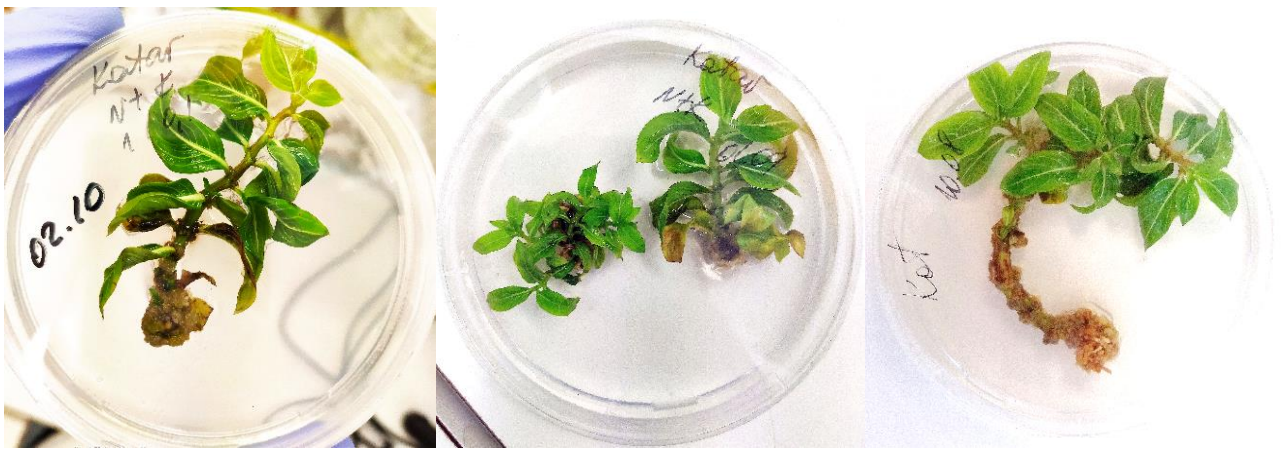
3.1 lentelė. Užauginti tiriamieji bandiniai – rausvojo kataranto kaliaus kultūros *in vitro*

Terpės komponentai	Augalo dalis
MS terpė + NAR (1 mg/l) + Kinetinas (0,1 mg/l)	Šaknys
	Stiebai
	Lapai
LS terpė + NAR (2 mg/l) + Kinetinas (0,2 mg/l) + gliukozė (30 g/l)	Šaknys
	Stiebai
	Lapai
B <sub>5</sub> terpė + 2,4-D (1 mg/l) + Kinetinas (0,1 mg/l)	Šaknys
	Stiebai
	Lapai

Tyrimui į terpes pasodinta 200 sterilizuotų *C. roseus* sėklų, tačiau jos nepasižymėjo dygimu. Todėl, remiantis mokslininkų iš Indijos tyrimais [55], buvo ant terpių užaugintos augalo, augusio *in vivo*, atskirtos morfologinės dalys. Po pirminio pasodinimo ant *Petri* lėkštelių užaugusios kaliaus kultūros buvo antrą kartą persodinamos ir kultivuojamos ant šviežių terpių. Didžiausiu kaliaus prieaugiu pasižymėjo augalo lapai (žr. 3.2 pav.), auginami ant MS terpės, ir stiebai (žr. 3.3 pav.), auginami ant LS terpės, o mažiausiu – šaknys (žr. 3.1 pav.), auginamos ant B<sub>5</sub> terpės.



**3.1 pav.** *C. roseus* šaknų kaliaus kultūros *in vitro*, auginant ant B<sub>5</sub> terpės



**3.2 pav.** *C. roseus* lapų kaliaus kultūros *in vitro*, auginant ant MS terpės



**3.3 pav.** *C. roseus* stiebų kaliaus kultūros *in vitro*, auginant ant LS terpės

Kaliaus kultūras suformavo 100 % eksplantų. Augalo kaliaus formavimosi priklausomybė nuo morfologinės augalo dalies buvo tirta ir kitų mokslininkų. Mokslininkai iš Indijos [58] užfiksavo geresnį augimą stiebų kaliaus, nei lapų kaliaus. Tyrime naudojami augimo hormonai buvo pasirinkti vertinant kitų mokslininkų darbus [71,72]. Mokslininkai iš Indijos [58] ir iš JAV [73] užfiksavo didžiausią vinkristino kiekį kaliui auginti naudojant NAR ir BAP augimo hormonų kombinacijas, taip

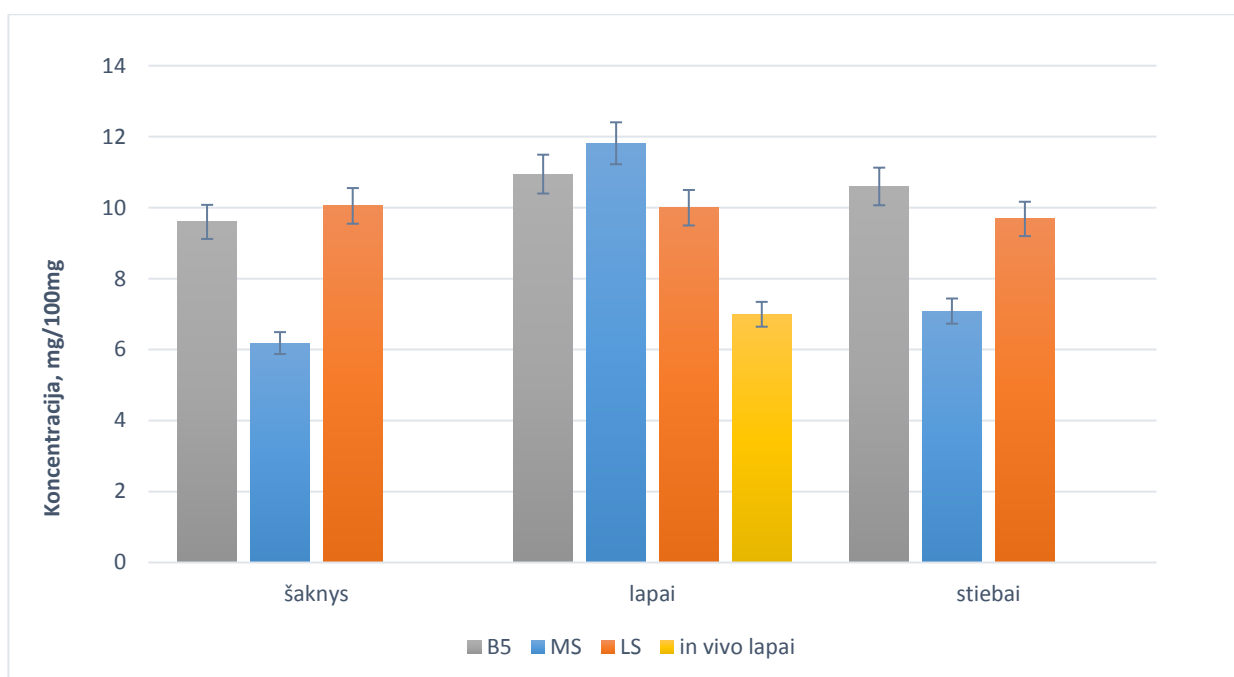


pat naudojo 2,4-D ir kinetino augimo hormonų kombinacijas, tačiau buvo nustatytas mažesnis vinkristino kiekis žaliavoje.

### 3.2. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas *C. roseus* žaliavoje

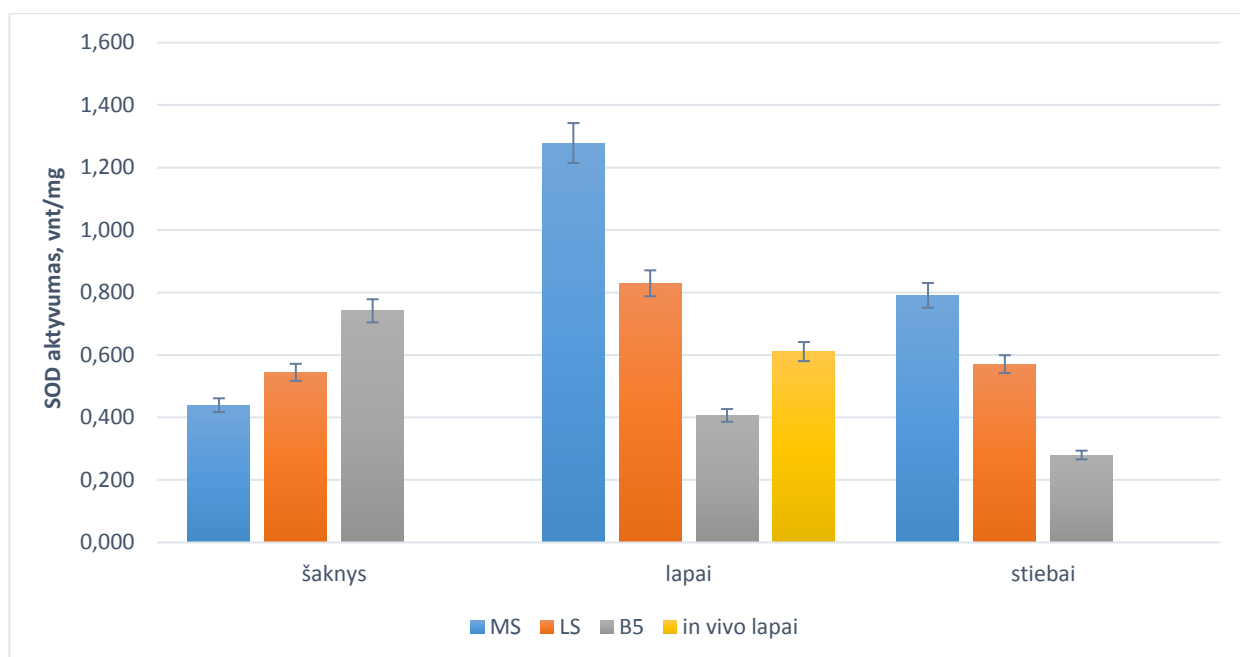
Superoksido dismutazė yra viena iš aktyviausių augalo sudėtyje esančių fermentinių antioksidantų, kuri inaktyvuoja superoksidą. Norint nustatyti fermento superoksido dismutazės aktyvumą *C. roseus* žaliavoje, iš pradžių, Bradfordo metodu buvo tiriama bendra baltymų koncentracija (mg/100 mg sausos žaliavos) augalo ekstraktuose pagal albumino kalibracinę kreivę ir pritaikius lygtį, pateiktą metodikoje.

Tiek B<sub>5</sub>, tiek ir LS maitinamojoje terpėje išaugintas kalius iš skirtingų morfologinių (t. y., šaknų, lapų ir stiebų) savo sudėtyje susintetino panašų kiekį baltymų, vidutiniškai ~10 mg baltymų/100 mg sausos žaliavos. NAR maitinamoji terpė labiau yra pritaikyta lapų kaliui auginti (11,81 mg/100g sausos žaliavos), nei šaknims ar stiebams. Lyginant auginimo būdus, auginamas kalius *in vitro* susintetina daugiau baltymų nei natūralioje aplinkoje *in vivo* augintas augalas (7,00 mg/100 mg sausos žaliavos).



3.4 pav. Baltymų koncentracija *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN ≤ 5 %

Įvertinus baltymų koncentraciją žaliavoje ir pritaikius lygtį, pateiktą metodikoje, yra apskaičiuojamas fermento superoksido dismutazės aktyvumas augalo žaliavoje.

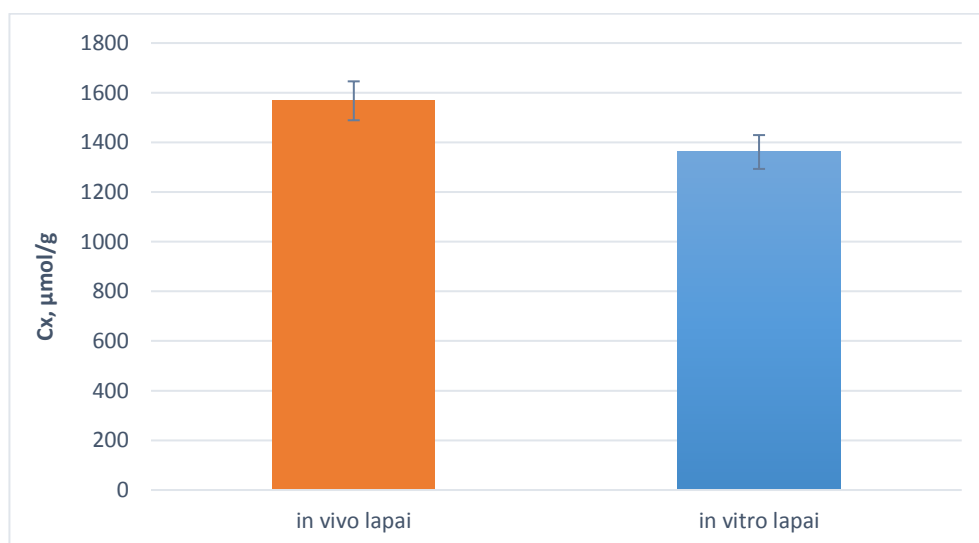


**3.5 pav.** Fermento superoksido dismutazės aktyvumas *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN  $\leq 5\%$

Lyginant baltymų koncentracijos ir SOD aktyvumo grafikus (žr. 3.4 ir 3.5 pav.), rezultatai nėra proporcingai priklausomi vienas nuo kito, t. y., esant didesnei baltymų koncentracijai, nebūtinai ir fermento aktyvumas bus didesnis. Aktyviausias fermentas nustatytas lapuose (t. y., pagrindinėje augalo dalyje, kur vyksta didžiausias kiekis metabolinių reakcijų). Lyginant maitinamųjų terpių tinkamumą fermento aktyvumui, šaknų kaliaus kultūras rekomenduojama auginti B<sub>5</sub> maitinamojoje terpėje (0,741 vnt/mg), o lapų ir stiebų kalių – MS maitinamojoje terpėje (atitinkamai 1,278 ir 0,791 vnt/mg).

### 3.3. *L*-proolino koncentracijos įvertinimas *C. roseus* žaliavoje

*L*-prolinas – tai vienas iš pagrindinių aminorūgščių, kuris yra atsakingas už augalo vystymąsi (pvz., baltymų biosintezę), toleranciją abiotiniam stresui (t. y., stresinėms aplinkos sąlygoms) bei skatina chlorofilo *b* susidarymą.

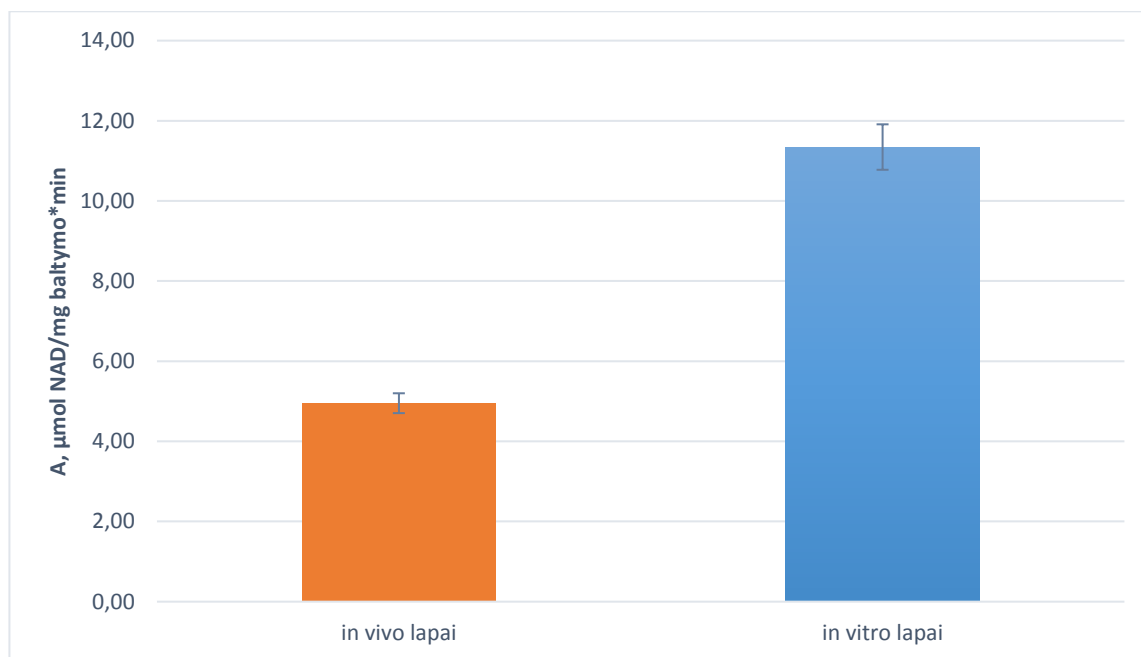


**3.6 pav.** *L*-proolino koncentracija *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN  $\leq 5\%$

Tyrimo rezultatai (žr. 3.6 pav.) parodė, jog *L*-proolino koncentracija augalo *in vivo* nėra ženkliai didesnė (1567,32  $\mu\text{mol/g}$ ) nei MS terpėje auginto lapų kaliaus *in vitro* (1361,23  $\mu\text{mol/g}$ ). Tai sąlygoja abiotinio streso veiksniai (pvz., temperatūra, aplinkos slėgis, šviesa ir atmosferos, vandens ar grunto cheminė sudėtis), kurie labiau augalą veikia auginant *in vivo* nei *in vitro* būdu.

### 3.4. Prolino dehidrogenazės aktyvumo įvertinimas *C. roseus* žaliavoje

Norint nustatyti prolino dehidrogenazės aktyvumą *C. roseus* žaliavoje, iš pradžių buvo atliekama tirpių baltymų ekstrakcija. Bradfordo metodu nustatoma baltymų koncentracija (mg/ml) augalo ekstraktuose pagal albumino kalibracinę kreivę ir pritaikius lygtį, pateiktą metodikoje, apskaičiuotas fermento aktyvumas augalo ekstraktuose.

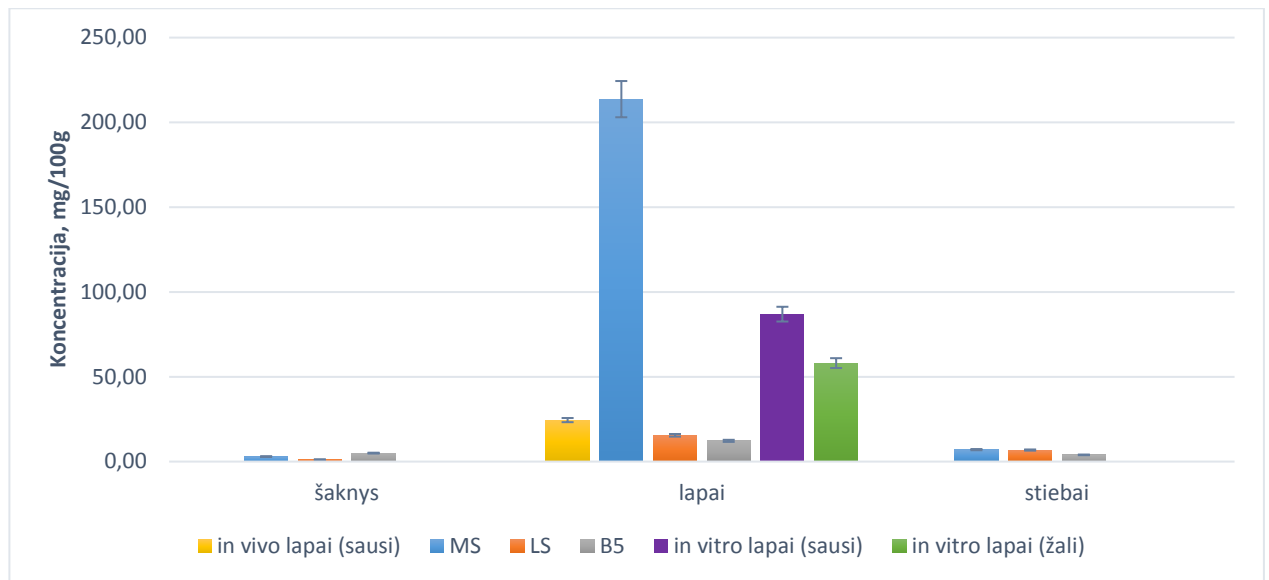


**3.7 pav.** Fermento prolino dehidrogenazės aktyvumas *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN  $\leq 5\%$

Iš rezultatų matyti (žr. 3.7 pav.), kad pastebimas ryškus skirtumas tarp *in vitro* ir *in vivo* mėginių ekstraktų. Tiriamas fermentas (prolino dehidrogenazė) buvo aktyvesnis lapų kaliaus *in vitro* sausos žaliavos buferiniuose ekstraktuose (11,34  $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \cdot \text{min}$ ), kai, tuo tarpu, *in vivo* lapų ekstraktuose 4,95  $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \cdot \text{min}$ . Šiame metode svarbus dėmesys atiteko šviesos sugerties pokyčiui per 3 minutes, tai nulėmė fermento efektyvumo dydį.

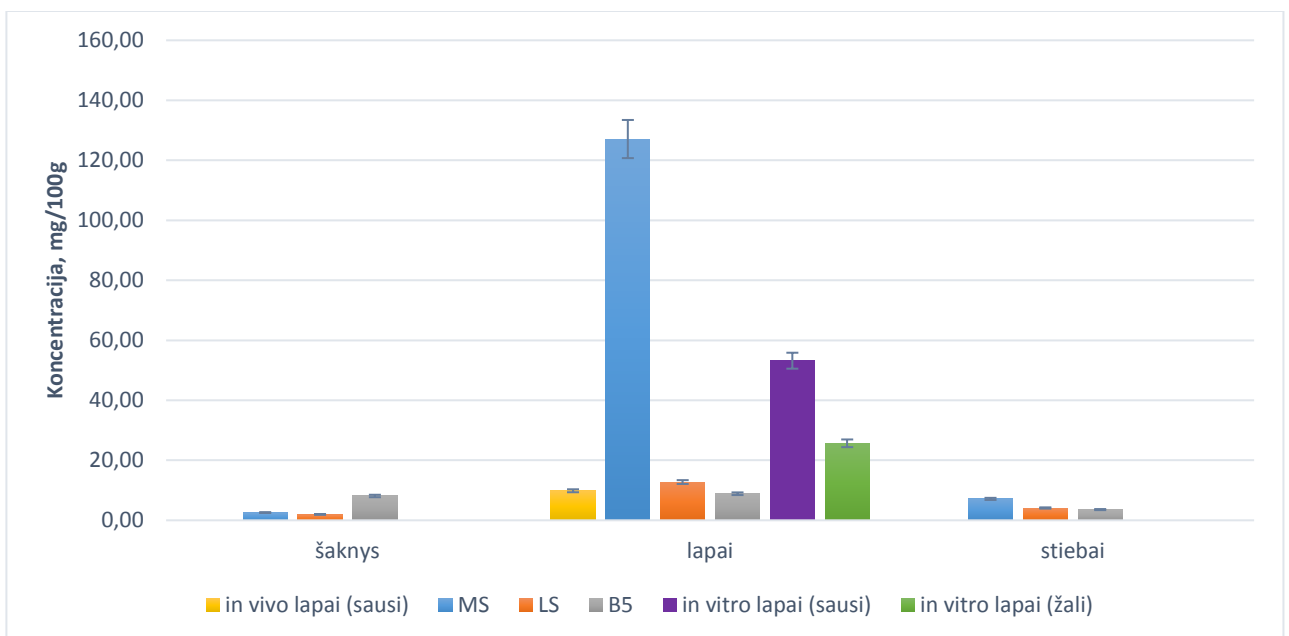
### 3.5. Chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų įvertinimas *C. roseus* žaliavoje

Chlorofilui *a*, chlorofilui *b* ir karotinoidams (tai 2 iš 4 pagrindinių augalų sudėtyje esančių pigmentų) nustatyti *C. roseus* žaliavoje, buvo pasirinktas spektrofotometrinis metodas, kuomet naudojant tą patį mėginį buvo išmatuota šviesos sugertis prie 3 skirtingų bangos ilgių, kuriuose yra tiriamųjų pigmentų pikai (662 nm, 644 nm ir 441 nm).



**3.8 pav.** Chlorofilo *a* koncentracija *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN  $\leq$  5 %

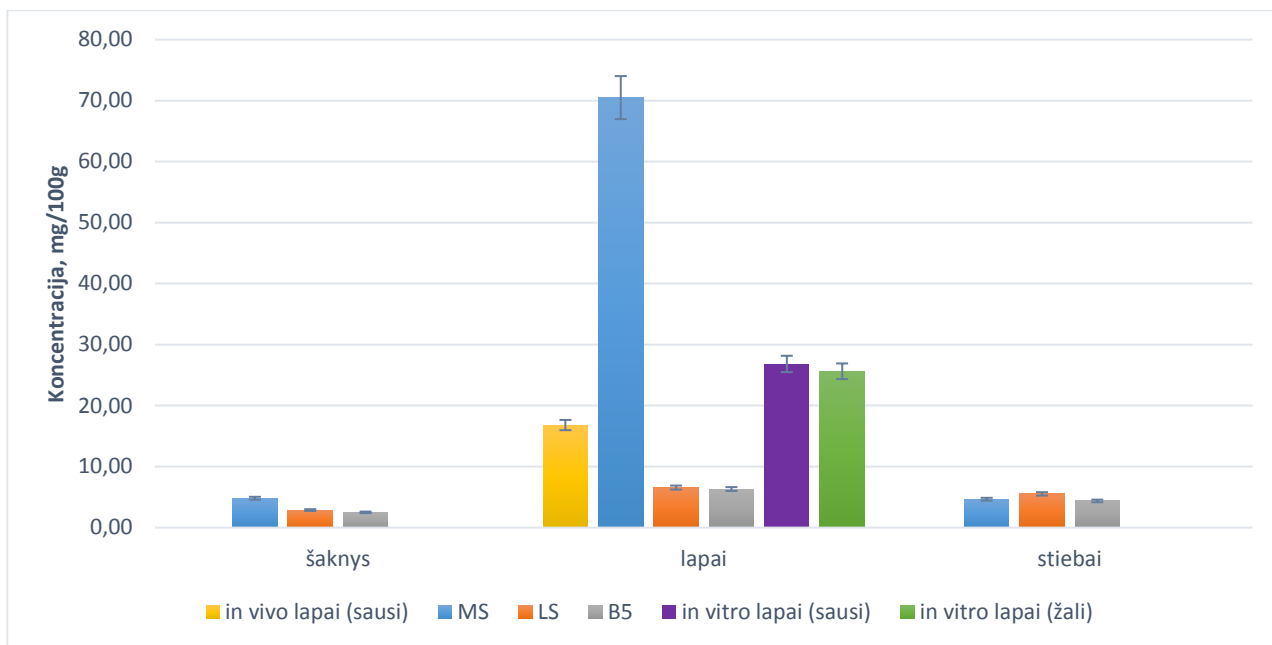
Unikali chlorofilo *a* savybė yra absorbuoti tiek raudonos, tiek ir mėlynos spalvos šviesą, tačiau mėlyną šviesą absorbuoja silpniau, todėl jos energijos negali naudoti fotosintezei. Tyrimo rezultatai parodė (žr. 3.8 pav.), jog didžiausią kiekį chlorofilo *a* susintetino lapų kalius auginamas MS maitinamojoje terpėje (213,71 mg/100g sausos žaliavos). Palyginimui buvo patikrinta neišdžiovintoje kaliaus kultūroje esanti chlorofilo *a* koncentracija (58,06 mg/100g žaliavos). Pastebėta, jog išdžiovintoje žaliavoje buvo daugiau tirpiklyje tirpių pigmentų, todėl chlorofilo *a* koncentracija buvo didesnė sausos žaliavos ekstraktuose (86,93 mg/100g sausos žaliavos).



**3.9 pav.** Chlorofilo *b* koncentracija *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN  $\leq$  5 %

Chlorofilas *b* leidžia augalui praplėsti sugeriamos šviesos spektrą, todėl augalai gali absorbuoti daugiau energijos iš aukštesnio dažnio mėlynos šviesos. Žvelgiant į grafiką (žr. 3.9 pav.), pastebima panaši situacija kaip ir chlorofilo *a* koncentracijos grafike (žr. 3.8 pav.). Efektyviausi chlorofilo *b*

gamintojai – lapai. MS maitinamoji terpė yra optimali chlorofilo *b* sintezei. Palyginimui buvo patikrinta nedžiovintos kaliaus kultūros ekstraktuose esanti chlorofilo *b* koncentracija (25,67 mg/100g sausos žaliavos), o sausoje žaliavoje buvo dvigubai didesnis chlorofilo *b* kiekis (53,21 mg/100g sausos žaliavos). MS maitinamosios terpės lapų kaliaus ekstraktuose nustatyta chlorofilo koncentracija (127,09 mg/100g sausos žaliavos) įrodo, jog terpė yra palankiausia pigmentų sintezei. Šaknų kaliaus B<sub>5</sub> terpės ekstraktuose fiksuojame didesnę chlorofilo *b* koncentraciją (8,11 mg/100g sausos žaliavos) nei chlorofilo *a*.



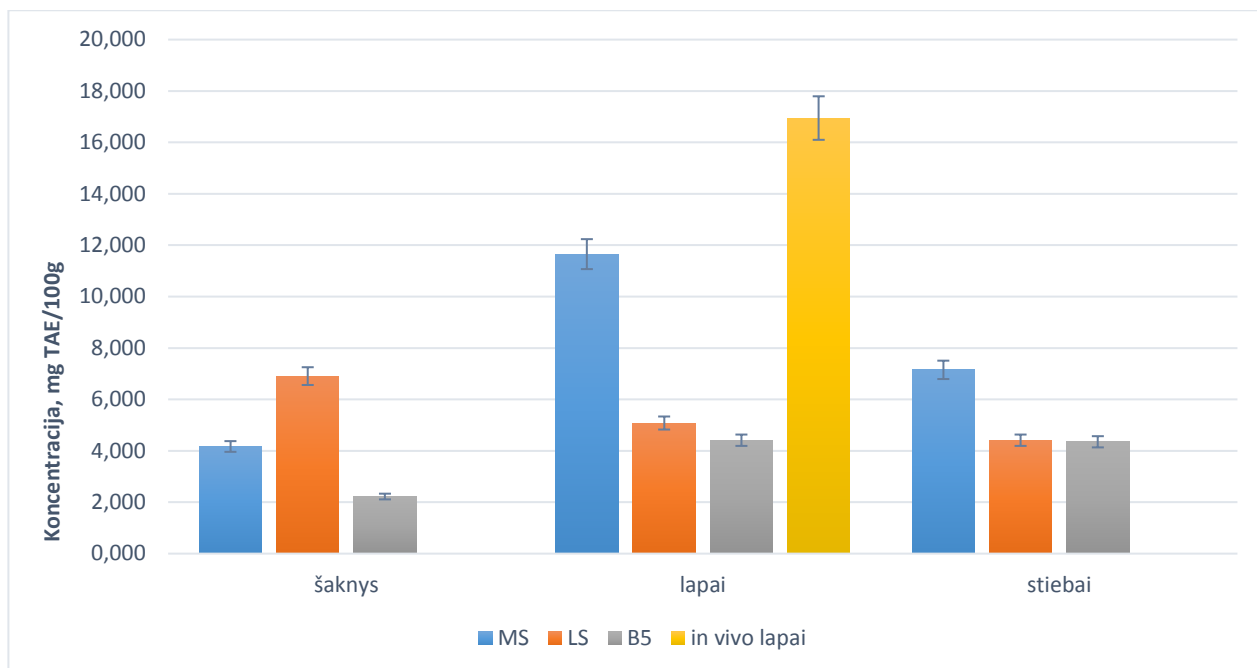
**3.10 pav.** Karotinoidų koncentracija *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN ≤ 5 %

Karotinoidai yra šviesos energiją absorbuojantys junginiai, tačiau, taip pat jie atlieka nefotocheminį gesinimą, t. y., apsaugo augalą nuo perteklinės saulės energijos, ją išsklaidydami kaip šilumą. Karotinoidų koncentracijos grafike (žr. 3.10 pav.) pastebime, jog MS maitinamojoje terpėje augintų lapų kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose taip pat rasta didžiausia koncentracija karotinoidų (70,49 mg/100g sausos žaliavos). Augalo *in vivo* lapuose rasta 16,81 mg karotinoidų/100g sausos žaliavos, nedžiovintame lapų kaliaus *in vitro* šių pigmentų koncentracija buvo 25,63 mg/100g žaliavos, o tame pačiame, tik džiovintame, lapų kaliaus *in vitro* ekstraktoje – 26,82 mg karotinoidų/100g sausos žaliavos.

### 3.6. Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas *Folin-Ciocalteu* metodu *C. roseus* žaliavoje

Polifenoliniai junginiai yra atsakingi už augalo antioksidantines savybes, todėl koreliuoja tarpusavyje antioksidantinis aktyvumas su fenolinių junginių koncentracija. Spektrofotometriškai buvo atlikta rausvojo kataranto *in vivo* ir *in vitro* atskirų morfologinių dalių analizė. Iš gautų matavimo rezultatų *Excel* programa buvo išvesti aritmetiniai vidurkiai, apskaičiuoti fenolinių junginių kiekiai 100 gramų sausos žaliavos ir apskaičiuotos ekstraktų paklaidos neviršijo 5 % SSN.

Norint nustatyti bendrą fenolinių junginių koncentraciją *C. roseus* sausoje žaliavoje, buvo pasitelktas tanino rūgšties (TAE) kalibracinės kreivės grafikas bei pritaikoma lygtis, pateikta metodikoje.

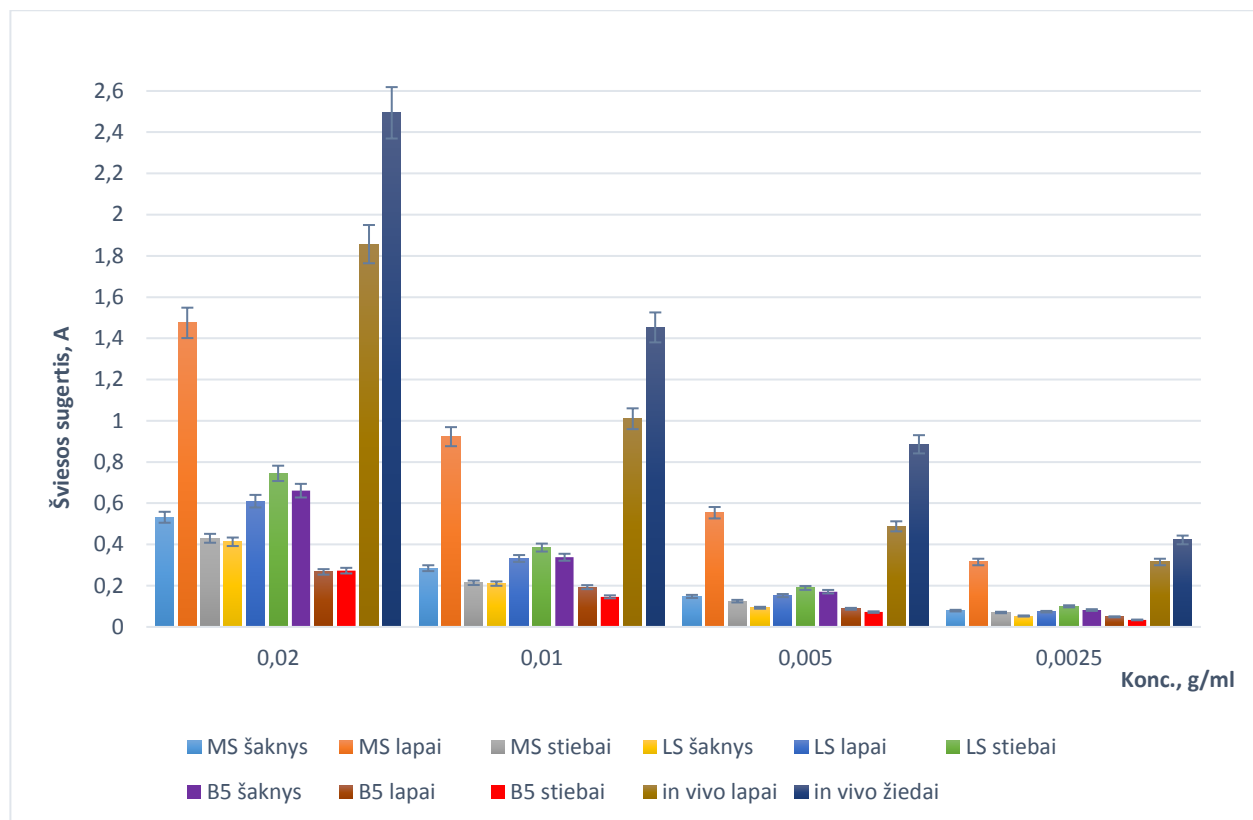


**3.11 pav.** Bendra fenolinių junginių koncentracija *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN  $\leq 5\%$

Ištirus augalą buvo nustatyta (žr. 3.11 pav.), jog fenolinių junginių sintezė aktyviausiai vyksta augalo *in vivo* lapuose, nes, lyginant su kitais tiriamaisiais, buvo rastas didžiausias kiekis tirpiklyje ištirpusių fenolinių junginių – 16,947 mg TAE/100 g sausos žaliavos. Lyginant kaliaus *in vitro* ekstraktus, didžiausias kiekis ištirpusių polifenolinių junginių nustatytas lapų kaliaus *in vitro* acetoniniame ekstrakte – 11,653 mg/100 g sausos žaliavos. B<sub>5</sub> terpėje augęs kaliaus *in vitro* susintetino mažiausią kiekį polifenolinių junginių. Lyginant šaknų kaliaus *in vitro* ekstraktus, didžiausias kiekis ištirpusių polifenolinių junginių nustatytas kaliaus augusio LS mitybinėje terpėje – 6,907 mg/100 g sausos žaliavos. Antioksidantinio aktyvumo tyrimų rezultatai priklausys nuo fenolinių junginių kiekio ekstraktuose, nes jie stabilizuoja laisvuosius radikalus – kuo didesnis fenolinių junginių kiekis augaluose, tuo pasireiškia aktyvesnės antioksidantinės savybės.

### 3.7. Redukcinių (antioksidantinių) savybių įvertinimas *C. roseus* žaliavoje

Norint nustatyti augale esančias antioksidantines savybes buvo pritaikyti skirtingi metodai, siekiant nustatyti tikslesnį antioksidantų, esančių ekstraktuose, aktyvumą. Šiuo atveju buvo pasirinktas indų mokslininko taikytas [66] metodas, kuriuo buvo vertinama ekstrakto skirtingų koncentracijų tirpalų šviesos sugertis, tam kad nustatyti šviesos sugerties priklausomybę nuo koncentracijos.

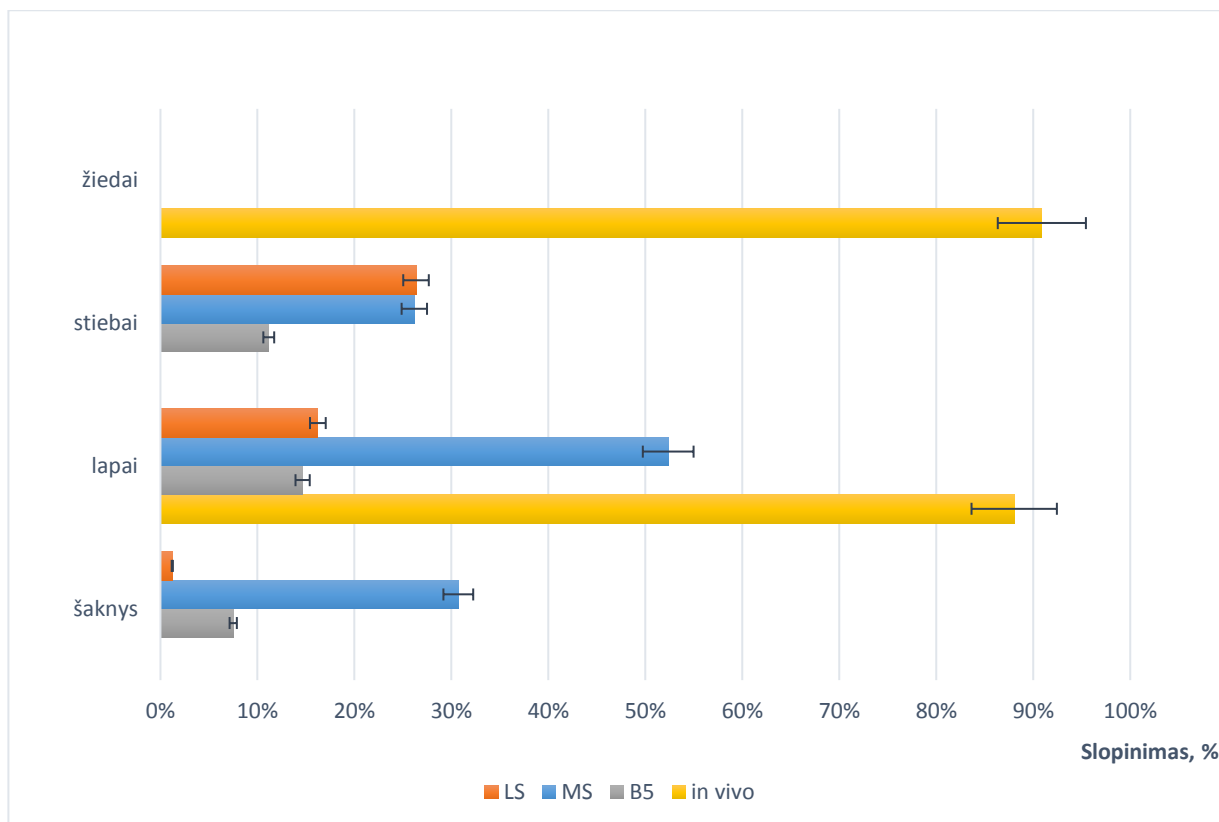


**3.12 pav.** Redukcinių savybių įvertinimas *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN ≤ 5 %

Iš rezultatų (žr. 3.12 pav.) matyti, kad esant didesnei *C. roseus* ekstrakto (augalo veikliųjų junginių) koncentracijai, šviesos sugertis taip pat bus proporcingai didesnė, t. y., bendras grafiko vaizdas nesiskiria prie skirtingos ekstraktų skiedinių koncentracijos. Vertinant 0,02 g/ml koncentracijos grafiką, ryškiausias antioksidantų aktyvumas yra pastebimas natūralioje aplinkoje auginto augalo *in vivo* ekstraktuose, tiek žieduose (2,494 A), tiek ir lapuose (1,857 A). Kaliaus *in vitro* aktyviausi antioksidantai buvo užfiksuoti MS maitinamojoje terpėje auginto lapų kaliaus metanoliniuose ekstraktuose (1,475 A). Šaknų kaliui augti, kaip ir baltymų koncentracijos nustatyme, tinkamiausia yra B<sub>5</sub> maitinamoji terpė (0,661 A), o LS maitinamoji terpė yra rekomenduojama stiebų kaliui auginti, vertinant tyrimo rezultatus pagal šį metodą. Tačiau galima teigti, jog B<sub>5</sub> maitinamoji terpė nėra tinkamas pasirinkimas stiebų ir lapų kaliui auginti.

### 3.8. Antioksidantinių savybių *C. roseus* žaliavoje įvertinimas. DPPH metodas

Kitu, DPPH metodu atliekant tyrimus buvo pasirinkta vienos koncentracijos *C. roseus* ekstraktai. Šiuo metodu buvo tirtas DPPH radikalo slopinimas, kuomet ekstrakto esantys fenoliniai junginiai atiduoda vandenilio joną ir DPPH radikalas yra stabilizuojamas. Buvo pasiruoštas palyginamasis (violetinės spalvos tirpalas, kai DPPH radikalas yra nestabilus) tirpalas, kurio šviesos sugertis skaitine verte yra didžiausias, o ekstraktai laikui bėgant blukina DPPH tirpalo spalvą (t. y., kuo labiau augalo ekstrakto antioksidantinis poveikis tirpalui yra didesnis, tuo labiau tirpalo spalva yra gelsvesnė).



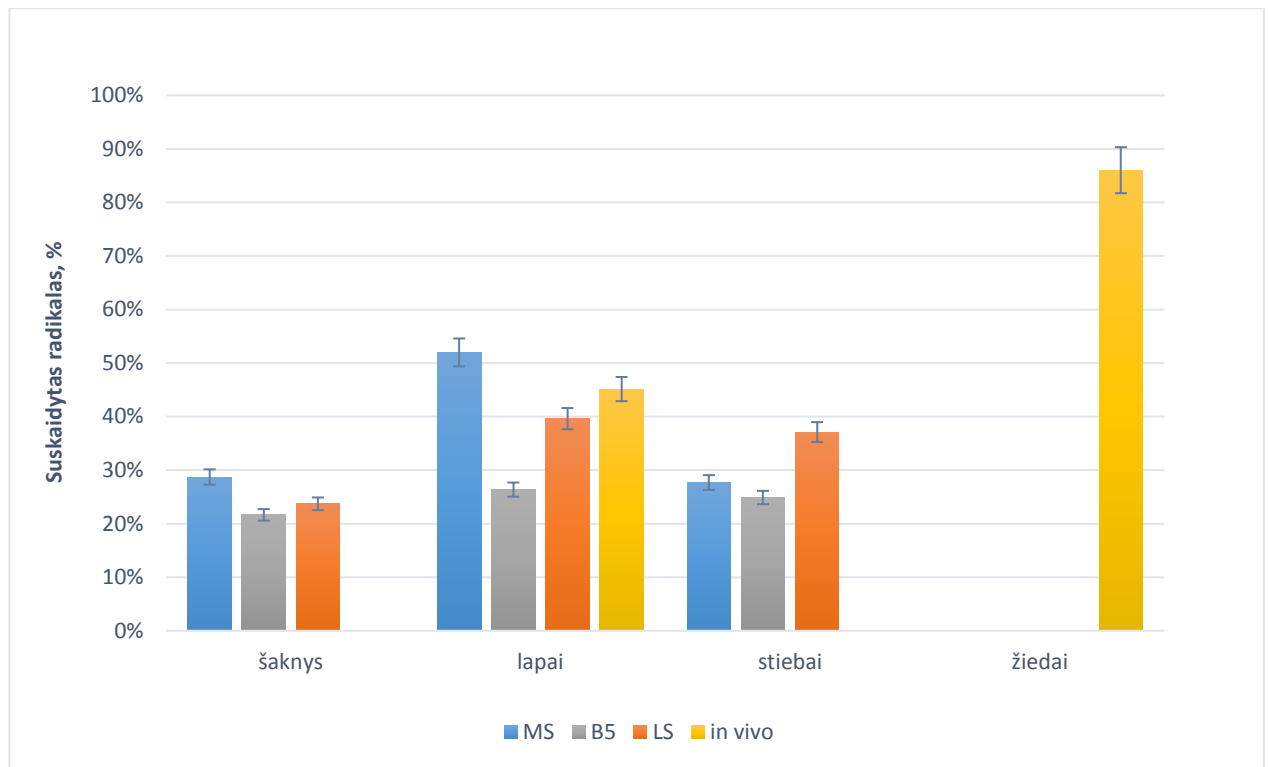
**3.13 pav.** Antioksidantinis ekstraktų aktyvumas DPPH metodu *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN ≤ 5 %

Buvo pastebėta ta pati tendencija (žr. 3.13 pav.) kaip ir 3.7 poskyryje naudotame metode. *C. roseus* augintas *in vivo* rodo didesnę antioksidantinę aktyvumą, nei kalius *in vitro*. Šiame metodo rezultatuose yra mažesnis skirtumas tarp *in vivo* lapų ir žiedų. Augalo *in vivo* žiedai pasižymėjo aktyviausiomis antioksidantinėmis savybėmis, net 90,88 % nuslopino DPPH radikalą, o *in vivo* lapai pasižymėjo šiek tiek mažesniu, 88,03 %, radikalo aktyvumo slopinimu. *C. roseus* auginto laboratorinėmis sąlygomis (*in vitro*) stipriausiu antioksidantiniu aktyvumu pasižymėjo MS terpėje auginto kaliaus ekstraktai – lapai pasiekė 52,36 %, šaknys – 30,72 %, o stiebai – 26,18 % radikalo slopinimą. Šiame metode (B<sub>5</sub>) šaknų kalius nepasižymėjo, tokiu aukštu antioksidantiniu aktyvumu (7,50 %), tačiau LS maitinamoji terpė, vėl gi, yra rekomenduojama stiebų kaliui auginti (26,35 % radikalo slopinimas).

### 3.9. Antioksidantinių savybių *C. roseus* žaliavoje įvertinimas. ABTS metodas

ABTS metode, kaip ir DPPH metode, yra apskaičiuojamas procentinis radikalo slopinimas *C. roseus* ekstraktų bandiniuose. Inkubuojant tamsoje ABTS radikalą su kalio persulfatu, jis redukuojamas į nestabilią formą (ABTS<sup>•+</sup>) – tirpalas nusidažo žalsvai, o su ekstrakto esančiais antioksidantais (t. y., fenoliniais junginiais) laisvasis radikalas yra surišamas (t. y., stabilizuojamas).



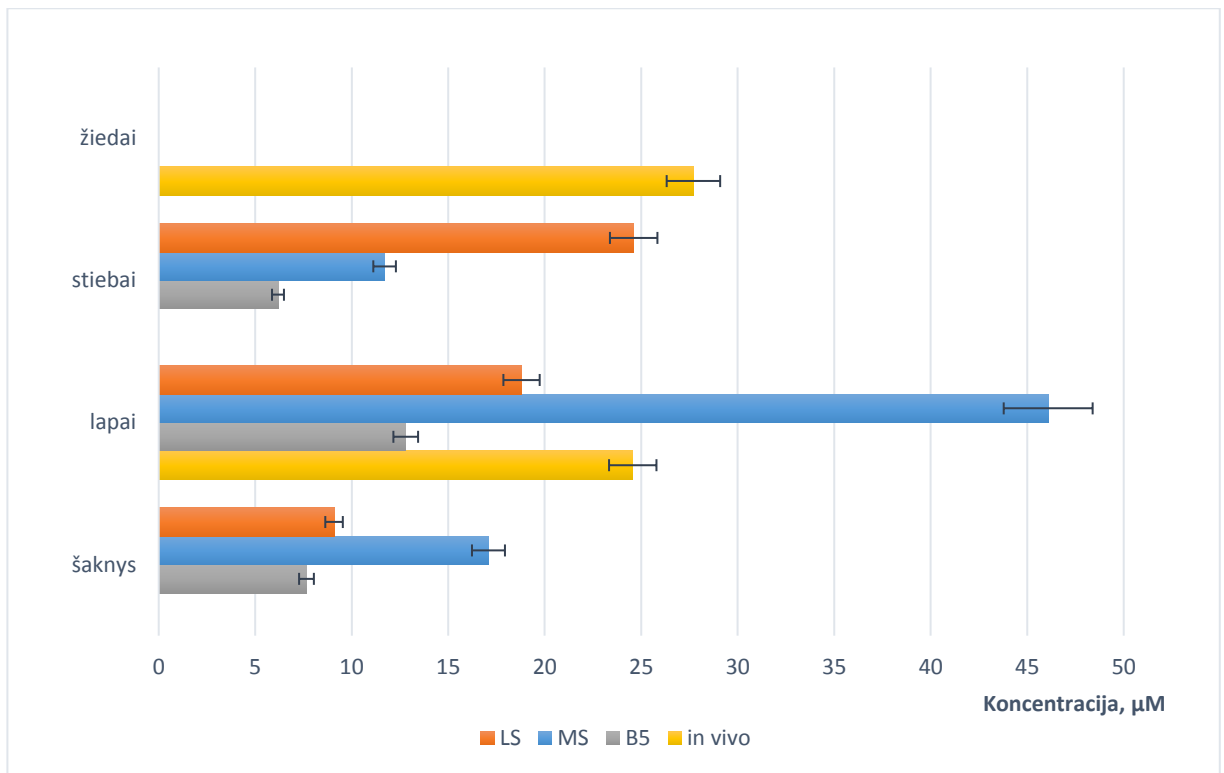


**3.14 pav.** Antioksidantinis ekstraktų aktyvumas ABTS metodu *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN ≤ 5 %

Tyrimo rezultatai (žr. 3.14 pav.) parodė, kad intensyviausias antioksidantinis aktyvumas ABTS metodu stebimas augalo *in vivo* žiedų ekstraktuose (86,02 %). Lapų kaliaus *in vitro* ekstraktuose aktyvumas didžiausias pastebėtas auginant MS maitinamojoje terpėje (51,99 %), stiebų kaliaus daugiausiai antioksidantinių savybių turėjo auginant LS maitinamojoje terpėje (37,11 %), o šaknų kaliaus turėjo aktyviausias antioksidantines savybes auginant MS maitinamojoje terpėje (28,72 %). Šiuo atveju, B<sub>5</sub> maitinamojoje terpėje auginamas kaliaus turėjo mažesnes redukcines savybes, nei MS ar LS maitinamojoje terpėje auginamas kaliaus.

### 3.10. Antioksidantinių savybių *C. roseus* žaliavoje įvertinimas. FRAP metodas

FRAP metodas yra pagrįstas Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) redukcija į Fe<sup>2+</sup>-TPTZ. Vizualiai tai yra matoma bespalvio tirpalo nusidažymu mėlyna spalva. Antioksidantais (ekstraktuose esančiais polifenoliniais junginiais) yra siekiama redukuoti Fe(III) jonus. Spektrofotometriškai 593 nm bangos ilgyje yra patikrinama po redukcijos gautos Fe(II) koncentracija esanti bandiniuose. Norint nustatyti *C. roseus* ekstraktų antioksidantinį aktyvumą, reikia papildomai paruošti FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (5–25 μmol/l) kalibracinę kreivę ir iš jos apskaičiuoti Fe(II) koncentraciją (μM) bandiniuose.

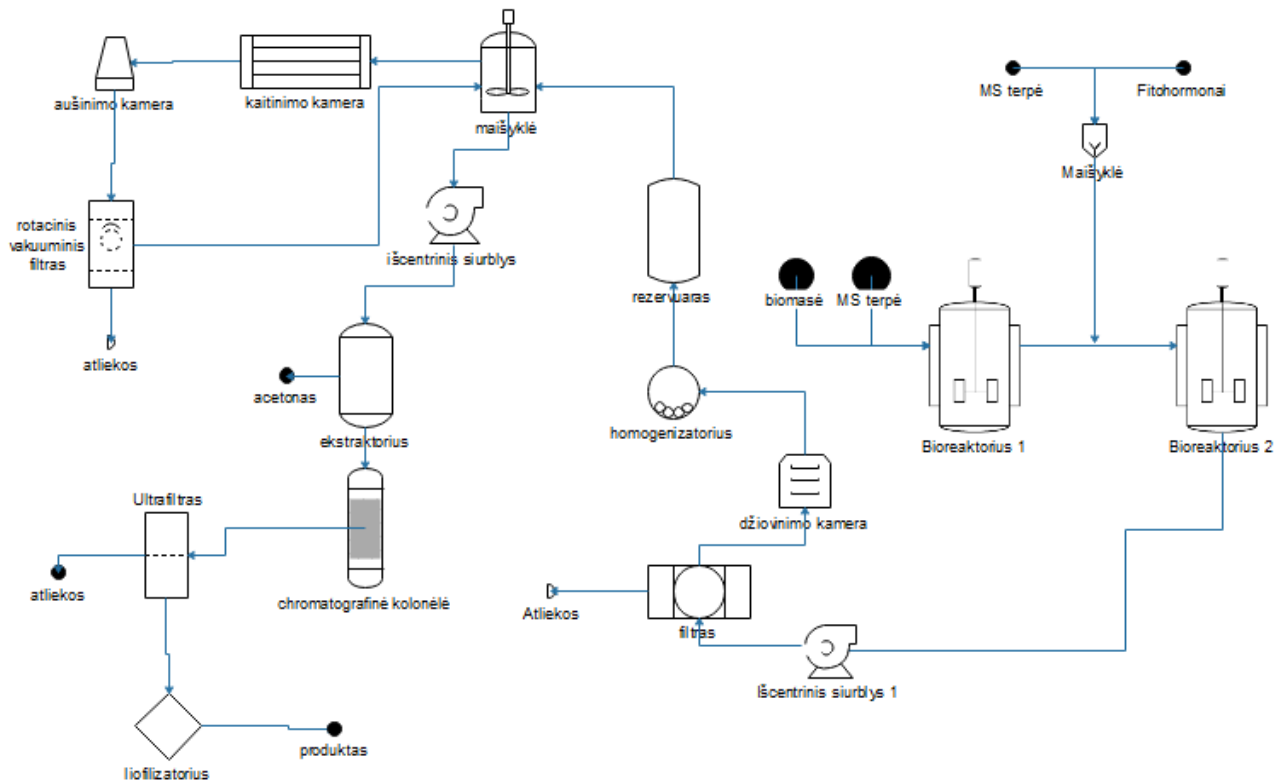


**3.15 pav.** Antioksidantinis ekstraktų aktyvumas FRAP metodu *C. roseus* kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktuose, SSN ≤ 5 %

Tyrimas (žr. 3.15 pav.) parodė, kad stipriausiu trivalentės geležies jonų redukavimu pasižymi MS maitinamojoje terpėje augintas lapų kalius (46,086 μM). Šaknų kaliaus stipriausios antioksidantinės savybės pasireiškia taip pat kaliui auginti renkantis MS maitinamąją terpę, net 17,086 μM trivalentės geležies buvo redukuota į divalentę formą. Natūraliomis sąlygomis (*in vivo*) auginto augalo žiedų metanoliniai ekstraktai redukavo 27,705 μM trivalentės geležies, kuomet lapai – 24,562 μM. LS terpėje augintų augalų ekstraktai taip pat pasižymėjo didesnėmis redukciniomis savybėmis – stiebų kalius *in vitro* susintetino didžiausią kiekį antioksidantų (24,610 μM), tačiau geromis redukciniomis savybėmis pasižymėjo ir lapų kalius (18,800 μM), augintas šioje terpėje. Kalbant apie B<sub>5</sub> maitinamojoje terpėje auginto kaliaus ekstraktus, savo redukciniomis savybėmis neprilygo kitose terpėse augintiems ekstraktams, geriausiu atveju lapų kalius suredukavo 12,800 μM Fe<sup>3+</sup> jonų.

#### 4. Rekomendacijų dalis

Vinblastino ir vinkristino išskyrimas iš rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* (žr. 4.1 pav.).



4.1 pav. Vinkristino ir vinblastino išskyrimo aparatinė schema iš rausvojo kataranto kaliaus kultūrų

Iš pradžių pirmajame bioreaktoriuje yra pasodinami rausvojo kataranto *in vivo* eksplantai (pvz., lapai, stiebai, šaknys) su MS maitinamąja terpė. Tada susidariusios kaliaus kultūros yra perkeliama į antrąjį bioreaktorių ir paveikiamos fitohormonais. Užaugintos rausvojo kataranto kaliaus kultūros su išcentrinium siurbliu praleidžiamos pro filtrą (atliekos atskiriamos) ir džiovinamos džiovinimo kameroje. Gauta sausa augalų biomasa yra sumulkinama homogenizatoriuje ir laikoma rezervuare. Sukaupus pakankamai medžiagos, homogenizuotos rausvojo kataranto kaliaus kultūros yra perkeliama į maišyklę, kurioje sausa žaliava yra sumaišoma su acetonu ir HCl tirpalu (santykiu 10:1). Tada mišinys perduodamas į kaitinamąją kamerą ir gautas tirpalas atvėsina aušinimo kameroje. Rotaciniame vakuuminiam filtre išgrynintinos kaliaus kultūros yra gražinamos į maišyklę, kurioje nuosėdos vėl praplaunamos acetonu. Tada išcentrinium siurbliu filtratai yra perduodami į ekstraktorių, kuriame acetono tirpalas yra ekstrahuojamas acto rūgšties etilo esteriu. Surinkta viršutinė fazė yra tiekama į chromatografinę kolonėlę ir joje išvalytas tirpalas išcentrinium siurbliu tiekiamas į ultrafiltrą. Išvalytas tirpalas liofilizatoriuje yra džiovinamas šaltoje temperatūroje ir gautas sausas produktas gali būti naudojamas pramoniniams tikslams.

## Išvados

1. Intensyviausiai rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus* L.) kaliaus kultūras *in vitro* suformavo augalo lapai. Didžiausias rausvojo kataranto kaliaus kultūros vidutinis prieaugis buvo nustatytas *Murashige&Skoog* (MS) terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l).
2. Didžiausiu antioksidantinių fermentų (didžiausia vertė prolino dehidrogenazės – 11,34 (μmol NAD/mg baltymo x min) ir superoksido dismutazės – 1,305 vnt/mg) aktyvumu pasižymėjo rausvojo kataranto kaliaus kultūros, augusios *Murashige&Skoog* terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l).
3. Didžiausią baltymų koncentraciją (11,81 mg/100 g) sukaupė rausvojo kataranto kaliaus kultūros, augusios *Gamborg* (B<sub>5</sub>) terpėje su 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l). Didžiausia *L*-prolino koncentracija (1567,32 μmol/g) buvo nustatyta rausvame katarante *in vivo*. Daugiausiai chlorofilo *a* (213,71 mg/100 g) ir *b* (127,09 mg/100 g) bei karotinoidų (70,49 mg/100 g) sukaupė rausvojo kataranto kaliaus kultūros, augusios *Murashige&Skoog* terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l). Didžiausią fenolinių junginių koncentraciją (16,947 mg/100 g) sukaupė rausvasis katarantas *in vivo*, o didžiausią fenolinių junginių koncentraciją (11,653 mg/100 g) susintetino rausvojo kataranto kaliaus kultūros, augusios *Murashige&Skoog* terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l).
4. Tiriant rausvojo kataranto antioksidantines savybes 4 metodais (t. y., FRAP, DPPH, ABTS ir redukciniu) nustatyta, kad aktyviausiomis antioksidantinėmis savybėmis pasižymėjo tiriamojo augalo *in vivo* žiedai. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu taip pat pasižymėjo kaliaus kultūros, augusios MS terpėje su 1-naftilacto rūgštimi (1 mg/l) ir kinetinu (0,1 mg/l).
5. Pasiūlyta vinkristino ir vinblastino išskyrimo aparatūrinė schema, pagal kurią rekomenduojama išskirti alkaloidus iš rausvojo kataranto kaliaus kultūrų *in vitro*.

## Literatūros sąrašas

1. DEGUCHI, A., F. TATSUZAWA, K. MIYOSHI. A blackish-flowered cultivar of *Catharanthus roseus* accumulates high concentrations of a novel anthocyanin with a unique feature of aggregation in weak acid solutions. *Dyes and Pigments* [interaktyvus]. 2020, vol. 173, no. August 2019, p. 108001. ISSN:18733743. Prieiga per: doi:10.1016/j.dyepig.2019.108001
2. VERMA, A.K., R.R. SINGH, S. SINGH. Improved alkaloid content in callus culture of *Catharanthus roseus*. *Botanica Serbica*. 2012, vol. 36, no. 2, p. 123–130. ISSN:1821-2158.
3. ŠVEISTYTĖ, L. *Vaistinių ir aromatinių augalų genetiniai ištekliai*. [s.l.]: Lietuvos Respublikos aplinkos ministerija: Augalų genų bankas, 2011, 5 p. ISBN 9789955637776.
4. RAMANAUSKAS, A., I. JONUŠKIENĖ. EVALUATION OF SECONDARY METABOLITES VARIATION IN MEDICINAL PLANTS AND OPTIMIZATION OF SAGE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) GROWTH IN VITRO. *Chemical Technology* [interaktyvus]. 2014, vol. 2, no. 64, p. 28–34. ISSN:1392-1231. Prieiga per: doi:10.5755/j01.ct.64.2.6021
5. RAMACHANDRA RAO, S., G. RAVISHANKAR. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* [interaktyvus]. 2002, vol. 20, no. 2, p. 101–153. ISSN:07349750. Prieiga per: doi:10.1016/S0734-9750(02)00007-1
6. BENNETT, R.N., R.M. WALLSGROVE. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* [interaktyvus]. 1994, vol. 127, no. 4, p. 617–633. ISSN:0028-646X. Prieiga per: doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x
7. GAN, R.-Y., C.-L. CHAN, Q.-Q. YANG, H.-B. LI, D. ZHANG, Y.-Y. GE, A. GUNARATNE, J. GE, H. CORKE. Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. *Sprouted Grains* [interaktyvus]. [s.l.]: AACC International Press, 2019, p. 191–246. [žiūrėta 2020-05-03]. ISBN 9780128115251 Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-811525-1.00009-9
8. STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* [interaktyvus]. 2007, vol. 30, no. 18, p. 3268–3295. ISSN:16159306. Prieiga per: doi:10.1002/jssc.200700261
9. MUSTAFA, N.R., R. VERPOORTE. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews* [interaktyvus]. 2007, vol. 6, no. 2–3, p. 243–258. ISSN:1568-7767. Prieiga per: doi:10.1007/s11101-006-9039-8
10. NISAR, A., A.S. MAMAT, M.I. HATIM, M.S. ASLAM, M.S. AHMAD. Antioxidant and Total Phenolic Content of *Catharanthus roseus* Using Deep Eutectic Solvent. *Recent Advances in Biology and Medicine* [interaktyvus]. 2017, vol. 3, p. 7–10. ISSN:2378-654X. Prieiga per: doi:10.18639/RABM.2017.03.355635
11. PANCHE, A.N., A.D. DIWAN, S.R. CHANDRA. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science* [interaktyvus]. 2016, vol. 5, no. 47, p. e47. ISSN:2048-6790. Prieiga per: doi:10.1017/jns.2016.41
12. DOYLE, S., E. OZAKI, M. CAMPBELL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *Journal of Inflammation Research* [interaktyvus]. 2015, vol. 8, p. 15. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:1178-7031. Prieiga per: doi:10.2147/JIR.S51250
13. LIU, Y.-J., J. ZHAN, X.-L. LIU, Y. WANG, J. JI, Q.-Q. HE. Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Nutrition* [interaktyvus]. 2014, vol. 33, no. 1, p. 59–63. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:02615614. Prieiga per: doi:10.1016/j.clnu.2013.03.011

14. HWANG, S.-L., P.-H. SHIH, G.-C. YEN. Citrus Flavonoids and Effects in Dementia and Age-Related Cognitive Decline. *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline* [interaktyvus]. [s.l.]: Elsevier, 2015, p. 869–878. [žiūrėta 2020-05-03]. ISBN 9780124079397 Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-407824-6.00080-X
15. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2004, vol. 94, no. 3, p. 223–253. ISSN:01681605. Prieiga per: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
16. KUMAR, R., Y.C. TRIPATHI. Getting fragrance from plants. *Training Manual on Extraction Technology of Natural Dyes & Aroma Therapy and Cultivation Value Addition of Medicinal Plants*. 2011, vol. 1, p. 77–102. Prieiga per: doi:10.13140/2.1.3886.4161
17. KALEMBA, D., A. KUNICKA. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2003, vol. 10, no. 10, p. 813–829. ISSN:09298673. Prieiga per: doi:10.2174/0929867033457719
18. ŠIPAILIENĖ, A., P.R. VENSKUTONIS, A. ŠARKINAS. Mielių atsparumas prieskoninių augalų ekstraktams. *Sodininkystė ir Daržininkystė*. 2005, vol. 24, no. 1, p. 107–117.
19. ZIELIŃSKA, S., A. MATKOWSKI. Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). *Phytochemistry Reviews* [interaktyvus]. 2014, vol. 13, no. 2, p. 391–416. ISSN:1568-7767. Prieiga per: doi:10.1007/s11101-014-9349-1
20. LAWAL, O.A., I.A. OGUNWANDE, A.E. IBIROGBA, O.M. LAYODE, A.R. OPOKU. Chemical Constituents of Essential Oils from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Grown in Nigeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* [interaktyvus]. 2015, vol. 18, no. 1, p. 57–63. ISSN:0972-060X. Prieiga per: doi:10.1080/0972060X.2014.998720
21. DAS, S., A.B. SHARANGI. Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.): Diverse medicinal and therapeutic benefits to humankind. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* [interaktyvus]. 2017, vol. 6, no. 5, p. 1695–1701. ISSN:2349-8234.
22. GAJALAKSHMI, S., S. VIJAYALAKSHI, D. RAJESWARI V. Pharmacological Activities of *Catharanthus roseus*: A Perspective Review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2013, vol. 4, no. 2, p. 431–439. ISSN:0975-6299.
23. WANSI, J.D., K.P. DEVKOTA, E. TSHIKALANGE, V. KUETE. Alkaloids from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa* [interaktyvus]. [s.l.]: Elsevier, 2013, p. 557–605. ISBN 9780124059276 Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-405927-6.00014-X
24. KUKULA-KOCH, W.A., J. WIDELSKI. Alkaloids. *Pharmacognosy* [interaktyvus]. [s.l.]: Elsevier, 2017, p. 163–198. ISBN 9780128021040 Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00009-3
25. KUREK, J. Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life. *Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life* [interaktyvus]. [s.l.]: IntechOpen, 2019, p. 13. Prieiga per: doi:10.5772/intechopen.85400
26. FUNAYAMA, S., G.A. CORDELL. Introduction. *Alkaloids* [interaktyvus]. [s.l.]: Elsevier, 2015, p. 1–20. ISBN 978-0-12-417302-6 Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-417302-6.00017-9
27. SVENDSEN, A., R. VERPOORTE. Book Review: Chromatography of Alkaloids. Part A: Thin-Layer Chromatography. *Journal of Natural Products* [interaktyvus]. 1984, vol. 47, no. 6, p. 1069–1069. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:0163-3864. Prieiga per: doi:10.1021/np50036a048
28. ANISZEWSKI, T. Alkaloid chemistry. *Alkaloids* [interaktyvus]. 2. Ed. [s.l.]: Elsevier, 2015, p. 99–193. ISBN 978-0-444-59433-4 Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-444-59433-4.00002-X

29. LINNÉ, C. VON. Biological Significance of Alkaloids. *Alkaloids - Secrets of Life* [interaktyvus]. [s.l.]: Elsevier, 2007, p. 141–180. ISBN 9780444527363 Prieiga per: doi:10.1016/B978-044452736-3/50005-2
30. FAVRETTO, D., A. PIOVAN, R. FILIPPINI, R. CANIATO. Monitoring the production yields of vincristine and vinblastine in *Catharanthus roseus* from somatic embryogenesis. Semiquantitative determination by flow-injection electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [interaktyvus]. 2001, vol. 15, no. 5, p. 364–369. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:0951-4198. Prieiga per: doi:10.1002/rcm.239
31. ISHIKAWA, H., D.A. COLBY, D.L. BOGER. Direct Coupling of Catharanthine and Vindoline to Provide Vinblastine: Total Synthesis of (+)- and ent (-)-Vinblastine. *Journal of the American Chemical Society* [interaktyvus]. 2008, vol. 130, no. 2, p. 420–421. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:0002-7863. Prieiga per: doi:10.1021/ja078192m
32. STARLING, D. Two ultrastructurally distinct tubulin paracrystals induced in sea-urchin eggs by vinblastine sulphate. *Journal of cell science* [interaktyvus]. 1976, vol. 20, no. 1, p. 79–89. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:0021-9533.
33. GOBBI, P.G., C. BROGLIA, F. MERLI, M. DELL'OLIO, C. STELITANO, E. IANNITTO, M. FEDERICO, R. BERTÈ, D. LUISI, S. MOLICA, C. CAVALLI, L. DEZZA, E. ASCARI. Vinblastine, bleomycin, and methotrexate chemotherapy plus irradiation for patients with early-stage, favorable Hodgkin lymphoma. *Cancer* [interaktyvus]. 2003, vol. 98, no. 11, p. 2393–2401. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:0008543X. Prieiga per: doi:10.1002/cncr.11807
34. JORDAN, M. Mechanism of Action of Antitumor Drugs that Interact with Microtubules and Tubulin. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* [interaktyvus]. 2012, vol. 2, no. 1, p. 1–17. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:15680118. Prieiga per: doi:10.2174/1568011023354290
35. ISHIKAWA, H., D.A. COLBY, S. SETO, P. VA, A. TAM, H. KAKEI, T.J. RAYL, I. HWANG, D.L. BOGER. Total Synthesis of Vinblastine, Vincristine, Related Natural Products, and Key Structural Analogues. *Journal of the American Chemical Society* [interaktyvus]. 2009, vol. 131, no. 13, p. 4904–4916. ISSN:0002-7863. Prieiga per: doi:10.1021/ja809842b
36. KUETE, V. Health Effects of Alkaloids from African Medicinal Plants. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* [interaktyvus]. [s.l.]: Elsevier, 2014, p. 611–633. ISBN 9780128004753 Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-800018-2.00021-2
37. JACOBS, D.I., W. SNOEIJER, D. HALLARD, R. VERPOORTE, OTHERS. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current medicinal chemistry*. 2004, vol. 11, no. 5, p. 607–628.
38. LIU, J., Y. LIU, Y. PAN, Y.-G. ZU, Z.-H. TANG. Determination of Alkaloids in *Catharanthus roseus* and *Vinca minor* by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Letters* [interaktyvus]. 2016, vol. 49, no. 8, p. 1143–1153. ISSN:0003-2719. Prieiga per: doi:10.1080/00032719.2015.1094664
39. CHEN, Q., W. ZHANG, Y. ZHANG, J. CHEN, Z. CHEN. Identification and quantification of active alkaloids in *Catharanthus roseus* by liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2013, vol. 139, no. 1–4, p. 845–852. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:03088146. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.088
40. WESOŁOWSKA, A., M. GRZESZCZUK, J. WILAS, D. KULPA. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) Analysis of Indole Alkaloids Isolated from *Catharanthus roseus*(L.) G. Don Cultivated Conventionally and Derived from In vitro Cultures. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*

- Cluj-Napoca* [interaktyvus]. 2016, vol. 44, no. 1, p. 100–106. ISSN:1842-4309. Prieiga per: doi:10.15835/nbha44110127
41. KUBOYAMA, T., S. YOKOSHIMA, H. TOKUYAMA, T. FUKUYAMA. Stereocontrolled total synthesis of (+)-vincristine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [interaktyvus]. 2004, vol. 101, no. 33, p. 11966–11970. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:0027-8424. Prieiga per: doi:10.1073/pnas.0401323101
42. KUEHNE, M.E., P.A. MATSON, W.G. BORNMANN. Enantioselective syntheses of vinblastine, leurosidine, vincovaline and 20'-epi-vincovaline. *The Journal of Organic Chemistry* [interaktyvus]. 1991, vol. 56, no. 2, p. 513–528. [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN:0022-3263. Prieiga per: doi:10.1021/jo00002a008
43. ANISZEWSKI, T. From iodine to enzyme: a critical review of chemical and biological methods of lupine alkaloid analysis. *Sci Legum* [interaktyvus]. 1994, vol. 1, p. 25–36. [žiūrėta 2020-05-04].
44. ANISZEWSKI, T., D. CIESIOŁKA, K. GULEWICZ. Equilibrium between basic nitrogen compounds in lupin seeds with differentiated alkaloid content. *Phytochemistry* [interaktyvus]. 2001, vol. 57, no. 1, p. 43–50. [žiūrėta 2020-05-04]. ISSN:00319422. Prieiga per: doi:10.1016/S0031-9422(00)00498-2
45. HE, X.H., M. WU, S.Y. LI, Y.Z. CHU, J. CHEN, L.Y. LIU. Chemical modification of tryptophan residues in superoxide dismutase from camellia pollen and its fluorescence spectrum. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2005, vol. 21, no. 5, p. 562–565. ISSN:10059040.
46. KABEL, A.M. Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*. 2014, vol. 2, no. 3, p. 35–38. Prieiga per: doi:10.12691/jnh-2-3-2
47. LOBO, V., A. PATIL, A. PHATAK, N. CHANDRA. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. 2010, vol. 4, no. 8, p. 118. ISSN:0973-7847. Prieiga per: doi:10.4103/0973-7847.70902
48. ABID, A.L., A.G. SHAIQ, A.A. RAYEES, A.B. HILAL, A.B. TAUSEEF, A.W. IMTIYAZ. Free radicals and antioxidants: Myths, facts and mysteries. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* [interaktyvus]. 2013, vol. 7, no. 3, p. 91–113. ISSN:1996-0840. Prieiga per: doi:10.5897/AJPAC12.074
49. STEWARD, F.C., M.O. MAPES, K. MEARS. GROWTH AND ORGANIZED DEVELOPMENT OF CULTURED CELLS. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cell. *American Journal of Botany* [interaktyvus]. 1958, vol. 45, no. 10, p. 705–708. [žiūrėta 2020-05-31]. ISSN:00029122. Prieiga per: doi:10.1002/j.1537-2197.1958.tb10599.x
50. BOURGAUD, F., A. GRAVOT, S. MILESI, E. GONTIER. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* [interaktyvus]. 2001, vol. 161, no. 5, p. 839–851. [žiūrėta 2020-05-31]. ISSN:01689452. Prieiga per: doi:10.1016/S0168-9452(01)00490-3
51. RS, N. Fast In-Vitro Callus Induction in *Catharanthus roseus* - A Medicinally Important Plant Used in Cancer Therapy. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2011, vol. 2, no. 4, p. 597–603. ISSN:0975-8585.
52. RAMIREZ-ESTRADA, K., H. VIDAL-LIMON, D. HIDALGO, E. MOYANO, M. GOLENIOSWKI, R. CUSIDÓ, J. PALAZON. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules* [interaktyvus]. 2016, vol. 21, no. 2, p. 182. ISSN:1420-3049. Prieiga per: doi:10.3390/molecules21020182
53. VEERABATHINI, S., S. SARANG, S. SHALINI, P. DEEPA SANKAR. Standardization of



- friable callus development in *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015, vol. 7, no. 3, p. 111–113. ISSN:09751491.
54. ZULKEPLI, A.Z., A.A. SAMAD. Optimization of Sterilization Method and Shoot Induction of *Catharanthus roseus* Explants. *Proceedings of the Annual International Conference on BioInformatics and Computational Biology & Proceedings of the Annual International Conference on Advances in Biotechnology*. [s.l.]: Global Science and Technology Forum, 2011, Prieiga per: doi:10.5176/978-981-08-8119-1\_Biotech22
55. VANDANA, S., K. ASHWINI, K. ARUN, K. SUMIT. An efficient in vitro propagation protocol for *Catharanthus roseus* (L.). *Research Journal of Biotechnology*. 2020, vol. 15, no. 1, p. 82–87. ISSN:22784535.
56. MURANAKA, T., K. SAITO. Production of pharmaceuticals by plant tissue cultures. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. [s.l.]: Elsevier Ltd, 2010, p. 615–628. ISBN 9780080453828 Prieiga per: doi:10.1016/b978-008045382-8.00065-4
57. RASHMI, R. Rapid In-Vitro Regeneration of an Important Medicinal and an Ornamental Plant (*Catharanthus roseus* L). *Biochemistry & Analytical Biochemistry* [interaktyvus]. 2015, vol. 4, no. 4, p. 1–6. ISSN:2161-1009. Prieiga per: doi:10.4172/2161-1009.1000227
58. KALIDASS, C., V.R. MOHAN, A. DANIEL. Effect of Auxin and Cytokinin on Vincristine Production by Callus Cultures of *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2010, vol. 12, p. 283–288. ISSN:1870-0462.
59. CSISZÁR, J., E. LANTOS, I. TARI, E. MADOSŰ, B. WODALA, Á. VASHEGYI, F. HORVÁTH, A. PÉCSVÁRADI, M. SZABÓ, B. BARTHA, Á. GALLÉ, A. LAZÁR, G. CORADINI, M. STAICU, S. POSTELNICU, S. MIHACEA, G. NEDELEA, L. ERDEI. Antioxidant enzyme activities in *Allium* species and their cultivars under water stress. *Plant, Soil and Environment*. 2007, vol. 53, no. 12, p. 517–523. ISSN:12141178. Prieiga per: doi:10.17221/2192-pse
60. BRADFORD, 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, vol. 72, no. 1–2, p. 248–254. ISSN:00032697. Prieiga per: doi:10.1006/abio.1976.9999
61. ÁBRAHÁM, E., C. HOURTON-CABASSA, L. ERDEI, L. SZABADOS. Methods for Determination of Proline in Plants. SUNKAR, R. Sud. *Plant Stress Tolerance: Methods in Molecular Biology* [interaktyvus]. [s.l.]: Humana Press, 2010, p. 317–331. ISBN 978-1-60761-702-0 ISSN:1940-6029. Prieiga per: doi:10.1007/978-1-60761-702-0\_20
62. RANGANAYAKULU, G.S., C. SUDHAKAR, S.R. P. Effect of water stress on proline metabolism and leaf relative water content in two high yielding genotypes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting drought tolerance. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2015, vol. 3, no. 1, p. 92–103. ISSN:2320-8694.
63. MALINAUSKAITĖ, R. Šarminio jonizuoto vandens įtaka paprastojo lęšio ‘Smėlinukai’ morfofiziologiniams rodikliams. 2014, vol. 1000, no. 5, p. 1822–1824. ISSN:2345-0215.
64. MAKKAR, H.P., P. SIDDHURAJU, K. BECKER. Methods in molecular biology: Plant Secondary Metabolites. *Totowa: Human Press*. 2007, ISBN 1-58829-993-7
65. FOLIN, O., V. CIOCALTEAU. Tyrosine and tryptophane in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1927, vol. 73, no. 2, p. 627–648. ISSN:0021-9258, 1083-351X.
66. BHAWYA, D., K.R. ANILAKUMAR. Antioxidant, DNA damage protection and antibacterial effect of *Psoralea corylifolia*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2011, vol. 4, no. 2, p. 149–155. ISSN:09742441.

67. WANG, Y.-L., X.-D. WANG, B. ZHAO, Y.-C. WANG. Enhancing antioxidative capacity of *Lepidium meyenii* calli by addition of methyl salicylate to culture medium. *Acta Physiologiae Plantarum* [interaktyvus]. 2007, vol. 29, no. 5, p. 417–423. ISSN:0137-5881. Prieiga per: doi:10.1007/s11738-007-0050-5
68. ESCAMILLA-HURTADO, M.L., S.E. VALDÉS-MARTÍNEZ, J. SORIANO-SANTOS, R. GÓMEZ-PLIEGO, J.R. VERDE-CALVO, A. REYES-DORANTES, A. TOMASINI-CAMPOCOSIO. Effect of culture conditions on production of butter flavor compounds by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* in semisolid maize-based cultures. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2005, vol. 105, no. 3, p. 305–316. ISSN:01681605. Prieiga per: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.014
69. VENKATACHALAM, H., Y. NAYAK, B.S. JAYASHREE. Evaluation of the Antioxidant Activity of Novel Synthetic Chalcones and Flavonols. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* [interaktyvus]. 2012, vol. 3, no. 3, p. 216–219. ISSN:20100221. Prieiga per: doi:10.7763/IJCEA.2012.V3.189
70. HUANG, D., B. OU, R.L. PRIOR. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, vol. 53, no. 6, p. 1841–1856. ISSN:0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf030723c
71. SCRAGG, A.H. Alkaloid Accumulation in *Catharanthus weus* Suspension Cultures. *Plant Cell Culture Protocols* [interaktyvus]. New Jersey: Humana Press, 1999, p. 393–402. ISSN:10643745. Prieiga per: doi:10.1385/1-59259-583-9:393
72. AKHTAR, M.S., M.K. SWAMY. Conserving Biodiversity of a Potent Anticancer Plant, *Catharanthus roseus* Through In Vitro Biotechnological Intercessions: Substantial Progress and Imminent Prospects. AKHTAR, M.S. - SWAMY, M.K. *Sud. Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements* [interaktyvus]. Singapore: Springer Singapore, 2018, p. 83–108. ISBN 978-981-10-8063-0 Prieiga per: doi:10.1007/978-981-10-8064-7
73. SWANBERG, A., W. DAI. Plant Regeneration of Periwinkle (*Catharanthus roseus*) via Organogenesis. *HortScience* [interaktyvus]. 2008, vol. 43, no. 3, p. 832–836. ISSN:0018-5345. Prieiga per: doi:10.21273/HORTSCI.43.3.832
74. Prieiga per: [https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Catharanthus\\_roseus\\_\(Madagascar\\_Periwinkle\).htm](https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Catharanthus_roseus_(Madagascar_Periwinkle).htm) [žiūrėta 2020-04-27]
75. Prieiga per: <https://palangkarayatown.blogspot.com/2016/04/medical-plants-of-kalimantan.html> [žiūrėta 2020-05-04]
76. Prieiga per: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16884> [žiūrėta 2020-05-01]
77. Prieiga per: <https://www.kew.org/blogs/in-the-gardens/catharanthus-roseus-a-cancer-killing-champion-of-the-plant-world> [žiūrėta 2020-03-15]
78. Prieiga per: <https://www.drugs.com/mtm/vinblastine.html> [žiūrėta 2020-04-21]
79. Prieiga per: <https://www.drugs.com/mtm/vincristine.html> [žiūrėta 2020-04-21]

## Priedai

1 priedas. Maitinamųjų terpių sudėtis

**1 lentelė.** Maitinamosios *Murashige & Skoog* (MS) terpės sudėtis

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

**2 lentelė.** Maitinamosios *Linsmaier & Skoog* (LS) terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale, mg/l	Koncentracija terpėje, mg/l
Makroelementai		
CaCl <sub>2</sub>	332,02	2,99
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	1,25
KNO <sub>3</sub>	1900,00	18,79
MgSO <sub>4</sub>	180,54	1,50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	20,61
Mikroelementai		
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,11
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,10
FeNaEDTA	36,70	100,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	100,27
KI	0,83	5,00
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	16,90	100,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	1,03
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,60	29,91
Vitaminai		
mio-inozitolis	100,00	554,94
Tiaminas-HCl	0,40	1,19

**3 lentelė.** Maitinamosios *Gamborg* (B<sub>5</sub>) terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale, mg/l	Koncentracija terpėje, mg/l
Makroelementai		
CaCl <sub>2</sub>	113,23	1,02
KNO <sub>3</sub>	2500,00	24,73
MgSO <sub>4</sub>	121,56	1,01
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	130,44	1,09
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134,00	1,01
Mikroelementai		
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,11
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,10
FeNaEDTA	36,70	100,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,00	48,52
KI	0,75	4,52
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10,00	59,16
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	1,03
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2,00	6,96