



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Paprastosios jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) kaliaus
kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinio ir antibakterinio
aktyvumo įvertinimas bei panaudojimo galimybės**

Baigiamasis magistro projektas

Evelina Klinkovaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Paprastosios jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas bei panaudojimo galimybės

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Evelina Klinkovaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

M.d. Ingrida Tumosienė

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Paprastosios jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas bei panaudojimo galimybės

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Evelina Klinkovaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

TURINYS

| | |
|---|-----------|
| Santrumpų ir terminų sąrašas | 9 |
| Įvadas..... | 10 |
| 1. Literatūros apžvalga | 11 |
| 1.1. Jonažolės apibūdinimas..... | 11 |
| 1.2. Jonažolės kaupiami bioaktyvieji junginiai..... | 12 |
| 1.3. Jonažolės kaliaus kultūros..... | 13 |
| 1.4. Jonažolės suspensinės kultūros | 15 |
| 1.5. Jonažolės kaliaus kultūrose kaupiami metabolitai | 16 |
| 1.6. Antioksidantai | 17 |
| 1.7. Antioksidantai <i>in vitro</i> | 19 |
| 1.8. Jonažolės pritaikymas | 21 |
| 1.9. Jonažolės antibakterinis aktyvumas | 23 |
| 1.10. Literatūros apžvalgos apibendrinimas..... | 24 |
| 2. Medžiagos ir tyrimų metodai | 25 |
| 2.1. Įrangos sąrašas | 25 |
| 2.2. Jonažolės regeneracija ir kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> gavimas | 25 |
| 2.2.1. Sėklų sterilinimas..... | 25 |
| 2.2.2. Augimo reguliatorių paruošimas | 25 |
| 2.2.3. Mitybinių terpių paruošimas..... | 25 |
| 2.2.4. Sėklų sudaiginimas <i>in vitro</i> ir kalusių formavimas | 26 |
| 2.3. Jonažolės antioksidacinio aktyvumo nustatymas | 26 |
| 2.3.1. Jonažolės redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas | 26 |
| 2.3.2. Jonažolės antioksidacinis aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ | 27 |
| 2.3.3. Jonažolės ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu | 28 |
| 2.3.4. Jonažolės ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu | 28 |
| 2.4. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas..... | 29 |
| 2.4.1. Sintetinių junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas..... | 29 |
| 2.4.2. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ..... | 29 |
| 2.4.3. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu..... | 29 |
| 2.5. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu | 29 |
| 2.6. Baltymų koncentracijos nustatymas..... | 30 |
| 2.7. SOD aktyvumo nustatymas..... | 32 |
| 2.8. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos nustatymas..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 2.9. MDA koncentracijos nustatymas | 34 |
| 2.10. L-prolino koncentracijos nustatymas | 34 |
| 2.11. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas | 35 |
| 2.12. Flavonoidų koncentracijos nustatymas | 36 |
| 2.13. Katalazės aktyvumo nustatymas | 37 |
| 2.14. Prolindehidrogenazės aktyvumo nustatymas | 38 |
| 2.15. Antibakterinio aktyvumo nustatymas agaru difuziniu metodu | 38 |
| 2.16. Liuteino koncentracijos nustatymas | 39 |
| 2.17. Vandeniilio peroksido suardymo nustatymas | 39 |
| 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas..... | 40 |
| 3.1. Jonažolės kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> susidarymo tyrimai..... | 40 |
| 3.2. Jonažolės antioksidacinio aktyvumo įvertinimas..... | 41 |
| 3.2.1. Jonažolės redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas | 42 |
| 3.2.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ..... | 42 |
| 3.2.3. Jonažolės ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas, naudojant DPPH metodą..... | 44 |
| 3.2.4. Jonažolės antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu | 44 |
| 3.3. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas | 45 |
| 3.3.1. Sintetinių junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas..... | 46 |
| 3.3.2. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ..... | 46 |
| 3.3.3. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu..... | 47 |
| 3.4. Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu | 47 |
| 3.5. Baltymų koncentracijos įvertinimas..... | 48 |
| 3.6. SOD aktyvumo įvertinimas..... | 48 |
| 3.7. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas | 49 |
| 3.8. MDA koncentracijos įvertinimas | 50 |
| 3.9. L-prolino koncentracijos įvertinimas | 51 |
| 3.10. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas | 51 |
| 3.11. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas | 52 |
| 3.12. Katalazės aktyvumo įvertinimas | 53 |
| 3.13. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas | 54 |
| 3.14. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaru difuziniu metodu | 54 |
| 3.15. Liuteino koncentracijos įvertinimas | 55 |
| 3.16. Vandeniilio peroksido suardymo įvertinimas | 56 |
| 4. Rekomendacijų dalis..... | 58 |

| | |
|--|-----------|
| Išvados | 61 |
| Literatūros sąrašas | 62 |
| Priedai..... | 67 |
| 1 priedas. Tyrimo metu naudotų reagentų sąrašas..... | 67 |
| 2 priedas. Tyrimo metu naudotos aparatūros sąrašas | 68 |
| 3 priedas. N-(1,3-dioksizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino) propanamido (39 junginio) cheminė struktūra | 69 |
| 4 priedas. FRAP kalibracinės kreivės reagentų kiekiai | 69 |
| 5 priedas. Fenolinių junginių kalibracinės kreivės reagentų kiekiai | 69 |
| 6 priedas. Principinės aparatūrinės schemas prietaisų žymėjimas ir pavadinimai..... | 70 |
| 7 priedas. Principinės aparatūrinės schemas medžiagų žymėjimas ir pavadinimai | 70 |
| 8 priedas. Hiperforino ir adhiperforino cheminė struktūra..... | 71 |

Klinkovaitė, Evelina. Paprastosios jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas bei panaudojimo galimybės.

Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: paprastoji jonažolė, *Hypericum perforatum* L., kaliaus kultūros, *in vitro*, antioksidacinis, antibakterinis.

Kaunas, 2021. 71 p.

Santrauka

Hypericum perforatum L. jau nuo seno yra naudojamas kaip vaistinis augalas, pasižymintis antioksidacinėmis, antibakterinėmis, priešuždegiminėmis bei antidepresantinėmis savybėmis. Jonažolėje gausu bioaktyviųjų junginių, tokių kaip hipericinas, hiperforinas, pseudohipericinas, flavonoidų bei kitų junginių, kurie ir lemia šias savybes. *Hypericum* preparatai plačiai naudojami medicinoje, farmacijoje, nuolat atliekami tyrimai, siekiant nustatyti ir įvertinti antioksidacinį ir antibakterinį aktyvumą. Efektyviausias būdas tai ištirti – naudoti įvairius augimą lemiančius hormonus, kurie atsako už augalo augimą, vystymąsi, ląstelių dalijimąsi ir diferenciaciją bei baltymines medžiagas, kurios svarbios imuniniam atsakui. Naudojant šias medžiagas, bandoma pagerinti ir pagerinti augalo augimą bei padidinti bioaktyviųjų junginių koncentracijas [1].

Tyrimo metu buvo paruoštos skirtingos terpės, kurios tarpusavyje skyrėsi sudėtimi – buvo pridedami auksinai (2,4-D, NAR) ir/arba citokinai (BAP, kinetinas), naudojamos skirtingos koncentracijos. Buvo formuojamos *H. perforatum* L. kaliaus kultūros *in vitro*, vertinamas jų ekstraktų antioksidacinis ir antibakterinis aktyvumas. Antioksidacinis aktyvumas buvo vertinamas, naudojant redukcinį, FRAP, DPPH ir ABTS metodus, antibakterinis aktyvumas – agarų difuziniu metodu. Įvertinta 39 junginio (N-(1,3-dioksizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino) propanamido) ir augalo dalies, iš kurios buvo išauginta kaliaus kultūra, įtaka paprastosios jonažolės antioksidaciniam ir antibakteriniam aktyvumui. Nustatytas katalazės ir SOD aktyvumas, fenolinių junginių, MDA, liuteino, chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų, flavonoidų koncentracija bei, taip pat, įvertinta 39 junginio ir augalo eksplanto dalies, iš kurios buvo išauginta kaliaus kultūra, įtaka šiems rodikliams. Buvo ištirtas prolindehidrogenazės ir askorbatperoksidazės aktyvumas, prolino ir baltymų koncentracija. Pasiūlyta hiperforino išskyrimo iš *H. perforatum* L. kaliaus kultūrų *in vitro* ekstrakcijos būdu, naudojant superkritinį CO₂, technologinė schema.

Klinkovaitė, Evelina. Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activity and Application Possibilities of St. John's (*Hypericum Perforatum* L.) Callus Culture *in Vitro* Extracts. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: St. John's Wort, *Hypericum perforatum* L., callus cultures, *in vitro*, antioxidative, antibacterial.

Kaunas, 2021. 71.

Summary

Hypericum perforatum L. has long been used as a medicinal plant with antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and antidepressant properties. St. John's wort is rich in bioactive compounds such as hypericin, hyperforin, pseudohypericin, flavonoids and other compounds, which determine these properties. *Hypericum* medications are widely used in medicine, pharmacy, regular research is carried out to determine and evaluate antioxidant and antibacterial activity. The most effective way to study this is to use a variety of growth-determining hormones that are responsible for plant growth, development, cell division and differentiation, and proteins that are important for the immune response. The use of these substances attempts to accelerate and improve plant growth and increase the concentrations of bioactive compounds [1].

During the study, different media were prepared, which differed in their composition - auxins (2,4-D, NAA) and / or cytokines (BAP, kinetin) were added, different concentrations were used. *H. perforatum* L. callus cultures were formed *in vitro*, and the antioxidant and antibacterial activity of their extracts was evaluated. Antioxidant activity was assessed using reductive, FRAP, DPPH and ABTS methods, antibacterial activity - using agar diffusion method. The influence of 39 compound (N-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-3-((4-methoxyphenyl)amino)propanamide) and the part of the plant explant from which callus cultures were grown on the antioxidant and antibacterial activity of St. John's wort was evaluated. Catalase and SOD activity, the content of phenolic compounds, MDA, lutein, chlorophyll *a* and *b* and carotenoids, flavonoids were determined, as well as the influence of 39 compound's and plant explant parts from which were grown on these parameters was evaluated. Proline dehydrogenase and ascorbate peroxidase activity, proline and protein content were examined. A technological scheme for the extraction of hyperforin from *H. perforatum* L. callus cultures by *in vitro* extraction using supercritical CO₂ was proposed.

Santrumpų ir terminų sąrašas

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

BAP – 6-benzilaminopurinas;

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

FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia;

MS – *Murashige* ir *Skoog* terpė;

NAR – 1-naftilacto rūgštis;

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;

SOD – superoksido dismutazė;

MDA – malondialdehidas;

39 junginys – N-(1,3-dioksizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino) propanamidas;

Kinetinas – 6-furfurilaminopurinas;

BHT – butilato hidroksitoluenas;

DTT – ditioneitolis;

PMSF – fenilmetilsufonilfluoridas;

LB – *Luria-Bertani* terpė;

IAR – 3-indolilacto rūgštis;

IBR – 3-indolilbutano rūgštis;

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilenbenziazolin-6-sulfonrūgštis);

DMSO – dimetilsulfoksidas;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

NAD – β-nikotinamido adenino dinukleotidas;

TDZ – tidiazuronas;

T+1 – TDZ (0,5 mg/l) + IAR (0,1 mg/l).

Įvadas

Šiuolaikinė medicina nuolat tobulėja – kasdien atliekami nauji tyrimai, atrandamos naujos ligos bei siekiama būdų, kaip su jomis kovoti. Ieškoma ne tik naujų veikliųjų medžiagų, bet ir atsigręžiama į nuo seno naudojamus vaistinius preparatus.

Jau seniai buvo pastebėtas *H. perforatum* L. farmakologinis poveikis kovoje su virusais ir bakterijomis, tačiau pastaruoju metu ypač išaugo susidomėjimas *Hypericum* rūšies augalais. Paprastosios jonažolės ekstraktuose gausu naftodiantronų (hipericino, pseudohipericino), floroglicinolių (hiperforino), flavonoidų (hiperozito, kvercetino), fenolinių rūgščių (ferulo ir kofeino rūgščių), ksantonų bei eterinių aliejų. *H. perforatum* L. pasižymi puikiomis antioksidacinėmis, antibakterinėmis bei antidepresantinėmis savybėmis ir yra puikus natūralių bioaktyvių junginių šaltinis [2].

Hypericum preparatai plačiai naudojami medicinoje bei farmacijoje, nuolat atliekami tyrimai tiek su *in vivo*, tiek su kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktais, nustatomas bei vertinamas antioksidacinis ir antibakterinis aktyvumas. Siekiant pagerinti ir pagerinti augalo augimą *in vitro* bei padidinti bioaktyviųjų junginių koncentracijas, naudojami augimą lemiantys hormonai bei baltyminės medžiagos, kurios turi įtakos imuniniam atsakui [1].

Tyrimo tikslas – suformuoti paprastosios jonažolės (lot. *H. perforatum* L.) kaliaus kultūras *in vitro* ir įvertinti jų ekstraktų antioksidacinį ir antibakterinį aktyvumą bei panaudojimo galimybes.

Tyrimo uždaviniai:

1. suformuoti *H. perforatum* L. kaliaus kultūras *in vitro*;
2. įvertinti jonažolės kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, naudojant redukcinį, FRAP, DPPH ir ABTS metodus bei įvertinti 39 junginio (N-(1,3-dioksizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino) propanamido) ir augalo dalies, iš kurios buvo išaugintos kaliaus kultūros, įtaką antioksidaciniam aktyvumui;
3. nustatyti *H. perforatum* L. katalazės ir SOD aktyvumą, fenolinių junginių, MDA, pigmentų bei flavonoidų koncentraciją bei įvertinti 39 junginio ir augalo dalies, iš kurios buvo išauginta kaliaus kultūra, įtaką šiems rodikliams;
4. įvertinti prolindehidrogenazės aktyvumą, vandenilio peroksido suardymą bei prolino ir baltymų koncentracijas;
5. įvertinti paprastosios jonažolės kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antibakterinį aktyvumą;
6. Pateikti hiperforino išskyrimo iš *H. perforatum* L. iš kaliaus kultūrų *in vitro* ekstrakcijos būdu, naudojant superkritinį CO₂.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Jonažolės apibūdinimas

Paprastoji jonažolė (lot. *H. perforatum* L.) yra geltonžiedis, šakotas, žolinis, daugiametis augalas. Jonažolė formuoja tankius medynus, kurie konkuruoja su vietinėmis augalų rūšimis, sumažina laukinės gamtos buveines, turi neigiamos įtakos dirvožemio drėgmei – jį sausina, taip padidindama gaisro pavojų, tačiau pasižymi puikiomis antierozinėmis savybėmis. Šis augalas išsiskiria ypač dideliu genotipo ir fenotipo kintamumu bei greitu prisitaikymu prie aplinkos sąlygų [3]. *H. perforatum* L. kilusi iš Europos, vakarų Azijos ir šiaurės Afrikos. XVII a. jonažolė buvo perkelta į šiaurės Ameriką, ten prisitaikė ir išplito po visą žemyną [4]. Jonažolė auga dviem fazėmis: rudens/žiemos – pradinis, bazinis augimas, ir pavasario/vasaros – išauga sumedėjęs stiebas [3]. Pavasarį iš plačiai išsišakojusio šakniastiebio užauga keli kieti, rausvi 50–80 cm stiebai. Viršutinė kotelio dalis yra šakota ir plinta į šonus. Būdingas bruožas, skiriantis paprastąją jonažolę nuo kitų *Hypericum* rūšių – du išilginiai kotelio kraštai. Iš jo išauga stiebai, padengti smulkiais, juodais liaukiniais mazgeliais, kuriuose kaupiasi eteriniai aliejai. Ant viršutinių šakelių galiukų yra gausus geltonai oranžinis žiedynas [5]. Žiedyną sudaro nuo 25 iki 100 žiedų ant vieno stiebo [6]. Penkių galiukų asimetriniai žiedlapiai, taip pat, padengti tamsiomis liaukomis. Smulkinant šiuos augalus gaunamos kraujo raudonumo sultys, kurios dažo mėlynai violetine spalva. Jonažolėse yra gausu pigmentinių medžiagų, flavonoidų, tokių kaip hiperino (lapuose 1,6–2,6 %, žieduose 2,2 %), rutino (lapuose 1,7–2,8 %, žieduose 1,2 %), hiperforino, hipericino, pseudohipericino, kvercetino, chlorogeno bei kavos rūgšties. Taip pat, aptinkama eterinio aliejaus į kurio sudėtį įeina terpenai, seskviterpenai ir izovalerijono rūgšties esteriai. Pasižymi gausiu karotino kiekiu, organinių rūgščių ir mineralinių medžiagų kiekiu [7]. Jonažolės žydi nuo birželio galo iki rugsėjo [5]. Daigai netoleruoja didelio druskingumo. Subrendę augalai gal išgyventi ilgą užmigimo periodą, iki 10 metų. Turi galias bei plačias šaknų sistemas, kurios leidžia išgyventi sausras. Dauginasi vegetatyviškai iš šoninių šaknų ir šaknų vainikų, pasižymi savidulka arba apdulkina vabzdžiai. Vertikaliosios šaknys gali siekti iki pusanthro metro ilgio. Bendras stiebo ir žiedyno aukštis 30–90 cm [6]. *H. perforatum* L. geba išauginti dešimtis tūkstančių sėklų per metus. Jonažolės sėklos sunoksta per 4–6 mėn., didžiausias daigumas pasiekiamas po 12 mėn [3]. Mažos, rudos spalvos sėklos, pasižymi specifiniu, dervingu kvapu, panašiu į terpentinę. Vienos sėklos ilgis yra apie 1 mm [6]. Optimalios sąlygos sėkloms sudygti yra plynas, menkas, smėlingas, žvyruotas dirvožemis, stiprus lietus ir saulės spinduliai. Geriausiai sėklos subręsta per kelis sezonus, per pirmuosius metus daugiausia vystoma šaknų sistema [3].

Atmosferinio anglies dioksido koncentracijos didėjimas bei oro temperatūros kilimas turi įtakos pasėlių augimui *in vivo*. Tyrimo metu buvo stebima anglies dioksido ir temperatūros įtaka *H. perforatum* L. augimui, biomasės susidarymui ir antrinių metabolitų koncentracijai. Per pastaruosius 50 metų, anglies dioksido kiekis atmosferoje pasiekė 405,7 $\mu\text{mol/mol}$. Kiekvienais metais padidėja 2,4 %. Manoma, kad iki 2050 m. anglies dioksido koncentracija atmosferoje padidės iki 550 $\mu\text{mol/mol}$, o iki XXI a. pabaigos - iki 700 $\mu\text{mol/mol}$. Dėl šiltnamio efektą sukeliančių dujų padidėjimo, vidutinė pasaulinė temperatūra nuolat kyla. Nustatyta, jog trumpalaikis padidėjusio anglies dioksido kiekis aktyvina fotosintezę, tad padidėja derlius, tačiau vertinant ilgalaikį poveikį – pastebimas augalų metabolinio aktyvumo sumažėjimas. Rezultatai parodė, kad padidėjusi anglies dioksido koncentracija ir aukštesnė temperatūra,

labiausiai paveikia augalų augimą ir biomasės susidarymą. Paaikškėjo, kad auginant *Hypericum*, esant padidintai anglies dioksido koncentracijai, hipericino kiekis sumažėja 22,00% [8].

1.2. Jonažolės kaupiami bioaktyvieji junginiai

Nuo senų laikų *Hypericum* augalai, kaip vaistiniai augalai, buvo naudojami įvairioms medicininėms problemoms gydyti, tokioms kaip išorinės žaizdos, uždegimai, nudegimai, odos, menstruacijų, nervų sutrikimai, nerimas, depresija bei insomnija [4]. Jonažolė naudojama kaip diuretikas, antibakterinė, priešuždegiminė, dezinfekavimo priemonė, kaip vaistas kvėpavimo takams ir tulžies pūslei gydyti [6]. Pagrindiniai bioaktyvieji *H. perforatum* L. komponentai skirstomi į dvi kategorijas. Pirmoji grupė yra naftodiantronai, tokie kaip hipericinas, pseudohipericinas ir jų pirmtakai, kurie, gali sunaikinti virusų paviršiaus struktūras. Antroji grupė yra floriglicinoliai – pavyzdžiui hiperforinas ir jo darinys adhiperforinas, kuris yra nestabilus tirpale, ypač jautrus oksidacijai [9]. Gausu flavonoidų, acilfloriglicinolių, proantocianidinų, flavonolio glikozidų, terpeno ir sesviterpeno aliejų, fenilpropanų, biflavonų, taninų, ksantonų bei floriglicinolių. Didžiausiu farmakologiniu aktyvumu pasižymi hipericinas, hiperforinas, flavonoidų sudedamosios dalys bei eteriniai aliejai [10]. Aptinkama biologiškai aktyvių medžiagų – cholino, pektino, rutino, sitosterolio junginių. Taip pat, junginių, reguliuojančių smegenų veiklą, tokių kaip hiperforinas, pasižymintis antidepresantinėmis savybėmis, dopaminas, interleukinai, melatoninas, monoaminoksidazės ir serotoninas [6]. Eksperimentų su gyvūnais metu, buvo nustatyta, jog hipericinas pasižymi fotosensibilizacinėmis savybėmis – gyvūnams, kurie dvi savaites buvo šeriami *H. perforatum* L. augalais, šviesos paveiktose vietose atsirado edemos, alopecija bei pakito kraujo sudėtis – padidėjo hipericino kiekis. Taip pat, žiurkės priaugo mažiau svorio nei kontroliniai gyvūnai. Nustatyta, jog *Hypericum* ekstrakto ir eterinių aliejų mišiniai triušių akims sukelia minimalų akių dirginimą. Atlikus tyrimus su *H. perforatum* L. polifenolio frakcija, nustatyta, jog ši frakcija pasižymi imunostimuliaciniu aktyvumu, o lipofilinė dalis - imuninę sistemą slopinančiomis savybėmis [10]. Kaip jau minėta, kontaktas su *H. perforatum* L. gali sukelti fotojautrumą, kurio šalutinis poveikis yra virškinimo trakto sutrikimai, alerginės reakcijos ir nuovargis. Jei *Hypericum* ekstraktai naudojami kartu su vaistais, klasifikuojamais kaip serotonino reabsorbcijos inhibitoriai, gali pasireikšti serotonino sindromo simptomai: haliucinacijos, galvos skausmas, karščiavimas, pykinimas, drebulys, prakaitavimas, hipertenzija, tachikardija, koma. Be to, jonažolė gali sumažinti kontraceptinių, antidepresantinių bei ŽIV vaistų, varfarino ir digoksino veiksmingumą [11]. Vieno tyrimo metu pastebėta, jog moterims, vartojančioms jonažolę kartu su geriamaisiais kontraceptikais, sutrinka mėnesinių ciklas ir pasireiškia nereguliarus kraujavimas. Nustatyta, jog kraujavimas padidėja dėl citochromo aktyvumo. Fermentų aktyvumas mažina kontraceptikų veiksmingumą [12].

Dėl savo pagrindinių bioaktyviųjų komponentų, tokių kaip hipericinas ir hiperforinas, jonažolė pasižymi antioksidacinėmis, citotoksinėmis, antimikrobinėmis, prieštraukulinėmis, anksiolitininėmis savybėmis, skatina žaizdų gijimą. Hipericinas yra stiprus natūralus fotosensibilizatorius, kuris yra naudojamas fotodinaminėje vėžio terapijoje. Hiperforinas, pasižymintis antidepresantinėmis savybėmis, yra naudojamas stebint antidepresantų poveikį. Nustatyta, jog *H. perforatum* L. itin svarbus metabolizuojant vaistus, tokius kaip teofiliną – bronchus plečiantis vaistas, kuris atpalaiduoja bronchų lygiuosius raumenis, klozapiną – neuroleptikas, antipsichozinis vaistas, ir takriną – acetilcholinesterazės inhibitorius ir netiesioginis cholinerginis antagonistas, naudojamas Alzheimerio ligai gydyti. *H.*

perforatum L. pasižymi sąveika su šiais vaistais, taip sustiprindamas jų poveikį. Tačiau ilgalaikis *H. perforatum* L. vartojimas gali būti toksiškas kepenų ląstelių gyvybingumui – pažeidžiami hepatocitai, sudarantys 80–90% visos kepenų masės ir galintys atsinaujinti, tad yra svarbūs kepenų regeneracijai [13].

H. perforatum L. gausu flavonoidų, pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis. Daugiausia aptinkama kvercetino ir jo glikozidų darinių, sudarančių pagrindinę bioaktyviųjų *H. perforatum* L. junginių klasę. Tarp glikozidų dažniausiai dominuoja hiperosidas, rutinas ir izokercitrinas. Taip pat aptinkami biflavonoidai – gan reta dimerinių flavonų grupė. Pagrindinis *H. perforatum* L. biflavonas yra 3,8–bipigeninas. Keletos tyrimų metu, nustatyta, jog tikslus flavonoidų kiekio nustatymas *H. perforatum* L. mėginiuose priklauso nuo tinkamų ekstrahavimo sąlygų parinkimo – tirpiklio, ekstrahavimo trukmės ir temperatūros. Daugiausia flavonoidų išskiriama naudojant keletą tirpiklių. Taip pat nustatyta, jog pagrindinių bioaktyviųjų junginių kiekis priklauso ne tik nuo ekstrahavimo technikos ir sąlygų, bet ir nuo derliaus nuėmimo – svarbu atsižvelgti į augalo vystymosi ciklą. Skirtingose augalo vystymosi stadijose, susidaro skirtingas bioaktyviųjų junginių kiekis. Nustatyta, jog daugiausia rutino susikaupia žiedų jaunystės etape, kai žiedas tik ruošiasi žydėti, tačiau didesnės kvercetino ir 3,8-bipigenino koncentracijos aptiktos jau žydėjimo metu [14].

Be anksčiau minėtų junginių, *H. perforatum* L. aptinkama ir ksantonų. Ksantonai, kaip ir flavonoidai, pasižymi antidepresantinėmis savybėmis. Manoma, jog depresija kyla, esant smegenų monoamino neurotransmiterių (dopamino, norepinefrino ir serotonino) funkciniam trūkumui. Tiriant *H. perforatum* L. ekstraktus nustatyta, kad flavonoidai ir ksantonai slopina monoamino oksidazių, kurios katalizuoja neurotransmiterių oksidacinį deaminavimą smegenyse, aktyvumą. Tad flavonoidai ir ksantonai gali būti naudojami kaip svarbūs antidepresantai. Depresija yra stipriai susijusi su Alzheimerio ir Parkinsono ligomis, kurioms būdingi pažinimo sutrikimai ir neurodegeneracija. Alzheimerio liga yra susijusi su acetilcholino ir butirilcholino, kurie yra hidrolizuojami acetilcholinesterazės (AChE) ir butirilcholinesterazės (BChE), trūkumu. Taip pat svarbi tirozinazė (TYR), kuri formuoja neuromelaniną žmogaus smegenyse. Per didelis TYR fermento aktyvumas sukelia dopamino neurotoksiškumą ir prisideda prie neurodegeneracijos, susijusios su Parkinsono liga. Tad cholinesterazių (AChE ir BChE) ir TYR slopinimas yra svarbus metodas tiriant vaistus neurodegeneracinių ligų gydymui. Įrodyta, jog chlorogeninė rūgštis, rutinas, hiperosidas, izokercitrinas ir kveritrinas slopina AChE. Be to, *Hypericum* taikomas ir diabeto gydymui. Diabetui būdinga hiperglikemija, angliavandenių, riebalų ir baltymų metabolizmo sutrikimai - sutrinka insulino sekrecijos mechanizmas. Veiksmingas terapinis metodas hiperglikemijai kontroliuoti yra sulėtinti angliavandenius hidrolizuojančių fermentų, tokių kaip α -amilazės ir α -gliukozidazės, aktyvumą. α -amilazė ir α -gliukozidazės aktyvumo slopinimas prailgina angliavandenių virškinimą – sumažėja gliukozės absorbcijos greitis bei sulėtėja gliukozės kiekio padidėjimas kraujyje. Įrodyta, jog *Hypericum*, esantys kvercetino ir kamferolio dariniai, slopina α -amilazės ir α -gliukozidazės aktyvumą [15].

1.3. Jonažolės kaliaus kultūros

Kaliaus kultūros – tai būdas, vystyti naujas augalų rūšis, taikant genetines modifikacijas, stebint ląstelių regeneraciją bei vykdant tolimesnius tyrimus. Augalų ląstelių kultūrų naudojimas suteikia įvairių privalumų, tokių kaip manipuliavimas bioaktyviųjų junginių biosinteze, naudojant augalines medžiagas steriliomis ir kontroliuojamomis sąlygomis, bei didesnis produktyvumas – sezoniškumas neturi įtakos.

Bet to, lyginant kaliaus kultūrų augalų naudojimą su lauke auginamais augalais – kaliaus kultūrų naudojimas sumažina galimo kryžminio užteršimo galimybes.

Pirmiausia yra paimamos *H. perforatum* L. sėklos, praplaunamos tekančiu vandeniu. Taip pat, naudojami papildomi plovikliai. Eksplantų paviršius sterilizuojamas, naudojant 0,1 % gyvsidabrio chloridą 45 s, vėliau plaunamas steriliu vandeniu. Sterilizuotos sėkos yra pasodinamos ant bazinės terpės. Po maždaug 6 savaičių vertinamas augalų augimas ir eksplantų atsakas. Sudygę daigai perkeliama į dauginimo terpę, praturtintą kinetinu. Auginant kaliaus kultūras, galimos kelios regeneracijos – netiesioginė arba tiesioginė. Netiesioginės regeneracijos metu vystomas somoklonas – iš *in vitro* išaugintų lapų eksplantai dedami į bazinę terpę, vėliau kaliaus kultūra (atauga) kas 4-5 savaites dauginama, naudojant tam tikrą subkultūrą. Dviejų savaičių kaliaus kultūra perkeliama į įvairius terpių derinius. 8-10 1 cm² dydžio eksplantai sodinami į *Petri* lėkštelę. Po maždaug 30 dienų inkubacinio laikotarpio, užaugę ūglių pumpurai perkeliama į standartizuotą dauginimo terpę. Šioje terpėje kiekvienas ūglys yra laikomas kaip atskiras klonas. Tiesioginės regeneracijos metu vyksta augalų transgeninis vystymas. Tyrimui naudojami, taip pat, *in vitro* išauginti lapų eksplantai. Jie yra dedami į visavertę, praturtintą terpę. Atliekamos genetinės transformacijos. Į tam tikrą terpę, praturtintą kanamicinu, pasėjama bakterijų. Inkubuojama 28 °C, laikoma tamsioje vietoje ~12 val. nuolat purtant 200 aps/min. Vėliau į lapų eksplantus sušvirkščinama 12 val bakterijų suspensijos ir persodinama į bazinę terpę. Po 3-7 dienų eksplantai perkeliama į regeneracinę terpę, praturtintą 1 mg/ml cefotaksimu. Regeneruoti ūgliai perkeliama į 50 mg/l kanamicinu papildytą bazinę terpę. Tolimesnių tyrimų metu galima atlikti įvairius histocheminius ar genominius tyrimus. Cheminė analizė atliekama paėmus 1g džiovintų augalų lapų. Lapai yra susmulkinami, padaromi skiediniai, ekstrahuojama. Galima atlikti hipericino, hiperfotino serotoninino ar melatonino plonasluoksne skysčių chromatografijos analizę [16].

Vieno tyrimo metu buvo stebėtas nanodalelių poveikis *H. perforatum* L. augimui. Cheminių nanodalelių sintezės tyrimo metu nustatyta, kad šios dalelės pasižymi kancerogeniškumu, genotoksiškumu, citotoksiškumu bei bendru toksiškumu. Nanomedžiagos yra tokios mažos, kad gali prasiskverbti pro odą, plaučius ir žarnas, sukeldamos rimtą pavojų žmonių sveikatai. Eksperimento metu buvo tirtos skirtingų koncentracijų sidabro suspensijos ir jų įtaka *H. perforatum* L. kultūrų morfologijai ir antioksidacinėms savybėms. Lyginant kontrolinę *H. perforatum* L. kultūrą ir *H. perforatum* L. kultūrą su sidabro suspensijomis – kultūroje su sidabru atsiranda ilgesni stiebai. Stebinti pH, pastebėti ryškūs pH pakitimai dėl galimai jaučiamo oksidacinio streso. Sidabro poveikis turi įtakos peroksidazės aktyvumo sumažėjimui beveik 4 kartus, lyginant su kontrole. Peroksidazės aktyvumo sumažėjimą gali lemti ligninų sintezė – ligninas ir celiuliozė sudaro pagrindinius augalų ląstelių sienelės struktūrinius komponentus ir yra itin svarbūs augalams prisitaikant prie aplinkos sąlygų, tad tai gali turėti įtakos stiebų pailgėjimui [17].

Taip pat buvo atliekami tyrimai su gama spinduliuote. Augalų audinių švitinimas gama spinduliais stimuliuoja ląstelėje esančių aktyvių deguonies radikalų ir vandenilio peroksido sintezę, kurie yra svarbūs kaupiant antrinius junginius. Šie radikalai gali modifikuoti arba pažeisti augalų ląsteles ir paveikti tam tikrus svarbius biocheminius procesus, kurie gali būti gyvybiškai svarbūs organizmo išlikimui. Šios modifikacijos priklauso nuo švitinimo dozių stiprumo ir trukmės. Eksperimento metu buvo tirtas gama spinduliuotės poveikis *Hypericum* biomasės susidarymui ir farmakologiškai svarbių antrinių metabolitų, gaunamų iš skirtingų daigų dalių (lapo, stiebo ir šaknies), suaktyvinimui kaliaus kultūroje. Nustatyta, jog

švitinimas skatina fenolinių junginių kaupimąsi. Chromatografiškai atlikus kaliaus ekstraktų analizę paaiškėjo, jog gama spinduliams sužadinus 10 Gy dozę 90 s, didžiausia p-hidroksibenzenkarboksirūgšties koncentracija buvo užfiksuota eksplanto lapuose – 4,35 mg/100 g. Eksplanto šaknies kaliaus kultūroje daugiausia užfiksuota chlorogeninės rūgšties. Švitintoje kaliaus kultūroje chlorogeninės rūgšties 12,91 mg/100 g, kontroliniame – 3,55 mg/100 g. Nustatyta, jog švitinimo dozės, 10 Gy ir 20 Gy, skatina epikateino kaupimąsi ant lapų ir stiebo (126,39 mg/100 g ir 148,80 mg/100 g), palyginti su kontroliniais mėginiais (98,81 mg/100 g ir 101,72 mg/100 g). Taip pat švitinimas padidina ir hipericino bei pseudohipericino koncentracijas. Optimalios švitinimo dozės yra 10 ir 20 Gy – didesnės dozės, tokios kaip 30 Gy ir 40 Gy lėmė šių fitocheminių medžiagų sumažėjimą. Be to, švitinimas turi teigiamos įtakos sėklų daigumui [18].

Tiriant *in vitro* ir *in vivo* *H. perforatum* L. augalus, pastebėtas skirtingas flavonoidų kiekis. Tyrimo metu iš *H. perforatum* L. buvo išskirti 5,3-dimetilo eteris, liuteolin-5-gliukozidas, liuteolin-3-gliukozidas ir naujas natūralus junginys – 6-C-prenilo liuteolinas. Šie flavonoidai visiškai skyrėsi nuo tų, kurie anksčiau buvo stebimi tos pačios rūšies augaluose *in vitro*. Nustatyta, jog bendras kaliaus kultūrų flavonoidų kiekis maždaug 0,5 – 0,7 mg/1g SM, tuo tarpu laukiniuose *H. perforatum* L. augaluose 14 – 70 mg/1 g SM [19].

1.4. Jonažolės suspensinės kultūros

Šiuo metu *H. perforatum* L. produktai yra vieni populiariausių augalinių vaistų visame pasaulyje. JAV parduodami kaip maisto papildai, Europoje – kaip antidepresantai. Šios svarbios *H. perforatum* L. antrinių metabolitų farmacinės savybės yra pagrindinė tendencija atliekant didžiulius tyrimus su ląstelių kultūromis. Augalų ląstelių ir audinių kultūrų panaudojimas didelės apimties antrinių metabolitų gamybai iki šiol buvo pasiektas tik ribotai dėl mažo ir nepatikimo antrinių produktų išgavimo. Nors naudojant įprastus biocheminius metodus, manipuluojant kultūros ir proceso veiksniais, žymiai pagerėja produktų išeiga, tačiau rezultatų atkuriamumas vis dar nėra pilnai išaiškintas. Tam pradėta naudoti metabolinė inžinerija – priemonė, gerinanti naudingų junginių biosintezę vaistiniuose augaluose. Kadangi *H. perforatum* L. ekstrakto farmakologinis aktyvumas labiausiai priskiriamas hipericinui ir hiperforinui, kurie gaminami išimtinai šiais rūšiais, jų genetinės manipuliacijos tikslas yra pagerinti šių medžiagų gamybą. Vieno tyrimo metu buvo bandoma nustatyti *H. perforatum* L. genetines transformacijas, kurios naudingos biosintetinių, biocheminių ir genų ekspresijos profilių tyrimams bei metabolizmo inžinerijai. Eksperimento metu buvo naudojamos *Agrobacterium tumefaciens* ir *Rhizobium rhizogenes*, kuriomis buvo bombarduojamos suspensinės kultūros. *Agrobacterium* ir *Rhizobium* palaiko stabilų kultūrų produktyvumą, kuriose nėra hormonų, todėl kaupiasi daugiau antrinių metabolitų. Naudojant šią dalelių bombardavimo ir augalų transformavimo techniką buvo nustatyta, jog po 3 mėnesių nepertraukiamo gumbelių, turinčių higromicino, bombardavimo, buvo užaugintos transgeninės, higromicinui atsparios kaliaus kultūros, o vėliau ir transgeniniai augalai. Įrodyta, kad *H. perforatum* L. organogeninių ląstelių suspensijų bombardavimas yra veiksmingas būdas transformuoti augalus – tai suteikia galimybę pilnai išaiškinti *H. perforatum* L. biosintezės procesus bei gerinti antrinių metabolitų gamybą *H. perforatum* L. [20].

Kito tyrimo metu buvo naudojamos naujos *H. perforatum* L. ląstelių suspensinės kultūros, stebima jų įtaka ląstelių augimui ir hipericino gamybai. Tyrimo metu nustatyta, jog žasmono rūgštis pagreitina

ląstelių augimą bei sužadina efektyvesnę hipericino gamybą. *H. perforatum* L. ląstelių kultūros, kurios buvo augintos terpėje, papildytoje žasmono rūgštimi ir laikomos tamsoje, pasižymėjo palankesnėmis sąlygomis ląstelių augimui bei hipericino gamybai, nei laikomos šviesoje. Nustatyta, kad žasmonatai – žasmono rūgštis, žasmono rūgšties metilesteris bei metilžasmonatas – skatina rozmarino rūgšties ir šikonino gamybą. Šios medžiagos yra svarbios signalo perdavimo procesuose, reguliuojančiuose augalų gynybą nuo išorės dirgiklių bei genetinės informacijos saugojime. Pirmiausia sėklos yra plaunamos tekančiu vandeniu, paviršius sterilizuojamas naudojant natrio hipochloritą 10 – 15 min. Po to perplaunama 3 – 4 kartus steriliu distiliuotu vandeniu. Sterilizuotos sėklos sudedamos ant bazinės terpės daiginimui. Po 10 dienų, sudygusios *in vitro* kaliaus kultūros yra naudojamos suspensinių kultūrų sudarymui. Kaliaus kultūros perkeliamos į kitą terpę, kuri yra praturtinta druskomis, vitaminais, 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštimi, kinetinu ir sacharoze. Kultūros laikomos tamsoje ir šviesoje, $25\pm 2^{\circ}$ C temperatūroje. Gautos suspensinės kultūros yra laikomos 125 ml Erlenmejerio kolbose su 50 ml mitybine terpe, turinčią 2,4-D, kinetino ir sacharozės. Subkultūros auginamos kratytuve esant 90 aps/min, palaikant $25\pm 2^{\circ}$ C temperatūrą [21].

1.5. Jonažolės kaliaus kultūrose kaupiami metabolitai

Vis didėja susidomėjimas natūraliomis aktyviomis medžiagomis, tokiomis kaip hipericinas, hiperforinas, ksantonai, flavonoidai, procianidinai, kovojančiomis su įvairiomis ligomis bei kasdieniniais negalavimais. Tad farmacijoje yra ypač išaugusi aktyviųjų komponentų paklausa, kuri skatina ieškoti naujo, alternatyvaus biotechnologinio požiūrio šių komponentų gamybai. Atsižvelgiant į svarbų augalų ląstelių ir organų kultūrų svarbą – augalų ląstelės ir organų kultūros yra lyg natūrali aktyviųjų komponentų sintezės sistema – buvo atlikti jonažolės ląstelių ir audinių kultūrų naudingų antrinių metabolitų produktyvumo tyrimai. Tyrimo metu buvo lyginami *H. perforatum* L. antriniai metabolitai, pagaminti ląstelių suspensijos kultūrose (nediferencijuotoje būsenoje) ir *in vitro* regeneruotuose organuose (lapuose, su skirtingais vystymosi tarpsniais, ir šaknyse). Nustatyta, jog skirtingų ūglių ir diferencijuotų kaliaus struktūrų naudojimas pasižymėjo skirtingu hipericino ir pseudohipericino kiekiu. Taip pat, nustatyta, jog nediferencijuotos *H. perforatum* L. struktūros, tamsiomis sąlygomis daugiausia pagamina ksantonų, tad jie yra pagrindiniai suspensinių ląstelių metabolizmo produktai. Be to, tyrimai parodė, kad hipericino biosintezė yra itin susijusi su juodųjų, liaukinių mazgelių diferenciacija *H. perforatum* L. lapuose. Histologiniai ir ultrastruktūriniai tyrimai parodė, kad juodųjų mazgelių, taip pat, yra kamiene ir žiedlapiuose. Regeneruotų augalų dalyse, kuriose kaupiasi hipericinas, hiperforinas ir flavonoidai, ksantonų neaptikta [22].

Kito tyrimo metu buvo stebima stimuliacinė hipericino ir pseudohipericino gamyba, tiriamas elicitorinis poveikis. Tyrimui buvo naudojami kaliaus kultūros *H. perforatum* L. ūgliai, gauti iš *H. perforatum* L. žiedlapių. Nustatyta, jog mananas pagerina pseudohipericino gamybą 4 kartus, o hipericino – 2 kartus. β -1,3-gliukanas ir pektinas stimuliuoja pseudohipericino gamybą, maždaug 2 kartus, tačiau hipericino gamybai įtakos neturi. Mielių ekstraktas skatina antrinių metabolitų gamybą augalų ląstelių ir audinių kultūrose, tad buvo ištirtas mielių ekstrakto poveikis hipericino ir pseudohipericino gamybai. Paaiškėjo, jog 1–8 mg/ml mielių ekstrakto koncentracija slopina tiek hipericino, tiek pseudohipericino gamybą, o 4–8 mg/ml koncentracija sumažina *H. perforatum* L. ūglių augimą [23].

Taip pat buvo tirti ir kiti *H. perforatum* L. kaliaus kultūros kaupiami metabolitai, tokie kaip fenoliai, flavonoidai, chlorogeninė rūgštis bei hipericinas. Tyrimo metu buvo tirta skirtinga auksino ir auksino / citokinino derinių koncentracijų, inokulianto dydžių bei terpių įtaka biomasės poveikiui ir šių metabolitų kaupimuisi. Naudotos kolbos, optimalios sąlygos antrinių metabolitų susidarymui buvo šios: 0,1 mg/l kinetino su 1 mg/l 3-indolil-sviesto rūgštis, inokulianto tankis 6 g/l ir 1/2MS terpė - auginama 2-5 sav. balioninio tipo burbuliniame bioreaktoriuje kuriame yra 1 / 2 MS terpės, papildytos 0,1 mg/l kinetinu. Po 2 savaičių buvo vertintas šaknų išsivystymas. Šakniastiebiai, kurie buvo auginami (MS) terpėje, papildytoje auksiniais, tokiais kaip IBR ir IAR, pasižymėjo gausiu šoninių šaknų išsivystymu. Šakniastiebiai, kurie buvo auginami terpėje be auksino (kontrolė) ir terpėje, papildytoje auksinu NAR – šoninės šaknys neišsivystė. Esant žemai IBR ir IAR koncentracijai (0,5 mg/l), šaknys buvo plonos ir pailgos, tačiau esant didelėms koncentracijoms (3 mg/ l), šoninės šaknys buvo trumpesnės, storesnės ir gausios. Be to nustatyta, jog 104,2 g/l atsitiktinės šaknys turėjo $56,47 \pm 0,22$ mg/g SM fenolinių, $35,01 \pm 1,26$ mg/g SM flavonoidų, $0,97 \pm 0,06$ mg/g SM chlorogeninės rūgštis ir $1,389 \pm 0,80$ mg/g SM hipericino [24].

H. perforatum L. ekstraktuose yra daugybė flavonoidų, tokių kaip hiperozidas ir kvercetas, kurie pasižymi antioksidacinėmis ir antidepresantinėmis savybėmis, naftodiantronų ir floriglicinolių. *H. perforatum* L. medicininių preparatų veiksmingumas grindžiamas visu metabolitų deriniu, o ne pavienių komponentų veikimu. Tačiau lauke auginamuose ir laboratorinėmis sąlygomis užaugintuose augaluose fitochemikalų kiekis gali skirtis – tam turi įtakos biologiniai procesai ir aplinkos veiksniai. Ląstelių arba organų kultūros – puikus būdas fitochemikalų biosintezei vykdyti. Tam yra kuriamos bioreaktorių sistemos. Labai svarbu optimizuoti kultūrų parametrus, nes biomasės ir antrinių metabolitų gamybai didelę įtaką gali turėti tokie faktoriai kaip pasėlio tankis, terpės komponentai, deguonies pernešimas ir maišymasis bei kiti fizikiniai ir cheminiai veiksniai. Bioreaktorių kultūrose aeracijos tūris ir inokulianto tankis yra pagrindiniai faktoriai, siekiant maksimaliai padidinti biomasę ir antrinius metabolitų kieki. Tyrimo metu buvo nustatytas inokulianto tankio, aeracijos tūrio ir augimo laikotarpio poveikis biomasės ir metabolitų kaupimuisi. Taip pat įvertintas *H. perforatum* L. atsitiktinių šaknų antioksidacinis atsakas į kultūrinių augalų šaknis bioreaktoriaus skystose kultūrose. Po 6 savaičių pastebėtas maždaug 50 kartų didesnės biomasės kiekis – fenolinių junginių susidarė 60,11 mg/g SM, flavonoidų – 42,7 mg/g SM, chlorogeninės rūgštis – 0,80 mg/g SM. Optimalios sąlygos biomasės ir metabolitų kiekio padidėjimui buvo inokulianto koncentracija 3 g/l, aeracijos tūris 0,1 vvm. Nustatyta, jog kvercetino ir hiperozidų, nesikaupiančių atsitiktinėse šaknyse, kiekiai yra labai maži. Skysčių chromatografija parodė, jog kvercetino susidarė $1,33 \mu$ / g SM, o hiperozido – $14,01 \mu$ / g SM [25].

1.6. Antioksidantai

Hypericum yra didžiausia iš devynių genčių, priklausančių *Clusiaceae Lindl* šeimai. Gentį sudaro 484 rūšys, iš kurių labiausiai žinoma *H. perforatum* L.. Ši rūšis jau nuo senų laikų buvo naudojama kaip vaistas žaizdų gijimui, pasižymintis raminančiomis, antioksidacinėmis, antivirusinėmis ir antidepresantinėmis savybėmis. *H. perforatum* L. yra daugybė junginių, priklausančių skirtingoms cheminių medžiagų šeimoms, turinčioms biologinį aktyvumą. Jonažolėje aptinkami naftodiantronai (hipericinas, pseudohypericinas ir protohypericinas), flavonoidai (rutinas, kvercetas, kvercitrinas, biapigeninas) ir acilfloriglicinoliai (hiperforinas ir adhiperforinas).

Naftodiantronas – hipericinas – yra vienas iš svarbiausių junginių, randamų *Hypericum* gentyje. Pirmiausia jis buvo išskirtas iš *H. perforatum* L., o paskui aptiktas ir keliose kitose *Hypericum* rūšyse, kurios kaupia junginį tamsiuose mazgeliuose, išsibarsčiusiuose po visas augalo aerines dalis. Hipericinas pasižymi antimikrobinu, priešvėžiniu ir priešuždegimiu poveikiu. Be to, hipericinas gali sukelti stiprų fotojautrumą, žinomą kaip hipericizmas. Jis yra stiprus natūralus fotosensibilizuojantis agentas, naudingas fotodinaminėje terapijoje. Šios terapijos esmė – fotosensibilizatoriaus, šviesos ir molekulinio deguonies bendras poveikis. Fotodinaminė terapija – tai neinvazinis, terapinis metodas, naudojamas gydant įvairius vėžinius ir nevėžinius pažeidimus bei sutrikimus. Terapijos metu netoksiškas fotosensibilizatorius yra suaktyvinamas ir sužadinamas pažeistoje vietoje, apšviečiant tinkamo bangos ilgio šviesa. Gautas fotoreakcijos sukelia deguonies generaciją, ko pasekmė – pažeisti audiniai ir ląstelės miršta. Šviesos suaktyvintas hipericinas sukelia deguonies ir superoksido anijono susidarymą - tai sukelia nekrozę, apoptozę, autofagiją ir imunogeninių ląstelių mirtį. Tačiau ne tik hipericinas turi šią savybę, bet ir kiti du *H. perforatum* L. junginiai – pseudohipericinas ir hiperforinas. Jie taip pat pasižymi fototoksinėmis savybėmis *in vitro*. Įrodyta, kad hipericinas pasižymi priešnavikinėmis savybėmis dėl jo antiproliferacinio, antimetastazinio ir antiangiogeninio poveikio.

Taip pat, tyrimo metu buvo vertintos 11 *Hypericum* rūšys - *H. perforatum* L., *H. aegypticum* L., *H. androsaemum* L., *H. calycinum* L., *H. hircinum* L., *H. hirsutum* L., *H. montanum* L., *H. patulum* Thunb., *H. perforatum* L., *H. pubescens* Boiss., *H. tetrapterum* Fr.. Lyginama cheminė sudėtis, antioksidacinės savybės, fototoksinis poveikis. Analizė atlikta skysčių chromatografija, naudojant diodų matricos aptikimą ir masių spektrometriją, siekiant nustatyti pagrindinių polifenolių, acilfluoro-glicinolių ir naftodiantronų kiekį. Ekstraktų fotocitotoksinis tyrimas buvo atliktas, naudojant pelių fibroblastą, o jų antioksidacinis aktyvumas įvertintas, naudojant 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo ir deguonies radikalus. Fitocheminė analizė leido nustatyti ir kiekybiškai įvertinti 20 metabolitų, tokių kaip kvercetin-3-O-gliukozidas, kvercetin-3-O-galaktozidas, kveritrinas, kvercetas, biapigeninas ir kt., pasižyminčių biologiniu aktyvumu. Nustatyta, jog visos tirtos rūšys pasižymėjo geru citotoksinu ir antioksidantu poveikiu. Paaikškėjo, kad be *H. perforatum* L., dar bent trys rūšys (*H. tetrapterum*, *H. pubescens* ir *H. montanum*) yra puikūs fiziologiškai aktyvių junginių šaltiniai, o *H. tetrapterum* ir *H. perforatum* L. dėl fototoksiškumo gali būti naudojami fotodinaminėje terapijoje. Biocheminiai šio tyrimo rezultatai patvirtina, kad šios *Hypericum* rūšys yra geras antioksidantų šaltinis, naudingas kovojant su oksidaciniu stresu bei gydant patologines ligas [26].

Kito tyrimo metu buvo tiriama ksantono gamyba *H. perforatum* L. suspensinėse kultūrose. Eksperimento metu *H. perforatum* L. kultūros buvo auginamos 24 val kartu su *A. tumefaciens*. Nustatyta, jog su *A. tumefaciens* auginamų *H. perforatum* ląstelių RNR analizė pasižymėjo greita genų, koduojančių svarbius fenilpropanoidinio fermentus, ir ksantono biosinteze. HPLC chromatogramų analizė atskleidė 12 kartų padidėjusią bendrą ksantono koncentraciją ir daugelio ksantonų atsiradimą po elicitacijos. Taip pat, pastebėta, jog metanolinis ekstraktas pasižymėjo žymiai didesniu antioksidaciniu ir antimikrobinu poveikiu nei kontrolinių *H. perforatum* ląstelių ekstraktas (be *A. tumefaciens*). Buvo nustatyti keturi pagrindiniai ksantonai: 1,3,6,7-tetrahidroksi-8-prenilo ksantonas, 1,3,6,7-tetrahidroksi-2-prenilo ksantonas, 1,3,7-trihidroksi-6-metoksi-8-prenilo ksantonas ir paksantonas. Tyrimai atskleidė, kad ksantonai augalų ląstelėse biotinio streso metu atlieka dvejopą funkciją: yra antioksidantai, apsaugantys

ląsteles nuo oksidacinio pažeidimo, ir veikia kaip fitoeleksinai, siekiantys pakenkti patogeno augimui [27].

1.7. Antioksidantai augaluose *in vitro*

Skirtingi ūglių, atsitiktinių šaknų ir ląstelių suspensijų kultūrų *in vitro* metodai ne tik leidžia modifikuoti augalus, bet ir suteikia galimybę greitai padauginti ir išsaugoti endemines, retas, nykstančias augalų rūšis bei efektyviai gaminti norimus bioaktyviuosius junginius. Iki šiol tik kelios *Hypericum* rūšys, tokios kaip *H. mysorense*, *H. retusum*, *H. tetrapterum*, *H. calycinum*, *H. maculatum*, *H. hirsutum*, *H. richeri*, *H. umbellatum* ir *H. hookerianum*, buvo dauginamos mikroorganizmais *in vitro*. Be to, endeminių rūšių, tokių kaip *H. polyanthemum* ir *H. rumeliacum* Boiss, išsaugojimui, taip pat, naudojami *in vitro* kultūros metodai. *Hypericum* ląstelių suspensijos ir organų kultūros daugiausia naudojamos, siekiant išaiškinti įvairių klasių antrinių metabolitų kaupimąsi. Nustatyta, jog pagrindiniai veiksniai, didinantys antrinių metabolitų gamybą *in vitro* yra ląstelių imobilizavimas, produkto sekrecija bei elicitacija. Elicitoriai yra išorinės arba pašalinės molekulės, kurios stimuliuoja įvairių rūšių augalų gynybines sistemas. Šios molekulės sukelia endogeninę gynybos aktyvaciją, kuri turi įtakos metabolinio geno modifikavimui – modifikuojama specifinių baltymų sintezė. Įrodyta, kad egzogeninių elicitorių pritaikymas augalų audinių ar ląstelių kultūrose gerina bioaktyviųjų junginių gamybą. Taip pat, šio tyrimo metu buvo bandoma kultivuoti nykstančias *H. aviculariifolium* ir *H. pruinaatum* rūšis *in vitro*, naudojant žasmono rūgštij. Įrodyta, kad endeminės *H. aviculariifolium* ir *H. pruinaatum* rūšys gali būti sėkmingai regeneruotos iš *in vitro* audinių kultūros bei nustatyta, jog žasmonio rūgštis didina bioaktyviųjų junginių gamybą. Žasmono rūgštis sukeliamas poveikis bioaktyviųjų junginių gamybai buvo susijęs su gydymo dozėmis, specifiniais antrinių metabolitų ir rūšių skirtumais [28].

Tyrimo buvo vertinamas *in vitro* *H. calycinum*, *H. confertum* ir *H. Perforatum* L. metanolio ekstraktų antioksidantų, anticholinesterazės ir antireazės aktyvumas. Iš tirtų rūšių nustatyta, kad didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis buvo *H. calycinum* – $141,12 \pm 2,40$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, tuo tarpu *H. confertum* pasižymėjo didžiausiu flavonoidų kiekiu – $70,61 \pm 0,51$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. Biocheminiai šio tyrimo rezultatai parodė, kad visos trys rūšys pasižymėjo stipriu antioksidaciniu poveikiu. Kadangi *H. calycinum* pasižymėjo itin gausiu fenolinių junginių kiekiu, tad būtent ši rūšis buvo aktyviausia atliekant antioksidantų aktyvumo tyrimus. *H. calycinum*, taip pat, geriausiai slopino acetilcholinesterazę. *H. perforatum* L. itin gerai slopino butirilcholinesterazę. Pagal ureazės slopinamojo aktyvumo tyrimo rezultatus, tik *H. calycinum* pasižymėjo silpnu antireazės aktyvumu, kitos rūšys buvo visai neaktyvios. Įrodyta, kad *Hypericum* rūšys, ypač *H. calycinum* pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu, tad gali būti naudingos užkertant kelią bei gydyti ligas, susijusias su oksidaciniu stresu. Nustatyta, kad oksidacinis pažeidimas yra vienas iš Alzheimerio ligos, patologinių požymių. Gydant Alzheimerio ligą, naudojami acetilcholinesterazės inhibitoriai [29].

Kaip jau minėta, *Hypericum* rūšyse yra nemažai biologiškai aktyvių aptinkamų junginių – naftodiantronų, floriglicinolių, flavonoidų, procianidinų, taninų, eterinių aliejų, aminorūgščių, fenilpropanoidų, ksantonų ir kitų vandenyje tirpių komponentų. Tarp jų dominuoja naftodiantronai, tokie kaip hipericinas ir pseudohypericinas. Jie yra lokalizuoti mažuose, juoduose mazgeliuose, esančiuose ant gėlių žiedlapių, kuokelių, lapų ir stiebų. Hipericinas ir pseudohypericinas yra fotodinaminiai pigmentai, pasižymintys fotodinaminio aktyvumu – veikiami šviesos yra naudojami įvairioms ligoms gydyti.

Fotoaktyvinami sukuria reaktyviausias deguonies rūšis. Šios savybės leidžia jiems veikti kaip antivirusiniams agentams. Hipericinas, taip pat, turi antidepresantinių savybių – veikia monoamino neurotransmisiją centrinėje nervų sistemoje. Fitofarmaciniai *Hypericum* preparatai paprastai gaminami iš lauke užaugintų augalų, tačiau bakterijų, grybelių ar vabzdžių užkrėtimas gali pakeisti komercinių hipericino preparatų turinį. Ribotas šio augalo paplitimo plotas, sezoniškumas, biologinės įvairovės praradimas, kokybės kintamumas ir užterštumo problemos skatina ieškoti alternatyvių hipericino gamybos būdų. Tad buvo sugalvota naudoti mikropropagavimą – augalų auginimą *in vitro* steriliomis ir standartizuotomis sąlygomis.

Šio tyrimo metu buvo ieškoma būdų, leidžiančių pagerinti hipericino ir pseudohipericino produktyvumą *H. perforatum* L. *in vitro* kultūrose. Eksperimento metu buvo naudojamas mikrodauginimas. *H. perforatum* L. mikropropagavimo metu buvo gautos trys *in vitro* kultūrų rūšys, turinčios skirtingas morfologines savybes. Tyrimo metu buvo naudojama MS/B5 auginimo terpė, papildyta N₆-benziladeninu (0,1–5,0 mg/l). Ūglių regeneracinis potencialas buvo įvertintas terpėje, papildytoje auksiniais (0,05–1,0 mg/l), 3-indolilacto rūgštimi arba 3-indolilbutano rūgštimi. Nustatyta, jog optimali N₆-benziladenino koncentracija buvo intervale nuo 0,1 iki 2,0 mg/l – šiose koncentracijos ribose, ūgliuose suintensyvėjo hipericino (25–50 μg / g SM) ir pseudohipericino (170–350 μg / g SM) gamyba. Esant auksinams, hipericino susidarė – 30–100 μg / g SM, o pseudohipericino – 120–400 μg / g SM). Įrodyta, jog 3-indolilacto rūgštis naftodiantronų gamybai įtakos neturėjo, tačiau 3-indolilviesto rūgštis sumažino hipericino ir pseudohipericino kiekį *in vitro* augaluose [30].

Taip pat buvo atliekami tyrimai su hiperforinu. Hiperforinas yra naudojamos uždegiminėms odos ligoms gydyti, pavyzdžiui, atopiniam dermatitui gydyti, bei pasižymi antidepresantinėmis savybėmis. Hiperforinas yra pagrindinė lipofilinių ekstraktų sudedamoji dalis, esanti permatomose lapų ir žiedų liaukose. Be antidepresantinių ir odą gydančių savybių, hiperforinas turi nemažai farmakologinio aktyvumo, įskaitant priešnavikinį ir antibakterinį poveikį. Hiperforinas yra jautrus oksidacijai ir nestabilus tirpale. Auginant *in vitro*, tinkamų tirpiklių ir ekstrahavimo sąlygų parinkimas yra labai svarbus norint gauti kuo didesnę kiekį. Kadangi aplinka, ekologiniai ir genetiniai veiksniai turi didelę įtaką hiperforino kiekiui lauke auginamuose augaluose, tad *in vitro* yra puiki alternatyva auginti *Hypericum* audinių kultūras. Tyrimo metu buvo auginamos *in vitro* *H. perforatum* L. šaknies kultūros, kurios gali gaminti hiperforiną. Nustatyta, jog didžiausia hiperforino ekstrahavimo išėiga buvo pasiekta naudojant petroleterį. Po 6 sav. *in vitro* auginimo, hiperforino susidarė ~5 mg/g SM [31].

Tarp visų antrinių metabolitų, kuriuos gamina *H. perforatum* L., ksantonai yra labai svarbūs dėl priešgrybelinio aktyvumo. Tyrimo metu buvo siekiama pagerinti *H. perforatum* subsp. *Angustifolium* (sin. *Fröhlich*) *Borkh* ksantono gamybą. Buvo sukurta nauja *in vitro* šaknų auginimo metodika. Regeneruotos *H. perforatum* L. šaknys buvo auginamos trijų pakopų kultūrų sistemoje: pirmame etape, siekiant padidinti biomase, šaknys buvo kultivuojamos pusiau stiprioje skystoje *Murashige* ir *Skoog* (MS) terpėje, papildytoje 1 mg/l rūgštimi ir 1,5% sacharozė. Antruoju ir trečiuoju etapais, siekiant stimuliuoti antrinį metabolizmą, šaknys buvo kultivuojamos su 1,1 mg/l 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštimi, 0,215 mg/l kinetinu ir 0,186 mg/l 1-naftilacto rūgštimi. Trečiajame etape, kai kurios šaknys buvo papildytos chitozanu. Nustatyta, jog naudojant trijų etapų metodą, ksantono gamyba padidėjo 2,7

karto. Vertinant priešgrybelinį aktyvumą *Candida* rūšimis, *Cryptococcus neoformans* ir dermatofitams – vidutinės, minimalios slopinamosios koncentracijos vertės atitinkamai buvo 36,9, 26,7 ir 65 µg/ml [32].

1.8. Jonažolės pritaikymas

Jau nuo senų laikų *Hypericum* sultys, ekstraktai, arbatos, tinktūros, oleumai, milteliai ir granulės buvo naudojami kaip vaistai. Oleumai skatina nekomplikuotą žaizdų cicatrizaciją. Aliejai pasižymi antimikrobiniu poveikiu. Ekstraktai naudojami lengvai ar vidutinio sunkumo depresijai gydyti. Nustatyta, jog *Hypericum* ekstraktai, turi įtakos žarnyno ir kepenų fermentų bei ksenobiotikų pernešėjų reguliavimui. Dėl šios savybės, *Hypericum* gali pakeisti kartu vartojamų vaistų farmakokinetiką ir efektyvumą. *Hypericum* šalutinis poveikis yra fotojautrumas ir virškinimo trakto sutrikimai. Jonažolė naudojama kaip maistinis, fitofarmacinis ir kosmetikos ingredientas. Labiausiai fitofarmaciniu aktyvumu pasižymi hipericinas, pseudohipericinas, rutinas, kvercetas, kvercitrinas, mikelianinas, amentoflavonas, hiperozidas, hiperforinas ir adhiperforinas. Mažose, permatomose lapų aliejaus liaukose, besitęsiančiose nuo viršutinio ir apatinio lapų epidermių, bei aplinkiniuose audiniuose yra fitocheminis junginys – hiperforinas. Tamsiose liaukose ir kitose augalo dalyse yra hipericino ir pseudohipericino. Daugiausia bioaktyvių fitocheminių medžiagų yra sutelkta šakų pumpuruose ir galiukuose, žieduose bei vaisiuose. Jonažolės fitocheminė sudėtis skiriasi priklausomai nuo veislės, klimato, auginimo sąlygų, brandos etapo, derliaus nuėmimo laiko ir būdų bei ekstrahavimo sąlygų ir technikos. Augant vaisiams, padaugėja floroglicinolių ir sumažėja fitocheminių medžiagų. *H. perforatum* L. ekstraktai ruošiami iš šlapios ir džiovintos augalinės medžiagos, naudojant skirtingus tirpiklius – anglies dioksidą, vandenį, etanolį, metanolį, aliejus ir kt. Svarbu reguliuoti augalinės medžiagos santykį su tirpikliu ir ekstrahavimo temperatūrą. Džiovintos jonažolės dalys gali būti sumaltos arba supjaustytos ir naudojamos arbatoms, užpilams ir tabletėms gaminti. Tinktūroms gaminti, naudojami *Hypericum* ekstraktai ir alkoholis – labiausiai paplitęs yra etanolis. *Hypericum* aliejams, tepalams ar kapsulėms gaminti naudojami riebiųjų tirpikliai, tokie kaip alyvuogių aliejus ar kiti augaliniai aliejai.

Siekiant sumažinti sergamumą, susijusį su depresija, vis dažniau naudojami *H. perforatum* L. preparatai dėl pasižymintųjų antidepresantinių savybių. Depresija yra susijusi su smegenų molekulinės neurobiologijos pokyčiais. Sergant depresija, pasikeičia neurotransmiterių, tokių kaip gliutamato ir γ -aminosviesto rūgšties, pusiausvyra. Depresija sergančių asmenų γ -aminosviesto koncentracija būna mažesnė [33]. Hiperforinas ir adhiperforinas naudojami silpnai ir vidutinio sunkumo depresijai gydyti, slopindami daugelio neurotransmiterių išsivavinimą. Nustatyta, kad hiperforinas yra veiksmingesnis už placebo bei toks pat efektyvus kaip sintetiniai antidepresantai - paroksetinas, fluoksetinas ir sertralinas. Depresija taip pat labai susijusi su Alzheimerio liga. Nustatyta, jog sergant Alzheimerio liga hipokampe ir žievėje sumažėja acetilcholino ir butirilcholino, kurie yra svarbūs atminties apdorojimui bei koncentracijai. Acetilcholinesterazės ir butirilcholinesterazės fermentai hidrolizuoja esterinius ryšius, tad gydant Alzheimerio ligą, naudojami acetilcholinesterazės ir butirilcholinesterazės inhibitoriai [29].

Kito tyrimo metu buvo stebimas *H. perforatum* L. poveikis menopauzei. Ankstyvieji menopauzės simptomai yra karščio bangos, insomnija, nerimas, depresija, susikaupimo stoka, seksualinių norų pasikeitimas ir odos bei gleivių atrofija. Vėlyvieji menopauzės simptomai apima širdies ir kraujagyslių sistemos sutrikimus bei osteoporozę. Menopauzės simptomai gali būti gydomi naudojant hormonų terapiją arba nehormoninį gydymą. Hormoninis gydymas gali sukelti krūties vėžį, tromboemboliją,

disfunkcinį gimdos kraujavimą bei kepenų ligas, tad vis dažniau ieškoma nehormoninių vaistų alternatyvų. Dėl antidepresantinio ir analgetinio poveikio *H. perforatum* L. gali būti naudojamas menopauzės simptomų gydymui. Jonažolėje esantys, tokie komponentai kaip flavonolio dariniai, biflavonai, proanthocianidinai, ksantonai, floriglicinoliai ir naftodiantronai, mažina depresiją, karščio bangas bei insomniją. Nustatyta, kad *Hypericum* slopina serotonino, dopamino ir norepinefrino išsiskyrimą, kas mažina depresiją [34].

Taip pat, *H. perforatum* L. naudojamas žaizdoms gydyti. Žaizdų gyjimas yra sudėtingas procesas, apimantis kelias stadijas – hemostazę, uždegimą, proliferaciją ir brendimą ir/ arba atstatymą. Vieno tyrimo metu, naudojant *H. perforatum* L. aliejų, buvo sukurti nauji tvarstymo siūlai. Žaizdos tvarstis turi pasižymėti drėgmės išlaikymu žaizdos ir tvarsčio sąlytyje, dujų pralaidumu, turėti tinkamas mechanines savybes, sudaryti kliūtis mikroorganizmams bei pašalinti toksinius komponentus nuo žaizdos paviršiaus. Tai, taip pat, turėtų būti netoksiška, nealergiška, lengvai keičiama medžiaga. Tvarstymui naudojamas hidrogelis, skaidrios plėvelės, sintetinis polimeras, toks kaip poliuretano putos, natūralūs polimerai, tokie kaip želatina bei karboksimetilceliuliozė. Tačiau natūralesnės biomedžiagos yra labiau tinkamos dėl lengvai apdorojamų, antimikrobinų savybių ir žaizdų gyjimą skatinančių ląstelių dauginimosi. Jonažolės aliejuje esantis chitozanas skatina žaizdų gyjimą, pasižymi drėkinančiu, priešuždegiminiu bei antimikrobinu poveikiu. Tyrimo metu naudotos chitozono plėvelės pasižymėjo antibakteriniu poveikiu – chitozanas slopino *Escherichia coli* ir *Staphylococcus aureus* bakterijas. Be to, chitozanas blokuoja nervų galus, taip sumažindamas skausmą. Nustatyta, jog chitozanas skatina nudegimų žaizdų, uždegiminėmis ląstelėmis apkrėstų audinių gyjimą bei greitina odos atsinaujinimą. Taip pat, įrodyta, kad chitozanas pasižymi bakteriostatiniu poveikiu - neleidžia žaizdos plotui užsikrėsti [35].

Kito tyrimo metu, dėl *Hypericum* priešuždegiminio, antimikrobinio, antioksidacinio bei ir žaizdų gyjimo poveikio, *H. perforatum* L. aliejus buvo naudojamas moterims, po epiziotomijos, gydyti. Po epiziotomijos gali išsivystyti komplikacijos, tokios kaip tarpvietės skausmas, diskomfortas, užsitęsęs žaizdų gyjimas ar infekcija. *H. perforatum* L. aliejus gali būti veiksmingas vaistas žaizdų priežiūrai, galintis padėti pagerinti epiziotomiją patyrusių moterų žaizdų gyjimą. Tyrimo metu, nustatyta, jog *H. perforatum* L. aliejus pagreitina proliferacinę žaizdų gyjimo fazę, sumažina uždegimo procesą, skatina kolageno sintezę bei fibroblastų migraciją į sužeistą vietą. Teigiama, kad šis poveikis priklauso nuo naftodiantronų, floriglicinolių, flavonoidų, bioflavonoidų ir fenilpropanoidų. Nustatyta, kad naudojant *H. perforatum* L. aliejų, žaizdų metu padidėja fibroblastų migracija ir kolageno gamyba. Taip pat, įrodyta, jog amentoflavonas ir hipericinas pasižymi priešuždegiminiu poveikiu, o flavonoidai sumažina lipidų peroksidaciją – skatina nekrozės prevenciją bei stimuliuoja angiogenezę [36].

Jonažolė veiksminga gydyti net tokias ligas kaip vėžys. Tyrimo metu buvo tiriamos hipericino ir hiperforino priešvėžinės savybės *in vitro*. Nustatyta, kad hiperforinas slopina auglio ląstelių vystymąsi. Jis, taip pat, skatina citochromo c išsiskyrimą iš mitochondrijų bei slopina naviko vystymąsi *in vivo*. Ištyrus hipericino priešvėžines savybes, paaiškėjo, jog jis slopina navikinių audinių vystymąsi, tokių kaip neuroblastoma, glioma, mezotelioma, adenoma, karcinoma, melanoma, leukemija ir sarkoma. Ekperimento metu, hipericino ir radioterapijos taikymas nužudė prostatos vėžio ląsteles. Taip pat, ištyrus *H. perforatum* L. ekstrakto įtaką prostatos vėžinių ląstelių vystymuisi *in vivo* ir *in vitro*, pastebėta, jog sumažėja naviko vystymąsis ir metastazių skaičius [37].

Naujausi tyrimai atskleidė, jog *H. perforatum* L. gali būti naudojamas ir kovoje su koronaviruso pandemija. COVID-19 yra nauja koronaviruso padermė, ypač veikianti vyresnio amžiaus žmones, turinčius kvėpavimo takų problemų ar gretutinių ligų. Sergant koronavirusu galimi įvairūs plaučių pažeidimai. Apie 20% žmonių, kurie serga ūmaus respiracinio distreso sindromu – ūminiu kvėpavimo nepakankamumu, kurio metu dėl plaučių edemos sutrinka deguonies pasisavinimas iš alveolių į kraują – išsivysto alveolinė intersticinė pneumonija. Nustatyta, kad chlorochinas, remdesiviras ir hidroksichlorochinas yra veiksmingi prieš COVID-19. Šie vaistai yra ŽIV proteazės inhibitoriai. Šiuo metu, vyraujant pasaulinei pandemijai, ypač aktualu ieškoti vis naujų COVID-19 gydymo būdų. Tyrimo metu buvo atliekami molekuliniai COVID-19 (PDB ID: 6LU7) sukarpymai ir įvairių *H. perforatum* L. ligandų prijungimai, matuojama surišimo energija, kurią apima vandeniliniai ryšiai, Van der Valso jėgos ir elektrostatinė sąveika. Kaip kontrolė naudojami chlorochino ir hidroksichlorochino ligandai. Tyrime naudojami 22 ligandai, tokie kaip hipericinas, pseudohypericinas, protopseudohypericinas, protohypericinas, hiperozidas, adhyperforinas, kriptochlorogeninė rūgštis, hyperforinas, izohypericinas, katechinas ir kt. Nustatyta, jog stabiliausi kompleksai susidaro naudojant hipericiną ir izohypericiną. COVID-19 pagrindinės proteazės ir hipericino arba izohypericino ligandų kompleksui susidaryti reikia 11 kcal/mol surišimo energijos. *H. perforatum* L. kompleksai gali būti naudojami prieš COVID-19, tačiau reikėtų daugiau atlikti *in vitro* ir *in vivo* tyrimų, geriau iširti inhibitorinį potencialą [38].

1.9. Jonažolės antibakterinis aktyvumas

Kovai su mikroorganizmais yra naudojamos antimikrobinės medžiagos, galinčios sunaikinti mikrobus ar užkirsti kelią jų dauginimuisi bei augimui. Pirmieji antimikrobiniai polimerai buvo aptikti 1965 m. Svarbiausios antimikrobinių polimerų taikymo sritys - medicinos, maisto ir tekstilės pramonės. Bioplėvelės susiformuoja mikrobams prilipant prie substrato ir su juo susirišant. Antimikrobinės medžiagos turi slopinti mikrobų gyvybingumą ir adheziją. Tyrimo metu, buvo tirtos naujos medžiagos, sujungtos poliuretano ir *H. perforatum* L. ekstraktu, vertintas antimikrobinis bei antibioplėvelinis aktyvumas. Antimikrobinės *H. perforatum* L. etanolio ekstrakto savybės buvo nustatytos prieš tris skirtingus mikroorganizmus – *Candida albicans*, *E. coli* ir *S. aureus*. Tyrimai parodė, kad labiausiai paveikta buvo *S. aureus* bakterija, *C. albicans* ir *E. coli* slopinamojo poveikio nepastebėta. Antibioplėvelių analizės rezultatai atskleidė, jog *H. perforatum* L., taip pat, labiausiai paveikė *S. aureus* bioplėvelės formavimąsi. Nustatyta, jog lyginant su kontrole, poliuretano ir *H. perforatum* L. ekstrakto derinys sąlygojo 92,85 % *S. aureus* bioplėvelės sumažėjimą. Įrodyta, kad *H. perforatum* L. ekstraktas, gali būti veiksmingai naudojamas farmacijoje bei biomedicinoje, kovojant su *S. aureus* infekcijomis [39].

Įrodyta, kad *Hypericum* ekstraktai pasižymi antimikrobinėmis, antibakterinėmis savybėmis. *Hypericum* preparatai yra veiksmingi prieš gramteigiamas bakterijas, įskaitant meticilinui ir penicilinui atsparų *S. aureus*. Tyrimo metu buvo tiriamas *H. perforatum* L. metanolio ekstraktų antimikrobinis aktyvumas. Nustatyta, jog hipericinas ir hiperforinas turi didžiausią antimikrobinį poveikį. Paašškėjo, kad *Hypericum* pasižymi antimikrobiniu poveikiu ir gramneigiamiesiems organizmams. Eksperimento metu buvo naudojami, tokie mikroorganizmai kaip *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *C. albicans*. Nustatyta, jog hiperforinas ir hipericinas labiausiai paveikia *C. diphtheriae*, *S. agalactiae* ir *S. pyogenes*. Paašškėjo, kad šviesa padidina gramneigiamų bakterijų ir virusų jautrumą *H. perforatum* L.

aliejų ekstraktams. Vandens ir *H. perforatum* L. ekstraktas pasižymi priešgrybeliniu poveikiu, labiausiai paveikia *Microsporum*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia lunata* ir *Fusarium vasiiinfectum*. Taip pat, nustatyta, kad hipericino poveikiui yra jautrūs ir *Herpes simplex* bei gripo virusai [33].

Kito tyrimo metu, buvo vertinami neapdoroti *H. perforatum* L. ekstraktai, nustatomas, šių ekstraktų, išskiriamų medžiagų antimikrobinis poveikis. Įrodyta, kad pagrindinė jonažolės antibakterinė medžiaga yra tetraketonas – hiperforinas, kuris, taip pat, yra atsakingas už žolelės antidepresantinį aktyvumą. Pastebėta, kad hiperforinas labiau veikia gramteigiamas bakterijas, tokias kaip *Staphylococcus oxford*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans* ir *Streptococcus sanguis*, nei gramneigiamas bakterijas, tokias kaip *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* ir *E. coli*. Paaiškėjo, jog alkoholiniai – metanolio, etanolio - ekstraktai pasižymi didesniu aktyvumu nei vandeniniai ekstraktai. Tyrimo metu, metanolio ekstraktas pasižymėjo didesniu aktyvumu prieš *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. oxford* ir *S. aureus*. Vandens ekstraktas buvo aktyvus tik prieš *S. oxford*. Rezultatai parodė, kad organiniai tirpikliai yra tinkamesni antibakteriniams augalų komponentams išgauti nei vanduo. Taip pat, hiperforinas pasižymėjo dideliu antibakteriniu poveikiu prieš *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Micrococcus luteus* bei *Moraxella catarrhalis*. Atliekant tyrimus *in vivo* ir *in vitro* su *S. aureus*, buvo nustatyta, jog kovojant su *S. aureus* infekcijomis, *H. perforatum* L. yra veiksmingesnis už sulfanilamidą [40]. Tačiau nustatyta, kad *S. aureus* gali įgyti atsparumą hiperforinui - rezistentiškumas nesivysto, kai *Hypericum* ekstrakto koncentracija žmogaus kraujo plazmoje yra 900 mg/per parą [41]. Be to, nustatyta, jog hiperforinas pasižymi antimaliariniu poveikiu – hiperforinas slopina *Plasmodium falciparum*, kuris yra maliarijos sukelėjas. Tirti antibakteriniai kremai ir tepalai, turintys *H. perforatum* L. ekstraktų, pasižymėjo trumpesne nudegimų gyjimo trukme ir teigiamu antiseptiniu poveikiu. Gydant tepalu, I – ojo laipsnio nudegimai užgyjo per 48 val, II – ojo ir III – ojo laipsnio nudegimai užgyjo tris kartus greičiau nei įprastai ir be randų susidarymo nudegimų vietoje [40].

1.10. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Mokslininkų atlikti tyrimai parodė, kad paprastojoje jonažolėje (lot. *Hypericum perforatum* L.) gausu naftodiantronų, floriglicinolių, flavonoidų, fenolinių rūgščių bei kitų biologiškai aktyviųjų junginių, kurie lemia *H. perforatum* L. antioksidacines, antibakterines bei antidepresantines savybes. *Hypericum* preparatai plačiai naudojami medicinoje ir farmacijoje. Atliekami tyrimai su *in vivo* ir su *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktais, nustatomas ir vertinamas antioksidacinis ir antibakterinis aktyvumas. Norint pagreitinti ir pagerinti augalo augimą *in vitro*, padidinti bioaktyviųjų junginių koncentracijas – naudojami auksinai ir citokinai.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Visi skaičiavimai atlikti naudojant Microsoft Excel programą. Reagentų sąrašas pateiktas 1 priede.

2.1. Įrangos sąrašas

Tyrimuose naudotos įrangos sąrašas pateiktas 2 priede.

2.2. Jonažolės regeneracija ir kaliaus kultūrų *in vitro* gavimas

2.2.1. Sėklų sterilinimas

Jonažolės sėklos sterilinamos 70 % C₂H₅OH – 5 s, 1,5 % NaClOH – 20 min ir 3 kartus plaunamos steriliu distiliuotu vandeniu [42].

2.2.2. Augimo reguliatorių paruošimas

Pirmiausia paruošiamas pradinis tiriamosios medžiagos tirpalas (0,1 mg/ml). Pasveriamas 10 mg tiriamojo junginio ir suberiami į matavimo kolbą, įpilama 2 – 5 ml distiliuoto vandens. Išmaišius tirpalą ir ištirpus milteliams, pripilama distiliuoto vandens iki 100 ml žymės.

Reikalingas paimti tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris iš pradinio tirpalo apskaičiuojamas pagal formulę:

$$X = \frac{A \times B}{C} \quad (1)$$

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).

$$\frac{\text{norima fitohormono koncentracija, mg/l}}{\text{turima fitohormono koncentracija, mg/ml}} \times \text{terpės tūris, l} = \text{reikalingas fitohormono kiekis, ml} \quad (2)$$

2.2.3. Mitybinių terpių paruošimas

Augalų ląstelių kultūros kultivavimui būtina mitybinė terpė ir išorinės aplinkos faktoriai, tokie kaip šviesa ir temperatūra. Viena populiariausių mitybinių terpių yra *Murashige & Skoog* (MS) terpė, kuri pasižymi didele nitrato, kalio ir amonio jonų koncentracija. Šią terpę sudaro įvairūs makroelementai, mikroelementai, geležies šaltinis, organiniai priedai, tokie kaip nikotino rūgštis, mioinozitolis, piridoksino hidrochloridas (vitaminas B₆) ir tiamino hidrochloridas (vitaminas B₁), anglies šaltinis bei augimo hormonai.

Terpė yra sterilizuojama autoklave 15 min, 120 °C temperatūroje, 0,75 – 1 atm. slėgyje. MS terpės pH 5,7–5,8, pH reguliuojamas su 0,1 N NaOH ir 0,1 N H₂SO₄. Vėliau pridedami papildomi reagentai atitinkamai terpei. Terpės pateiktos 2.1. lentelėje.

2.1. lentelė. Tyrimui paruoštų terpių sudėtis

| Terpė | Sudėtis |
|-------|--|
| 1 | MS+ 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) |
| 2 | MS+BAP (0,5 mg/l) |
| 3 | MS+BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) |
| 4 | MS+ 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinas (0,11 mg/l) |
| 5 | MS+BAP (0,5 mg/l) + 39 junginys |
| 6 | MS+ 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinas (0,11 mg/l) + 39 junginys |
| 7 | MS + T+1 |

39 junginio cheminė struktūra pateikta 3 priede [43].

2.2.4. Sėklų sudaiginimas *in vitro* ir kaliusų formavimas

Sėkos sodinamos į Petri lėkšteles, kuriose buvo paruošta atitinkama terpė. Sodinimas vykdytas laminare. Laminaras sterilinamas ultravioletiniais spinduliais bei etanolium (70 %). Jonažolės optimali kultivavimo temperatūra yra 20 – 22 °C temperatūra, fotoperiodas – 24 valandos. Vėliau eksplantai reguliariai kas 3 savaites buvo perkelti į šviežių maitinamąją terpę, kol susiformavo kaliaus kultūros [44, 45].



2.1. pav. Jonažolės sėklų sudaiginimas *in vitro* ir kaliaus kultūrų formavimas

2.3. Jonažolės antioksidacinio aktyvumo nustatymas

2.3.1. Jonažolės redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas

Pasveriami 0,1 g išdžiovintos medžiagos, sumaišoma su su 5 ml metanolio ir ekstrahuojama 45°C 0,5 val. Ekstraktas centrifuguojamas ir naudojamas tyrimams.

Paruošiami I, II, III, IV skirtingų koncentracijų ekstraktų mėginiai, bendras kiekis turi būti 0,5 ml:

- I – 0,01 mol/l (0,25 ml bandinio + 0,25 ml metanolio);
- II – 0,005 mol/l (0,125 ml bandinio + 0,375 ml metanolio);
- III – 0,0025 mol/l (0,0625 ml bandinio + 0,4375 ml metanolio);

- IV – 0,00125 mol/l (0,03125 ml bandinio + 0,46875 ml metanolio).

Į 0,5 ml skirtingų koncentracijų ekstraktų mėginius, supilama 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 1,25 ml $K_3[Fe(CN)_6]$. Sumaišoma ir inkubuojama 50 °C temperatūroje 20 min. Vėliau pridedama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišoma. Centrifuguojama 9000 aps/min 10 min.

1,25 ml supernatanto sumaišoma su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % $FeCl_3$ (0,01 g $FeCl_3$ + 10 ml H_2O). Matuojama sugertis, bangos ilgis 700 nm. Kuo didesnė šviesos sugertis, tuo mėginiai labiau pasižymi redukcinėmis savybėmis. Kontrolinis mėginys: 1 ml 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$ + 1 ml natrio fosfatinio buferio 0,2 M (pH=6,6) [46].

2.3.2. Jonažolės antioksidacinis aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ

Šis metodas nustato augalo redukuojančias savybes. Metodas paremtas Fe^{3+} -TPTZ pavirtimu į Fe^{2+} -TPTZ (mėlyna spalva) 593 nm ilgyje.

Pasveriami 0,1 g išdžiovintos jonažolės, sumaišoma su su 5 ml metanolio ir ekstrahuojama 45°C 0,5 val. Ekstraktas centrifuguojamas ir naudojamas tyrimams.

Ruošiami 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);

$$1 \text{ mol} - 1000 \text{ ml} - 270,3 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (FeCl_3 \times 6H_2O)$$

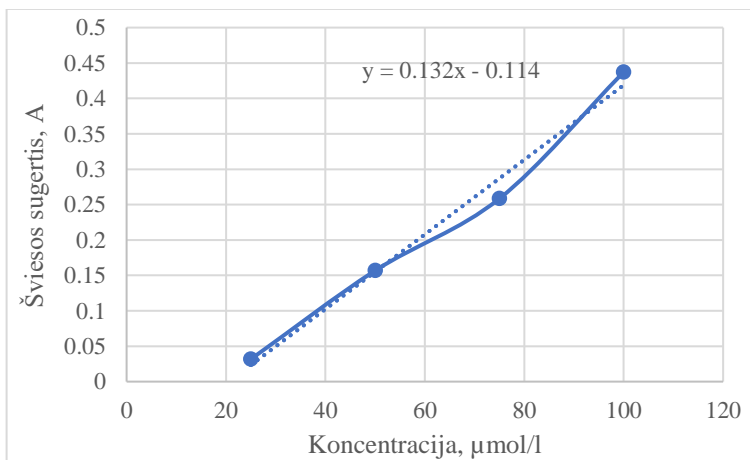
$$20 * 10^{-3} - 20 \text{ ml} - x$$

$$x = 0,010812 \text{ g}$$

- FRAP reagentas ruošiamas iš: 30 ml 300 mM acetato buferio, 3 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 3 ml $FeCl_3 \times 6 H_2O$ (20 mmol/l).

100 µL ekstrakto sumaišoma su 3 ml FRAP reagentu. Kontrolinis mėginys yra iš 100 µL metanolio ir 3 ml FRAP reagento.

Reakcijos mišinys matuojamas 593 nm bangos ilgyje spektrofotometriškai. Kalibravimo kreivė ruošiamą $FeSO_4 \times 7H_2O$ (5, 10, 15, 20; 25 µmol/L). Reikšmė apskaičiuojama pagal kalibravimo kreivę µmol/L $Fe(II)/L$. Kalibracinės kreivės kontrolinis mėginys yra iš 3 ml FRAP reagento ir 7 ml H_2O [47]. Kalibracinės kreivės reagentų kiekiai pateikti 4 priede.



2.3. pav. FeSO₄ x 7H₂O kalibracinė kreivė

Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas iš kalibracinės lygties, įsistačius atitinkamą sugertį į y vietą. Mėginiai buvo išmatuoti praskiedus 4 kartus ir 14 kartų.

2.3.3. Jonažolės ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

Augalų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai.

Fenoliniams junginiams būdingas antioksidacinis aktyvumas dėl jų gebėjimo išaktyvinti laisvuosius radikalus. Reakcijos metu antioksidantas atiduoda vandenilį ir taip išaktyvina laisvuosius radikalus, kurie tampa stabiliais DHHP – H tipo junginiais.

0,2 g susmulkintos žaliavos užpilama 2 ml metanolio ir homogenizuojama 10 min. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 minučių. Surenkamas supernatantas.

Tiriamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml paruošto ekstrakto, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir po 15 minučių laikymo tamsoje pamatuojamas tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje.

Palyginamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml metanolio, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Etaloninis DPPH tirpalas ruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje. Kontrolė – metanolis [48, 49].

2.3.4. Jonažolės ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu

ABTS metodas paremtas radikalo anijono slopinimu. ABTS yra gaunamas pridėdam į jį kalio persulfato tirpalą. Radikalo anijonas turi mėlynai-žalią spalvą ir šviesos sugertis matuojama 734 nm bangos ilgyje.

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C, 0,5 h. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tyrimams. Į 0,5 ml ekstraktą įpilama 1,7 ml fosfato buferio (20 mM) ir 0,3 ml 2 mM ABTS (praskiesto). Nustatoma ABTS šviesos sugertis 734 nm bangos ilgyje. Kontrolė – praskiestas ABTS tirpalas.

$$\%_{slopinimas} = \frac{A_B - A_A}{A_B} * 100 \quad (3)$$

A_B – praskiesto ABTS tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo augalų ekstrakto šviesos sugerties dydis [49].

2.4. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas

2.4.1. Sintetinių junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas

Naudojami analogiška metodika ir reagentai, kaip aprašyta 2.3.1. skyrelyje, tik skiriasi tiriami žaliava. Šiuo atveju naudojama L-askorbo rūgštis, BHT ir 39 junginys.

2.4.2. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ

Naudojami analogiška metodika ir reagentai, kaip aprašyta 2.3.2. skyrelyje, tik skiriasi tiriami žaliava. Šiuo atveju naudojama L-askorbo rūgštis, BHT ir 39 junginys.

2.4.3. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

Pasiruošiamas DPPH tirpalas. Apsiskaičiuojama, kiek DPPH reiks ištirpinti 50 ml etanolyje.

$$1 \text{ mol} - 1000 \text{ ml} - 394,32 \text{ g/mol}$$

$$1 * 10^{-3} - 50 \text{ ml} - x$$

$$x = 0,019716 \text{ g}$$

3 ml DPPH tirpalo sumaišoma su 3 ml tiriamųjų junginių tirpalais. Mišiniai maišomi ir paliekami stovėti 20 min.

Palyginamasis tirpalas ruošiamas iš 3 ml DPPH ir 3 ml DMSO. Po 20 min. ruošiamas skiedimas 1:15 – palyginamajam tirpalui ir tiriamiesiems tirpalams su DMSO.

Absorbcija matuojama 517 nm bangos ilgyje [48,49,50].

2.5. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu

0,05 g sausos, susmulkintos augalinės medžiagos sumaišoma su 10 ml acetono (70 %) tirpalu ir maišoma kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Vėliau centrifuguojama 10 min 9000 aps/min 4° C. Supernatantas surenkamas ir laikomas ant ledo.

Kalibravimo kreivės parengimas. Paimama 0,0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100, 110, 120, 130 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo, pridedama distiliuoto vandens, kad kiekis mėgintuvėliuose būtų 500 µl. Į šį tirpalą pridedama 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir inkubuojama kambario temperatūroje 40 min tamsoje. Po 40 min matuojama absorbcija prieš tuščią mėginį. Kontrolė – 500 µl H₂O sumaišoma su 250 µl Folino-Kiokalto reagentu ir 1,25 ml Na₂CO₃.

Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas. Paimamas atitinkamas kiekis paruošto ekstrakto ir praskiedžiama vandeniu iki 500 µl. Pridedama į jį 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir įpilama 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir matuojama absorbcija tirpalo 725 nm bangos ilgyje po

40 min laikymo tamsoje. Kontrolė – 470 µl H₂O sumaišoma su 30 µl acetono, 250 µl Folino-Kiokalto reagentu ir 1,25 ml Na₂CO₃.

Apskaičiuojama bendra fenolinių junginių koncentracija pagal formulę:

$$x = \left(\frac{a \cdot V}{n \cdot V_1} \right) * 100 \quad (4)$$

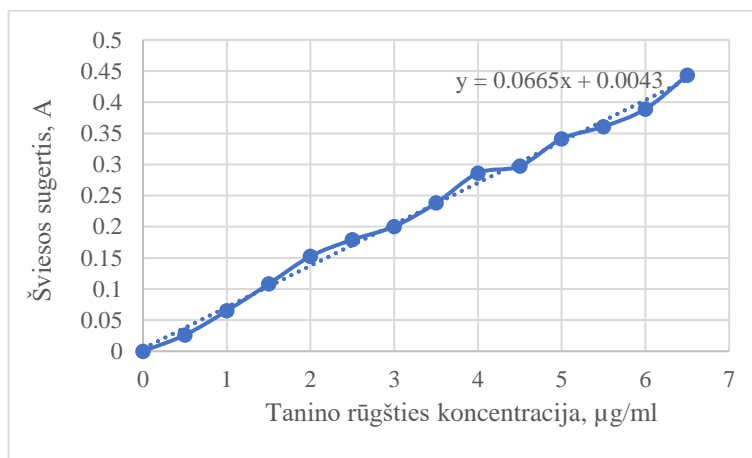
a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;

V – pradinis ekstrakto tūris ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

n – augalinė masė, mg [50,51].

Kalibracinės kreivės reagentų kiekiai pateikti 5 priede.



2.4. pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

2.6. Baltymų koncentracijos nustatymas

Paruošiama baltymų koncentracijos nustatymo kalibravimo kreivė pagal albuminą. 25 mg albumino ištirpinama 25 ml vandens. Iš pradinio tirpalo imami 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; tūrio mėginiai (ml) ir skiedžiama distiliuotu vandeniu iki 10 ml. Kalibravimo kreivei į pirmąjį mėgintuvėlį įpilama 0,2 ml distiliuoto vandens. Į visus mėgintuvėlius įpilama 2 ml Bradfordo reagento. Mėginiai sumaišomi ir matuojami spektrofotometru, kai bangos ilgis 595 nm.

Baltymų išskyrimas iš augalinės biomasės. Augalinė medžiaga išdžiovinama, pasverama 0,05 g ir panaudojant buferius išekstrahuojami baltymai. Augalinė medžiaga užpilama atskirais buferiais (pH=2,6; pH=4; pH=6; pH=8; pH=10) į atskirus mėgintuvėlius po 1 ml ir maišoma vieną valandą. Centrifuguojama 9000 aps/min 20 min 4 °C. Po centrifugavimo paimama 200 µl ekstrakto, pridedame

Bradfordo reagento (2 ml). Po 2 minučių matuojamas optinis tankis esant 595 nm bangos ilgiui. Kontrolė - 200 µl atitinkamo buferio sumaišoma su 2 ml Bradfordo reagentu.

Baltymų ekstrahavimui naudojami buferiai:

1) 0,1 M Glicinas – HCl; pH=2,6

2) 0,1 M Natrio acetatas (pH= 4,0):

0,1 M CH₃COOH;

0,1 M Natrio acetatas;

3) 0,1 M Natrio acetatas (pH= 6,0):

0,1 M CH₃COOH;

0,1 M Natrio acetatas;

4) 0,1 M Tris – HCl; pH=8,0

0,1 M Tris ir 0,1 M HCl;.

5) 0,1 M Natrio boratas; pH=10

Visi buferiniai tirpalai turi 0,15 M NaCl.

Bendra baltymų koncentracija X (mg/100 mg) apskaičiuojama iš formulės:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1} \quad (5)$$

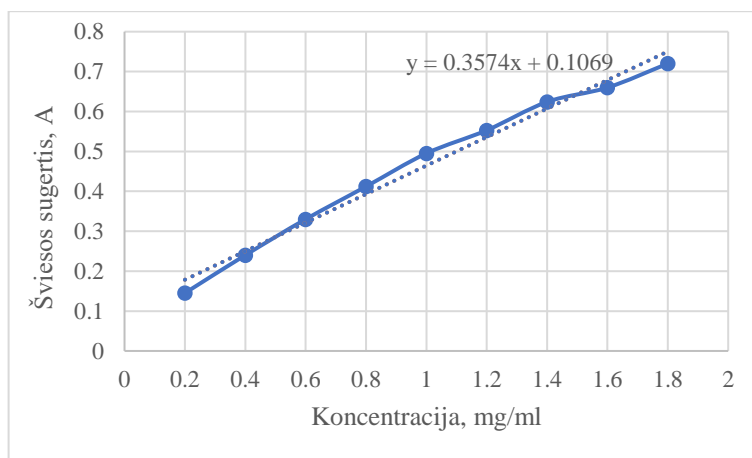
Čia:

a – baltymo koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg/ml;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

n – augalinė masė, mg.



2.4. pav. Kalibracinė kreivė pagal albuminą

2.7. SOD aktyvumo nustatymas

0,1 g augalinės žaliavos sumaišoma su 4 ml 0,066 M K/Na fosfatiniu buferiu (pH=7,4), turinčiu 1 mM ditiotritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1-3 mg polivinilpirolidono. Vykdoma tirpių baltymų ekstrakcija. Mėginiai centrifuguojami 9000 aps/min 10 min. Supernatantas dar kartą centrifuguojamas Eppendorf mėgintuvėliuose.

Baltymų nustatymui paimama 200 μ l mėginio ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento, išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Paruošiama baltymų kalibravimo kreivė pagal albuminą.

Reakcijos mišinys 2 ml tūrio turi 40 μ l fermentinio preparato, 400 μ l 200 mM Tris-HCl buferio (pH=7,8), 200 μ l 100 mM L-metionino; 200 μ l 540 μ M nitromėlynojo tetrazolio, 500 μ l 0,1% Tritono X-100 ir 20 μ l 300 μ M riboflavino ir 620 μ l distiliuoto vandens. Paruošiamas kontrolinis mėginys be fermentinio preparato.

Reakcija atiekama apšviečiant liuminescentinėmis lempomis 30 min. Kaip kontrolė naudojamas mišinys be fermentinio preparato. Šviesos sugertis matuojama 560 nm bangos ilgyje.

Naudojama baltymų koncentracijos nustatymo kalibravimo kreivė pagal albuminą (žr.2.6. skyrelį). Fermento aktyvumas apskaičiuojamas:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{\log 2 \times m} \quad (6)$$

A – SOD aktyvumas vnt/mg;

E_K – šviesos sugertis kontrolinio bandinio;

E_T – šviesos sugertis tiriamojo bandinio;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml (Baltymų koncentracija apskaičiuojama pagal Bradfordo metodą) [52].

2.8. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos nustatymas

Karotinoidų bei chlorofilo *a* ir *b* bei nustatymas vaistinių augalų audiniuose paremtas šviesos sugerties nustatymu spektrofotometru bangos ilgiuose:

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

Pigmentų kiekio nustatymui 0,1 g sausos ir smulkintos augalinės medžiagos sumaišoma su 10 ml 96% C₂H₅OH. Nufiltruojama. Nufiltruoto ekstrakto tūris išmatuojamas cilindru. Vėliau ekstraktai praskiedžiami etanolio tol, kol optinis tankis praskiestų tirpalų būtų nuo 0,1 iki 0,8. Filtratas supilamas į matavimo kiuvetę ir matavimai atliekami spektrofotometru, bangos ilgiai: 662 nm chlorofilui *a* nustatymui, 644 nm - chlorofilui *b*, 441 nm – karotinoidams. Kontrolinis mėginys – C₂H₅OH.

Pigmentų koncentracija apskaičiuojama pagal formules:

$$\text{Chlorofilo } a \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_a = 9,784 D_{662} - 0,99 D_{644}; \quad (7)$$

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_b = 21,426 D_{644} - 4,65 D_{662}; \quad (8)$$

$$C_a + C_b = 5,134 D_{662} + 20,436 D_{644}; \quad (9)$$

Karotinoidų koncentracija (mg l⁻¹):

$$C_{\text{karotinoidai}} = 4,695 D_{441} - 0,268 (C_a + C_b); \quad (10)$$

Pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuojamas:

$$X = \frac{C \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000} \quad (11)$$

C-pigmentų koncentracija mg/l;

V-pradinis ekstrakto tūris;

V₁- pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

V₂- praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n - augalinė masė, g [53].

2.9. MDA koncentracijos nustatymas

0,1 g augalinės žaliavos sumaišoma su 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi. Homogenizuojama kratytuve 10 min 25 °C. Centrifuguojama 9000 aps/min 10 min 4 °C. 0,3 ml supernatanto sumaišomas su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi (ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje) ir inkubuojama 95 °C temperatūroje 30 min. Atšaldoma ir centrifuguojama 15 min 9000 aps/min. Matuojama šviesos sugertis prie 532 ir 600 nm bangos ilgių.

MDA koncentracija apskaičiuojama:

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \times V_e \times 2}{k \times m_s \times V_a} \quad (12)$$

C_x – MDA koncentracija $\mu\text{mol/g}$;

E – tirpalo šviesos sugertis;

V_e – ekstrakto tūris, ml;

V_a – ekstrakto tūris analizei, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas $156 \text{ Mm}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$;

m_s - bandinio masė, ekstrakcijai, g [54].

2.10. L-prolino koncentracijos nustatymas

100 mg vaistinės augalinės žaliavos susmulkinama ir užpilama 4 ml distiliuotu vandeniu mėgintuvėlyje. Mėgintuvėlis su augaline žaliava 3 min kaitinamas ir atšaldomas. Procedūra kartojama dar du kartus. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min. Gautas ekstraktas praskiedžiamas iki 6 ml ir toliau naudojamas tyrimams.

Į kitą mėgintuvėlį įpilama 1 ml ekstrakto, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento kaitinami 1 val vandens vonelėje. Į kontrolinį mėginį vietoj ekstrakto įpilamas 1 ml distiliuoto vandens. Šviesos sugertis matuojama 520 nm bangos ilgyje.

Prolino koncentracija apskaičiuojama naudojantis kalibravimo kreive (*L*-prolino) pagal formulę:

$$C_X = \frac{E \times k \times V_{bendras}}{V_{paimta} \times m} \quad (14)$$

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

E – tirpalo šviesos sugertis;

k – *L*-prolino kiekis, gautas pagal kalibravimo kreivę (μmol)

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

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

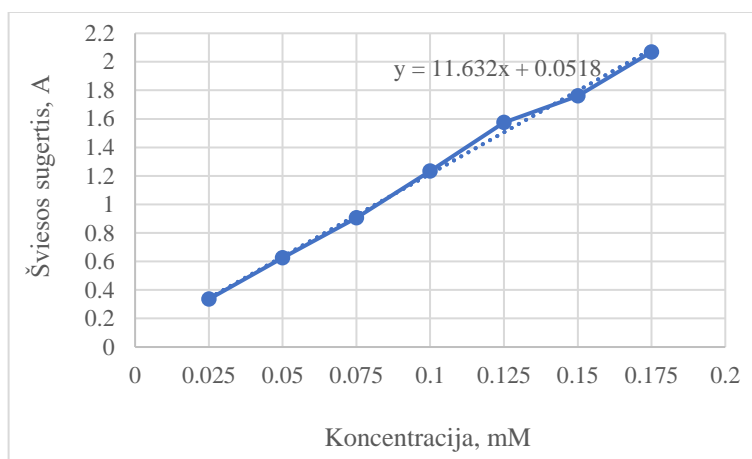
m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g.

L-proolino kalibravimo kreivė. Pasveriami *L*-proolino 0,0011 g ir ištirpinama 10 ml H₂O (1 mM). Ruošiama *L*-proolino kalibravimo kreivė: 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,175 mM.

Imami atitinkami *L*-proolino kiekiai iš pradinio tirpalo į mėgintuvėlius:

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

Mėgintuvėliai kaitinami 1 val verdančioje vandens vonelėje ir atšaldžius matuojama šviesos sugertis 520 nm bangos ilgyje.



2.5. pav. *L*-proolino kalibracinė kreivė

2.11. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas

0,1 g augalinės žaliavos susmulkinama su atšaldytu 4 ml 0,1 M fofatiniu buferiu (pH=7), kuris turi 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, ištirpinto DMSO. Centrifuguojama 9000 aps/min 20 min.

Baltymų nustatymui paimama 200 μl mėginio ir įpilama 2 ml Brafordo reagento bei išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Naudojama baltymų kalibravimo kreivė pagal albuminą.

Į reakcijos mišinį (6 ml) įpilama 3 ml 0,1 M fosfatinio buferio (pH=7), 0,6 ml 5 mM askorbo rūgšties, 0,06 ml 0,01 M EDTA, 0,06 ml 0,01 M vandenilio peroksido ir 0,2 ml fermentinio preparato. Įpilama 2,08 ml distiliuoto vandens. Reakcija prasideda pridėjus vandenilio peroksido. Matuojama šviesos sugertis 290 nm bangos ilgyje pradžioje, po 3 min. ir po 30 min. Kontrolė – foffatinis buferis. Askorbatperoksidazės aktyvumas nustatomas pagal formulę:

$$A = \frac{\Delta \bar{E}_{\min} \times \left(\frac{V}{1000} + V_{Buf.} + V_{peroks.} \right)}{k \times m} \quad (15)$$

A – fermentų aktyvumas, mmol/mg;

$\Delta \bar{E}_{\min}$ – vidutinė šviesos sugerties skirtumas po 30 min. ir pradžioje;

V – pavyzdžio tūris, μ l;

$V_{Buf.}$ – buferio tūris, ml;

$V_{peroks.}$ – vandenilio peroksido tūris, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas 2,8 nmol/cm;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg. (Baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal Bradfordą).

2.12. Flavonoidų koncentracijos nustatymas

0,2 g susmulkintos augalinės žaliavos sumaišoma su 2 ml 80 % metanoliu. Laikoma 1 parą 150 rpm kratyklėje. Homogenatas nucentrifuguojamas 9000 rpm 10 min, surenkamas supernatantas.

Bendras flavonoidų kiekis nustatomas su aliuminio chloridu. Į 0,1 ml tiriamąjį mėginį įpilama iki 1 ml 80 % metanolio ir 1 ml 2 % aliuminio chlorido. Mišinys paliekamas stovėti 30 min. Vėliau matuojama absorbcija, bangos ilgis 415 nm. Flavonoidai apskaičiuojami pagal kvercetiną mg/g sausos masės.

Flavonoidų koncentracija mg/g pagal kvercetiną apskaičiuojama pagal formulę:

$$C = \frac{C_1 \times V}{g} \quad (16)$$

C_1 – kvercetino koncentracija mg/ml pagal kalibravimo kreivę;

V – ekstrakto pradinis tūris, ml

g – augalinė masė, g

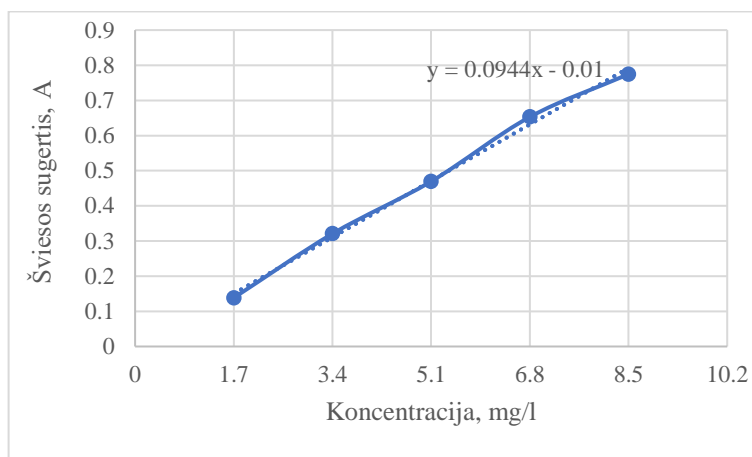
Kvercetino kalibravimo kreivė. Kvercetinas (1 mg/ml) ištirpinamas metanolyje.

Po to paruošiamos kvercetino koncentracijos: 10 mg/l; 20 mg/l; 30 mg/l; 40 mg/l; 50 mg/l.

1. Į pirmąjį mėgintuvėlį įpilama 0,1 ml kvercetino ir 0,15 ml 2% aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu;
2. Į antrąjį mėgintuvėlį įpilama 0,2 ml kvercetino ir 0,15 ml 2 % aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu;
3. Į trečiąjį mėgintuvėlį įpilama 0,3 ml kvercetino ir 0,15 ml 2 % aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu;

4. Į ketvirtąjį mėgintuvėlį įpilama 0,4 ml kvercetino ir 0,15 ml 2% aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu;
5. Į penktąjį mėgintuvėlį įpilama 0,5 ml kvercetino ir 0,15 ml 2% aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu.

Išmatuojama šviesos sugertis 415 m bangos ilgyje. Tuščias bandinys – metanolis. Braižoma kvercetino kalibravimo kreivė [55].



2.6. pav. Kvercetino kalibracinė kreivė

2.13. Katalazės aktyvumo nustatymas

0,1 augalinės žaliavos susmulkinama ir tirpių baltymų ekstrakcija vyksta 0,05 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH=7,8) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, ištirpinto DMSO, 1-3 mg polivinilpirolidono. Centrifuguojama 9000 aps/min 10 min ir supernatantas dar kartą centrifuguojamas Eppendorf mėgintuvėliuose.

Baltymų nustatymui paimama 200 μl mėginio ir įpilama 2 ml Brafordo reagent, išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Naudojama baltymų kalibravimo kreivė pagal albuminą.

Ruošiamas 4 ml tūrio reakcijos mišinys iš 100 μl fermentinio preparato ir 3900 μl 0,05 M K/Na fosfatinio buferio. Prieš matavimą į reakcijos mišinį įpilama 0,1 M 0,2 ml vandenilio peroksido. Šviesos sugerties matavimo dinamika registruojama pradžioje, po 3 min. ir po 30 min. 240 nm bangos ilgyje.

Fermento aktyvumas apskaičiuojamas:

$$A = \frac{1000 \times \Delta \bar{E} \times V}{k \times m} \quad (17)$$

A – katalazės aktyvumas vnt/mg

$\Delta \bar{E}$ – šviesos sugerties pokytis pradžioje ir po 30 min;

V – bendras mišinio tūris, m;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas 32,57;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg. (Baltymų koncentracija apskaičiuojama pagal albumino kalibravimo kreivę, žr 2.6.skyrelį) [56].

2.14. Prolindehidrogenazės aktyvumo nustatymas

0,1 g džiovintos augalinės medžiagos sumaišoma su 4 ml ekstrakcijos buferiu (pH=7,8), turinčiu 0,05 M Tris-HCl; pH=7,8, 1 mM EDTA ir 0,5 % tritono X-100. Mėginiai maišomi kratytuve 10 min. 25 °C. Centrifuguojama 9000 aps/min 10 min. Surenkamas supernatantas (800µl) dar kartą centrifuguojamas Eppendorf mėgintuvėliuose.

Baltymų nustatymui paimama 200 µl mėginio ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento, matuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Kontrolė – buferis pH= 7,8. Naudojama baltymų kiekio kalibravimo kreivė pagal albuminą.

Į kitą mėgintuvėlį įpilama 400 µl fermentinio preparato, 1800 µl karbonatinio buferio pH=10,3 ir 1800 µl 0,02 M L-prolino. Prieš matavimą į reakcijos mišinį įpilama 100 µl 100 mM NAD. Šviesos sugerties matavimo dinamika registruojama pradžioje ir po 3 min. 340 nm bangos ilgyje. Kontrolė – buferis pH= 10,3.

Fermento prolindehidrogenazės aktyvumas apskaičiuojamas:

$$A = \frac{1000 \cdot \Delta \bar{E} \cdot V}{k \cdot m} \quad (18)$$

A – prolindehidrogenazės aktyvumas µmol NAD/ mg baltymo x min;

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

V – bendras mišinio tūris, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas 6,22 µmol⁻¹ x cm⁻¹

m – baltymo masė preparato tūryje, mg. (Baltymų koncentracija apskaičiuojama pagal albumino kalibravimo kreivę, žr. 2.6.skyrelį).

2.15. Antibakterinio aktyvumo nustatymas agaro difuziniu metodu

Pasiruošiamas vaistinis ekstraktas. Sumaišoma 0,2 g augalinės žaliavos su 2 ml DMSO.

Pasiuošiama 0,5 l LB terpės. Sumaišomi šie komponentai: 5 g/l NaCl, 5 g/l triptono, 2,5 g/l mielių ekstrakto. Matuojamas pH. Kai pH nusistovi ~pH= 7,2, tada supilama 7,5 g/l mikro agaro. Autoklavuojama.

Ant LB terpės petri lėkštelėse užpilama 50 µl *X. campestris*, *B. subtilis* bakterijų suspensijos ir uždedamas popierinis diskas, suvilgytas 25 µl vaistinių augalų ekstraktu. Petri lėkštelės sudedamos į

termostatą 37 °C. Po vienos-dviejų parų stebimas bakterijų augimas ir vaistinių augalų ekstraktų antibakterinis poveikis.

2.16. Liuteino koncentracijos nustatymas

Į 0,1 g augalinės žaliavos įpilama 20 ml acetono ir maišoma 3 val 250 rpm. Suspensija yra paliekama stovėti 5 min ir centrifuguojama 10 min 9000 aps/min. Supernatantas yra surenkamas, nuosėdos maišomos 1 valandą su acetonu (10 ml). Nuosėdos su acetonu yra centrifuguojamos 15 min 9000 aps/min ir šviesos sugertis išmatuojama pagal acetoną 446 nm bangos ilgyje. Liuteinas nustatomas iš formulės mg/g:

$$X = \frac{A_{446}}{(14.45 \times 10^4)} \times \left(\frac{1}{b}\right) \times 568.88 \times \frac{V}{M} \times \frac{1L}{10^3 ml} \times 10^3 \frac{mg}{g} \times \frac{kg}{10^3 g} \quad (19)$$

X – liuteino koncentracija, mg/l;

A_{446} – absorbcija, A;

b – bangos ilgis,

V – ekstrakto tūris, ml;

M – augalinė žaliava, kg.

2.17. Vandenilio peroksido suardymo nustatymas

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama 5 ml fosfatiniame buferyje (pH=7,4) 45 °C, 0,5 h. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tyrimams. Į 2 ml ekstraktą įpilama 1,2 ml 40 mM vandenilio peroksido tirpalo, paruošto fosfatiniame buferyje (pH=7,4). Mišinys laikomas 30 min. Suardymas nustatomas 230 nm bangos ilgyje. Palyginimui naudojamas vandenilio peroksido buferyje tirpalas, kaip nulinkas – fosfato buferis.

$$\%_{slopinimas} = \frac{A_B - A_A}{A_B} * 100 \quad (20)$$

A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

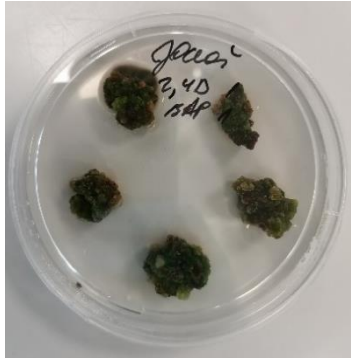
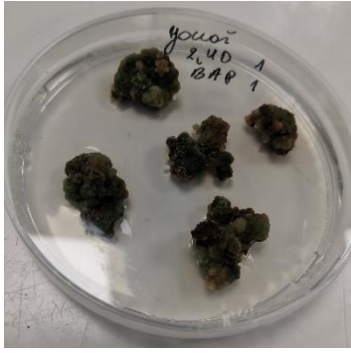
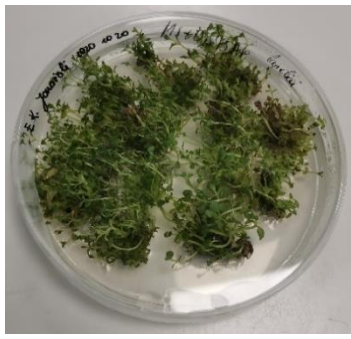
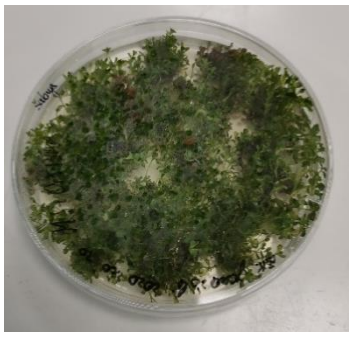
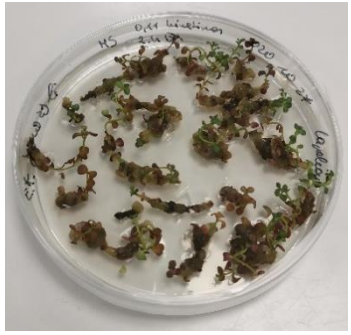

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

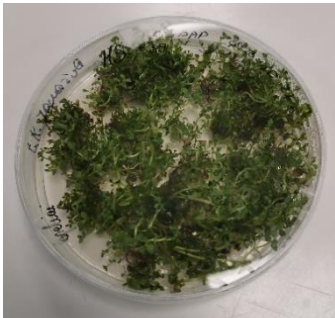



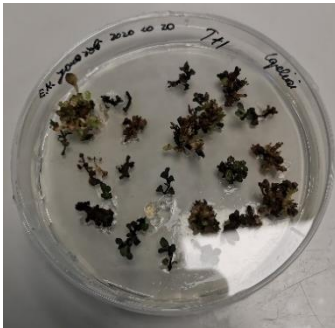

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Jonažolės kaliaus kultūrų *in vitro* susidarymo tyrimai

Sudugusios jonažolės *in vitro* buvo išskaidytos į atskiras augalo dalis – lapelius ir šakneles, iš kurių atitinkamoje terpėje buvo formuojamos kaliaus kultūros.

3.1 lentelė. Kaliaus kultūros, išaugintintos iš tam tikros augalo dalies bei tam tikroje terpėje

| Terpė | Augalo dalis | |
|--|---|---|
| | Lapeliai | Šaknys |
| MS+ 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) |  |  |
| MS+BAP (0,5 mg/l) |  |  |
| MS+ 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinas (0,11 mg/l) |  |  |

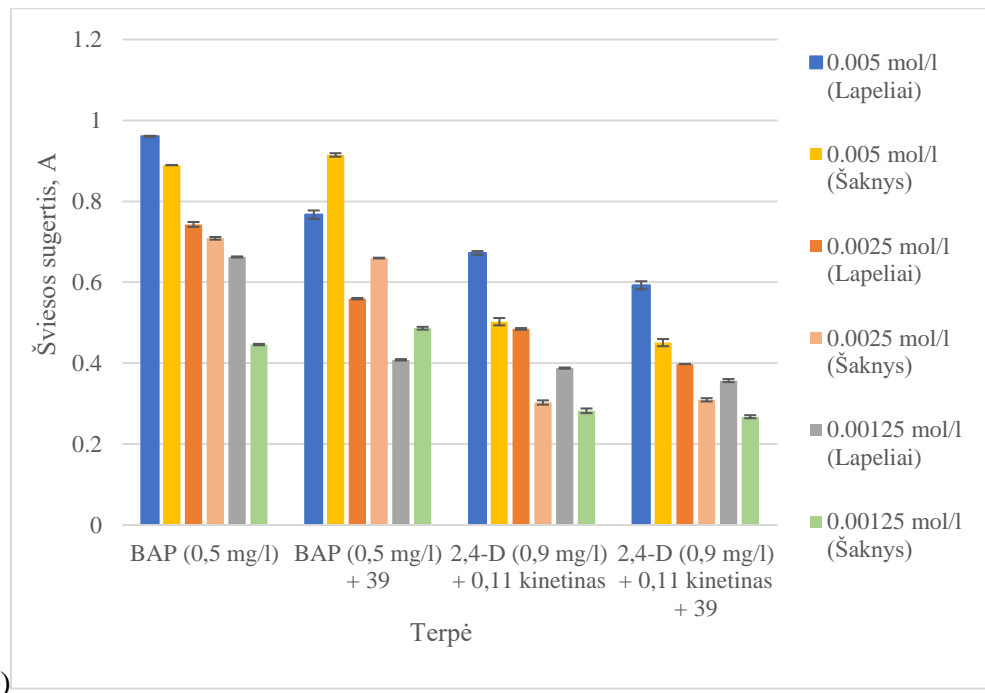
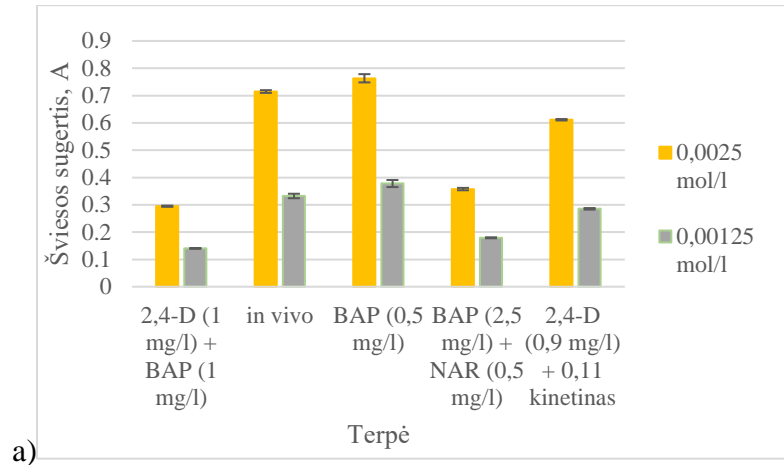
| Terpė | Augalo dalis | |
|---|--|--|
| | Lapeliai | Šaknys |
| MS+BAP (0,5 mg/l) + 39 junginys |  |  |
| MS + 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinas (0,11 mg/l) + 39 junginys |  |  |
| MS + T+1 |  |  |

6-benzilaminopurinas (BAP) skatina ūglių augimą, 6-furfurilaminopurinas (kinetinas) ir 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D) daugiau formuoja kaliaus kultūras. Pastebėta, jog mėginiuose su kinetiniu, kaliaus kultūros pasižymi rausva spalva – yra antocianinų. MS + T+1 terpė yra netinkama.

3.2. Jonažolės antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Jonažolių antioksidacinis aktyvumas buvo vertinamas, naudojant skirtingas jonažolių ekstraktų koncentracijas, auginimo terpes bei kaliaus kultūras, augintas iš skirtingų augalo dalių.

3.2.1. Jonažolės redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas



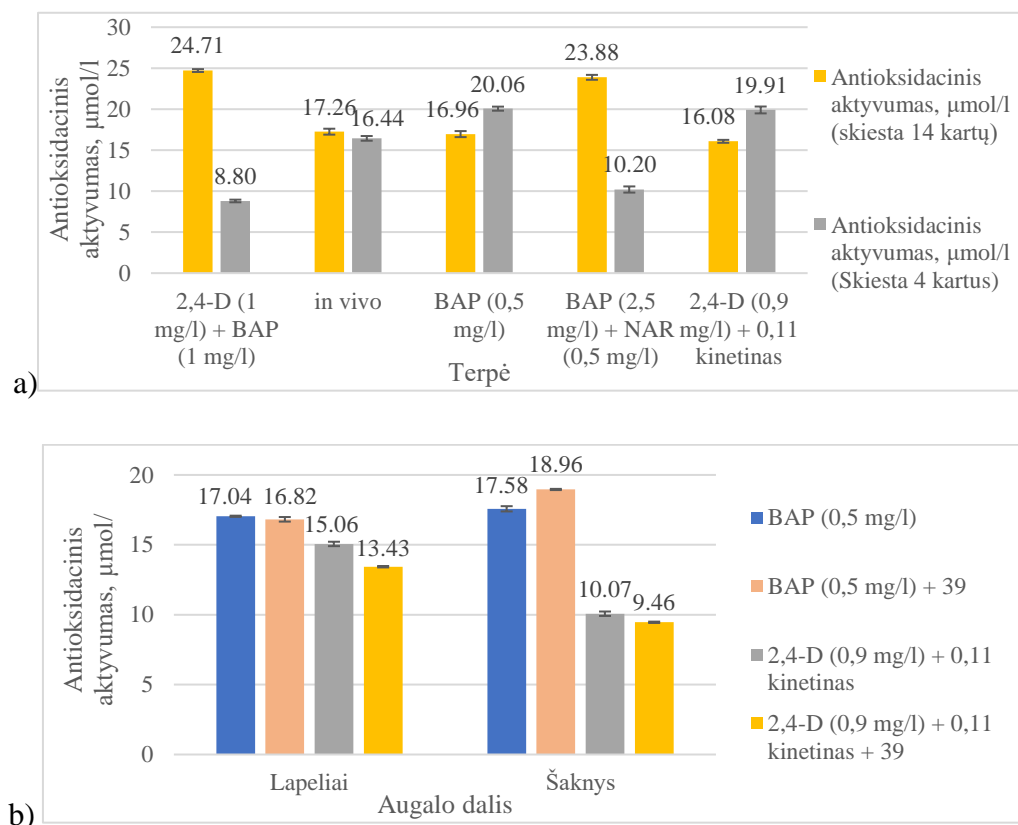
3.1. pav. a) Šviesos sugerties priklausomybė nuo skirtingų jonažolės koncentracijų bei auginimo terpės. b) Šviesos sugerties priklausomybė nuo skirtingų jonažolės koncentracijų, auginimo terpės bei augalo dalies, iš kurios buvo išaugintos kaliaus kultūros

Tyrimų rezultatai parodė (3.1 pav.), kad didžiausia antioksidantų koncentracija ir geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo jonažolių, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), o mažiausiai redukcinių savybių turėjo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l), ekstraktai. Lyginant koncentracijas – tendencijos išliko tokios pat (3.1 pav. a).

Geriausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo jonažolių, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), ekstraktai. 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetino (0,11 mg/l) terpėje augintos jonažolės pasižymėjo silpnesnėmis redukcinėmis savybėmis. 39 junginys turėjo teigiamos įtakos BAP (0,5 mg/l) kaliaus kultūroms, išaugintoms iš šaknų, tačiau kaliaus kultūroms, augintoms terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), įtakos neturėjo. Daugiausiai antioksidantų buvo BAP (0,5 mg/l) terpės kaliaus kultūrose, augintose

iš lapelių, ekstraktuose. Taip pat BAP (0,5 mg/l) + 39 – iš šaknelių, 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetino (0,11 mg/l) ir 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetino (0,11 mg/l) + 39 terpėse – kaliaus kultūrose, augintose iš lapelių, ekstraktuose. Lyginant koncentracijas – tendencijos išliko tokios pat (3.1 pav. b).

3.2.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ

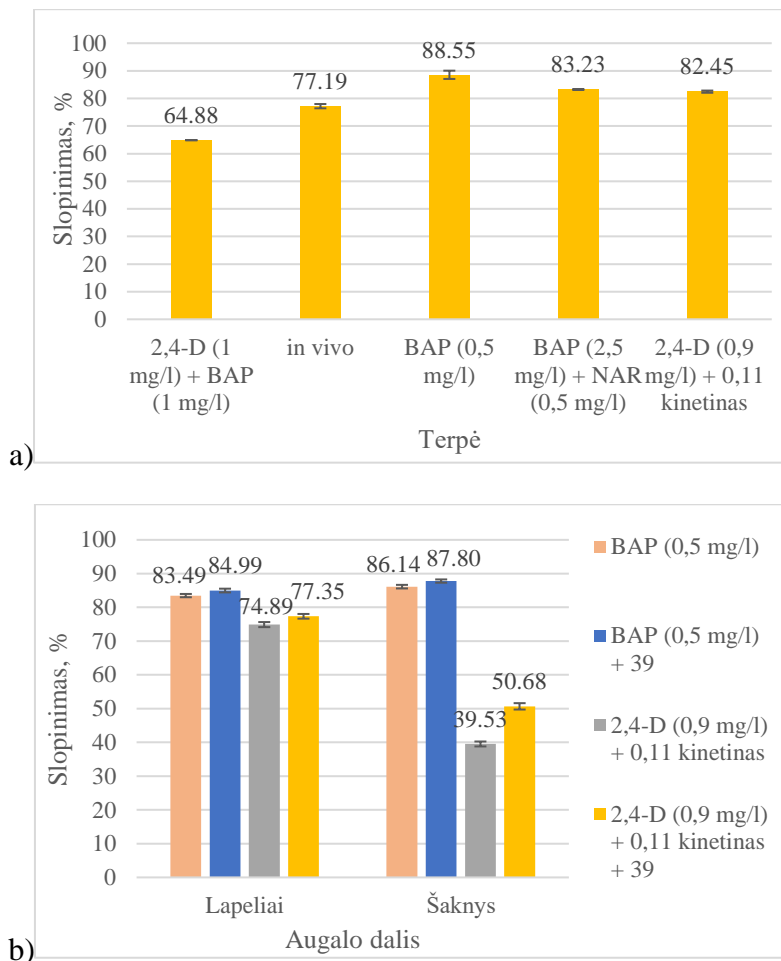


3.2. pav. a) Antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo jonažolės auginimo terpės bei nuo ekstraktų skiedimo laipsnio; **b)** Antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo jonažolės auginimo terpės bei augalo dalies, iš kurios buvo išaugintos kaliaus kultūros

Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu 4 kartus praskiestuose mėginiuose pasižymėjo jonažolių, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l) ir 2,4-D (1 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), mažiausiu – su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l), ekstraktai (3.2 pav. a).

Iš rezultatų matyti (3.2 pav. b), kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo jonažolės kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), mažesnis – terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l) ekstraktuose. 39 junginys turėjo įtakos BAP (0,5 mg/l) terpės kaliaus kultūroms, augintoms iš šaknų, tačiau kaliaus kultūroms, augintoms terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l) – įtakos neturi. Daugiausia antioksidantų kaupė kaliaus kultūrų, augintų BAP (0,5 mg/l) terpėje iš šaknelių, o 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetino (0,11 mg/l) – iš lapelių, ekstraktai.

3.2.3. Jonažolės ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas, naudojant DPPH metodą

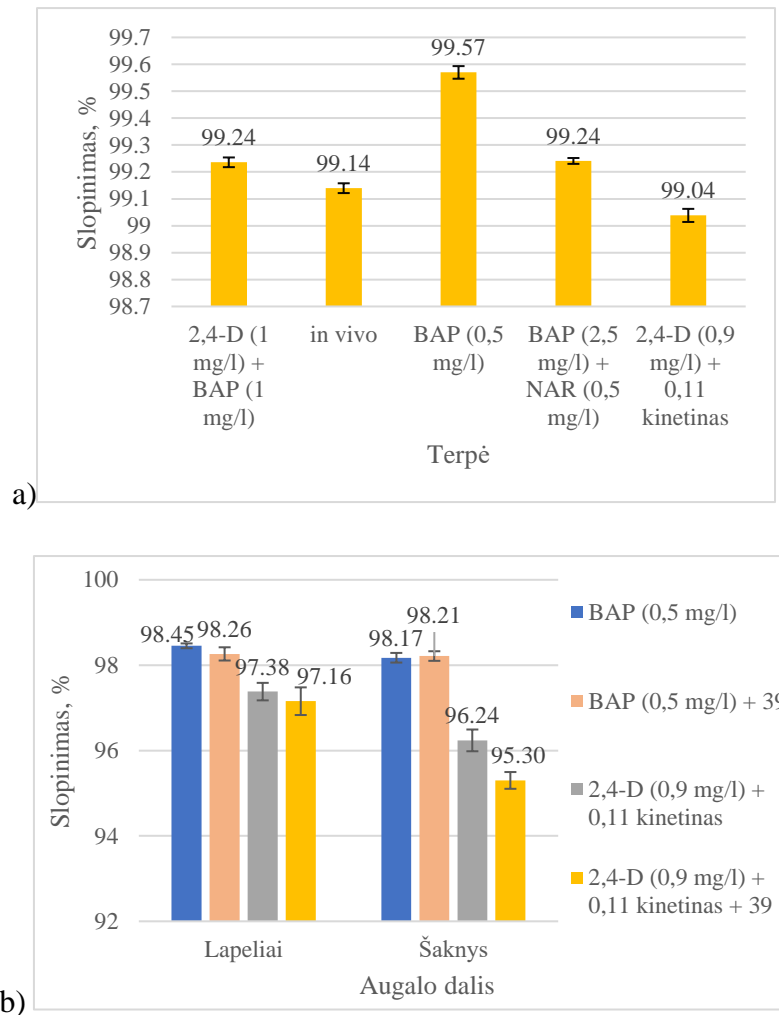


3.3. pav. a) Stabilus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizacijos fenoliniais junginiais priklausomybė nuo skirtingų jonažolės auginimo terpių; b) DPPH radikalo slopinimo priklausomybė nuo terpės ir augalo dalies, iš kurios buvo augintos kaliaus kultūros

Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), ekstraktas – procentinis DPPH slopinimas 88,55%. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas kaliaus kultūrose, augintose terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l), ekstrakto – 64,88 % (3.3. pav. a).

Iš šaknų augintos jonažolės kaliaus kultūros, augintos terpėje su BAP (0,5 mg/l), ekstraktai skatino didesnę DPPH radikalo slopinimą, o su 2,4-D (1 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l) – iš lapelių. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), ekstraktai. Kaliaus kultūros, augintos terpėse, papildytose 39 junginiu, pasižymėjo šiek tiek didesniu slopinimu nei terpėse be jo (3.3. pav. b).

3.2.4. Jonažolės antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu



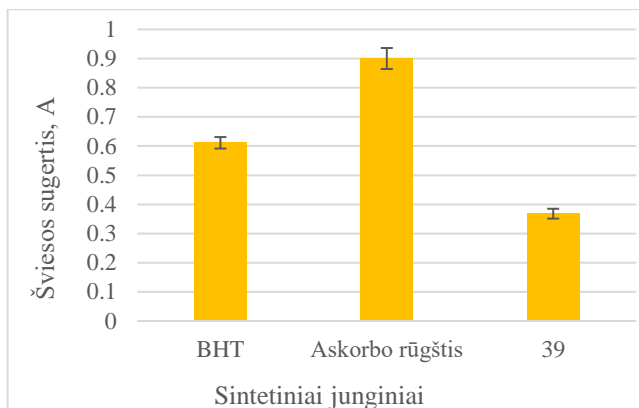
3.4. pav. a) Radikalo anijono slopinimo priklausomybė nuo terpės. b) Radikalo anijono slopinimo priklausomybė nuo terpės bei augalo dalies, iš kurios išaugintos kaliaus kultūros

Nustatyta (3.4 pav. a), kad didžiausiu radikalo anijono slopinimu pasižymėjo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), o mažiausiu – terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l) ekstraktai.

Didžiausiu radikalo anijono slopinimu pasižymėjo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), mažiausiu – terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), ekstraktai. 39 junginys turėjo nedidelę, bet teigiamą įtaką BAP (0,5 mg/l) terpėje augintoms kaliaus kultūroms iš šaknelių. Daugiausia radikalo anijono slopino kaliaus kultūrų, augintų iš lapelių terpėse su BAP (0,5 mg/l) ir 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), ekstraktai (3.4 pav. b).

3.3. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

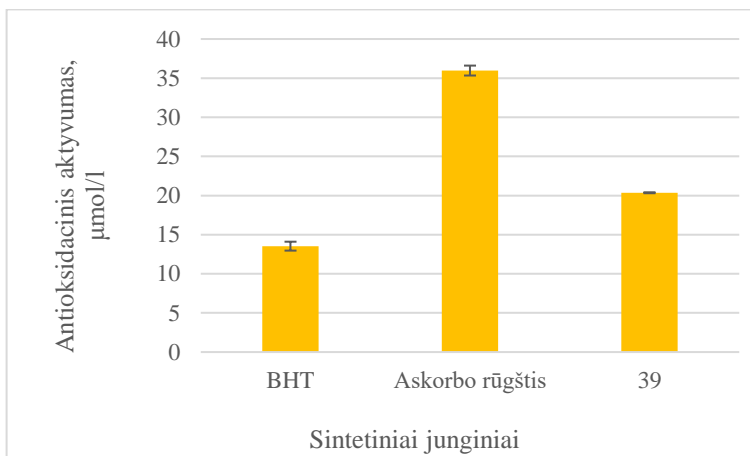
3.3.1. Sintetinių junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas



3.5. pav. Šviesos sugerties priklausomybė nuo skirtingų sintetinių junginių

Didžiausia šviesos sugertimi ir geriausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo askorbo rūgštis. BHT ir 39 junginio redukcinės savybės mažesnės.

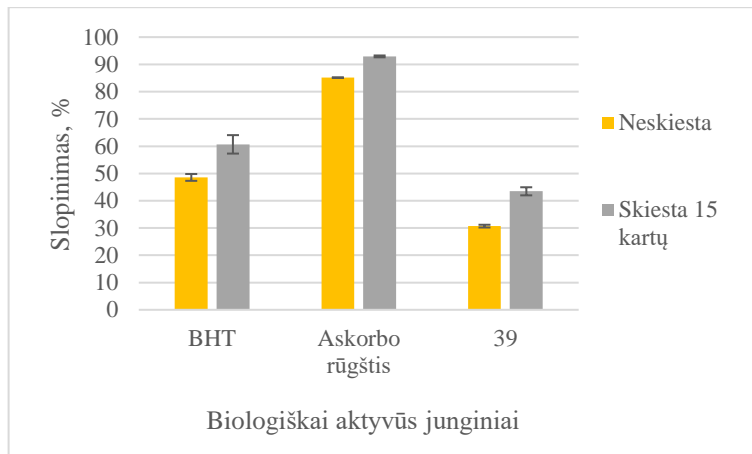
3.3.2. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ



3.6. pav. Antioksidacinio aktyvumo priklausomybė nuo skirtingų sintetinių junginių

Didžiausia šviesos sugertimi ir geriausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo askorbo rūgštis. BHT ir 39 junginio redukcinės savybės mažesnės.

3.3.3. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

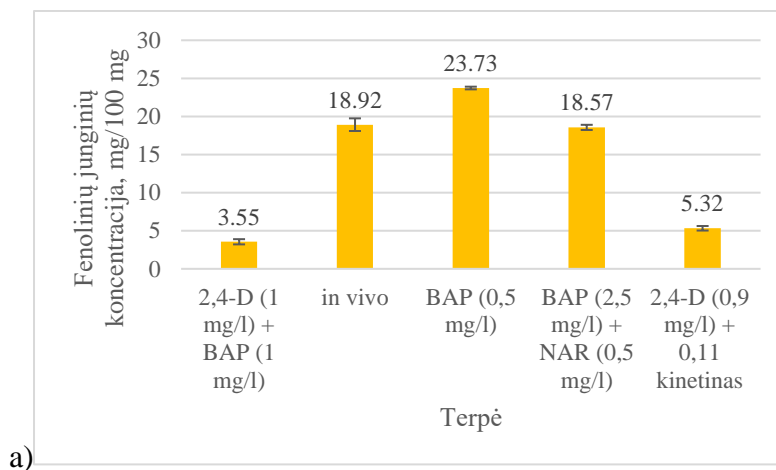


3.7. pav. Stabilus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo slopinimo priklausomybė nuo biologiškai aktyvių junginių ir skirtingų jų koncentracijų

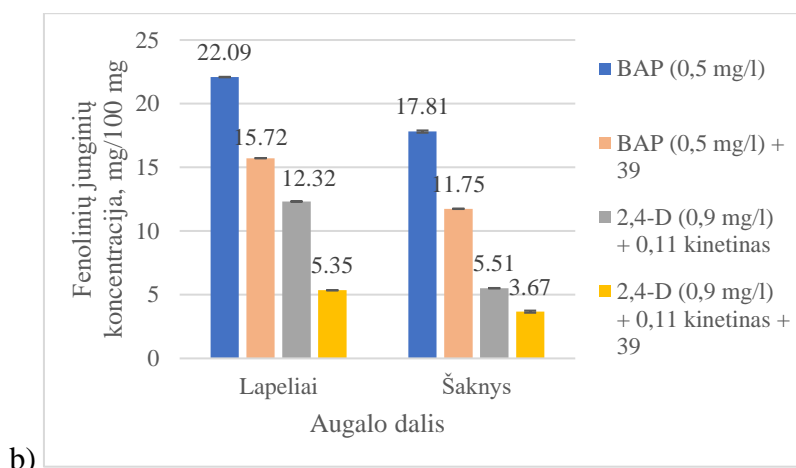
Didžiausiu DPPH radikalo slopinimu pasižymi askorbo rūgštis. Lyginant koncentracijas, matyti, jog praskiesti tirpalai geriau slopino DPPH radikalus.

3.4. Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

Bendra fenolinių junginių koncentracija buvo vertinama, naudojant skirtingas jonažolių auginimo terpes bei kaliaus kultūras, augintas iš skirtingų augalo dalių.



a)

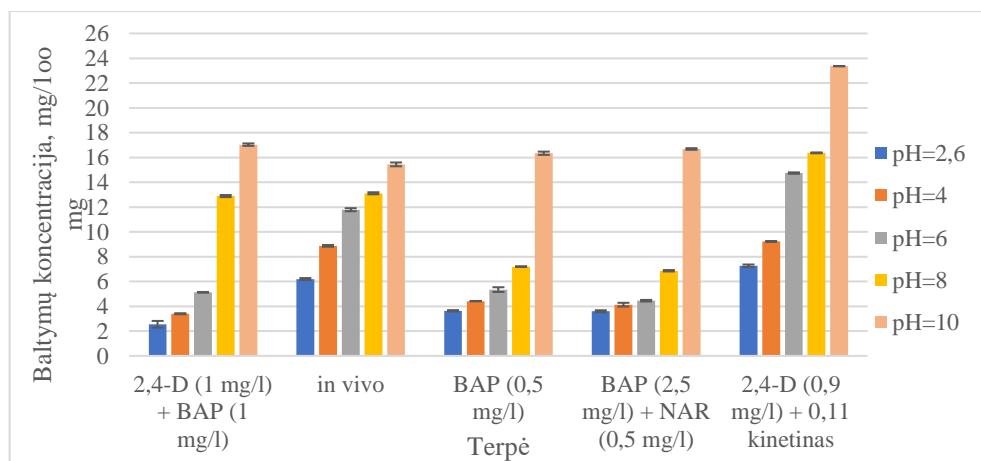


3.8. pav. a) Fenolinių junginių koncentracijos priklausomybė nuo jonažolės auginimo terpės. b) Fenolinių junginių koncentracijos priklausomybė nuo jonažolės auginimo terpės bei augalo dalies, iš kurios buvo augintos kaliaus kultūros

Didžiausia bendra fenolinių junginių koncentracija yra jonažolėse, augintose terpėje su BAP (0,5 mg/l). Mažiausia fenolinių junginių koncentracija yra kaliaus kultūrose, augintose terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) (3.8. pav. a).

Didžiausia bendra fenolinių junginių koncentracija buvo jonažolių, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), ekstrakto. 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetino (0,11 mg/l) terpėje augintos jonažolės kaliaus kultūros pasižymėjo mažesne fenolinių junginių koncentracija. 39 junginys įtakos neturėjo. Daugiausia fenolinių junginių kaupė kaliaus kultūrų, augintų iš lapelių BAP (0,5 mg/l) ir 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetino (0,11 mg/l) terpėse, ekstraktai (3.8. pav. b).

3.5. Baltymų koncentracijos įvertinimas

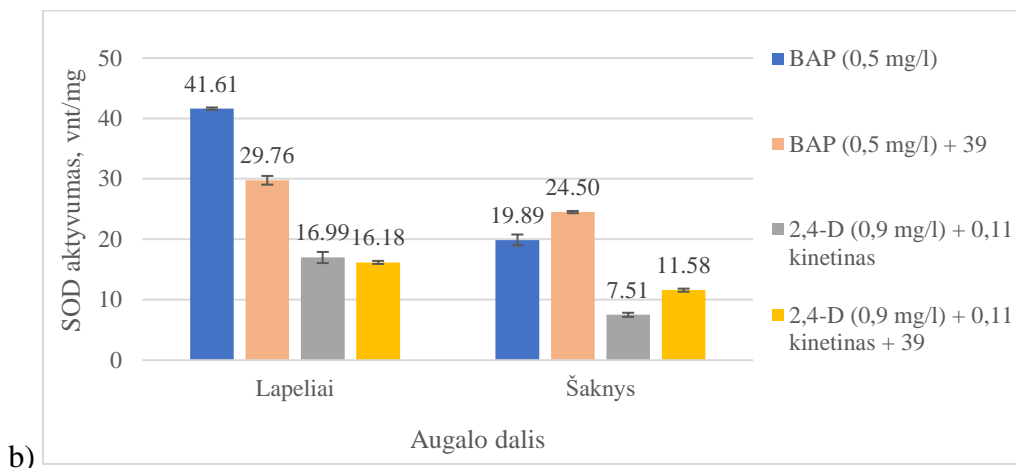
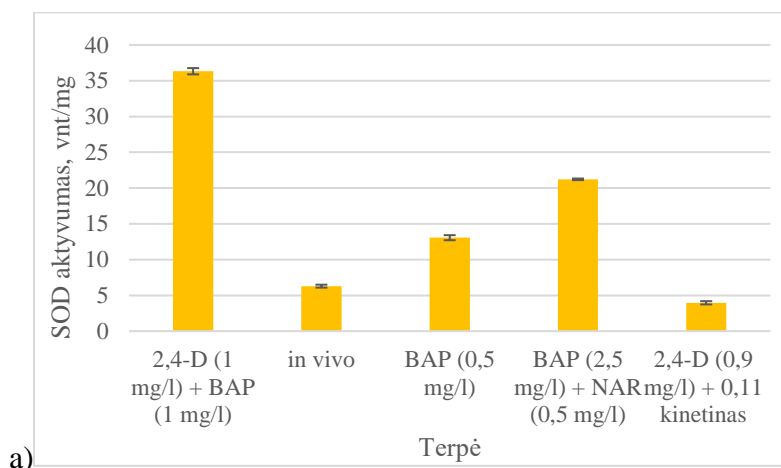


3.9. pav. Baltymų koncentracijos priklausomybė nuo terpės ir pH

Kuo didesnis pH, tuo daugiau išskiriama baltymų. Didžiausia baltymų koncentracija buvo jonažolės kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), ekstrakto.

3.6. SOD aktyvumo įvertinimas

Fermento superoksido dismutazės aktyvumas buvo vertinamas, naudojant skirtingas jonažolių auginimo terpes bei kaliaus kultūras, augintas iš skirtingų augalo dalių.



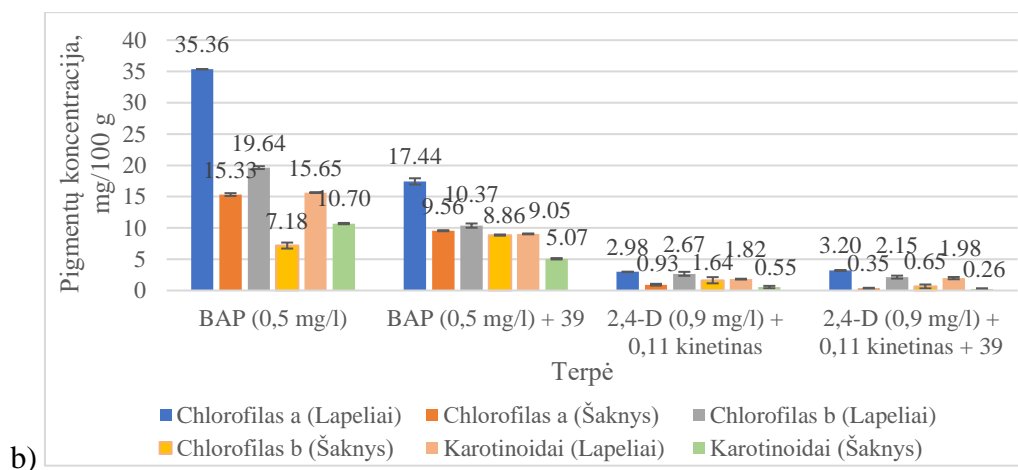
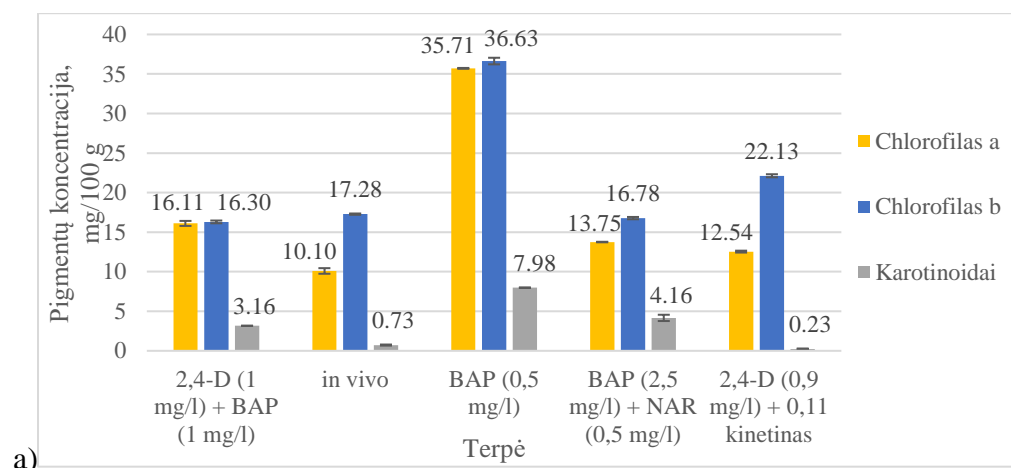
3.10. pav. a) Seperoksido dismutazės aktyvo priklausomybė nuo terpės. b) Seperoksido dismutazės aktyvumo priklausomybė nuo terpės bei augalo dalies, iš kurios buvo išaugintos kaliaus kultūros

Didžiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 2,4-D (1 mg/l) +BAP (1 mg/l), o mažiausiu – terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), ekstraktai (3.10. pav. a).

Didžiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), mažiausiu – terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), ekstraktai. 39 junginys turėjo įtakos jonažolės kaliaus kultūroms, augintoms iš šaknų terpėje su BAP (0,5 mg/l) ir 2,4-D (1 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l). Didžiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo kaliaus kultūrų, augintų iš lapelių, ekstraktai (3.10. pav. b).

3.7. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracija buvo vertinama, naudojant skirtingas jonažolių ekstraktų koncentracijas, auginimo terpes bei kaliaus kultūras, augintas iš skirtingų augalo dalių.

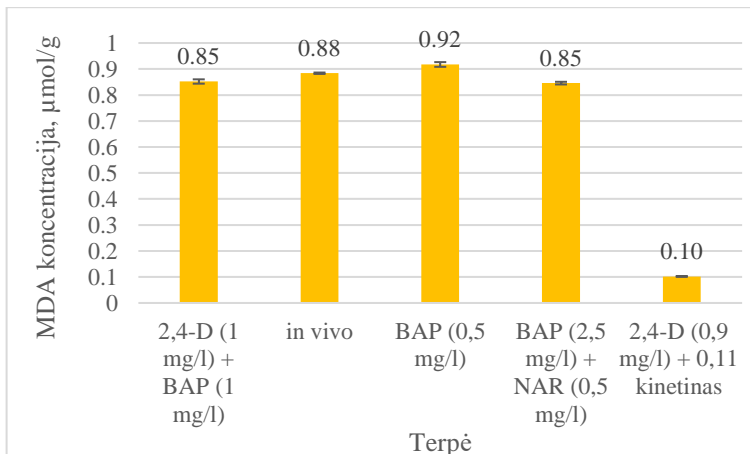


3.11. pav. Pigmentų koncentracijos priklausomybė nuo terpės

Didžiausia pigmentų koncentracija pasižymėjo kaliaus kultūros, augintos terpėje su BAP (0,5 mg/l) – chlorofilo *a* yra 35,71 mg/100g, chlorofilo *b* – 36,63 mg/100g, karotinoidų – 7,98 mg/100g (3.11. pav. a).

Didžiausia pigmentų koncentracija pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūros, augintos terpėje su BAP (0,5 mg/l), mažiausia – terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l). Daugiausia jonažolė kaupia chlorofilų, mažiausiai – karotinoidų. Didžiausios pigmentų koncentracijos aptiktos kaliaus kultūrų, augintų iš lapelių, ekstraktuose. 39 junginys įtakos neturėjo (3.11. pav. b).

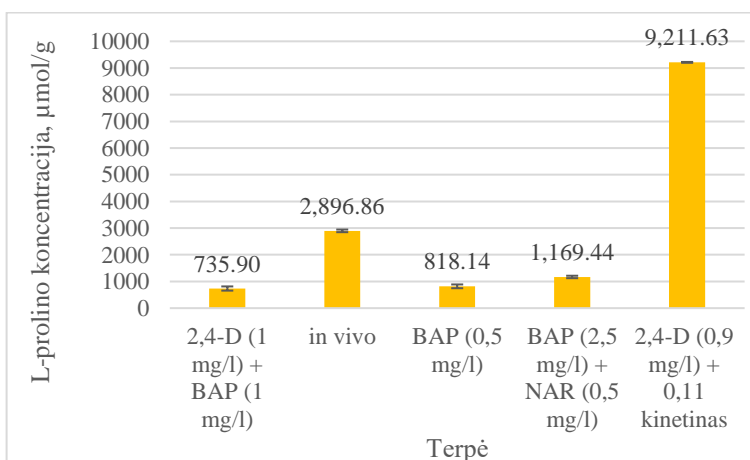
3.8. MDA koncentracijos įvertinimas



3.12. pav. MDA koncentracijos priklausomybė nuo terpės

Didžiausia malondialdehido koncentracija buvo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l) – 0,92 µmol/g, o mažiausia – terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l) – 0,10 µmol/g, ekstraktuose.

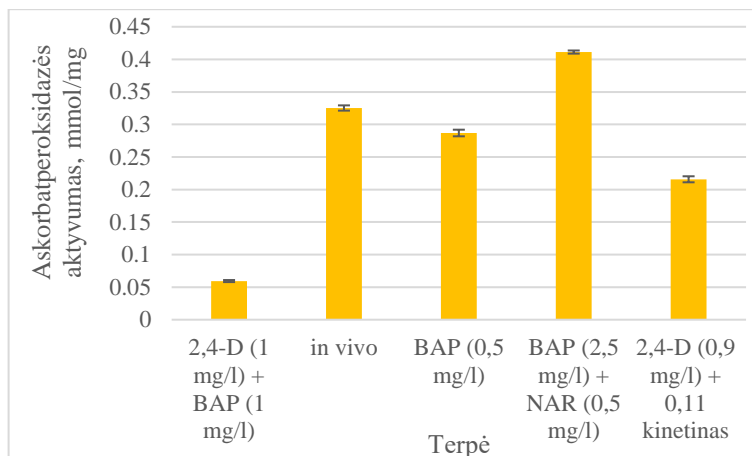
3.9. L-prolino koncentracijos įvertinimas



3.13. pav. L-prolino koncentracijos priklausomybė nuo terpės

Didžiausia L-prolino koncentracija buvo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), o mažiausia – terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l), ekstraktuose.

3.10. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas

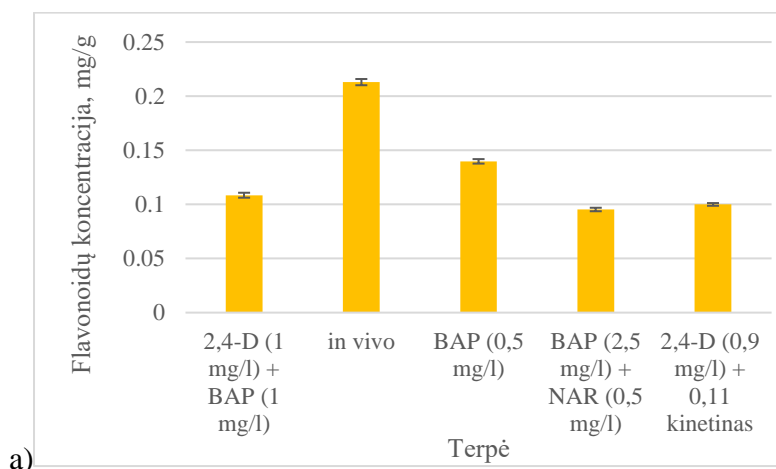


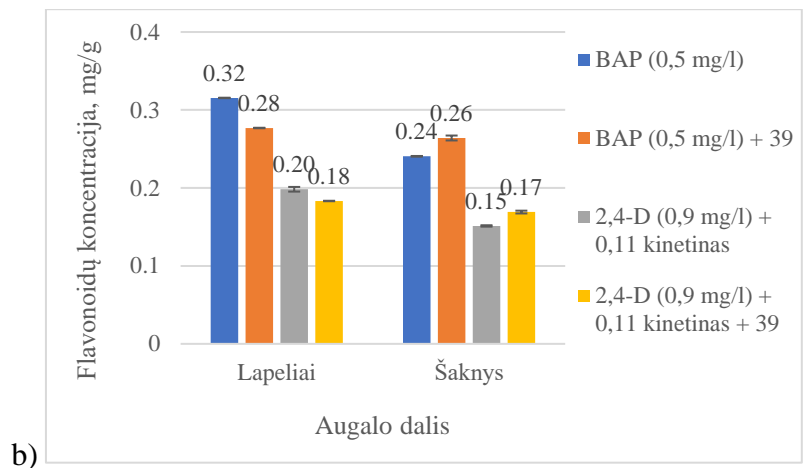
3.14. pav. Askorbatperoksidazės aktyvumo priklausomybė nuo terpės

Jonažolės kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l), ekstraktų askorbatperoksidazės aktyvumas buvo didžiausias. Mažiausias pastebėtas aktyvumas kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 2,4-D (1 mg/l) +BAP (1 mg/l), ekstrakto.

3.11. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Flavonoidų koncentracija buvo vertinama, naudojant skirtingas jonažolių auginimo terpes bei kaliaus kultūras, augintas iš skirtingų augalo dalių.





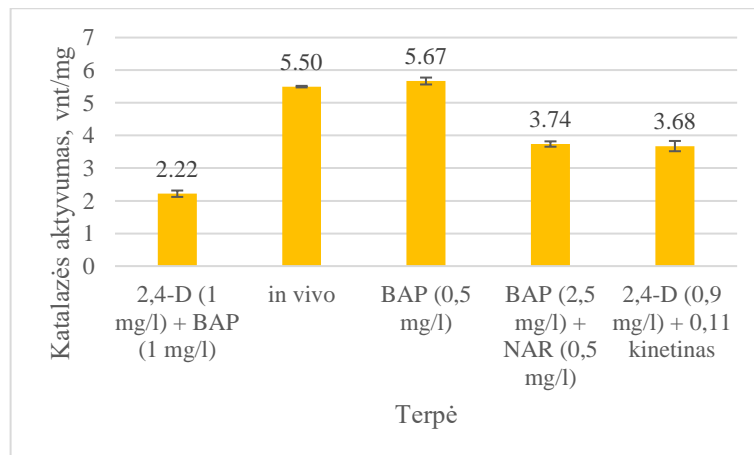
3.15. pav. a) Flavonoidų koncentracijos priklausomybė nuo terpės.

b) Flavonoidų koncentracijos priklausomybė nuo terpės bei nuo augalo dalies, iš kurios išaugintos kaliaus kultūros

Didžiausia flavonoidų koncentracija buvo *in vivo* augintų jonažolių ekstraktuose, o mažiausia – kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l) (a) ekstraktuose.

Didžiausia flavonoidų koncentracija buvo kaliaus kultūrose, augintose terpėje su BAP (0,5 mg/l), mažiausia – terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l). 39 junginys turi nedidelę, tačiau teigiamą įtaką kaliaus kultūroms, augintoms iš šaknų terpėje su BAP (0,5 mg/l) ir 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l) (b).

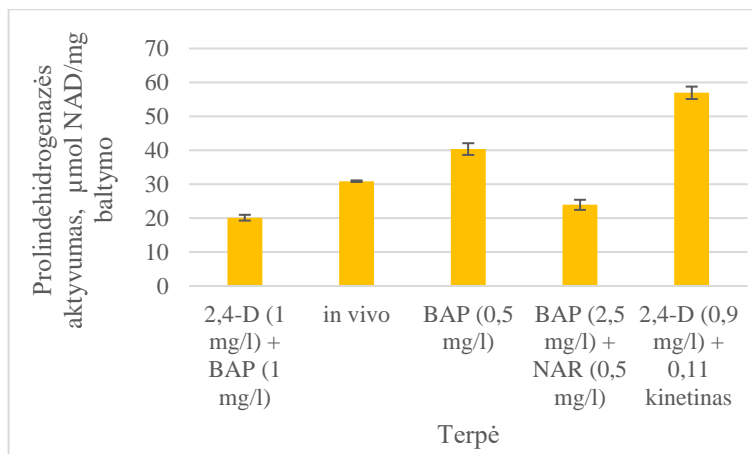
3.12. Katalazės aktyvumo įvertinimas



3.16. pav. Katalazės aktyvumo priklausomybė nuo terpės

Didžiausias katalazės aktyvumas buvo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), o mažiausias – terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l), ekstraktuose.

3.13. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas

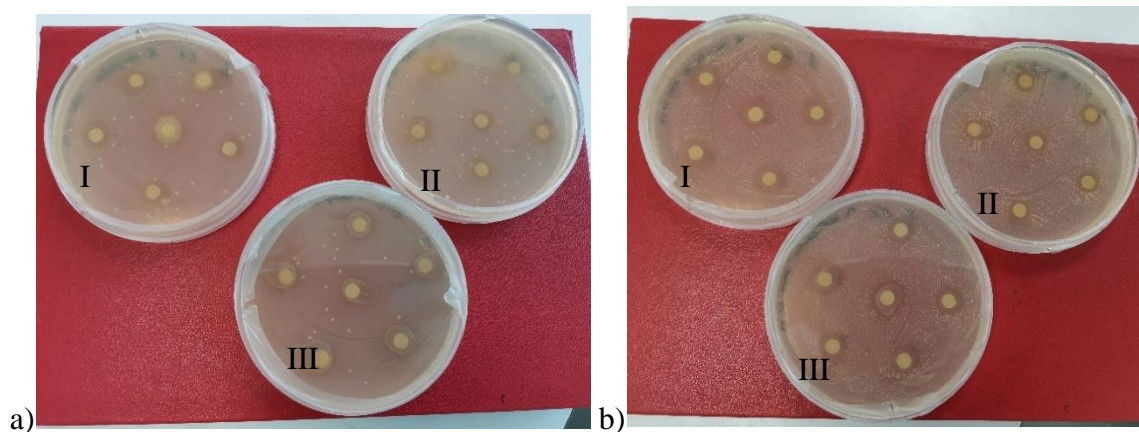


3.17. pav. Prolindehidrogenazės aktyvumo priklausomybė nuo terpės

Didžiausias prolindehidrogenazės aktyvumas buvo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), o mažiausias – terpėje su 2,4-D (1 mg/l) +BAP (1 mg/l), ekstraktuose.

3.14. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaro difuziniu metodu

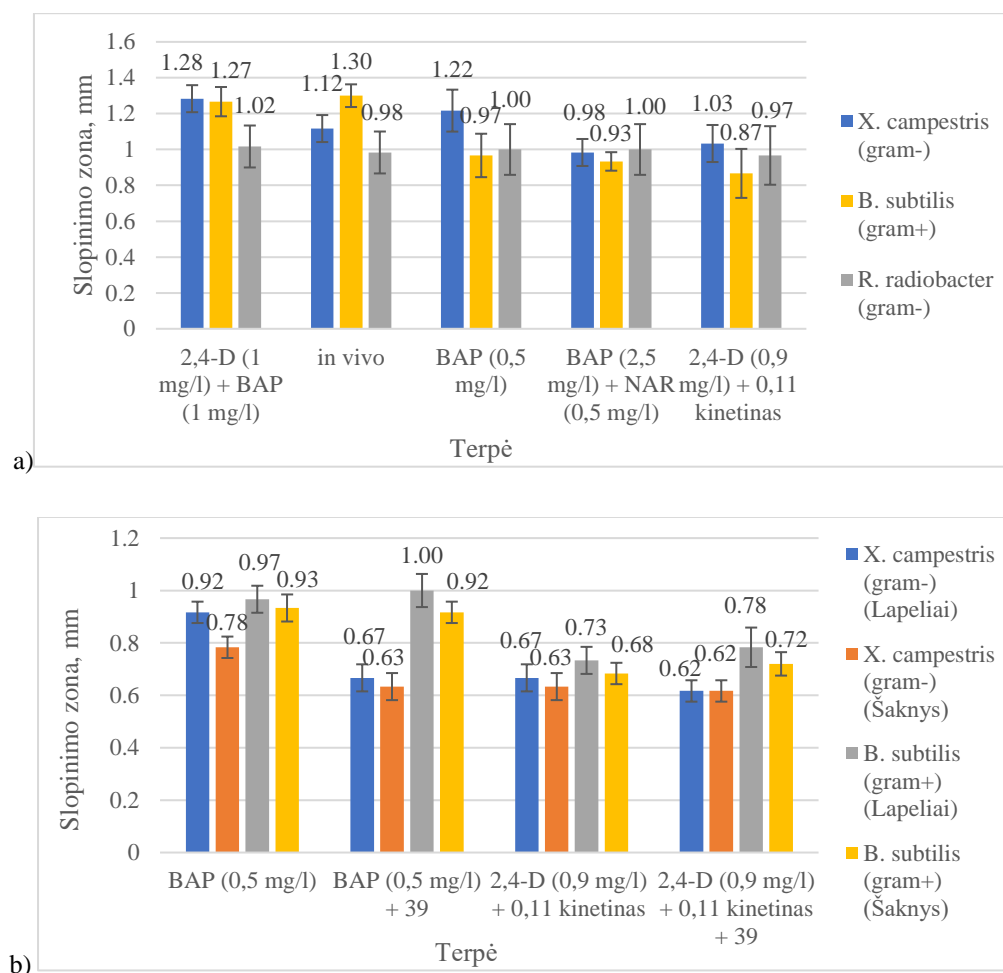
Antibakterinis aktyvumas buvo vertinamas, naudojant skirtingas jonažolių auginimo terpes bei kaliaus kultūras, augintas iš skirtingų augalo dalių.



3.18. pav. Bakterijų augimo priklausomybė nuo ekstraktų, su skirtingomis terpėmis, antibakterinio poveikio.

a) *X. campestris*; b) *B. subtilis*

I- terpė su 2,4-D (1 mg/l) +BAP (1 mg/l), II- *in vivo*, III- terpė su BAP (0,5 mg/l)



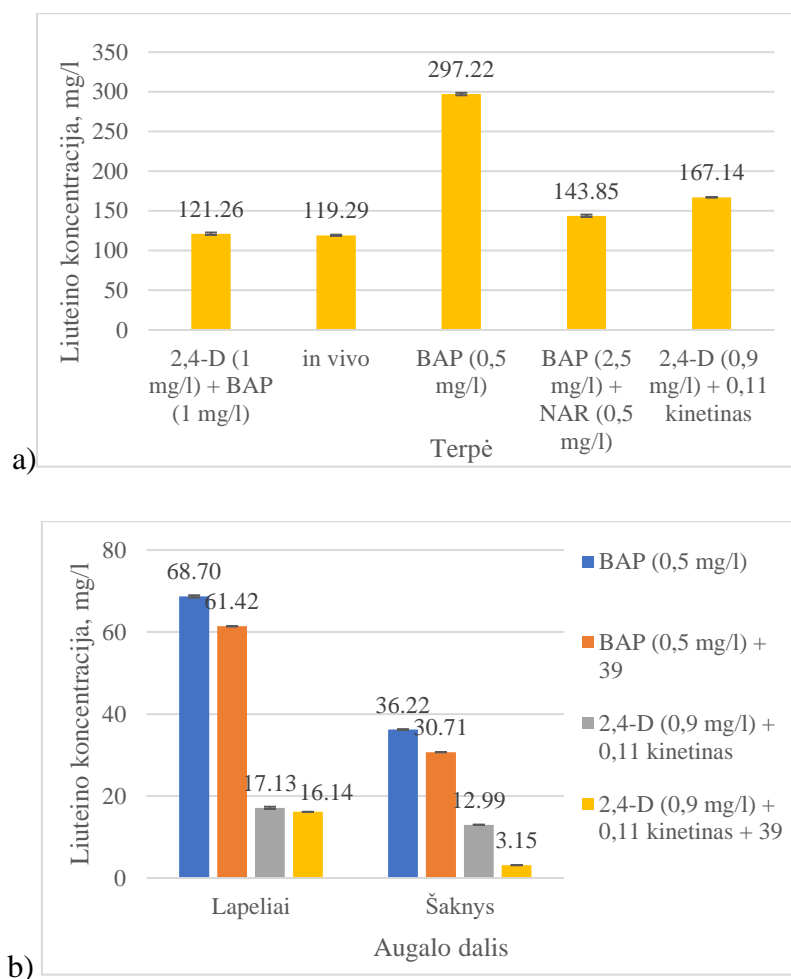
3.19. pav. a) Antibakterinio aktyvumo priklausomybė nuo terpės. b) Antibakterinio aktyvumo priklausomybė nuo terpės bei augalo dalies, iš kurios išaugintos kaliaus kultūros

Didžiausiu antibakteriniu poveikiu prieš gramteigiamas bakterijas pažymėjo *in vivo* ir jonažolės kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l), ekstraktai, o prieš gramneigiamas kaliaus kultūrų, augintų 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) terpėje bei terpėje su BAP (0,5 mg/l), ekstraktai. Didžiausiu antibakteriniu aktyvumu tiek prieš gramteigiamas, tiek prieš gramneigiamas bakterijas pasižymėjo kaliaus kultūrų, augintų 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) terpėje, ekstraktai (3.19. pav. a)

Didžiausiu antibakteriniu poveikiu prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas pažymėjo kaliaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), ekstraktai. 39 junginys įtakos neturėjo. Bakterijas labiausiai slopino kaliaus kultūrų, išaugintų iš lapelių, ekstraktai (3.19. pav. b).

3.15. Liuteino koncentracijos įvertinimas

Liuteino koncentracija buvo vertinama, naudojant skirtingas jonažolių auginimo terpes bei kaliaus kultūras, augintas iš skirtingų augalo dalių.

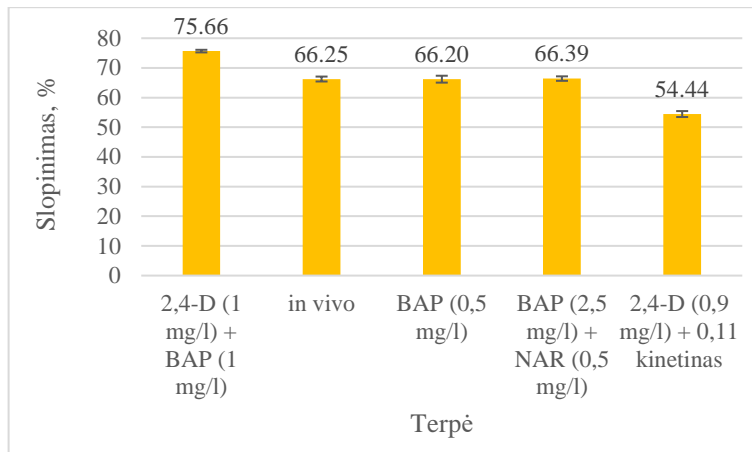


3.20. pav. a) Liuteino koncentracijos priklausomybė nuo terpės. b) Liuteino koncentracijos priklausomybė nuo terpės bei augalo dalies, iš kurios išaugintos kalviaus kultūros

Didžiausia liuteino koncentracija pasižymėjo kalviaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), o mažiausiu – *in vivo* ir terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l), ekstraktai (3.20. pav. a)

Didžiausia liuteino koncentracija pasižymėjo jonažolės kalviaus kultūrų, augintų terpėje su BAP (0,5 mg/l), o mažiausia – terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), ekstraktai. Daugiausia liuteino buvo kalviaus kultūrų, išaugintų iš lapelių, ekstrakto. 39 junginys įtakos neturėjo (3.20. pav. b).

3.16. Vandenilio peroksido suardymo įvertinimas



3.21. pav. Vandenilio peroksido suardymo priklausomybė nuo terpės

Didžiausiu vandenilio peroksido suardymu pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūrų, augintų terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l), o mažiausiu – terpėje su 2,4-D (0,9 mg/l) + kinetinu (0,11 mg/l), ekstraktai.

4. Rekomendacijų dalis

Hiperforino ekstrakcijos principinėje aparatūrinėje schemoje (4.1. pav.) pavaizduotas hiperforino išgavimas iš paprastosios jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) *in vitro* užaugintų kaliaus kultūrų, naudojant superkritinį CO₂.

Pirmiausia pradedamas žaliavų tiekimas į bioreaktorių (B-1). Iš mitybinės terpės rezervuaro (MTR-1), terpė pumpuojama į autoklavą (A-1), kur yra sterilizuojama 121°C temperatūroje, 20 min, 6 atm slėgyje. Sterili terpė toliau pumpuojama išcentrinio siurbliu (S-2) į bioreaktorių. Taip pat ruošiamas kaliaus kultūros ir mitybinės terpės (MT-1) mišinys (MŠ-1). Mitybinė terpė kaliaus kultūrai yra tiekama išcentrinio siurbliu (S-3) į autoklavą (A-2) ir iš ten pumpuojama į maišyklę (M-1), kur yra sumaišoma su juostinio transporterio (JT-1) tiekama kaliaus kultūra. Gautas kaliaus kultūros ir mitybinės terpės mišinys išcentrinio siurbliu (S-5) pumpuojamas į bioreaktorių. Taip pat, į bioreaktorių tiekiamas oras, kuris yra išvalytas, naudojant oro filtrą (F-1) ir suslėgtas - naudojant oro kompresorių (K-1).

Bioreaktoriuje užauginta biomasė išcentrinio siurbliu (S-8) tiekama į liofilizatorių, kur yra išdžiovinama. Išdžiovinta biomasė nukreipiama į smulkintuvą (SM-1), iš ten į susmulkintos biomasės laikymo rezervuarą (LR-1). Atidarius vožtuvą (V-11), patenka į ekstraktorių (E-1).

Į ekstraktorių, taip pat, tiekiamas ekstrakcijos tirpiklis – metanolis, bei CO₂. Anglies dioksidas laikymo rezervuare (ADR-1) yra skystos agregatinės būsenos. Atidarius vožtuvą (V-7), skystas CO₂ patenka į aušintuvą (AŠ-1), kur CO₂ atšaldomas iki -10 °C ir tiekiamas į aukšto suslėgimo siurbli (ASS-1). Tokia žema CO₂ temperatūra neleidžia aukšto suslėgimo siurbliui sukelti kavitacijos. Suslėgtas anglies dioksidas paduodamas į šilumokaitį (Š-1), iš ten – į ekstraktorių. Išmatuojamas ekstrahavimo skysčio – metanolio – srautas bei tankis ir, taip pat, per šilumokaitį tiekiamas į ekstraktorių. Šilumokaitis reguliuoja ekstrakcijos temperatūrą – optimali temperatūra 40 °C, aukštesnė temperatūra padidina ekstrakcijos išeigą, tačiau sumažina hiperforino kiekį. Ekstrakcija gali būti vykdoma 1-5 valandas, 90-150 bar slėgyje. Optimalios hiperforino ekstrakcijos parametrų vertės yra 3 valandos 90 bar slėgyje arba 1,5 valandos 120 bar slėgyje – prie tokių parametrų hiperforino išgaunama 35 % daugiau nei taikant kitas parametrų reikšmes.

Po ekstrakcijos superkritinis CO₂, kuriame yra metanolio ir biomasės, per pirmąjį slėgį mažinantį diafragminį vožtuvą (DV-1) patenka į pirmąjį separatorių (SE-1), kurio konstrukcija primena skysčių cikloną (angl. *fluidcyclone*). Pirmame separatoriuje atskiriami mažai tirpūs junginiai, kuriuos išpumpuoja išcentrinis siurblys (S-9). Šie junginiai pasišalina kaip atliekos.

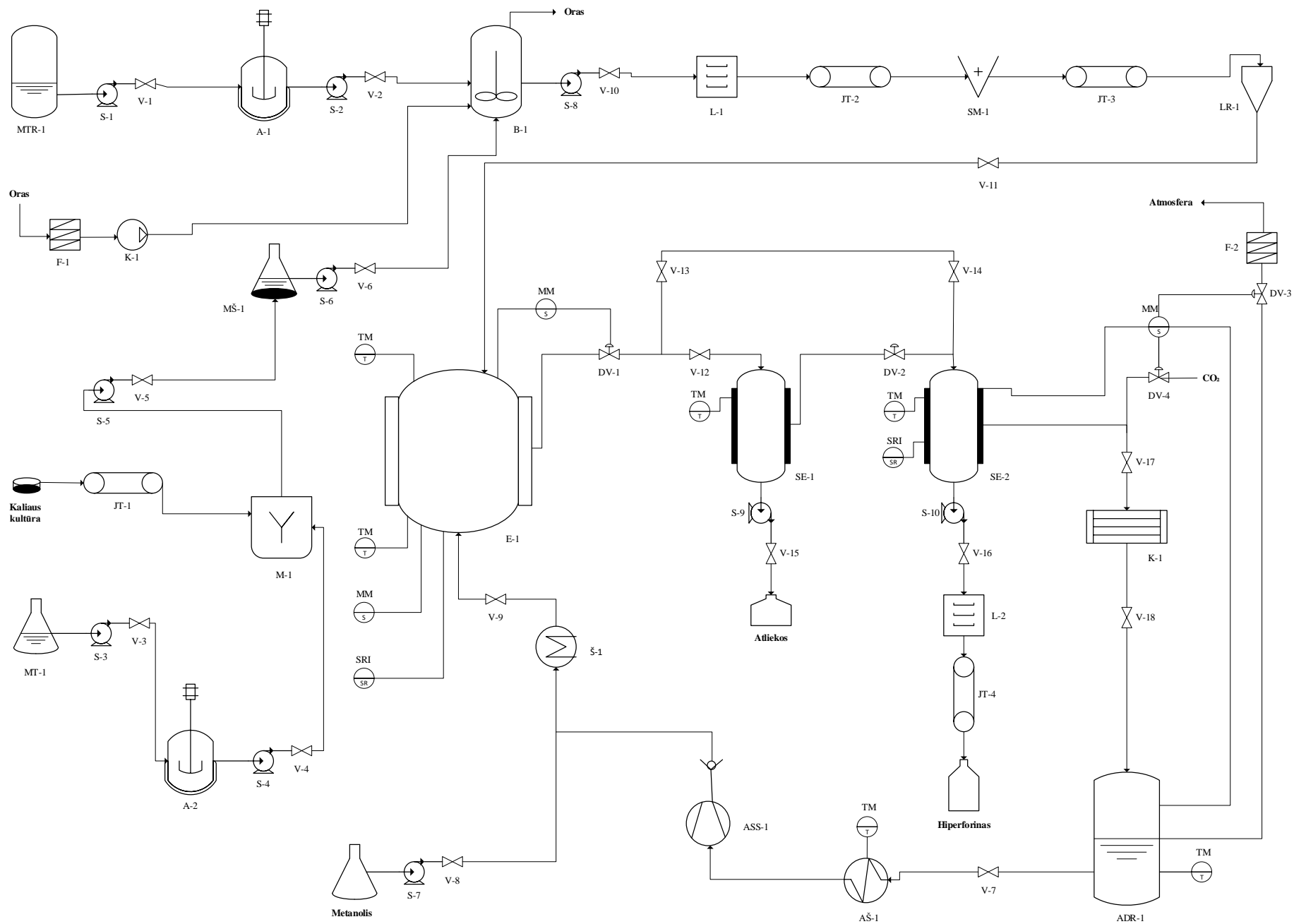
Vėliau superkritinis CO₂ tiekiamas per antrąjį slėgį mažinantį vožtuvą (DV-2) patenka į antrąjį separatorių (SE-2), kuriame palaikoma 8 °C temperatūra ir 40 bar slėgis. Tokiomis sąlygomis skystas anglies dioksidas pradeda garuoti ir atsiskiria hiperforinas. Matuojamas ir reguliuojamas slėgis, srautas bei temperatūra, esant reikalui, atidaromi diafragminiai vožtuvai (DV-3) ir (DV-4).

Atidarius vožtuvą (V-17) CO₂ garai patenka į kondensatorių (K-1), kuriame CO₂ virsta iš dujinės būsenos į skystą. Iš kondensatoriaus skystas CO₂ grąžinamas į skysto anglies dioksido laikymo rezervuarą, kuriame nuolat matuojama temperatūra.

Antrame separatoriuje likęs hiperforino ekstraktas yra nukreipiamas į liofilizatorių. Pradžioje palaikoma -25°C temperatūra, vėliau keliama iki 5°C temperatūros. Po 14 valandų džiovinimo, džiovinama dar 10 valandų, vis keliant temperatūrą iki 20°C . Gaunami liofilizuoti hiperforino milteliai, kurie vėliau gali būti homogenizuojami. Naudojant HPLC gali būti vertinamas hiperforino grynumas. Kaip standartas naudojamas hiperforino ir adhiperforino mišinys [57].

Principinės aparatūrinės schemos prietaisų žymėjimas ir pavadinimai pateikti 6 priede. Principinės aparatūrinės schemos medžiagų žymėjimas ir pavadinimai pateikti 7 priede.

Hiperforino ir adhiperforino cheminė struktūra pateikta 8 priede [57].



4.1. pav. Principinė aparatūrinė hiperforino ekstrakcijos iš paprastosios jonažolės (*H. perforatum* L.) superkritiniu CO₂ schema

Išvados

1. Įvertinus fitohormonų įtaką jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) augimui *in vitro*, nustatyta, kad MS terpė su 6-benzilaminopurinu skatino jonažolės ūglių augimą *in vitro*, o MS terpė su kinetinu ir 2,4-dichlorfenoksirūgštimi intensyviau formavo kaliaus kultūras *in vitro*.
2. Atlikus antioksidantinius tyrimus, gauta, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su BAP (0,5 mg/l), ekstraktas. Taikant DPPH metodą, pastebima 39 junginio (N-(1,3-dioksizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino) propanamido) teigiama įtaka visose terpėse augintoms jonažolės kaliaus kultūroms *in vitro*. Redukciniu ir ABTS metodais nustatyta, jog didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo MS terpėje su BAP (0,5 mg/l) augintose kaliaus kultūrų ekstraktuose iš lapelių, tačiau FRAP ir DPPH metodais – iš šaknelių.
3. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, iširta, kad didžiausiu katalazės ir superoksido dismutazės aktyvumu, fenolinių junginių, pigmentų, tokių kaip liuteino, chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų, koncentracija pasižymėjo MS terpėje su BAP (0,5 mg/l) terpėje augintos jonažolės kaliaus kultūros. N-(1,3-dioksizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido junginys flavonoidų koncentracijai ir SOD aktyvumui turėjo teigiamos įtakos BAP (0,5 mg/l) ir 2,4-D (0,9 mg/l) + 0,11 (mg/l) kinetino terpėse augintoms kaliaus kultūroms iš šaknelių, pigmentų ir fenolinių junginių koncentracijai įtakos neturėjo.
4. Didžiausias prolindehidrogenazės aktyvumas, *L*-prolino bei baltymų koncentracija buvo nustatyta jonažolių kaliaus kultūrų, augintų MS su 2,4-D (0,9 mg/l) su (0,11 mg/l) kinetinu terpėje, ekstrakto. Didžiausiu SOD aktyvumu bei didžiausiu vandenilio peroksido suardymu pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūrų, augintų MS su 2,4-D (1 mg/l) ir BAP (1 mg/l), ekstraktai.
5. Gauta, kad didžiausiu antibakteriniu aktyvumu tiek prieš gramteigiamas, tiek prieš gramneigiamas bakterijas pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su 2,4-D (1 mg/l) ir BAP (1 mg/l), ekstraktas. Didžiausiu antibakteriniu poveikiu prieš *B.subtilis* pasižymėjo jonažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų, augintų MS su 2,4-D (1 mg/l) ir BAP (1 mg/l) terpėje, ekstraktas. Prieš gramneigiamas bakterijas, tokias kaip *X. campestris* ir *R. radiobacter*, intensyviu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su 2,4-D (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) bei terpėje su BAP (0,5 mg/l), ekstraktai.
6. Pasiūlyta hiperforino išskyrimo aparatūrinė schema, kuria rekomenduojama išskirti hiperforiną iš *H.perforatum* L. kaliaus kultūrų *in vitro*, naudojant superkritinę CO₂ ekstrakciją.

Literatūros saraksts

1. ERAY, N., DALAR, A., TURKER, M. The effects of abiotic stressors and signal molecules on phenolic composition and antioxidant activities of in vitro regenerated *Hypericum perforatum* (St. John's Wort). *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. Volume 133, September 2020, Pages 253-263 [žiūrēta 2020-09-13]. ISSN 0254-6299. Prieiga per: doi:10.1016/j.sajb.2020.07.037
2. HEYDARIAN, M., Characterization of *Hypericum perforatum* polysaccharides with antioxidant and antimicrobial activities: Optimization based statistical modeling. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. Volume 104, Part A, 2017, Pages 287-293 [žiūrēta 2020-09-13]. ISSN 0141-8130. Prieiga per: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.06.049
3. BROWN K., BETTINK K. *Hypericum perforatum* L. St John's Wort, 26 August 2019. *FloraBase – the Western Australian Flora* [interaktyvus]. [žiūrēta 2020-09-13]. Prieiga per: <https://florabase.dpaw.wa.gov.au/browse/profile/5182>
4. *Missouri Botanical Garden*. *Hypericum perforatum* L. [interaktyvus] [žiūrēta 2020-09-13]. Prieiga per: <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=e198>
5. *A. Vogel Plant Encyclopaedia*, *Hypericum perforatum* L. St. John's Wort [interaktyvus]. [žiūrēta 2020-09-13]. Prieiga per: https://www.avogel.ch/en/plant-encyclopaedia/hypericum_perforatum.php
6. WINSTON, R., et. al. Biology and Biological Control of Common St. John's Wort. *Forest Health Technology Enterprise Team, Technology Transfer, Biological Control* [interaktyvus]. May 2012 [žiūrēta 2020-09-13]. Prieiga per: https://www.fs.fed.us/foresthealth/technology/pdfs/FHTET-2010-05_StJohnswort.pdf
7. *Méta Jonažolė (Hypericum perforatum L.)* [interaktyvus] [žiūrēta 2020-09-13]. Prieiga per: <https://eco-meta.com/english-st-johns-wort-hypericum-perforatum-l/>
8. SHARMA, S., et. al. Combined effect of elevated CO₂ and temperature on growth, biomass and secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L. in a western Himalayan region. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* [interaktyvus]. 31 December 2019, 100239, [žiūrēta 2020-10-02]. ISSN 2214-7861. Prieiga per: doi:10.1016/j.jarmap.2019.100239
9. ZHOU, W., et. al. Genome-wide identification and characterization of R2R3-MYB family in *Hypericum perforatum* under diverse abiotic stresses. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. Volume 145, 15 February 2020, Pages 341-354, [žiūrēta 2020-10-02]. ISSN 0141-8130. Prieiga per: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.100
10. *US National Library of Medicine*. Final report on the safety assessment of *Hypericum perforatum* extract and *Hypericum perforatum* oil [interaktyvus]. 2001;20 Suppl 2:31-9, [žiūrēta 2020-10-02]. Prieiga per: doi:10.1080/10915810160233749
11. *Plants For A Future*. *Hypericum perforatum* L. [interaktyvus] [žiūrēta 2020-10-02]. Prieiga per: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Hypericum+perforatum>
12. MARKHAM, M. J., TIERAONA, L. D. 32 - Dietary Supplements and Hemostasis. *Consultative Hemostasis and Thrombosis (Third Edition)*. 2013, Pages 595-600 [žiūrēta 2020-10-04]. ISBN 9781455722969
13. SILVA, S., et. al. Effects of *Hypericum perforatum* extract and its main bioactive compounds on the cytotoxicity and expression of CYP1A2 and CYP2D6 in hepatic cells. *Life Sciences* [interaktyvus]. Volume 144, 1 January 2016, Pages 30-36, [žiūrēta 2020-10-04]. ISSN 0024-3205. Prieiga per: doi:10.1016/j.lfs.2015.11.004

14. BAGDONAITĖ, E., et. al. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L. from Lithuania. *Industrial Crops and Products*, Volume 35, Issue 1, January 2012, Pages 302-308, ISSN 0926-6690, doi:10.1016/j.indcrop.2011.07.018, [žiūrėta 2020-10-04]
15. STANOEVA, J. P., et. al. Phenolic profile and biological activity of *Hypericum perforatum* L.: Can roots be considered as a new source of natural compounds? *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. Volume 117, July 2018, Pages 301-310 [žiūrėta 2020-10-04]. Prieiga per: doi:10.1016/j.sajb.2018.05.030
16. KHAN, S. A., et. al. Development of enhanced hypericin yielding transgenic plants and somaclones: High throughput direct organogenesis from leaf and callus explants of *Hypericum perforatum*. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. Volume 111, January 2018, Pages 544-554, [žiūrėta 2020-10-17]. Prieiga per: doi:10.1016/j.indcrop.2017.11.032
17. ARUTYUNYAN, A. A., et. al. Effect of silver nanoparticles on peroxidase activity of *Linum ausriacum* L. and *Hypericum perforatum* L. callus culture. *Toxicon* [interaktyvus]. Volume 159, Supplement 1, 5 March 2019, [žiūrėta 2020-10-17]. Prieiga per: doi:10.1016/j.toxicon.2018.11.387
18. AZEEZ, H., et. al. Changes induced by gamma ray irradiation on biomass production and secondary metabolites accumulation in *Hypericum triquetrifolium* Turra callus cultures. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. Volume 108, 1 December 2017, Pages 183-189, [žiūrėta 2020-10-17]. Prieiga per: doi:10.1016/j.indcrop.2017.06.040
19. ALBERTO, C., P., et. al. Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry* [interaktyvus]. Volume 48, Issue 7, August 1998, Pages 1165-1168, [žiūrėta 2020-10-17]. ISSN 0031-9422. Prieiga per: doi:10.1016/s0031-9422(97)00963-1
20. FRANKLIN, G., OLIVEIRA, M., DIAS, A. C. P. Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. *Plant Science* [interaktyvus]. Volume 172, Issue 6, June 2007, Pages 1193-1203, [žiūrėta 2020-10-17]. ISSN 0168-9452. Prieiga per: doi:10.1016/j.plantsci.2007.02.017
21. WALKER, T. S., BAIS, H. P., VIVANCO, J. M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry* [interaktyvus]. Volume 60, Issue 3, June 2002, Pages 289-293, [žiūrėta 2020-10-17]. ISSN 0031-9422. Prieiga per: doi:10.1016/s0031-9422(02)00074-2
22. PASQUA, G., et. al. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science* [interaktyvus]. Volume 165, Issue 5, November 2003, Pages 977-982, [žiūrėta 2020-10-18]. ISSN 0168-9452. Prieiga per: doi:10.1016/s0168-9452(03)00275-9
23. KIRAKOSYAN, A., et. al. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry* [interaktyvus]. Volume 53, Issue 3, 2 February 2000, Pages 345-348, [žiūrėta 2020-10-18]. ISSN 0031-9422. Prieiga per: doi:10.1016/s0031-9422(99)00496-3
24. CHAHRABARTY, D., et al. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. Volume 101, Issue 12, June 2010, Pages 4708-4716, [žiūrėta 2020-10-18]. ISSN 0960-8524. Prieiga per: doi:10.1016/j.biortech.2010.01.115,
25. MURTHY, H. N., et.al. Production of adventitious root biomass and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* L. in a balloon type airlift reactor. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. Volume 102, Issue

- 21, November 2011, Pages 10072-10079, [žiūrēta 2020-10-18]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.biortech.2011.08.044
26. NAPOLI, E., et. al. Phytochemical profiles, phototoxic and antioxidant properties of eleven *Hypericum* species – A comparative study. *Phytochemistry* [interaktyvus]. Volume 152, August 2018, Pages 162-173, [žiūrēta 2020-10-27]. ISSN 0031-9422. Prieiga per: doi:10.1016/j.phytochem.2018.05.003
27. FRANKLIN, G., et. al. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry* [interaktyvus]. Volume 70, Issue 1, January 2009, Pages 60-68, [žiūrēta 2020-10-27]. ISSN 0031-9422. Prieiga per: doi:10.1016/j.phytochem.2008.10.016
28. CIRAK, C., et al. In vitro plant regeneration and jasmonic acid induced bioactive chemical accumulations in two *Hypericum* species from Turkey. *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. Volume 128, January 2020, Pages 312-318, [žiūrēta 2020-10-27]. Prieiga per: doi:10.1016/j.sajb.2019.11.028
29. ERSOY, E., et. al. Evaluation of in vitro biological activities of three *Hypericum* species (*H. calycinum*, *H. confertum*, and *H. perforatum*) from Turkey. *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. Volume 130, May 2020, Pages 141-147, [žiūrēta 2020-10-27]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.sajb.2019.12.017
30. GADZOVSKA, S., et.al. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. in vitro cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. Volume 43, Issue 6, June 2005, Pages 591-601, [žiūrēta 2020-11-14]. ISSN 0981-9428. Prieiga per: doi:10.1016/j.plaphy.2005.05.005
31. GAID, M., et. al. Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures. *Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. Volume 222, 20 March 2016, Pages 47-55, [žiūrēta 2020-11-14]. ISSN 0168-1656. Prieiga per: doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.016
32. TOCCI, N., et al. A three-step culture system to increase the xanthone production and antifungal activity of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* in vitro roots. *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. Volume 57, August 2012, Pages 54-58, [žiūrēta 2020-11-14]. ISSN 0981-9428. Prieiga per: doi: 10.1016/j.plaphy.2012.04.014
33. COPPOCK, R. W., DZIWENKA, M. Chapter 45 - St. John's Wort. *Nutraceuticals, Efficacy, Safety and Toxicity* [interaktyvus]. 2016, Pages 619-631, [žiūrēta 2020-11-14]. ISBN 9780128021477. Prieiga per: doi: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00045-0
34. EATEMADNIA, A., et. al. The effect of *Hypericum perforatum* on postmenopausal symptoms and depression: A randomized controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine* [interaktyvus]. Volume 45, August 2019, Pages 109-113, [žiūrēta 2020-11-14]. ISSN 0965-2299. Prieiga per: doi: 10.1016/j.ctim.2019.05.028
35. GÜNEŞ, S., TIHMINLIOĞLU, F. *Hypericum perforatum* incorporated chitosan films as potential bioactive wound dressing material. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. Volume 102, September 2017, Pages 933-943, [žiūrēta 2021-01-16]. ISSN 0141-8130. Prieiga per: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.080
36. ÇOBANOĞLU, A., ŞENDİR, M. The effect of *hypericum perforatum* oil on the healing process in the care of episiotomy wounds: A randomized controlled trial. *European Journal of Integrative Medicine*

- [interaktyvus]. 18 November 2019, 100995, [žiūrėta 2021-01-16]. ISSN 1876-3820. Prieiga per: doi: 10.1016/j.eujim.2019.100995
37. ERGÜN, S. Cross-Kingdom Gene regulation via miRNAs of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) flower dietetically absorbed: An in silico approach to define potential biomarkers for prostate cancer. *Computational Biology and Chemistry* [interaktyvus]. Volume 80, June 2019, Pages 16-22, [žiūrėta 2021-01-16]. ISSN 1476-9271. Prieiga per: doi: 10.1016/j.compbiolchem.2019.02.010,
 38. YALÇIN, S., YALÇINKAYA, S., ERCAN, F. Determination of Potential Drug Candidate Molecules of the *Hypericum perforatum* for COVID-19 Treatment. *Current Pharmacology Reports* [interaktyvus]. 02 March 2021, 42–48. [žiūrėta 2021-01-16]. Prieiga per: doi: 10.1007/s40495-021-00254-9
 39. NAZLI, O., et. al. Antimicrobial and antibiofilm activity of polyurethane/*Hypericum perforatum* extract (PHPE) composite. *Bioorganic Chemistry* [interaktyvus]. Volume 82, February 2019, Pages 224-228, [žiūrėta 2021-01-16]. ISSN 0045-2068. Prieiga per doi: 10.1016/j.bioorg.2018.08.017
 40. SADDIQE, Z., NAEEM, I., MAIMOONA, A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. Volume 131, Issue 3, 5 October 2010, Pages 511-521, [žiūrėta 2021-01-16]. ISSN 0378-8741. Prieiga per: doi: 10.1016/j.jep.2010.07.034
 41. HÜBNER, A.T. Treatment with *Hypericum perforatum* L. does not trigger decreased resistance in *Staphylococcus aureus* against antibiotics and Hyperforin. *Phytomedicine* [interaktyvus]. Volume 10, Issues 2–3, 2003, Pages 206-208, [žiūrėta 2021-01-16]. ISSN 0944-7113. Prieiga per: doi: 10.1078/094471103321659951
 42. MUSTAFA, N. R., et al. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature protocols* [interaktyvus]. Volume 6, Issues 6, 5 May 2011, Pages 715-724, [žiūrėta 2021-03-22]. Prieiga per: doi: 10.1038/nprot.2010.144
 43. TUMOSIENE, I., et. al. Antioxidant and Anticancer Activity of Novel Derivatives of 3-[(4-Methoxyphenyl)amino]propane-hydrazide. *Molecules* [interaktyvus]. June 2020, 25 (13), 2980, [žiūrėta 2021-03-22]. Prieiga per: doi:10.3390/molecules25132980
 44. KARIMAH, K., YUNIATI, R., HANDAYANI, W. In vitro culture from internodes of *Melastoma malabathricum* L. on Murashige and Skoog (1962) modified medium with thidiazuron and 1-naphthaleneacetic acid. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [interaktyvus]. Volume 481, April, 2020, [žiūrėta 2021-03-22]. Prieiga per: doi: 10.1088/1755-1315/481/1/012007
 45. NOVALIZDA, M., et al. The Formation of Shoots in Mangosteen (*Garcinia Mangostana* L.) Nodules From Bengkalis, Riau in Murashige Skoog and Woody Plant Medium. *Journal of Physics: Conference Series* [interaktyvus]. Volume 1351, November, 2019, [žiūrėta 2021-03-22]. Prieiga per: doi: 10.1088/1742-6596/1351/1/012028
 46. BHAWYA, D., ANILAKUMAR, K. R. Antioxidant, DNA, damage protection and antibacterial effect of *Psoralea corylifolia*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol 4, Suppl 2, 2011, [žiūrėta 2021-03-28]. ISSN - 0974-244
 47. HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, Vol. 53, Pages 1841–1856, [žiūrėta 2021-03-28]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.sajb.2019.12.017
 48. WANG, Y. L., et al. Enhancing antioxidative capacity of *Lepidium meyenii* calli by addition of methyl salicylate to culture medium. *Acta Physiol Plant* [interaktyvus]. 2007, 29:417–423 [žiūrėta 2021-03-28]. Prieiga per: doi: 10.1007/s11738-007-0050-5

49. OZKANA, E. E., et al. Evaluation of in vitro biological activities of three *Hypericum* species (*H. calycinum*, *H. confertum*, and *H. perforatum*) from Turkey. *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. Volume 130, May 2020, Pages 141-147, [žiūrėta 2021-04-11]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.sajb.2019.12.017,
50. EROGLU, E., GIRGIN, S. N. A unique phenolic extraction method from olive oil macerate of *Hypericum perforatum* using DMSO: Assessment of in vitro anticancer activity, LC-MS/MS profile, total phenolic content and antioxidant capacity. *South African Journal of Botany* [interaktyvus]. Volume 139, July 2021, Pages 6-11, [žiūrėta 2021-04-11]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.sajb.2021.01.015
51. MAKKAR, P.S., SIDHURAJU, P., BECKER, K. Plant Secondary Metabolites. *Humana Press* [interaktyvus]. 2007, [žiūrėta 2021-04-11]. ISBN 978-1-58829-993-2. Prieiga per: doi: 10.1007/978-1-59745-425-4
52. SKYBAA, M., et. al. Oxidative stress and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. plants subjected to low temperature treatment, *Journal of Plant Physiology* [interaktyvus]. Volume 169, Issue 10, 1 July 2012, Pages 955-964, [žiūrėta 2021-04-11]. ISSN 0176-1617. Prieiga per: doi: 10.1016/j.jplph.2012.02.017
53. MALINAUSKAITĖ, R. Šarminio jonizuoto vandens įtaka paprastojų lešio 'SMĖLINUKAI' augalų morfofiziologiniams rodikliams II ontogenezės etape, *Žmogaus ir gamtos sauga 2015 – 2 dalis*, ASU, [žiūrėta 2021-04-15]. ISSN 1822-1823
54. SAVICKA, M., ŠKUTE, N. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija* [interaktyvus]. 2010. Vol. 56. No. 1–2. P. 26–33, [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi: 10.2478/v10055-010-0004-x
55. ALTUNA, M. L., et. al. Assessment of cholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant effects of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort), *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. Volume 43, May 2013, Pages 87-92, [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.017
56. VITORIA, A. P., LEA, P. J., AZEVEDO, R. A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* [interaktyvus]. Volume 57, 2001, Pages 701–710, [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi: 10.1016/S0031-9422(01)00130-3
57. RÖMPP, H., et. al. Enrichment of hyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. Volume 21, Issue 4, March 2004, Pages 443-451, [žiūrėta 2021-04-29]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.ejps.2003.10.026

Priedai

1 priedas. Tyrimo metu naudotų reagentų sąrašas

| Reagentai | | | |
|---|--|--|---------------------------------|
| 96% C ₂ H ₅ OH | Mikro druskos | DMSO | 0,1 M vandenilio peroksidas |
| NaClOH | Makro druskos | Polivinilpirolidonas | 0,05 M Tris-HCl (pH=7,8) |
| Distiliuotas vanduo | Fe-EDTA | 40 mM Tris-HCl buferis | 1 mM EDTA |
| NH ₄ NO ₃ | Organiniai priedai | 10 mM L-metioninas | 0,5 % Tritonas X-100 |
| KNO ₃ | 39 junginys | 54 μM nitromėlynasis tetrazolis | Karbonatinis buferis (pH=10,3) |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | Natrio fosfatinis buferis 0,2 M (pH=6,6) | 0,025% Tritonas X- 100 | 0,02 M L-prolinas |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1 % K ₃ [Fe(CN) ₆] | 3 μM riboflavinai | 100 mM NAD |
| KH ₂ PO ₄ | 10 % trichloracto rūgštis | CaCO ₃ | NaCl |
| KJ | 20 mM fosfatinis buferis (pH=7,4) | 20 % trichloracto rūgštis | Triptonas |
| H ₃ BO ₃ | 1 mM DPPH* | 0,5 % tiobarbitūrinė rūgštis | Mielių ekstraktas |
| MnSO ₄ ·4 H ₂ O | 1 % K ₃ [Fe(CN) ₆] | Ledinė acto rūgštis | <i>Xanthomonas campestris</i> |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 10 % trichloracto rūgštis | Ninhidrinai | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 2 mM ABTS** | H ₃ PO ₄ | <i>Rhizobium radiobacter</i> |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 1 % K ₃ [Fe(CN) ₆] | L-prolinas | 0,1 mM vandenilio peroksidas |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 7% Na ₂ CO ₃ | 0,1 M fosfatinis buferis (pH=7) | 80 % CH ₃ OH |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,1 % FeCl ₃ | 40 mM vandenilio peroksido tirpalas***** | 2 % AlCl ₃ |
| Na ₂ EDTA·2H ₂ O | DPPH etaloninis tirpalas | H ₃ PO ₄ | Kvercetas |
| Mioinozitolis | BHT ir askorbo rūgšties tirpalai*** | 0,5 mM askorbo rūgštis | 0,05 M K/Na fosfatinis buferis |
| Reagentai | | | |
| Nikotino rūgštis | 1 N Folino-Kiokalto reagentas**** | 0,1 mM EDTA | 0,1 M vandenilio peroksidas |
| Piridoksinas-HCl | Standartinis tanino rūgšties tirpalas (0,1 mg/ml)***** | Sacharozė | Bradfordo reagentas |
| Tiaminas-HCl | Acetonas | Agar-agaras | 0,066 M K/Na fosfatinis buferis |
| Glicinas | Albuminas | 0,5 mM PMSF | 1 mM DTT |
| Citokinai (BAP, kinetinas) | Auksinai (2,4-D, NAR) | | |

*ruošiamas etanolyje;

**paruošiamas sumaišant 2 mM ABTS su 0,17 M kalio persulfatu, kuris ištirpintas 20 mM fosfatiniame buferyje (pH=7,4) ir laikomas per naktį;

*** ištirpinamas DMSO;

**** ruošiamas praskiedžiant komercinį reagentą (2 N) su vienodu kiekiu distiliuoto vandens. Perpilama į tamsų butelį ir laikoma šaldytuve. Naudojamas tik geltonos spalvos tirpalas, jei žalias – nenaudoti;

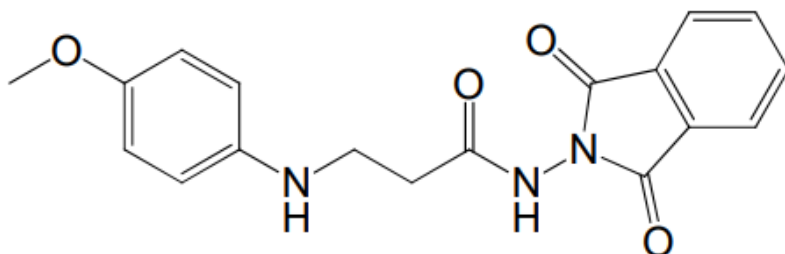
*****paruošiamas ištirpinant 25 mg tanino rūgšties su 25 ml distiliuoto vandens. Vėliau praskiedžiama 1:10 distiliuotu vandeniu;

***** paruoštas fosfatiniame buferyje (pH=7,4).

2 priedas. Tyrimo metu naudotos aparatūros sąrašas

| Prietaisas | Gamintojas, modelis |
|-----------------------------|-----------------------|
| Autoklavas | Certoclav CV – EL |
| Centrifuga | Universal 320 R |
| Termostatas | Binder BD23 |
| Laminaras | Telstar BV 100 |
| Laminaras | Holten |
| Magnetinė maišyklė | Heidolph Mr Hei – Tec |
| pH metras | Winlab |
| Spektrofotometras | Shimadzu UV – 1280 |
| Svarstyklės | Shimadzu ATX 8400 |
| Termostatuojamas kratytuvas | Biosan ES – 20 |
| Mėgintuvėlių purtyklė | Biosan BioVortex V1 |
| Vandens vonelė | Memmert |
| Vandens vonelė | Ultherm BWT-U |

3 priedas. N-(1,3-dioksizoindol-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino) propanamido (39 junginio) cheminė struktūra



4 priedas. FeSO₄ x 7H₂O kalibracinės kreivės reagentų kiekiai

| Koncentracija, μmol/l | FeSO ₄ kiekis, ml | FRAP kiekis, ml | H ₂ O kiekis, ml |
|-----------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| 5 | 0,025 | 3 | 6,975 |
| 10 | 0,05 | | 6,95 |
| 15 | 0,075 | | 6,925 |
| 20 | 0,1 | | 6,9 |
| 25 | 0,125 | | 6,875 |

5 priedas. Tanino rūgšties kalibracinės kreivės reagentų kiekiai

| Standartinio tanino rūgšties tirpalas, μl | H ₂ O kiekis, μl |
|---|-----------------------------|
| 0 | 500 |
| 10 | 490 |
| 20 | 480 |
| 30 | 470 |
| 40 | 460 |
| 50 | 450 |
| 60 | 440 |
| 70 | 430 |
| 80 | 420 |
| 90 | 410 |
| 100 | 400 |
| 110 | 390 |
| 120 | 380 |
| 130 | 370 |

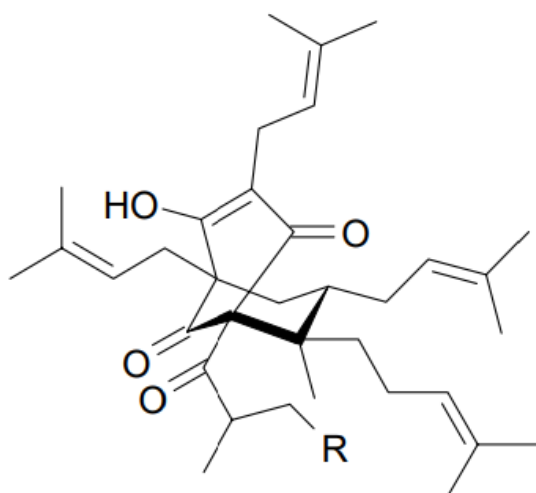
6 priedas. Principinės aparatūrinės schemos prietaisų žymėjimas ir pavadinimai

| Prietaiso žymėjimas | Prietaiso pavadinimas |
|---|---------------------------|
| S-1, S-2, S-3, S-4, S-5, S-6, S-7, S-8, S-9, S-10 | Išcentriniai siurbliai |
| V-1, V-2, V-3, V-4, V-5, V-6, V-7, V-8, V-9, V-10, V-11, V-12, V-13, V-14, V-15, V-16, V-17, V-18 | Vožtuvai |
| A-1, A-2 | Autoklavai |
| B-1 | Bioreaktorius |
| F-1, F-2 | Oro filtras |
| K-1 | Oro kompresorius |
| JT-1, JT-2, JT-3, JT-4 | Juostiniai transporteriai |
| M-1 | Maišyklė |
| L-1, L-2 | Liofilizatoriai |
| SM-1 | Smulkintuvas |
| LR-1 | Laikymo rezervuaras |
| AŠ-1 | Aušintuvas |
| ASS-1 | Aukšto suslėgimo siurblys |
| Š-1 | Šilumokaitis |
| E-1 | Ekstraktorius |
| SE-1, SE-2 | Separatoriai |
| K-1 | Kondensatorius |
| TM | Termometras |
| MM | Manometras |
| SRI | Srauto indikatorius |

7 priedas. Principinės aparatūrinės schemos medžiagų žymėjimas ir pavadinimai

| Medžiagos žymėjimas | Medžiagos pavadinimas |
|---------------------|--|
| MTR-1 | Maitinimo terpės rezervuaras |
| MT-1 | Mitybinė terpė (kolba) |
| MŠ-1 | Mišinys (kaliaus kultūros ir mitybinės terpės) |
| ADR-1 | Skysto CO ₂ rezervuaras |

8 priedas. Hiperforino ir adhiperforino cheminē struktūra



R = H (hiperforinas)

R = CH₃ (adhiperforinas)