



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

**Kiekybinis bendrųjų fenolinių junginių, flavonoidų,
antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas
Astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos augalų dalyse *in vivo* ir
kaliaus kultūrose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Iveta Skujytė

Projekto autorė

Doc. dr. Iona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

**Kiekybinis bendrųjų fenolinių junginių, flavonoidų,
antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas
Astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos augalų dalyse *in vivo* ir
kaliaus kultūrose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Iveta Skujytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

M.d. dr. Ingrida Tumosienė

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas
Farmacijos fakultetas

Iveta Skujytė

**Kiekybinis bendrųjų fenolinių junginių, flavonoidų,
antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas
Astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos augalų dalyse *in vivo* ir
kaliaus kultūrose *in vitro***

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Ivetos Skujytės, baigiamasis projektas tema „Kiekybinis bendrųjų fenolinių junginių, flavonoidų, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas Astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*“ 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.

Iveta Skujytė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Skujytė, Iveta. Kiekybinis bendrųjų fenolinių junginių, flavonoidų, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas Astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*. Baigiamasis magistro projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų kryptių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: Astriniai, fenoliniai junginiai, antioksidacinis, antibakterinis, bioaktyvumas.

Kaunas, 2020. 64 p.

Santrauka

Šiame projekte buvo nustatytos bendrųjų fenolinių junginių, flavonoidų koncentracijos, įvertinti antioksidaciniai aktyvumai bei antibakteriniai poveikiai Astrinių šeimos augalų (vaistinės medetkos, rausvažiedės ežiuolės ir vaistinės ramunės) dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*. Tyrimu metu nustatyta, kad intensyviausiu antioksidaciniu aktyvumu pagal redukcinį metodą pasižymėjo medetkos žiedų ekstraktas *in vivo* (0,793 A). Atlikus augalų, užaugintų *in vivo* ir *in vitro*, ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymą FRAP metodu, buvo matyti, kad intensyviausiomis savybėmis pasižymėjo medetkos (0,239 $\mu\text{mol/l}$) ir ežiuolės (0,223 $\mu\text{mol/l}$) žiedų *in vivo* ekstraktai. Antioksidacinio aktyvumo nustatymo DPPH metodu metu buvo pastebėta, kad stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo ežiuolės žiedų *in vivo* ekstraktas (92,9 %). Didžiausia fenolinių junginių koncentracija nustatyta ežiuolės žiedų *in vivo* ekstrakto (2,98 mg/100mg), o flavonoidų – medetkos žiedų *in vivo* ekstrakto (15,318 mg/g). Didžiausias superoksido dismutazės fermento aktyvumas buvo nustatytas medetkos kultūrų *in vitro* ekstrakto (58,47 vnt/mg). Daugiausiai *L*-prolino buvo nustatyta ramunės žiedų *in vivo* ekstrakto (1,386 $\mu\text{mol/g}$). Didžiausia chlorofilo *a* koncentracija buvo nustatyta medetkos stiebų *in vivo* (180,65 mg/100mg), chlorofilo *b* – ramunės žiedų *in vivo* (364,54 mg/100mg), o karotinoidų – medetkos žiedų *in vivo* (847,745 mg/100mg) ekstraktuose. Didžiausia liuteino koncentracija nustatyta medetkos žiedų *in vivo* ekstrakto (1,096 mg/g). Stipriausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo ramunės augalo dalių *in vivo* ekstraktai, kurie intensyviausiai slopino *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijų augimą.

Skujytė, Iveta. Evaluation of Total Phenolic Compounds, Flavonoids Quantities, Antioxidant and Antibacterial Activities in Asteraceae Family Plant Parts *in Vivo* and Callus Cultures *in Vitro*. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: *Asteraceae*, phenolic compounds, antioxidants, antibacterials, bioactivities.

Kaunas, 2020. 64 pages.

Summary

In this project, the concentrations of total phenolic compounds, flavonoids were determined, antioxidant activities and antibacterial effects in parts of Astrid family plants (marigold, purple coneflower and chamomile) *in vivo* and in callus cultures *in vitro* were investigated. The research showed that marigold flower extract *in vivo* had the highest reductive properties (0.793 A). The *in vivo* extracts of marigold (0.239 $\mu\text{mol} / \text{l}$) and purple coneflower (0.223 $\mu\text{mol}/\text{l}$) flowers showed the highest properties of the antioxidant activity of extracts of plants grown *in vivo* and *in vitro* by FRAP method. During the DPPH detection of antioxidant activity, it was observed that the strongest antioxidant properties were in purple coneflower flowers *in vivo* extract (92.9 %). The highest concentrations of phenolic compounds were found in the *in vivo* extract of purple coneflower flowers (2.98 mg / 100 mg) and in flavonoids in the *in vivo* extract of marigold flowers (15.318 mg/g). The highest activity of superoxide dismutase enzyme was found in *in vitro* extract of marigold cultures (58.47 units/mg). The highest concentration of the *L*-proline was detected in the *in vivo* extract of chamomile flowers (1.386 $\mu\text{mol} / \text{g}$). The highest concentration of chlorophyll *a* was found in *in vivo* extracts of calendula stems (180.65 mg / 100 mg), chlorophyll *b* in chamomile flowers *in vivo* (364.54 mg / 100 mg), and carotenoids in *in vivo* extracts of marigold flowers (847.745 mg/100 mg). The highest concentration of lutein was found in the *in vivo* extract of calendula flowers (1.096 mg/g). The strongest antibacterial activity was observed in the *in vivo* extracts of chamomile plant parts, which most intensively inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* bacteria.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas.....	7
Įvadas.....	8
1. Literatūros apžvalga.....	9
1.1. Augalų charakteristika.....	9
1.2. Vaistinės medetkos (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.) apibūdinimas	9
1.3. Rausvažiedės ežiuolės (lot. <i>Echinacea purpurea</i> L.) apibūdinimas.....	11
1.4. Vaistinės ramunės (lot. <i>Matricaria recutita</i> L.) apibūdinimas.....	13
1.5. Antioksidantai.....	15
1.6. Karotinoidai	16
1.7. Fenoliniai junginiai.....	18
1.8. Flavonoidai	18
1.9. Kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	19
1.10. Antibakterinis aktyvumas	19
1.11. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	20
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	21
2.1. Tiriamasis objektas	21
2.2. Reagentai	21
2.3. Aparatūra	21
2.4. Tyrimo metodai	22
2.4.1. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas.....	22
2.4.2. Augalų ląstelių kultivavimo sąlygos	22
2.4.3. Auginimo reguliatorių paruošimas	23
2.4.4. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose	24
2.4.5. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu.....	24
2.4.6. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu	24
2.4.7. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu	25
2.4.8. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas.....	26
2.4.9. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas.....	26
2.4.10. L-Prolino koncentracijos įvertinimas	27
2.4.11. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas tiriamuosiuose augaluose	28
2.4.12. Liuteino koncentracijos įvertinimas tiriamuosiuose augaluose.....	29
2.4.13. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaru difuziniu metodu ..	30
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	31
3.1. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas.....	31
3.2. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose	31
3.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu.....	33
3.4. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu	35
3.5. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu	37
3.6. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas.....	40
3.7. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas.....	44
3.8. L-Prolino koncentracijos įvertinimas	47
3.9. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas tiriamuosiuose augaluose	50
3.10. Liuteino koncentracijos įvertinimas tiriamuosiuose augaluose.....	52
3.11. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaru difuziniu metodu	54
Išvados	56
Literatūros sąrašas	57
Priedai.....	63
1 priedas. Antibakterinio aktyvumo įvertinimo agaru difuziniu metodu rezultatai	63
2 priedas. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	64

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

BAP – 6-benzilaminopurinas
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas
TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas
DTT – ditionitrolis
FRAP – geležies redukcijos antioksidantinė galia
LB – Luria-Bertani maitinamoji terpė
MS – Murashige & Skoog maitinamoji terpė
PMSF – fenilmetilsufonilfluoridas
DMSO – dimetilsulfoksidas
SOD – superoksido dismutazė

Įvadas

Astriniai (lot. *Asteraceae*) šeimos augalai dėl savo sudėtyje turinčių farmakologinių ir biologinių veikliųjų medžiagų yra naudojami kaip vaistai įvairioms ligoms gydyti. Šios augalų šeimos vaistažolės naudojamos daugelyje sričių, įskaitant: mediciną, mitybą, kvapiąsias medžiagas, gėrimus, dažymą, repelentus, aromatus ir kosmetiką. Tai pačių įvairiausių ir gausiausių augalų šeima ir yra labai perspektyvi farmakologiniu požiūriu.

Tokių intensyvių Astrinių šeimos augalų panaudojimą lemia jų sintetinių pirminių ir antrinių bioaktyvių metabolitų įvairovė. Fenoliniai junginiai, flavonoidai, chlorofilas *a* ir *b* bei karotinoidai (liuteinas), yra svarbūs ne tik kaip junginiai pasižymintys gydomosiomis savybėmis, bet ir dėl savo poveikio augalų apsaugos sistemai.

Tyrimams buvo pasirinktos vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.), rausvažiedės ežiuolės (lot. *Echinacea purpurea* L.) ir vaistinės ramunės (lot. *Matricaria recutita* L.) augalų dalys (lapai, stiebai ir žiedai) *in vivo* ir kaliaus kultūros *in vitro*.

Iš šių augalų kaliaus kultūrų *in vitro* gaunami bioaktyvūs junginiai įeina į antioksidacines receptūras farmacijai, maistui, kosmetikai ir kitoms reikmėms. Mokslinės informacijos apie šių augalų atskirų dalių bei jų pagrindu sukurtų *in vitro* sistemų cheminius junginius, antioksidacines ir antibakterines savybes vis dar gana mažai, todėl tokių savybių įvertinimas ir toliau yra tikslingas ir naudingas ieškant naujų natūralių vaistinių šaltinių.

Projekto tikslas – kiekybiškai įvertinti bendras fenolinių junginių, flavonoidų koncentracijas, antioksidacinį ir antibakterinį aktyvumą vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.), rausvažiedės ežiuolės (lot. *Echinacea purpurea* L.) ir vaistinės ramunės (lot. *Matricaria recutita* L.) augalų dalyse (žieduose, lapuose ir stiebuose) *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*.

Projekto uždaviniai:

1. suformuoti tiriamųjų augalų kaliaus kultūras *in vitro*;
2. įvertinti antioksidacinį aktyvumą DPPH, FRAP metodais ir redukcines savybes tiriamuosiuose augaluose *in vitro* ir *in vivo*;
3. nustatyti bendras fenolinių junginių ir flavonoidų koncentracijas;
4. nustatyti tiriamųjų augalų *in vitro* ir *in vivo* superoksido dismutazės aktyvumą;
5. įvertinti pigmentų (chlorofilo *a*, chlorofilo *b* ir karotinoidų) koncentracijas;
6. įvertinti *L*-prolino ir liuteino koncentracijas tiriamuosiuose augalų ekstraktuose;
7. nustatyti tiriamųjų augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antibakterinį aktyvumą prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijas.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Augalų charakteristika

Astriniai (lot. *Asteraceae*) šeimos augalai yra didžiausia žydinčių augalų šeima pasaulyje. Šeimą sudaro daugiau kaip 1600 genčių ir 23 000 atskirų rūšių. Astriniai šeimos nariai yra svarbūs medicininiais, dekoratyviniais ir ekonominiais tikslais [1]. Daugelis šios šeimos augalų turi fitocheminių junginių, polifenolių, flavonoidų ir antioksidacinius fermentų aktyvumus. Šie fenolio ir antioksidantų junginiai sukelia platų biologinių aktyvumų spektrą ir padidina augalų bei juos vartojančių organizmų atsparumą. Astriniai šeimos augalai yra geras baltymų, eterinių aliejų, vitaminų, taip pat flavonoidų ir fenolinių junginių šaltinis [2].

1.2. Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) apibūdinimas

Vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.) – vienmetis augalas su geltonai oranžiniais žiedais, priklausantis Astrinių šeimai [1].



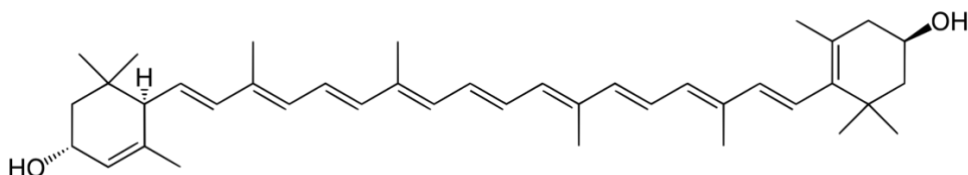
1.1 pav. Vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.)

Vaistinių medetkų paplitimas. Šis augalas turi maždaug nuo 12 iki 20 rūšių vienmečių ar daugiamečių žolinių augalų, augančių paprastųjų saulėgrąžų (*Asteraceae*) šeimoje. Augalas kilęs iš rytinės Makaronėzijos per Viduržemio jūros regioną iki Irano. Dažniausiai auginamas ir naudojamas genties narys yra vaistinė medetka *Calendula officinalis* L [3].

Vaistinių medetkų morfologiniai požymiai. *Calendula officinalis* 20–50 cm žolinis augalas žydintis birželio – rugsėjo mėnesiais. Stiebas stačias, šakotas, apaugęs plaukeliais. Viršutiniai lapai lancetiški arba pailgi, bekočiai, apatiniai – pailgai kastuviški, daugiausia lygiakraščiai, retai dantyti, su lapkočiu, apaugę trumpais plaukeliais. Žiedynas 3 – 5 cm graižas. Graižai ryškūs, geltonai oranžiniai. Kraštiniai (liežuviški) žiedai sudaro 2 – 3 eiles, viduriniai – vamzdiški, geltoni. Vaisius – lukštavaisis [4].

Kokybės ir kiekybės reikalavimai. Medetkų žiedai naudojami kaip vaistinė augalinė žaliava farmacinių vaistinių preparatų gamybai, todėl Europos farmakopėjoje yra pateikti jų kokybės ir kiekybės reikalavimai. Kokybė įvertinama nustatant augalinėje žaliavoje esančių veikliųjų medžiagų, drėgmės, bendro pelenų ir šalutinių medžiagų koncentracijas. Vaistinių medetkų augalinėje žaliavoje flavonoidų koncentracija, išreikšta hiperozidu, turi būti ne mažesnis kaip 0,4 %, drėgmė – ne didesnė nei 12 %, bendras pelenų koncentracija negali būti didesnis kaip 10 %, o šalutinių medžiagų negali būti daugiau nei 2 % [5].

Vaistinių medetkų cheminė sudėtis. Vaistinės medetkos ekstraktai savo sudėtyje turi daug veikliųjų medžiagų komponentų. Pagrindiniai yra terpenoidai, kumarinai, chinonai, saponinai, flavonoidai, karotinoidai ir aminorūgštys. Jie pasižymi antioksidaciniu poveikiu ir yra būtini imuninei sistemai. *Calendula officinalis* L. išsiskiria dėl savo sudėtyje kaupiamų karotinoidų: flavoksantino, liuteino, α -karoteno, β -karoteno, γ -karoteno ir likopeno. Nustatyta, kad šie karotinoidai turi antioksidacinių, antimikrobinių ir antiproliferacinių savybių [6].



1.2 pav. Liuteino cheminė struktūra

Šis augalas yra laikomas potencialiu liuteino šaltiniu. Liuteinas (žr. 1.2 pav.) – tai stiprus antioksidantų junginys, apsaugantis ląsteles nuo oksidacinio pažeidimo, naudojamas siekiant sumažinti lėtinių degeneracinių ligų riziką. Liuteinas apsaugo lipidus, baltymus ir DNR nuo laisvųjų radikalų poveikio. Nustatytas teigiamas liuteino poveikis sergant ateroskleroze, katarakta, vėžiu ir kitomis ligomis [7].

Vaistinėse medetkose pagrindiniai kaupiami flavonoidai yra rutinas ir hiperozidas. Taip pat yra randama narcizino, neohesperidino, izokvercetino, kvercetino, izorhamnetino ir gliukozido [8]. Bendra flavonoidų koncentracija medetkos augalinėje žaliavoje neturi būti mažesnė kaip 0,4 % [9]. Buvo atliktas tyrimas ir nustatyta, kad medetkos augalo žiedų etanolio ekstraktas turi laisvųjų aminorūgščių, tokių kaip: alaninas, argininas, asparto rūgštis, asparginas, valinas, histidinas, glutamo rūgštis, leucinas, lizinas, prolinas, serinas, tirozinas, treoninas, metioninas ir fenilalaninas. Aminorūgščių koncentracija lapuose yra apie 5 %, stiebų – 3,5 %, o žiedų – 4,5 % [10]. Vaistinės medetkos žiedai kaupia apie 0,3 % eterinio aliejaus [11].

Vaistinių medetkų farmakologinės savybės. Vaistinės medetkos visame pasaulyje žinomos dėl savo medicininės svarbos. Jų sudėtyse yra įvairių fitochemikalų, įskaitant angliavandenius, aminorūgštis, lipidus, riebalų rūgštis, karotinoidus, terpenoidus, flavonoidus, chinonus, kumarinus ir kitas sudedamąsias dalis. Medetkos ekstraktai pasižymi svarbiu biologiniu aktyvumu, todėl yra naudojami žaizdoms gydyti ir imunitetui palaikyti. Iš augalo gauti ekstraktai dažniausiai pasižymi spazmogeniniu ir spazmolitiniu, hepatoprotekciniu, genotoksiniu ir antigenotoksiniu, antiamilaziniu, priešūždegiminiu, antialerginiu, antibakteriniu–antigrybeliniu, antioksidantiniu, antidiabetiniu, anti-ŽIV ir priešvėžiniu, apsauginiu nuo nefronų, prevenciniu, hipoglikeminiu ir skrandžio apsauginiu, poveikiais. Vaistinių medetkų ekstraktai neturi toksiško poveikio [12].

Vaistinių medetkų ekstraktuose esantis likopenas ir liuteinas suteikia žiedams oranžinę ir geltoną spalvą, todėl augalas yra naudojamas kaip natūralus dažiklis audinių, maisto ir kosmetikos pramonėse. Jo žiedlapius galima naudoti natūraliems audiniams: vilnai, medvilnei, linui, kanapėms ir šilkui, dažyti. Šiuo metu *Calendula officinalis* yra patvirtintas naudoti maistui, o JAV yra įtrauktas į Maisto ir vaistų administracijos GRAS, t. y. visuotinai pripažintų ir saugių medžiagų sąrašą. Jis, kaip augalinis vaistas, turi didelę ekonominę vertę ir yra plačiai naudojamas kosmetikoje, kvėpaluose ir farmaciniuose preparatuose, taip pat maiste [13].

Vaistinių medetkų suspensijos arba jos tinktūros yra naudojamos spuogams gydyti, siekiant sumažinti uždegimą, pilvo spazmus, kontroliuojant kraujavimą ir raminant sudirgusius audinius. Taip pat augalo ekstraktai įeina į tepalų sudėtis gydyti žaizdas, herpesą, opas, nušalimus, odos pažeidimus ir randus [10]. Yra įrodyta, kad medetkų kremas ar tepalas yra veiksmingi gydant dermatitą. Buvo atliktas tyrimas, kuriame dalyvavo 254 radiaciją gavę pacientai ir nustatyta, kad vietiskai naudojant 4 % medetkos tepalą, 2 ar aukštesnio laipsnio dermatitas pasireiškė daug rečiau nei grupėje, vartojusioje trolaminą [13]. Tyrimų metu įsitikinta, kad *Calendula officinalis* L. ekstraktai bei atskiri jų junginiai, turi patikimą vėžio gydymo potencialą, gydant įvairias vėžio formas. Ekstraktai turėjo reikšmingą citotoksiškumą *in vitro* didelėms vėžio ląstelių linijoms [14]. Tyrimais nustatyta, kad jis gali būti labai saugus gydant prostatos vėžį [15].

Calendula officinalis L. yra augalas, turintis daugybę cheminių komponentų, kurie pasižymi įvairiais farmakologiniais poveikiais, todėl dėl savo veiksmingumo ir saugumo tikimasi, kad bus sukurtų naujų vaistų skirtų gydyti daugeliui žmonijos ligų.

1.3. Rausvažiedės ežiuolės (lot. *Echinacea purpurea* L.) apibūdinimas

Rausvažiedė ežiuolė (lot. *Echinacea purpurea* L.) – daugiametis žolinis augalas, priklausantis Astrinių šeimai, labiausiai paplitęs Šiaurės Amerikoje. Į Europą pateko XVII a., o nuo 1960 m. auginamas Lietuvoje.



1.3 pav. Rausvažiedė ežiuolė (lot. *Echinacea purpurea* L.)

Rausvažiedžių ežiuolių (lot. *Echinacea purpurea* L.) paplitimas. Rausvažiedžių ežiuolių gimtoji vieta Atlanto drenažo srityje JAV ir Kanadoje. Jos platinimo centrai yra Arkanzasas, Kanzasas, Misūris ir Oklahoma, Jungtinės Amerikos Valstijos. Ežiuolė buvo auginama kaip vaistinis augalas šiaurės ir rytų Afrikos dalyse bei Europoje [16]. Natūraliai paplitusių įvairių rūšių ežiuolių galima pamatyti JAV, jos dažniausiai aptinkamos atvirose pievose ar drėgnose vietose, tokiose kaip miškai, pelkės, grioviai, upių krantai ir žemai slūgstantys krūmynai [17].

Rausvažiedžių ežiuolių morfologiniai požymiai. Rausvažiedė ežiuolė – tai 60 – 100 cm žolinis augalas, su šakotine šaknų sistema, žydintis birželio – rugsėjo mėnesiais. Stiebas apaugęs smulkiais, trumpais plaukeliais arba lygus, status, standus, apatinėje dalyje apvalus, viršutiniame trečdalyje – šakotas, briaunuotas ir tuščiaviduris. Lapai išsidėstę pražanginiu būdu, paprasti, ištisiniai, plačiai kiaušiniški – lancetiški, širdiškais pamatais, smailėjančia dantyta viršūne, viršutinė pusė ryškiai žalios spalvos paviršius raukšlėtas ir šiurkštus. Lapkočiai iki 25 cm ilgio. Pamatiniai lapai, šiurkštūs arba smarkiai dantyti, turi nuo 3 iki 5 ryškiai matomų gyslų, 17 – 42 cm ilgio ir 6 – 10 cm pločio, trumpesniais koteliais arba bekočiai. Graižuose yra 10 – 20 sterilių, rausvai purpuriškų, 4 – 6 cm ilgio ir 0,6 cm pločio liežuviškų žiedų. Žydėjimo pradžioje jie būna horizontalioje padėtyje, o pabaigoje – svyra žemyn. Vidiniai graižo žiedai dvilyčiai, vamzdiški, geltoni, padengti žvyneliais, žydi spirale

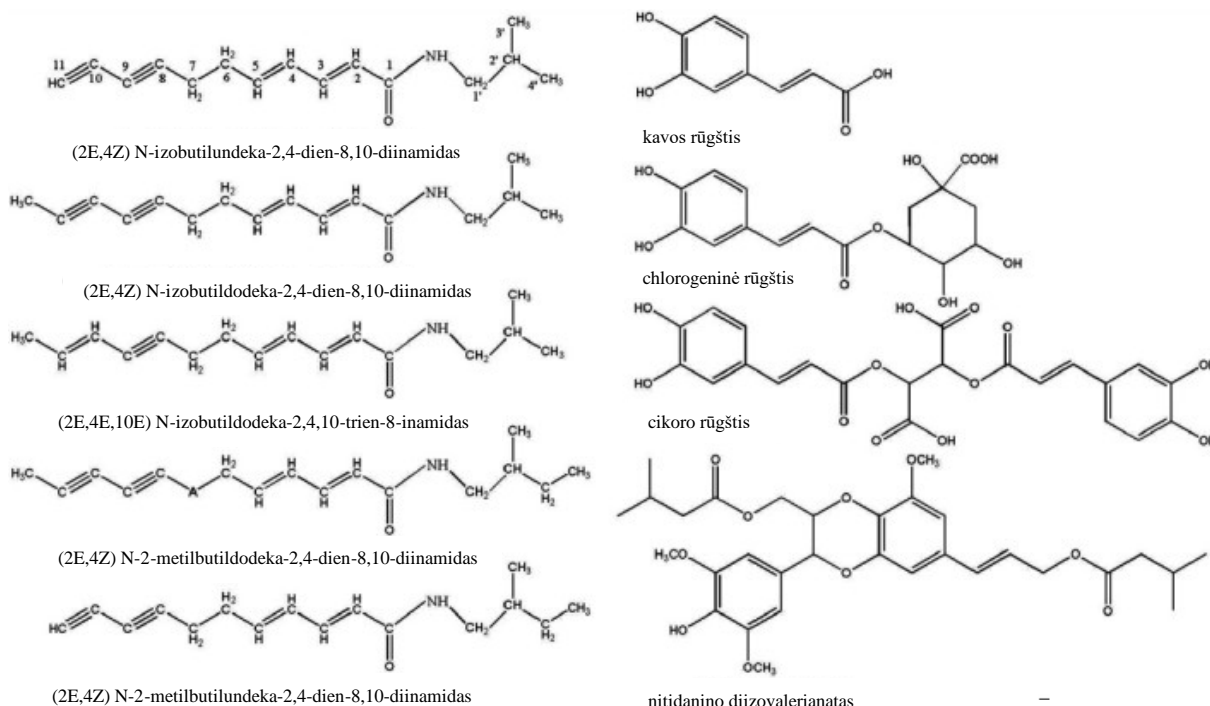
aukštn. Žiedynostį gaubia linijiškai lancetiški, plaukuoti arba pliki, blakstienuoti vainiklapiai, sudarantys dveilę – ketureilę skraistę. Žiedynostis žydėjimo pradžioje būna plokščias, 1,5 – 3,5 cm skersmens, žydėjimo metu – iškilus, 2 – 3,5 cm skersmens. Vaisių brandos metu – kūgiškas, su daugybe pažiedžių, šeriuotas. Vaisius – lukštavaisis [18].

Rausvažiedžių ežiulių cheminė sudėtis. Augalo sudėtyje yra daug įvairių cheminių junginių, atsakingų už jo biologinį aktyvumą. Rausvažiedėje ežiulėje buvo nustatyta 216 skirtingų aktyvių junginių. Šis medicininis augalas kaupia eterinį aliejų, kurio sudėtyje yra fitocheminių junginių (žr. 1.1 lentelę) [20].

1.1 lentelė. Fitocheminiai *Echinacea purpurea* L. junginiai

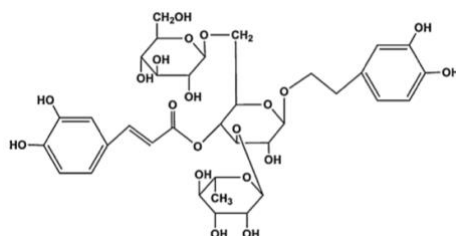
Klasė	Pavyzdžiai
Gliukozidai	Echinakozidas, echinacinas
Fenilpropanoidai	Kavos rūgštis ir jų dariniai
Flavonoidai	Liuteolinas, kaempferolis, kvercetas, apigeninas ir izorhamnetinas.
Terpenoidai	Borneolis, germakrenas D, kariofileno epoksidai ir palmitino rūgštis
Azoto junginiai	Alkamidai, alkaloidai, tokie kaip glicino betainas, pirolizidino alkaloidai
Kiti	Poliacetilenai, polisacharidai, cukrūs, fitosteroliai, metalų druskos, tokios kaip kalis, kalcis, magnis, geležies, aliuminio, taip pat karbonatų silikatai, chloridai, sulfatai. Askorkorbo rūgštis.

Alkamidai, kavos rūgšties dariniai ir polisacharidai yra laikomi svarbiomis augalų sudedamosiomis dalimis. Daugybė tyrimų atskleidė, kad alkamidai turi įtakos ežiulės ekstraktų imunomoduliacinėms savybėms *in vitro* ir *in vivo*, o polisacharidai – priešūždegiminių ežiulės preparatų poveikiui [19]. Kai kuriose ežiulės rūšyse yra kavos rūgšties, kuri gali būti naudojama augalų autentifikavimui ir kokybės kontrolei. Aktyviausi *E. purpurea* kavos rūgšties dariniai: kaftaro rūgštis, chlorogeninė rūgštis, cinarinas, echinakozidas ir cikoro rūgštis [21]. Pagrindiniai antriniai metabolitai pateikti 1.4 paveiksle [16].



1.4 pav. *E. purpurea* sudėtyje esančių kai kurių antrinių metabolitų cheminės struktūros

Rausvažiedėje ežiuolėje esantis natūralus, vandenyje tirpus feniletanoidinis gliukozidas echinakozidas (žr. 1.5 pav.), slopina daugelį virusų, bakterijų ir grybelio rūšių, veikia kaip stiprus antioksidantas, kuris reikalingas organizmo apsaugai. Tai natūralus antibiotikas sudarytas iš trisacharido, susidedančio iš dviejų gliukozės ir vienos ramnozės dalių, gliukozidiškai sujungtų su viena kofeino rūgštimi ir viena dihidroksifeniletanolio (hidroksitirolio) liekana, esančia centre – ramnozėje [22].



1.5 pav. Echinakozido cheminė struktūra

Rausvažiedžių ežiuolių farmakologinės savybės. Rausvažiedės ežiuolės pasižymi antioksidacinėmis, antimikrobinėmis, priešuždegiminėmis ir imunomoduliacinėmis savybėmis. Taip pat augalo ekstraktai pasižymi citochromo fermentų slopinamuoju, antiadrogeniniu, radio bangų apsauginiu ir priešnavikiniu poveikiais [23]. *Echinacea purpurea* L. yra vienas iš geriausiai parduodamų vaistinių augalų, plačiai naudojamas peršalimui, gerklės skausmui ir kitoms viršutinių kvėpavimo takų infekcijoms malšinti. Paruošti ežiuolės ekstrakto produktai (užpilai, tinktūros ir kapsulės) yra naudojami imuninei sistemai stimuliuoti [24]. Ežiuolės ekstraktai daugiausiai naudojami chemopreventiniuose ir chemoterapiniuose vaistuose nuo viršutinių ir apatinių kvėpavimo takų infekcinių ligų. Šio augalo ekstraktai naudojami gydyti dantų, žarnyno skausmui, gyvatės įkandimams, esant odos sutrikimams, traukuliams, lėtiniam artritui ir vėžiui [23].

Medicininis augalo naudojimas yra susijęs su imunomoduliaciniu ir priešnavikiniu poveikiu, nes ežiuolės ekstraktas suaktyvina žmogaus makrofagus, stimuliuoja citokinų ir naviko nekrozės faktoriaus α (TNF- α) gamybą, kurie apsaugo šeiminką nuo virusų ir vėžio [25]. Rausvažiedžių ežiuolių ekstraktai apsaugo nuo lėtinių ligų, todėl jie gali būti naudojami ženšenio, žaliosios arbatos, omega-3 lipidų ir kitų papildų sudėtyse [26].

1.4. Vaistinės ramunės (lot. *Matricaria recutita* L.) apibūdinimas

Vaistinė ramunė – Astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos vienmetis žolinis augalas, vienas iš labiausiai paplitusių vaistinių augalų. Jis yra įtrauktas į 26 šalių farmakopėjas. Iš ramunėlių gaunami muilai, plovikliai, kvapiosios medžiagos, losjonai, tepalai, plaukų produktai, kepiniai, konditerijos gaminiai, alkoholiniai gėrimai ir užpilai [27].

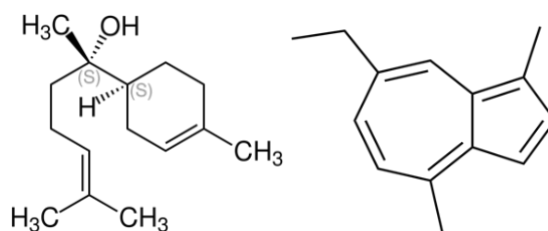


1.6 pav. Vaistinė ramunė (lot. *Matricaria recutita* L.)

Vaistinių ramunių paplitimas. Ramunės yra vienos iš svarbiausių vaistinių augalų, kilusių iš Pietų ir Rytų Europos. Jos taip pat auginamos Vokietijoje, Vengrijoje, Prancūzijoje, Rusijoje, Jugoslavijoje ir Brazilijoje. Vaistinės ramunės buvo įvežtos į Indiją per mugalų laikotarpį, dabar jis auginamas Punjabe, Utar Pradeše, Maharaštroje ir Džamu ir Kašmyre. Augalų galima rasti Šiaurės Afrikoje, Azijoje, Šiaurės ir Pietų Amerikoje, Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje. Vengrija yra pagrindinė šių augalų biomasės gamintoja. Vengrijoje ji taip pat gausiai auga nederlinguose dirvožemiuose ir yra neturtingų šių vietovių gyventojų pajamų šaltinis. yra eksportuojamos į Vokietiją dideliais kiekiais, kad būtų distiliuotas aliejus [28].

Vaistinių ramunių morfologiniai požymiai. Tai vienamečiai, gausiai šakoti, 10 – 70 cm aukščio augalai, kurių vaistinė žaliava – ramunių žiedai (lot. *Matricariae flos*). Lapai plunksniškai suskaldyti siūliškomis skiltimis. Žiedai šakų viršūnėse susitelkę gana smulkiais, kūgio pavidalo graižais. Augalai būdingo, savito kvapo. Žydi nuo gegužės iki rugsėjo. Vaistinės ramunės auga žieminių javų pasėliuose, dykvietėse, šiukšlynuose, rečiau pelkėse. Dažnos visoje Lietuvoje, o ypač ten, kur vyrauja molio ir priemolio dirvožemiai. Vaistinių ramunių graižai skinami, kai pradeda skleisti vamzdišką žiedai ir graižas būna dar beveik plokščias. Surinktą žaliavą reikia džiovinti gerai vėdinamoje patalpoje arba džiovykloje ne aukštesnėje kaip 40 laipsnių temperatūroje [29].

Vaistinių ramunių žiedų cheminė sudėtis. Vaistinės ramunės kaupia eterinį aliejų, žieduose nustatyta daugiau kaip 120 cheminių junginių. Pagrindinės eterinio aliejaus sudedamosios dalys yra terpenoidai – α -bisabololis (žr. 1.7 pav.) ir jo oksidai ($\leq 78\%$) bei azulenai, įskaitant chamazuleną (1 – 15 %) [30].



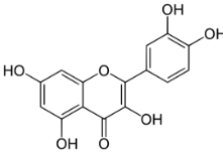
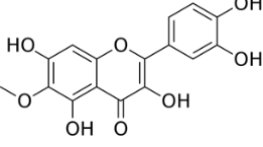
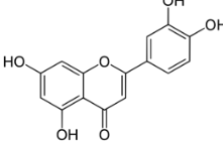
1.7 pav. α -Bisabololio ir chamazuleno cheminės struktūros

Vaistinių ramunių biologinį poveikį lemia aktyvios cheminės sudedamosios dalys – terpeniniai ir fenoliniai junginiai. Buvo nustatytas α -bisabololio priešuždegiminis, antimikrobinis, pažeidžiamasis ir opas sukeliantis poveikis. Chamazulenas taip pat pasižymi priešuždegiminiu poveikiu [31].

Iš fenolinių junginių svarbiausi yra flavonoidai – apigeninas, kvercetas, patuletinas ir liuteolinas (žr. 1.2 lentelę), jų gliukozidai, taip pat kumarinai (herniarinas ir umbeliferonas). Visi šie junginiai yra laikomi pagrindiniais vaistinių ramunių bioaktyviaisiais junginiais [27].

1.2 lentelė. Pagrindiniai flavonoidai vaistinėje ramunėje

Junginio pavadinimas ir cheminė formulė	Cheminė struktūra
Apigeninas $C_{15}H_{10}O_5$	

Junginio pavadinimas ir cheminė formulė	Cheminė struktūra
Kvercetas $C_{15}H_{10}O_7$	
Patuletinas $C_{16}H_{12}O_8$	
Liuteolinas $C_{15}H_{10}O_6$	

Be šių cheminių junginių yra ir kitų augalų antioksidantų, pavyzdžiui, chlorofilų *a* ir *b*, karotinoidų ir tokoferolių bei vandenyje tirpaus vitamino C [32].

Vaistinių ramunių farmakologinės savybės. Vaistinės ramunės vienas iš plačiausiai naudojamų ir gerai dokumentuotų vaistinių augalų pasaulyje. Fitocheminis šio augalo tyrimas parodė, kad jame gausu citoprotekcinų aktyvių molekulių, tokių kaip fenoliniai junginiai. Todėl, žinoma, kad šių augalų ekstraktai ir juose esantis eterinis aliejus, kurio sudėtyje yra antioksidantų, pasižymi įvairiomis farmakologinėmis savybėmis [33].

Matricaria recutita L. ekstraktams yra priskiriami šie biologiniai poveikiai: antimikrobinis, antioksidantinis, antimaliarinis, antimutageninis, antitrombocitinis, chemopreventinis, priešvėžinis, priešuždegiminis, antigenotoksinis, spazmolitinis [34]. Šis augalas pasižymi švelniai raminančiu, hipolesteroleminiu, naudingu virškinimo trakto, kepenų, centrinės ir autonominės nervų sistemų, hemodinaminio poveikiais. Jis buvo naudojamas esant vidurių pūtimo nervų dispsijai, kelionių ligai, nosies katarui, neramumui ir ypač esant virškinimo trakto sutrikimams, susijusiems su vaikų nerviniu dirglumu. Jis taip pat buvo taikomas hemorojui, mastitui, kojų opoms gydyti, inkstų diegliams, pykinimui, odos išsiveržimui, vidurių užkietėjimui, kaip raminamiesiems vaistams, norint pašalinti parazitinius kirminus, gydyti skrandžio ir odos ligoms [34]. Apigeninas, ramunėlių flavonoidinis glikozidas, pasižymi antioksidaciniu gebėjimu, kuris slopina indukuojamos 2 tipo ciklooksigenazės (COX-2) transkripcinį aktyvavimą. COX-2 yra fermentas, kurio farmakologinis slopinimas gali palengvinti uždegimą ir skausmą. Apigeninas veikia kartu su vitaminais C ir E [35].

Dėl farmacijos pramonės augimo, vaistinių ramunių pasaulinė rinka nuolat plečiasi. Didėja jų auginimo ir medicininė svarba, todėl pagal Sveikatos apsaugos ministerijos licenzijas gaminami įvairūs farmaciniai produktai [36].

1.5. Antioksidantai

Antioksidantai yra žinomi kaip molekulės, galinčios sustabdyti ar slopinti oksidacijos procesą, inaktyvuojant laisvuosius radikalus, kurie veikia įvairias ląstelių struktūras. Šis aktyvumas paprastai stebimas išmatuojant antioksidantų gebėjimą slopinti oksidacijos procesą tirpale [37].

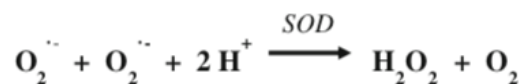
Daugybė vaistinių, aromatinių augalų turi cheminių junginių, pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis. Nuo tiriamuosiuose augaluose esančių fenolinių junginių ir flavonoidų koncentracijų priklauso jų antioksidacinis aktyvumas, todėl didėjant bioaktyvių metabolitų koncentracijoms, proporcingai didėja ir antioksidantai.

Augalų ląstelėse yra platus spektras fermentinių ir nefermentinių antioksidacinių sistemų. Fermentinės antioksidacinės sistemos vykdo susidariusių laisvųjų radikalų neutralizaciją ir atlieka apsauginę funkciją audiniams bei ląstelėms, ne tik naikinant oksidacinį stresą, bet ir lipidų peroksidacijos, baltymų pažeidimo ir DNR struktūros pokyčius [38].

Fermentiniai ir nefermentiniai antioksidantai:

- Fermentiniai: superoksido dismutazė (SOD) (EC 1.15.1.11), katalazė (EC 1.11.1.6) ir glutationio peroksidazė (EC 1.11.1.9);
- Nefermentiniai antioksidantai: apima mažos molekulinės masės junginius, tokius kaip fenoliniai junginiai, vitaminai (A, C ir E), antocianai, karotinoidai (provitaminas A, β-karotinas), taninai ir kt [39].

Iš fermentinių antioksidantų buvo pasirinkta nustatyti superoksido dismutazės (SOD) aktyvumą. SOD – tai fermentų grupė, kuri katalizuoja superoksido radikalų ($O_2^{\cdot-}$) dismutaciją ar virsmą į molekulinį deguonį (O_2) ir vandenilio peroksidą (H_2O_2) (žr. 1.8 pav.). Augaluose yra trys SOD grupės: vario ir cinko (Cu, Zn-SOD); mangano (Mn-SOD); ir geležies (Fe-SOD). Šis fermentas gaminamas citoplazmoje ir mitochondrijose [40].



1.8 pav. Fermentinė reakcija, katalizuojama superoksido dismutazės

Tiriamųjų augalų antioksidaciniai poveikiai nustatyti trimis metodais: redukciniu, DPPH ir FRAP. DPPH metodas yra dažnai naudojamas antiradikaliniam aktyvumui nustatyti. Jis pagrįstas antioksidanto galimybe sunaikinti laisvuosius radikalus. Į DPPH laisvųjų radikalų šalinimo metodą įeina laisvasis radikalas (DPPH •), galintis priimti vandenilio radikalus iš antioksidantų tirpale. Savo radikalios formos DPPH absorbuojamas esant 517 nm, esant antioksidantui, ši absorbcijos vertė mažėja dėl antioksidantų molekulių ir radikalų reakcijos. Šią reakciją buvo galima pastebėti pasikeitus spalvai iš violetinės į geltoną [41].

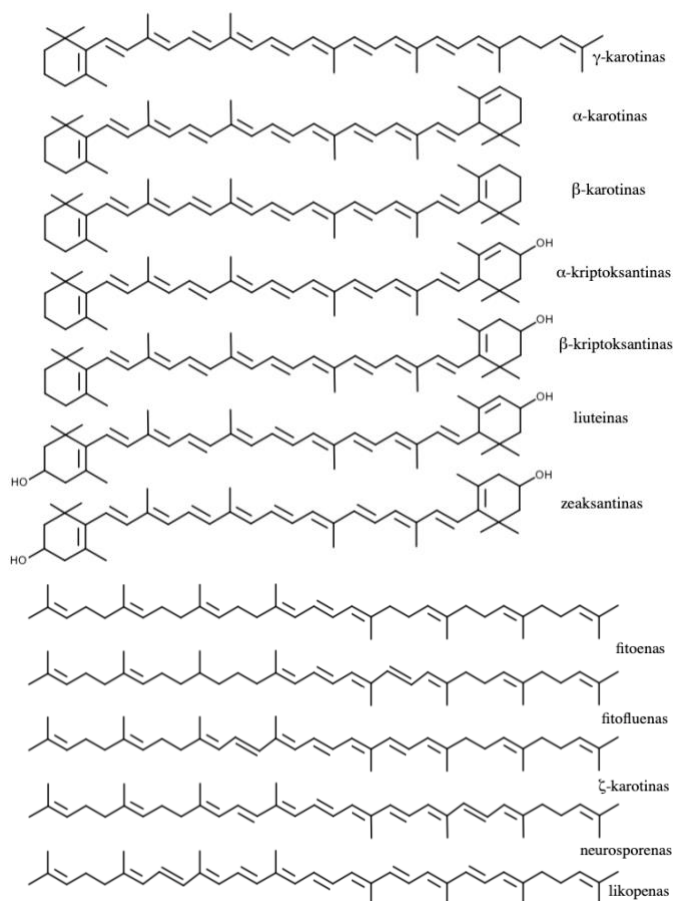
FRAP tyrimas buvo sukurtas išmatuoti geležies redukcinius biologinių skysčių ir grynų junginių vandeninių tirpalų sugebėjimus. Esant žemam pH, antioksidantas redukuoja geležies tripiridiltriazino (Fe-TPTZ) kompleksą į mėlynos spalvos juodąją spalvą. Ši reakcija matuojama spektrofotometru, esant 593 nm. [41].

1.6. Karotinoidai

Karotinoidų pavadinimas yra kilęs iš morkų šaknyje esančio pagrindinio pigmento – *Daucus carota*, kuris yra vienas iš labiausiai paplitusių ir svarbiausių pigmentų gyvame organizme. Karotinoidai yra pigmentai, atsakingi už daugelio augalų spalvas. Gėlių žiedlapių geltoną ir oranžinę spalvas daugiausia lemia karotinoidai, o atspalvis priklauso nuo pigmentų kiekio ir sudėties [42].

Karotinoidai yra tetraterpenoidai, sintetinami augaluose ir mikroorganizmuose. Jų taip pat galima rasti daugelyje gyvūnų rūšių ir jie yra svarbūs paukščių, vabzdžių, žuvų ir vėžiagyvių dažikliai. Tačiau gyvūnai ir žmonės negali sintetinti karotinoidų, todėl jų lygis organizme priklauso nuo aprūpinimo maistu [43].

Iki šiol buvo aprašyta daugiau kaip 750 karotinoidų, iš kurių apie 50 žmogaus organizme yra raciono sudedamosiomis dalimis, o žmogaus kraujyje ir audiniuose yra tik apie 20. Svarbiausi yra β -karotinas, α -karotinas, likopenas, liuteinas, zeaksantinas, β -kriptoksantinas, α -kriptoksantinas, γ -karotinas, neurosporenas, ζ -karotinas, fitofluenas ir fitoenas (žr. 1.9 pav.), esantys žmogaus plazmoje, jie reguliariai pateikiami žmonių mitybos racionų sąraše [44].



1.9 pav. Žmogaus plazmoje esančių pagrindinių karotinoidų cheminės struktūros.

Karotinoidai yra svarbūs tokiose pramonės šakose kaip chemija, farmacija, maistas ir kosmetika. Šie pigmentai gali veikti ne tik kaip vitamino A pirmtakai, bet ir kaip spalvos reguliatoriai. Jie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, todėl yra tyrinėjami mokslininkų. Karotinoidų gamybą cheminės sintezės ar ekstrahavimo būdu iš augalų riboja nedidelė išeiga, o gamybos išlaidos susidaro nemažos, todėl buvo pradėti tirti mikroorganizmų karotinoidai, kaip alternatyva, parodanti geresnę išeigą, nei kiti [45].

Karotinoidai priklauso svarbiausiems maisto produktų komponentams. Jie yra natūralūs dažikliai nuo geltonos iki raudonos spalvos, todėl daro didelę įtaką daugelio maisto produktų priimtinumui. Kaip ir mineralai, kai kurie karotinoidai yra vitamino A pirmtakai, o kalbant apie žmonių sveikatą, jie yra vieni iš bioaktyviųjų fitochemikalų, kurie yra kredituoti ir mažina degeneracinių ligų, tokių kaip vėžys, širdies ir kraujagyslių ligos, geltonosios dėmės degeneracija ir katarakta, riziką [45].

Karotinoidai yra natūraliai lipiduose tirpūs pigmentai, iš kurių dauguma yra C40 terpenoidai, kurie veikia kaip membraną saugantys antioksidantai, šalinantys O₂ ir peroksilo radikalus. Jų antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo jų struktūros. Karotinoidų pigmentai visuotinai atsiranda aukštesnių augalų, dumblių ir fototrofinių bakterijų fotosintetinėse sistemose. Kita vertus, nefotosintetiniuose organizmuose karotinoidai yra svarbūs apsaugant nuo fotooksidacinio pažeidimo [43].

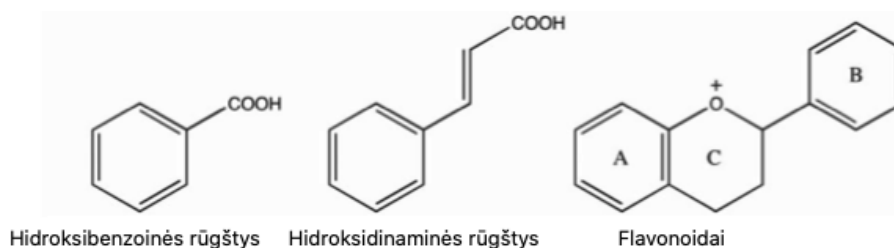
Daugybė tyrimų rezultatų rodo, kad dietos, kurioje gausu karotinoidų, vartojimas yra epidemiologiškai susijęs su mažesne kelių ligų rizika. Epidemiologiniai įrodymai sieja didesnę karotinoidų suvartojimą ir koncentraciją audiniuose su sumažinta vėžio ir širdies bei kraujagyslių ligų rizika [43].

1.7. Fenoliniai junginiai

Fenolinių junginių yra beveik visuose augaluose ir augalinės kilmės maisto produktuose. Augaluose esantys polifenoliai gali veikti kaip signalinės molekulės, dalyvaujantys augalų augimo hormoniniame reguliavime ir apsaugoti jas nuo mikroorganizmų užkrėtimo (antimikrobinis aktyvumas) [46].

Fenoliniai junginiai yra sintetinami augaluose iš dalies reaguojant į ekologinius ir fiziologinius spaudimus, tokius kaip patogenų ir vabzdžių ataka, UV spinduliuotė ir žaizdos [47].

Pagrindinis fenolinių junginių struktūrinis bruožas yra aromatinis žiedas, turintis vieną ar daugiau hidroksilo grupių (žr. 1.10 pav.) [48].



1.10 pav. Fenolinių rūgščių ir flavonoidų pagrindinės struktūros.

1.8. Flavonoidai

Flavonoidai yra vieni iš labiausiai paplitusių fenolinių junginių. Jie yra augalų audiniuose ir dažnai kartu su karotinoidais ir chlorofilais atsakingi už savo mėlyną, violetinę, geltoną, oranžinę ir raudoną spalvas. Į flavonoidų šeimą įeina flavonai, flavonoliai, izoflavonoliai, antocianinai, antocianidinai, proantocianidinai ir katechinai [49].

Visi flavonoidai yra gauti iš aromatinių aminorūgščių, fenilalanino ir tirozino, ir turi trijų žiedų struktūras [50]. Flavonoidų struktūros kitimas atsiranda dėl hidroksilinimo, prenilinimo, šarminimo ir glikozilinimo reakcijų, keičiančių pagrindinę molekulę, masto ir struktūros [50].

Augaliniai fenoliniai junginiai klasifikuojami kaip paprasti fenoliai arba polifenoliai pagal fenolio vienetų skaičių molekulėje. Taigi augalinius fenolius sudaro paprasti fenoliai, kumarinai, ligninai, lignanai, kondensuoti ir hidrolizuojami taninai, fenolinės rūgštys ir flavonoidai [51].

Dažniausiai pasitaikančius bioaktyvius junginius sudaro tokie antriniai metabolitai: antibiotikai, mikotoksinai, alkaloidai, maistiniai pigmentai, augalų augimo faktoriai ir fenoliniai junginiai. Fenolio junginius sudaro flavonoidai, fenolinės rūgštys ir taninai. Flavonoidai sudaro didžiausią augalų fenolinių junginių grupę, sudarančią daugiau nei pusę iš aštuonių tūkstančių natūraliai randamų fenolinių junginių [52]. Daugumos fenolinių junginių antioksidantinis aktyvumas yra daug didesnis nei gerai žinomų kitų antioksidacinių, tokių kaip vitaminas E ar askorbo rūgštis [53]. Antioksidantai yra būtinos organizmui ir natūraliai gaunamos medžiagos iš maisto produktų. Antioksidantai gali būti klasifikuojami atsižvelgiant į veikimo mechanizmą (pirminius ir antrinius) arba kilmę (natūralius ir sintetinius) [54].

1.9. Kaliaus kultūros *in vitro*

Pastaruoju metu biotechnologijos siūlo patrauklias galimybes auginti augalų pagrindu sukurtas *in vitro* sistemas (kaliaus, ląstelių suspensijos bei organų kultūras) ir atlikti genetines manipuliacijas, kad būtų lengviau sukurti norimus augalus ir augalinius produktus. Daugelis antrinių metabolitų ne tik atlieka apsaugines funkcijas, bet yra svarbūs dėl savo medicininio poveikio. Todėl augalų ląstelių kultūros yra svarbūs šaltiniai, lengvai keičiamų antrinių metabolitų gamyboje. Buvo sukurtos metodikos, siekiant optimizuoti auginimo sąlygas ir padidinti antrinių metabolitų derlių augalų *in vitro* kultūrose.

Kaliaus kultūros *in vitro*, auginamos optimizuotose terpėse ir steriliomis kontroliuojamomis sąlygomis, yra gera alternatyva tiriamųjų augalų auginimui *in vivo*. Laboratorijoje per trumpą laiką galima gauti milijonus palikuonių augalų, turinčių tą patį genotipą ir fenotipą. *In vitro* pagaminta (mikroprodukcinė) augalinė medžiaga paprastai yra vienoda, aukštos kokybės ir joje nėra jokių mikroorganizmų. Be to, *in vitro* produkciją galima nustatyti neatsižvelgiant į oro sąlygas ar auginimo sezoną [26].

Augalų kaliaus kultūra *in vitro* yra svarbi pagrindinio mokslo ir komercinio taikymo technika. Visose pagrindinėse sausumos augalų šeimose sužeistas audinys yra išgaunamas nediferencijuotomis kaliaus ląstelėmis. Šias kaliaus ląsteles galima kultivuoti *in vitro* biotechnologinėms reikmėms. Beveik bet kuri augalo dalis gali būti naudojama auginti kultūras. Iš augalų audinių paimti eksplantai lėtai auga *in vitro* į ląstelių masę nuo amorfiškos ir bespalvės iki šviesiai rudos spalvos. Jie gaunami steriliomis sąlygomis, išvengiant mikrobo infekcijos ir auginami kietoje gelio terpėje, papildytoje augimo hormonais (auksiniais ir citokininiais). Diferencijuotos augalų ląstelės ir kultivuojamos kalio ląstelės labai skiriasi. Nors kai kurioms kultūrų kultūroms reikia tamsių augimo sąlygų, kitos auga tam tikromis dienos ir nakties sąlygomis (pvz.: 16 val. šviesoje, 8 val. tamsoje). Kaliaus kultūros paprastai auga $25 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje [55].

1.10. Antibakterinis aktyvumas

Vaistinių medetkų žiedlapių ekstraktai turi panašų antibakterinį poveikį tiek gramteigiamoms, tiek gramneigiamoms bakterijoms. Vaistinės medetkos žiedlapių ekstraktai pasižymi puikiu antimikrobinu poveikiu prieš *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* ir *Aspergillus niger*. Yra atlikta tyrimų įrodančių vaistinių medetkų ekstraktų slopinamąjį poveikį *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, ir *Candida parapsilosis* bakterijoms. Literatūroje pateikta informacija apie antibakterinių ir priešgrybelinių *Calendula officinalis* ekstraktų aktyvumą, labai skirtinga. Kintantį antibakterinį aktyvumą gali lemti skirtingi mikroorganizmų šaltiniai [56].

Rausvažiedė ežiulė pasižymi kaip imuninės gynybos linija nuo infekcijų turinti augalas. Šio augalo ekstraktų aktyvumas buvo tiriamas 50 dienų gydant pelių leukemiją, o rezultatai parodė sustiprintą imuninę būklę ir prailgintą gyvenimo trukmę. Buvo ištirti įvairių ežiulių rūšių ir jų cheminių komponentų antimikrobiniai poveikiai prieš keletą mikroorganizmų. Rausvažiedžių ežiulių sudėtyje esantis natūralus antibiotikas echinakozidas parodė antimikrobinį poveikį prieš *Staphylococcus aureus*. *Echinacea purpurea* ekstraktai gali slopinti *Legionella pneumophila*, sukeltą pneumoniją. Yra atlikta tyrimų apie *Pseudomonas aeruginosa* ir *Escherichia coli* slopinimą poliactilenuis, gautais iš *Echinacea purpurea* šaknų. N-heksanas savo sudėtyje turėjęs *Echinacea spp.* ekstraktų pasižymėjo slopinamuoju poveikiu *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehata*, *Candida albicans*, *Candida steatulica* ir *Candida tropicalis* grybeliams, esant beveik ultravioletiniam švitinimui (fototoksiškumui). Taip pat buvo pastebėtas rausvažiedžių ežiulių ekstraktų neutrofilų chemotoksiškumo ir citotoksiškumo didėjimas vėžinėms ląstelėms ir ląstelėms, užkrėstoms parazitais *Leishmania enriettii*. Buvo nustatytas stipresnis rausvažiedžių ežiulių antibakterinis poveikis, palyginus su dviem antibiotikais – eritromicinu ir tilozino tartratu [57].

Antimikrobinis poveikis, iš vaistinių ramunių gautų ekstraktų, buvo pastebėtas tam tikrų rūšių bakterijoms, grybeliams ir virusams *in vitro*. Vaistinių ramunių ekstraktai turėjo priešgrybelinį poveikį *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* ir *Fusarium culmorum*. Iš ramunių gauti esteriai ir laktonai parodė aktyvumą prieš *Mycobacterium tuberculosis* ir *M. avium*, o etanolio ekstraktai slopino herpes ir poliomiolitą virusų augimą. *Matricaria recutita* vandeniniai ekstraktai buvo veiksmingesni prieš pelėsius ir mieles, o alkoholio ekstraktai pasižymėjo didesniu aktyvumu prieš bakterijas [58].

1.11. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Astriniai šeimos augalai dėl savo sudėtyje turinčių farmakologinių ir biologinių veiklių medžiagų yra naudojami kaip vaistai įvairioms ligoms gydyti. Tai pačių įvairiausių ir gausiausių augalų šeima ir yra labai perspektyvi farmakologiniu požiūriu. Daugelis šios šeimos augalų turi fitocheminių junginių, polifenolių, flavonoidų ir antioksidacinius fermentų aktyvumus. Šie fenolio ir antioksidantų junginiai sukelia platų biologinių aktyvumų spektrą ir padidina augalų bei juos vartojančių organizmų atsparumą.

Šis tyrimas buvo atliekamas su vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.), rausvažiedės ežiulės (lot. *Echinacea purpurea* L.) ir vaistinės ramunės (lot. *Matricaria recutita* L.) augalų dalimis (lapais, stiebais ir žiedais) *in vivo* ir kaliaus kultūromis *in vitro*. Tyrimo metu buvo optimizuotos sąlygos kaliaus kultūrų *in vitro* auginimui ir pirminių bei antrinių metabolitų kaupimui. Remiantis įvairiomis metodikomis buvo ištirtos tiriamųjų augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* kiekybinės fenolinių junginių ir flavonoidų koncentracijos bei įvertinti antioksidaciniai ir antibakteriniai aktyvumai.

Mokslinės informacijos apie šių augalų atskirų dalių bei jų pagrindu sukurtų *in vitro* sistemų cheminius junginius, antioksidacines ir antibakterines savybes vis dar gana mažai, todėl tokių savybių įvertinimas ir toliau yra tikslingas ir naudingas ieškant naujų natūralių vaistinių šaltinių.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tiriamasis objektas

Tiriamuoju objektu pasirinkti trys Astrinių šeimos augalai – vaistinė medetka (*Calendula officinalis* L.), rausvažiedė ežiuolė (*Echinacea purpurea* L.) ir vaistinė ramunė (*Matricaria recutita* L.). Tiriamieji medžiaga užauginta Biržuose, žaliava surinkta ir sudžiovintos augalo dalys – žiedai, lapai ir stiebai naudoti tyrimams. Gauti tyrimų rezultatai palyginti su užaugintomis visų šių augalų kaliaus kultūromis *in vitro*.

2.2. Reagentai

Projekte buvo naudoti šie reagentai:

NH₄NO₃, KNO₃, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, KJ, H₃BO₃, MnSO₄·4 H₂O, ZnSO₄·7H₂O, Na₂MoO₄·2H₂O, CuSO₄·5H₂O, CoCl₂·6H₂O, FeSO₄·7H₂O, Na₂EDTA·2H₂O, 1 % K₃[Fe(CN)₆], 96 % C₂H₅OH, CaCO₃, H₃PO₄, FeCl₃·6H₂O (20 mmol/l), FeSO₄·7H₂O, 0,1 M CH₃COOH, 0,1 % FeCl₃, 0,2 M natrio fosfatinis buferis (pH = 6,6), 10 % trichloracto rūgštis, 300 mM acetato buferis (pH = 3,6), 10 mmol TPTZ ištirpintas 40 mmol/l HCl, 0,1 M glicinas (pH = 2,6), 0,1 M natrio acetatas (pH = 4,0), 0,1 M natrio acetatas (pH = 6,0), 0,1 M tris – HCl (pH = 8,0), 0,1 M natrio boratas (pH = 10), 0,066 M K/Na fosfatinis buferis, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, DMSO, polivinilpirolidonas, 40 mM tris - HCl buferis, 10 mM L-metioninas, 54 μM nitromėlynasis tetrazolis, 0,025 % tritonas X – 100, 3 μM riboflavinai, 80 % metanolis, 2 % aliuminio chloridas, ledinė acto rūgštis, ninhidrinai, prolinai, natrio chloridas, triptonas, mielių ekstraktas, mikro agaras, mioinozitolis, nikotino rūgštis, piridoksinas, tiaminas, glicinas, sacharozė, agar-agaras, augimo hormonai, DPPH, acetonas, tanino rūgštis, distiliuotas vanduo, Folino-Kiokalto reagentas, natrio karbonatas, Kumasi briliantinis mėlis, albuminas, Bradfordo reagentas.

2.3. Aparatūra

- Spektrofotometras "*Shimadzu UV-1280*"
- Termostatas "*Binder*"
- Termostatuojama vandens vonelė "*Biosan*"
- Termostatuojamas kratytuvas "*Biosan ES-20*"
- PH matuoklis "*Winlab*"
- Centrifuga "*Universal 320 R*"
- Autoklavas "*Certoclav*"
- Laminaras "*Telstar BV-100*"

2.4. Tyrimo metodai

2.4.1. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas

Vienas iš svarbiausių etapų augalų ląstelių kultūros kultivavimo procese yra tinkamos maitinamosios terpės parinkimas ir išorinių aplinkos faktorių, tokių kaip šviesa ir temperatūra, užtikrinimas. Sukultivavus augalų lasteles *in vitro* maitinamoji terpė buvo sudaryta iš šių komponentų: mikroelementų, makroelementų, geležies ir anglies šaltinių, organinių priedų ir augimo hormonų. Murashige & Skoog (MS) terpė – tai viena iš plačiausiai naudojamų audinių kultūroms skirtų maitinamųjų terpių. Šioje terpėje yra aukštos nitrato, kalio ir amonio jonų koncentracijos, taip pat į jos sudėtį įeina mioinozitolis, nikotininė rūgštis, piridoksino hidrochloridas (B₆) ir tiamino hidrochloridas (B₁) [59].

2.4.2. Augalų ląstelių kultivavimo sąlygos

2.1 lentelė. Maitinamosios Murashige & Skoog (MS) terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale, mg/l	Koncentracija terpėje, mg/l
Makroelementai		
NH ₄ NO ₃	33000	1650
KNO ₃	38000	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	8800	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7400	370
KH ₂ PO ₄	3400	170
Mikroelementai		
KJ	166	0,83
H ₃ BO ₃	1240	6,2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4460	22,3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1720	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	50	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	5	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5	0,025
Geležies šaltinis		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5560	27,8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ 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

Tyrimo metu naudotos terpės sudėtis pateikta 2.1 lentelėje. Optimali kultivavimo temperatūra buvo 20 – 22 °C, fotoperiodas 24 valandos, naudotos MS terpės pH = 5,7. Eksplantai reguliariai kas 3 savaites perkelti į šviežią maitinamąją terpę [60].

2.2 lentelė. MS terpės reagentų koncentracija, paimta iš pradinių tirpalų

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

Tiriamųjų augalų eksplantų kaliaus formavimosi iniciavimui bei regeneracijai buvo paruoštos maitinamosios terpės (žr. 2.2 lentelę), kurių pH išmatuotas naudojant pH – metrą. Nustatytas terpės pH – 5,7. Maitinamoji terpė buvo sterilinta autoklave 120 °C, esant 0,75 – 1 atm. slėgiui, 15 min [61].

2.4.3. Auginimo reguliatorių paruošimas

Svarbų vaidmenį ląstelėse vykstančiuose procesuose atlieka fitohormonai, tai augalų hormonai, kurie reikalingi reguliuojant augalų augimą, vystymąsi, žydėjimą, vaisių formavimąsi ir dauginimąsi. Yra žinoma, kad augalų atsparumą patogenams galima modifikuoti keičiant jautrumą auksinui [60]. Pagrindiniai fitohormonai auksinai ir citokininai pateikti 2.3 ir 2.4 lentelėse.

2.3 lentelė. Auksinai

Sutrumpinimas	Cheminis pavadinimas
2,4-D	2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis
1,4,5-T	2,4,5-trichlorfenoksiacto rūgštis
IAR	3-indolilacto rūgštis
IBR	3-indolilbutano rūgštis
MCPR	2-metil-4-chlorofenoksiacto rūgštis
NAR	1-naftilacto rūgštis
NOR	2-naftiloksiacto rūgštis

2.4 lentelė. Citokininai

Sutrumpinimas	Cheminis pavadinimas
BAP _a	6-benzilaminopurinas
2iP (IPA)	[N ₆ -(2-izopentil)adeninas]
Kinetinas	6-furfurilaminopurinas
Tidiazuronas	1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urėja
Zeatinas	4-hidroksi-3-metil-trans-2 butenilaminopurinas

Auginimo reagentorių paruošimas:

Pasverta 10 mg tiriamojo junginio ir suberta į matavimo kolbą. Įpilta 2 – 5 ml tirpiklio (distiliuoto vandens), kad ištirptų milteliai. Visiškai ištirpdžius tiriamą junginį, buvo įpiltas dvigubas kiekis distiliuoto vandens. Tirpalą išmaišius, pripilta distiliuoto vandens iki 100 ml.

Reikalingas paimti tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris iš pradinio tirpalo apskaičiuotas pagal formulę (2.1):

$$X = \frac{A \times B}{C} \quad (2.1)$$

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.

Tūris buvo praskiestas iki 100 ml ir gauta reikiama koncentracija, mg/l [62].

2.4.4. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose

Paimti išdžiovintų tiriamųjų augalinių medžiagų kiekiai (0,1 g) ir ekstrahuoti metanolyje (5 ml) 45°C 0,5 val. Ekstraktai centrifuguoti ir naudoti tyrimams. Į 0,5 ml skirtingų koncentracijų ekstraktų mėginius, supilta po 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio ir 1,25 ml $K_3[Fe(CN)_6]$. Sumaišyta ir inkubuota 50 °C temperatūroje 20 min. Po to pridėta 1,25 ml 10 % trichloracto rūgštis ir dar kartą sumaišyta. Centrifuguota 10 min [63].

Nucentrifuguoto tirpalo 1,25 ml sumaišyta su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % $FeCl_3$. Mėginiai išmatuoti esant 700 nm bangos ilgiui. Didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcines savybes [63].

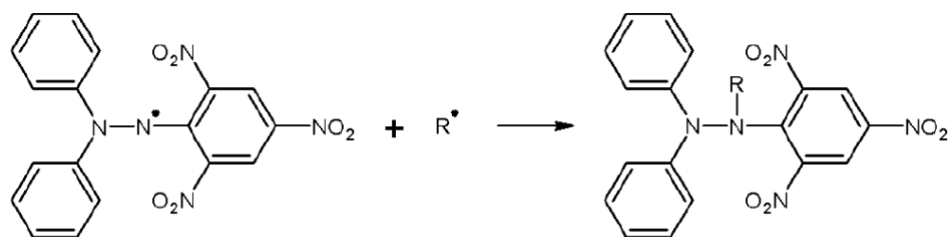
2.4.5. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Šis metodas paremtas galimybe rūgštinėje terpėje redukuoti geležies 2,4,6-tripiridil-s-triazino $[Fe(III)-(TPTZ)_2]^{3+}$ kompleksą į intensyvios mėlynos spalvos $[Fe(II)-(TPTZ)_2]^{2+}$ kompleksą. Vykdyta išdžiovintų augalinių medžiagų (0,1 g) ekstrakcija metanolyje (5 ml) 45 °C, 0,5 h. Ekstraktas centrifuguotas 10 min ir naudotas tyrimams [64].

Ruošti šie reagentai: 300 mM acetato buferis (pH = 3,6), 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l HCl, $FeCl_3 \times 6H_2O$ (20 mmol/l). FRAP reagentas ruoštas su 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 2,5 ml $FeCl_3 \times 6H_2O$ (20 mmol/l). 100 µL mėginiai buvo sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu. Reakcijos mišinys matuotas 593 nm bangos ilgyje spektrofotometriškai. Paruošta skirtingų koncentracijų (5, 10, 15, 20; 25 µmol/L) $FeSO_4 \times 7H_2O$ kalibravimo kreivė. Fe_{2+} reikšmė µmol/L apskaičiuota iš kalibravimo kreivės [64].

2.4.6. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Augalų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas įvertintas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizavo fenoliniai junginiai. Fenoliniai junginiai pasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu, nes buvo inaktyvinti laisvieji radikalai [65].



2.1 pav. Radikalo DPPH• redukcijos reakcija su antioksidantu

Vykdytos reakcijos metu (žr. 2.1 pav.) antioksidantas atidavė vandenilį ir taip išaktyvino laisvuosius radikalus, kurie tapo stabiliais DHHP – H tipo junginiais.

Tyrimo atlikimas: ant 0,2 g susmulkintų augalinių žaliavų užpilta 2 ml metanolio ir homogenizuota 10 min. Homogenatas centrifuguotas 9000 aps./min 10 minučių ir surinktas supernatantas.

Tiriamieji tirpalai ruošti į mėgintuvėlius įpilus 0,077 ml paruoštų ekstraktų ir pridėjus po 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turiniai sumaišyti ir po 15 minučių laikymo tamsoje pamatuoti tirpalų optiniai tankiai prie 515 nm bangos ilgio.

Palyginamasis tirpalas ruoštas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml metanolio ir pridėjus 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.

Etaloninis DPPH tirpalas ruoštas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje. Antioksidacinis aktyvumas įvertintas pagal 2.2 formulę [65]:

$$\% \text{ slopinimas} = [(A_B - A_A) / A_B] \cdot 100 \quad (2.2)$$

A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

2.4.7. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

Į sausas ir susmulkintas augalines medžiaga buvo įpilta po 10 ml acetono (70 %) ir maišyta kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Vėliau mėgintuvėliai centrifuguoti 10 min 9000 aps/min 40 C. Supernatantai surinkti ir laikyti ant ledo [66].

Kalibravimo kreivės parengimas. Į mėgintuvėlius paimta skirtingų koncentracijų (0,0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 110; 120; 130 μ l) standartinio tanino rūgšties tirpalo ir distiliuotu vandeniu pripildyta iki 500 μ l. Į šiuos tirpalus pridėta po 250 μ l Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato tirpalų. Sumaišyta ir inkubuota kambario temperatūroje 40 min tamsoje. Po 40 min matuota absorbcija prieš tuščią mėginį.

Bendras fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas. Paimta atitinkama koncentracija paruošto ekstrakto ir praskiesta vandeniu iki 500 μ l. Pridėta 250 μ l Folino-Kiokalto reagento ir įpilta 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišyta ir matuota absorbcija tirpalo 725 nm bangos ilgyje po 40 min laikymo tamsoje. Apskaičiuota bendra fenolinių junginių koncentracija pagal 2.3 formulę [66]:

$$x = aV \cdot 100/nV_1 \quad (2.3)$$

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;

V – pradinis ekstrakto tūris ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris paimtas praskiedimui, ml;

n – augalinė masė, mg.

2.4.8. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

0,5 g susmulkintų augalinių žaliavų buvo sumaišyta su 5 ml 80 % metanolio. Parą laiko vykdytas maišymas termostatuojamame kratytuve prie 150 rpm. Po paros homogenatai nucentrifuguoti 9000 rpm 10 min ir supernatantai naudoti tyrimui [67].

Bendroji flavonoidų koncentracija nustatyta naudojant aliuminio chloridą. Buvo paimta po 0,1 ml tiriamųjų ekstraktų, pripildyta 80 % metanoliumi iki 1 ml ir pridėta po 1 ml 2 % aliuminio chlorido. Mišiniai palikti stovėti 30 min. Absorbcijos išmatuotos 415 nm bangos ilgyje. Sudaryta kvercetino kalibravimo kreivė. Flavonoidų koncentracija mg/g pagal kvercetiną apskaičiuota pagal 2.4 formulę [67]:

$$C = \frac{C_1 \times V}{g} \quad (2.4)$$

C₁ – iš kalibravimo kreivės nustatyta kvercetino koncentracija, mg/ml; V – ekstrakto pradinis tūris, ml; g – augalinė masė, g.

2.4.9. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Fermento superoksido dismutazės aktyvumui nustatyti reikalinga sudaryti albumino kalibravimo kreivę.

Albumino kalibravimo kreivės sudarymas:

Albumino tirpalas buvo paruoštas 25 mg albumino ištirpinus 25 ml vandens. Iš pradinio tirpalo buvo paimti žinomo tūrio (žr. 2.5 lentelę) mėginiai ir iki 10 ml praskiesti distiliuotu vandeniu [68].

2.5 lentelė. Kalibravimo kreivės sudarymas

Eil. Nr.	Albumino pradinio tirpalo tūris, ml	Iki 10 ml skiesto tirpalo koncentracija, mg/ml
1	0,2	0,02
2	0,4	0,04
3	0,6	0,06
4	0,8	0,08
5	1,0	0,1
6	1,2	0,12
7	1,4	0,14
8	1,6	0,16
9	1,8	0,18

Kalibravimo kreivei į pirmą mėgintuvėlį įpilta 0,2 ml distiliuoto vandens, o į 2 – 9 mėgintuvėlius po 0,2 ml skiesto albumino tirpalo. Vėliau į visus mėgintuvėlius buvo įpilta po 2 ml Bradfordo reagento. Mėginiai sumaišyti ir matuoti naudojant spektrofotometrą esant 595 nm bangos ilgiui. Nubraižyta kalibravimo kreivė [68].

SOD aktyvumo įvertinimas:

0,1 g susmulkintose tiriamuosiuose augalinėse žaliavose vykdyta tirpių baltymų ekstrakcija 0,066 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH = 7,4) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM ditionitritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsufonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1 – 3 mg polivinilpirolidono. Mėginiai centrifuguoti 9000 aps/min 10 min. Supernatantai surinkti į Eppendorf mėgintuvėlius ir dar kartą centrifuguoti.

Baltymų nustatymui paimta po 200 µl mėginio ir įpilta po 2 ml Bradfordo reagento. Išmatuota šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Paruošta baltymų kalibravimo kreivė pagal albuminą.

Į 2 ml reakcijos mišinio pridėta: 40 µl fermentinio preparato, 400 µl 200 mM tris – HCl buferio (pH = 7,8), 200 µl 100 mM *L*-metionino, 200 µl 540 µM nitromėlynojo tetrazolio, 500 µl 0,1 % tritono X-100, 20 µl 300 µM riboflavino ir 620 µl distiliuoto vandens. Paruoštas kontrolinis mėginys be fermentinio preparato.

Reakcija atlikta apšvietus liuminescentinėmis lempomis 30 min. Kaip kontrolė naudotas mišinys be fermentinio preparato. Šviesos sugertis matuota 560 nm bangos ilgyje.

Fermento aktyvumas apskaičiuotas pagal formulę 2.5 [68]:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{\log 2 \times m} \quad (2.5)$$

A – SOD aktyvumas vnt/mg;

E_K – kontrolinio bandinio šviesos sugertis;

E_T – tiriamojo bandinio šviesos sugertis;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml (baltymo koncentracija apskaičiuota pagal Bradfordo metodą).

2.4.10. *L*-Prolino koncentracijos įvertinimas

100 mg susmulkintų vaistinių tiriamųjų augalinių žaliavų užpilta 4 ml distiliuoto vandens. 3 min mėgintuvėliai su augaline žaliava kaitinti ir atšaldyti. Procedūra kartota iš viso tris kartus. Ekstraktas centrifuguotas 10 min 9000 aps/min., praskiestas iki 6 ml ir toliau naudotas tyrimams [69].

Į kitą mėgintuvėlį įpilta 1 ml ekstrakto, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir buvo kaitinama 1 val vandens vonelėje. Į kontrolinį mėginį vietoj ekstrakto įpiltas 1 ml distiliuoto vandens. Šviesos sugertis matuota 520 nm bangos ilgyje.

L-Prolino koncentracija apskaičiuota naudojantis *L*-proline kalibravimo kreive ir pagal formulę 2.6 [69]:

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

C_x – *L*-prolino koncentracija $\mu\text{mol/g}$;

E – tirpalo šviesos sugertis;

k – *L*-prolino koncentracija, nustatyta iš kalibravimo kreivės (μmol);

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

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g.

***L*-Prolino kalibravimo kreivė:**

Pasvertas 0,0011 g *L*-prolino ir ištirpintas 10 ml H₂O (1 mM). Paruošta skirtingų koncentracijų *L*-prolino kalibravimo kreivė (0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,175 mM)

Iš pradinio tirpalo paimti atitinkami *L*-prolino kiekiai į mėgintuvėlius:

- 1) Į tuščią bandinį įpilta 1 ml H₂O, 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento.
- 2) 0,025 ml *L*-prolino praskiesta iki 1 ml su H₂O, pridėta 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento.
- 3) 0,025 ml *L*-prolino praskiesta iki 1 ml su H₂O, pridėta 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento.
- 4) 0,075 ml *L*-prolino praskiesta iki 1 ml su H₂O, pridėta 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento.
- 5) 0,1 ml *L*-prolino praskiesta iki 1 ml su H₂O, pridėta 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento.
- 6) 0,125 ml *L*-prolino praskiesta iki 1 ml su H₂O, pridėta 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento.
- 7) 0,15 ml *L*-prolino praskiesta iki 1 ml su H₂O, pridėta 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento.
- 8) 0,175 ml *L*-prolino praskiesta iki 1 ml su H₂O, pridėta 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento.

Mėgintuvėliai kaitinti 1 val. verdančioje vandens vonelėje ir atšaldyti. Matuota šviesos sugertis 520 nm bangos ilgyje [69].

2.4.11. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas tiriamuosiuose augaluose

Karotinoidų bei chlorofilo *a* ir *b* įvertinimas vaistinių tiriamųjų augalų audiniuose paremtas spektrofotometriškai nustatant šviesos sugertį esant skirtingiems bangos ilgiams:

- Chlorofilui *a* (662 nm);
- Chlorofilui *b* (644 nm);
- Karotinoidams (441 nm).

Karotinoidų nustatymui į mėgintuvėlius paimta po 0,1 g susmulkintų tiriamųjų augalinių medžiagų. Į juos pridėta 0,05 g CaCO₃ ir 20 ml 96 % C₂H₅OH, po to viskas susmulkinta iki vientisos masės ir nufiltruota. Nufiltruoto ekstrakto tūris išmatuotas cilindru. Vėliau ekstraktai praskiesti etanoliu ir stebėtas jų optinis tankis, kuris buvo nuo 0,1 iki 0,8. Filtratas supiltas į matavimo kiuvetę ir matavimai atlikti spektrofotometru esant 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidai) bangų ilgiams [70].

Pigmentų koncentracija apskaičiuota pagal formules [70]:

Chlorofilo *a* koncentracija (mg l⁻¹) apskaičiuota pagal formulę 2.7:

$$C_a = 9,784 \cdot D_{662} - 0,99 \cdot D_{644}; \quad (2.7)$$

Chlorofilo *b* koncentracija (mg l⁻¹) apskaičiuota pagal formulę 2.8:

$$C_b = 21,426 \cdot D_{644} - 4,65 \cdot D_{662}; \quad (2.8)$$

$$C_a + C_b = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644}; \quad (2.9)$$

Karotinoidų koncentracija (mg l⁻¹) apskaičiuota pagal formulę 2.9:

$$C_{\text{karotinoidai}} = 4,695 \cdot D_{441} - 0,268 \cdot (C_a + C_b); \quad (2.10)$$

Pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuota pagal formulę 2.10:

$$X = C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100 / n \cdot V_1 \cdot 1000 \quad (2.11)$$

C – pigmentų koncentracija mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris;

*V*₁ – paimtas praskiedimui pradinis ekstrakto tūris, ml;

*V*₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g.

2.4.12. Liuteino koncentracijos įvertinimas tiriamuosiuose augaluose

Buvo paimta po 100 mg tiriamųjų augalinių žaliavų ir įpilta po 20 ml acetono. Maišyta termostatuojamame kratytuve esant 250 rpm, 3 val. Suspensijos buvo paliktos stovėti 5 min ir centrifuguotos 10 min 9000 aps/min. Supernatantai buvo surinkti, o nuosėdos maišytos 1 valandą su acetonu (10 ml). Mėgintuvėliai nucentrifuguoti 15 min 9000 aps/min ir šviesos sugertis išmatuota prie 446 nm bangos ilgio [71].

Liuteino koncentracija apskaičiuota pagal 2.12 formulę [71]:

$$C = \frac{A_{446}}{(14.45 \cdot 10^4)} \cdot \left(\frac{1}{b}\right) \cdot 568.88 \cdot \frac{V}{M} \cdot \frac{1L}{10^3 ml} \cdot 10^3 \frac{mg}{g} \cdot \frac{kg}{10^3 g} \quad (2.12)$$

X – liuteino koncentracija, mg/g;

A_{446} – šviesos sugertis;

b – bangos ilgis, 1 cm;

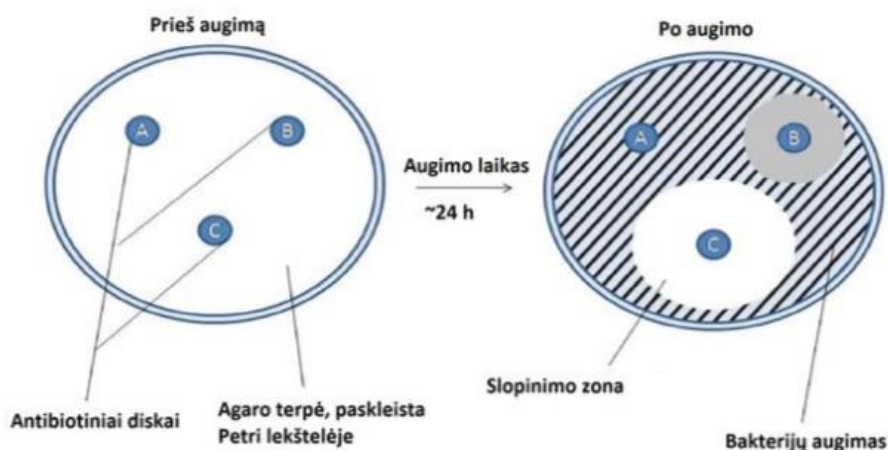
V – ekstrakto tūris, ml;

M – augalinė žaliava, kg;

$14,45 \times 10^4$ – molinis ekstinkcijos koeficientas ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.4.13. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaru difuziniu metodu

Ant LB terpės *Petri lėkštelėse* paskirstyta po 50 μl *E.Coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijų suspensijų ir uždėti popieriniai diskeliai, kurie buvo suvilgyti po 25 μl tiriamųjų vaistinių augalų ekstraktų. Palyginimui popieriniai diskeliai taip pat buvo suvilgyti su 25 μl ir 50 μl antibiotiko Ciprofloksacino. *Petri lėkštelės* buvo patalpintos į termostatą, kuriame temperatūra buvo 37 °C. Praėjus vienai parai buvo stebėtas bakterijų augimas ir antibiotikų bei vaistinių tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinis poveikis (žr. 2.2 pav.) [72].



2.2 pav. Augalinių ekstraktų antibakterinių savybių įvertinimas agaru difuziniu metodu

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas

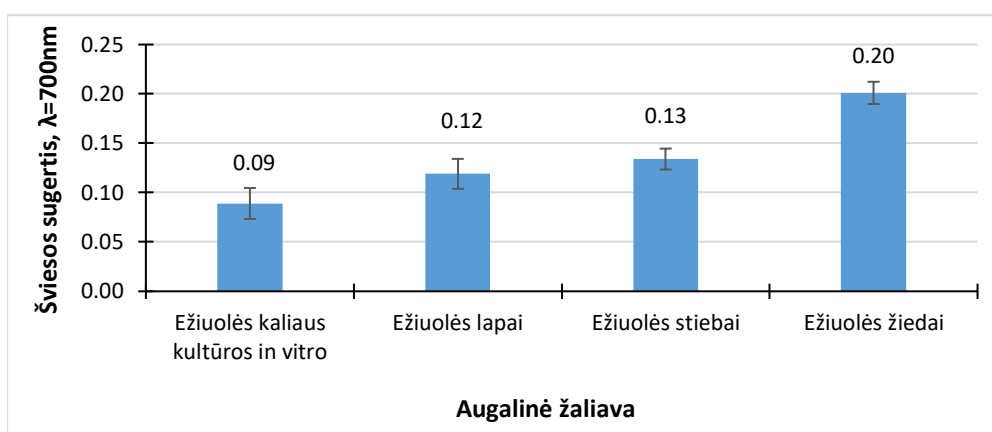
Buvo naudotos skirtingos maitinamosios terpės kaliaus kultūrų auginimui *in vitro*.

3.1 lentelė. Augalų eksplantų kultūrų augimą inicijuojančių terpių sudėtys

Augalo pavadinimas	Terpės sudėtis
Vaistinė medetka (<i>Calendula officinalis</i> L.)	TDZ (0,5 mg/l) + IAR (0,1 mg/l),
Rausvažiedė ežiulė (<i>Echinacea purpurea</i> L.)	BAP (3 mg/l) + IBR (0,5 mg/l)
Vaistinė ramunė (<i>Matricaria recutita</i> L.)	TDZ (0,5 mg/l) + IAR (0,1 mg/l)

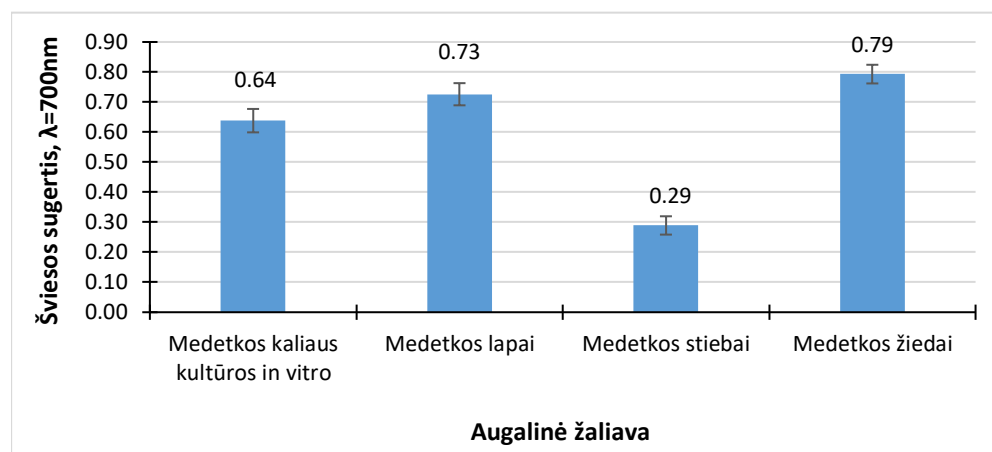
3.2. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose

Atlikus visų tiriamųjų augalų antioksidacinių savybių tyrimą buvo pastebėta, kad stipriausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo visų tiriamųjų augalų žiedų ekstraktai *in vivo* ekstraktai.



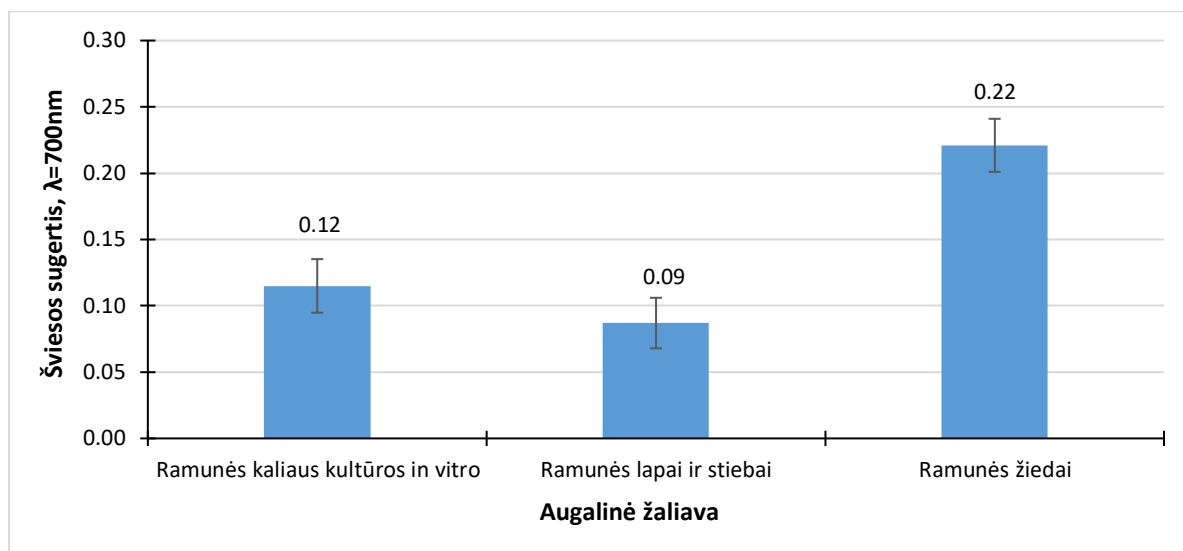
3.1 pav. Ežiulės augalo dalių *in vivo* ir *in vitro* redukcinių savybių pasiskirstymas pagal šviesos sugertį

Ežiulės žiedų *in vivo* ekstrakto buvo nustatyta didžiausia šviesos sugertis – 0,20 A, o lapų ir stiebų *in vivo* ekstraktuose, atitinkamai 0,12 A ir 0,13 A, taigi lapų ekstraktas pasižymėjo silpnesnėmis redukcinėmis savybėmis negu stiebų ekstraktas. Ežiulės *in vitro* ekstraktas pasižymėjo silpniausiomis redukcinėmis savybėmis, šviesos sugertis – 0,09 A. Rezultatai pateikti 3.1 paveiksle.



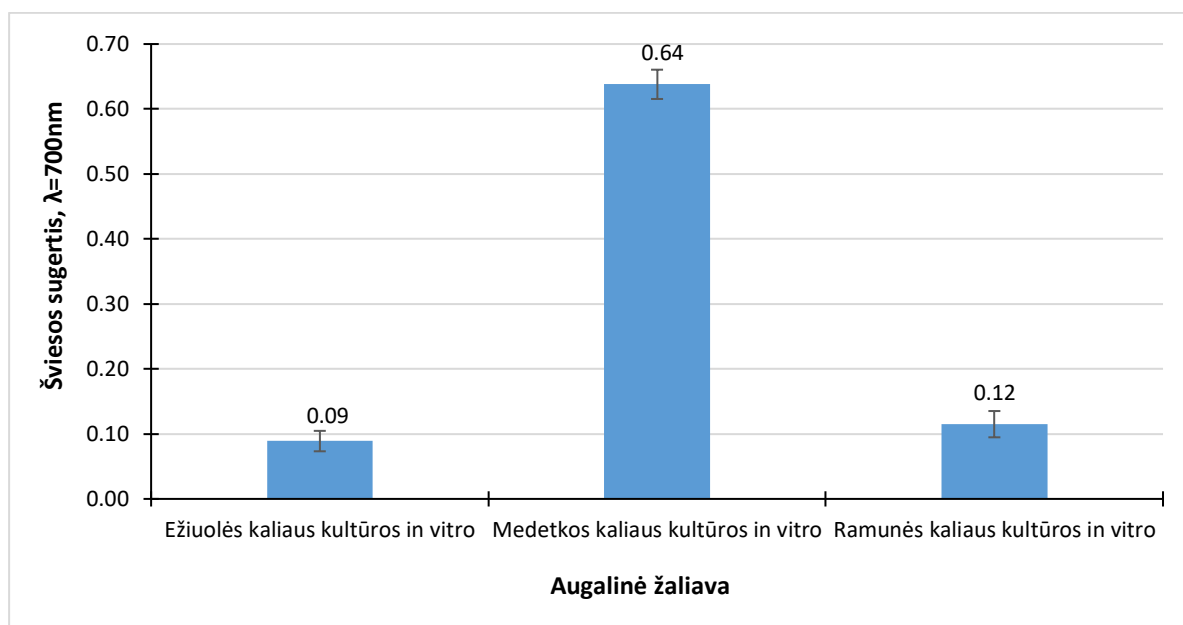
3.2 pav. Medetkos augalo dalių *in vivo* ir *in vitro* redukcinių savybių pasiskirstymas pagal šviesos sugertį

Lyginant su kitais tiriamaisiais augalais, medetkos ekstraktai pasižymėjo stipriausiomis redukciniomis savybėmis, rezultatai pateikti 3.2 paveiksle. Žiedų *in vivo* ekstraktas parodė didžiausią antioksidacinį aktyvumą – 0,79 A, truputį mažesni – lapų (0,73 A). Iš visų medetkos ekstraktų silpniausiomis redukciniomis savybėmis pasižymėjo stiebai *in vivo* – 0,29 A.



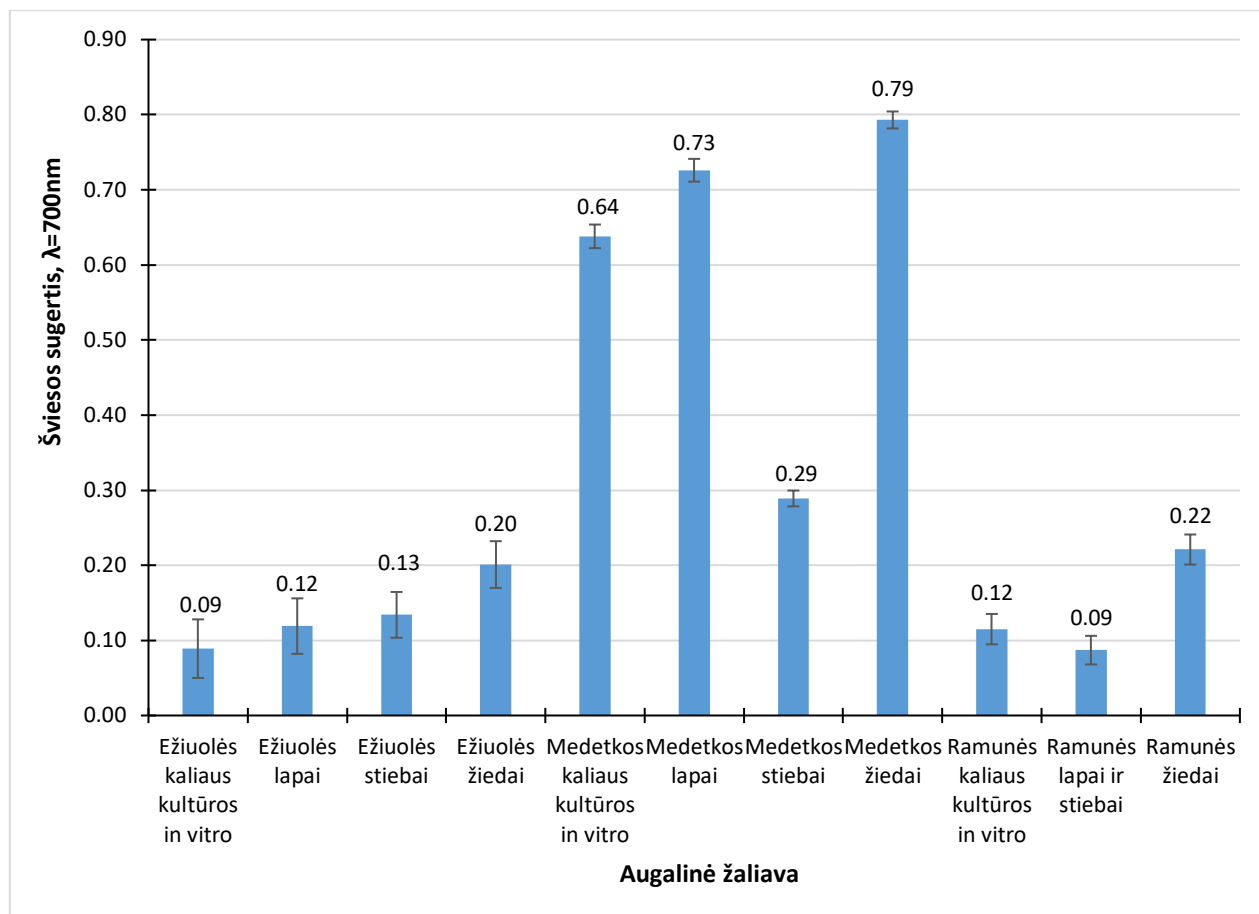
3.3 pav. Ramunės augalo dalių *in vivo* ir *in vitro* redukcinių savybių pasiskirstymas pagal šviesos sugertį

Vaistinės ramunės žiedų ekstraktas *in vivo* pasižymėjo stipriausiomis savybėmis (0,22 A), o du kartus silpnesnėmis kaliaus kultūros *in vitro* (0,12 A). Ramunės lapų ir stiebų ekstraktas *in vivo* parodė pačias silpniausias redukcines savybes (0,09 A), lyginant su kitomis tiriamiojo augalo dalimis. Rezultatai pateikti 3.3 paveiksle.



3.4 pav. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų *in vitro* redukcinių savybių pasiskirstymas pagal šviesos sugertį

Palyginus visų tiriamųjų augalų kaliaus kultūras (žr. 3.4 pav.), pastebėtas didelis skirtumas tarp medetkos (0,64 A) ir ežiuolės (0,09 A) *in vitro* ekstraktų.



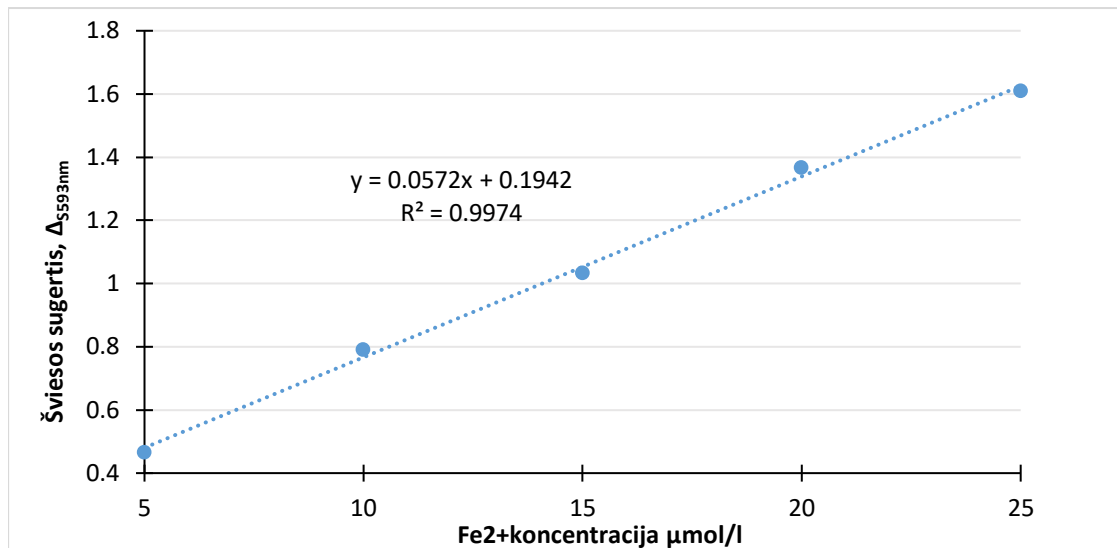
3.5 pav. Tiriamųjų augalų redukcinių savybių pasiskirstymas pagal šviesos sugertį

Iš bendrų rezultatų, pateiktų 3.5 paveiksle, matyti, kad didžiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo medetkos augalinė žaliava. Medetkos žiedų ekstrakto *in vivo* nustatyta 0,793 A šviesos sugertis, lapuose *in vivo* – 0,73 A, o kaliaus kultūrose *in vitro* – 0,64 A. Mažiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo ramunės lapų ir stiebų *in vivo* (0,09 A) ir ežiuolės kaliaus kultūrų *in vitro* (0,09 A) ekstraktai.

Literatūroje pateikti tik medetkos žiedų *in vivo* ir medetkos lapų *in vivo* ekstraktų rezultatai, mokslininkai Tugba Ercetin, Fatma Sezer Senol ir kiti 2012 metais atliko medetkos žiedų *in vivo* ir lapų *in vivo* ekstraktų redukcinių savybių nustatymo tyrimą skirtinguose tirpikliuose. Spektrofotometru buvo nustatyta metanolyje ekstrahuotų medetkos žiedų *in vivo* šviesos sugertis – 0,061 A, o medetkos stiebų *in vivo* – 0,105 A [73]. Redukcinės augalo savybės priklauso nuo augalo auginimo sąlygų ir jo surinkimo vietos.

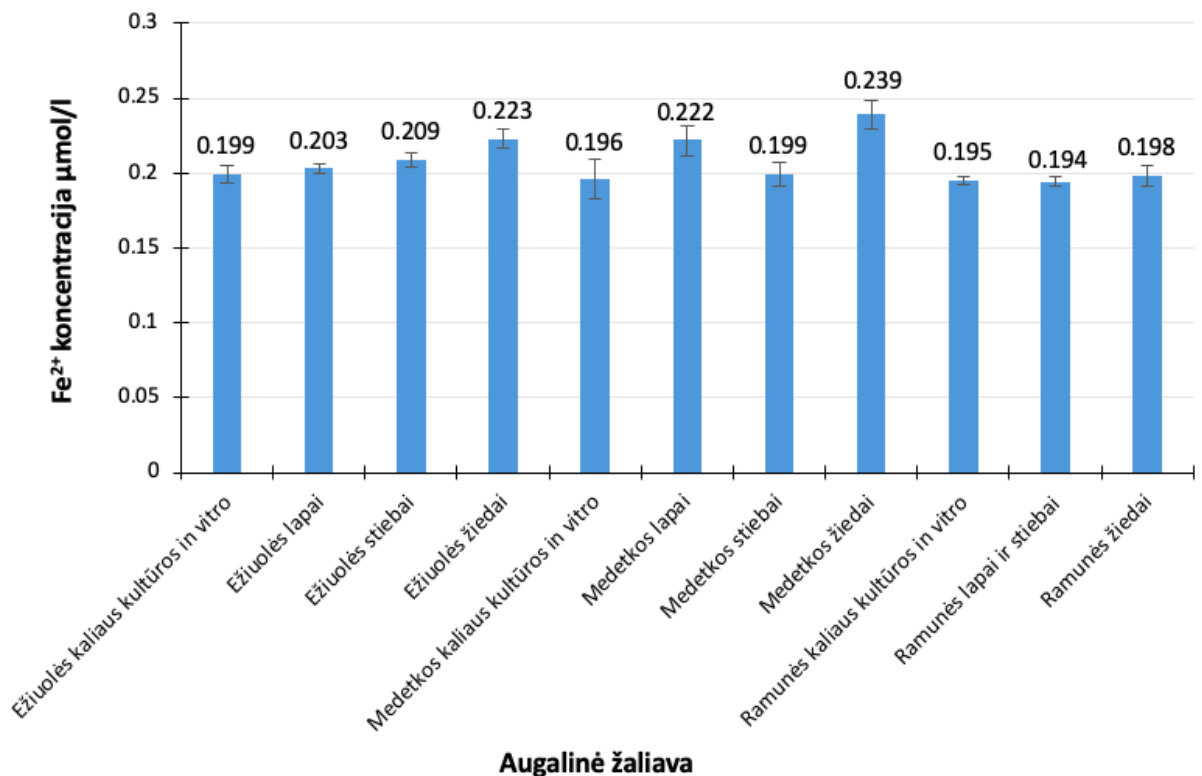
3.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Pirmiausia buvo paimti skirtingų koncentracijų geležies (Fe^{2+}) tirpalai ir pamatuoti jų optiniai aktyvumai. Sudaryta kalibravimo kreivė, kuri pateikta 3.6 paveiksle.



3.6 pav. Fe²⁺ koncentracijos priklausomybė nuo šviesos sugerties

Remiantis kalibravimo kreive apskaičiuotos tiriamųjų augalų ekstraktų Fe²⁺ koncentracijos, sudaryta bendra diagrama, kuri pateikta 3.7 paveiksle.

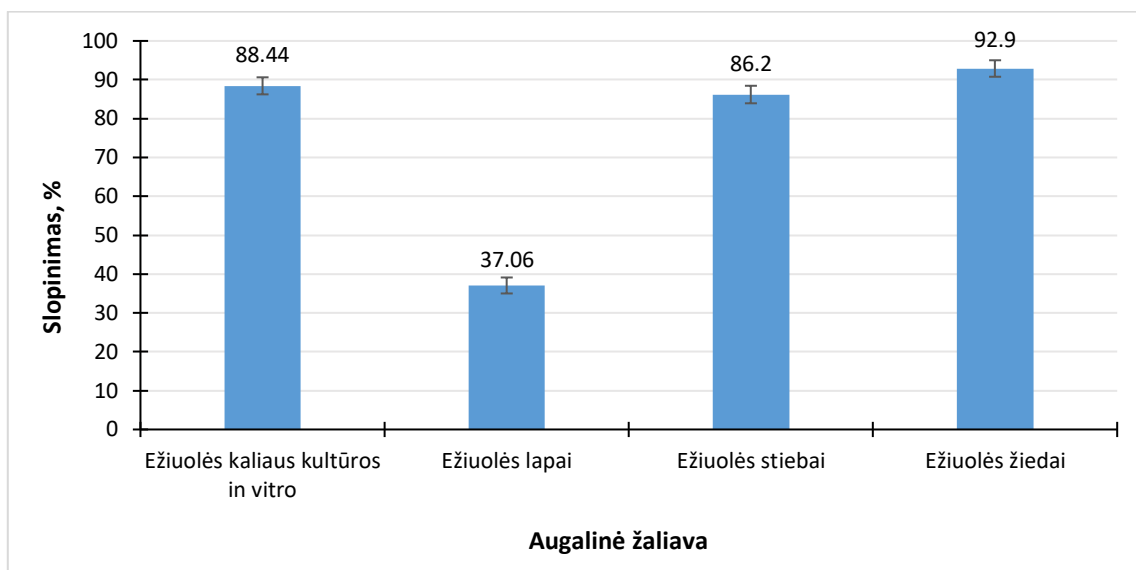


3.7 pav. Antioksidacinis aktyvumas tiriamųjų augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Atlikus antioksidacinio aktyvumo nustatymą, pagal FRAP metodą, buvo pastebėta, kad stipriausiomis savybėmis pasižymėjo medetkos (0,239 µmol/l) ir ežiuolės (0,223 µmol/l) žiedų *in vivo* ekstraktai. Visos kitos augalų dalys parodė labai panašius rezultatus, tačiau nors ir nežymiai, bet ramunės lapų ir stiebų *in vivo* ekstrakto aktyvumas buvo silpniausias – 0,194 µmol/l.

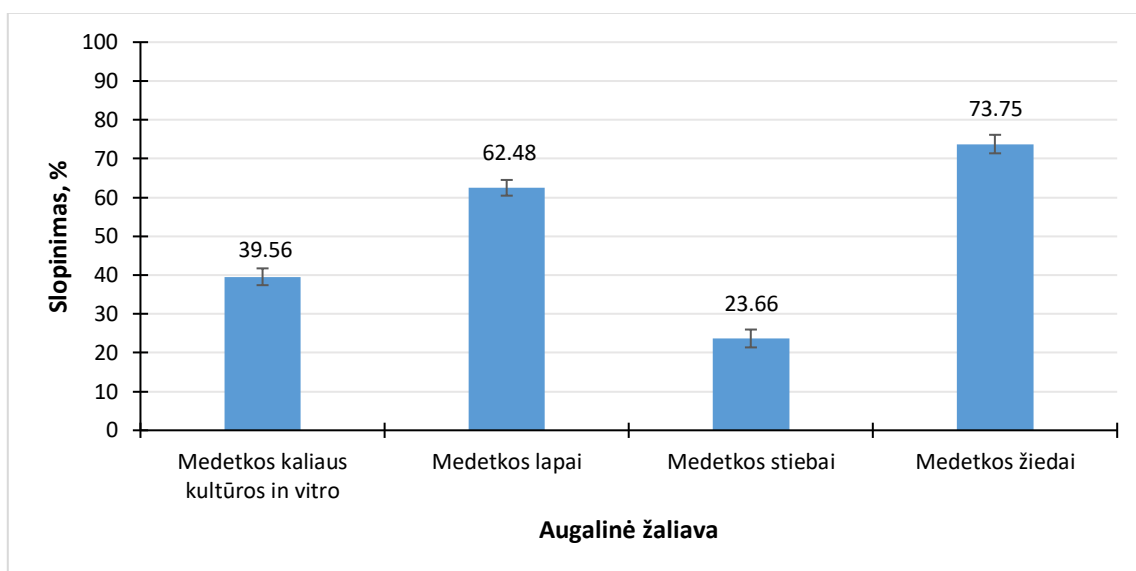
3.4. Augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Atlikus antioksidacinio aktyvumo nustatymą DPPH metodu, buvo pastebėta, kad daugiausia DPPH radikalo neutralizavo visų tiriamųjų augalų žiedų ekstraktai.



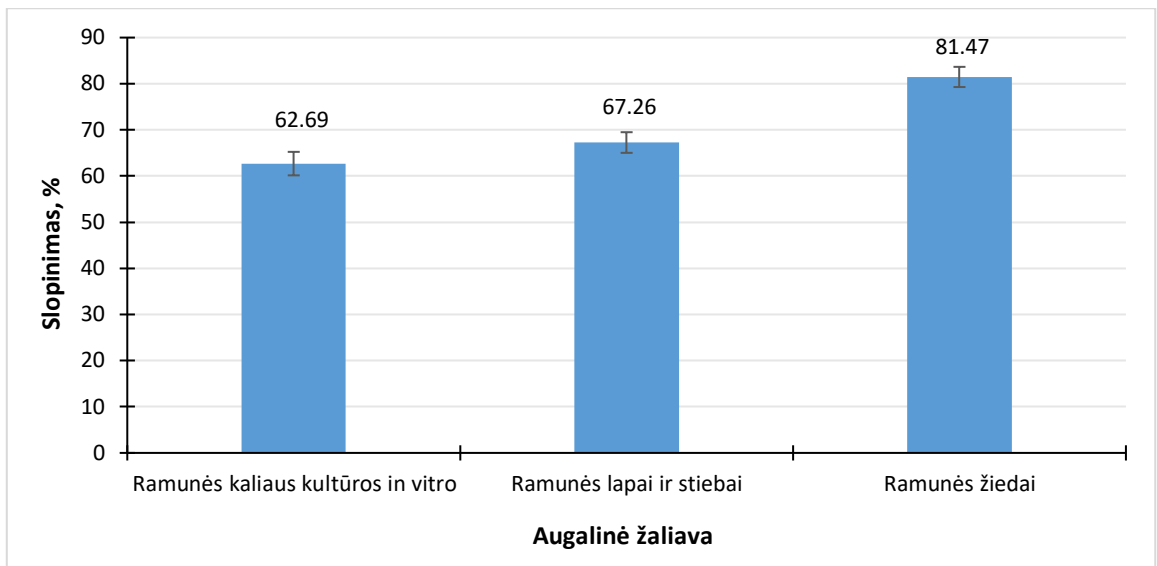
3.8 pav. Antioksidacinis aktyvumas DPPH ežiuolės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Ežiuolės augalo dalių *in vivo* ir *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo rezultatai pateikti 3.8 paveiksle. Nustatytas didžiausias radikalo slopinimas ežiuolės žiedų ekstrakto – 92,9 %, truputį mažesnis ežiuolės kaliaus kultūrose *in vitro* (88,44 %). Lyginant visas ežiuolės *in vivo* užaugintas augalo dalis, ežiuolės lapų ekstraktas parodė mažiausią slopinimą – 37,06 %.



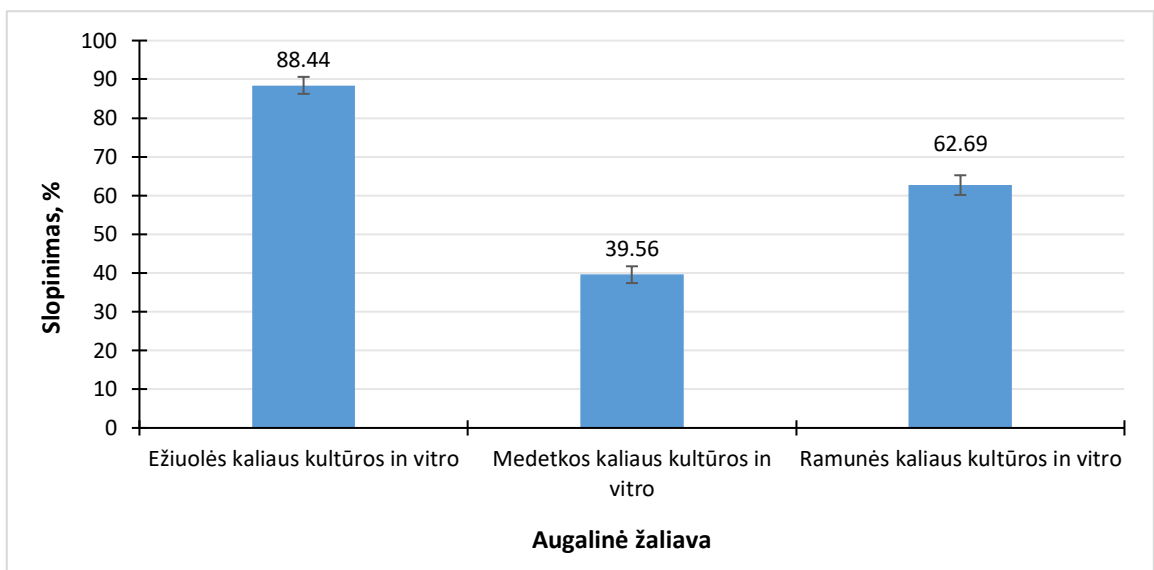
3.9 pav. Antioksidacinis aktyvumas DPPH medetkos augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Medetkos ekstraktų rezultatai pateikti 3.9 paveiksle, didžiausius rezultatus parodė medetkos žiedų (73,75 %) ir lapų (62,48 %) ekstraktai. Medetkos stiebų (23,66 %) ekstraktas DPPH radikalą slopino 3 kartus mažiau negu medetkos žiedų ekstraktas.



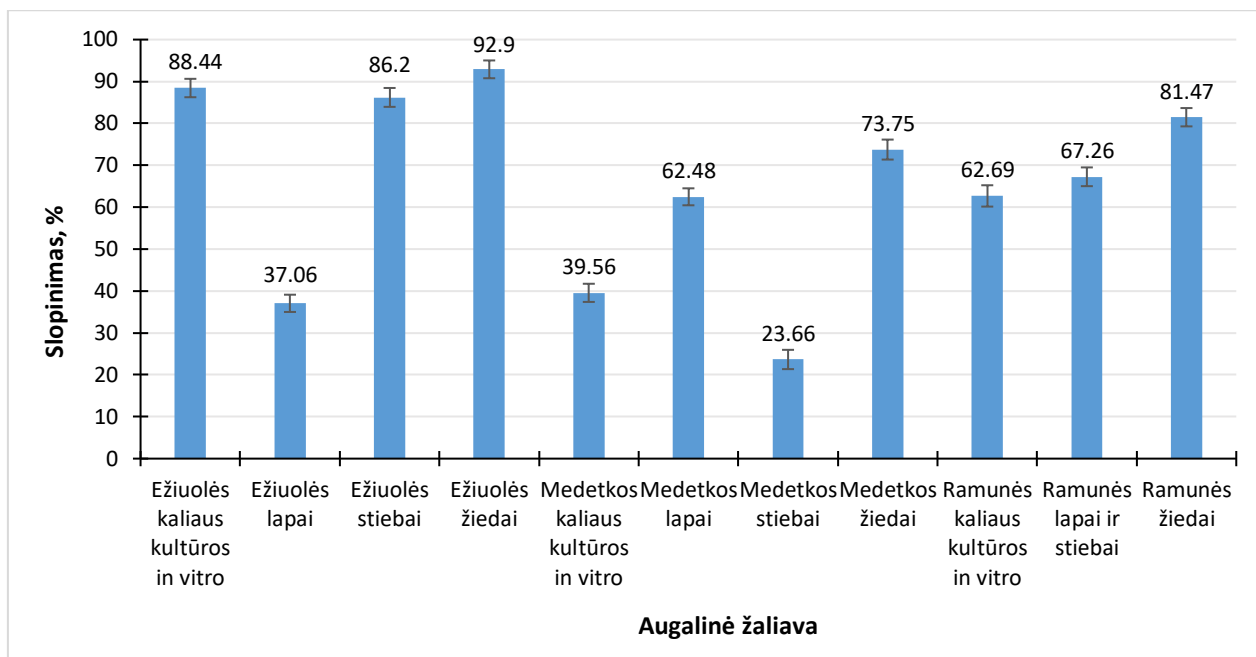
3.10 pav. Antioksidacinis aktyvumas DPPH vaistinės ramunės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Labiausiai DPPH radikalą slopino ramunės žiedų *in vivo* (81, 47 %) ekstraktas, o lapų ir stiebų – 67,26 %. Vaistinės ramunės *in vitro* ekstraktas parodė mažesnę aktyvumą (62,69 %), lyginant su *in vivo* augalo dalimis. Vaistinės ramunės ekstraktų antioksidaciniai rezultatai pateikti 3.10 paveiksle.



3.11 pav. Antioksidacinis aktyvumas DPPH medetkos augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Palyginus visų tiriamųjų augalų kaliaus kultūras *in vitro* pastebėta, kad labiausiai DPPH radikalas buvo slopinamas ežiuolės ekstrakto (88,44 %). Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo medetkos ekstraktas (39,56 %), rezultatai pateikti 3.11 paveiksle.



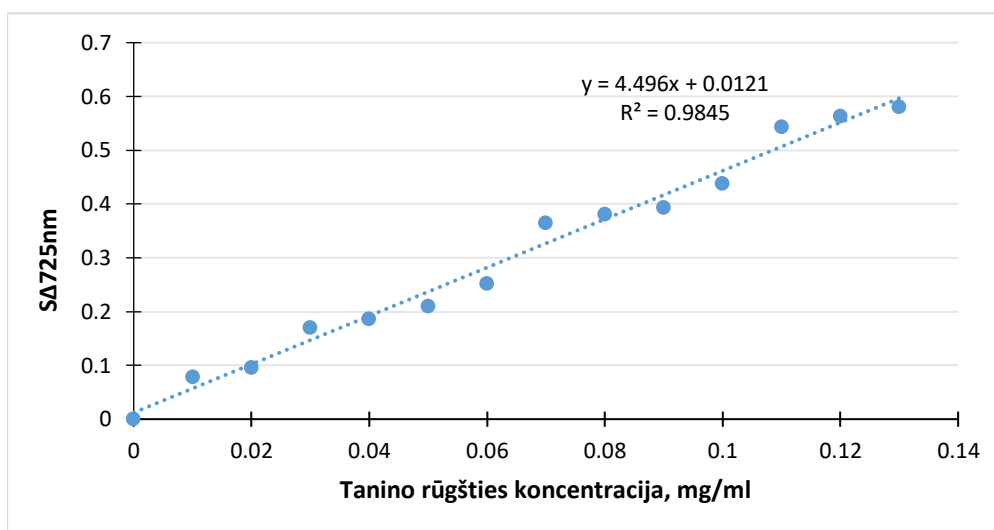
3.12 pav. Antioksidacinis aktyvumas DPPH medetkos augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Apibendrinant gautus rezultatus, pateiktus 3.12 paveiksle, matyti, kad labiausiai DPPH radikalas buvo slopinamas ežiuolės žiedų *in vivo*, ežiuolės kaliaus kultūrų *in vitro* ir ežiuolės stiebų *in vivo* ekstraktų, atitinkamai 92,9 %, 88,44 % ir 86,2 %. Mažiausias slopinimas buvo nustatytas medetkos stiebų ekstrakto *in vivo* (23,66 %).

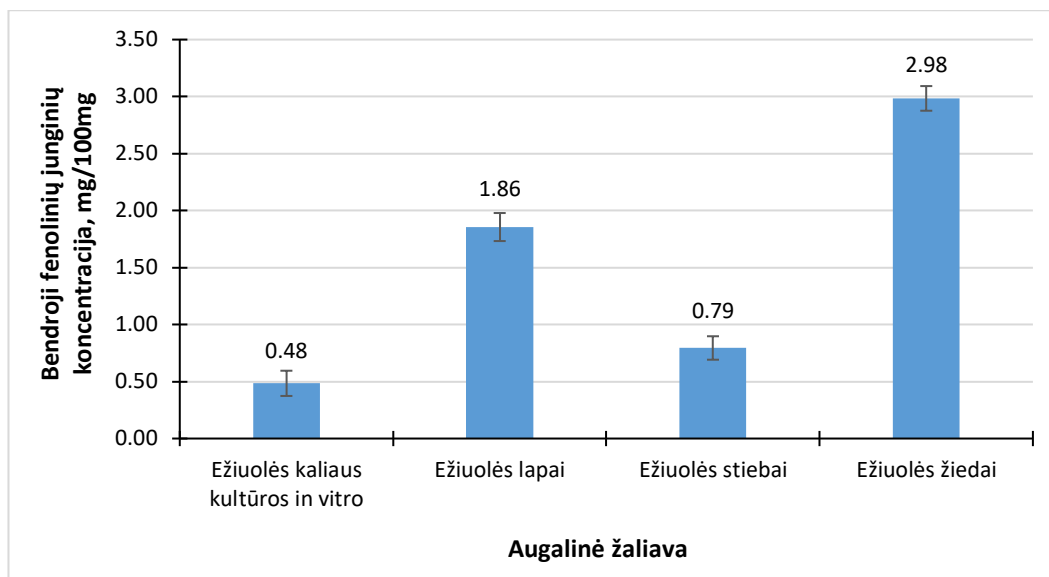
Literatūroje pateikti rezultatai labai panašūs. Mokslininkų hah ir kitų atliktame antioksidacinio aktyvumo tyrime buvo nustatytas ežiuolės žiedų *in vivo* DPPH radikalo slopinimas 94,40 % [74], tačiau ežiuolės stiebų *in vivo* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas literatūroje nepateiktas.

3.5. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

Nustatyti bendrajai fenolinių junginių koncentracijai, buvo sudaryta kalibravimo kreivė, kuri pateikta 3.13 paveiksle.

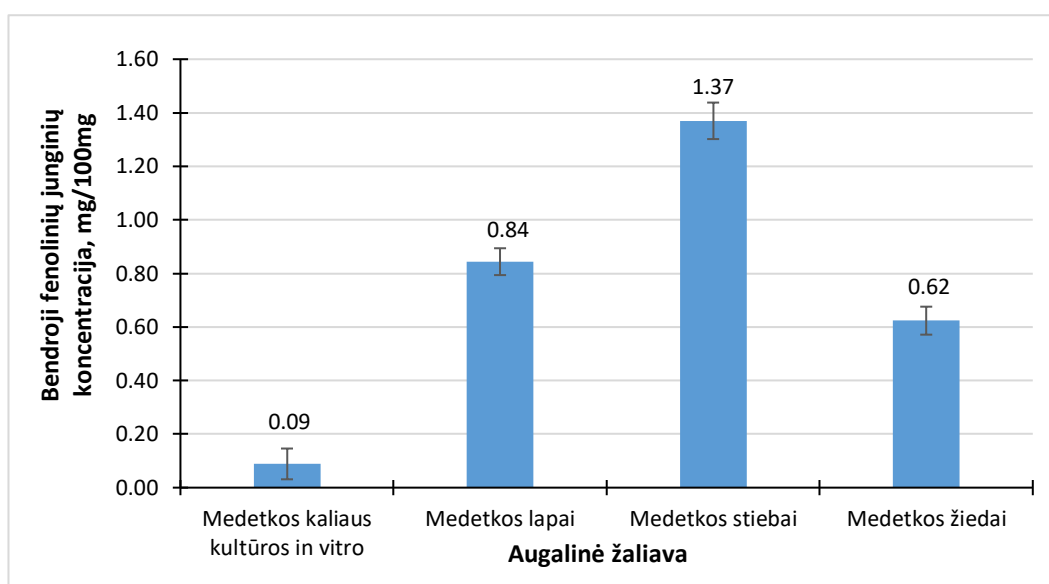


3.13 pav. Tanino rūgšties koncentracijos priklausomybė nuo šviesos sugerties



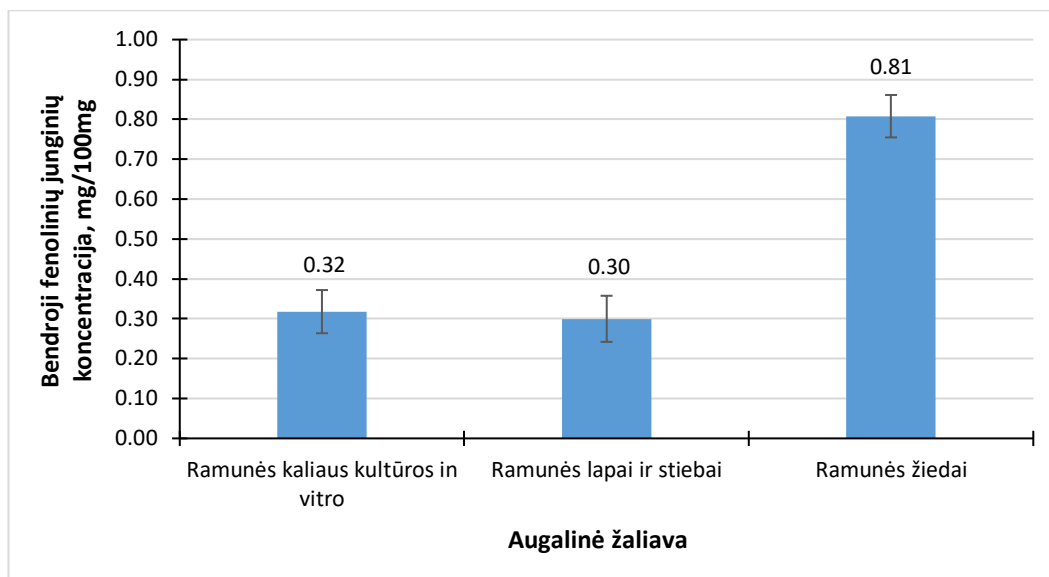
3.14 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija ežiuolės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Nustatius bendrąją fenolinių junginių koncentraciją Folino-Kiokalto metodu, ežiuolės augalo ekstraktuose *in vivo* ir *in vitro*, buvo pastebėta, kad didžiausią koncentraciją sukaupė žiedų *in vivo* ekstraktas (2,98 mg/100mg) ir truputį mažesnę lapų *in vivo* (1,86 mg/100mg). Mažiausia fenolinių junginių koncentracija nustatyta kaliaus kultūrose *in vitro* (0,48 mg/100mg). Rezultatai pateikti 3.14 paveiksle.



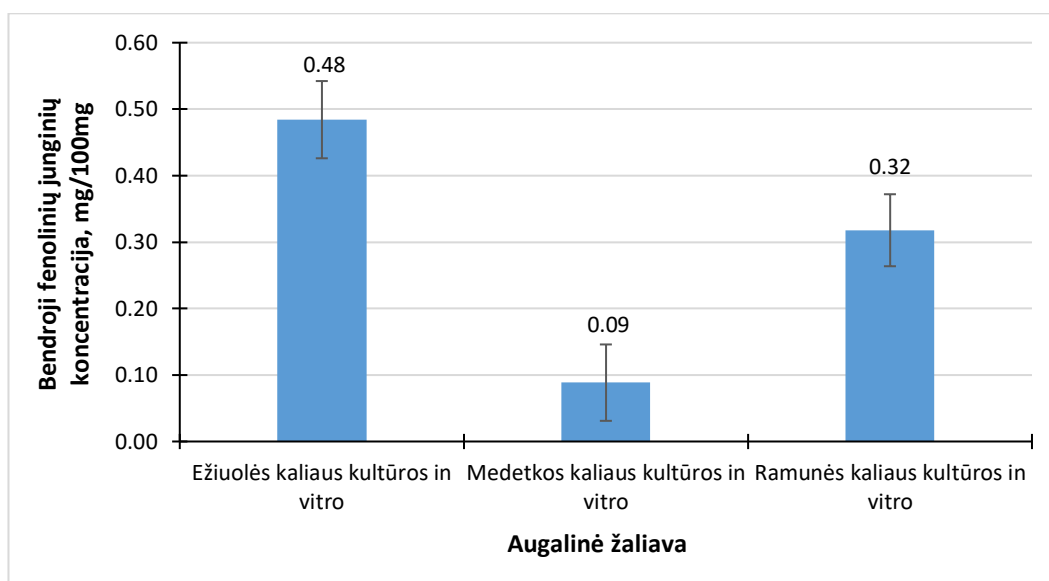
3.15 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija medetkos augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Medetkos augalo dalys *in vivo* parodė geresnius rezultatus negu kaliaus ekstraktas *in vitro*. Gauti rezultatai pateikti 3.15 paveiksle. Medetkos stiebų (1,37 mg/100mg) ir lapų (0,84 mg/100mg) *in vivo* ekstraktuose buvo nustatyta daugiau fenolinių junginių lyginant su kaliaus kultūromis *in vitro* (0,09 mg/100mg).



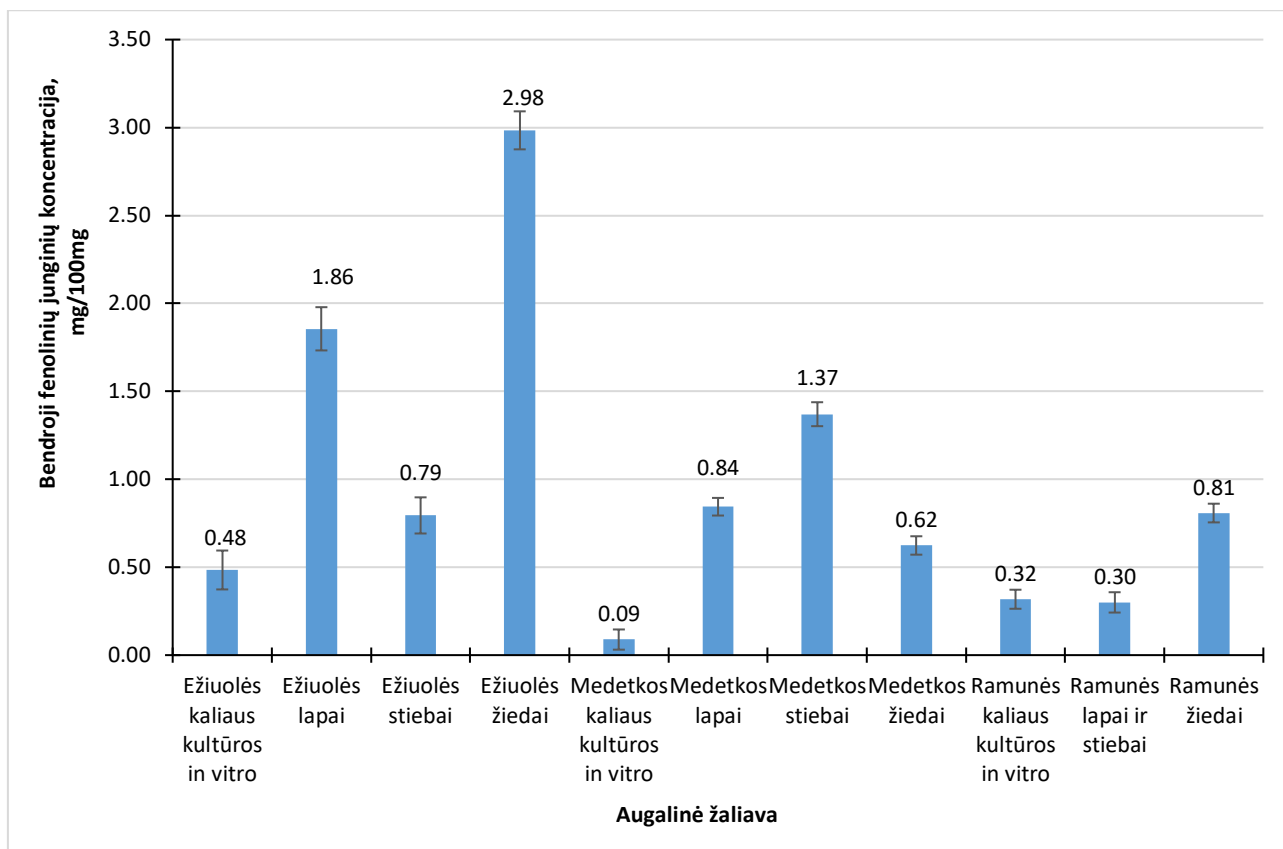
3.16 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija ramunės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Palyginus ramunės augalo dalių *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus buvo pastebėta, kad didžiausią fenolinių junginių koncentraciją sukaupė žiedų *in vivo* ekstraktas (0,81 mg/100mg), o mažiausią – lapų ir stiebų *in vivo* (0,30 mg/100mg). Rezultatai pateikti 3.16 paveiksle.



3.17 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija tiriamųjų augalų kaliaus kultūrose *in vitro*

Iš visų tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų išsiskyrė ežiuolė, kuri sukaupė didžiausią bendrąją fenolinių junginių koncentraciją – 0,48 mg/100mg. Pati mažiausia koncentracija nustatyta medetkoje (0,09 mg/100mg). Rezultatai pateikti 3.17 paveiksle.

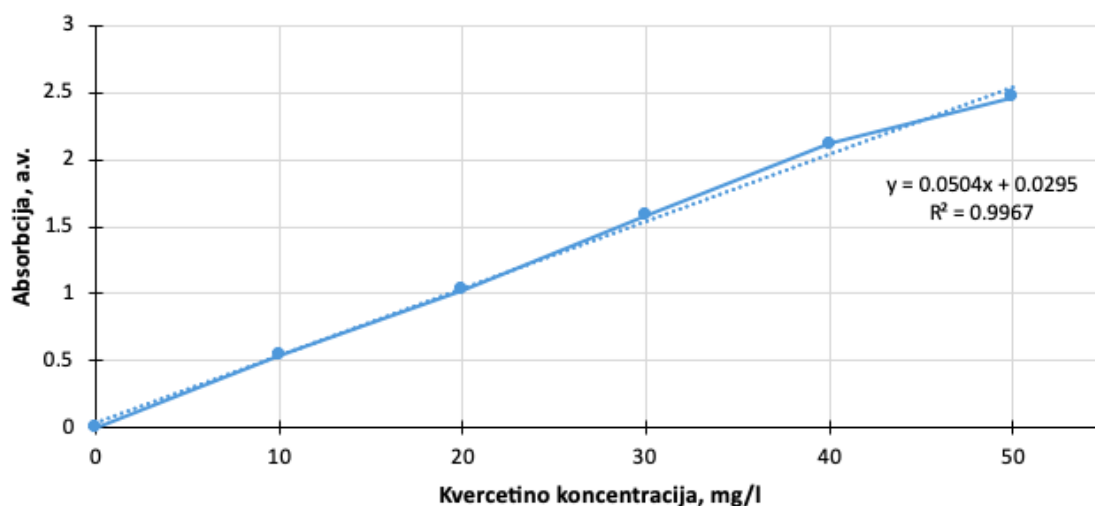


3.18 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija tiriamųjų augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

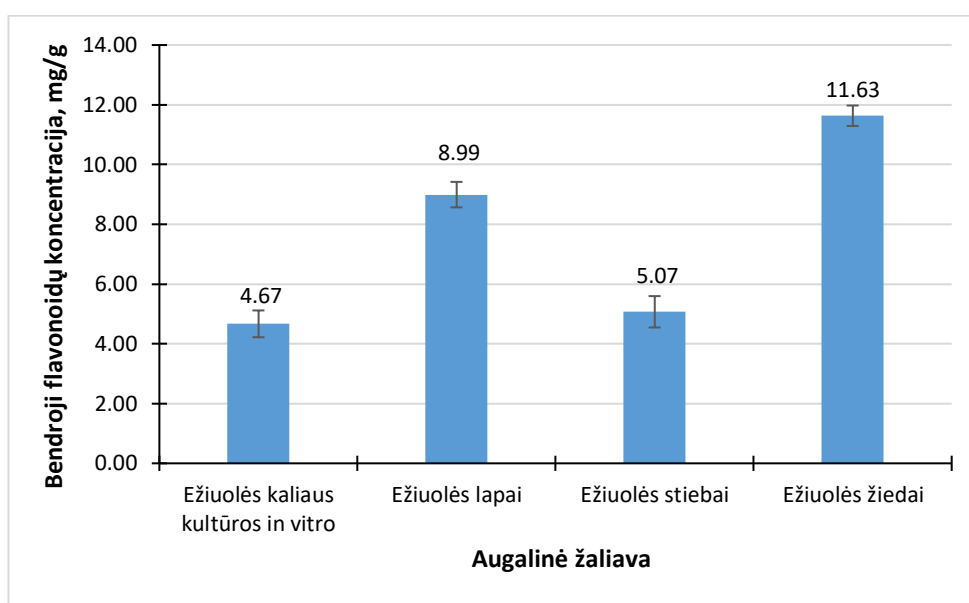
Iš bendrų rezultatų, pateiktų 3.18 paveiksle, matyti, kad didžiausią bendrąją fenolinių junginių koncentraciją sukaupė ežiuolės žiedų ekstraktas *in vivo* (2,98 mg/100mg), taip pat didesnę rezultatą parodė ežiuolės lapų *in vivo* ekstraktas (1,86 mg/100mg). Mažiausias bendra fenolinių junginių koncentracija nustatyta medetkos lapų ekstrakto (0,09 mg/100mg). Literatūroje nėra pateiktų rausvažiedės ežiuolės atskirų dalių, bendrųjų fenolinių junginių koncentracijų, yra nurodytos tik bendrosios viso augalo fenolinių junginių koncentracijos. 2019 metais T. Oniszczuk ir kitų mokslininkų atlikto tyrimo metu nustatyta rausvažiedės ežiuolės bendroji fenolinių junginių koncentracija – 4,213 mg/g [75].

3.6. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Nustatyti flavonoidų koncentracijas tiriamuosiuose augaluose buvo sudaryta kvercetino kalibracinė kreivė (žr. 3.19 pav.) ir iš jos buvo apaskaičiuotos flavonoidų koncentracijos mg/g.

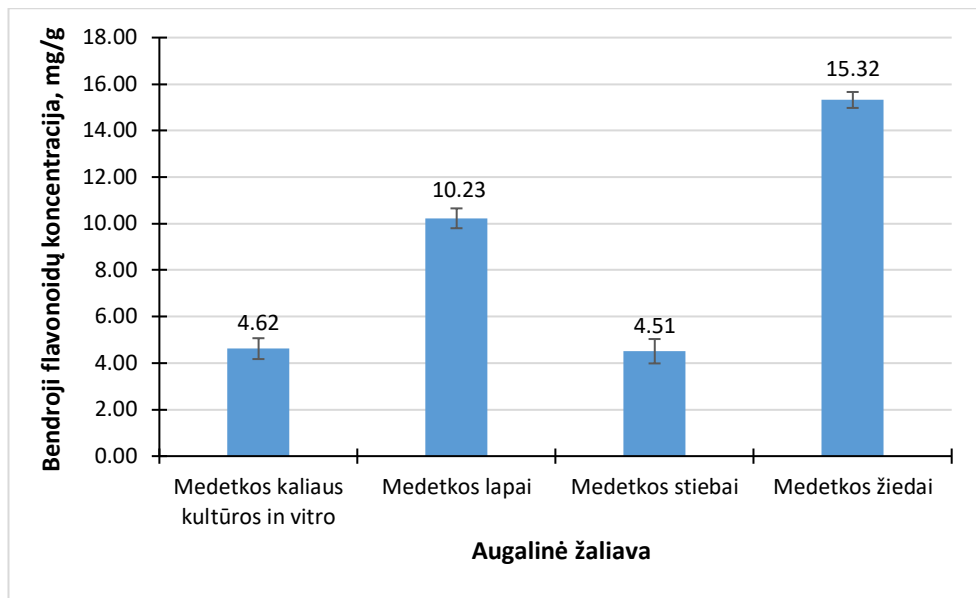


3.19 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė



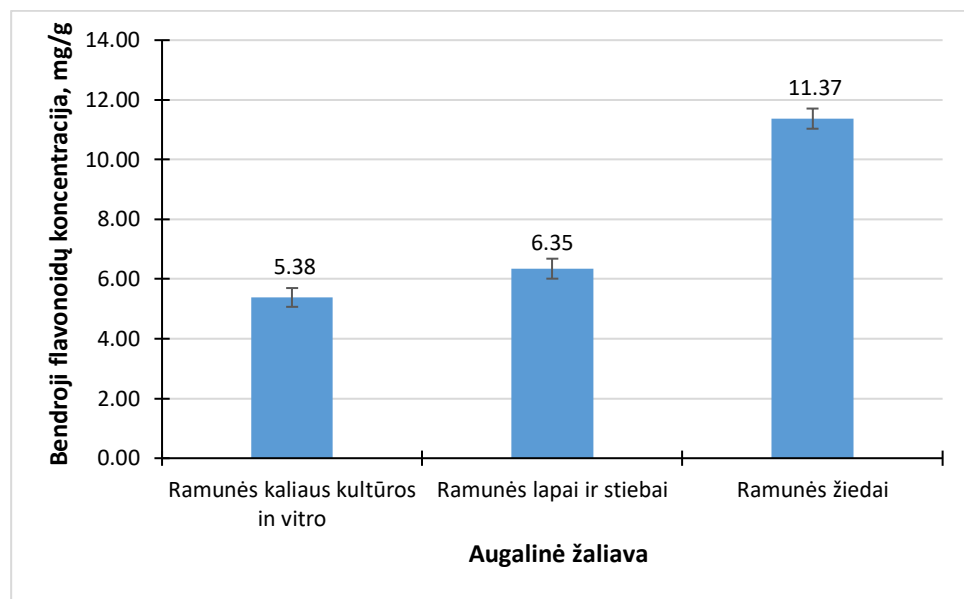
3.20 pav. Bendroji flavonoidų koncentracija ežiulės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Apskaičiavus bendrą flavonoidų koncentraciją ežiulės augalinėje žaliavoje, buvo gauti tokie rezultatai (žr. 3.20 pav.): didesnės koncentracijos flavonoidų nustatytos skirtingose augalo dalyse *in vivo* (žiedų ekstraktas parodė 11,63 mg/g, lapų – 8,99 mg/g, o stiebų – 5,07 mg/g) negu kaliaus kultūrose *in vitro* (4,67 mg/g).



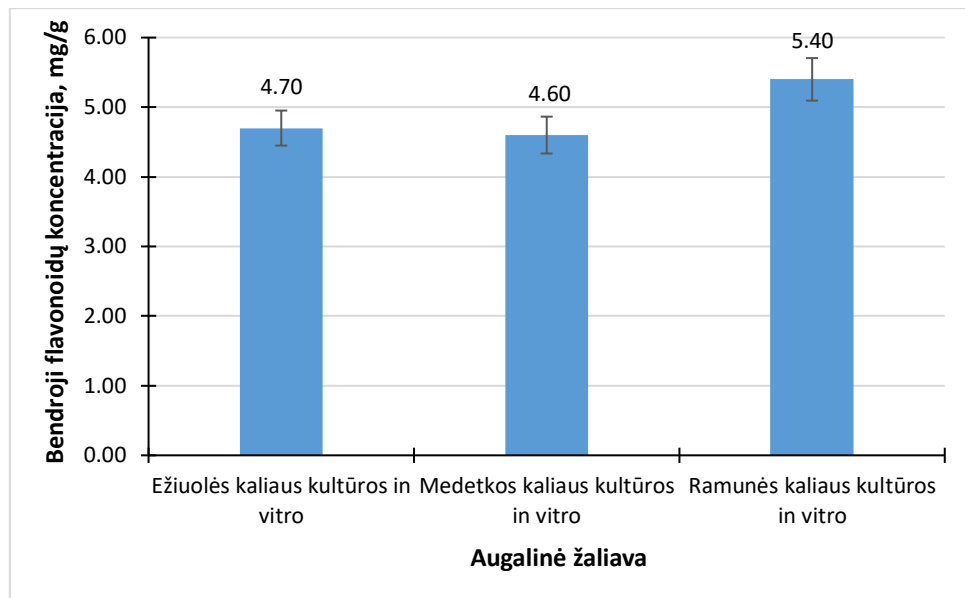
3.21 pav. Bendroji flavonoidų koncentracija medetkos augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Pakartojus tyrimą su medetkos augaline žaliava buvo gauti rezultatai, kurie pateikti 3.21 paveiksle. Didžiausia bendroji flavonoidų koncentracija buvo nustatyta žiedų *in vivo* ekstrakto (15,32 mg/g), 1,5 karto mažesnę rezultatą parodė lapų *in vivo* ekstraktas (10,23 mg/g), o mažiausiai flavonoidų buvo nustatyta stiebų *in vivo* ekstrakto (4,51 mg/g).



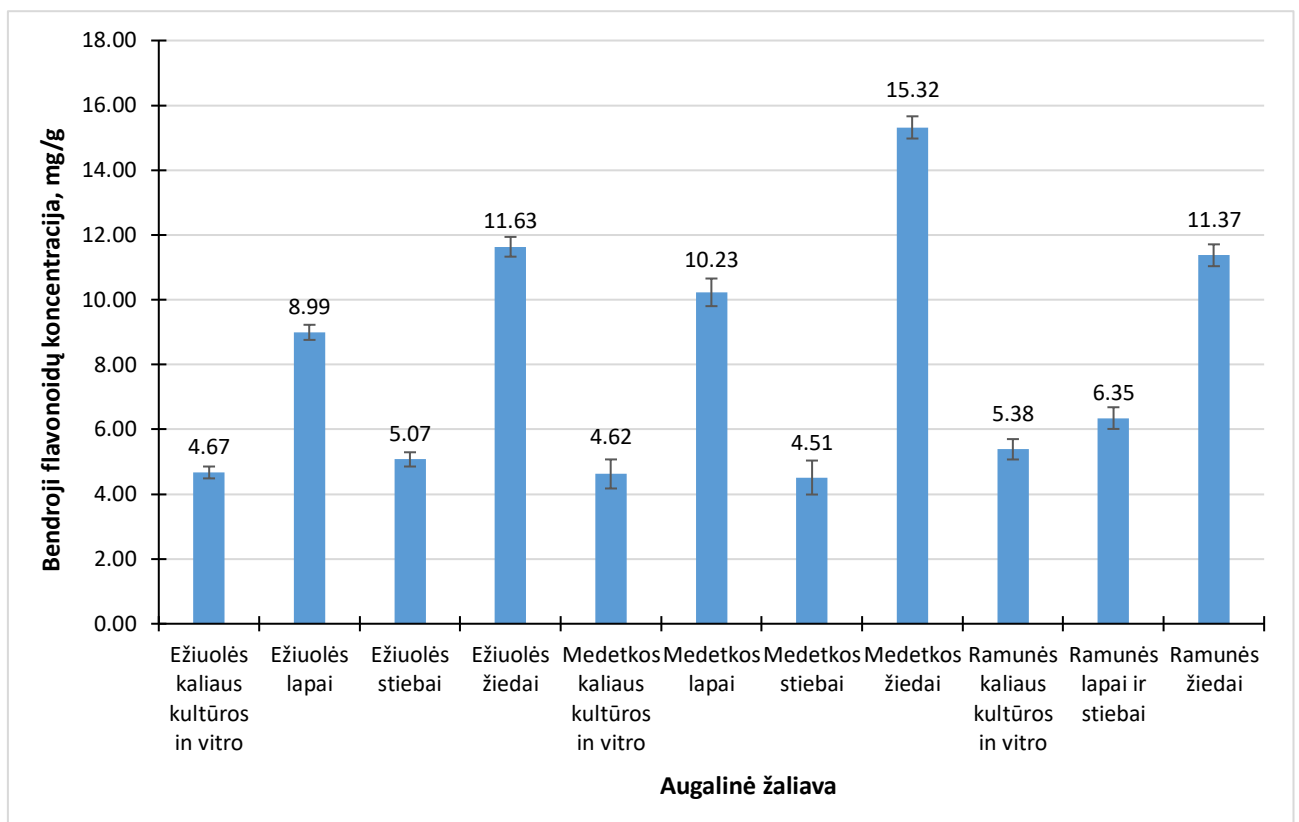
3.22 pav. Bendroji flavonoidų koncentracija ramunės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Iš gautų duomenų, pateiktų 3.22 paveiksle, matyti, kad ramunės augalo dalys užaugintos *in vivo* parodė didesnes bendras flavonoidų koncentracijas. Didžiausia koncentracija pasižymėjo ramunės žiedų *in vivo* ekstraktas (11,37 mg/g).



3.23 pav. Bendroji flavonoidų koncentracija tiriamųjų augalų kaliaus kultūrose *in vitro*

Palyginus visų tiriamųjų augalų kaliaus kultūras *in vitro* buvo gauti panašūs rezultatai (žr. 3.23 pav.): didesne bendra flavonoidų koncentracija pasižymėjo ramunės kaliaus kultūra *in vitro* (5,40 mg/g).



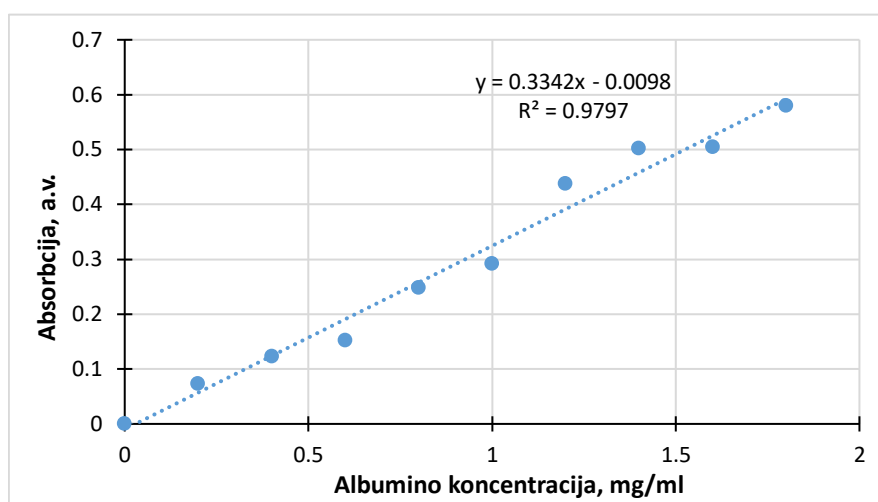
3.24 pav. Bendroji flavonoidų koncentracija tiriamųjų augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Apibendrinant gautus rezultatus (žr. 3.24 pav.) galima daryti išvadą, kad didžiausia bendra flavonoidų koncentracija pasižymėjo visų tiriamųjų augalų žiedų ekstraktai *in vivo*. Medetkos žiedų ekstrakte *in vivo* buvo nustatyta didžiausia koncentracija – 15,32 mg/g, o ežiuolės ir ramunės žiedų ekstraktuose, atitinkamai 11,63 mg/g ir 11,37 mg/g. Mažiausią flavonoidų koncentraciją turėjo ežiuolės ir medetkos kaliaus *in vitro* ekstraktai (4,67 mg/g ir 4,62 mg/g) bei medetkos stiebų *in vivo* ekstraktas (4,51 mg/g).

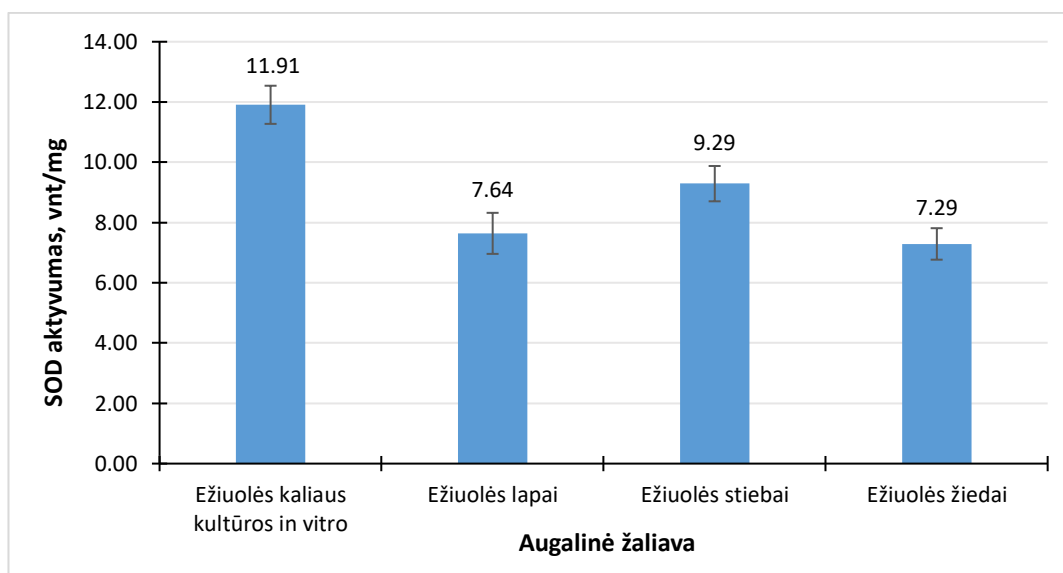
Gauti rezultatai buvo palyginti su Lietuvos sveikatos mokslų universitete atlikto tyrimo rezultatais ir pastebėta, kad skirtinguose regionuose Lietuvoje užaugintų medetkos žiedų *in vivo* bendroji flavonoidų koncentracija svyruoja nuo 17,8 mg/g iki 25,37 mg/g. Iš atlikto tyrimo galima teigti, kad bendroji flavonoidų koncentracija priklauso nuo vietovės, kurioje surinkta augalinė žaliava [76].

3.7. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Fermento superoksido dismutazės aktyvumui nustatyti buvo sudaryta baltymo albumino kalibracinė kreivė, kuri pateikta 3.25 paveiksle.

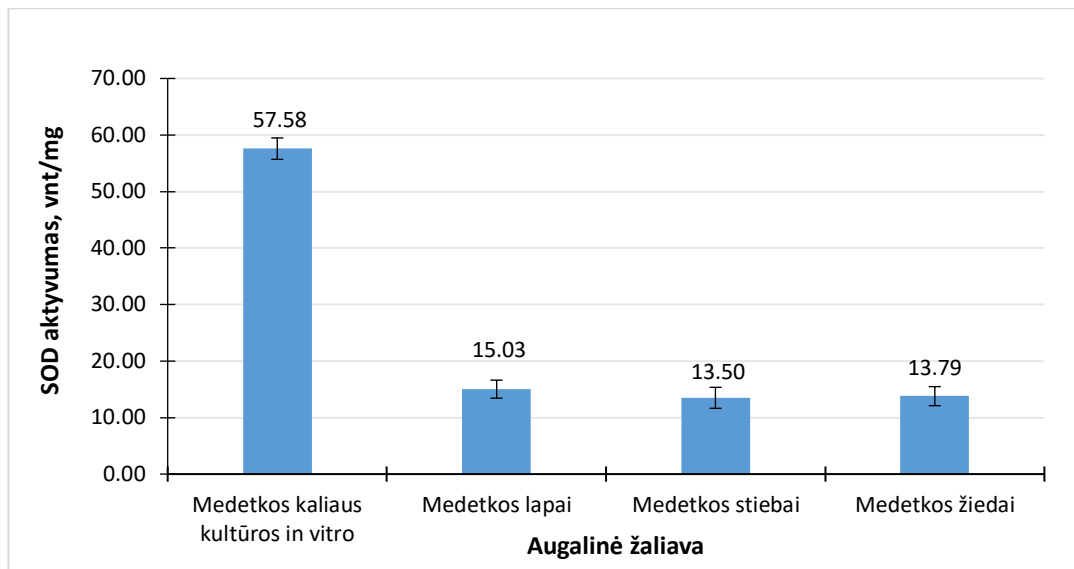


3.25 pav. Kalibracinė kreivė pagal albuminą



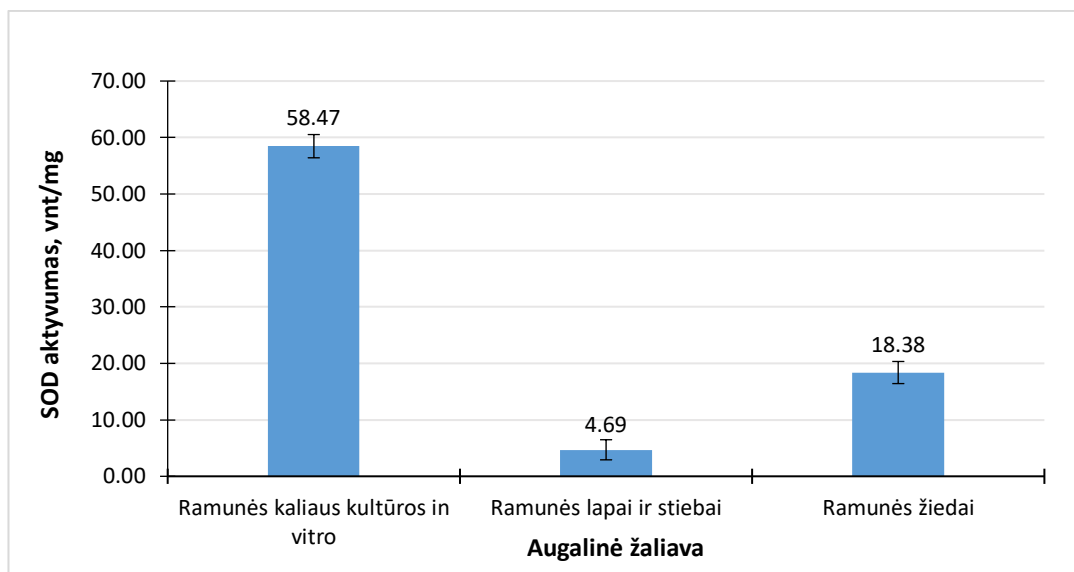
3.26 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumas ežiulės augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Iš rezultatų pateiktų 3.26 paveiksle, matyti, kad ežiulės kaliaus *in vitro* ekstrakto buvo nustatytas didžiausias fermento SOD aktyvumas (11,91 vnt/mg), truputį mažesnis stiebų ekstrakto (9,29 vnt/mg). Labai panašus fermento aktyvumas buvo nustatytas lapų ir žiedų ekstraktuose, atitinkamai 7,64 vnt/mg ir 7,29 vnt/mg.



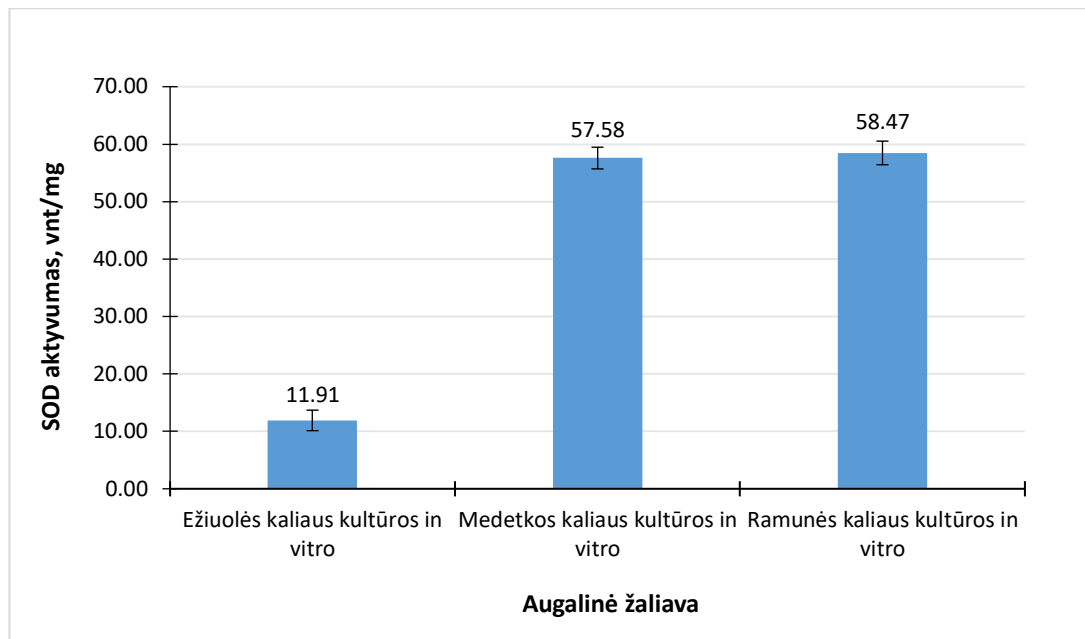
3.27 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumas medetkos augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Nustatytas medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* superoksido dismutazės aktyvumas (57,58 vnt/mg), maždaug 4 kartus didesnis negu to paties augalo skirtingų dalių *in vivo*. Rezultatai pateikti 3.27 paveiksle.



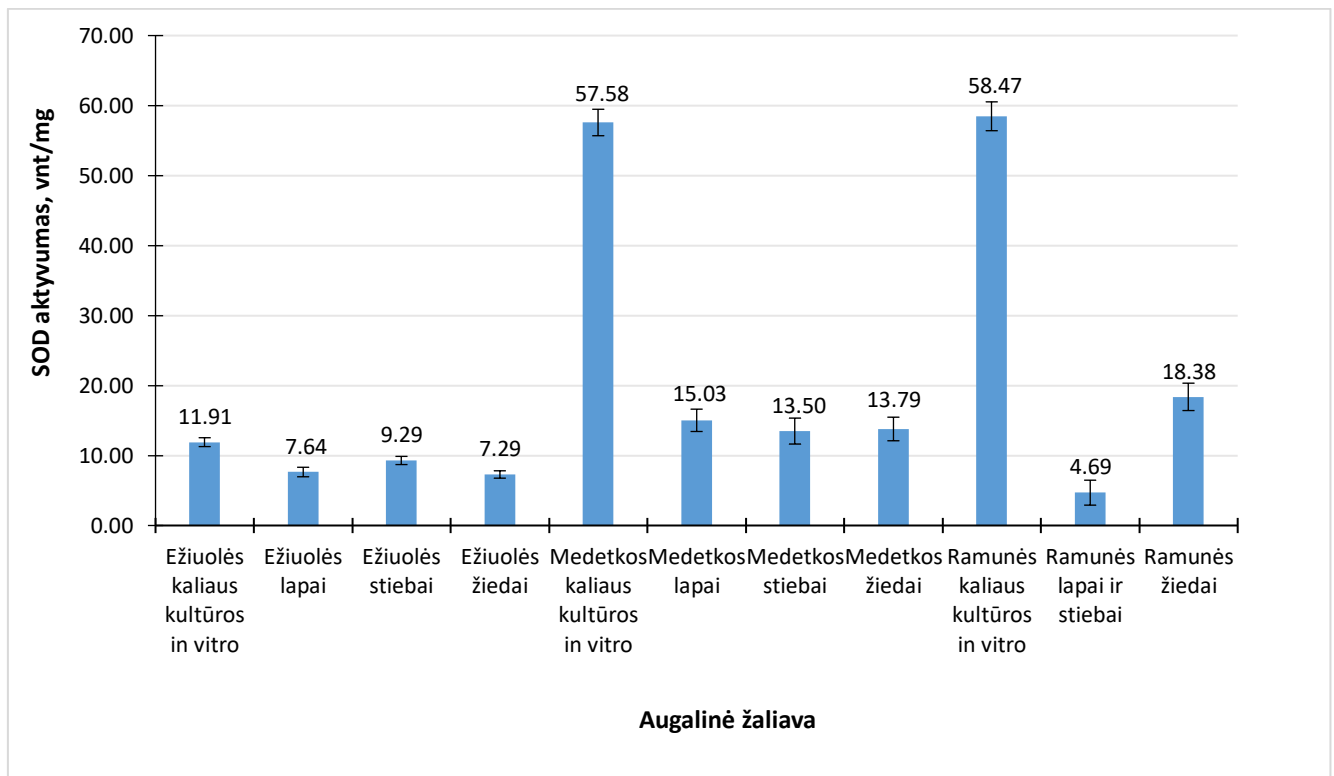
3.28 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumas ramunės augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Pakartojus tyrimą su ramunės augaline žaliava buvo gauti tokie rezultatai (3.28 paveikslas): kaliaus kultūros *in vitro* parodė didžiausią fermento aktyvumą – 58,47 vnt/mg, o lapų ir stiebų *in vivo* ekstraktas mažiausią – 4,69 vnt/mg.



3.29 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumas tiriamųjų augalų kaliaus kultūrose *in vitro*

Palyginus visų tiriamųjų augalų kaliaus kultūras *in vitro*, buvo pastebėta, kad ramunėje ir medetkoje fermento superoksido dismutazės aktyvumas buvo didžiausias (58,47 vnt/mg ir 57,58 vnt/mg). Rezultatai pateikti 3.29 paveiksle.



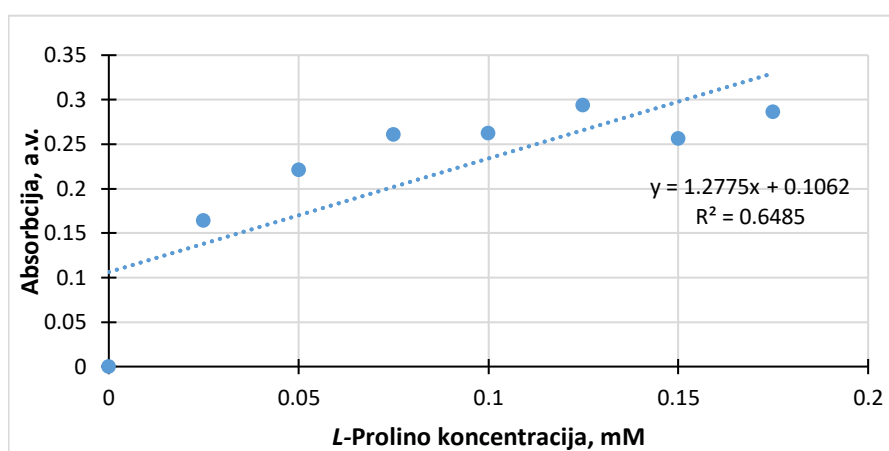
3.30 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumas tiriamųjų augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Apibendrinus gautus rezultatus, kurie pateikti 3.30 paveiksle matyti, kad didžiausias nustatytas SOD fermento aktyvumas buvo medetkos ir ramunės kaliaus kultūrose *in vitro*, atitinkamai 58,47 vnt/mg ir 57,58 vnt/mg, o pats mažiausias ramunės lapų ir stiebų ekstrakto *in vivo* 4,69 vnt/mg.

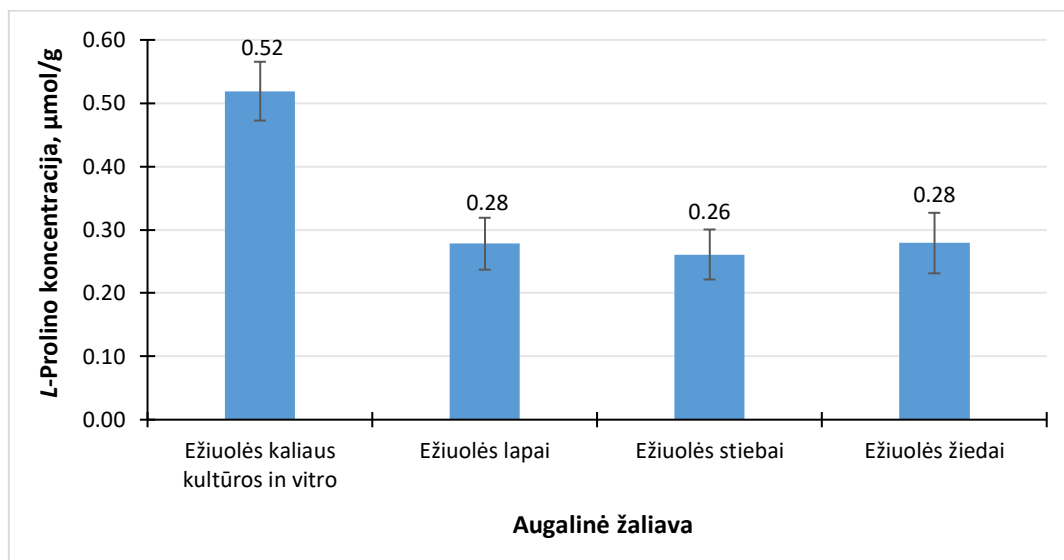
Buvo pastebėta, kad geriausias rezultatus parodžiusių medetkos ir ramunės augalų kaliaus kultūros *in vitro* buvo užaugintos toje pačioje mitybinėje terpėje (TDZ (0,5 mg/l) + IAR (0,1 mg/l)). Literatūroje su tokia mitybine terpe užaugintų kaliaus kultūrų *in vitro* rezultatų nepateikta, todėl buvo pasidomėta ramunės žiedų *in vivo* ekstraktų SOD aktyvumu. 2014 m. Akram Ranjbar ir kitų mokslininkų atliktame tyrime buvo nustatyta vaistinės ramunės žiedų *in vivo* koncentracija – 3,61 vnt/mg [77].

3.8. L-Prolino koncentracijos įvertinimas

Prolinas apsaugo baltymus, fermentus ir kitus svarbius ląstelių junginius nuo aktyvumo sumažėjimo ir padeda augalams adaptuotis esant nepalankiomis sąlygomis. Nustatyti *L*-proolino koncentraciją buvo sudaryta *L*-proolino kalibracinė kreivė (žr. 3.31 pav.) ir iš jos apskaičiuota *L*-proolino koncentracija.

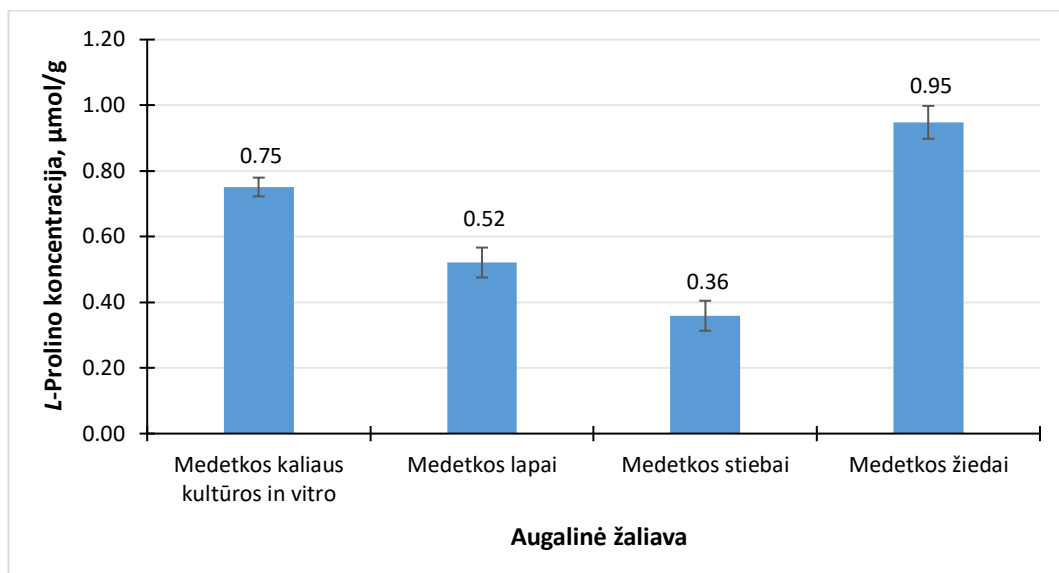


3.31 pav. *L*-proolino kalibracinė kreivė



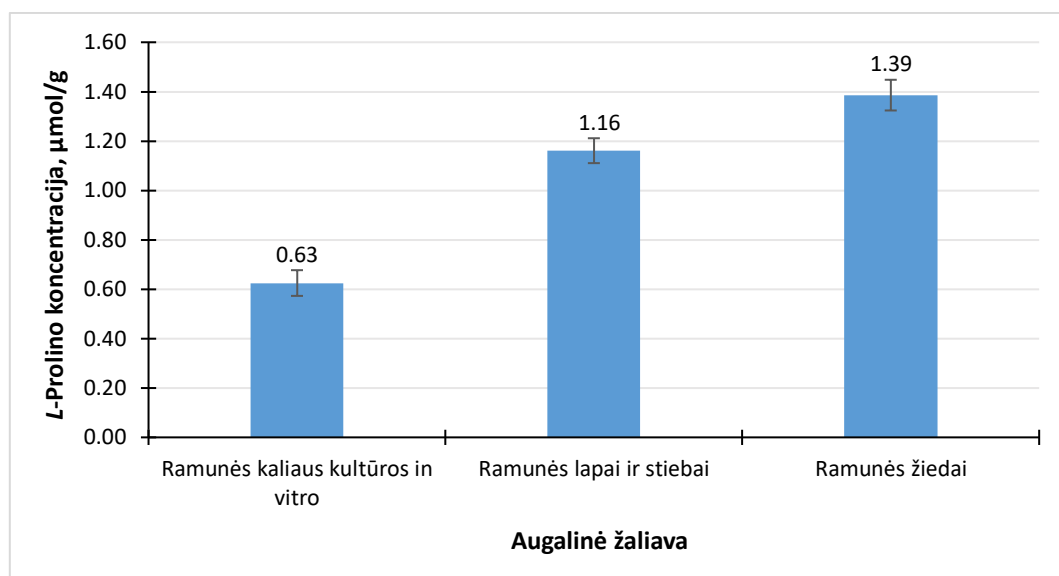
3.32 pav. *L*-proolino koncentracija ežiulės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Apskaičiavus *L*-proolino koncentraciją ežiulės augalinėje žaliavoje buvo gauti rezultatai pateikti 3.32 paveiksle. Kaliaus kultūrose *in vitro* buvo nustatyta didžiausia *L*-proolino koncentracija (0,52 μmol/g). Palyginus visas augalo dalis *in vivo* rezultatai gauti labai panašūs, truputį daugiau *L*-proolino buvo nustatyta žiedų ekstrakto (0,26 μmol/g).



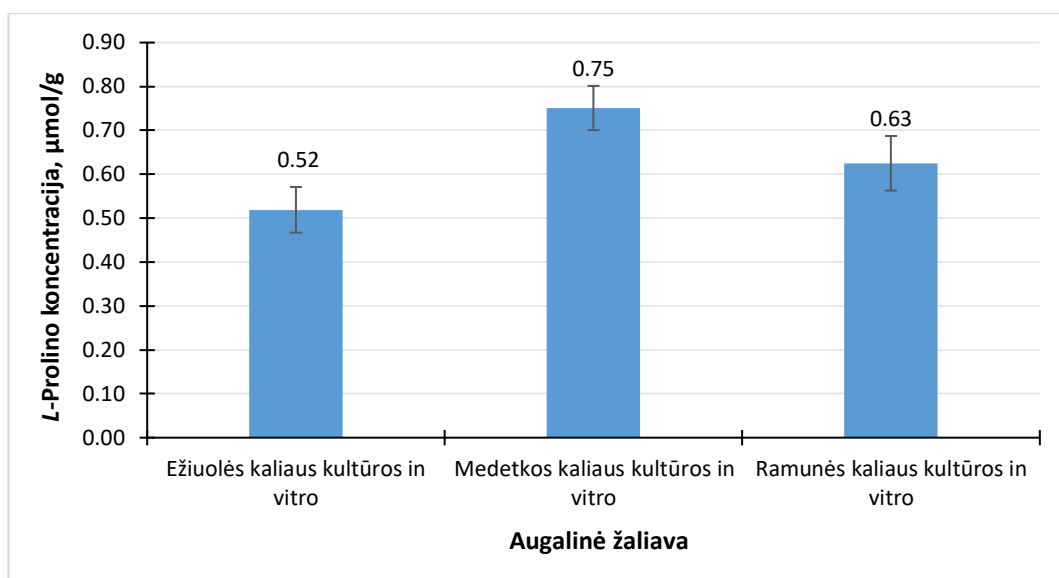
3.33 pav. *L*-Prolino koncentracija medetkos augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Pakartojus tyrimą su medetkos augaline žaliava pastebėta, kad didžiausia *L*-proline koncentracija buvo žiedų *in vivo* ekstrakto (0,95 $\mu\text{mol/g}$), o mažiausia – stiebų *in vivo* ekstrakto (0,36 $\mu\text{mol/g}$).



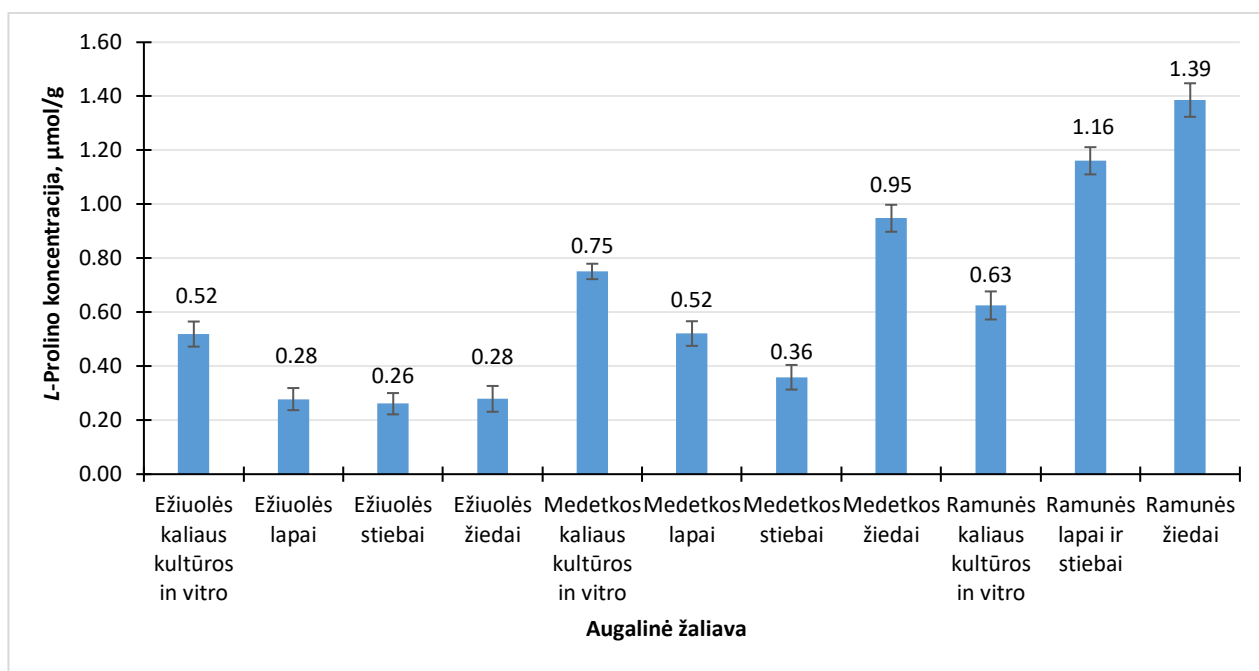
3.34 pav. *L*-Prolino koncentracija ramunės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Ramunė užauginta *in vivo* parodė didesnius *L*-proline koncentracijos kiekius (žiedų – 1,39 $\mu\text{mol/g}$, lapų ir stiebų – 1,16 $\mu\text{mol/g}$) negu kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktas (0,63 $\mu\text{mol/g}$). Rezultatai pateikti 3.34 paveiksle.



3.35 pav. L-Proline koncentracija ramunės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Palyginus visų tiriamųjų augalų kaliaus kultūras *in vitro* buvo pastebėta, kad didžiausia L-proline koncentracija išsiskyrė medetkos ekstraktas – 0,75 µmol/g. Rezultatai pateikti 3.35 paveiksle.

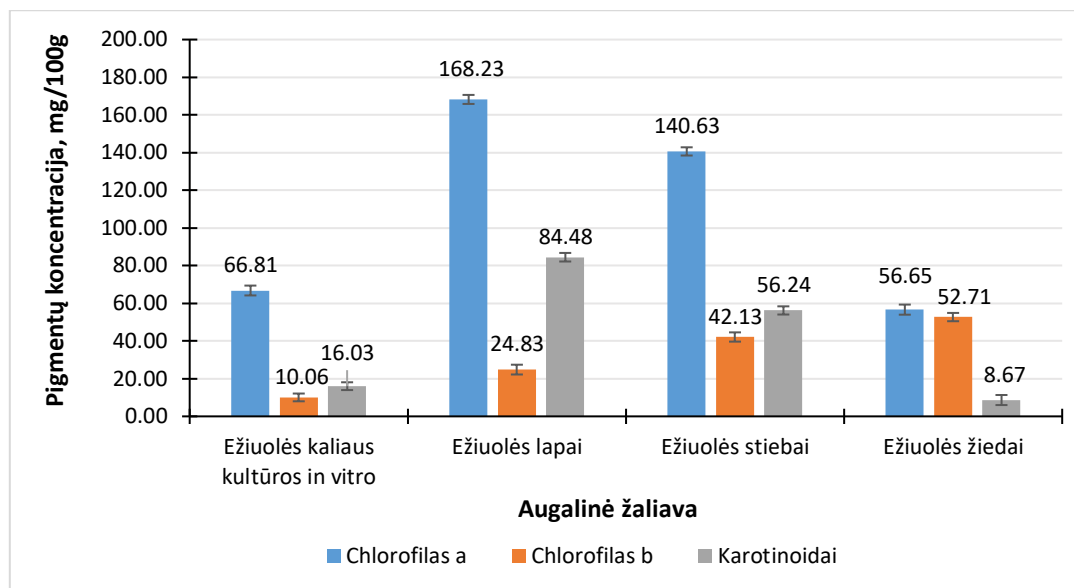


3.36 pav. L-Proline koncentracija tiriamųjų augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Bendri L-proline koncentracijos nustatymo rezultatai pateikti 3.36 paveiksle. Palyginus visus tiriamuosius augalus matyti, kad daugiausiai L-proline buvo nustatyta ramunės augalinėje žaliavoje, didžiausia koncentracija gauta žiedų (1,39 µmol/g) bei lapų ir stiebų (1,16 µmol/g) *in vivo* ekstraktuose. Taip pat didesnė koncentracija nustatyta medetkos žiedų *in vivo* ekstrakto (0,95 µmol/g). Mažiausią L-proline koncentraciją parodė visos ežiuolės augalo dalys *in vivo*.

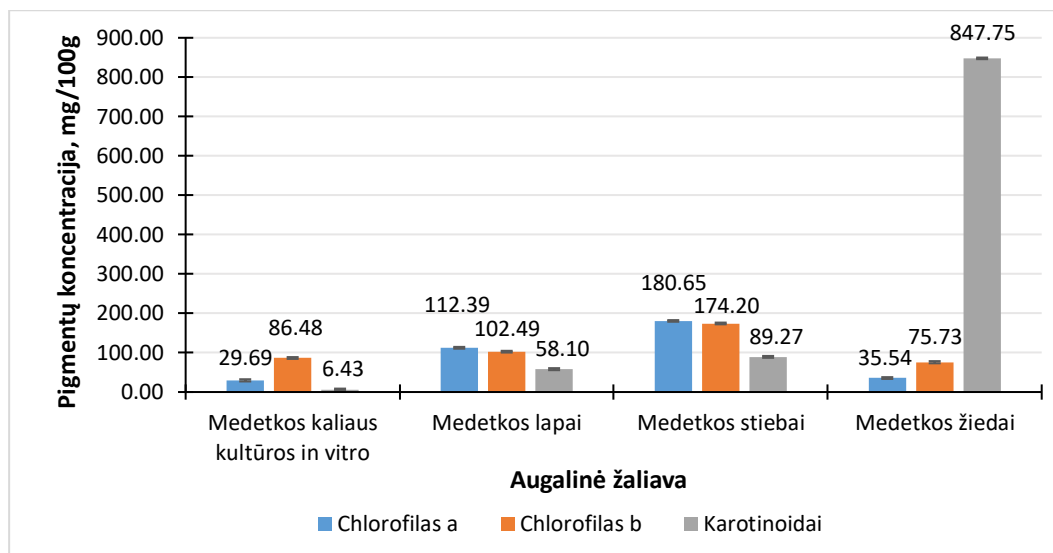
Gamal el-Din ir Abd-el-Wahed ištyrė skirtingų L-proline koncentracijų tegiamą poveikį vaistinių ramunių vegetatyviniam augimui, eteriniam aliejui ir kai kurioms biocheminėms sudedamosioms dalims [78]. Mokslininkų A. Greitovsky, K. Markušova ir kitų atliktame tyrime buvo nustatyta bendro vaistinės ramunės augalo L-proline koncentracija, gautas rezultatas – 2,3 µmol/g [79].

3.9. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas tiriamuosiuose augaluose



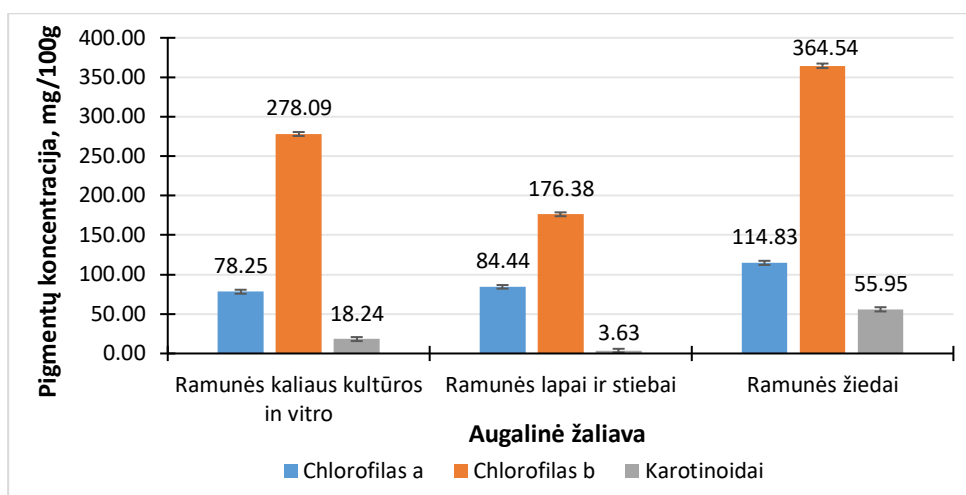
3.37 pav. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijų palyginimas ežiuolės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Nustčius chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijas ežiuolės augalinėje žaliavoje buvo pastebėta, kad didžiausią chlorofilo *a* koncentraciją sukaupe lapų ekstraktas – 168,23 mg/100mg, taip pat stiebų – 140,63 mg/100mg. Didžiausia chlorofilo *b* koncentracija nustatyta žiedų (52,71 mg/100mg) bei stiebų (42,13 mg/100mg) *in vivo* ekstraktuose. Karotinoidų daugiausiai sukaupe lapų (84,48 mg/100mg) ir stiebų (56,24 mg/100mg) ekstraktai. Rezultatai pateikti 3.37 paveiksle.



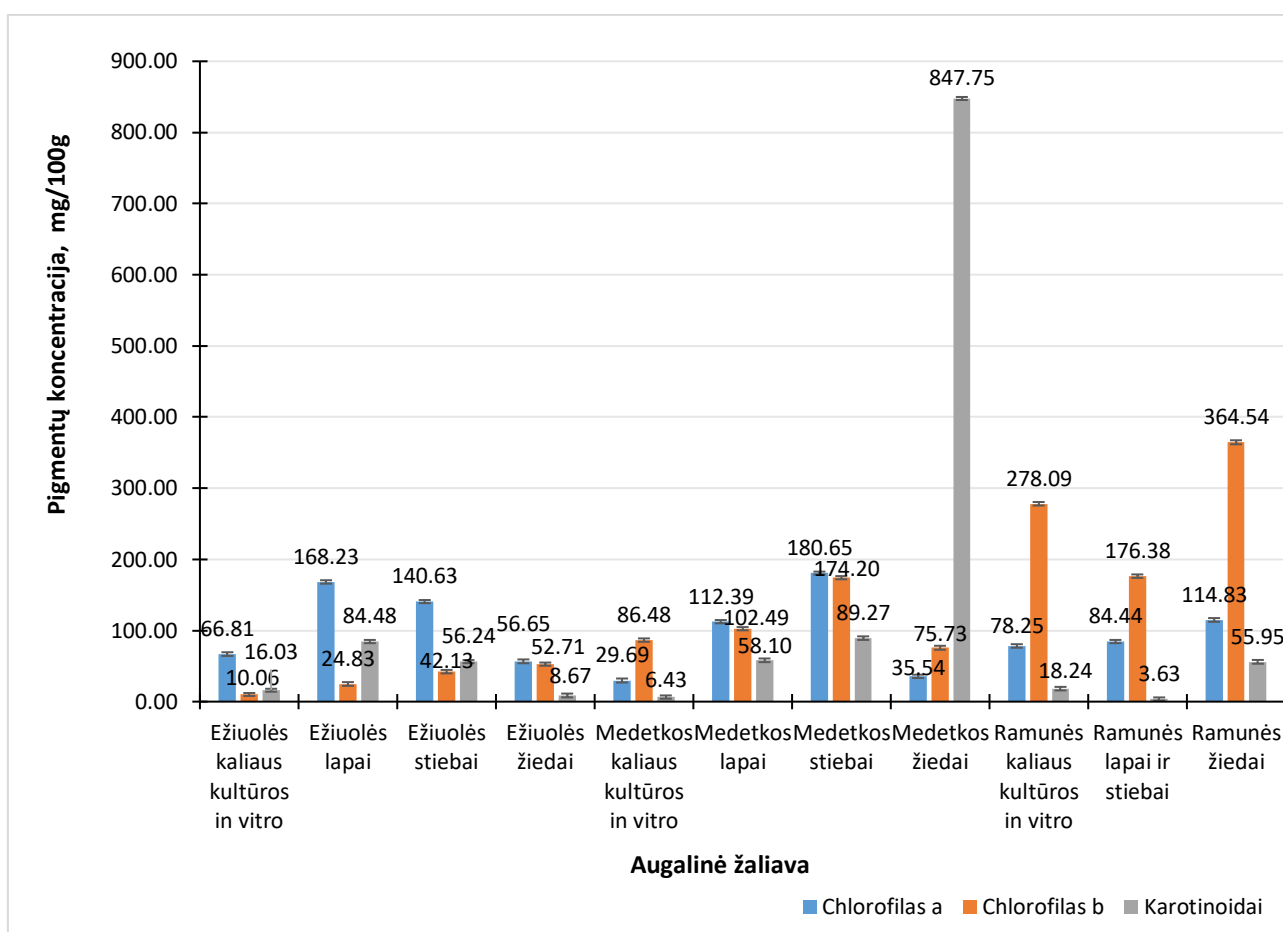
3.38 pav. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijų palyginimas medetkos augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Iš literatūros žinome, kad medetkos žiedai kaupia karotinoideus, todėl iš rezultatų pateiktų 3.38 paveiksle puikiai matyti, kokia didelė koncentracija ekstrakto buvo nustatyta (847,75 mg/100mg). Didžiausias koncentracijas chlorofilo *a* ir *b* sukaupe medetkos stiebų *in vivo* ekstraktas, atitinkamai 180,65 mg/100mg ir 174,20 mg/100mg. Mažiausia koncentracija chlorofilo *a* nustatyta medetkos kaliaus *in vitro* ekstrakto (29,69 mg/100mg), o chlorofilo *b* – medetkos žiedų *in vivo* ekstrakto (75,73 mg/100mg).



3.39 pav. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijų palyginimas ramunės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Tyrimas buvo pakartotas su ramunės augaline žaliava, buvo pastebėta, kad ji sukaupė didžiausią chlorofilo *b* koncentraciją. Žiedų *in vivo* ekstrakto nustatyta – 364,54 mg/100mg, kaliaus kultūrų *in vitro* – 278,09 mg/100mg, o lapų ir stiebų *in vivo* – 176,38 mg/100mg koncentracijos. Didžiausios koncentracijos chlorofilo *a* ir karotinoidų nustatytos žiedų *in vivo* ekstrakto, atitinkamai 114,83 mg/100mg ir 55,95 mg/100mg. Rezultatai pateikti 3.39 paveiksle.



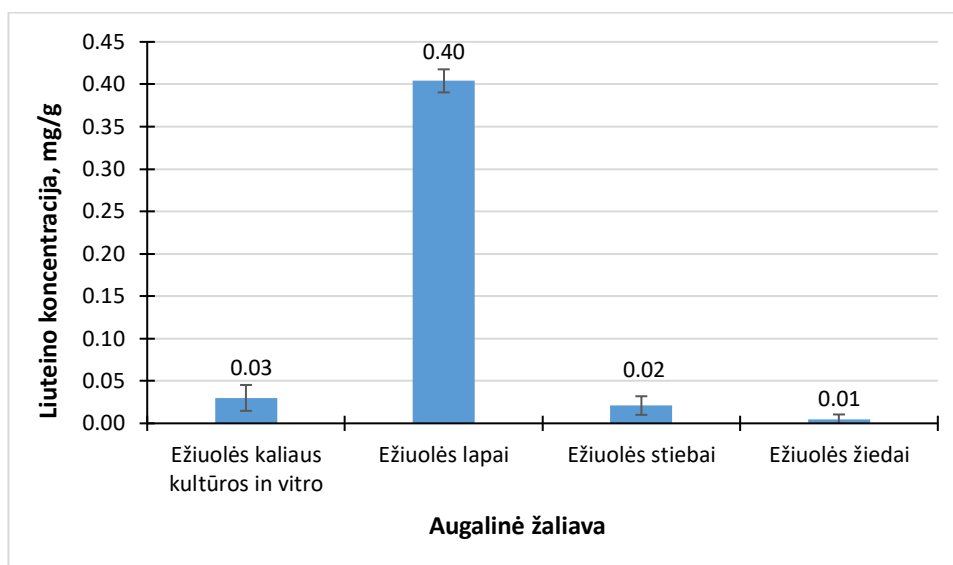
3.40 pav. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijų palyginimas tiriamųjų augalų dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Apibendrinant gautus bendrus rezultatus (žr. 3.40 pav.) matyti, kad didžiausia chlorofilo *a* koncentracija buvo nustatyta medetkos stiebų *in vivo* (180,65 mg/100mg) ir ežiuolės lapų *in vivo* (168,23 mg/100mg) ekstraktuose. Chlorofilo *b* daugiausiai sukaupė ramunės žiedų *in vivo* (364,54 mg/100mg) ir kaliaus kultūrų *in vitro* (278,09 mg/100mg) ekstraktai, o karotinoidų – medetkos žiedų *in vivo* ekstraktas (847,75 mg/100mg).

Literatūroje mokslininkų atlikto tyrimo metu, buvo nustatyta medetkos stiebų *in vivo* koncentracija – 480 mg/100 g, mūsų tyrimo metu gautas chlorofilo *a* rezultatas yra 3 kartus mažesnis [80]. Palyginus mūsų gautą geriausią vaistinės ramunės žiedų *in vivo* Chlorofilo *b* rezultatą su literatūroje pateiktais, buvo pastebėta, kad kitų mokslininkų atlikti tyrimai labai skiriasi nuo mūsų projekte gautų. A. Greitovsky ir kiti ištyrė, kad bendrame vaistinės ramunės augale esanti chlorofilo *b* koncentracija siekė 475,6 mg/100mg [79]. Lietuvos sveikatos ir mokslų universitete buvo atliktas vaistinės ramunės aktyvių metabolitų tyrimas ir nustatyta karotinoidų koncentracija, kuri siekė 8,05 mg/g [81].

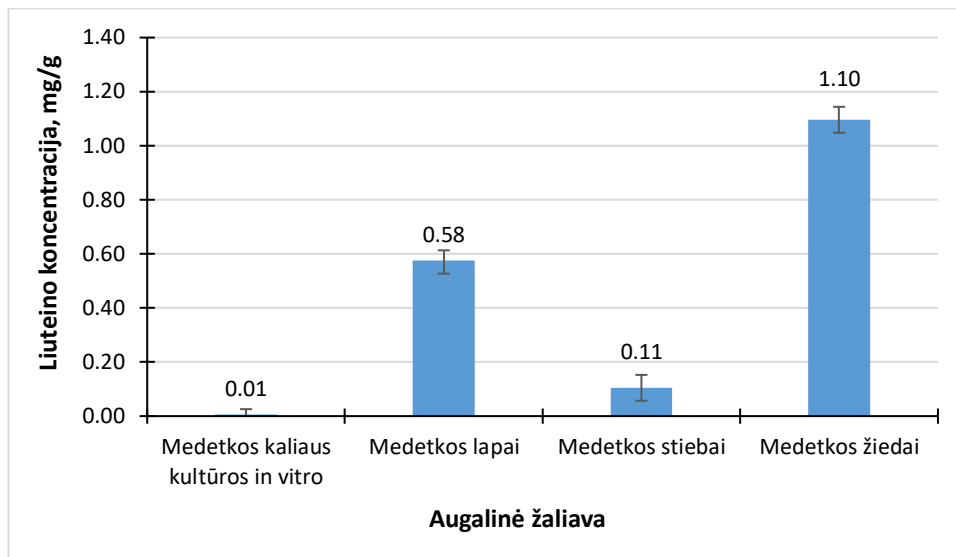
3.10. Liuteino koncentracijos įvertinimas tiriamuosiuose augaluose

Atlikus liuteino koncentracijos nustatymą skirtingose ežiuolės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro* buvo pastebėta, kad didžiausią koncentraciją liuteino sukaupė lapų ekstraktas *in vivo* (0,40 mg/g), o mažiausią – žiedų *in vivo* (0,01 mg/g). Ežiuolės augalinėje žaliavoje esanti liuteino koncentracija pateikta 3.41 paveiksle.



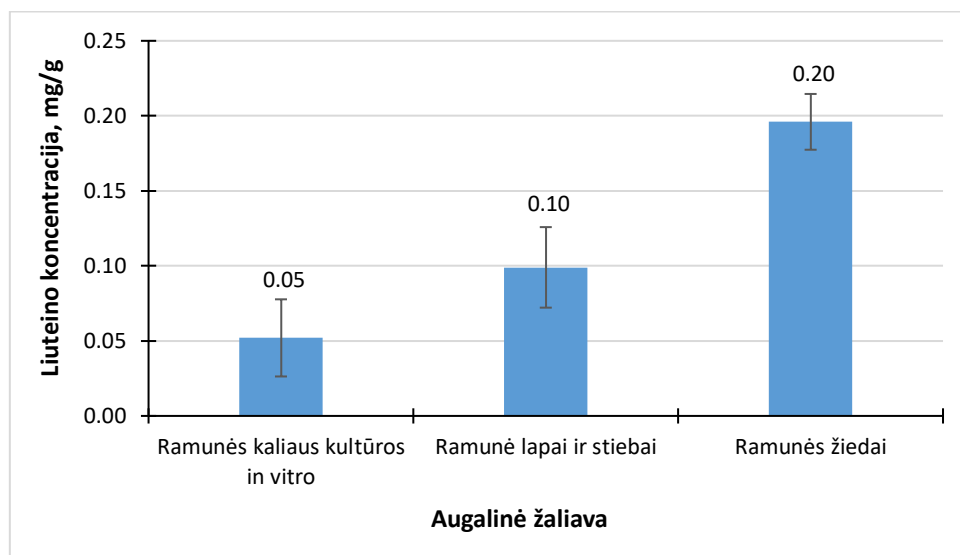
3.41 pav. Liuteino koncentracija ežiuolės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Medetkos augalinėje žaliavoje nustatyta liuteino koncentracija pateikta 3.42 paveiksle. Žiedų ekstraktas *in vivo* turėjo didžiausią liuteino koncentraciją (1,096 mg/g), dvigubai mažesnė koncentracija nustatyta lapų *in vivo* ekstraktoje (0,58 mg/g). Kaliaus kultūrose *in vitro* liuteino praktiškai nebuvo, rezultatas siekė vos 0,01 mg/g.



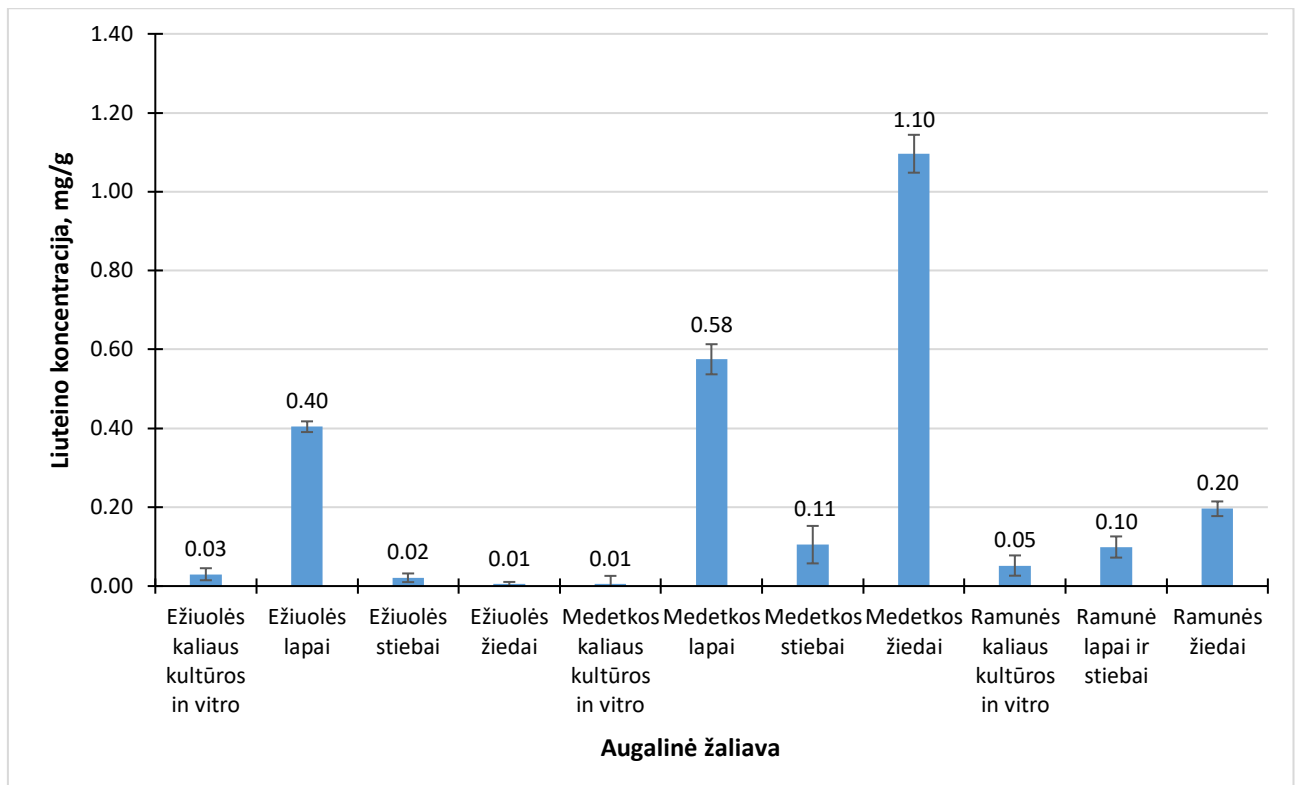
3.42 pav. Liuteino koncentracija medetkos augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Pakartojus tyrimą su ramunės augaline žaliava, buvo pastebėta, kad augalo dalys užaugintos *in vivo* sąlygomis (žiedų ir stiebų ekstraktai) turėjo didesnes liuteino koncentracijas negu kaliaus kultūros *in vitro*. Rezultatai pateikti 3.43 paveiksle.



3.43 pav. Liuteino koncentracija ramunės augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Iš bendrų rezultatų, pateiktų 3.44 paveiksle, galima daryti išvadą, kad didžiausia liuteino koncentracija nustatyta medetkos žiedų *in vivo* ekstrakte (1,10 mg/g) ir dvigubai mažesnė lapų *in vivo* ekstrakte (0,58 mg/g). Ežiulės lapų *in vivo* ekstraktas turėjo truputį mažesnę koncentraciją (0,40 mg/g) lyginant su medetkos lapų *in vivo* ekstraktu. Medetkos kaliaus kultūrose *in vitro* ir ežiulės žiedų ekstraktuose, liuteino praktiškai nebuvo.



3.44 pav. Liuteino koncentracija medetkos augalo dalyse *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

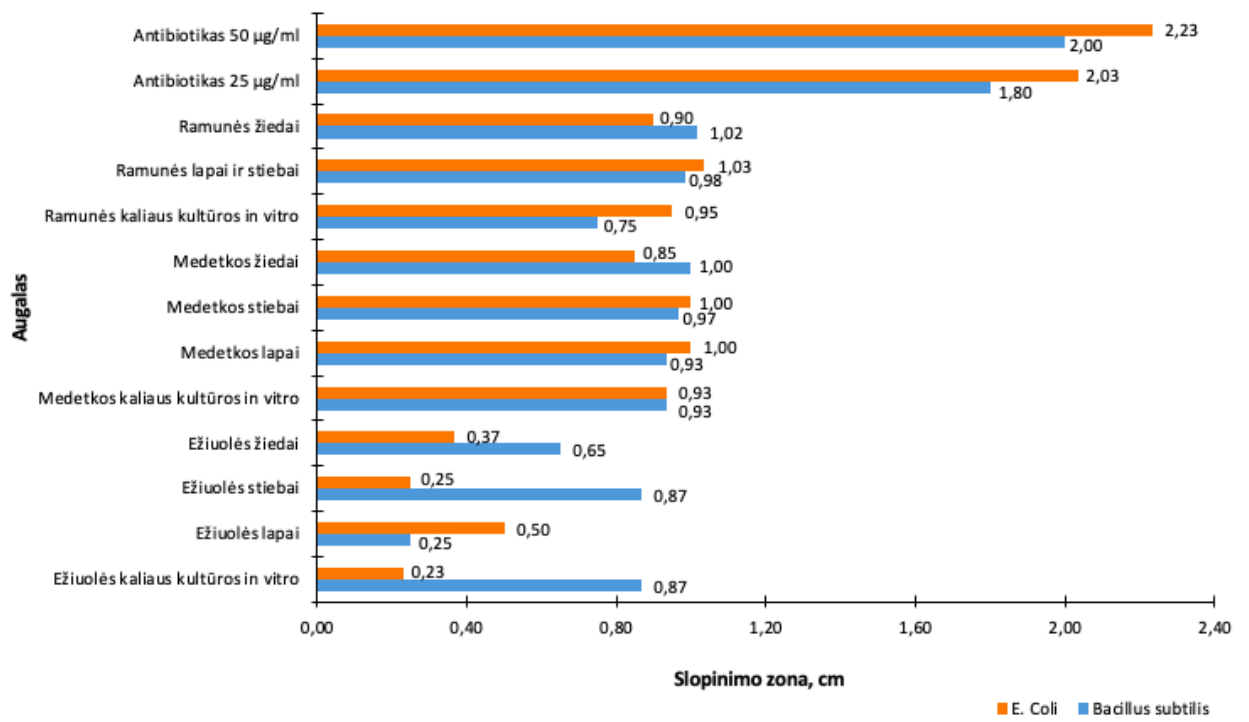
Mūsų tyrime geriausius rezultatus parodžiusi medetkos žiedų *in vivo* liuteino koncentracija buvo palyginta su literatūroje pateiktais rezultatais. Jian-Hao Lin ir kitų mokslininkų atliktame medetkos žiedų *in vivo* liuteino koncentracijos įvertinimo tyrime buvo nustatyta, kad augalinė žaliava sukaupė 20 g/kg koncentraciją [82].

Taip pat buvo atliktas tyrimas ir apskaičiuota bendro medetkos augalo *in vivo* liuteino koncentracija, kuri buvo 0,04 g/kg [83]. Taip pat 2003 metais A. M. Natchigal, A. C. O. Stringheta ir kiti mokslininkai taip pat nustatė bendrąją medetkos žiedų *in vivo* augalų ekstraktų koncentraciją, kuri buvo 0,301 g/kg [84].

3.11. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas agar difuziniu metodu

Palyginus visų tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo rezultatus buvo nustatyta, kad stipriausiu aktyvumu pasižymėjo ramunės augalo dalys *in vivo*. Lapų ir stiebų ekstraktas geriausiai slopino gramneigiamos bakterijos *E. Coli* augimą (slopinimo zona 1,03 cm), o žiedų – granteigiamos *Bacillus subtilis* (slopinimo zona 1,02 cm). Palyginus ramunės augalo dalių *in vivo* gautus rezultatus su skirtingų koncentracijų antibiotiku ciprofloksacinu pastebėta, kad augalinė žaliava dvigubai mažiau slopino tyrime naudotų bakterijų augimą.

Mažiausiai bakterijas slopino ežiuolės augalinės žaliavos ekstraktai. Silpniausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *E. Coli* pasižymėjo ežiuolės kaliaus kultūros *in vitro* (slopinimo zona 0,23 cm), o prieš *Bacillus subtilis* – ežiuolės lapai *in vivo* (slopinimo zona 0,25 cm).



3.45 pav. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo palyginimas

Išvados

1. Intensyviausiai tiriamųjų augalų kaliaus kultūros *in vitro* buvo suformuotos šiose MS terpėse su augimo hormonais: rausvažiedės ežiuolės – BAP (3 mg/l) + IBR (0,5 mg/l), vaistinės medetkos – TDZ (0,5 mg/l) + IAR (0,1 mg/l), vaistinės ramunės – TDZ (0,5 mg/l) + IAR (0,1 mg/l).
2. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pagal DPPH metodą pasižymėjo ežiuolės žiedų *in vivo* ekstraktas (92,9 %), o mažiausiu – medetkos stiebų *in vivo* (23,66 %). Didžiausias antioksidacinis aktyvumas FRAP metodu buvo pastebėtas ežiuolės žiedų *in vivo* (0,223 μmol/l), o mažiausias – medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* (0,20 μmol/l) ekstraktuose. Stipriausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo medetkos žiedų *in vivo* (0,79 A), o silpniausiomis – vaistinės ramunės lapų ir stiebų *in vivo* (0,09 A) ekstraktai.
3. Didžiausias bendras fenolinių junginių koncentracijas sukaupė ežiuolės žiedų *in vivo* (2,98 mg/100mg), o mažiausias – medetkos lapų *in vivo* (0,09 mg/100mg) ekstraktai. Didžiausia flavonoidų koncentracija buvo medetkos žiedų *in vivo* (15,32 mg/g), o mažiausia flavonoidų koncentracija – medetkos stiebų *in vivo* ekstraktas (4,51 mg/g).
4. Didžiausias superoksido dismutazės aktyvumas buvo nustatytas medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* (57,58 vnt/mg), o mažiausias – ramunės lapų ir stiebų *in vivo* (4,69 vnt/mg) ekstraktuose.
5. Chlorofilo *a* didžiausią koncentraciją sukaupė medetkos stiebų *in vivo* (180,65 mg/100mg), o chlorofilo *b* ramunės žiedų *in vivo* (364,54 mg/100mg) ekstraktai. Karotinoidų didžiausia koncentracija nustatyta medetkos žiedų *in vivo* ekstrakto (847,74 mg/100g).
6. Didžiausia *L*-prolino koncentracija buvo nustatyta ramunės žiedų *in vivo* ekstrakto (1,39 μmol/g), o mažiausia – ežiuolės augalų dalyse *in vivo*. Didžiausia liuteino koncentracija nustatyta medetkos žiedų *in vivo* ekstrakto (1,10 mg/g).
7. Ištirta, kad geriausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo vaistinės ramunės augalo dalys *in vivo*. Šis augalas geriausiai slopino tyrime naudotų bakterijų augimą (*Escherichia coli* – 1,03 cm ir *Bacillus subtilis* – 1,02 cm slopinimo zona). Mažiausiai bakterijas slopino rausvažiedės ežiuolės augalinės žaliavos ekstraktai.

Literatūros sąrašas

1. GAO, T., et al. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large *Asteraceae* family. *BMC Evolutionary Biology* [interaktyvus]. Beijing: Peking Union Medical College, 2010, vol. 10, 324 [žiūrėta 2020-01-12]. ISSN 1471–2148. doi: 10.1186/1471-2148-10-324
2. GUNES, A., S. KORDALI, M. TURAN, B. USANMAZ, U. B. AYSE. Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the *Asteraceae* family from medicinal plants. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2019, 137, 208–213 [žiūrėta 2020-01-12]. ISSN 0926–6690. Prieiga per: Science Direct.
3. RIFFAT, J., I. A. KHURSHID, J. NELOFER. Calendula Officinalis-An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proceedings of the Indian National Science Academy* [interaktyvus]. Kamala Print-n-Publish, December 2017, vol. 83 (4), 769–787 [žiūrėta 2020-01-15]. doi:10.16943/ptinsa/2017/49126
4. HENSEL Wolfgang. *Vaistinių augalų žinynas*. Vilnius: Aktėja, 2008. ISBN 9789955211860.
5. COUNCIL OF EUROPE. *European pharmacopoeia 8.0*. Strasbourg: Cedex, 2013. ISBN 9789287175250
6. LEGHA, M. R., et al. Induction of carotenoid pigments in callus cultures of *Calendula officinalis* L. in response to nitrogen and sucrose levels. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* [interaktyvus]. Society for In-Vitro Biology, February 2012, vol. 48, 99–106 [žiūrėta 2020-01-15]. doi: 10.1007/s11627-011-9402-3
7. NATCHIGAL, A.M., A. C. STRINGHETA, M. C. BERTOLDI, and P. C. STRINGHETA. Quantification and characterization of lutein from tagetes (*Tagetes patula* L.) and calendula (*Calendula officinalis* L.) flowers. Iš: XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People: International Symposium on Emerging Health Topics in Fruits and Vegetables, August 22–27, 2010. Lisbon, Portugal. Belgium: Acta Horticulturae, 2012, No.939. pp. 309–314.
8. VIDAL-OLLIVIER E., et al. Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med* [interaktyvus]. France: Laboratoire de Pharmacognosie-Homeopathie, Faculte de Pharmacie, Marseille Cedex, February 1989, vol. 55(1), 73 [žiūrėta 2019-12-12]. doi: 10.1055/s-2006-961831
9. BARNES, Joanne, Linda A. ANDERSON, DAVID J. PHILLIPSON. *Herbal Medicines*. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2013. ISBN 9780853696230.
10. Muley, B., S. S. KHADABADI, B. BANARASE. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [interaktyvus]. University of Benin, November 2009, vol. 8 (5), 8 [žiūrėta 2019-12-20]. doi: 10.4314/tjpr.v8i5.48090
11. GAZIM, Christiani Z., et al. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Revista Brasileira De Ciencias Farmaceuticas – RBCF* [interaktyvus]. Universidade de São Paulo, 2008, vol.44 (3), 391-395 [žiūrėta 2020-02-20]. doi: 10.1590/S1516-93322008000300008
12. RIFFAT J., I. A. ANDRABI, J. NELOFER. *Calendula Officinalis*-An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proceedings. Indian National Science Academy*. [interaktyvus]. Srinagar: University of Kashmir, 2017, vol. 83(4), 769–787 [žiūrėta 2020-01-20]. doi: 10.16943/ptinsa/2017/49126
13. MOHAMMAD, S. M. Pot marigold (*Calendula officinalis*) medicinal usage and cultivation. Scientific Research and Essays. *Scientific research and essays* [interaktyvus]. Academic Journals, 2012, vol.7(14), 1468–1472 [žiūrėta 2020-02-02]. doi: 10.5897/SRE11.630
14. CRUCERIU D., O. BALACESCU, E. RAKOSY. *Calendula officinalis*: Potential Roles in Cancer Treatment and Palliative Care. *Intergrative Cancer Therapies* [interaktyvus]. Cluj-napoca, December 2018, vol 17(4), 1068-1078 [žiūrėta 2020-02-02]. doi: 10.1177/1534735418803766

15. FOROUTANKHAH, M., et al. Evaluation of *Calendula officinalis* L. (marigold) flower as a natural growth promoter in comparison with an antibiotic growth promoter on growth performance, carcass traits and humoral immune responses of broilers. *Animal Nutrition*. [interaktyvus]. Beijing: KeAi, 2019, vol. 5, 314–318 [žiūrėta 2020-02-10]. ISSN 2405–6545. Prieiga per: Science Direct.
16. MANAYAI, A., M. VAZIRIAN, S. SAEIDNIA. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. Medknow Publications, January–June 2015, vol. 9(17), 63–72 [žiūrėta 2020-02-03]. doi: 10.4103/0973-7847.156353
17. WALLACE, S. *Echinacea* Monograph. *Alternative Medicine Review* [interaktyvus]. Thorne Research Inc, 2001, vol. 9(4), 411–414 [žiūrėta 2020-02-03]. ISSN 1089515. Prieiga per: <http://www.altmedrev.com/archive/publications/6/4/411.pdf>
18. RAGAŽINSKIENĖ, Ona, Silvija RIMKIENĖ, Valdimaras SASNAUSKAS. *Vaistinių augalų enciklopedija*. Kaunas: Lututė, A. Steponavičienė, 2005. ISBN 9955575735.
19. MUHAMMED, A. A., K. M. SEVKET, A. B. EBRU, O. SEDANUR. Effect of light on biosynthesis of alkalamide, caffeic acid derivatives and echinacoside in *Echinacea purpurea* L. callus cultures. *Akademik Ziraat Dergisi* [interaktyvus]. Baslangıç, October 2018, 179–184 [žiūrėta 2020-02-05]. doi: 10.29278/azd.476349
20. OMPRAKASH, Goshain. A Review on Purple Cone Flower (*Echinacea purpurea* L. Moench). *Journal of Pharmacy Research* [interaktyvus]. Association of Pharmaceutical Innovators, July 2015, 5(8), 4076–4081 [žiūrėta 2020-02-18]. doi: 10.1155/2012/769896
21. ONISZCZUK, T., et al. Active polyphenolic compounds, nutrients contents and antioxidant capacity of extruded fish feed containing purple coneflower (*Echinacea purpurea*). *Saudi Journal of Biological Sciences* [interaktyvus]. Elsevier, January 2019, vol. 26(1), 24–30 [žiūrėta 2020-02-05]. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.11.013.
22. LI, F., et al. Antiosteoporotic activity of echinacoside in ovariectomized rats. *Phytomedicine* [interaktyvus]. Elsevier, April 2013, vol. 20(6), 549–555 [žiūrėta 2020-02-05]. doi: 10.1016/j.phymed.2013.01.001
23. MANAYAI, A., M. VAZIRIAN, S. SAEIDNIA. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. Medknow Publications, January–June 2015, vol. 9(17), 63–72 [žiūrėta 2020-02-03]. doi: 10.4103/0973-7847.156353
24. CHONGCHONG, W. *Echinacea purpurea* Extract Affects the Immune System, Global Metabolome, and Gut Microbiome in Wistar Rats. *Journal of Agricultural Science* [interaktyvus]. Cambridge univ press, March 2017, vol. 9(4), 1–14 [žiūrėta 2020-02-05]. doi: 10.5539/jas.v9n4p1
25. EL–ASHMAWY, N., et al. *In vitro* and *in vivo* studies of the immunomodulatory effect of *Echinacea purpurea* on dendritic cells. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [interaktyvus]. International Research Publication House, June 2015, vol. 13(2), 185–192 [žiūrėta 2020-02-06]. ISSN 2150–3516. Prieiga per: Science Direct.
26. LEMA–RUMINSKA, J., et al. Profile of secondary metabolites and genetic stability analysis in new lines of *Echinacea purpurea* (L.) Moench micropropagated via somatic embryogenesis. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. Elsevier, December 2019, vol. 142, 111–851 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per: Science Direct.
27. PETRONILHO, S., M. MARASCHIN, M. A. COIMBRA, S. M. ROCHA. *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. Elsevier, November 2012, vol. 40(1), 1–12 [žiūrėta 2020-02-06]. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.02.041
28. SINGH, O., Z. KHANAM, N. MISRA, M. K. SRIVASTAVA. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. Medknow Publications, January–June 2011, vol. 5(9), 82–95 [žiūrėta 2020-02-06]. doi: 10.4103/0973-7847.79103

29. JALAL, B. Z., K. M. NASROALLAH, K. M. ZAHRA. Chamomile (*Matricaria recutita*) As a Valuable Medicinal Plant. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* [interaktyvus]. SAMI, January–June 2014, vol. 2(3), 823 – 829 [žiūrėta 2020-02-10]. doi: 10.4103/0973-7847.79103
30. GUPTA, V., et al. Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*-A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* [interaktyvus]. MRI Publication, May 2010, vol. 2(1), 12–16 [žiūrėta 2020-02-12]. ISSN 0975-248X. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/266968942_Pharmacological_Potential_of_Matricaria_recutita-A_Review.
31. PETRONILHO, S., M. MARASCHIN, I. DELGADILLO, A. M. COIMBRA, S. M. ROCHA. Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. Elsevier, November 2011, vol. 34(3), 1482 – 1490 [žiūrėta 2020-02-14]. ISSN 0926–6690. Prieiga per: Science Direct.
32. TELESINSKI, A., M. GRZESZCZUK, D. JADCZAK, H. ZAKRZEWSKA. Fluoride content and biological value of flowers of some chamomile (*Matricaria recutita* L.) cultivars. *Journal of Elementology* [interaktyvus]. Polskie Towarzystwo Magnezologiczne, December 2012, 17 (4), 703–712 [žiūrėta 2020-02-15]. doi: 10.5601/jelem.2012.17.4.12
33. SEBAI, H., M. A. JABRI, A. SOULI, K. HOSNI. Chemical composition, antioxidant properties and hepatoprotective effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract against alcohol-induced oxidative stress in rat. *General Physiology and Biophysics* [interaktyvus]. Slovak Academy of Sciences, March 2015, vol. 34(3), 263–275 [žiūrėta 2020-02-14]. doi: 10.4149/gpb_2014039
34. HICHEM, S., et al. Antidiarrheal and antioxidant activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. Elsevier, March 2014, vol. 152 (2), 327–332 [žiūrėta 2020-02-12]. ISSN 1872–7573. Prieiga per: Science Direct.
35. SRIVASTAVA, J. K., M. PANDEY, S. GUPTA. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Life Sciences* [interaktyvus]. Elsevier, September 2009, 85 (19–20), 663–669 [žiūrėta 2020-02-12]. doi: 10.1016/j.lfs.2009.09.007
36. BAGHALIAN, K., S. ABDOSHAH, F. KHALIGHI–SIGAROODI, P. FARZAD. Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, February 2011, vol. 49(2), 201–207 [žiūrėta 2020-02-14]. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.11.010
37. MILIAUSKAS, G., P. R. VENSKUTONIS, T. A. van BEEK. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* [interaktyvus]. Elsevier, January 2004, vol. 85, 231–237 [žiūrėta 2020-02-07]. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.05.007
38. GUPTA, Dharmendra K., Jose A. PALMA, Francisco J. CORPAS. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Cham, Switzerland: Springer, 2018. ISBN 9783319750873.
39. BIRBEN, E., U. M. SAHINER, C. SACKESSEN, S. ERZURUM, O. KALAYCI. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* [interaktyvus]. Elsevier, January 2012, vol. 5(1), 9–19 [žiūrėta 2020-02-07]. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
40. RIO, L. A., F. J. CORPAS, J. A. PALMA, E. LOPEZ–HUERTAS. Plant Superoxide Dismutases: Function Under Abiotic Stress Conditions. Iš: GUPTA, Dharmendra K., et al. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Cham, Switzerland: Springer, 2018, pp. 1–26. ISBN 9783319750873.
41. HAJAJI, S., et al. Correlation of radical-scavenging capacity and amoebicidal activity of *Matricaria recutita* L. (*Asteraceae*). *Experimental Parasitology* [interaktyvus]. Elsevier, December 2017, vol. 183, 212–217 [žiūrėta 2020-02-07]. Prieiga per: Science Direct.
42. SIMPSON, K., A. CERDA, C. STANGE. Carotenoid Biosynthesis in *Daucus Carota*. *Subcellular Biochemistry* [interaktyvus]. PubMed, August 2016, vol. 79, 199–217 [žiūrėta 2020-02-07]. doi: 10.1007/978-3-319-39126-7_7

43. RAAL, A., K. KIRSIPUU, R. MUST, S. TENNO. Content of Total Carotenoids in *Calendula Officinalis* L. from Different Countries Cultivated in Estonia. *Natural product communications* [interaktyvus]. PubMed, February 2009, vol. 4(1), 35–38 [žiūrėta 2020-02-08]. doi: 10.1177/1934578X0900400109
44. FIEDOR, J., K. BURDA. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* [interaktyvus]. MDPI, February 2014, vol. 6(2), 466–488 [žiūrėta 2020-02-14]. doi: 10.3390/nu6020466
45. MATA-GOMEZ L.C., MONTANEZ J.C., MENDEZ-ZAVALA A., AGUILAR C.N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* [interaktyvus]. PubMed, January 2014, vol. 13(1), 1–11 [žiūrėta 2020-02-08]. doi: 10.1186/1475-2859-13-12.
46. JUKISC, H., S. HABES, A. ALDZIC, K. DURGO, I. KOSALEC. Antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds of the extracts of *Echinacea purpurea* (L.). *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herze* [interaktyvus]. University of Sarajevo, June 2015, vol. 13(1), 43–52 [žiūrėta 2020-02-08]. ISSN 0367–4444.
47. NAPAL, G.N., M. T. DEFAGO, G. VALLADARES, S. M. PALACIOS. Response of *Epilachna paenulata* to two flavonoids, Pinocembrin and quercetin, in a comparative study. *Journal of Chemical Ecology* [interaktyvus]. Springer Verlag, August 2010, vol. 36(8), 898–904 [žiūrėta 2020-02-05]. doi: 10.1007/s10886-010-9823-1
48. CHIRINOS, R., et al. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2009, vol. 113(4), 1243–1251 [žiūrėta 2020-02-07]. ISSN 0308–8146. Prieiga per: Science Direct.
49. RONG, T. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* [interaktyvus]. MDPI, December 2010, vol. 2(12), 1231–1246 [žiūrėta 2020-02-07]. doi: 10.3390/nu2121231
50. ROUTRAY, W., V. ORSAT. Microwave-assisted extraction of flavonoids. *Food and Bioprocess Technology* [interaktyvus]. Springer Verlag, February 2012, vol. 5(2), 409–424 [žiūrėta 2020-02-06]. doi: 10.1007/s11947-011-0573-z
51. SOTO–VACA, A., J. N. LOSSO, A. GUTIERREZ, J. W. FINLEY. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. American Chemical Society, May 2012, vol. 60(27), 6658–6677 [žiūrėta 2020-02-07]. doi: 10.1021/jf300861c
52. MARTINS, S., et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* [interaktyvus]. 2011, vol. 29(3), 365–373 [žiūrėta 2020-02-07]. ISSN 0734–9750. Prieiga per: Science Direct.
53. LIAUDANSKAS M., P. VIŠKELIS, V. JANULIS. Polifenoliniai junginiai obuoliuose: cheminė sudėtis, struktūros ypatumai, biologinis poveikis (apžvalga). *Sodininkystė ir daržininkystė*. 2012, 31(1–2), 317. ISSN 0236–4212.
54. HURTADO-FERNANDEZ, E., M. GOMEZ–ROMERO, A. CARRASCO-PANCORBO, A. FERNANDEZ-GUTIERREZ. Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* [interaktyvus]. Elsevier, December 2010, 53 (5), 1130–1160 [žiūrėta 2020-02-10]. doi: 10.1016/j.jpba.2010.07.028
55. EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering* [interaktyvus]. 2019, vol. 5(1), 50–59 [žiūrėta 2020-02-08]. ISSN 2095–8099. Prieiga per: Science Direct.
56. EFSTRATIOU, E., et al. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary therapies in clinical practice* [interaktyvus]. Elsevier, August 2012, vol. 18(3), 173–176 [žiūrėta 2020-03-05]. doi: 10.1016/j.ctcp.2012.02.003
57. SABOURI, Z., M. BARZEGAR, M. A. SAHARI, H. N. BADI. *Echinacea* plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Journal of*

- Medical Plants* [interaktyvus]. Wiley, May 2012, vol. 11(43), 28–40 [žiūrėta 2020-03-05]. doi: 10.1002/ptr.6101
58. MCKAY, D., J. B. BLUMBERG. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research* [interaktyvus]. Wiley, July 2006, vol. 20(7), 519–530 [žiūrėta 2020-03-05]. doi: 10.1002/ptr.1900
59. WITTE, C. P., S. A. Tiller, M. A. TAYLOR, H. V. DAVIES. Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. *Journal of Plant Biotechnology* [interaktyvus]. Springer Verlag, January 2002, vol. 68(1), 103–104 [žiūrėta 2020-03-05]. doi: 10.1023/A:1012966218478
60. GALVYDIS, Jonas, Evaldas NAVYS, Ingrida ŠAULIENĖ. *Sodmenų auginimas urbanizuotoms teritorijoms: vadovėlis aukštosioms mokykloms*. Šiauliai: VšĮ Šiaulių universiteto leidykla, 2007. ISBN 9789986388203.
61. LUCCHESINI, M., A. BERTOLI, A. MENSUALI–SODI, L. PISTELLI. Establishment of *in vitro* tissue cultures from *Echinacea angustifolia* D.C. adult plants for the production of phytochemical compounds. *Scientia Horticulturae*. 2009, 122, 484–490. ISSN 0304–4238. Prieiga per: Science Direct.
62. SLATER, Adrian, Nigel SCOTT, Mark FOWLER. *Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants*. A. Slater. Oxford: Oxford University Press, 2003. ISBN 9780199254682
63. BHAWYA D., K. R. ANILAKUMAR. Antioxidant, DNA damage protection and antibacterial effect of *Psorelea corylifolia*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* [interaktyvus]. Innovare academic sciences pvt ltd, December 2011, vol 4 (2), 149–155 [žiūrėta 2020-03-08]. ISSN 0974 – 2441. Prieiga per: Science Direct.
64. RAUDONIS, R., L. RAUDONĖ, V. JANULIS, P. VIŠKELIS. Antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo nustatymo metodai (apžvalga). *Sodininkystė ir daržininkystė* [interaktyvus]. 2012, 31(3-4), 15-35 [žiūrėta 2020-02-15]. ISSN 0236–4212.
65. BARRAGAN FERRER D., J. M. BARRAGAN FERRER, I. AUKŠTIKALNĖ, I. VILIUŠIENĖ. Vaistažolių arbatų kokybinis vertinimas pagal fenolinių junginių kiekį ir antiradikalinį aktyvumą. *Sveikatos mokslai* [interaktyvus]. 2016, 26(6), 161–164. [žiūrėta 2020-02-15]. doi: 10.5200/sm-hs.2016.109.
66. MAKKAR, H. P., P. SIDDHURAJU, K. BECKER. *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press Inc., 2007. ISBN: 9781588299932.
67. MANIVANNAN, A., P. SOUNDARARAJAN, Y. G. PARK, B. R. JEONG. *In Vitro* Propagation, Phytochemical Analysis, and Evaluation of Free Radical Scavenging Property of *Scrophularia kakudensis* Franch Tissue Extracts. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [interaktyvus]. 2015, 22 [žiūrėta 2020-02-15]. doi: 10.1155/2015/480564
68. CSISZAR, J., et al. Antioxidant enzyme activities in *Allium* species and their cultivars under water stress. *Plant Soil and Environment* [interaktyvus]. Czech Academy of Agricultural Sciences, 2007, vol. 53(12), 517–523 [žiūrėta 2020-02-15]. doi: 10.17221/2192-PSE
69. ABRAHAM, E., C. CABASSA, L. ERDEI, L. SZABADOS. Methods for Determination of Proline in Plants. *Methods in molecular biology* [interaktyvus]. Humana Press, 2010, vol.639, 317–331 [žiūrėta 2020-02-17]. doi: 10.1007/978-1-60761-702-0_20
70. BUTNARIU, M., C. Z. CORADINI. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. *Chemistry Central Journal* [interaktyvus]. 2012, 6 (35) [žiūrėta 2020-02-20]. doi:10.1186/1752-153X-6-35.
71. JALALI, J. M., S. ABBASI. Nano based lutein extraction from marigold petals: optimization using different surfactants and co-surfactants. *Heliyon* [interaktyvus]. Elsevier, 2019, vol. 5 (4) [žiūrėta 2020-02-20]. ISSN 2405–8440. Prieiga per: Science Direct.
72. NEELIMA, Garg, K. L. GARG, K.G. MUKERJI. *Laboratory Manual of Food Microbiology*. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd, 2010. ISBN 9789380578019.
73. ERCETIN T., et al. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L.

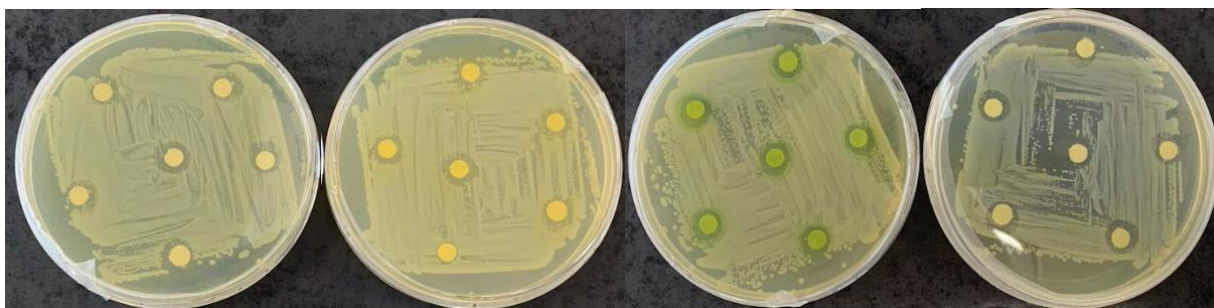
- Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. Elsevier, March 2012, vol. 36(1), 203–208 [žiūrėta 2020-04-15]. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.09.007
74. YU-LING Tsai, et al. Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. *LWT – Food Science and Technology* [interaktyvus]. Elsevier, April 2012, vol. 46(1), 169–176 [žiūrėta 2020-04-20]. ISSN 1096–1127. Prieiga per: Science Direct.
 75. ONISZCZUK T., et al. Active polyphenolic compounds, nutrient contents and antioxidant capacity of extruded fish feed containing purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.). *Saudi Journal of Biological Sciences* [interaktyvus]. Elsevier, January 2019, vol. 26(1), 24–30 [žiūrėta 2020-04-25]. ISSN 1319–562X. Prieiga per: Science Direct.
 76. ŠALKAUSKAS, E. Flavonoidų, fenolinių junginių kiekybinis nustatymas ir antioksidacinio aktyvumo tyrimas vaistinių medetkų (*Calendula officinalis* L.) žieduose. *Magistro darbas*, LSMU, 2015.
 77. RANJBAR A., et al. Ameliorative effect of *Matricaria chamomilla* L. on paraquat: Induced oxidative damage in lung rats. *Pharmacognosy Research* [interaktyvus]. Medknow Publications, July 2014, vol. 6(3), 199–203 [žiūrėta 2020-04-26]. doi: 10.4103/0974-8490.132595
 78. SINGH O., Z. KHANAM, N. MISRA, M. K. SRIVASTAVA. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Review* [interaktyvus]. Medknow Publications, January 2011, vol. 5(9), 82–95 [žiūrėta 2020-04-26]. doi: 10.4103/0973-7847.79103
 79. GREJTOVSKY A., K. MARKUSOVA, L. NOVAKOVA. Lead uptake by *Matricaria chamomilla* L. *Plant Soil and Environment* [interaktyvus]. Czech Academy of Agricultural Sciences, February 2008, vol. 54(2), 47–54 [žiūrėta 2020-04-27]. doi: 10.17221/2784-PSE
 80. PIRZAD A. Effect of chemical and biological nitrogen on some morphological characters of *Calendula officinalis* L. *International journal of Agronomy and Plant Production* [interaktyvus]. Victorquest Publications, January 2013, vol. 4, 165–170 [žiūrėta 2020-04-28]. doi: 10.5897/JMPR11.1014
 81. DAUDARTAITĖ, I. Karotenoidų nustatymas vaistinių medetkų (*Calendula officinalis* L.) žieduose. *Magistro darbas*, LSMU, 2017.
 82. JIAN-HAO, L., L. DUU-JONG, C. JO-SHU. Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. Elsevier, October 2014, vol. 184 [žiūrėta 2020-04-28]. doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.099
 83. PINTEA, A., C. BELE, S. ANDREI, S. CARMEN. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis* [interaktyvus]. January 2003, vol. 47(47), 37–40 [žiūrėta 2020-04-28]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/228486806_HPLC_analysis_of_carotenoids_in_four_varieties_of_Calendula_officinalis_L_flowers.
 84. NATCHIGAL, A. M., A. C. O. STRINGHETA, P. C. STRINGHETA, M. C. BERTOLDI. Quantification and characterization of lutein from tagetes (*Tagetes patula* L.) and calendula (*Calendula officinalis* L.) flowers. *Acta Horticulturae* [interaktyvus]. ISHS, 2012, vol. 939, 309–314 [žiūrėta 2020-05-05]. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.939.40

Priedai

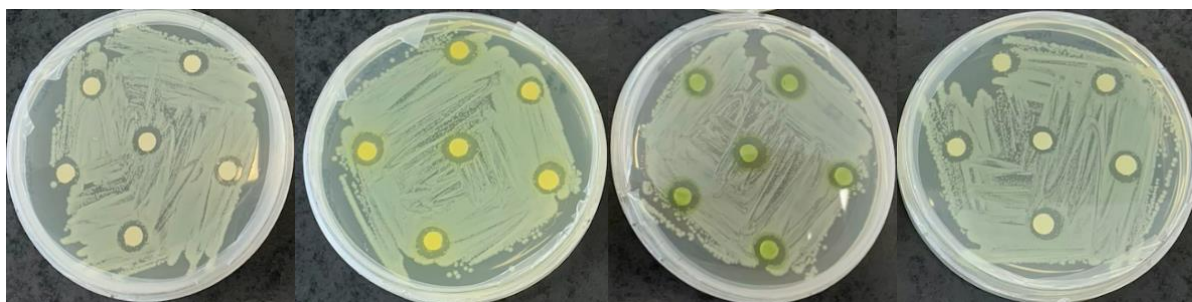
1 priedas. Antibakterinio aktyvumo įvertinimo agarų difuziniu metodu rezultatai



1 pav. Vaistinės ramunės kaliaus kultūrų *in vitro*, lapų ir stiebų bei žiedų *in vivo* antibakterinis aktyvumas prieš *E. coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijas

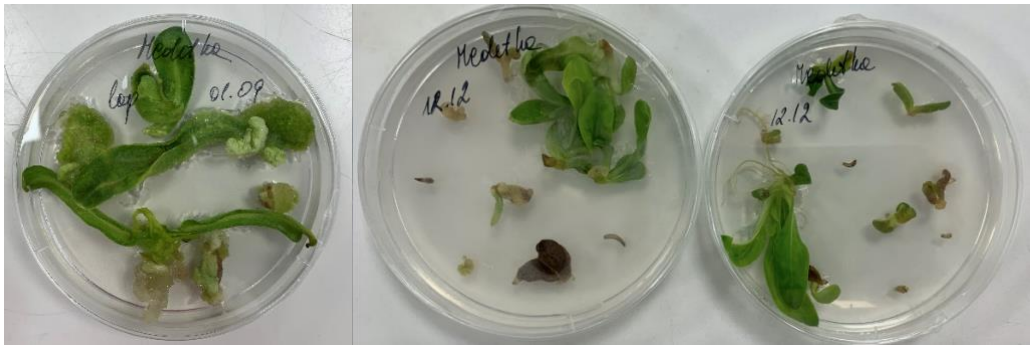


2 pav. Vaistinės medetkos kaliaus kultūrų *in vitro*, žiedų, lapų ir stiebų *in vivo* antibakterinis aktyvumas prieš *E. coli* bakteriją

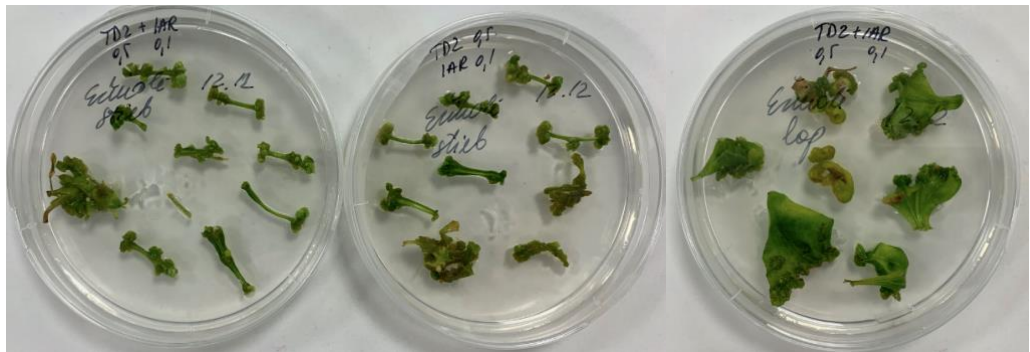


3 pav. Vaistinės medetkos kaliaus kultūrų *in vitro*, žiedų, lapų ir stiebų *in vivo* antibakterinis aktyvumas prieš *Bacillus subtilis* bakteriją

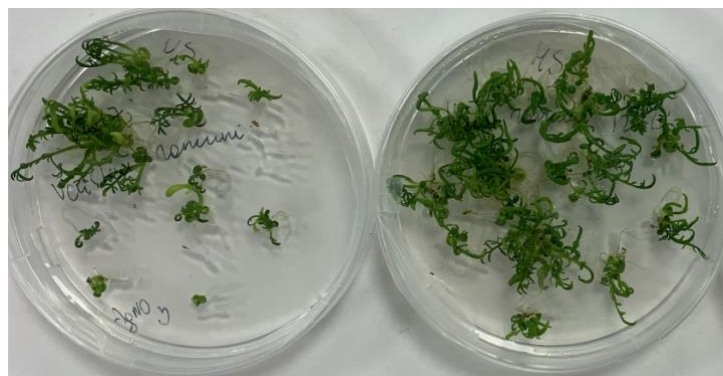
2 priedas. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūros *in vitro*



1 pav. Vaistinės medetkos kaliaus kultūros *in vitro* iš stiebų



2 pav. Rausvažiedės ežiulės kaliaus kultūros *in vitro* iš stiebų ir lapų



3 pav. Vaistinės ramunės kaliaus kultūros *in vitro*