



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinio, antibakterinio ir fitocheminio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.) ir juozažolės (lot. *Hyssopus officinalis* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose

Baigiamasis magistro projektas

Aistė Žemaitytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinio, antibakterinio ir fitocheminio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.) ir juozažolės (lot. *Hyssopus officinalis* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Aistė Žemaitytė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

**Doc. dr. Birutė Sapijanskaitė-
Banevič**

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Aistė Žemaitytė

Biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinio, antibakterinio ir fitocheminio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.) ir juozažolės (lot. *Hyssopus officinalis* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose

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.

Aistė Žemaitytė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Žemaitytė, Aistė. Biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinio, antibakterinio ir fitocheminio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.) ir juozažolės (lot. *Hyssopus officinalis* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: vaistinis čiobrelis, vaistinė juozažolė, kaliaus kultūros, *in vitro*.

Kaunas, 2021. 70 p.

Santrauka

Vaistinis čiobrelis (lot. *Thymus vulgaris* L.) ir vaistinė juozažolė (lot. *Hyssopus officinalis* L.) yra vieni iš svarbiausių medicininių augalų rūšių, kurie dėl intensyvių antioksidacinių ir antibakterinių savybių yra plačiai naudojami maisto, kosmetikos ir farmacijos pramonėje. Literatūros duomenimis, tiriamųjų augalų kaliaus kultūros kaupia didelį antrinių metabolitų kiekį. Siekiant optimizuoti pakankamą antrinių metabolitų sintezę, medicininių augalų kaliaus kultūrose *in vitro*, reikalinga nustatyti tikslinius augalų augimo reguliatorius ir jų koncentraciją. Pagrindinis šio tyrimo tikslas buvo nustatyti vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės kaliaus kultūrose taikomus fitohormonus, kurie turėtų įtakos didesniai antioksidaciniam, antibakteriniam ir fitocheminiam augalų aktyvumui *in vitro*. Tyrimo metu buvo vertinamas keturių mitybinių terpių poveikis vaistinio čiobrelio, bei dviejų mitybinių terpių poveikis vaistinės juozažolės antrinių metabolitų sintezei kaliaus kultūrose *in vitro*. Gauti rezultatai palyginti su *in vivo* vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės tyrimų rezultatais.

Ištyrus vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* antioksidacines savybes skirtingais metodais gauti rezultatai skyrėsi. ABTS radikalo surišimo metodu nustatyta, kad vaistinio čiobrelio antioksidacines savybes labiausiai skatino lapų ir stiebų MS terpės papildymas su 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ augimo reguliatoriais ir 0,5 mg/l *N*-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidu. Taikant superoksido dismutazės aktyvumo metodą iširta reikšminga 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin fitohormonų bei 0,5 mg/l *N*-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido sąsaja su didžiausia antioksidacinių junginių sinteze vaistinio čiobrelio šaknų kaliaus kultūroje. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad vaistinio čiobrelio lapų ir stiebų kaliaus kultūros MS mitybinės terpės papildymas su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, lėmė didžiausią antibakterinį aktyvumą. Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros papildymas minėtos koncentracijos IAR ir TDZ augimo reguliatoriais taip pat sąlygojo didžiausią flavonoidų koncentraciją kaliaus kultūroje *in vitro*. Vaistinių augalų *in vitro* tyrimuose didžiausia liuteino koncentracija buvo nustatyta vaistinio čiobrelio kaliaus kultūroje iš lapų ir stiebų, augintoje MS mitybinėje terpėje su 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ fitohormonais ir 0,5 mg/l *N*-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidu. Apibendrinus galima teigti, kad 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ augimo reguliatoriai ir 0,5 mg/l *N*-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidas yra tinkami didinti antrinių metabolitų sintezę vaistinio čiobrelio *in vitro* kaliaus kultūrose.

Žemaitytė, Aistė. Evaluation and Comparison of Biological Active Compounds, Antioxidative, Antibacterial and Phytochemical Activities of Thyme (*Thymus Vulgaris* L.) and Hyssop (*Hyssopus Officinalis* 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 (study field group): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: thyme, hyssop, callus cultures, *in vitro*.

Kaunas, 2021. 70.

Summary

Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) are among the most important medicinal plant species, that are widely used in the food, cosmetic and pharmaceutical industries due to their strong antioxidant and antibacterial properties. According to other scientific studies, callus cultures of the studied plants accumulate a large amount of secondary metabolites. In order to optimize the sufficient synthesis of secondary metabolites of medicinal plants in callus cultures *in vitro*, it is necessary to determine the significant plant growth regulators and their concentration. Therefore, the main objective of this study was to identify the phytohormones of thyme and hyssop callus culture that would affect the antioxidant, antibacterial, and phytochemical plant activity *in vitro*. During the study, the effect of four culture media was evaluated for the synthesis of secondary metabolites in the callus cultures of thyme *in vitro*. Similarly, the two culture media were investigated for the synthesis of secondary metabolites in the callus cultures of hyssop *in vitro*. The results obtained were compared with those of thyme and hyssop *in vivo*.

After evaluating the antioxidant properties of thyme and hyssop *in vivo* and *in vitro* callus culture, using different methods, the results were different. Using ABTS radical scavenging assay, it was found that the antioxidant properties of callus culture of thyme stems and leaves were mainly enhanced by supplementing the MS culture media with 0.1 mg/l IAA, 0.5 mg/l TDZ growth regulators and 0.5 mg/l *N*-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-3-((4-methoxyphenyl)amino)propanamide. However, the superoxide dismutase assay revealed that the callus culture of thyme root using 2 mg/l NAA and 0.5 mg/l Kin phytohormones and 0.5 mg/l *N*-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-3-((4-methoxyphenyl)amino)propanamide accumulated the highest amount of antioxidant compounds. During the course of the study, it was found that callus culture of thyme leaves and stems, in MS medium, supplemented with 0.1 mg/l IAA and 0.5 mg/l TDZ phytohormones, gave the highest plant antibacterial activity. The callus culture of thyme, supplemented with IAA and TDZ phytohormones at the concentration mentioned above, also resulted in the highest concentration of flavonoids in the plant callus culture *in vitro*. According to the study, the highest concentration of lutein was accumulated in the callus culture of thyme leaves and stems, grown in MS medium, supplemented with 0.1 mg/l IAA, 0.5 mg/l TDZ phytohormones and 0.5 mg/l *N*-1,3-dioxoisindolin-2-yl)-3-((4-methoxyphenyl)amino)propanamide. Therefore, 0.1 mg/l of IAA, 0.5 mg/l of TDZ growth regulators and 0.5 mg/l of *N*-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-3-((4-methoxyphenyl)amino)propanamide are able to increase the synthesis of thyme secondary metabolites *in vitro* callus cultures.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	11
1.1. Notrelinių augalų charakteristika	11
1.1.1. Vaistinio čiobrelio charakteristika.....	11
1.1.2. Vaistinės juozažolės charakteristika	11
1.2. Notrelinių augalų panaudojimo galimybės.....	12
1.2.1. Vaistinio čiobrelio panaudojimo galimybės	12
1.2.2. Vaistinės juozažolės panaudojimo galimybės	13
1.3. Augalų biotechnologiniai metodai	13
1.3.1. Genų inžinerijos metodai.....	13
1.3.2. Augalų audinių kultūros metodas	14
1.4. Notrelinių augalų kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	15
1.4.1. Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	15
1.4.2. Vaistinės juozažolės kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	16
1.5. Kaliaus kultūrų kaupiami antriniai metabolitai	16
1.6. Vaistinio čiobrelio antriniai metabolitai.....	17
1.6.1. Vaistiniame čiobrelyje kaupiami terpenai	17
1.6.2. Vaistiniame čiobrelyje kaupiami fenoliniai junginiai.....	19
1.7. Vaistinės juozažolės antriniai metabolitai	19
1.7.1. Vaistinėje juozažolėje kaupiami terpenai	19
1.7.2. Vaistinėje juozažolėje kaupiami fenoliniai junginiai	20
1.8. Notrelinių augalų antibakterinis aktyvumas.....	20
1.8.1. Vaistinio čiobrelio antibakterinis aktyvumas	21
1.8.2. Vaistinės juozažolės antibakterinis aktyvumas	22
1.9. Ateities perspektyvos	22
1.10. Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	23
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	24
2.1. Tyrimų planavimas ir tyrimų objektas	24
2.2. Tyrimų eiga	24
2.3. Tyrimų metu naudoti prietaisai	25

2.4.	Tyrimų metu naudoti reagentai	25
2.5.	Vaistinio čiobrelis sėklų sterilinimas	26
2.6.	Vaistinės juozažolės sėklų sterilinimas	26
2.7.	Mitybinių terpių paruošimas	26
2.8.	Augimo reguliatorių paruošimas	26
2.9.	Vaistinių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	27
2.9.1.	Redukcinių savybių nustatymas	27
2.9.2.	Antioksidacinis aktyvumas DPPH radikalo surišimo metodu.....	29
2.9.3.	Antioksidacinis aktyvumas ABTS radikalo surišimo metodu.....	29
2.9.4.	Antioksidacinis aktyvumas FRAP metodu.....	31
2.9.5.	Antioksidacinis aktyvumas superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimo metodu	32
2.10.	Antibakterinis aktyvumas prieš <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i> ir <i>Xanthomonas campestris</i>	34
2.11.	Bendras fenolinių junginių kiekybinis įvertinimas Folin-Ciocalteu'o metodu.....	35
2.12.	Flavonoidų kiekybinis įvertinimas	37
2.13.	Liuteino kiekybinis įvertinimas.....	38
3.	Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	39
3.1.	<i>Thymus vulgaris</i> L. ir <i>Hyssopus officinalis</i> L. kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	39
3.2.	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	40
3.2.1.	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas redukcinių savybių nustatymo metodu	40
3.2.2.	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH radikalo surišimo metodu.....	42
3.2.3.	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS surišimo metodu.....	44
3.2.4.	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu.....	46
3.2.5.	Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas.....	48
3.3.	Vaistinių augalų antibakterinio aktyvumo įvertinimas	50
3.4.	Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas vaistiniuose augaluose	52
3.5.	Flavonoidų koncentracijos įvertinimas vaistiniuose augaluose	55
3.6.	Liuteino koncentracijos įvertinimas vaistiniuose augaluose	56
4.	Rekomendacijų dalis	59
	Išvados	62
	Literatūros sąrašas	63
	Priedai.....	70

Santrumpų ir terminų sąrašas

- ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfonrūgštis) radikalas;
BAP – 6-benzilaminopurinas;
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas;
IAR – 3-indolilacto rūgštis;
Kin – 6-furfurilamino purinas;
LB – *Luria Bertani* terpė;
MEF – 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfatas;
MS – *Murashige Skoog* terpė;
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas;
MVA – mevalonatas;
NAR – 1-naftilacto rūgštis;
SOD – superoksido dismutazė;
TDZ – 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urėja;
39 – *N*-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidas;
2,4-D – 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis.

Įvadas

Augalų antriniai metabolitai yra ekonomiškai svarbūs biologiškai aktyvūs junginiai, kurie naudojami maisto, kosmetikos ir farmacijos pramonėje [1]. Dėl iškilusio susirūpinimo sintetiniais antioksidantais ir jų sukeliamu šalutiniu poveikiu organizmui, vis labiau atkreipiamas dėmesys į natūralius biologiškai aktyvius junginius ir jų panaudojimą pramonėje [2]. Tačiau *in vivo* sąlygomis augantys augalai pasižymi maža bioaktyviųjų junginių koncentracija ir lėtu augimo greičiu, kas sąlygoja ieškoti efektyvesnių metodų ekonomiškai svarbiems junginiams išgauti [3]. Per pastaruosius metus prekyboje didėjanti augalų antrinių metabolitų paklausa sąlygojo susidomėjimą bioaktyviųjų junginių gamyba taikant audinių kultūrų metodus [1]. Pramonėje taikomos kaliaus kultūros gali būti naudojamos gaminti didelį antrinių metabolitų kiekį farmacijos, kosmetikos ir maisto pramonės šakose [4]. Ši technologija sąlygoja ne tik didesnę norimų junginių produkciją, bet ir natūralaus junginio išskyrimą [5].

Viena iš svarbiausių, literatūroje aprašomų medicininių augalų šeimų, kaupiančių įvairius fitocheminius junginius, yra notrelinių šeima. Dėl didelės biologiškai aktyviųjų junginių koncentracijos ir tyrimuose nustatyto antioksidacinio bei antibakterinio poveikio, tyrimui analizuoti buvo pasirinktas vaistinis čiobrelis [6]. Kitas tirti pasirinktas notrelinių šeimos atstovas yra vaistinė juozažolė, kuri liaudies medicinoje yra naudojama gydyti uždegimą, hipertenziją, karščiavimą ir bakterijų sukeltą infekciją [7]. Vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės eterinių aliejų sudėtyje esantys fenoliniai junginiai atlieka laisvųjų radikalų surišimo funkciją ir apsaugo organizmą nuo oksidacinio streso sukeltos žalos [8]. Literatūroje yra aprašyta daug tyrimų, kurių metu buvo siekiama nustatyti tinkamą vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės kaliaus kultūrų mitybinę terpę ir fitohormonų sudėtį antrinių metabolitų sintezei. Siekiant nustatyti kaliaus kultūros terpę, kuri būtų tinkama sukaupti pakankamą antrinių metabolitų koncentraciją, tyrimo metu buvo vertinamas antioksidacinis, antibakterinis ir fitocheminis kaliaus kultūrų aktyvumas. Tyrimo metu buvo analizuojamas literatūroje neaprašytas 39-o junginio – *N*-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido poveikis vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės antrinių metabolitų sintezei kaliaus kultūrose. Tikimasi, kad atliekamas vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės kaliaus kultūrų antioksidacinio, antibakterinio ir fitocheminio aktyvumo tyrimas turės praktinės reikšmės tolimesniuose tyrimuose.

Projekto tikslas – nustatyti ir palyginti vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.) bei juozažolės (lot. *Hyssopus officinalis* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį, antibakterinį ir fitocheminį aktyvumą.

Projekto uždaviniai:

1. taikant redukcinių savybių nustatymo, DPPH ir ABTS radikalo surišimo, FRAP ir superoksido dismutazės aktyvumo metodus įvertinti ir palyginti antioksidacinį vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų aktyvumą;
2. įvertinti ir palyginti vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* antibakterinį poveikį;
3. įvertinti ir palyginti bendrąją fenolinių junginių koncentraciją Folin-Ciocalteu'o metodu vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose;

4. spektrofotometriniu metodu nustatyti ir palyginti flavonoidų ir liuteino koncentraciją vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose;
5. pateikti rekomenduojamą vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus išskyrimo aparatūrinę schemą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Notrelinių augalų charakteristika

Notreliniai (lot. *Lamiaceae*), kitaip žinomi kaip magnolijūnai, yra viena iš labiausiai pasaulyje paplitusių žydinčių medicininių ir aromatinių augalų rūšių [9]. Notrelinių augalų šeima, suskirstyta į 12 pošeimių, kuriose yra 295-ios gentys, apimančios 7775-ias augalų rūšis, priklauso *Magnoliophyta* skyriui ir *Lamiales* eilei [10]. Šalavijas (lot. *Salvia*), kalpokė (lot. *Scutellaria*), notra (lot. *Stachys*), cimžieda (lot. *Plectranthus*), saikenis (lot. *Hyptis*), berutis (lot. *Teucrium*), skaistminas (lot. *Vitex*), čiobrelis (lot. *Thymus*) ir katžolė (lot. *Nepeta*) yra didžiausios notrelinių šeimos gentys [11]. Svarbu paminėti, kad ši augalų šeima yra kilusi iš Viduržemio jūros regiono, tačiau keletas genčių yra lokaliai paplitusios Europoje, Australijoje, Pietvakarių Azijoje, Pietų Amerikoje ir Šiaurės Afrikoje [9,12].

Notrelinių šeimoje gali būti aptinkama vienmečių žolinių augalų arba daugiamečių krūmų [10]. Šios augalų šeimos rūšys dažniausiai turi keturių briaunų stiebus, kuriuos dengia liaukiniai plaukeliai. Augalų šaknys neretai yra sudarytos iš pagrindinės ir šoninių šaknų. Žieduose mezginės yra viršutinės ir abipusiai simetriškos su penkiais susijungusiais vainiklapiais ir taurėlapiais. Notrelinių augalų prisitaikymas prie aplinkos yra labai įvairus. Rūšys daugiausiai auga vasaros metu, tačiau jų augimas yra stebimas ir žiemą vietovėse, kurioms būdingas didelis kritulių kiekis. Šios šeimos rūšys taip pat auga sausose, uolėtose, miškingose vietovėse ir pievose [12].

1.1.1. Vaistinio čiobrelio charakteristika

Čiobrelis (lot. *Thymus*) yra vienas iš svarbiausių notrelinių augalų šeimos genčių, kurią sudaro apie 214 augalų rūšių ir 36 porūšiai. Tarp įvairių čiobrelio rūšių labiausiai, dėl savo gydomojo poveikio, tyrimams yra naudojamas vaistinis čiobrelis (lot. *Thymus vulgaris* L.) [13].

Tai sumedėjęs, visuomet žaliuojantis puskrūmis, turintis mažus, bet ypač aromatingus, pilkšvai žalius lapus, kuris ankstyvoje vasaroje išskleidžia purpurinės arba rausvos spalvos žiedus [14]. Svarbu paminėti, kad ovalios ir stačiakampės formos vaistinio čiobrelio lapai yra naudojami eteriniams aliejams išgauti. Vaistiniam augalui augti yra palankus karštas, sausas ir saulėtas klimatas. Pastebima, kad vaistinis čiobrelis užauga nuo 15 iki 30 cm aukščio ir 40 cm pločio [15].

1.1.2. Vaistinės juozažolės charakteristika

Juozažolė (lot. *Hyssopus*) yra kita notrelinių augalų šeimos gentis, kuri turi 10–12 augalų rūšių. Dėl gydomųjų savybių labiausiai žinoma juozažolės rūšis yra vaistinė juozažolė (lot. *Hyssopus officinalis* L.), kuri mediciniais tikslais yra vartojama daug metų [8].

Vaistinė juozažolė yra daugiametis, pusiau visžalis puskrūmis, augantis sausame, uolėtame ir kalkingame dirvožemyje [5,16]. Šis augalas yra ištvėringas, tačiau atšiauriomis žiemos sąlygomis gali neišgyventi. Vaistinė juozažolė užauga iki 60 cm aukščio, jos stiebas yra status, šakotas, keturbriaunis. Lapai yra lanceto formos, apaugę plonais plaukeliais su eterinius aliejus kaupiančiomis liaukutėmis. Ryškiai mėlynos spalvos žiedų, sukrautų po 3–7 lapų pažastyse, žydėjimas stebimas rugpjūčio–spalio mėnesiais [16].

1.2. Notrelinių augalų panaudojimo galimybės

Per pastaruosius 20 metų, taikant *in vitro* metodą, buvo atlikta daug mokslinių tyrimų, kurie pagrindžia *Lamiaceae* šeimos augalų pritaikymą žmogaus poreikiams [11]. Notrelinių šeimos augalai dėl kultivavimo paprastumo yra plačiai naudojami kosmetikos pramonėje [17]. Be to, nuo seno vaistiniai ir aromatiniai augalai buvo naudojami kulinarijoje patiekalų skoninėms savybėms gerinti ir liaudies medicinoje gydymo tikslais [9]. Augalų ūglių, lapų ir žiedų ekstraktuose sukaupti junginiai turi savitą biologinį aktyvumą. Iš augalų išskirti biologiškai aktyvūs junginiai pasižymi priešuždegiminėmis, antibakterinėmis, antihipertenzinėmis, skatinančiomis žaizdų gijimą ir skausmą malšinančiomis savybėmis [12]. Augalų kaupiami antriniai metabolitai taip pat pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Literatūros duomenimis, siekiant išvengti vėžinių susirgimų sintetinius, antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčius junginius, rekomenduojama pakeisti į natūraliai išskirtus biologiškai aktyvius junginius [18]. Pasaulio sveikatos organizacija siūlo notrelinių šeimos atstovus, turinčius ilgą jų vartojimo istoriją ir patvirtintą gydomąjį poveikį, toliau tirti dėl naujų savybių, kurios gali būti pritaikytos ligoms gydyti [17].

1.2.1. Vaistinio čiobrelio panaudojimo galimybės

Čiobrelis nuo senų laikų yra naudojamas kulinarijoje kaip priedas konservuojant maisto produktus, nes pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Šio augalo kaupiami eteriniai aliejai turi jiems būdingą aromatą dėl to yra vertingi parfumerijos ir kosmetikos pramonėje [14]. Dėl teikiamos naudos organizmui vaistinis čiobrelis taip pat gali būti vartojamas kaip funkcionalusis maistas [6].

Vienas iš svarbiausių čiobrelio rūšių yra vaistinis čiobrelis, kuris labiausiai taikomas gydymo tikslais, nes sukaupia didesnę timolio kiekį, nei kitos čiobrelio rūšys. Atlikti farmakologiniai eksperimentai *in vitro* atskleidė čiobrelio ekstraktų gydomąjį poveikį [14]. Liaudies medicinoje augalas yra naudojamas gydyti bronchitą, laringitą, gastritą ir viduriavimą [19]. Vaistinio čiobrelio eterinių aliejų sudėtyje esantys monoterpenai išsiskiria antispazminėmis ir antibakterinėmis savybėmis. Kiti augalo kaupiami cheminiai junginiai pasižymi antiseptiniu, dezinfekuojančiu ir tonizuojančiu poveikiu. Vaistinis čiobrelis yra naudingas gydyti žarnyno infekcijas ir užsikrėtimus, gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų invazijas žarnyne [14]. Atliktuose *in vitro* ir *in vivo* tyrimuose buvo nustatytos priešuždegiminės vaistažolės savybės. Vaistinio čiobrelio ekstraktai, kuriuose nustatytas padidėjęs superoksido dismutazės (SOD) aktyvumas, pelių ląstelėse reikšmingai slopino interleukino-6 ir nekrozės faktoriaus- α gamybą, taigi stabdė bendrą uždegiminį procesą [6].

Timolio įkapsuliavimas natūraliuose metilceliuliozės ir hidroksipropilmetilceliuliozės ftalato polimeruose gali tapti veiksmingu fitocheminiu adjuvantu arba tiksliniu vaistu infekcinėms ligoms gydyti. Mokslininkai nustatė, kad purkštuvinės džiovyklos metodu įkapsuliuotas į metilceliuliozės mikrosferas timolis, lyginant su laisvuoju timoliu, reikšmingai padidino biologinį aktyvumą [20].

Tyrimuose taip pat ištirtas galimai priešnavikinis vaistinio čiobrelio ekstraktų poveikis atskleidė chemoterapinį aktyvumą *in vitro* ląstelių linijose. Taikant MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido) tyrimą buvo įvertintas ekstrakto citotoksiškumas ir vėžio ląstelių linijų augimo slopinimas. Tyrimo metu nustatyta, kad vaistinio čiobrelio ekstraktas reikšmingai slopino 50 % vėžio ląstelių augimą, tirtose Hela ląstelių linijose [21].

1.2.2. Vaistinės juozažolės panaudojimo galimybės

Nepaisant šiek tiek kartaus vaistinės juozažolės skonio, šis yra panašus į mėtą ir dažnai naudojamas maisto pramonėje. Mokslinių tyrimų duomenimis, vaistažolės kaupiami biologiškai aktyvūs junginiai pasižymi intensyviomis antioksidacinėmis savybėmis [8]. Ekstraktų įkapsuliavimas didina jų antioksidacinį poveikį ir pailgina produkto galiojimo laiką. Taigi, dėl šios technologijos rinkoje atsiveria naujų galimybių didesniai produkto veiksmingumui pasiekti [18].

Juozažolė yra vienas iš svarbiausių medicininių augalų, naudojamų farmacijos pramonėje. Daugelyje tyrimų yra aprašytos antibakterinės, priešgrybelinės ir priešuždegiminės vaistinės juozažolės eterinio aliejaus savybės [5]. Pagal atliktus tyrimus matyti, kad vaistinės juozažolės ekstraktai yra naudojami prieš žmogaus imunodeficito virusą. Priešvirusinis augalo aktyvumas dažniausiai yra nustatomas dėl taninų, kavos rūgšties ir kitų didelės molekulinės masės junginių poveikio. Nustatyta, kad antibakteriniu ir priešgrybeliniu aktyvumu pasižymi pinokamfonas, izopinokamfonas ir β -pinenas [22].

1.3. Augalų biotechnologiniai metodai

Tobulėjant mokslui ir atsiradus didesniai suvokimui apie mikroskopijos pritaikymą, biocheminius metodus ir genetinės medžiagos manipuliacijas, naudojant mikroorganizmus, buvo atrasti ir pradėti taikyti nauji biotechnologiniai metodai. Pradėjus taikyti du pagrindinius metodus – augalų audinių kultūrų ir rekombinantinės DNR technologiją, įvyko svarbus augalų biotechnologijos proveržis [23].

1.3.1. Genų inžinerijos metodai

Siekiant pagerinti derlių ir antrinių metabolitų gamybą, taikant genų inžinerijos ir molekulinės biologijos metodus, galima sukurti augalus, atsparius virusams, bakterijoms, grybeliams, nematodams, herbicidams ir abiotiniam stresui [23].

Svarbiausi aspektai, kurie yra reikalingi įvykdyti genetines augalų modifikacijas:

1. aseptinė ląstelių, audinių arba augalo organų kultūra;
2. molekulinės biologijos įrankiai, kurie būtų pritaikyti genų perkėlimui į norimo augalo genomą DNR;
3. augalo gebėjimas regeneruoti iš genetiškai modifikuotų ląstelių organogenezės arba somatinės embriogenezės būdu [24].

DNR perkėlimas į augalus yra vienas iš pagrindinių etapų, reikalingų sukurti transgeninius augalus ir juose vykdyti trumpalaikę genų ekspresiją. Genetinei medžiagai transformuoti į ekonomiškai svarbius augalus yra naudojami fizikiniai, cheminiai ir biologiniai metodai. Dažniausiai genetinė medžiaga į augalo genomą yra perkeliama taikant mikroinjekciją, genų šautuvą, pernešimą polietilenglikoliu ar liposomas [25]. Genetinės medžiagos perkėlimas naudojant *Agrobacterium tumefaciens* bakteriją yra vienas pagrindinių metodų, naudojamų genetinėms transformacijoms atlikti. Šiuo metodu genetinė medžiaga į augalą yra perkeliama tiesioginiu būdu. Kitas būdas yra elektroporacija, kurios metu sumažinus ląstelės membranos pralaidumą į augalo ląstelę yra įterpiama rekombinantinė nukleorūgščių seka [26]. Metodo pasirinkimas priklauso nuo jo

efektyvumo perduoti genetinę informaciją į atitinkamą augalo ląstelę, eksplantų sugebėjimo regeneruoti ir nuo to ar pernešimas bus vykdomas į branduolio, ar į plastidžių genomą [25].

Augalų genų inžinerijos metodai yra pritaikyti žemės ūkio, maisto, energetikos ir aplinkosaugos srityse. Vis dėlto, svarbiausia augalų biotechnologijos pritaikymo sritis išlieka farmacijos pramonė. Transgeniniai augalai yra naudojami valgomoms vakcinoms, monokloniniams antikūnams, terapiniams vaistams, flavonoidams, taninams, baltymams, fermentams ir antibiotikams gaminti. Augalo genotipo pokyčiai lemia įvairių rekombinantinių baltymų, kurie sudaro antikūnus ir vakcinas, ekspresiją [23]. Svarbu paminėti, kad rekombinantiniai baltymai iš terapinių augalų yra išskiriami rekombinantinės DNR technologijos būdu. Visų pirma, siekiant suformuoti DNR konstrukta su norimomis savybėmis, reikia atlikti DNR manipuliaciją. Tolesnis rekombinantinės DNR technologijos etapas yra sukurti DNR konstrukto perkėlimas į atitinkamą augalą transgenezės būdu naudojant *Agrobacterium tumefaciens* bakteriją. Atrinkti augalai, kuriuose yra ekspresuojami genai, koduojantys reikiamus rekombinantinius baltymus, yra toliau dauginami. Galutinai sukauptas didelis rekombinantinių baltymų kiekis yra išgryninamas ir naudojamas vaistams bei vakcinoms gaminti [27].

1.3.2. Augalų audinių kultūros metodas

Augalų audinių kultūros *in vitro* metodas dažniausiai yra taikomas transgeniniams augalams, pasižymintiems specifinėmis agronominėmis savybėmis, auginti ir nykstančioms augalų rūšims išsaugoti. Įdomu tai, kad augalų ląstelių ir organų kultūrose yra sukauptas didelis antrinių metabolitų kiekis [28]. Svarbu paminėti, kad biologiškai aktyviųjų junginių kaupimas ląstelių kultūrose turi privalumų už junginių gavimą cheminės sintezės būdu, nes yra užtikrinamas natūralių junginių išskyrimas [29].

Atsižvelgus į kultivuojamą augalo dalį, augalų *in vitro* kultūros gali būti suskirstytos į:

1. ląstelių kultūras, kurioms priklauso lytinės ląstelės, ląstelių suspensija ir protoplastų kultūra;
2. audinių kultūras, kurioms priklauso kaliaus kultūrų ir diferencijuoti audiniai;
3. organų kultūras, kurioms priklauso visi kultivuojami augalo organai [28].

Kultivuojant augalų audinių kultūras *in vitro* svarbu pasirinkti tinkamą eksplantą ir terpę, reikalingą augalo audiniui diferencijuoti. Taip pat svarbu kontroliuoti aplinkos sąlygas ir prie *in vitro* suformuotų šiltnamio sąlygų adaptuoti regeneruotus augalus [30].

Biotechnologijos srityje, audinių kultūrų tyrimams *in vitro*, dažnai yra naudojamos kaliaus kultūros [4]. Kaliaus kultūra yra sudaryta iš amorfinės, laisvai išdėstytų plonasienių parenchiminių ląstelių masės, kuri susiformuoja augalo mechaninio pažeidimo vietoje iš besidalijančių pirminio audinio ląstelių [23]. Šio tipo audiniui atsirasti pakanka nedidelės pažeistos eksplanto dalies, o greitai besidalijančios ląstelės užtikrina didelį medžiagos kiekį, susiformuojantį per trumpą laiko tarpą. Taigi, kamieninės augalų ląstelės suteikia galimybę per trumpą laiką iš norimo augalo išgauti biologiškai aktyvius junginius [31]. Beveik bet kuri augalo dalis gali būti naudojama formuoti amorfinės bespalvės arba šviesiai rudas kaliaus kultūras [4]. Pasirinkus tinkamą motininį augalą ir organą, kuriame kaupėsi tikslinės, biologiškai aktyviosios medžiagos, bus išgaunamos didžiausios siekiamų junginių koncentracijos [32].

Kaliaus kultūroms auginti dažniausiai yra pasirenkama agaro terpė, praturtinta kultivavimui reikalingomis medžiagomis: druskomis, vitaminais, azotu, kalium ir fosforu. Tinkamoje terpėje kaliaus kultūros gali diferencijuotis į naują augalą. Šią savybę lemia somatinių augalo ląstelių totipotentiškumas [4]. Tai ypač svarbu nykstančioms ir retoms rūšims išsaugoti, nes per trumpą laiką iš nedidelio pradinių augalų kiekio yra išgaunama daug naujų, genetiškai identiškų augalų. Šiam tikslui pasiekti gali būti naudojamos augalo ląstelės, audiniai ar organai. Pritaikius audinių kultūros metodą, gaunama daug aukštos kokybės identiškų augalų, kuriems užauginti nėra naudojami pesticidai ir herbicidai [3]. Šis metodas yra greitesnis ir patogesnis, lyginant su terapinių junginių išgavimu iš gamtoje augančių augalų [33]. Augalų audinių kultūros nėra priklausomos nuo sezoninių pokyčių, dėl to galima tiksliau valdyti produkciją, taip pat per trumpą laiką išskirti tikslinį junginį, kas sąlygoja šio metodo pasirinkimą [34]. Taigi, augalų mikrodauginimo technologija yra veiksmingas būdas *in vitro* sąlygomis užauginti didelius kiekius sveikų ir genetiškai identiškų augalų, kurie vėliau galėtų būti naudojami komerciniais tikslais [3].

1.4. Notrelinių augalų kaliaus kultūros *in vitro*

Notrelinių augalų šeima kaupia skirtingų cheminių klasių junginius. Hidroksicinamono rūgštys, terpenoidai, flavonoidai, antocianinai, fenilpropanoidai, fitoekdistteroidai bei benzoksazinoidai – tai tik keletas cheminių junginių klasių, kurias kaupia notreliniai. Iš didelio junginių kiekio, didžiausiu biologiniu aktyvumu pasižymi fenoliniai junginiai ir eteriniai aliejai [10].

Siekiant skatinti antrinių metabolitų sintezę augaluose, rekomenduojama naudoti augalų audinių kultūrų metodą. Nuo 1960-ųjų metų antrinių metabolitų biosintezė tapo viena iš perspektyviausių šakų biotechnologijos pramonėje. Atsiradęs genetikos mokslas leido pritaikyti genetines manipuliacijas kaliaus kultūrų bei augalų audinių kultūrų tobulinimui. Suformuota kaliaus kultūra yra naudojama ląstelių suspensijos kultūroms gaminti, kurios yra vienas iš pagrindinių šaltinių, skirtų pakankamai antrinių metabolitų koncentracijai išgauti. Pramonėje ši technologija taikoma priešvėžiniams bei kitos rūšies terapiniams junginiams išskirti [4].

Kaliaus kultūroms suformuoti *in vitro* įtakos turi daugelis veiksnių. Svarbu pasirinkti tinkamą augalo rūšį bei eksplantą, tinkamas mitybinės terpės sudėtinės medžiagas ir fizines sąlygas. Jaunas eksplantas ir naudingi augimo reguliatoriai užtikrins ne tik spartų kaliaus kultūros augimą, bet ir antrinių metabolitų sintezę [35,36].

1.4.1. Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros *in vitro*

Mokslininkų žiniomis auksinai, sąveikaudami kartu su citokininais, teigiamai veikia augalų kaliaus kultūros formavimąsi. H. El-Bann'as 2017 m [33] atliko tyrimą su skirtingomis auksinų ir citokininų koncentracijomis, lemiančiomis vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros augimą ir antrinių metabolitų sintezę. Šiam bandymui atlikti į *Murashige Skoog'o* (MS) terpę buvo patalpintas apikalinis pumpuro eksplantas. Pradinė MS mitybinė terpė buvo papildyta skirtingomis 1-naftilacto rūgšties (NAR), 2,4-dichlorfenoksiacto rūgšties (2,4-D), 3-indolilacto rūgšties (IAR) koncentracijomis kartu su skirtingomis 6-benzilaminopurino (BAP) arba 6-furfurilamino purino (Kin) koncentracijomis. Atlikus bandymus, didžiausias kaliaus kultūros kiekis buvo nustatytas MS terpę papildžius 2 mg/l 2,4-D kartu su 1 mg/l Kin. Šie junginiai skatina ląstelių dalijimąsi, ilgėjimą ir ląstelių sienelių plastiškumą. Verta paminėti, kad maitinamąją terpę papildžius didesne nei 1 mg/l auksinų ir citokininų koncentracija yra efektyviai skatinama vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrų

iniciacija. Po kelių metų N. Mosavat'o ir bendraautorių 2019 m [37] atlikto tyrimo rezultatai sutapo su prieš tai aprašytais H. El-Bann'o tyrimo rezultatais. Įvertinus skirtingas kaliaus kultūrų mitybines terpes, didžiausias kaliaus kultūros priaugis (0,179 g) buvo nustatytas MS mitybinę terpę papildžius 2 mg/l 2,4-D ir 1 mg/l Kin fitohormonais.

Mokslininkų teigimu citokininas BAP ir auksinas NAR skatina augalo ląstelių dalijimąsi. K. Pawelec'o ir bendraautorių 2017 m [35] tyrimo tikslas buvo nustatyti tikslias augimo reguliatorių koncentracijos, kurios skatintų vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrų iniciaciją. Šiam tikslui augalo lapų eksplantai buvo patalpinti į MS terpę, kuri buvo papildyta skirtingomis BAP ir NAR koncentracijomis. Atlikus tyrimą nustatyta, kad didžiausia kaliaus kultūrų masė susiformavo mitybinę terpę papildžius 3 mg/l BAP ir NAR fitohormonais.

Kitaip nei K. Pawelec'as su bendraautoriais, D. Nicut'a su kolegomis 2016 m [38] tyrimo metu nustatė teigiamą sąveiką tarp 3-indolilbutano rūgšties (IBR) ir BAP, bei IAR ir BAP. Didžiausias vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros kiekis buvo suformuotas MS mitybinę terpę papildžius 0,1 mg/l IBR ir BAP, bei 0,5 mg/l IAR ir 1 mg/l BAP augimo reguliatoriais. Skirtingas fitohormonų poveikis vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrų iniciacijai ir priaugio suformavimui gali atsirasti dėl augalo genotipinių skirtumų, skirtingų eksplantų bei jų sąveikos su augimo reguliatoriais [35].

1.4.2. Vaistinės juozažolės kaliaus kultūros *in vitro*

Mokslininkai atlikdami augalų tyrimus *in vitro* siekia nustatyti tinkamus augimo reguliatorius, kurie paspartintų kaliaus kultūrų augimą ir antrinių metabolitų sintezę. G. Paksereshta'as su bendraautoriais 2016 m [5] atliko vaistinės juozažolės kaliaus kultūrų analizę, kurios metu buvo vertinama skirtingų BAP ir NAR koncentracijų įtaka kaliaus kultūrų iniciacijai. Kaliaus kultūroms suformuoti į MS mitybinę terpę buvo patalpinti lapų ir stiebų eksplantai. Ištyrus skirtingų koncentracijų augimo reguliatorių poveikį kaliaus kultūroms inicijuoti, nustatytas reikšmingas 0,5 mg/l NAR ir BAP fitohormonų poveikis. Stiebo eksplanto pažaidos vietoje didžiausias kaliaus kultūros masės priaugis buvo nustatytas terpę papildžius 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP. Didžiausias kaliaus kultūros augimo greitis pažeistoje lapo eksplanto dalyje buvo nustatytas maitinamąją terpę papildžius 0,5 mg/l NAR ir BAP bei NAR koncentraciją padidinus iki 2 mg/l. Taigi, šie augimo reguliatoriai yra reikalingi kaliaus kultūrai *in vitro* inicijuoti ir didesniai masės priaugiu suformuoti.

Kitaip nei G. Paksereshta'as, S. Tayefeh'as su kolegomis 2018 m [39] nustatė reikšmingą vaistinės juozažolės kaliaus kultūros ir 2,4-D bei NAR fitohormonų sąsają. Didžiausias kaliaus kultūros priaugis buvo nustatytas MS mitybinę terpę papildžius 0,5 mg/l 2,4-D ir 0,2 mg/l NAR augimo reguliatoriais.

Po kelių metų Y. Darwish'as su bendraautoriais [40] atliko tyrimą, kurio metu nustatė reikšmingą 2,4-D ir Kin poveikį vaistinės juozažolės antrinių metabolitų sintezei. Vaistinės juozažolės kaliaus kultūros MS mitybinę terpę papildžius 2 mg/l 2,4-D ir Kin fitohormonais rozmarino rūgšties koncentracija padidėjo 6,5 %.

1.5. Kaliaus kultūrų kaupiami antriniai metabolitai

Išskiriami du pagrindiniai kaliaus kultūros metodo etapai, kurie yra būtini terapiniams junginiams išgauti. Pirmasis iš jų yra skirtas didžiausiam kaliaus kultūros masės suformavimui, o sekantis –

antrinių metabolitų sintezei. Biologiškai aktyviems junginiam išskirti dažniausiai yra taikomi kaliaus kultūrų ir ląstelių suspensijos metodai [41].

Praktikoje siekiant didinti antrinių metabolitų sintezę yra naudojami natūralūs augimo reguliatoriai – fitohormonai. Dažniausiai yra naudojami natūralūs auksinai, citokininai, giberelinai, tačiau gali būti taikomi ir sintetiniai jų analogai [36]. Norint pasiekti didžiausią išskiriamų antrinių metabolitų koncentraciją taip pat svarbu naudoti elicitorius, kurie skatina svarbių augalo genomo dalių transkripciją ir sąlygoja antrinių metabolitų sintezę. Pagrindiniai elicitorių tipai yra biotiniai ir abiotiniai. Biotiniams elicitoriams priklauso pektinas, pektino rūgštis, chitinas, chitozanas bei gliukanai. Tuo tarpu fiziniai abiotiniai elicitoriai yra aukšta temperatūra, ultravioletinė spinduliuotė ir osmosinis slėgis [34]. Taip pat yra svarbi cheminių elicitorių klasė, kuri apima augalų signalines molekules. Metilžazmonatas, salicilo rūgštis ir azoto oksidas yra cheminiai elicitoriai, kurie skatina izoflavonoidų, terpenų, fitosterolių ir fenilpropanoidų sintezę [42].

Pagal atliktus tyrimus mokslininkai yra nustatę kaliaus kultūrų kaupiamus skirtingų klasių junginius. Biologiškai aktyvūs junginiai, kurie yra išskiriami iš *in vitro* kaliaus ir ląstelių suspensijos kultūrų, nurodyti 1.1 lentelėje [41].

1.1 lentelė. Augalų audinių kultūrų kaupiami antriniai metabolitai [41]

Alkaloidai	Terpenoidai	Steroidai	Chinonai	Fenilpropanoidai
Betalainai	Diterpenai	Digoksinas	Alavijo emodinas	Antocianinai
Chinolizidinas	Monoterpenai	Digitoksinas	Antrachinonai	Kavos rūgštis
Indolo alkaloidai	Paklitakselis	Ouabainas	Emodinas	Kumarinai
Izochinolino alkaloidai	Seskviterpenai	Steroidiniai glikozidai	Benzochinonai	Eugenolis
Piperidinas	Triterpenai ir kt.	Steroidiniai laktonai ir kt.	Naftochinonai	Flavonoidai
Tropano alkaloidai ir kt.			Timochinonas ir kt.	Ferulo rūgštis
				Izoflavonoidai ir kt.

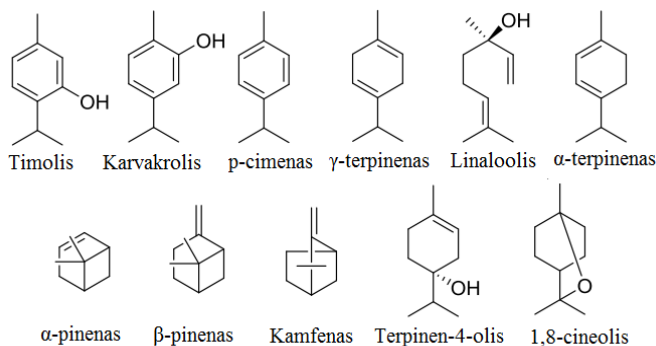
1.6. Vaistinio čiobreljo antriniai metabolitai

Didžiąją dalį vaistinio čiobreljo antrinių metabolitų apima eteriniai aliejai. Juos sudaro lakūs ir mažos molekulinės masės terpenai, terpenų alkoholiai, esteriai ir fenoliniai junginiai. Atkreiptinas dėmesys, kad koncentruoti eteriniai aliejai ir jų cheminė sudėtis yra pagrindinis mokslininkų tyrimų objektas. Fitocheminės analizės metu buvo nustatyti nelakieji, vaistinio augalio kaupiami, organiniai junginiai – fenilpropanoidai, lignanai, taninai, organinės rūgštys ir fitosteroliai [13]. Svarbu paminėti, kad procentinę prekyboje parduodamo vaistinio čiobreljo eterinio aliejaus cheminę sudėtį sudaro timolis (23–60 %), γ -terpinenas (18–50 %), *p*-cimenas (8–44 %), karvakrolis (2–8 %) ir linaloolis (3–4 %) [44]. Džiovintoje vaistažolėje eterinio aliejaus yra nustatoma iki 2,5 % [44].

1.6.1. Vaistiniame čiobrelyje kaupiami terpenai

Terpenai yra viena iš didžiausių ir įvairiausių antrinių metabolitų klasių. Didžioji dalis terpenų yra toksiški ir dalyvauja apsauginiuose augalo mechanizmuose [45]. Monoterpenai ir seskviterpenai yra atsakingi už augalo atsparumą nuo kenkėjų [41].

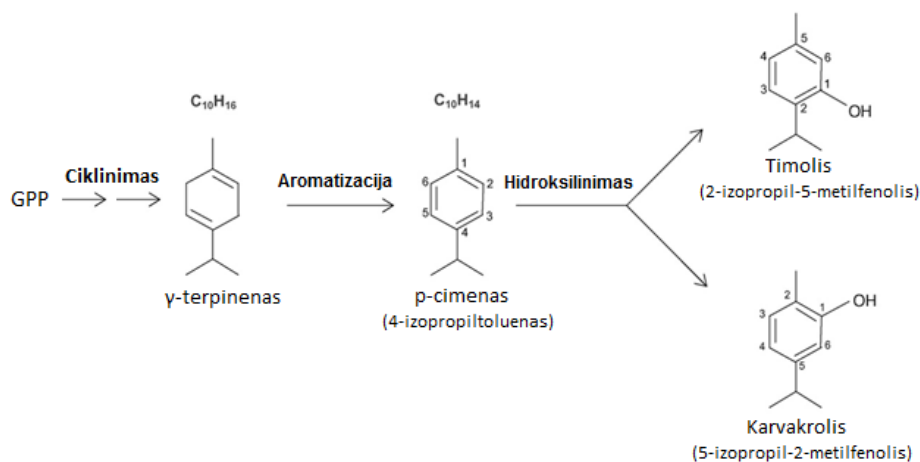
Vaistiniame čiobrelyje yra nustatytas pakankamas monoterpenų grupės medžiagų kiekis. Vyraujantys šios grupės junginiai yra timolis (10–64 %), karvakrolis (0,4–20,6 %), *p*-cimenas (9,1–22,2 %), α -pinenas (0,9–6,6 %), linaloolis (2,2–4,8 %), 1,8-cineolis (0,2–14,2 %), γ -terpinenas (5–10%), kamfenas, α -terpinenas, β -pinenas ir terpinen-4-olis [13]. Pagrindinių, vaistinių čiobrelių sudarančių, monoterpeno klasės junginių cheminė struktūra pavaizduota 1.1 pav.



1.1 pav. Svarbiausių monoterpenų klasės junginių cheminė struktūra [6]

Didžiausią vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus koncentraciją sudaro monoterpenas timolis (53,26 %) ir jo izomeras karvakrolis (8,7 %) [46]. Timolis yra apibūdinamas kaip bespalvis, kristalinės struktūros junginys, kuris išsiskiria stipriu kvapu ir geru tirpumu alkoholyje bei kituose organiniuose tirpikliuose. Kitaip nei timolis, karvakrolis yra šviesiai gelsvos spalvos skystis, kuris gerai tirpsta etanolyje, acetone ir dietilo eteryje [47]. Timolis ir karvakrolis yra kaupiami antžeminių augalo dalių plastidžių liaukų trichomose [48]. Fenolinė grupė esanti timolyje apsaugo nuo žalingų laisvųjų radikalų poveikio neutralizuodama šias molekules [49]. Įdomu tai, kad šie junginiai yra atsakingi už antibakterinį vaistažolės poveikį. Anot mokslininkų, timolis ir karvakrolis veikdamas per hidroksilinę grupę sąveikauja su bakterijų citoplazmine membrana, tokiu būdu pakeičia jos stabilumą ir suardydamas lipidinį sluoksnį sąlygoja bakterijos žūtį [19].

Terpenoidų sintezė augaluose vyksta dvejais pagrindiniais etapais. Pirmasis iš jų yra mevalonato (MVA) etapas vykstantis citozolyje, antrasis yra 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEF) etapas, kuris vyksta augalo plastidėse [13]. Pagal atliktus tyrimus nustatyta, kad timolio ir karvakrolio sintezė vyksta per dviejų etapų oksidacijos reakcijas citochromui P450 katalizuojant γ -terpineną (žr. 1.2 pav.) [47].



1.2 pav. Timolio ir karvakrolio biosintezės schemą [50]

1.6.2. Vaistiniame čiobrelėje kaupiami fenoliniai junginiai

Fenolinių junginių sintezė vyksta fenilpropanoidiniu keliu. Fenoliniai junginiai yra skirstomi į fenilpropanoidus, kumarinus, benzoinės rūgšties darinius bei sudėtingesnės struktūros junginius – flavonoidus, stilbenus ir taninus. Žinoma, kad daugelis notrelinių šeimos augalų kaupia dideles fenolinių junginių koncentracijas [51].

Iki šiol yra nustatyta 60 skirtingų augalo kaupiamų flavonoidų. Pagrindinės flavonoidų klasės, nustatytos vaistiniame čiobrelėje yra flavonai, flavonoliai ir fenilpropanoidai. Luteolinas ir apigeninas yra pagrindiniai vaistiniame čiobrelėje nustatyti flavonai. Svarbu paminėti, kad didelę vaistažolės koncentraciją sudaro flavonoliai – rutinas ir kvercetas bei fenilpropanoidai – ferulo rūgštis, kavos rūgštis, benzoinė rūgštis ir galo rūgštis [13]. Mokslininkų teigimu, siekiant pagerinti fenolinių junginių sintezę vaistinio čiobrelės ūgliuose yra naudojamos *Pseudomonas* genties bakterijos [52].

Fenoliniai junginiai yra sulaukę didelio susidomėjimo dėl tyrimais patvirtintų antioksidacinių savybių. Biologiškai aktyvūs junginiai augalo ląsteles apsaugo nuo oksidacinės pažeidimo, kuri yra reaktyviųjų deguonies formų ar laisvųjų radikalų poveikio rezultatas [2]. Šios savybės gali būti pritaikytos maisto saugumui ir produkto galiojimo laikui didinti. Viena iš pagrindinių maisto produkto kokybės blogėjimo priežasčių yra lipidų peroksidacija. Lipidų peroksidacijos metu susiformavę laisvieji radikalai ir reaktyviosios deguonies formos sukelia ląstelių pažeidimą ir turi įtakos kancerogenezės, uždegimo ir senėjimo procesams bei širdies ir kraujagyslių ligoms vystytis. Vienas iš būdų, siekiant sumažinti kenksmingų oksidacijos produktų susidarymą ir išsaugoti maistinę vertę, yra natūralių antioksidacinių junginių panaudojimas [53]. Atsisakius sintetinių konservantų – butilinto hidroksitolueno ir hidroksianizolo butilato bei juos pakeitus natūraliais, biologiškai aktyviais junginiais, būtų reikšmingai sumažintas neigiamas poveikis organizmui [49].

1.7. Vaistinės juozažolės antriniai metabolitai

Pagal mokslinius tyrimus nustatyta, kad monoterpenai, seskviterpenai ir oksiduotos junginių komponentės (alkoholiai, aldehydai, esteriai ir fenoliniai junginiai) yra pagrindinės vaistinės juozažolės kaupiamos cheminių junginių grupės. Kaupiami junginiai pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu, kuris yra vienas iš svarbiausių augalo ekstrakto savybių [18].

1.7.1. Vaistinėje juozažolėje kaupiami terpenai

Bicikliniai monoterpeno ketonai – pinokamfonas (*trans*-pinokamfonas) ir izo-pinokamfonas (*cis*-pinokamfonas) yra pagrindiniai vaistinės juozažolės eterinį aliejų sudarantys junginiai. Jų koncentracija vaistinio augalo ekstrakto sudaro iki 41 % [54]. Didžiausią, prekyboje parduodamas vaistinės juozažolės eterinio aliejaus, koncentraciją sudaro *cis*-pinokamfonas, pinokarvonas ir β -pinenas. Žinoma, kad pinokamfonas vartojamas per burną sukelia traukulius ir gali turėti įtakos epilepsijos priepuoliams atsirasti. Dėl šio nepageidaujamo šalutinio poveikio vaistinės juozažolės eterinis aliejus yra skirtas tik išoriniam naudojimui [55].

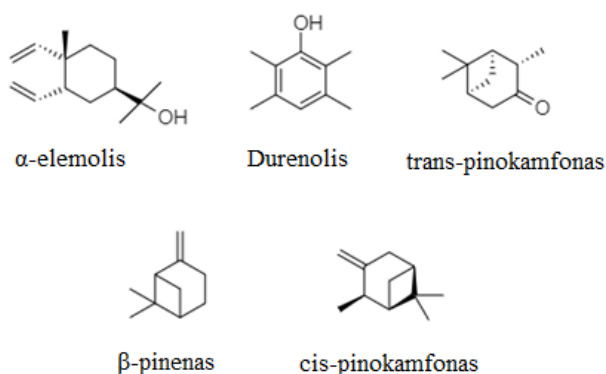
Atlikus cheminę eterinio aliejaus analizę nustatyta, kad vaistinė juozažolė taip pat kaupia mirtenilacetatą, α -pineną, 1,8-cineolą, pinokarvoną ir linaloolį [56]. Nepaisant to, daugėjant atliekamų mokslinių tyrimų yra nustatoma skirtinga eterinių aliejų sudarančių junginių sudėtis. Šiuos skirtumus lemia augalų paplitimas po skirtingus pasaulio regionus, klimato pokyčiai, skirtingi

išskyrimo metodai ir skirtingi eksplantai. V. Pandej'os ir bendraautorių 2013 m [55] paskelbtame tyrime buvo stebima vaistinės juozažolės, augintos skirtinguose pasaulio regionuose, kaupiamų junginių įvairovė (žr. 1.2 lentelę).

1.2 lentelė. Vaistinės juozažolės eterinį aliejų sudarantys junginiai pagal auginamą [55]

Šalis	Pagrindiniai junginiai
Iranas	Timolis (18,95 %), β -bisabololis (16,62 %), karvakrolis (7,73 %), <i>n</i> -dodekanas (5,23 %).
Lenkija	Izopinokamfonas (41,97%), elemolis (17,21 %).
Egiptas	β -pinenas (19,60%), pinokamfonas (19,20 %), kamparas (16,3 %).

Kitaip nei V. Pandej'a, H.A.H. Said-Al Ahl'as ir bendraautoriai 2015 m [54] atlikę tyrimą teigė, kad didžiausią vaistinės juozažolės, kultivuojamos Egipte, koncentraciją sudarė β -pinenas, *cis*-pinokamfonas, *trans*-pinokamfonas, α -elemolis bei durenolis (žr. 1.3 pav.). Pagal H. Mohamadpoor'os ir bendraautorių 2019 m [57] tyrimo rezultatus antioksidacinį augalo aktyvumą lemia pinokamfonas, *cis*-pinokamfonas, β -pinenas ir kamparas. Įdomu tai, kad antioksidacinis pinokamfono aktyvumas iki šiol nebuvo ištirtas ir aprašytas literatūroje.



1.3 pav. Pagrindinių, eterinį aliejų sudarančių, junginių cheminės struktūros [54]

1.7.2. Vaistinėje juozažolėje kaupiami fenoliniai junginiai

Vaistinės juozažolės fitocheminės analizės metu buvo nustatyti flavonoidų glikozidai – izokvercitrinas, rutininas ir kvercitrinas bei flavonoidų aglikonai – kvercetas ir luteolinas. Ištyrus nustatyta, kad didžiausią vaistinės juozažolės flavonoidų koncentraciją sudaro izokvercetas [18]. Mokslininkai taip pat yra nustatę vaistinės juozažolės ekstrakto sukauptą rozmarino, kaftaro, chlorogeno, *p*-kumaro, ferulo ir kavos rūgštį [58].

1.8. Notrelinių augalų antibakterinis aktyvumas

Pastaraisiais metais yra stebimas gerokai išaugęs bakterijų, atsparių įvairiems antibiotikams, skaičius. Tai yra vienas iš pavojų su kuriuo susiduria visuomenė. Dėl šios priežasties mokslininkai tiria skirtingus natūralius junginius, kurie būtų veiksmingi prieš antibiotikams atsparias bakterijas [59]. Padidėjęs bakterijų atsparumas antibiotikams ir naujų antibiotikų stygius rinkoje sąlygojo poreikį ieškoti alternatyvių būdų kovai prieš vaistiniams preparatams atsparių bakterijų sukeltas infekcijas. Siekiant padidinti antibakterinio poveikio veiksmingumą pradėti naudoti augalų eteriniai aliejai. Derinant antibiotikus kartu su eteriniais aliejais yra sumažinama minimali koncentracija reikalinga mikroorganizmui slopinti. Literatūros duomenimis, didžiausias poveikis prieš bakterijas yra stebimas eterinius aliejus derinant kartu su amikacinu, chloramfenikoliu, β -laktamais ir fluorochinolonais [60].

Augalų kaupiami antriniai metabolitai pasižymi natūraliomis antibakterinėmis savybėmis dėl to išskirti iš eterinių aliejų gali pakeisti pramonėje naudojamus cheminius konservantus ir sumažinti jų sukeltą šalutinį poveikį žmogaus sveikatai.

Kosmetikos pramonėje didžiąją dalį naudojamų konservantų sudaro dirbtinai susintetinti cheminiai junginiai. Fenoksietanolis, benzilo alkoholis, dehidroacetatinė rūgštis ir parabenai yra vieni iš dažniausiai naudojamų konservantų kosmetikos pramonėje. Naudojami junginiai neigiamai veikia odą ir gali turėti kancerogeninį poveikį. Eteriniai aliejai, išskirti iš *in vitro* sąlygomis augančių augalų, pasižymi natūraliomis antibakterinėmis savybėmis. Taigi, kosmetikos pramonėje turi didesnę pranašumą ir tolesnę perspektyvą, nei sintetiniai konservantai, nes suteikia ilgesnį kosmetikos produkto galiojimo laiką bei užtikrina vartojamo produkto saugumą [59].

1.8.1. Vaistinio čiobrelio antibakterinis aktyvumas

Daugelis notrelinių augalų šeimos rūšių pasižymi antibakteriniu aktyvumu. K. Kon'as ir M. Rai'as 2012 m [61] atliktoje studijoje didžiausią vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus koncentraciją sudarantys karvakrolis (62,3 %), γ -terpinenas (15,8 %) ir *p*-cimenas (6,00 %) slopino gramneigiamos *E. coli* ir gramteigiamos *S. aureus* bakterijų augimą.

Xanthomonas bakterijų gentis yra viena iš dažniausių daržovių ir grūdinių kultūrų ligų sukėlėjų. Analizuojant tyrimų rezultatus nustatyta, kad šios genties bakterijos įgavo atsparumą prieš naudojamus kanamicino, ampicilino, penicilino ir streptomicino antibiotikus. K. Chudasama'as ir V. Thaker'ė 2012 m [62] atlikę vaistinio čiobrelio ekstrakto tyrimą nustatė reikšmingą antibakterinį poveikį prieš *X. campestris* pv. *citri* bakterijos augimą. Antibakterinio tyrimo metu nustatyta slopinimo zona siekė 23,66 mm. Gauti rezultatai gali būti naudingi tolimesniuose tyrimuose efektyvaus vaistinio čiobrelio ekstrakto ir antibiotiko derinio paieškai. Antibakterinis vaistinio čiobrelio aktyvumas yra siejamas su kamfenu, terpinenu, α -pinenu, β -pinenu, *p*-cimenu ir limonenu.

S. Valizadeh'a su bendraautorais 2016 m [63] atlikę vaistinio čiobrelio tyrimus nustatė, kad didžiausią eterinio aliejaus koncentraciją sudarė timolis (64,45 %), γ -terpinenas (9,22 %) ir *p*-cimenas (6,18 %). Vaistinio čiobrelio ekstraktai gauti vandens garų distiliacijos metodu ir ištirpinti dimetilsulfokside turėjo reikšmingą antibakterinį poveikį prieš *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* ir *Escherichia coli* bakterijas. Anot mokslininkų, gramteigiamos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *B. cereus* bakterijos, palyginus su gramneigiamomis, buvo jautresnės vaistinio čiobrelio ekstrakto ir eterinio aliejaus poveikiui. Didėjant vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus koncentracijai reikšmingai didėja antibakterinis poveikis.

Svarbu paminėti M. Kryvtsova'os ir bendraautorų 2019 m [64] atliktą tyrimą, kurio metu buvo siekiama nustatyti vaistinio čiobrelio junginius, slopinančius biofilmą. Tyrimo metu nustatyta, kad mažiausia vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus koncentracija (0,01 %) *S. aureus* biofilmo destrukciją slopino 53 %. Didžiausią poveikį turėjo 0,1 % koncentracijos vaistinio čiobrelio ekstraktas suardęs 81,5 % *S. aureus* bakterijų biofilmo. Antibakterinis eterinių aliejų poveikis, prieš skirtingas bakterijas, leidžia daryti išvadą, kad eteriniai aliejai gali būti naudojami gydymo tikslais, ypač tais atvejais, kai dėl įvairių medicininių priežasčių negalima skirti antibiotikų.

1.8.2. Vaistinės juozažolės antibakterinis aktyvumas

Literatūros duomenimis, vaistinės juozažolės ekstraktai slopina gramneigiamų ir gramteigiamų bakterijų augimą. N. Dehghanzadeh'os ir bendraautorių 2012 m [65] gauti bandymo rezultatai patvirtino vaistinės juozažolės eterinio aliejaus antibakterinį poveikį prieš *Erwinia amylovora* ir *Klebsiella* genties bakterijas. Didžiaja dalimi šių bakterijų vystymąsi stabdo kumino aldehidas ir linaloolis, kurie pasižymi stipriausiu antibakteriniu poveikiu. Nepaisant to, daugelyje atliktų tyrimų yra teigiama, kad didžiausią antibakterinį poveikį turi timolis ir karvakrolis, nes jų koncentracijos eteriniame aliejuje išlieka didžiausios.

Nustatyta, kad vaistinės juozažolės eterinis aliejus taip pat turi savybių stabdančių *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* ir *Escherichia coli* bakterijų augimą [55]. Atlikus antibakterinio aktyvumo tyrimą agaru skiedimo metodu I. Stappen'a su bendraautoriais 2014 m. [66] nustatė reikšmingą, eterinį aliejų sudarančių junginių, poveikį prieš *Salmonella abony* ir *Pseudomonas aeruginosa* bakterijas. Tyrimo metu didžiausią eterinio aliejaus koncentraciją sudarė pinokarvonas, *cis*-pinokamfonas, β -pinenas bei *trans*-pinokamfonas. Atlikti moksliniai tyrimai taip pat patvirtina vaistinės juozažolės eterinio aliejaus poveikį, slopinantį *Xanthomonas campestris* bakterijos augimą [67].

Mikroorganizmų geba formuoti biofilmą, kuris sąlygoja didelį atsparumą antibiotikams, yra būdinga daugeliui lėtinių ligų. Siekiant nustatyti junginius, slopinančius mikroorganizmų augimą M. Hassanshahian'as su bendraautoriais 2019 m [7] atliko vaistinės juozažolės etanolinio ir metanolinio ekstrakto antibakterinio poveikio tyrimą. Etanolinis vaistinės juozažolės ekstraktas pasižymėjo didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *E. coli* bakteriją. Tuo tarpu metanolinis ekstraktas prieš *B. cereus* biofilmo formavimąsi buvo mažiau veiksmingas. Išsamesnės analizės duomenimis antibakterinį augalo poveikį lėmė verbenonas, piranas, furanas ir ciklopropanas. Verta paminėti, kad vaistinės juozažolės eterinis aliejus reikšmingiau slopino biofilmo formavimąsi, nei biofilmo destrukciją.

1.9. Ateities perspektyvos

Baltymų ir ligandų sąveika yra svarbus molekulinės sąveikos tipas, kuris yra svarbus vaistų kūrimo procese. Šiuo metodu yra nustatomi baltymo receptoriaus ir ligando jungimosi būdai bei jungimosi giminingumas. Didėjant susirūpinimui dėl COVID-19 infekcijos yra ieškoma alternatyvių gydymo ir apsaugos metodų. Vaistinio čiobreljo eterinio aliejaus sudėtyje esančių timolio ir karvakrolio panaudojimas medicininiam produktams kurti gali būti vienas iš sprendimų kovai prieš infekciją [47].

Vertinant vaistinio čiobreljo eterinio aliejaus poveikį, koronavirusu sergančių pacientų simptomams slopinti, buvo nustatytas reikšmingas terapinis poveikis. Tyrimo rezultatai parodė teigiamą eterinio aliejaus poveikį karščiavimo, dusulio, kosulio, raumenų skausmo ir nuovargio simptomams lengvinti [68].

Atlikus išsamius tyrimus nustatyta, kad viruso S1 baltymo subvienetas, kitaip vadinamas receptoriniu domenu, atlieka svarbią funkciją, nes jungdamasis prie ACE2 peptidazės domeno inicijuoja prisijungimą prie ląstelės paviršiaus. S1 subvienetas turi didelę klinikinę reikšmę, nes jo slopinimas gali sąlygoti struktūrinius S baltymo pokyčius ir tokiu būdu sutrikdyti viruso tvirtinimąsi prie ląstelės paviršiaus [69]. Moksliniais tyrimais buvo įrodyta, kad karvakrolis ir timolis

pasižymėjo geresnėmis jungimosi giminingumo savybėmis, nei kiti ligandai. Mokslininkų įžvalgos apie dviejų svarbiausių vaistinio čiobrelio eterinių aliejų sudarančių junginių – timolio ir karvakrolio panaudojimą suteikė naujų galimybių kovai prieš pasaulį sukausčiusią infekciją. Pagal mokslinius tyrimus, prieš COVID-19 infekciją Jungtinių Valstijų aplinkos apsaugos agentūra į dezinfekavimo priemonių sąrašą įtraukė preparatus, kurių veiklioji medžiaga yra timolis. Svarbu paminėti, kad vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus preparatai, atitinkantys nacionalinės farmakopėjos arba Europos farmakopėjos reikalavimus, taip pat gali būti naudojami vaistiniams preparatams gaminti. Nepaisant to, siekiant patvirtinti biologiškai aktyviųjų junginių panaudojimą prieš COVID-19 infekciją yra reikalingi tolimesni tyrimai bei sukurto vaistinio preparato patvirtinimas [47].

1.10. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Notrelinių šeimos augalai pasižymi stipriomis antibakterinėmis, antioksidacinėmis ir priešgrybelinėmis savybėmis. *In vitro* sąlygomis suformuotos augalų kaliaus kultūros sukaupia didesnius biologiškai aktyviųjų junginių kiekius. Siekiant išgauti kuo didesnės koncentracijos, aukštesnės kokybės ir didesnės pridėtinės vertės junginius yra naudojami fitohormonai. Jie yra vieni iš svarbiausių medžiagų, reikalingų biologiškai aktyviems junginiams išgauti.

Tyrimo tikslas buvo nustatyti fitohormonų derinius didžiausiai antrinių metabolitų, pasižyminčių antibakterinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis, koncentracijai išgauti. Medicinoje, maisto pramonėje ir veterinarijoje naudojami tam tikri biologiškai aktyvūs junginiai turi sudaryti minimalias produktams reikalingas koncentracijas. Didėjant natūralių junginių paklausai būtina sukurti technologiją, kuri užtikrintų didžiausias sukauptų antrinių metabolitų koncentracijas. Šiam tikslui pasiekti reikalingi tolimesni tyrimai. Neabejotina, kad medicininiai preparatai su aukštos kokybės biologiškai aktyviais junginiais vaistų pramonėje kuria didelę pridėtinę vertę.

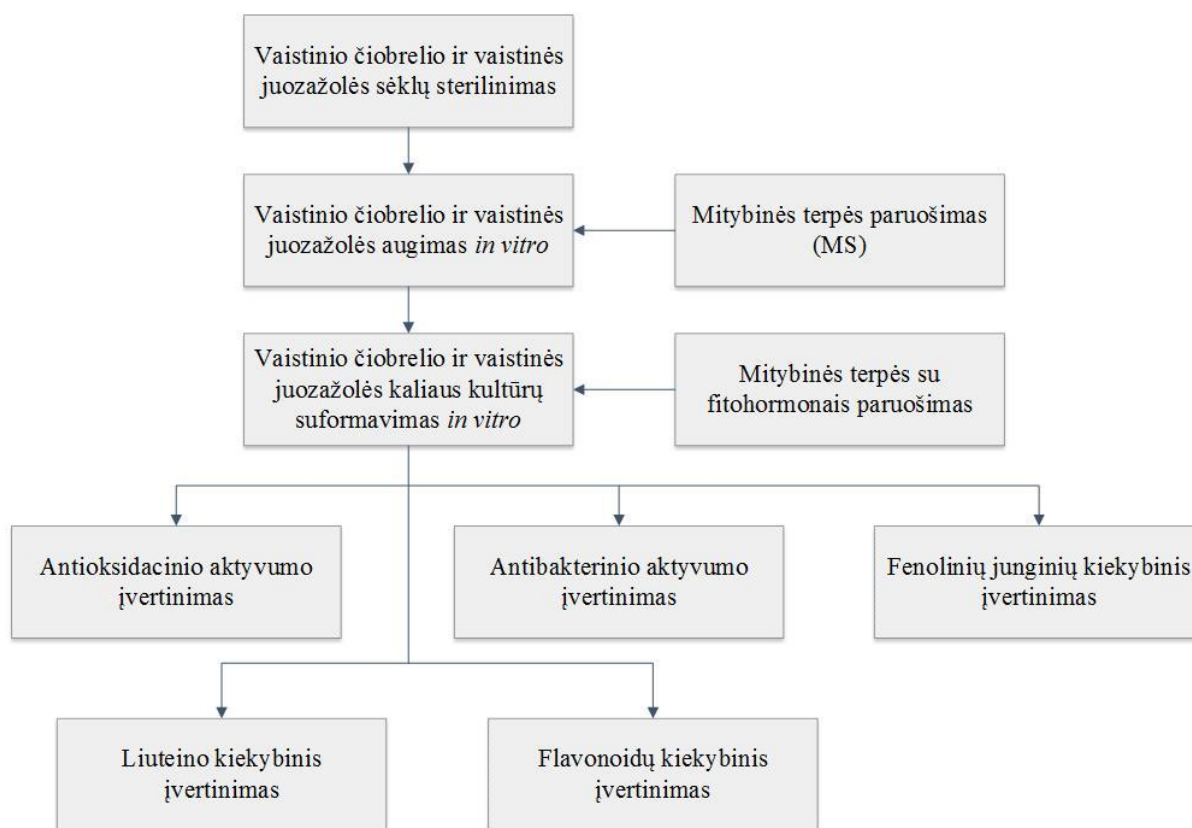
2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimų planavimas ir tyrimų objektas

Atlikus literatūros apžvalgą, tyrimams buvo pasirinkta tirti vaistinius notrelinių (lot. *Lamiaceae*) šeimos augalus. Siekiant nustatyti antibakterinį, antioksidacinį ir fitocheminį vaistinių augalų poveikį *in vitro* buvo naudotos vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.) ir vaistinės juozažolės (lot. *Hyssopus officinalis* L.) komercinės sėklos. Mokslinis darbas buvo atliktas Kauno technologijos universiteto, Cheminės technologijos fakulteto, Biotechnologijos laboratorijoje.

2.2. Tyrimų eiga

Siekiant įgyvendinti iškeltą tiriamojo projekto tikslą ir uždavinius buvo sudaryta tyrimų eigos schema. Tyrimai buvo atliekami vadovaujantis sudaryta schema, kuri nurodyta 2.1 pav.



2.1 pav. Tyrimų eigos schema

2.3. Tyrimų metu naudoti prietaisai

Tyrimuose naudoti prietaisai ir jų gamintojai yra pateikiami 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Tyrimams naudoti prietaisai

Nr.	Laboratoriniai prietaisai	Gamintojas
1.	Kratytuvas ZX3	VELP Scientific
2.	Termostatuojamas kratytuvas <i>Environmental Shaker-Incubator ES-20</i>	Biosan
3.	Svarstyklės ATX84	Shimadzu
4.	Centrifuga UNIVERSAL 320R	HETTICH
5.	Laminaras BV-100 <i>Laminar Flow Cabinet</i>	Telstar
6.	pH-metras	WinLab
7.	Termostatas	Binder
8.	Termostatinė vonelė ULTRATHERM BWT-U	Biosan
10.	Distiliatorius <i>Elix Type 2 Water Purification Systems</i>	Merc
11.	Spektrofotometras UV-1280 <i>UV-VIS Spectrophotometer</i>	Shimadzu
12.	Mikrocentrifuga D-6015 <i>Mini Centrifuge</i>	neoLab

2.4. Tyrimų metu naudoti reagentai

Žemiau yra nurodytas tyrimuose naudotų reagentų sąrašas:

1. C₂H₅OH (70 %);
2. NaOH (0,1 N)
3. Fosfatinis buferis (0,2 M; pH=6,6)
4. K₃[Fe(CN)₆] (1 %);
5. Trichloracto rūgštis (10 %);
6. FeCl₃ (0,1 %);
7. DPPH;
8. ABTS[•] (2 mM);
9. K₂S₂O₈ (0,17 mM)
10. Fosfatinis buferis (20 mM; pH=7,4);
11. Acetatinis buferis (300 mM; pH=3,6);
12. TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) (10 mM);
13. HCl (40 mmol/l);
14. FeCl₃•6H₂O (20 mmol/l);
15. DTT (ditiotritolis) (1 mM);
16. Fenilmetilsulfonilfluoridas (0,5 mM);
17. DMSO (dimetilsulfoksidas);
18. Polivinilpirolidonas;
19. Bradfordo reagentas;
20. Tris-HCl buferis (200 mM, pH=7,8),
21. L-metioninas (100 mM),
22. Nitromėlynasis tetrazolis (540 μM);
23. Tritonas X-100 (0,1 %);
24. Riboflavinas (300 μM);
25. Tanino rūgšties tirpalas (0,25 mg/ml);

26. Na₂CO₃ (7,5 %);
27. Folin-Ciocalteu'o reagentas;
28. Acetonas (70 %);
29. Kvercetas (1 mg/ml);
30. C₂H₅OH (80 %);
31. AlCl₃ (2 %);
32. CH₃OH.

2.5. Vaistinio čiobrelis sėklų sterilinimas

Sterilinimas buvo vykdytas laminaro sąlygomis sėklas 90 sek. mirkant į 70 % C₂H₅OH tirpalą, vėliau jos buvo pamerktos 10 min. į 0,1 % HgCl₂ tirpalą. Atlikus sterilinimą, sėklos 3 kartus plautos steriliu dH₂O [70].

2.6. Vaistinės juozažolės sėklų sterilinimas

Sterilinimas buvo vykdytas laminaro sąlygomis sėklas 12 min. mirkant į 0,1 % HgCl₂ tirpalą. Atlikus sterilinimą sėklos 3 kartus buvo plautos steriliu dH₂O [71].

2.7. Mitybinių terpių paruošimas

Siekiant užtikrinti optimalų augalo ląstelių augimą yra reikalinga mitybinė terpė bei tam tikros temperatūros ir šviesos sąlygos. Augalų sėkloms kultivuoti buvo pasirinkta MS terpė, kurią sudaro mikro ir makroelementai, geležies ir anglies priedas bei organiniai priedai [72] (žr. 1 priedą). Buvo pasirinktas optimalus terpės pH = 5,7, kuris reguliuotas su 0,1 N NaOH. Reagentai ir jų kiekis, reikalingi paruošti 1 l MS terpės nurodyti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Reagentai ir jų kiekis reikalingi 1 l MS terpės paruošti

Reagentai	Reagentų kiekiai reikalingi 1 l terpės
Makro druskos	50 ml
Mikro druskos	5 ml
Fe-EDTA	5 ml
Sacharozė	30 g
Agaras	5 g
Organiniai priedai	5 ml

Siekiant išvengti užterštumo, maitinamoji terpė 15 min. 120 °C temperatūroje, nustačius 0,75–1 atm. slėgį, buvo sterilinta autoklave. Augalų kultivavimas vykdytas 20–22 °C temperatūroje, fotoperiodo trukmė siekė 24 valandas. Norint užtikrinti reikiamą maistinių medžiagų kiekį, eksplantai kas 30 d. buvo perkelti į šviežią maitinamąją terpę. Priklausomai nuo tiriamos vaistažolės rūšies kaliaus kultūrų terpė buvo papildyta skirtingais fitohormonais.

2.8. Augimo reguliatorių paruošimas

Siekiant praturtinti mitybinę terpę augalų ląstelių procesus veikiančiomis medžiagomis, tyrimui pasirinkti skirtingi fitohormonai. Pradinis tiriamosios medžiagos paruošimas (0,1 mg/ml) buvo atliekamas 10 mg tiriamos medžiagos ištirpinus 2–5 ml dH₂O 100 ml kolboje. Medžiagai ištirpus 100 ml kolba iki žymos buvo pripildyta dH₂O. Reikalingas paimti pradinis tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris apskaičiuojamas pagal (2.1) formulę:

$$X = \frac{C(a) \times V}{C(b)}; \quad (2.1)$$

čia X – reikalingas paimti pradinio tiriamosios medžiagos tirpalo tūris (ml);

$C_{(a)}$ – reikalinga galutinė koncentracija (mg/l);

V – praskiedimo tūris (l);

$C_{(b)}$ – pradinio, tiriamosios medžiagos, tirpalo koncentracija (mg/ml).

Paruoštos tyrime analizuotos skirtingos mitybinės terpės, reikalingos vaistinio čiobrelio (žr. 2.3 lentelę) ir vaistinės juozažolės (žr. 2.4 lentelę) kaliaus kultūroms *in vitro* kultivuoti.

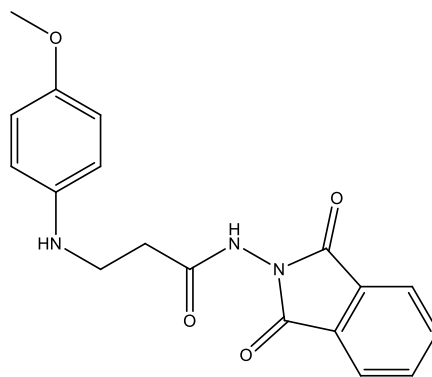
2.3 lentelė. Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrų *in vitro* mitybinės terpės

Nr.	Mitybinės terpės sudėtis
1.	MS, 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ
2.	MS, 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ, 0,5 mg/l 39 <i>N</i> -(1,3-dioiksoizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidas
3.	MS, 2 mg/l NAR, 0,5 mg/l Kin
4.	MS, 2 mg/l NAR, 0,5 mg/l Kin, 0,5 mg/l 39 <i>N</i> -(1,3-dioiksoizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidas

2.4 lentelė. Vaistinės juozažolės kaliaus kultūrų *in vitro* mitybinės terpės

Nr.	Mitybinės terpės sudėtis
1.	MS, 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP
2.	MS, 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP, 0,5 mg/l 39 <i>N</i> -(1,3-dioiksoizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidas

2.2 pav. pateikiama 39-o junginio *N*-(1,3-dioiksoizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido cheminė formulė.



2.2 pav. *N*-(1,3-dioiksoizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidas [73]

2.9. Vaistinių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

2.9.1. Redukcinių savybių nustatymas

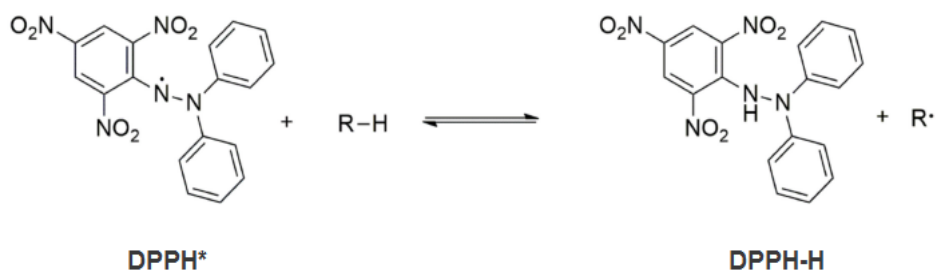
Biologiškai aktyvaus junginio redukcinės savybės gali būti įvertintos arba Fe^{3+} fericianido kompleksus ($Fe[(CN)_6]_3$) redukuoti iki Fe^{2+} geležies kompleksų ($Fe[(CN)_6]_2$). Mėlynos spalvos kompleksai susiformuoja pridėjus geležies chlorido tirpalo. Tyrimo metu redukcinės savybės yra įvertinamos spektrofotometriškai pagal šviesos sugertį. Svarbu paminėti, kad vykstant reakcijai

didėjanti vertinamojo mišinio šviesos sugertis, dėl padidėjusio $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$ kompleksų kiekio, lemia didesnes redukcines savybes [74]. Žemiau yra pateikiama tyrimo metu naudota modifikuota redukcinių savybių nustatymo metodika [75].

1. Ekstraktui paruošti 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos supilama į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė žaliava užpilama 5 ml metanoliu ir tolesnė ekstrakcija vykdoma termostatinėje vonelėje 30 min. 45 °C temperatūroje. Paruoštas ekstraktas centrifuguojamas 900 aps./min. greičiu. Po centrifugavimo gautas supernatantas naudojamas tyrimams.
2. Atliekami trys pradinio ekstrakto (20 mg/ml) skiedimai. Pirmojo skiedimo ekstrakto koncentracija – 10 mg/ml, antrojo skiedimo ekstrakto koncentracija – 5 mg/ml, trečiojo koncentracija – 2,5 mg/ml. Skiedimai buvo vykdomi su metanoliu, galutinis mėgintuvėlio tūris sudarė 0,5 ml.
3. Į paruoštus skirtingų praskiedimų ekstraktus įpilama 1,25 ml (0,2 M; pH=6,6) fosfatinio buferio ir 1,25 ml (1 %) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Vėliau papildoma 1,25 ml (10 %) trichloracto rūgštimi ir mišinys sumaišomas kratytuvu. Paruoštas mišinys centrifuguojamas 10 min. 9000 aps./min. greičiu. Gautas supernatantas naudojamas tolimesniuose tyrimo etapuose.
4. Į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 1,25 ml dH_2O , 1,25 ml ekstrakto ir 0,25 ml (0,1 %) FeCl_3 .
5. Kontroliniam mėginiui paruošti į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 1 ml (0,2 M; pH=6,6) fosfatinio buferio ir 1 ml (1 %) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.
6. Tirpalų šviesos sugertis nustatoma spektrofotometru 700 nm bangos ilgyje.

2.9.2. Antioksidacinis aktyvumas DPPH radikalo surišimo metodu

Vaistinių augalų antiradikalinis aktyvumas yra nustatomas spektrofotometriškai. Tyrimo metu violetinės spalvos 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH[•]) radikalas sureagavęs su vaistinių augalų antioksidaciniais junginiais prisijungia vandenilio atomą, tokiu būdu yra redukuojamas ir tampa geltonos spalvos 2,2-difenil-1-pikrilhidrazinu (žr. 2.3 pav.). Reakcijos metu vykstantis violetinės spalvos blukimas priklauso nuo antioksidanto koncentracijos. Tai yra paprastas, greitas ir nebrangus antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodas, tačiau turi trūkumų. Kiekybinės analizės metu yra absorbuojami kiti, mėginyje esantys, biologiškai aktyvūs junginiai, kurie gali turėti įtakos klaidingiems rezultatams [76].



2.3 pav. DPPH[•] radikalo redukcijos reakcija su vandenilio atomu [76]

Žemiau yra pateikiama modifikuota tyrimo metodika [49].

1. 0,2 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos supilama į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė žaliava užpilama 2 ml metanolio ir maišoma 10 min. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps./min. greičiu 10 min. Gautas supernatantas naudojamas tolimesniuose tyrimo etapuose.
2. Etaloniniam DPPH tirpalui paruošti 0,0024 g DPPH radikalo ištirpinama metanolyje, 100 ml talpos kolboje.
3. Tiriamajam tirpalui paruošti į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 77 μl (100 mg/ml) paruošto ekstrakto ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.
4. Palyginamajam tirpalui paruošti į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 77 μl metanolio ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.
5. Mėgintuvėliai sumaišomi kratytuvu ir 15 min. laikomi tamsoje.
6. Tirpalų šviesos sugertis nustatoma spektrofotometru 515 nm bangos ilgyje.

DPPH radikalo slopinimas apskaičiuojamas pagal (2.2) formulę:

$$DPPH \text{ slopinimas (\%)} = \frac{A(b) - A(a)}{A(b)} \times 100 \%; \quad (2.2)$$

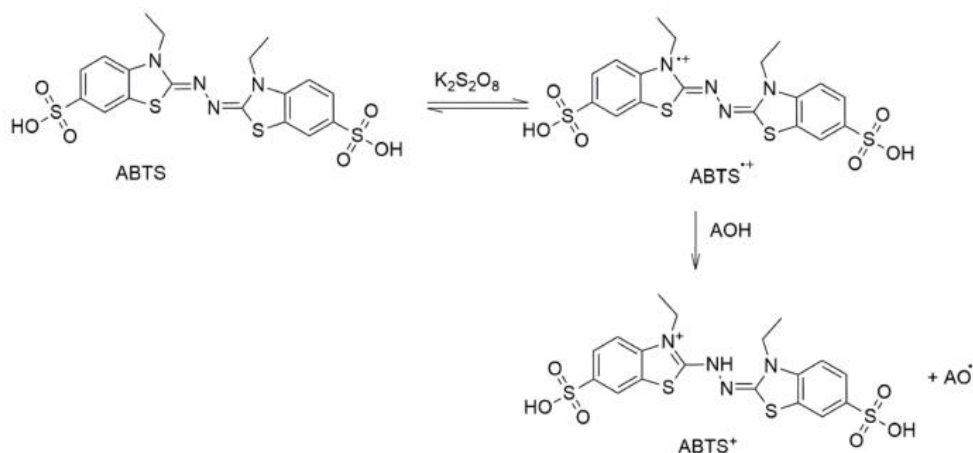
čia $A_{(b)}$ – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis;

$A_{(a)}$ – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.

2.9.3. Antioksidacinis aktyvumas ABTS radikalo surišimo metodu

2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfonrūgšties) radikalo katijonas (ABTS^{•+}) yra stabilus laisvasis radikalas, kuris dažnai naudojamas įvertinti natūralių junginių antioksidacines savybes.

Literatūros duomenimis, šiuo metodu gali būti įvertintos neapdorotų ekstraktų, polifenolių, fenolinių rūgščių ir flavonoidų antioksidacinės savybės [77]. ABTS metodas yra paremtas antioksidacinių junginių geba surišti (ABTS^{•+}) radikalo katijoną (žr. 2.4 pav.).



2.4 pav. ABTS^{•+} susiformavimas ir reakcija su antioksidantu [76]

Metodo pradžioje ABTS yra oksiduojamas kalio persulfato tirpalu, dėl ko išsiskiria (ABTS^{•+}) radikalo katijonas. Po 1–30 min. įvykus reakcijai tirpalo mišinį mėlynai žalsva spalva nudažo ABTS^{•+} mėlynai žalias chromoforas. ABTS katijono absorbcija spektrofotometru nustatoma 414, 645, 734, 815 nm bangos ilgiuose. [76]. Žemiau yra pateikiama modifikuota, tyrimo metu naudota, ABTS radikalo surišimo metodika [77].

1. 100 μmol ABTS radikalui susiformuoti 10 mg (2 mM) ABTS ištirpinama 10 ml (20 mM; pH=7,4) fosfatiname buferyje, paruoštame su (0,17 mM) K₂S₂O₈. Antioksidaciniam aktyvumui įvertinti pradinis ABTS tirpalas skiedžiamas (20 mM; pH=7,4) fosfatinu buferiu. Praskiesto ABTS palyginamojo tirpalo šviesos sugertis turi būti lygi A=0,9.
2. Ekstrakto paruošimui 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos supilama į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė žaliava užpilama 5 ml metanolio ir tolesnė ekstrakcija vykdoma termostatinėje vonelėje 30 min. 45 °C temperatūroje. Ekstraktas 9000 aps./min. greičiu centrifuguojamas 10 min. Supernatantas naudojamas tolimesniuose tyrimo etapuose.
3. Į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 500 μl (20 mg/ml) ekstrakto, 1,7 ml (20 mM; pH=7,4) fosfatinio buferio ir pridedama 300 μl (100 μmol) ABTS.
4. Kontrolinis mėginys yra (20 mM; pH=7,4) fosfatinis buferis.
5. Palyginamajam tirpalui yra naudojamas praskiestas ABTS tirpalas.
6. Tirpalų šviesos sugertis nustatoma spektrofotometru 734 nm bangos ilgyje.

ABTS radikalo slopinimas apskaičiuojamas pagal (2.3) formulę:

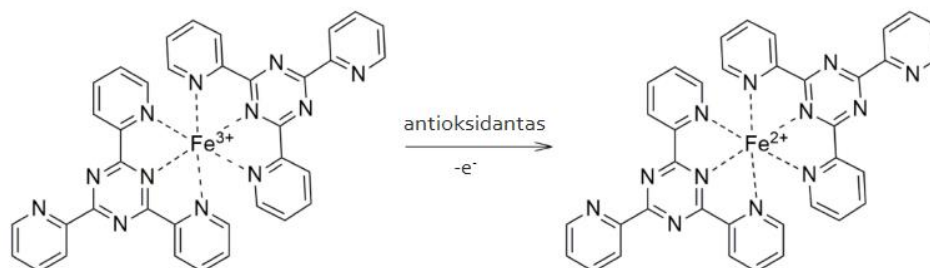
$$ABTS \text{ slopinimas (\%)} = \frac{A(b) - A(a)}{A(b)} \times 100 \%; \quad (2.3)$$

čia A(b) – praskiesto ABTS šviesos sugertis;

A(a) - tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.

2.9.4. Antioksidacinis aktyvumas FRAP metodu

Geležies redukcijos antioksidacinės galios (FRAP) metodo esmė yra nustatyti antioksidacinių junginių gebą redukuoti bespalvį Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-s-triazino kompleksą į intensyviai mėlyną Fe^{2+} -2,4,6-tripiridil-s-triazino kompleksą rūgštinėje aplinkoje (žr. 2.5 pav.).



2.5 pav. Fe^{3+} redukcija (FRAP metodas) [75]

Tai yra kolorimetrinis metodas, dėl to tirpalų šviesos sugertis yra įvertinama spektrofotometriškai [74]. Žemiau yra pateikiama naudota modifikuota tyrimo metodika [49].

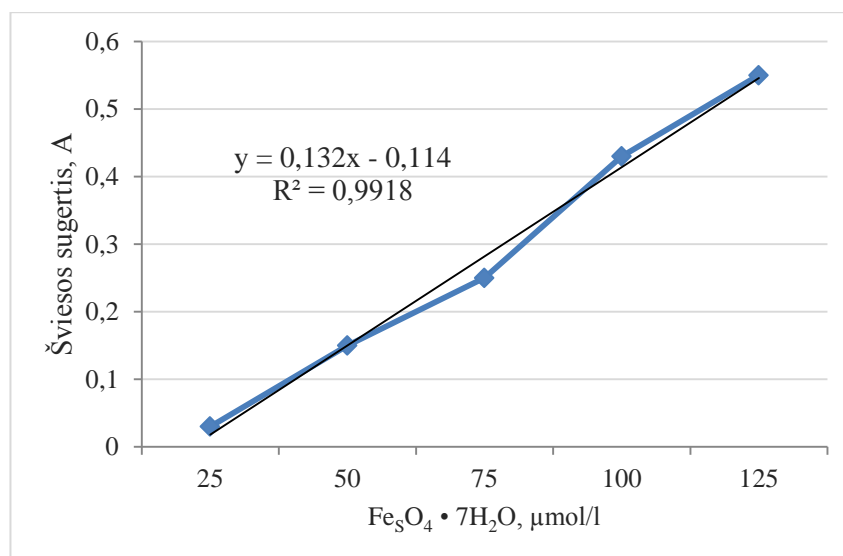
1. Ekstrakto paruošimui 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos supilama į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė žaliava užpilama 5 ml metanolio ir tolesnė ekstrakcija vykdoma termostatinėje vonelėje 30 min. 45 °C temperatūroje. Ekstraktas 9000 aps./min. greičiu centrifuguojamas 10 min. Gautas supernatantas naudojamas tolimesniuose tyrimo etapuose.
2. Paruošiamas FRAP reagentas: Į 20 ml mėgintuvėlį įpilama 30 ml (300 mM) acetatinio buferio, 3 ml (10 mM) TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 3 ml (20 mmol/l) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
3. Parengus reikalingos koncentracijos reagentus ruošiama $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kalibracinė kreivė. Kalibracinei kreivei, pagal 2.4 lentelę, ruošiami skirtingų koncentracijų (5, 10, 15, 20; 25 $\mu\text{mol/l}$) tirpalai, kurie vėliau su dH_2O praskiedžiami iki 10 ml.

2.4 lentelė. Kalibracinei kreivei reikalingi reagentai ir jų kiekis

Koncentracija ($\mu\text{mol/l}$)	dH_2O (ml)	FRAP reagento (ml)
5	0,025	3
10	0,05	3
15	0,075	3
20	0,1	3
25	0,125	3

4. Paruošiamas kontrolinis mėginys kalibracinei kreivei. Į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 3 ml FRAP reagento ir 7 ml dH_2O .
5. Tiriamųjų tirpalų paruošimui į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 20 μl (20 mg/ml) ekstrakto ir 80 μl metanolio. Vėliau į praskiestą ekstraktą įpilama 3 ml FRAP reagento.
6. Tiriamųjų tirpalų kontroliniam mėginiui paruošti į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 100 μl metanolio ir 3 ml FRAP reagento.
7. Tirpalų šviesos sugertis nustatoma spektrofotometru 593 nm bangos ilgyje.

Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas ($\mu\text{mol/l}$) pagal $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kalibracinę kreivę (žr. 2.6 pav.).



2.6 pav. FeSO_4 kalibracinė kreivė

2.9.5. Antioksidacinis aktyvumas superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimo metodu

Superoksido dismutazė (SOD) yra vienas iš fermentinių antioksidantų, kurio funkcija yra apsaugoti augalus nuo biotinio ir abiotinio streso sukeliama laisvųjų radikalų ir reaktyviųjų deguonies formų poveikio. Fermentas superoksido dismutazė augalo ląstelių mitochondrijose superoksido radikalą ($\text{O}_2^{\cdot-}$) geba paversti į molekulinį deguonį (O_2) ir vandenilio peroksidą (H_2O_2). Sukauptas didesnis vandenilio peroksido kiekis sukelia audinių pažeidimą, o Fentono reakcijos metu reaguodamas su Fe^{2+} jis virsta kenksmingu hidroksilo radikalais [78]. Siekiant išvengti žalingo hidroksilo radikalo poveikio, peroksisomose produkuojama katalazė reaguodama su vandenilio peroksidu jį suskaido iki vandens (H_2O) ir molekulinio deguonies (O_2), tokiu būdu sumažina laisvųjų radikalų sukeltą žalą.

Siekiant nustatyti SOD fermentinį aktyvumą augalo žaliavoje yra naudojamas nitromėlynojo tetrazolio/ riboflavino autooksidacijos metodas. Reakcijos metu yra nustatoma superoksido dismutazės geba slopinti nitromėlynojo tetrazolio redukciją [79]. Žemiau yra pateikiama naudota tyrimo metodika.

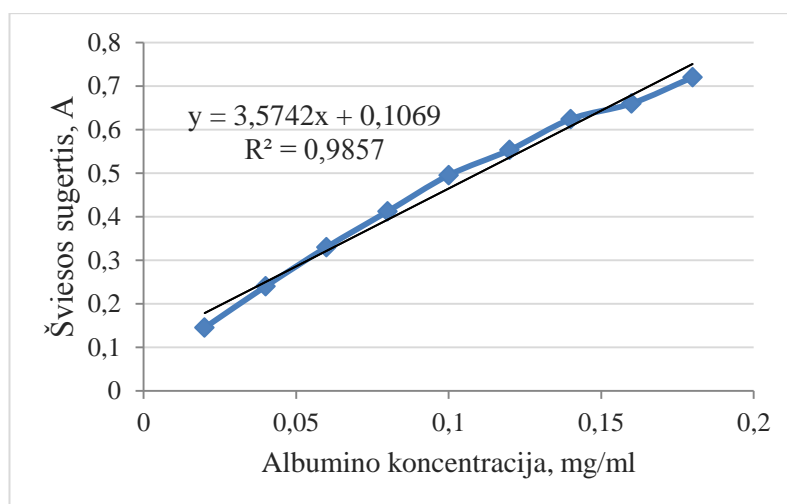
1. Ekstrakto paruošimui 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos supilama į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinės žaliavos ekstrakcija vykdoma 4 ml mišinio, kurį sudaro 1 mM ditiotritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) ištirpinto DMSO ir 1–3 mg polivinilpirolidono.
2. Ekstraktas 9000 aps./min. greičiu centrifuguojamas 10 min. Gautas supernatantas dar kartą centrifuguojamas mikrocentrifugoje „Eppendorf“ mėgintuvėliuose.
3. Baltymų koncentracijai nustatyti į 200 μl mėginio įpilama 2 ml Bradfordo reagento. Koncentracijai įvertinti paruošiamas kontrolinis mėginys iš 200 μl dH_2O ir 2 ml Bradfordo reagento.
4. Tirpalų šviesos sugertis nustatoma spektrofotometru 595 nm bangos ilgyje.

5. Baltymų koncentracijai nustatyti augalinėje žaliavoje ruošiama albumino kalibracinė kreivė.
6. Albumino kalibracinei kreivei paruošiamas pradinis albumino tirpalas: į 25 ml mėgintuvėlį įpilama 25 mg albumino ir ištirpinama 25 ml dH₂O. Pradinis albumino tirpalas yra praskiedžiamas iki 10 ml. Pagal 2.5 lentelę į 9 mėgintuvėlius yra supilamas atitinkamas albumino pradinio tirpalo kiekis ir dH₂O kiekis bei pridedama 2 ml Bradfordo reagento.

2.5 lentelė. Kalibracinei kreivei reikalingi reagentai ir jų kiekis

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

7. Baltymų koncentracija augalinėje žaliavoje yra apskaičiuojama pagal albumino kalibracinę kreivę (žr. 2.7 pav.).



2.7 pav. Kalibracinė kreivė pagal albuminą

8. Reakcijos mišiniui paruošti į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 40 μl (25 mg/ml) vaistinio ekstrakto, 400 μl (200 mM, pH=7,8) Tris-HCl buferio, 200 μl (100 mM) L-metionino, 200 μl (540 μM) nitromėlynojo tetrazolio, 500 μl (0,1 %) Tritono X-100, 20 μl (300 μM) riboflavino ir 620 μl dH₂O.
9. Paruošiamas kontrolinis mėginys be fermentinio preparato. Į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 40 μl SOD buferio, 400 μl 200 mM Tris-HCl buferio (pH=7,8), 200 μl 100 mM L-metionino, 200 μl 540 μM nitromėlynojo tetrazolio, 500 μl 0,1% Tritono X-100 ir 20 μl 300 μM riboflavino ir 620 μl dH₂O.
10. Reakcijai įvykti mėgintuvėliai 30 min. yra laikomi po liuminescencinėmis lempomis.
11. Tirpalų šviesos sugertis nustatoma spektrofotometru 560 nm bangos ilgyje.

Fermento aktyvumas (vnt./mg) apskaičiuojamas pagal (2.4) formulę:

$$A = \frac{\log \frac{E(k)}{E(t)}}{\log 2 \times m}; \quad (2.4)$$

čia A – fermento aktyvumas (vnt./mg);

E_k – kontrolinio mėginio šviesos sugertis (A);

E_t – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis (A);

m – baltymų koncentracija iš kalibracinės kreivės (mg/ml).

2.10. Antibakterinis aktyvumas prieš *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris*

Antibakterinis ekstraktų aktyvumas buvo įvertintas agarų difuziniu metodu. Šis metodas yra patvirtintas klinikinėje praktikoje ir taikomas atlikti įprastus antibakterinio jautrumo tyrimus. Svarbu paminėti, kad metodas yra paprastas, pigus bei pritaikytas tirti didelį mikroorganizmų ir antibakterinių junginių kieki. Patalpintas ant agarų terpės antibakterinis junginys difunduoja į agarą ir slopina bakterijų augimą. Antibakterinis poveikis yra nustatomas išmatuojant skaidrią bakterijų augimą slopinančią zoną (mm) [25]. Bakterijų koncentracija suspensijoje buvo apskaičiuojama naudojant 0,5 McFarland'o standartą, kurio A = 0,5 atitinka 10^8 KSV/ml [6]. Žemiau yra pateikiama naudota tyrimo metodika [49] :

1. Paruošiama ir autoklavuojama *Luria Bertani* (LB) mitybinė terpė, skirta bakterijoms kultivuoti. Pasirinktas optimalus terpės pH = 7,2 reguliuojamas su 0,1 N NaOH. Reagentai ir jų kiekis, reikalingi paruošti 1 l bakterijų terpės nurodyti 2.6 lentelėje.

2.6 lentelė. Reagentai ir jų kiekis reikalingi 1 l LB bakterijų terpei paruošti

Reagentai	Reagentų kiekiai reikalingi 1 l terpės (g)
NaCl	10
Triptonas	10
Mielių ekstraktas	5
Mikro agaras	15

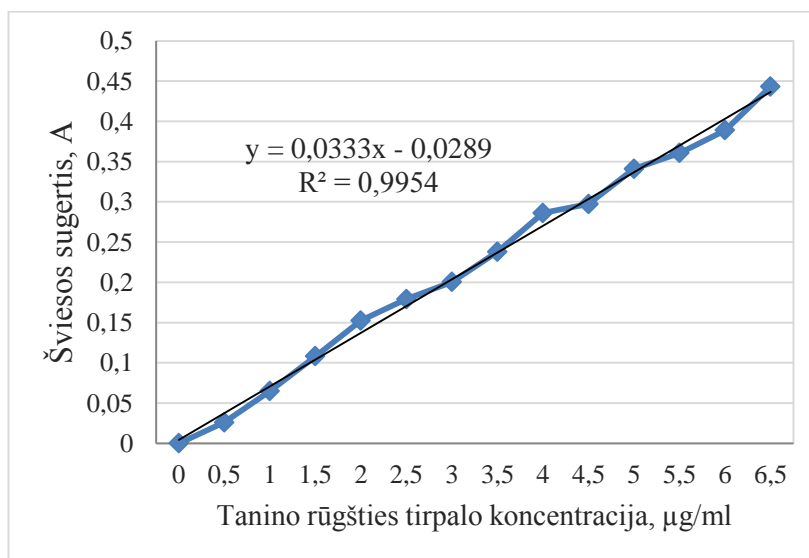
2. Ekstrakto paruošimui 0,2 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos supilama į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė žaliava užpilama 2 ml DMSO. Ekstrakcija yra vykdoma 7 ir 14 d. Ekstraktas 9000 aps./min. greičiu centrifuguojamas 10 min. Gautas supernatantas naudojamas tolimesniuose tyrimo etapuose.
3. Bakterijų suspensijos šviesos sugertis yra nustatoma spektrofotometru 600 nm bangos ilgyje. Siekiant sumažinti bakterijų koncentraciją suspensijoje, tiriamųjų bakterijų suspensijos šviesos sugertis (A) yra tarp 0,1 ir 0,2.
4. Į Petri lėkštelių LB terpę įpilama 50 µl *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris* bakterijų suspensijos, kuri išsklaidoma po lėkštelės perimetrą. Į Petri lėkštelę įdedami šeši filtrinio popieriaus diskeliai (6 mm). Vėliau ant kiekvieno filtrinio popieriaus diskelio užpilama 25 µl vaistinio ekstrakto (100 µg/ml).

5. Paruošiamas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris* kontrolinis mėginys. Į Petri lėkšteles su LB terpe įpilama 50 μl *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris* bakterijų suspensijos, kuri išsklaidoma po lėkštelės perimetrą.
6. Petri lėkštelės perkeliamos į termostatą ir bakterijų augimas yra vykdomas 48 val. 37 °C temperatūroje.
7. Antibakteriniam vaistinių ekstraktų poveikiui įvertinti yra išmatuojama skaidri slopinimo zona milimetrais (mm) išsidėsčiusi aplink filtrinio popieriaus diskelį.

2.11. Bendras fenolinių junginių kiekybinis įvertinimas Folin-Ciocalteu'o metodu

Folin-Ciocalteu'o metodas buvo sukurtas baltymų analizei, tačiau vėliau pritaikytas bendrai fenolinių junginių koncentracijai nustatyti. Folin-Ciocalteu'o reagentas yra fosfomolibdeno ir fosfovolframo rūgšties mišinys, kuriame molibdeno ir volframo oksidacijos laipsnis yra 6⁺. Geltonos spalvos Folin-Ciocalteu'o reagentui sureagavus su fenoliniais junginiais dėl susidariusių kompleksų tirpalas nusidažo mėlyna spalva. Šiuo metodu fenolinių junginių koncentracija gali būti vertinama maisto produktuose ir augalų ekstraktuose [76]. Žemiau yra pateikiama fenolinių junginių koncentracijai įvertinti naudota tyrimo metodika [80].

1. Kalibracinei kreivei ruošiamas standartinis tanino rūgšties tirpalas. 0,025 g tanino rūgšties įpilama į 10 ml dH₂O. 1 ml tanino rūgšties tirpalo praskiedžiama iki 10 ml ir naudojama tolimesniuose tyrimo etapuose.
2. Į tryliką 10 ml mėgintuvėlių įpilamas atitinkamas (0,25 mg/ml) praskiesto tanino rūgšties tirpalo kiekis: 0,0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100, 110, 120, 130 μl. Vėliau į mėgintuvėlius įpilama dH₂O. Kiekvienas mėgintuvėlio tūris turi sudaryti 500 μl. Į kiekvieną mėgintuvėlį taip pat įpilama 1,25 ml (7,5 %) Na₂CO₃ ir 250 μl Folin-Ciocalteu'o reagento. Mėgintuvėlio turinys sumaišytas kratytuvu yra inkubuojamas 40 min. tamsoje, kambario temperatūroje.
3. Kalibracinei kreivei naudojamas kontrolinis mėginys yra distiliuotas vanduo. Kalibracinė kreivė (žr. 2.8 pav.) yra naudojama tanino rūgšties koncentracijai apskaičiuoti.



2.8 pav. Kalibracinė tanino rūgšties kreivė

4. Ekstraktui paruošti 0,05 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės medžiagos supilama į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė žaliava užpilama 10 ml (70 %) acetonu ir tolesnė ekstrakcija vykdoma termostatuojamame kratytuve 20 min. 20 °C temperatūroje. Ekstraktas 9000 aps./min. greičiu centrifuguojamas 10 min. ir gautas supernatantas laikomas ant ledo.
5. Tiriamiesiems tirpalams paruošti į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 30 μl (5 mg/ml) ekstrakto, 470 μl dH₂O, 250 μl Folin-Ciocalteu'o reagento ir 1,25 ml (7,5 %) Na₂CO₃. Mėgintuvėlių turinys sumašytas kratytuvu inkubuojamas 40 min. tamsoje kambario temperatūroje.
6. Tiriamiesiems tirpalams kontrolinis mėginys paruošiamas iš 470 μl dH₂O, 30 μl (70 %) acto rūgšties, 250 μl Folin-Ciocalteu'o reagento ir 1,25 ml (7,5 %) Na₂CO₃.
7. Tirpalų šviesos sugertis nustatoma spektrofotometru 725 nm bangos ilgyje.

Bendroji fenolinių junginių koncentracija (mg/100mg) apskaičiuojama pagal (2.5) formulę:

$$A = \frac{C \times V \times 100}{m}; \quad (2.5)$$

čia A – bendroji fenolinių junginių koncentracija (mg/100mg);

C – tanino rūgšties koncentracija apskaičiuota iš kalibracinės kreivės (mg/ml);

V – pradinis ekstrakto tūris (ml);

m – augalinės žaliavos masė (mg).

2.12. Flavonoidų kiekybinis įvertinimas

Vienas iš dažniausiai naudojamų flavonoidų kiekybinio įvertinimo metodų yra pagrįstas flavonoidų ir AlCl_3 komplekso suformavimu. Tai yra kolorimetrinis tyrimo metodas ir reakcija yra įvertinama spektrofotometriškai. Tyrimo sėkmė priklauso nuo komplekso sudarymo efektyvumo, kurį lemia reakcijos laikas ir komplekso koncentracija [81]. Žemiau yra pateikiama naudota tyrimo metodika [82].

1. Kalibracinei kreivei yra paruošiamas standartinis kvercetino (1 mg/ml) tirpalas. 0,002 g kvercetino yra ištirpinama 2 ml metanolio.
2. Kalibracinei kreivei į penkis 10 ml mėgintuvėlius įpilamas atitinkamas kvercetino kiekis: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ml. Vėliau į mėgintuvėlius įpilama 150 μl (2 %) AlCl_3 ir su metanoliumi praskiedžiama iki 10 ml. Kontrolinis mėginys yra metanolis.
3. Kalibracinė kvercetino kreivė pateikiama 2.9 pav.
4. Ekstraktui paruošti – 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos supilama į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė žaliava užpilama 1 ml (80 %) metanoliumi ir termostatuojamame kratytuve maišoma 24 val. 150 aps./min. greičiu 20 °C temperatūroje.
5. Tiriamiesiems tirpalams paruošti į 10 ml mėgintuvėlį įpilama 100 μl ekstrakto, 900 μl (80 %) metanolio ir 1 ml (2 %) AlCl_3 .
6. Tiriamųjų tirpalų kontrolinis mėginys yra metanolis.
7. Tiriamasis tirpalas paliekamas stovėti 30 min. kambario temperatūroje. Tirpalų šviesos sugertis nustatoma spektrofotometru 415 nm bangos ilgyje.

Flavonoidų koncentracija (mg/g) apskaičiuojama pagal (2.6) formulę:

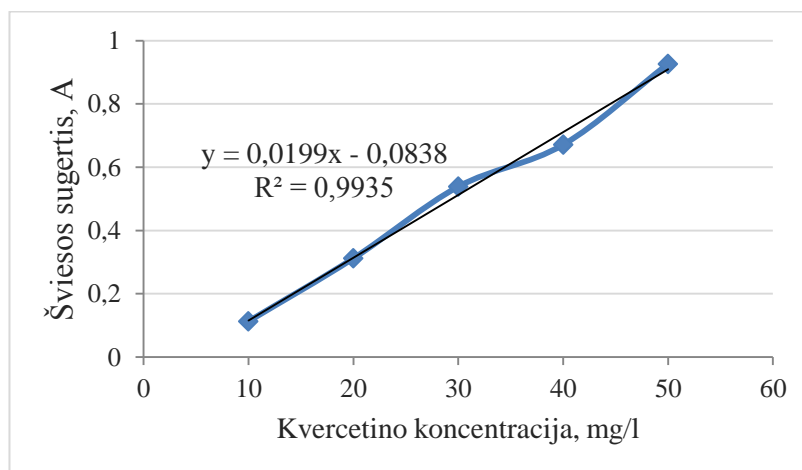
$$C = \frac{C_1 \times V}{m}; \quad (2.6)$$

čia C – flavonoidų koncentracija (mg/g);

C_1 – kvercetino koncentracija apskaičiuota pagal kalibracinę kreivę (mg/ml);

V – ekstrakto pradinis tūris (ml);

m – augalinės žaliavos masė (g).



2.9 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė

2.13. Liuteino kiekybinis įvertinimas

Liuteinas yra vienas iš karotinoidų - ksantofilų, pasižyminčių apsauginėmis savybėmis prieš akis žalojančią fotooksidacijos procesą. Nuo seno karotinoidai kiekybiškai yra vertinami spektrofotometriniais metodais. Liuteino ekstrakcija yra vykdoma organiniuose tirpikliuose – heksane, acetone ar etanolyje. Mokslininkų atliktų tyrimų duomenimis, siekiant nustatyti karotinoidus, tirpalo šviesos sugertis gali būti fiksuojama 440, 464 ir 503 nm bangos ilgiuose [79]. Žemiau yra pateikiama naudota tyrimo metodika [83].

1. Ekstrakto paruošimui 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos supilama į 10 ml mėgintuvėlį. Augalinė žaliava užpilama 5 ml (70 %) acetonu ir tolesnė ekstrakcija vykdoma termostatuojamame kratytuve 3 val. 250 aps./min. greičiu 20 °C temperatūroje.
2. Ekstraktas 9000 aps./min. greičiu centrifuguojamas 10 min. ir gautas supernatantas naudojamas įvertinti liuteino koncentraciją vaistinėje žaliavoje.
3. Kontrolinis mėginys yra acetonas. Tirpalų šviesos sugertis nustatoma spektrofotometru 446 nm bangos ilgyje.

Liuteino koncentracija (mg/g) apskaičiuojama pagal (2.7) formulę:

$$C = \frac{A_{446}}{(14,45 \times 10^4)} \times \left(\frac{1}{b}\right) \times 568,88 \times \frac{V}{m} \times \frac{1L}{10^3ml} \times 10^3 \frac{mg}{g} \times \frac{kg}{10^3g}; \quad (2.7)$$

čia C – liuteino koncentracija (mg/g);

A_{446} – absorbcija;

b – bangos ilgis;

V – ekstrakto tūris (ml);

m – augalinės žaliavos masė (kg);

$14,45 \times 10^4$ – molinės ekstinkcijos koeficientas ($l/mol^{-1}cm^{-1}$).

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. *Thymus vulgaris* L. ir *Hyssopus officinalis* L. kaliaus kultūros *in vitro*

Atliktų tyrimų rezultatai yra pateikiami atsižvelgiant į skirtingus fitohormonus, kurie buvo naudoti siekiant sukaupti didesnę biologiškai aktyviųjų junginių koncentraciją vaistinių augalų kaliaus kultūrose *in vitro*. Tyrimų metu buvo analizuojamos vaistinio čiobrelio, auginto MS mitybinėje terpėje su 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, kaliaus kultūros. Be to, buvo tiriamos vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros augintos MS mitybinėje terpėje su 2 mg/l NAR, 0,5 mg/l Kin augimo reguliatoriais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu (žr. 3.1 pav.). Svarbu paminėti, kad taip pat buvo analizuojamos ir vaistinės juozažolės kaliaus kultūros, augusios MS mitybinėje terpėje su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu (žr. 3.2 pav.).



Lapai ir stiebai
2 mg/l NAR, 0,5 mg/l Kin, 0,5 mg/l 39

Šaknys
2 mg/l NAR, 0,5 mg/l Kin, 0,5 mg/l 39

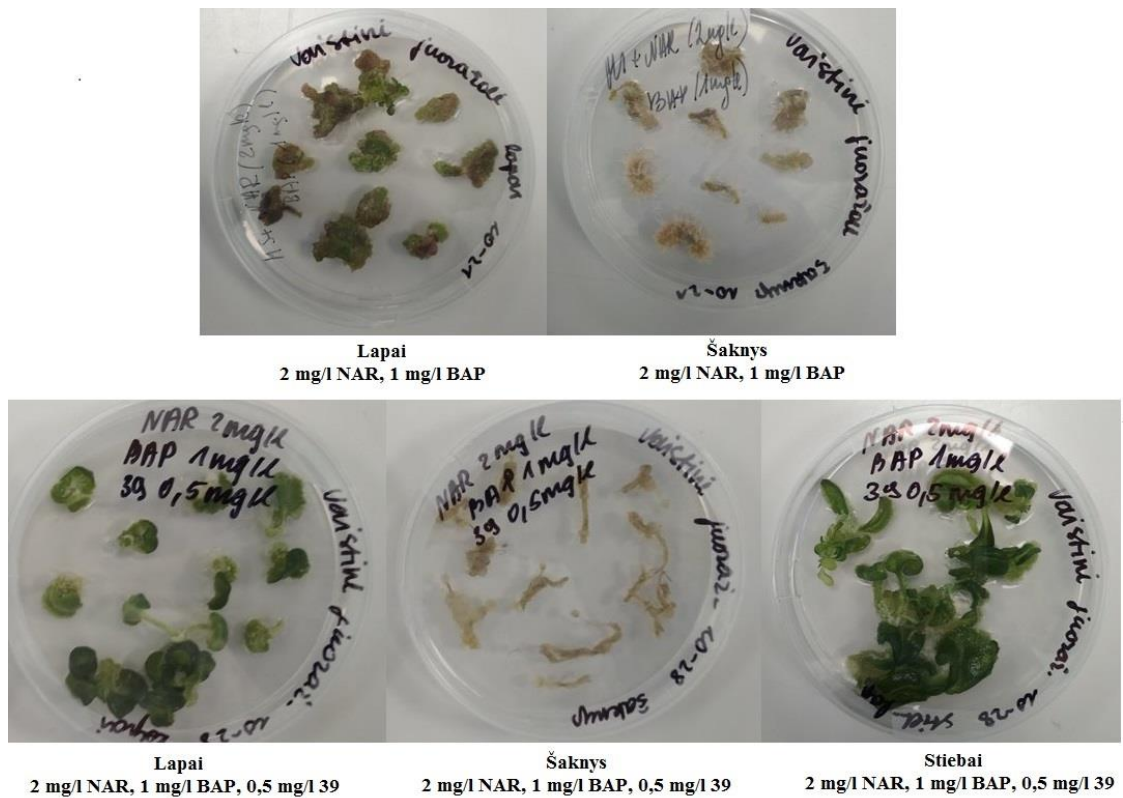


Lapai ir stiebai
0,5 mg/l TDZ, 0,1 mg/l IAR

Lapai stiebai
0,5 mg/l TDZ, 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l 39

Šaknys
0,5 mg/l TDZ, 0,1 mg/l IAR

3.1 pav. Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros *in vitro*



3.2 pav. Vaistinės juozažolės kaliaus kultūros *in vitro*

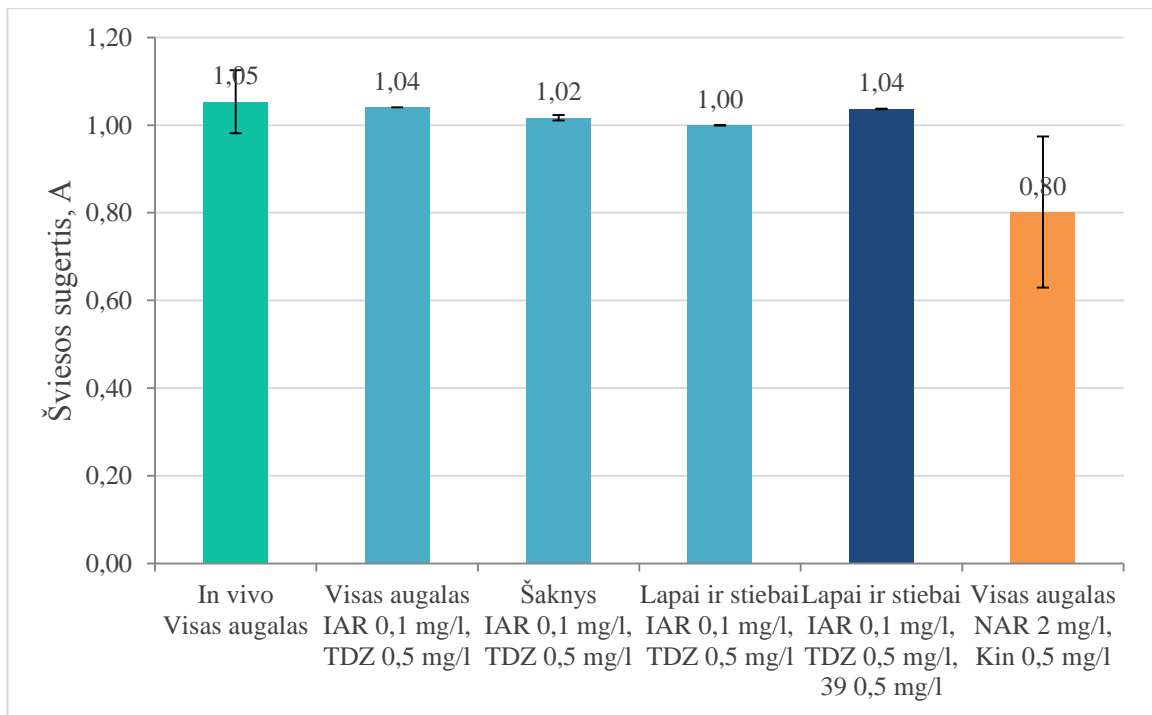
3.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Siekiant įvertinti tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų gebą kaupti antioksidacinius junginius, tyrimo metu analizei pasirinkti redukcinių savybių nustatymo, DPPH ir ABTS radikalo surišimo, FRAP bei superoksido dismutazės aktyvumo spektrofotometrinės analizės metodai.

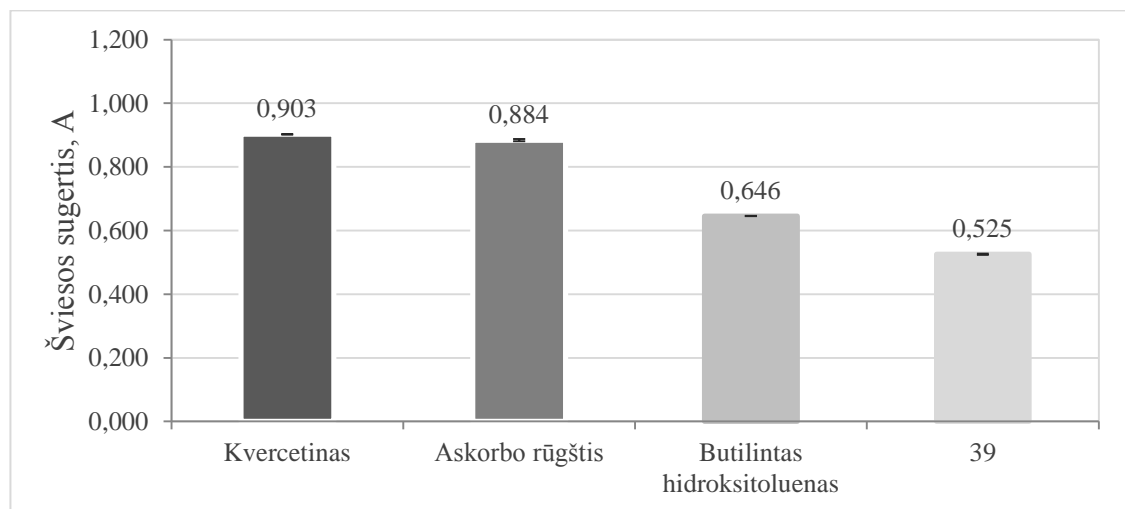
3.2.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas redukcinių savybių nustatymo metodu

Ištirus vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo*, bei skirtingų eksplantų kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus, buvo nustatytas įvairus antioksidacinis aktyvumas. Įvertinus rezultatus, iš 3.3 pav. matyti, kad vaistinio čiobrelio *in vivo* ekstraktas pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu ($A-1,05 \pm 0,07$), o mažiausiu – vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin augimo reguliatoriais, ekstraktas ($A-0,80 \pm 0,17$). Vertinant vaistinio čiobrelio kaliaus kultūras, stipriausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo viso augalo kaliaus kultūros, augintos su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, ekstraktas ($A-1,04 \pm 0,00$). Palyginus lapų ir stiebų kaliaus kultūrų, augintų su 39-u junginiu ir be 39-o junginio, ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, dėl stipresnių antioksidacinių savybių nustatytas teigiamas 39-o junginio poveikis (žr. 3.3 pav.)

Įvertinus kvercetino, askorbo rūgšties, butilinto hidroksitolueno ir 39-o junginio antioksidacines savybes, stipriausiomis savybėmis pasižymėjo kvercetinas ($A-0,90 \pm 0,00$), o silpniausiomis – 39-as junginys ($A-0,53 \pm 0,00$) (žr. 3.4 pav.).

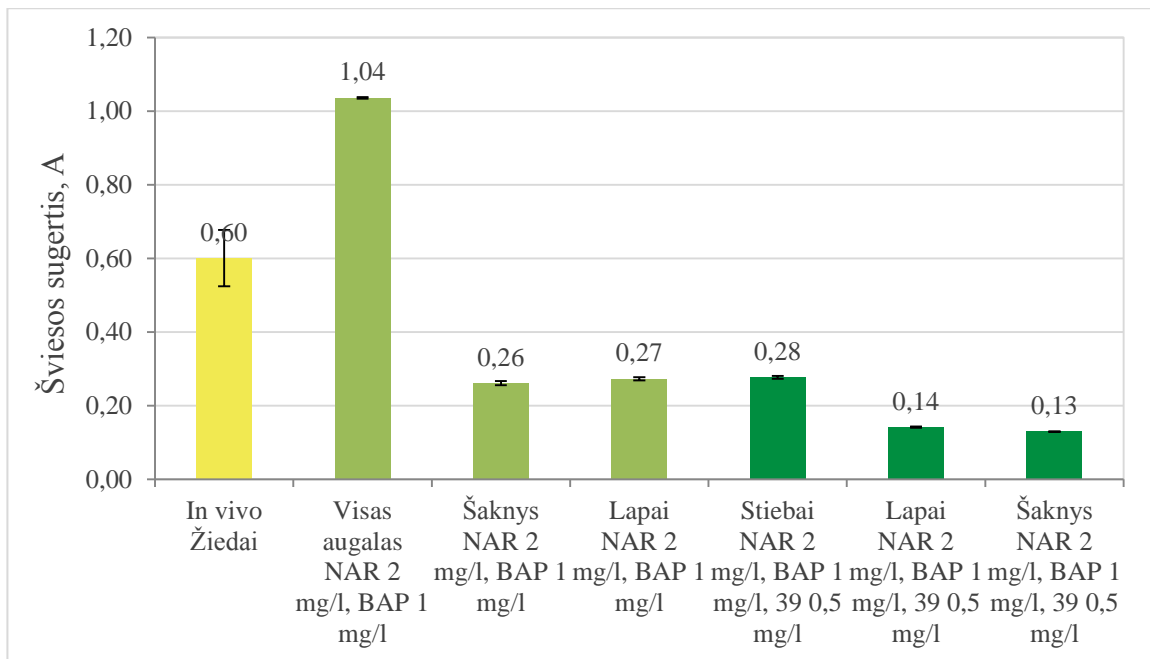


3.3 pav. Fitohormonų įtaka vaistinio čiobrelėlio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui (vidurkis±standartinis nuokrypis)



3.4 pav. Sintetinių junginių antioksidacinis aktyvumas (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Ištyrus vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacines savybes, iš 3.5 pav. matyti, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas viso augalo kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais, ekstrakto (A-1,04±0,00). Šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP augimo reguliatoriais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas pasižymėjo silpniausiomis antioksidacinėmis savybėmis (A-0,13±0,00). Pagal gautus tyrimo rezultatus (žr. 3.5 pav.) MS mitybinės terpės papildymas su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu reikšmingos įtakos didesniai antioksidaciniam aktyvumui *in vitro* neturėjo.



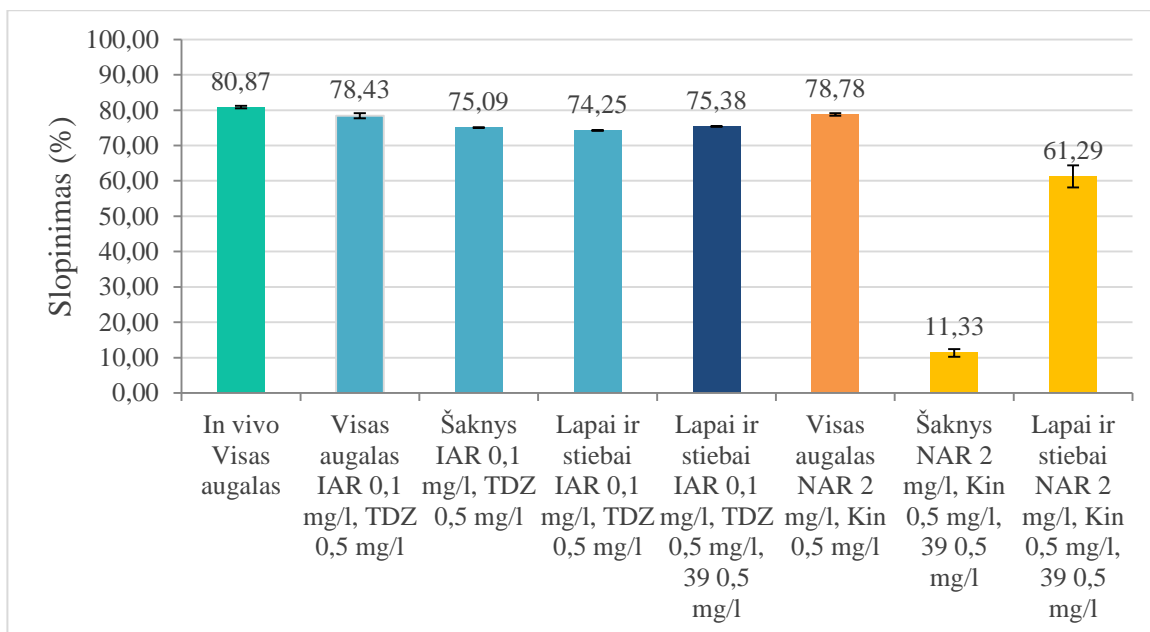
3.5 pav. Fitohormonų įtaka vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Palyginus vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* bei kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį poveikį redukcinių savybių nustatymo metodu, didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas vaistiniame čiobrelyje *in vivo* ($A-1,05\pm 0,07$). Vaistinio čiobrelio *in vivo* ($A-1,05\pm 0,07$) ekstraktas pasižymėjo 1,62 % stipresnėmis antioksidacinėmis savybėmis, nei vaistinės juozažolės kaliaus kultūros ekstraktas ($A-1,04\pm 0,00$). Mažiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas vaistinės juozažolės šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto ($A-0,13\pm 0,00$).

Apibendrinus tyrimo rezultatus, tirti vaistinio čiobrelio fitohormonai neskatino antioksidacinių junginių sintezės kaliaus kultūrose. Nustatyta, kad 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonai yra tinkami antioksidacinių junginių sintezei skatinti vaistinės juozažolės kaliaus kultūrose. Nepaisant to, tirtuose vaistiniuose augaluose, didžiausią antioksidacinių junginių koncentraciją sukauptė vaistinis čiobrelis *in vivo*.

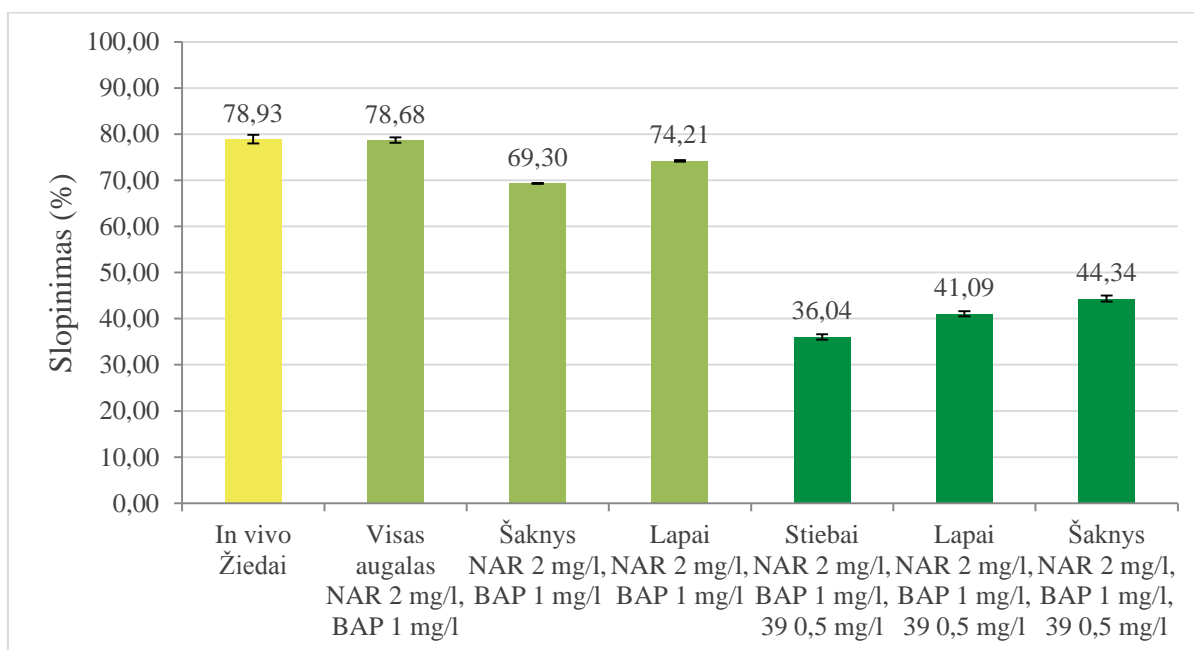
3.2.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH radikalo surišimo metodu

Ištyrus vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų poveikį DPPH radikalo slopinimui, nustatytas reikšmingas antioksidacinis aktyvumas. Gauti rezultatai sutapo su redukcinių savybių įvertinimo metodo rezultatais. Iš rezultatų, pateiktų 3.6 pav. matyti, kad didžiausiu DPPH radikalo slopinimu ir antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo vaistinio čiobrelio *in vivo* ekstraktas ($80,87\pm 0,36$ %). Šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas pasižymėjo mažiausiu, DPPH radikalą slopinančiu, poveikiu ($11,33\pm 1,12$ %). Įvertinus kaliaus kultūras iš lapų ir stiebų, augintų su 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ ir 0,5 mg/l 39-u junginiu ir be 39-o junginio, buvo nustatyta teigiama 39-o junginio sąsaja su didesne geba kaupti antioksidacinius junginius kaliaus kultūrose.



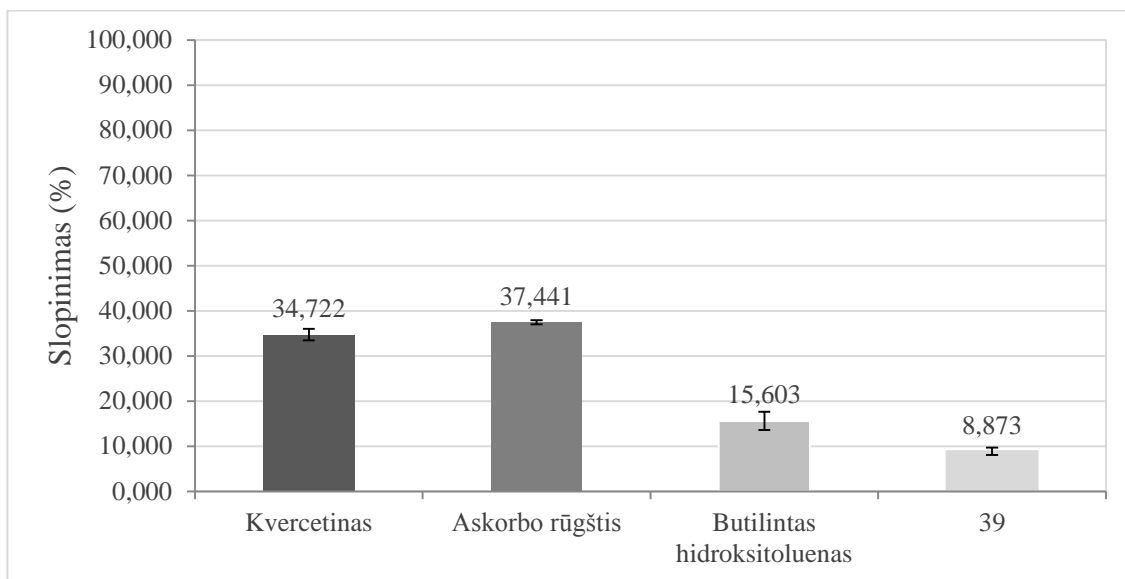
3.6 pav. Vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų DPPH radikalo slopinimas (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Įvertinus vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų DPPH radikalo slopinimo pajėgumą, iš rezultatų pateiktų 3.7 pav. matyti, kad didžiausias DPPH radikalo slopinimas nustatytas žiedų *in vivo* ekstraktoje (78,93±0,95 %). Tuo tarpu mažiausia geba slopinti DPPH radikalą buvo nustatyta kaliaus kultūroje iš stiebų, augintoje su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP bei 0,5 mg/l 39-u junginiu (36,04±0,56 %). Pagal gautus tyrimo rezultatus (žr. 3.7 pav.) MS mitybinės terpės papildymas su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP augimo reguliatoriais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu reikšmingos įtakos didesniai kaliaus kultūrų ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui neturėjo.



3.7 pav. Vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų DPPH radikalo slopinimas (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Įvertinus kvercetino, askorbo rūgšties, butilinto hidrokstitolueno ir 39-o junginio gebą slopinti DPPH radikalą, iš 3.8 pav. matyti, kad didžiausiu slopinimu pasižymėjo askorbo rūgštis (37,44±0,46 %), o mažiausiu – 39-as junginys (8,87±0,83 %).



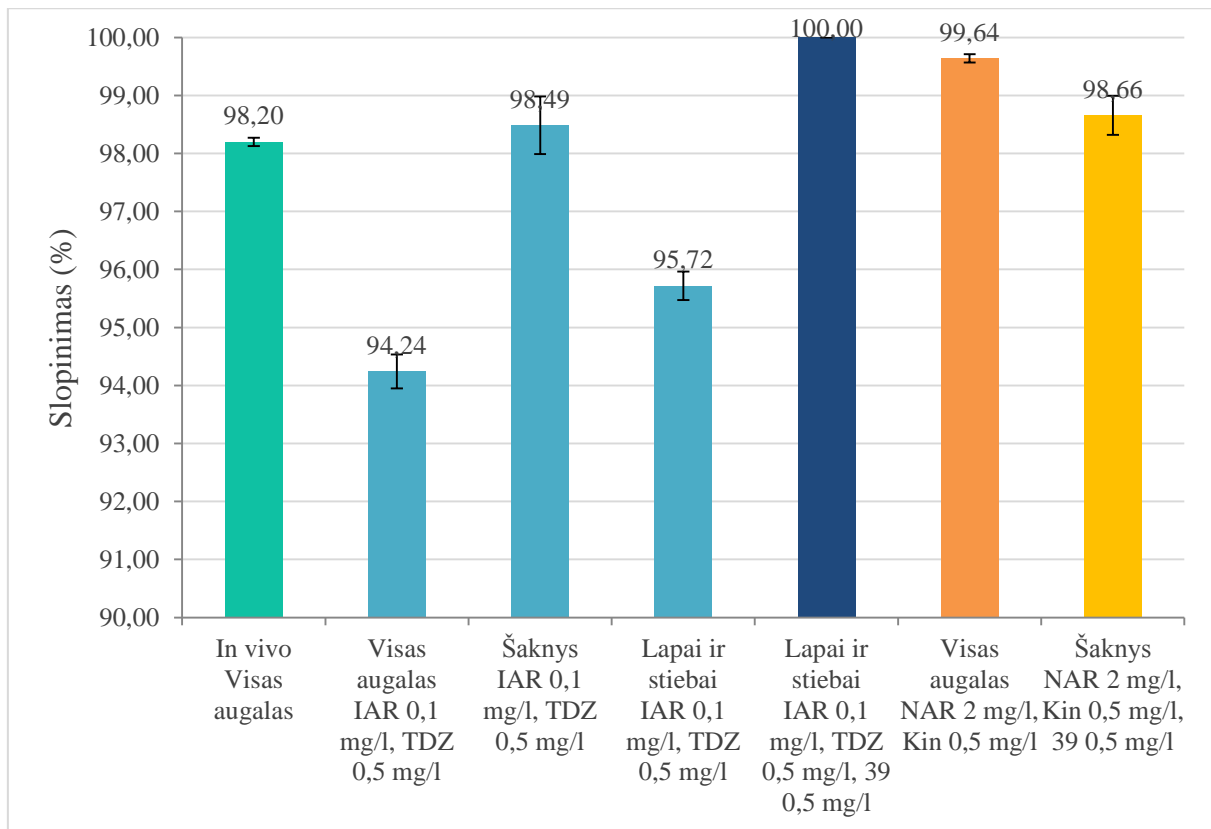
3.8 pav. Sintetinių junginių DPPH radikalo slopinimas (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Palyginus vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą DPPH radikalo surišimo metodu, didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas vaistiniame čiobrelyje *in vivo* (80,87±0,36 %). Vaistinio čiobrelio *in vivo* ekstraktas (80,87±0,36 %) pasižymėjo 2,3 % didesniu DPPH radikalo slopinimu, nei vaistinės juozažolės žiedų *in vivo* ekstraktas (78,94±0,95 %). Vaistinio čiobrelio šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 0,5 mg/l Kin fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto nustatyta mažiausia geba slopinti DPPH radikalą (11,33±1,12 %).

Iš gautų rezultatų galima teigti, kad vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės antioksidacinių junginių sintezei tirti fitohormonų deriniai buvo neveiksmingi. Stipriausias antioksidacinis poveikis ir didžiausia geba slopinti DPPH radikalą nustatyta vaistiniame čiobrelyje *in vivo*.

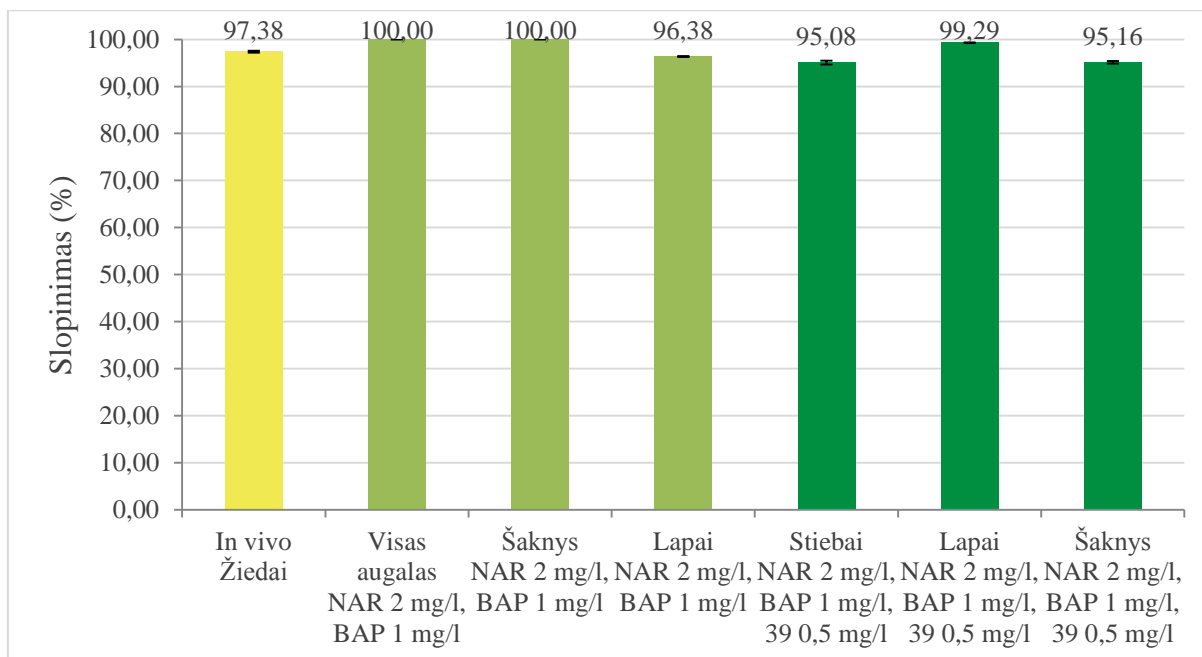
3.2.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS surišimo metodu

Ištyrus vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą ABTS surišimo metodu buvo nustatytas absoliutus ABTS radikalo slopinimas. Iš rezultatų, pateiktų 3.9 pav. matyti, kad didžiausia geba slopinti ABTS radikalą nustatyta lapų ir stiebų kaliaus kultūros, augintos su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto (100,00±0,00 %). Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros, augintos su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ augimo reguliatoriais, ekstraktas pasižymėjo mažiausiu ABTS radikalo slopinimu (94,24±0,29 %). Lyginant kaliaus kultūras iš šaknų bei lapų ir stiebų, augintų su 39-u junginiu ir be, matyti, kad 0,5 mg/l 39 junginys sąveikoje su 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ turėjo įtakos didesnei antioksidacinių junginių sintezei kaliaus kultūrose.



3.9 pav. Vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus *in vitro* kultūrų ekstraktų ABTS radikalo slopinimas (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Įvertinus vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus iš 3.10 pav. matyti, kad didžiausiu ABTS radikalo slopinimu pasižymėjo viso augalo ir šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais (100,00±0,00 %). Mažiausias radikalą slopinantis poveikis nustatytas kaliaus kultūroje iš stiebų, augintų su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP augimo regulatoriais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu (95,08±0,39 %). Lyginant kaliaus kultūrų iš šaknų ir lapų, augintų su 39 junginiu ir be, antioksidacinį aktyvumą, gauti rezultatai skyrėsi. Siekiant patvirtinti 0,5 mg/l 39-o junginio teigiamą poveikį antioksidacinių junginių sintezei kaliaus kultūrose reikalinga atlikti tolimesnius vaistinės juozažolės šaknų, lapų ir stiebų kaliaus kultūrų *in vitro* tyrimus.



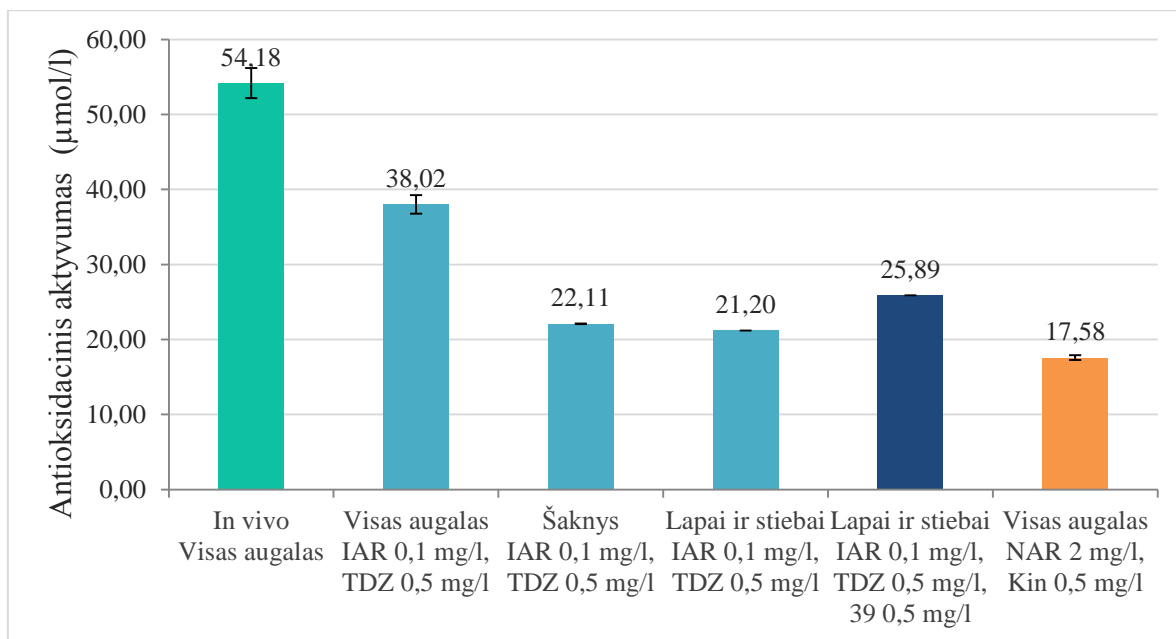
3.10 pav. Vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų ABTS radikalo slopinimas (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Palyginus vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą ABTS radikalo surišimo metodu, absoliutus radikalo slopinimas nustatytas vaistinio čiobrelio lapų ir stiebų kaliaus kultūros (0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ ir 0,5 mg/l 39) bei vaistinės juozažolės šaknų kaliaus kultūros (2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP) ekstraktuose. Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros, augintos su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, ekstraktas pasižymėjo mažiausia geba slopinti ABTS radikalą ir antioksidaciniu aktyvumu (94,24±0,29 %).

Taigi, ištyrus antioksidacinį aktyvumą ABTS radikalo surišimo metodu matyti, kad vaistinio čiobrelio (0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ ir 0,5 mg/l 39) ir vaistinės juozažolės (2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP) fitohormonų deriniai turi teigiamą poveikį antioksidacinių junginių sintezei kaliaus kultūrose.

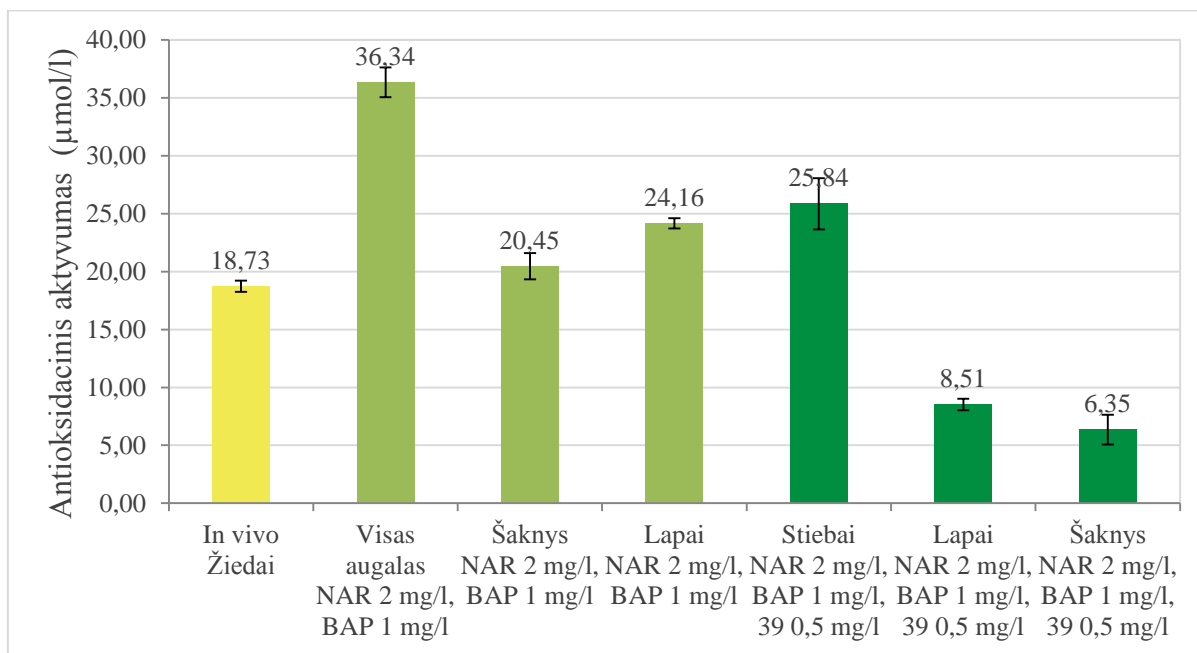
3.2.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Biologiškai aktyviųjų junginių geba redukuoti trivalentę geležį į divalentę apskaičiuojama pagal geležies sulfato kalibracinę kreivę ($\mu\text{mol/l}$). Įvertinus vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą FRAP metodu, iš 3.11 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas vaistinio čiobrelio *in vivo* ekstrakte (54,18±2,02 $\mu\text{mol/l}$), o mažiausias viso augalo kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin augimo regulatoriais, ekstrakte (17,58±0,32 $\mu\text{mol/l}$). Palyginus kaliaus kultūras iš lapų ir stiebų, augintų su 39-u junginiu ir be, matyti, kad mitybinės terpės su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais papildymas 0,5 mg/l 39-junginiu turėjo įtakos antioksidacinių junginių sintezei. Vaistinio čiobrelio lapų ir stiebų kaliaus kultūros, augintos su 39-u junginiu, ekstraktai pasižymėjo stipresnėmis antioksidacinėmis savybėmis.



3.11 pav. Vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Ištyrus vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą FRAP metodu, iš 3.12 pav. matyti, kad kaliaus kultūros, augusios su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais, ekstraktas pasižymėjo stipriausiu antioksidaciniu poveikiu ($36,34 \pm 1,28$ μmol/l). Šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP augimo reguliatoriais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas pasižymėjo silpniausiu antioksidaciniu aktyvumu ($6,35 \pm 1,28$ μmol/l). Palyginus šaknų ir lapų kaliaus kultūras, augintas su 39-u junginiu ir be, reikšmingo 39-o junginio poveikio didesniai ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui nenustatyta.



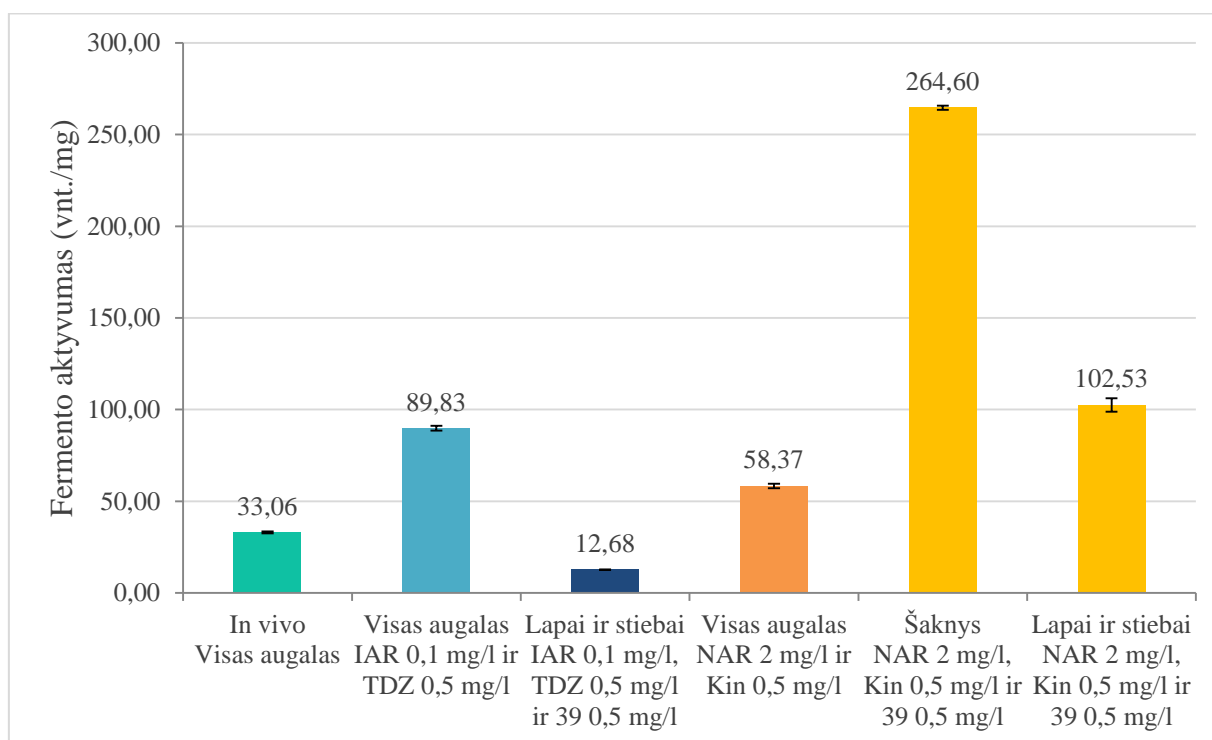
3.12 pav. Vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Palyginus vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą FRAP metodu, didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas vaistiniame čiobrelyje *in vivo* ($54,18 \pm 2,02 \mu\text{mol/l}$). Vaistinio čiobrelio *in vivo* ekstraktas ($54,18 \pm 2,02 \mu\text{mol/l}$) pasižymėjo 32,93 % stipresnėmis antioksidacinėmis savybėmis, nei vaistinės juozažolės kaliaus kultūros ekstraktas ($36,34 \pm 1,28 \mu\text{mol/l}$). Mažiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas vaistinės juozažolės šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto ($6,35 \pm 1,28 \mu\text{mol/l}$).

Apibendrinus tyrimo rezultatus, tirti vaistinio čiobrelio fitohormonų deriniai neskatino antioksidacinių junginių sintezės kaliaus kultūrose. Nustatyta, kad 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonai yra tinkami vaistinės juozažolės antioksidacinių junginių sintezei didinti. Nepaisant to, didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas vaistiniame čiobrelyje *in vivo*.

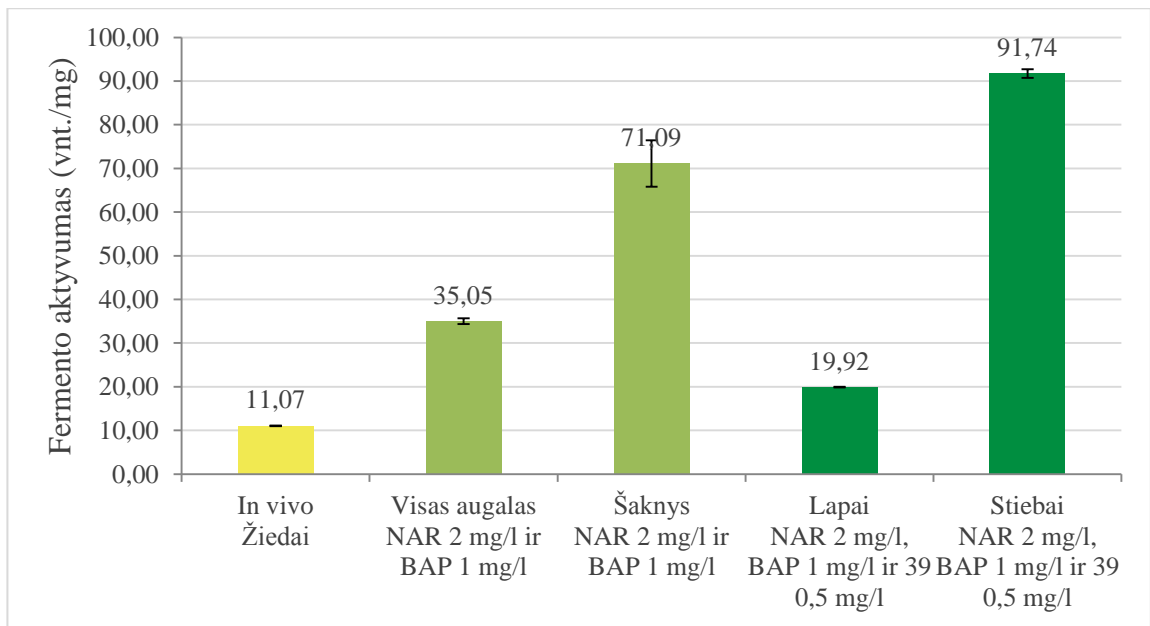
3.2.5. Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Tyrimo metu buvo tiriamas superoksido dismutazės aktyvumas vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose. Iš rezultatų pateiktą 3.13 pav. matyti, kad didžiausias SOD aktyvumas nustatytas šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto ($264,60 \pm 1,11 \text{ vnt./mg}$). Vaistinio čiobrelio lapų ir stiebų kaliaus kultūrų, augintų su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktai pasižymėjo mažiausiu SOD aktyvumu ($12,68 \pm 0,10 \text{ vnt./mg}$).



3.13 pav. Superoksido dismutazės aktyvumas vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Ištyrus vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus, iš rezultatų grafiko, nurodyto 3.14 pav. matyti, kad didžiausias SOD aktyvumas nustatytas stiebų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto ($91,74 \pm 0,98 \text{ vnt./mg}$), o mažiausias žiedų *in vivo* ekstrakto ($11,07 \pm 0,07 \text{ vnt./mg}$).



3.14 pav. Superoksido dismutazės aktyvumas vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Palyginus vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų SOD aktyvumą, vaistinio čiobrelio šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas pasižymėjo didžiausiu fermento aktyvumu ($264,60 \pm 1,11$ vnt./mg). Vaistinio čiobrelio šaknų kaliaus kultūros ekstraktas ($264,60 \pm 1,113$ vnt./mg) pasižymėjo 65,33 % didesniu SOD aktyvumu, nei vaistinės juozažolės stiebų kaliaus kultūros ekstraktas ($91,74 \pm 0,98$ vnt./mg). Mažiausias SOD aktyvumas nustatytas vaistinės juozažolės žiedų *in vivo* ekstraktoje ($11,07 \pm 0,07$ vnt./mg).

Taigi, apibendrinus galima teigti, kad MS mitybinės terpės papildymas su 2 mg/l NAR, 0,5 mg/l Kin fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu skatino antioksidacinių junginių sintezę vaistinio čiobrelio kaliaus kultūroje.

3.2.6. Vaistinių augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų antioksidacinių savybių, vertintų skirtingais metodais, apibendrinimas

Tyrimų metu buvo vertinamas vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas. Ištyrus antioksidacinį aktyvumą gauti skirtingi rezultatai. Reducinių savybių nustatymo ($A-1,05 \pm 0,07$), DPPH radikalo slopinimo ($80,87 \pm 0,36$ %) ir FRAP metodu ($54,18 \pm 2,02$ $\mu\text{mol/l}$) stipriausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas vaistiniame čiobrelėje *in vivo*. I. Ribeir'as 2015 m [84] atlikęs antioksidacinį saldžiosios hovenijos (lot. *H. dulcis*) tyrimą, reducinių savybių nustatymo metodu, nenustatė reikšmingo fitohormonų poveikio antioksidacinių junginių sintezei kaliaus kultūrose. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu taip pat pasižymėjo augalas augintas *in vivo* sąlygomis. Projekto metu gauti tyrimo rezultatai taip pat sutapo su J. Park'o ir bendraautorių 2020 m [85] tyrimo rezultatais. Atlikę antioksidacinį tyrimą gelsvojoje soforoje (lot. *Sophora flavescens*) *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*, DPPH radikalo slopinimo metodu, mokslininkai nustatė, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo augalas augęs *in vivo* sąlygomis (84,00 %). S. Nazir'as su bendraautoriais 2015 m [86] tyrime vertindami skirtingų NAR ir BAP koncentracijų įtaką antrinių metabolitų sintezei nustatė, kad didinant NAR ir

BAP fitohormonų koncentraciją iki 5 mg/l baziliko kaliaus kultūrose reikšmingai didėja antrinių metabolitų sintezė ir antioksidacinis aktyvumas. MS mitybinę terpę papildžius 5 mg/l NAR ir BAP bazilikas pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu.

Įvertinus antioksidacinį aktyvumą ABTS metodu, vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros, augintos su 1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas pasižymėjo stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis. Šiuo metodu gauti rezultatai išsiskiria iš kitų mokslininkų tyrimų rezultatų, nes literatūroje iki šiol nebuvo tirtas *N*-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido poveikis vaistiniam čiobreliui *in vitro*. Tačiau O. Lee su bendraautoriais 2020 m [87] taip pat nustatė teigiamą TDZ hormono ryšį su augalo kaupiamais antioksidaciniais junginiais kaliaus kultūrose. Palyginus rausvojo kataranto (lot. *Catharanthus roseus*) *in vivo* ūglių ir kaliaus kultūrų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą nustatyta, kad kaliaus kultūros MS mitybinės terpės papildymas su 2 μM TDZ ir 1 μM NAR lėmė didžiausią antrinių metabolitų sintezę ir antioksidacinį aktyvumą.

Antioksidacinį vaistinių augalų poveikį įvertinus FRAP metodu, vaistinio čiobrelio *in vivo* ekstraktas pasižymėjo stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis. Kitaip nei atliktame tyrime N. Hemmati su bendraautoriais 2020 m [88] analizuodami antioksidacinį aktyvumą FRAP metodu nustatė, kad didžiausią poveikį šalavijo (lot. *Salvia tebesana Bunge*) kaliaus kultūros antioksidaciniam aktyvumui turėjo terpės papildymas su 0,5 mg/l 2,4-D ir 0,5 mg/l BAP augimo reguliatoriais (123,2 μg/100g).

Antioksidacines savybes įvertinus SOD aktyvumo nustatymo metodu, vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros, augusios su 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas pasižymėjo didžiausiu superoksido dismutazės aktyvumu. N. Hossein'as su bendraautoriais 2019 m [89] tirdami SOD aktyvumą šalavijo (lot. *Salvia leriifolia*) kaliaus kultūros ekstrakto nustatė, kad didžiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo vaistažolė augusi MS mitybinėje terpėje be 2 mg/l 2,4-D ir 1 mg/l Kin augimo reguliatorių (12,47 vnt./mg).

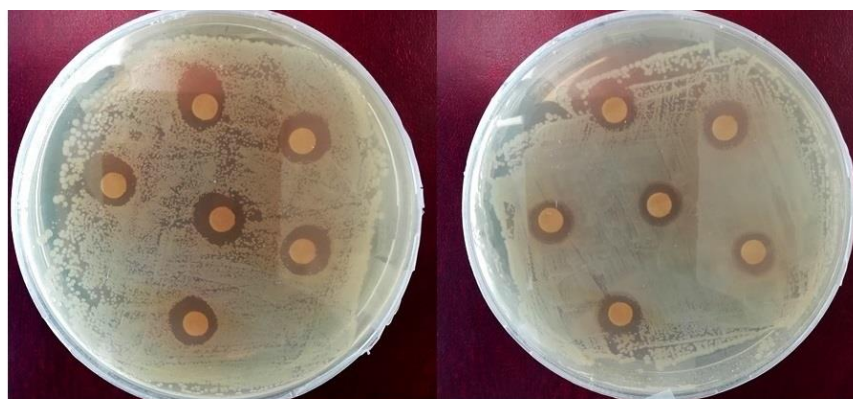
3.3. Vaistinių augalų antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Tyrimo metu buvo vertinamas vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų ekstraktų antibakterinis poveikis prieš gramteigiamą *B. subtilis* ir gramneigiamas *X. campestris*, *E. coli* ir *R. radiobacter* bakterijas. Iš 3.1 lentelėje pateiktų vaistinio čiobrelio antibakterinio aktyvumo rezultatų matyti, kad kaliaus kultūrose iš šaknų, augintų su 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin augimo reguliatoriais, antibakterinis aktyvumas prieš *B. subtilis* bakteriją buvo didžiausias. *X. campestris* slopinimą labiausiai skatino čiobrelio kaliaus kultūra iš lapų ir stiebų, auginta su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais. Šių hormonų derinys taip pat turėjo stipriausią poveikį čiobrelio antibakterinėms savybėms prieš *E. coli* ir *R. radiobacter* bakterijas. Svarbu paminėti, kad lapų ir stiebų kaliaus kultūros, augintos su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, ekstraktas pasižymėjo didžiausiu antibakteriniu aktyvumu, kuris buvo nustatytas prieš visas tirtas bakterijas (žr. 3.15 pav.). Pagal tyrimo rezultatus matyti, kad antibakterinis poveikis priklauso nuo ekstrakto ekstrahavimo laiko. Taigi, galima teigti, kad ilgesnis ekstrakto ekstrahavimo laikas turi įtakos didesniai biologiškai aktyviųjų junginių išsiskyrimui ir antibakteriniam aktyvumui.

3.1 lentelė. Vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų ekstraktų antibakterinis aktyvumas

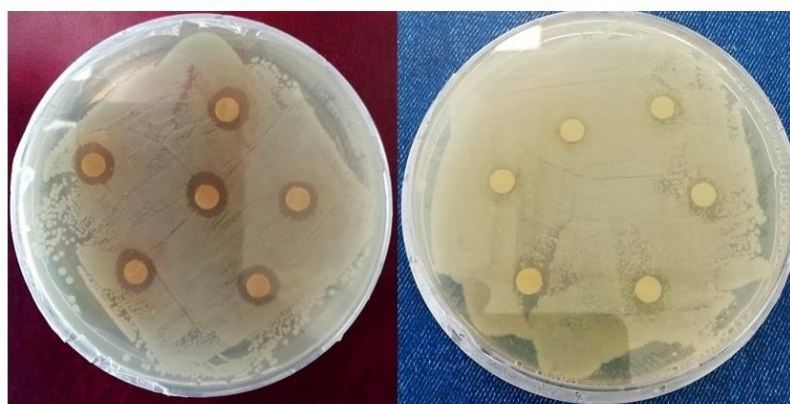
Augalo dalis	Terpė	Ekstrakto ekstrahavimo laikas (dienomis)	Slopinimo zona, cm			
			<i>B. subtilis</i>	<i>X. campestris</i>	<i>E. coli</i>	<i>R. radiobacter</i>
Visas augalas (<i>in vivo</i>)	-	7	0,083±0,132	0,000±0,000	0,000±0,000	0,233±0,052
Visas augalas	MS, (0,1 mg/l) IAR ir (0,5 mg/l) TDZ	7	0,000±0,000	0,133±0,151	0,300±0,058	0,200±0,055
Visas augalas	MS, (2 mg/l) NAR ir (0,5 mg/l) Kin	7	0,000±0,000	0,083±0,133	0,200±0,000	0,283±0,075
Lapai ir stiebai	MS, (0,1 mg/l) IAR ir (0,5 mg/l) TDZ	14	0,100±0,110	0,350±0,050	0,233±0,041	0,242±0,049
Lapai ir stiebai	MS, (2 mg/l) NAR, (0,5 mg/l) Kin, (0,5 mg/l) 39	14	0,117±0,133	0,000±0,000	Nt	Nt
Šaknys	MS, (2 mg/l) NAR ir (0,5 mg/l) Kin	7	0,133±0,082	0,000±0,000	Nt	Nt
Šaknys	MS, (0,1 mg/l) IAR ir (0,5 mg/l) TDZ	14	Nt	0,267±0,024	0,242±0,049	0,292±0,020

Lentelėje pateikiami rezultatai: vidurkis±SD, Nt-netirta



X. campestris
Lapai ir stiebai
0,5 mg/l TDZ, 0,1 mg/l IAR

E. coli
Lapai ir stiebai
0,5 mg/l TDZ, 0,1 mg/l IAR



R. radiobacter
Lapai ir stiebai
0,5 mg/l TDZ, 0,1 mg/l IAR

B. subtilis
Lapai ir stiebai
0,5 mg/l TDZ, 0,1 mg/l IAR

3.15 pav. Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrų antibakterinis aktyvumas

Iš 3.2 lentelėje pateiktų vaistinės juozažolės antibakterinio aktyvumo rezultatų matyti, kad žiedų *in vivo* ekstrakto antibakterinės savybės prieš *R. radiobacter* bakteriją buvo stipriausios. Juozažolės lapų kaliaus kultūrų papildymas 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP fitohormonais sąlygojo didžiausią antibakterinį aktyvumą prieš *B. subtilis* bakteriją. Juozažolės kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas taip pat pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu prieš *R. radiobacter* bakteriją.

3.2 lentelė. Vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų ekstraktų antibakterinis aktyvumas

Augalo dalis	Terpė	Ekstrakto ekstrahavimo laikas (dienomis)	Slopinimo zona, cm			
			<i>B. subtilis</i>	<i>X. campestris</i>	<i>E. coli</i>	<i>R. radiobacter</i>
Žiedai (<i>in vivo</i>)	-	7	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,416±0,038
Visas augalas	MS, (2 mg/l) NAR ir (1 mg/l) BAP	7	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,267±0,026
Lapai	MS, (2 mg/l) NAR ir (1 mg/l) BAP	7	0,083±0,041	0,000±0,000	Nt	Nt
Lapai	MS, (2 mg/l) NAR, (1 mg/l) BAP, (0,5 mg/l) 39	7	0,100±0,000	0,000±0,000	Nt	Nt
Šaknys	MS, (2 mg/l) NAR ir (1 mg/l) BAP	7	0,000±0,000	0,000±0,000	Nt	Nt
Šaknys	MS, (2 mg/l) NAR, (1 mg/l) BAP ir (0,5 mg/l) 39	7	Nt	0,000±0,000	Nt	Nt

Lentelėje pateikiami rezultatai: vidurkis±SD, Nt-netirti

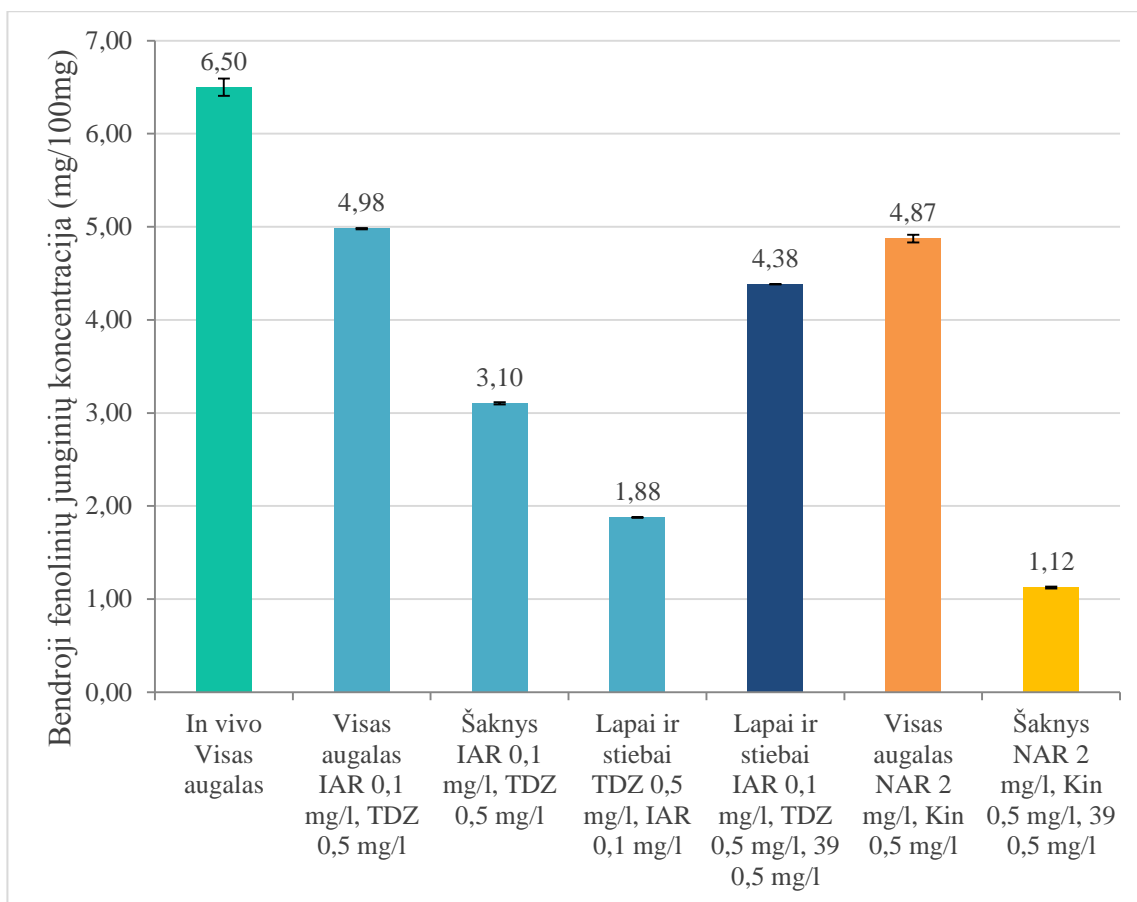
Palyginus vaistinio čiobrelis ir vaistinės juozažolės kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antibakterinį aktyvumą, matyti, kad fitohormonų deriniai vaistinio čiobrelis kaliaus kultūrose turėjo teigiamą poveikį antibakterinių junginių sintezei. Apibendrinus, gauti vaistinio čiobrelis antibakterinio aktyvumo rezultatai sutapo su F. Saricaogl' o ir bendraautorių 2018 m [90] atlikto tyrimo rezultatais. Tyrimo metu buvo patvirtintas vaistinio čiobrelis antibakterinis poveikis prieš *E. coli* (27 mm) ir *B. subtilis* (28 mm) bakterijas. Vertinant vaistinės juozažolės antibakterinį aktyvumą N. Dehghanzadeh' os ir bendraautorių 2012 m [65] tirta vaistinė juozažolė taip pat neslopino *E. coli* bakterijų augimo. Kitaip nei atliktame tyrime, mokslininkai antibakterinio poveikio prieš *B. subtilis* bakteriją nenustatė.

Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, kad vaistinis čiobrelis augęs *in vitro* pasižymėjo stipresniu antibakteriniu aktyvumu, nei vaistinis čiobrelis ir vaistinė juozažolė *in vivo*.

3.4. Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas vaistiniuose augaluose

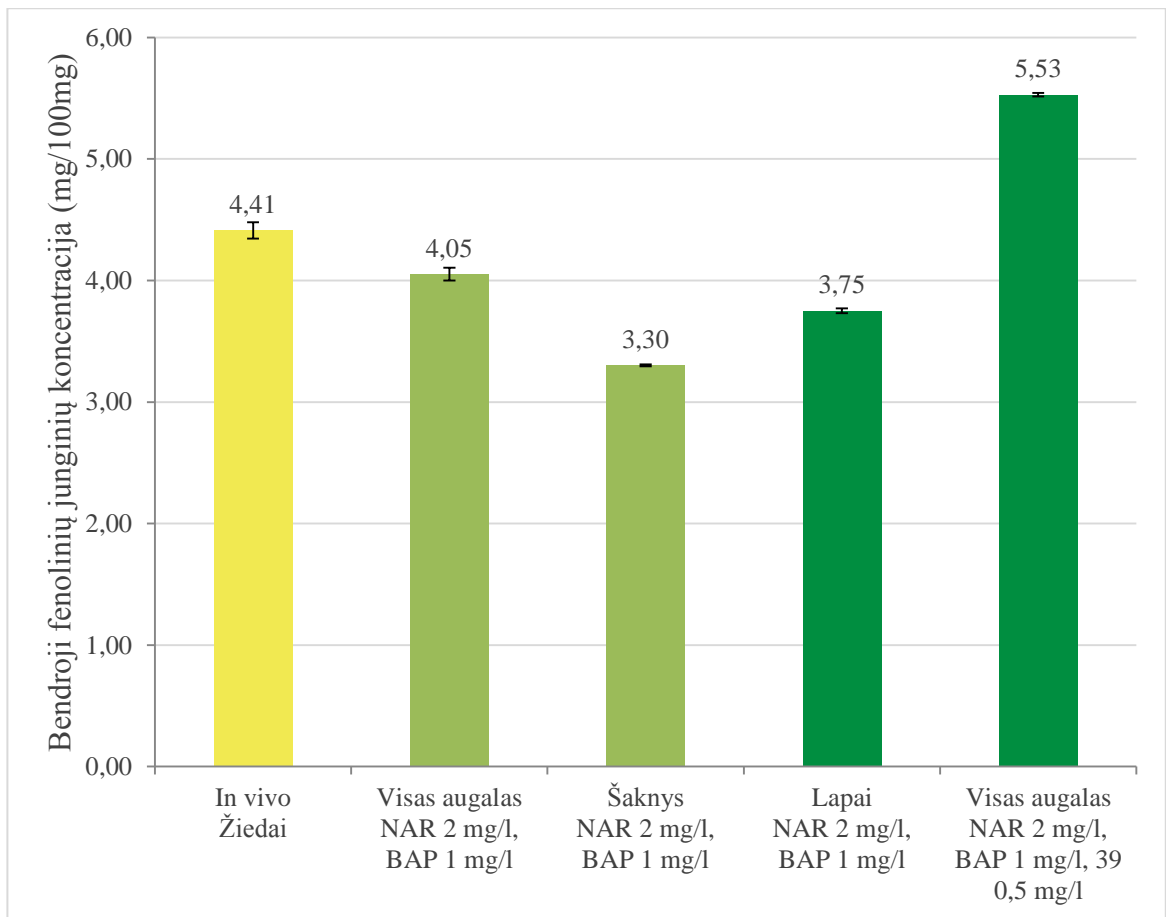
Tyrimo metu buvo vertinama bendra fenolinių junginių koncentracija vaistinio čiobrelis ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose. Ištyrus bendrą fenolinių junginių koncentraciją vaistiniame čiobrelis iš 3.16 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausia bendra fenolinių junginių koncentracija buvo nustatyta vaistinio čiobrelis *in vivo* ekstrakto (6,50±0,09 mg/100mg). Šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas pasižymėjo mažiausia fenolinių junginių koncentracija (1,12±0,01 mg/100mg). Palyginus kaliaus kultūras iš lapų ir stiebų, augintų su 39-u junginiu (4,38±0,00 mg/100mg) ir be 39-o junginio (1,88±0,00 mg/100mg), pagal 3.16 pav. rezultatus nustatytas

reikšmingas 39-o junginio poveikis bendrai fenolinių junginių koncentracijai. Nustatyta, kad vaistinio čiobrelio lapų ir stiebų kaliaus kultūros, mitybinės terpės papildymas su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, sąlygojo didesnę bendrą fenolinių junginių koncentraciją vaistažolės žaliavoje.



3.16 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Vertinant vaistinės juozažolės ekstraktuose sukaupią bendrą fenolinių junginių koncentraciją iš 3.17 pav. matyti, kad didžiausia bendra fenolinių junginių koncentracija nustatyta kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto (5,53±0,01 mg/100mg). Šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais, ekstrakto nustatyta mažiausia bendra fenolinių junginių koncentracija (3,30±0,01 mg/100mg). Palyginus kaliaus kultūras augintas su 39-u junginiu ir be, nustatytas reikšmingas junginio poveikis fenolinių junginių sintezei kaliaus kultūrose.



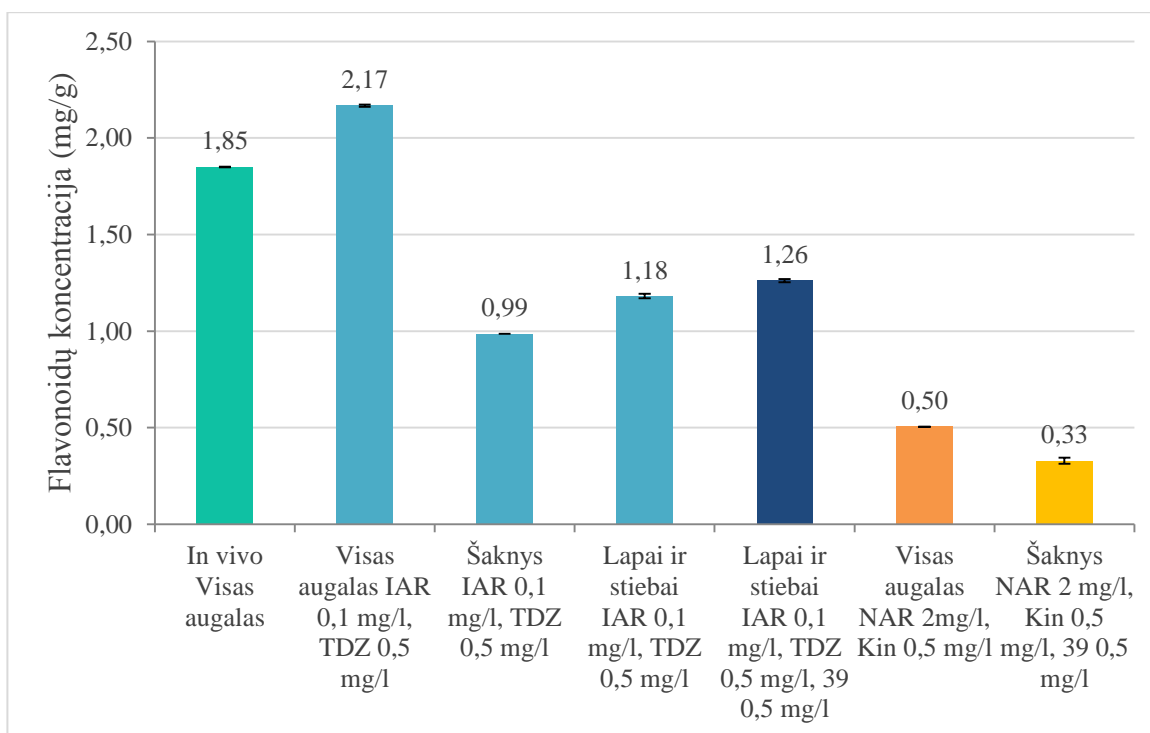
3.17 pav. Bendroji fenolinių junginių koncentracija vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Palyginus bendrą fenolinių junginių koncentraciją vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, didžiausia bendra fenolinių junginių koncentracija nustatyta vaistinio čiobrelio *in vivo* ekstraktoje ($6,50 \pm 0,09$ mg/100mg). Vaistinio čiobrelio *in vivo* ($6,50 \pm 0,09$ mg/100mg) ekstraktoje nustatyta 14,93 % didesnė bendra fenolinių junginių koncentracija, nei vaistinės juozažolės kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktoje ($5,53 \pm 0,01$ mg/100mg). Mažiausia bendra fenolinių junginių koncentracija nustatyta vaistinio čiobrelio šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 0,5 mg/l Kin fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktoje ($1,12 \pm 0,01$ mg/100mg).

Apibendrinus tyrimo rezultatus, galima teigti, kad tirtos mitybinės terpės neturėjo įtakos didesnei fenolinių junginių sintezei vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrose. Vaistinės juozažolės kaliaus kultūra, auginta su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, turėjo teigiamą įtaką fenolinių junginių sintezei. Nepaisant to, didžiausia bendra fenolinių junginių koncentracija nustatyta vaistiniame čiobrelyje *in vivo*. Kitaip nei tyrimo metu, M. Liu su bendraautoriais 2017 m [91] žaliwoje, Anji Baicha veislės, arbatoje nustatė auksinų ir citokininų reikšmingą poveikį fenolinių junginių sintezei *in vitro*. Terpės papildymas su 0,5 mg/l TDZ ir 1,0 mg/l IAR reikšmingai skatino fenolinių junginių sintezę kaliaus kultūrose.

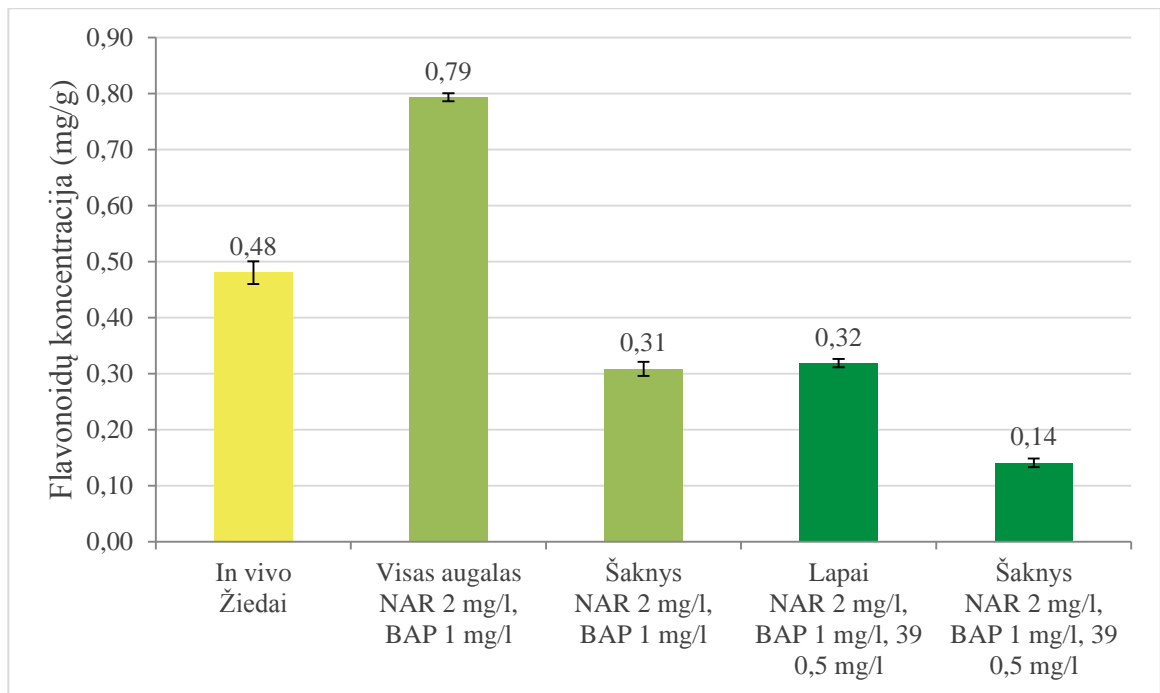
3.5. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas vaistiniuose augaluose

Tyrimo metu buvo vertinama flavonoidų koncentracija vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų ekstraktuose. Iš 3.18 pav. matyti, kad vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros, augintos su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, ekstraktas pasižymėjo didžiausia flavonoidų koncentracija (2,17±0,01 mg/g). Šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 0,5 mg/l Kin fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas pasižymėjo mažiausia flavonoidų koncentracija (0,33±0,02 mg/g). Pagal 3.18 pav. pateiktus rezultatus matyti, kad lapų ir stiebų kaliaus kultūros mitybinės terpės papildymas 0,5 mg/l 39-u junginiu skatino flavonoidų sintezę kaliaus kultūroje.



3.18 pav. Flavonoidų koncentracija vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Įvertinus flavonoidų koncentraciją vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, iš 3.19 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausia flavonoidų koncentracija buvo sukaupta kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais, ekstraktoje (0,79±0,01 mg/g). Šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstraktas pasižymėjo mažiausia flavonoidų koncentracija (0,14±0,01 mg/g). Kaliaus kultūrose MS mitybinės terpės papildymas su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu reikšmingos įtakos flavonoidų sintezei neturėjo.



3.19 pav. Flavonoidų koncentracija vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose (vidurkis±standartinis nuokrypis)

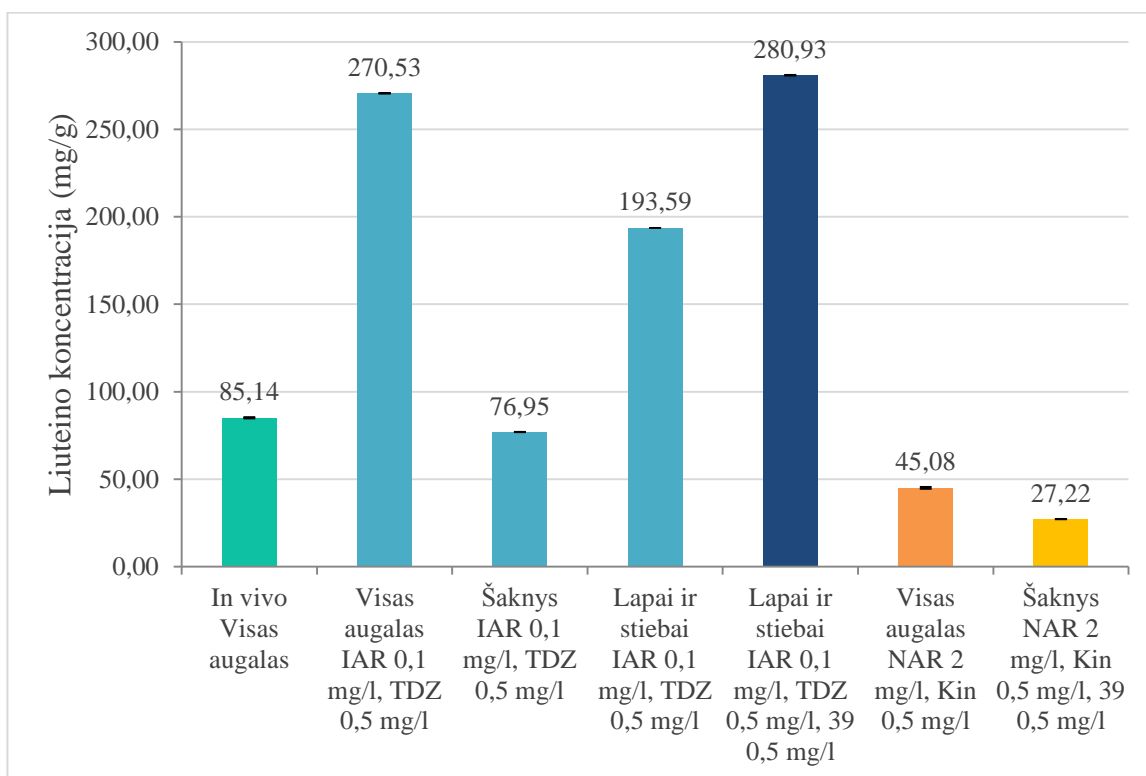
Palyginus flavonoidų koncentraciją vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų ekstraktuose, didžiausia flavonoidų koncentracija nustatyta vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros, augintos su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, ekstrakto ($2,17 \pm 0,01$ mg/g). Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros ekstrakto nustatyta flavonoidų koncentracija ($2,17 \pm 0,01$ mg/g) buvo 63,60 % didesnė nei vaistinės juozažolės kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP augimo reguliatoriais, ekstrakto ($0,79 \pm 0,01$ mg/g). Mažiausia flavonoidų koncentracija nustatyta vaistinės juozažolės kaliaus kultūroje iš šaknų, augintoje su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu ($0,14 \pm 0,01$ mg/g).

Apibendrinus tyrimo rezultatus, galima teigti, kad vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros mitybinė terpė su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais sąlygojo didžiausią flavonoidų sintezę, lyginant su *in vivo* čiobreliu ir visomis tirtomis terpėmis. Kitų tyrimų metu taip pat nustatyta teigiama TDZ hormono įtaka flavonoidų sintezei. N. Pourebadaš su bendraautorais 2015 m [92] tirdami notrelinių šeimos iberinės lalemantijos (lot. *Lallemantia iberica*) antrinių metabolitų sintezę *in vitro* nustatė, kad didžiausia flavonoidų koncentracija buvo aptikta kaliaus kultūros, papildytos su 2 mg/l TDZ fitohormonu, ekstrakto.

3.6. Liuteino koncentracijos įvertinimas vaistiniuose augaluose

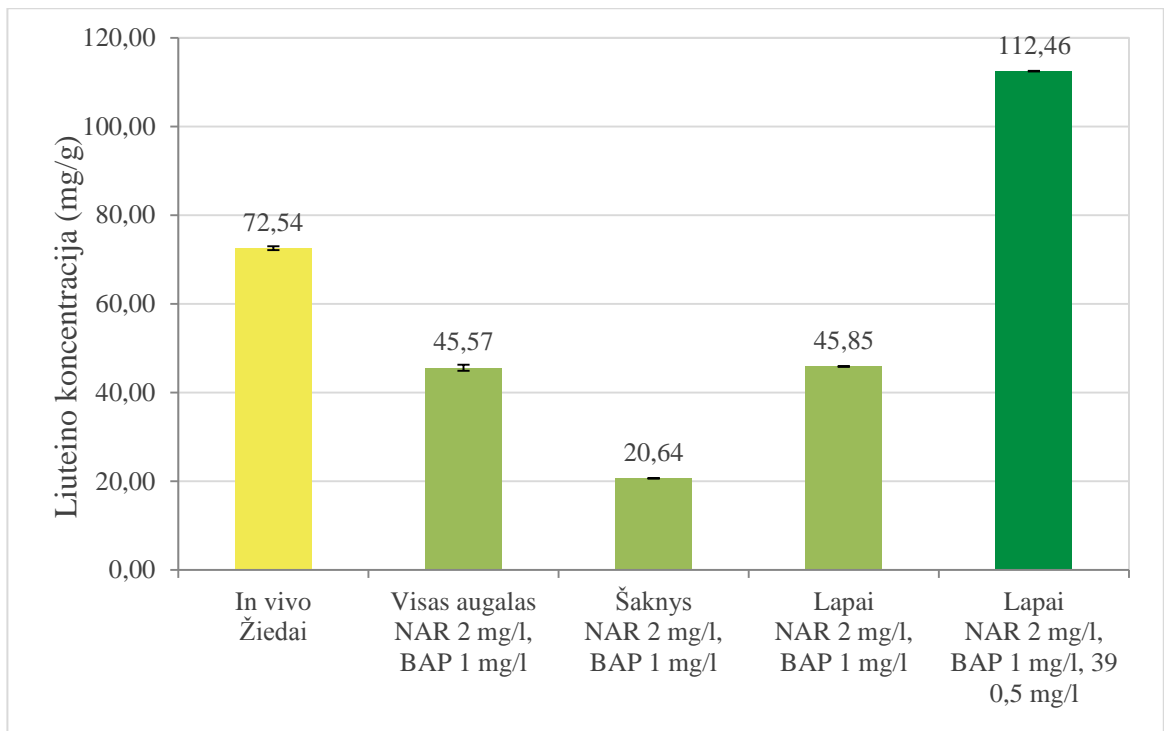
Tyrimo metu buvo vertinama liuteino koncentracija vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose. Ištyrus vaistinį čiobrelį, iš 3.20 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausia liuteino koncentracija buvo nustatyta lapų ir stiebų kaliaus kultūros, augintos su 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto ($280,93 \pm 0,18$ mg/g). Šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 1 mg/l Kin fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto nustatyta mažiausia liuteino koncentracija ($27,22 \pm 0,03$ mg/g). Pagal 3.20 pav.

pateiktus rezultatus matyti, kad lapų ir stiebų kaliaus kultūros mitybinės terpės papildymas su 0,5 mg/l 39-u junginiu skatino liuteino sintezę kaliaus kultūroje.



3.20 pav. Liuteino koncentracija vaistinio čiobrelio *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Įvertinus liuteino koncentraciją vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, iš 3.21 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausia liuteino koncentracija nustatyta lapų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto (112,46±0,06 mg/g). Šaknų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais, ekstrakto nustatyta mažiausia liuteino koncentracija (20,64±0,04 mg/g). Palyginus lapų kaliaus kultūras, augintas su 39-u junginiu ir be, matoma reikšminga 39-o junginio sąveika su NAR ir BAP fitohormonais. Lapų kaliaus kultūros mitybinės terpės papildymas 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, sąlygojo didesnę liuteino koncentraciją vaistinėje žaliavoje.



3.21 pav. Liuteino koncentracija vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų ekstraktuose (vidurkis±standartinis nuokrypis)

Palyginus liuteino koncentraciją vaistinio čiobrelio ir vaistinės juozažolės *in vivo* ir kaliaus kultūrų ekstraktuose, didžiausia liuteino koncentracija nustatyta vaistinio čiobrelio lapų ir stiebų kaliaus kultūros, augintos su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto ($280,93 \pm 0,18$ mg/g). Vaistinio čiobrelio lapų ir stiebų kaliaus kultūros ekstrakto buvo sukaupta 59,84 % didesnė liuteino koncentracija ($280,93 \pm 0,18$ mg/g), nei vaistinės juozažolės lapų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP augimo reguliatoriais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu, ekstrakto ($112,46 \pm 0,06$ mg/g). Mažiausia liuteino koncentracija nustatyta vaistinės juozažolės kaliaus kultūroje iš šaknų, augintoje su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonais ($20,64 \pm 0,04$ mg/g).

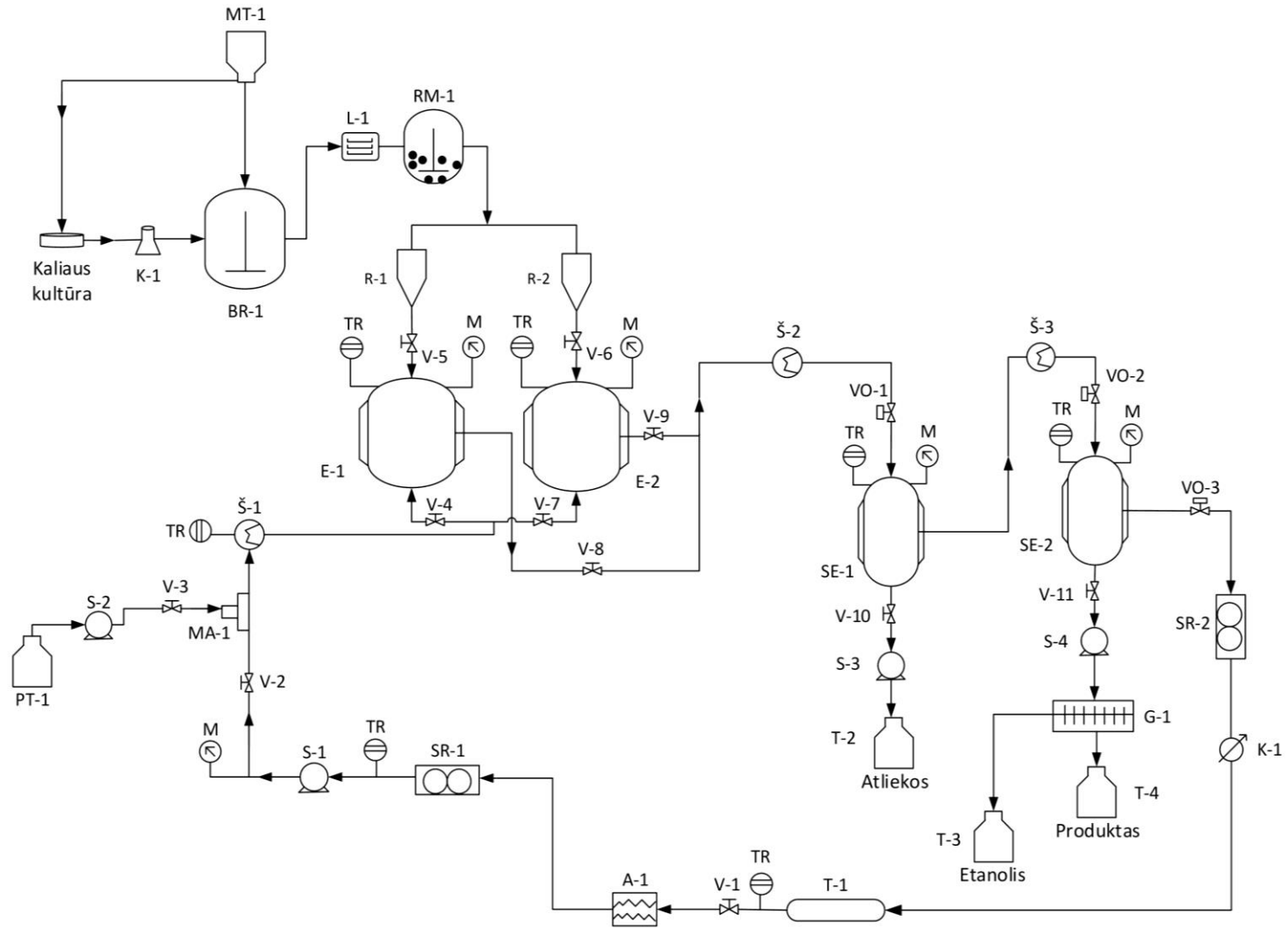
Apibendrinus gautus tyrimo rezultatus, galima teigti, kad MS mitybinės terpės papildymas su 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ fitohormonais ir 0,5 mg/l 39-u junginiu sąlygojo didžiausią liuteino koncentraciją vaistinio čiobrelio kaliaus kultūroje. Šis fitohormonų derinys gali būti taikomas liuteino sintezei skatinti kaliaus kultūrose. 2020 m D. Kulus'o [93] atliktame tyrime taip pat buvo nustatyta teigiama citokinino IAR sąsaja su didesne karotinių sinteze kaliaus kultūrose. Dailiojo auskarėlio (lot. *Lamprocapnos spectabilis*) kaliaus kultūroje, papildytoje su 1 mg/l IAR augimo reguliatoriumi buvo nustatyta didžiausia karotinių koncentracija.

4. Rekomendacijų dalis

Eterinis aliejus yra išskiriamas iš *in vitro* sąlygomis užauginto vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.) kaliaus kultūrų.

Biomasės augimas yra vykdomas dviem etapais. Pirmame etape yra paruošiama ir autoklavuojama vaistinio čiobrelio kaliaus kultūroms reikalinga mitybinė terpė su augimo reguliatoriais (MT-1). Antrame etape *in vitro* sąlygomis yra užauginama vaistinio čiobrelio kaliaus kultūra, kuri yra perkeliama į kolbą (K-1). Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrų, užaugintų *in vitro*, suspensija yra perkeliama į bioreaktorių (BR-1), į kurį yra tiekama mitybinė terpė (MT-1).

Bioreaktoriuje (BR-1) užauginta kaliaus kultūra yra džiovinama liofilizatoriuje (L-1) ir sumalama naudojant rutulinį malūną (RM-1). Žaliavos milteliai yra patalpinami į laikymo rezervuarus (R-1) ir (R-2), kurie yra nuleidžiami į ekstrakcijos rezervuarą (E-1) ir (E-2). Skystas CO₂ yra laikomas talpoje (T-1), kuris pro aušintuvą (A-1) aukšto slėgio siurbliu (S-1) yra suspaudžiamas iki superkritinio skysčio ir teka link ekstrakcijos rezervuarų (E-1) ir (E-2). Pagalbinio tirpiklio (PT-1) talpoje esantis etanolis siurbliu (S-2) taip pat yra tiekiamas link ekstrakcijos rezervuaro (E-1) ir (E-2). Maišytuvus (MA-1) sumaišo superkritinį CO₂ ir etanolį, kurie pakaitinti šilumokaičiu (Š-1) teka į ekstrakcijos rezervuarus (E-1) ir (E-2). Superkritisinis tirpiklis, su jame ištirpusiomis medžiagomis iš ekstrakcijos rezervuarų teka per grįžtamojo slėgio vožtuvą (VO-1) į pirmąjį separatorių (SE-1). Pirmame separatoriuje (SE-1) nustatčius tam tikrą temperatūrą ir slėgį netirpios augalinės žaliavos medžiagos (vaškai) nusėda separatoriaus apačioje, o tirpios medžiagos grįžtamojo slėgio vožtuvu (VO-2) teka į antrąjį separatorių (SE-2). Atliekos siurbliu yra tiekiamos į atliekų surinkimo talpą (T-2). Antrame separatoriuje (SE-2) sudarius tam tikrą slėgį ir temperatūros sąlygas CO₂ dujos yra atskiriamos nuo ekstrakto ir per grįžtamojo slėgio vožtuvą (VO-3) juda pro kondensatorių (K-1) ir į CO₂ talpą (T-1) grįžta skystu pavidalu. Etanolis naudojant garintuvą (G-1) yra išgarinamas ir talpinamas talpoje (T-3) tolimesniam panaudojimui. Galutinai sukonzentruotas ekstraktas, skystoje būsenoje, yra surenkamas ekstrakto surinkimo talpoje (T-4) [94,95].



4.1 pav. Principinė aparatūrinė schema vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.) eteriniam aliejui išgauti iš *in vitro* kaliaus kultūrų

4.1 lentelė. Technologinėje schemoje pavaizduoti aparatų ir medžiagų pavadinimai ir žymėjimai

Aparato arba medžiagos žymėjimas	Aparatas arba medžiaga
MT – 1	MS mitybinė terpė su augimo reguliatoriais
BR – 1	Bioreaktorius
K – 1	Kolba
L – 1	Liofilizatorius
RM – 1	Rutulinis malūnas
SR – 1, SR – 2	CO ₂ dujų srauto matuoklis
R – 1, R – 2	Laikymo rezervuaras
E – 1, E – 2	Ekstrakcijos rezervuaras
T – 1	CO ₂ dujų talpa
T – 2	Atliekų surinkimo talpa
T – 3	Pagalbinio tirpiklio (etanolio) surinkimo talpa
T-4	Ekstrakto surinkimo talpa
A – 1	Aušintuvas
S – 1, S – 2	Siurblys
PT – 1	Pagalbinis tirpiklis (etanolis)
MA – 1	Maišytuvas
Š – 1, Š – 2, Š – 3	Šilumokaitis
VO – 1, VO – 2, VO – 3	Grįžtamojo slėgio vožtuvas
K – 1	Kondensatorius
TR	Temperatūros reguliatorius
M	Manometras
V – 1, V – 2, V – 3, V – 4, V – 5, V – 6, V – 7, V – 8, V – 9	Vožtuvas
SR – 1, SR – 2	Srauto matuoklis
G – 1	Garintuvas

Išvados

1. Nustatyta, kad 0,1 mg/l IAR, 0,5 mg/l TDZ augimo reguliatorių ir 0,5 mg/l N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido bei 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l Kin fitohormonų ir 0,5 mg/l N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido deriniai yra tinkami didinti antioksidacinių junginių sintezę vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrose *in vitro*.
2. Įvertinus vaistinių augalų kaliaus kultūrų ekstraktus nustatyta, kad didžiausią antibakterinių junginių sintezę kaliaus kultūrose skatino MS mitybinės terpės papildymas su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais. Vaistinio čiobrelio lapų ir stiebų kaliaus kultūros, kultivuotos minėtoje mitybinėje terpėje, ekstraktas pasižymėjo didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš tirtas *B. subtilis*, *X. campestris*, *E. coli* ir *R. radiobacter* bakterijas.
3. Ištyrus vaistinius augalus, nustatyta, kad kaliaus kultūrų MS mitybinės terpės papildymas su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais, turi teigiamą poveikį didinti fenolinių junginių sintezę vaistiniame čiobrelyje *in vitro*. Tyrimo metu vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros ekstrakto nustatyta 63,60 % didesnė flavonoidų koncentracija, nei vaistinės juozažolės kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP augimo reguliatoriais, ekstrakto.
4. Nustatyta, kad MS mitybinė terpė su 0,1 mg/l IAR ir 0,5 mg/l TDZ fitohormonais bei 0,5 mg/l N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidu yra tinkama didinti liuteino koncentraciją vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrose *in vitro*. Vaistinio čiobrelio lapų ir stiebų kaliaus kultūros ekstrakto nustatyta 59,84 % didesnė liuteino koncentracija, nei vaistinės juozažolės lapų kaliaus kultūros, augintos su 2 mg/l NAR, 1 mg/l BAP augimo reguliatoriais ir 0,5 mg/l N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamidu, ekstrakto.
5. Pateikiama vaistinio čiobrelio *in vitro* kaliaus kultūrų, augintų MS mitybinėje terpėje su tirtais fitohormonais, rekomenduojama eterinio aliejaus išskyrimo aparatūrinė schema.

Literatūros sąrašas

1. HUSSAIN, M.S., et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012, 4 (1), 10-20. ISSN 0975-7406.
2. KOKSAL, E., et al. Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties.* 2016, 20 (3), 514-525. ISSN 1532-2386.
3. ESPINOSA-LEAL, C.A., C.A. PUENTE-GARZA ir S. GARCIA-LARA. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta.* 2018, 248 (1), 1-18. ISSN 1432-2048.
4. EFFERTH, T. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering.* 2019, 50 (1), 50-59. ISSN 2096-0026.
5. PAKSERESHTA, G., et al. Study of callus induction and cell culture to secondary metabolite production in *Hyssopus officinalis* L. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences.* 2016, 5 (2), 104-111. ISSN 2322-5106.
6. NIETO, G. A review on applications and uses of *Thymus* in the food industry. *Plants.* 2020, 9 (8), 961. ISSN 2223-7747.
7. HASSANSHAHIAN, M., A. SAADATFAR ir F. MASOUMI. Antimicrobial properties of *Hyssopus officinalis* extract against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm form. *Biological Journal of Microorganism.* 2019, 7 (28), 91-101. ISSN 2322-5181.
8. FATHIAZAD, F., M. MAZANDARANI ir S. HAMEDEYAZDAN. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran. *Adv Pharm Bull.* 2011, 1 (2), 63-67. ISSN 2251-7308
9. SONMEZDAG, A.S., H. KELEBEK ir S. SELLI. Identification of aroma compounds of *Lamiaceae* species in Turkey using the purge and trap technique. *Foods.* 2017, 6 (2), 10. ISSN 2304-8158.
10. CAVALCANTI, A.B.S., et al. Computer-aided chemotaxonomy and bioprospecting study of diterpenes of the *Lamiaceae* family. *Molecules.* 2019, 24 (21), 3908. ISSN 1420-3049.
11. SALEHI, B., et al. *Lamium* plants-a comprehensive review on health benefits and biological activities. *Molecules.* 2019, 24 (10), 1913. ISSN 1420-3049.
12. SIM LY, N.Z., A.B.D. RANI ir K. HUSAIN. *Lamiaceae*: an insight on their anti-allergic potential and its mechanisms of action. *Front Pharmacol.* 2019, 10, 677. ISSN 1663-9812.
13. LI, X., et al. Traditional uses, chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Thymus*. *Chem Biodivers.* 2019, 16 (9), e1900254. ISSN 1612-1880.
14. HOSSEINZADEH, S., A. JAFARIKUKHDAN, A. HOSSEINI ir R. ARMAND. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine.* 2015, 6 (9), 635-642. ISSN 2158-2882.
15. REDDY, V., R.V. KANDISA, P.V. VARSHA ir S. SATYAM. Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med Aromat Plants.* 2014, 3 (3), 1000164. ISSN: 2167-0412.
16. TOBYN, G., A. DENHAM ir M. WHITELEGG. *The Western Herbal Tradition: Hyssopus officinalis, hyssop.* London: Elsevier, 2011. ISBN 9780443103445.
17. BEKUT, M., et al. Potential of selected *Lamiaceae* plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacol Res.* 2018, 133, 301-314. ISSN 1573-904X.

18. SAVADKOUHI, N.R., P. ARIAI ir M.C. LANGERODI. The effect of encapsulated plant extract of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) in biopolymer nanoemulsions of *Lepidium perfoliatum* and *Orchis mascula* on controlling oxidative stability of soybean oil. *Food Sci Nutr.* 2020, 8 (2), 1264-1271. ISSN 2048-7177.
19. FANI, M. ir J. KOHANTEB. In vitro antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2017, 22 (4), 660–666. ISSN 1741-4288.
20. MEERAN, M.F.N., et al. Pharmacological properties and molecular mechanisms of Thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Front Pharmacol.* 2017, 8, 380. ISSN 1663-9812
21. AFONSO, A.F., O.R. PEREIRA ir S.M. CARDOSO. Health-promoting effects of *Thymus* phenolic-rich extracts: antioxidant, anti-inflammatory and antitumoral properties. *Antioxidants.* 2020, 9 (9), 814. ISSN 2076-3921.
22. JAHANTIGH, O., et al. Essential oil composition of *Hyssop* (*Hyssopus officinalis* L.) under salt stress at flowering stage. *Journal of Essential Oil Research.* 2016, 28 (5), 458-464. ISSN 2163-8152.
23. BHATIA, S., S. KIRAN, D. RANDHIR ir B. TANMOY. *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences: Plant tissue culture-based industries.* London: Academic Press, 2015. ISBN 9780128024980.
24. DELPORTE, F., J.M. JACQUEMIN, P. MASSON ir B. WATILLON. Insights into the regenerative property of plant cells and their receptivity to transgenesis. *Plant Signal Behav.* 2012, 7 (12), 1608-1620. ISSN 1559-2324.
25. SATHISHKUMAR, R., S.R. KUMAR, J. HEMA ir V. BASKAR. *Advances in Plant Transgenics: Methods and Applications: Plant Tissue Culture and DNA Delivery Methods.* Singapore: Springer, 2019. ISBN 9789811396243.
26. LOW, L.Y., et al. *New Visions in Plant Science: Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method.* London: IntechOpen, 2018. ISBN 9781789237030
27. BURNETT, M.J.B. ir A.C. BURNETT. Therapeutic recombinant protein production in plants: challenges and opportunities. *Plants, people, planet.* 2020, 2, 121-132. ISSN 2572-2611.
28. LOYOLA-VARGAS, V. ir N. OCHOA-ALEJO. *Plant Cell Culture Protocols: An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives.* New York: Humana Press, 2018. ISBN 9781493985944.
29. DE PAOLIS, A., et al. Plant cellular and molecular biotechnology: following Mariotti's steps. *Plants.* 2019, 8 (1), 18. ISSN 2223-7747.
30. LOYOLA-VARGAS, V.M. ir N. OCHOA-ALEJ. *Methods in Molecular Biology: An Introduction to Plant Cell Culture: The Future Ahead.* Totawa: Humana Press, 2012. ISBN 9781617798184.
31. KAZMIERSKI, L. ir S. ROSZKOWSKI. Plant stem cells culture — a new tool for skin protection and regeneration. *Med Res J.* 2019, 4 (1), 52-57. ISSN 2451-4101.
32. EIBL, R., et al. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018, 102 (20), 8661-8675. ISSN 1432-0614.
33. EL-BANNA, H.Y. Indirect micropropagation of *Thymus vulgaris* plant. *J Plant Production.* 2017, 8 (11), 1241-1246. ISSN 1349-1008.

34. BENJAMIN, E.D., G.A.ISHAKU, F.A. PEINGURTA ir A.S. AFOLAB. Callus culture for the production of therapeutic compounds. *American Journal of Plant Biology*. 2019, 4 (4), 76-84. ISSN 2578-8329.
35. PAWELEC, K., D. KULPA ir H. SIWEK. Callus culture of common thyme (*Thymus vulgaris L.*). *World Scientific News*. 2017, 74, 94-105. ISSN 2392-2192.
36. JAMWAL, K., S. BHATTACHARYA ir S. PURI. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2018, 9, 26-38. ISSN 2214-7861.
37. MOSAVAT, N., P. GOLKAR, M. YOUSEFIFARD ir R. JAVED. Modulation of callus growth and secondary metabolites in different *Thymus* species and *Zataria multiflora* micropropagated under ZnO nanoparticles stress. *Biotechnol Appl Biochem*. 2019, 66 (3), 316-322. ISSN 1470-8744.
38. NICUTA, D. ir N. BADALUTA. Observations on the morphogenetic reaction of thymus vulgaris explants cultivated *in vitro*. *Studii și Cercetări*. 2016, 25 (1), 126-131. ISSN 1755-4349.
39. TAYEFEH, S., N. MAHNA, S. KAZEMITABAR ir V. GHASEMI-OMRAN. Callogenesis induction in two *Hyssopus* species (*H. officinalis* and *H. angustifolius*) using different hormonal levels and culture media. *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*. 2018, 3 (2), 29-39. ISSN 2320-3862.
40. DARWISH, H.Y., et al. Induction of biosynthetic genes related to rosmarinic acid in plant callus culture and antiproliferative activity against breast cancer cell line. *Pak J Biol Sci*. 2020, 23 (8), 1025-1036. ISSN 1812-5735.
41. CHANDRAN, H., M. MEENA, T. BARUPAL IR K. SHARMA Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*. 2020, 26, e00450. ISSN 2322-1186.
42. MANIVANNAN, A., P. SOUNDARARAJAN, Y.G. PARK, B.R. JEONG. Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. *Int. J. Mol. Sci*. 2016, 17 (3), 399. ISSN 1422-0067.
43. SATYAL, P., B.L. MURRAY, R.L. MCFEETERS IR W.N. SETZER. Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*. 2016, 5 (4), 70. ISSN 2304-8158.
44. DAUQAN, E.M.A. ir A. ABDULLAH. Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris L.*) herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 2017, 5 (2), 017-022. ISSN 2347-212X.
45. BIDABADI, S.S. ir S.M. JAIN. Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants*. 2020, 9 (6), 702. ISSN 2331-0677.
46. QUEIROZ, F.C.F., et al. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris L.* essential oil, on the inflammatory response. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med*. 2012, 2012, 10. ISSN 1741-4288.
47. KOWALCZYK, A. Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*. 2020, 25 (18), 4125. ISSN 1420-3049.
48. MAJDI, M., A. MALEKZADEH-MASHHADY, A. MAROUFI IR C. CROCOLL. Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in

- thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. *Plant Physiol Biochem.* 2017 115, 152-162. ISSN 1873-2690.
49. GEDIKOGLU, A., M. SOKMEN ir A. CIVIT. Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Sci Nutr.* 2019, 7 (5), 1704-1714. ISSN 2048-7177.
 50. TOHIDIA, B., M. RAHIMMALEKA ir H. TRINDADEB. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. *Industrial Crops and Products.* 2019, 134 (4), 89-99. ISSN 1872-633X.
 51. KENNEDY, D.O. ir E.L. WIGHTMAN. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv. Nutr.* 2011, 2 (1), 32-50. ISSN 2156-5376.
 52. DIAS, M.I., M.J. SOUSA, R C. ALVES ir I.C.F.R. FERREIRA. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review. *Industrial Crops and Products.* 2016, 82, 9-22. ISSN 1872-633X.
 53. ROBY, M.H.H., M.A. SARHAN, K.A.H. SELIM IR K.I. KHALEL. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products.* 2013, 43 (1), 827-831. ISSN 1872-633X.
 54. SAID-AL AHL, H.A.H., Z.K. ABBAS, A.S. SABRA IR K.G. TKACHENKO. Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Egypt. *International Journal of Plant Research.* 2015, 1 (2), 49-53. ISSN 2163-260X.
 55. PANDEY, V, et al. Compositional variation in the leaf, flower and stem essential oils of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) from western-Himalaya. *Journal of Herbal Medicine.* 2014, 4 (2), 89-95. ISSN 2210-8041.
 56. BAJ, T., I. KORONA-GLOWNIAK, R. KOWALSKI IR A. MALM. Chemical composition and microbiological evaluation of essential oil from *Hyssopus officinalis* L. with white and pink flowers. *Open Chem.* 2018, 16, 317-323. ISSN 2391-5420.
 57. MOHAMADPOOR, H., A.G. PIRBALOUTI, I. BAJALAN IR F. MALEKPOOR. Chemical compositions and antioxidant activity of essential oils from inflorescences of two landraces of hyssop [*Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* (Bieb.)] cultivated in Southwestern, Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* 2019, 22 (4), 1074-1081. ISSN 0976-5026.
 58. VLASE, L., et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules.* 2014, 19 (5), 5490-5507. ISSN 1420-3049.
 59. SOLORZANO-SANTOS, F. ir M.G. MIRANDA-NOVALES. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol.* 2012, 23 (2), 136-41. ISSN 1879-0429.
 60. CHOUHAN, S., K. SHARMA ir S. GULERIA. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines.* 2017, 4 (3), 58. ISSN 2305-6320.
 61. KON, K. ir M. RAI. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. *Nusantara bioscience.* 2012, 4 (2), 50-56. ISSN: 2087-3956.
 62. CHUDASAMA, K.S. ir V.S. THAKER. Screening of potential antimicrobial compounds against *Xanthomonas campestris* from 100 essential oils of aromatic plants used in India: an

- ecofriendly approach. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2012, 45 (7), 783-795. ISSN 1477-2906.
63. VALIZADEH, S., et al. Investigating the phytochemical, antibacterial and antifungal effects of *Thymus vulgaris* and *Cuminum cyminum* essential oils. *Medical Laboratory Journal*. 2016, 10 (1), 36-43. ISSN 2538-4449.
 64. KRYVTSOVA, M.V., et al. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections. *Biosystems Diversity*. 2019, 27 (3), 270-275. ISSN 2520-2529.
 65. DEHGHANZADEH, N., S. KETABCHI and A. ALIZADEH. Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyssopus officinalis* L. grown in Iran. *ASIAN J.EXP.BIOL.SCI*. 2012, 3 (4), 767-771. ISSN 2248-9223.
 66. STAPPEN, I., et al. Chemical composition and biological activity of essential oils of *Dracocephalum heterophyllum* and *Hyssopus officinalis* from Western Himalaya. *Natural Product Communications*. 2015, 10 (1), 133-138. ISSN 1555-9475.
 67. CHOUDHARY, D. K., A. VARMA ir N. TUTEJA. *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture: Essential Oils as Antimicrobial Agents Against Some Important Plant Pathogenic Bacteria and Fungi*. Singapore: Springer, 2016. ISBN 9789811028540.
 68. SARDARI, S., et al. Therapeutic effect of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on patients with COVID19: a randomized clinical trial. *J Adv Med Biomed Res*. 2021, 29 (133), 83-91. ISSN 2676-6264.
 69. DAVIDSON, A.M., J. WYSOCKI ir D. BATLLE. Interaction of SARS-CoV-2 and other coronavirus with ACE (Angiotensin-Converting Enzyme)-2 as their main receptor. *Hypertension*. 2020, 76 (5), 1339-1349. ISSN 1473-5598.
 70. SZOPA, A., et al. *Schisandra rubriflora* plant material and *in vitro* microshoot cultures as rich sources of natural phenolic antioxidants. *Antioxidants*. 2020, 9 (6), 488. ISSN 2076-3921.
 71. CATANA, R., M. LAZAR, I. HOLOBIUC ir L. FLORESCU. Seed germination of some medicinal plant species for conservative purpose. *Romanian Biotechnological Letters*. 2020, 25 (3), 1621-1627. ISSN 2248-3942.
 72. HALL R.D. *Plant cell culture protocols*. Totowa: Humana Press, 1999. ISBN 0896035492.
 73. TUMOSIENĖ, I., et al. Antioxidant and anticancer activity of novel derivatives of 3-[(4-methoxyphenyl)amino]propanehydrazide. *Molecules*. 2020, 25 (13), 2980. ISSN 1420-3049.
 74. ARMSTRONG, D. *Advanced Protocols in Oxidative Stress III*. New York: Humana Press, 2015. ISBN 9781493914418.
 75. ALAM, M.N., N.J. BRISTI, M. RAFIQUZZAMAN. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, 21 (2), 143-152. ISSN 2213-7475.
 76. BEDLOVIČOVA, Z., I. STRAPAČ, M. BALAŽ IR A. SALAYOVA. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecules*. 2020, 25 (14), 3191. ISSN 1420-3049.
 77. DONG, J.W., et al. Re-evaluation of ABTS•+ assay for total antioxidant capacity of natural products. *Natural Product Communications*. 2015, 10 (12), 2169-2172. ISSN 1555-9475.

78. STEPHENIE, S., et al. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods*. 2020, 68, 103917. ISSN 1756-4646.
79. WEYDERT, C.J. ir J.J. CULLEN. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*. 2010, 5 (1), 51-66. ISSN 1750-2799.
80. MAKKAR, H.P.S., P. SIDDHURAJU, K. BECKER. *Plant Secondary Metabolites: Tannins*. Humana Press, 2007. ISBN 9781597454254.
81. DA SILVA, L.A.L., B.R PEZZINI, ir L. SOARES. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacogn Mag*. 2015, 11 (41), 96-101. ISSN 0976-4062.
82. GARG, N., K.L. GARG, K.G. MUKERJI. *Laboratory manual of food microbiology*. New Delhi: International publishing house, 2010. ISBN 9789380578019.
83. HAJARE, R., et al. Extraction and quantification of antioxidant lutein from various plant sources. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 2013, 22 (1), 152-157. ISSN 0976-044X.
84. RIBEIRO, I.G., et al. Compact callus cultures and evaluation of the antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb. (*Rhamnaceae*) under *in vivo* and *in vitro* culture conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2015, 9 (1), 8-15. ISSN 996-0875.
85. PARK, J.S., et al.. Production of flavonoids in callus cultures of *sophora flavescens* aiton. *Plants*. 2020, 9 (6), 688. ISSN 2223-7747.
86. NAZIR, S., et al. Callus culture of thai basil is an efective biological system for the production of antioxidants. *Molecules*. 2020, 25, 4859. ISSN 1433-1373.
87. LEE, O.N., et al. Phytochemical composition, antioxidant capacity, and enzyme inhibitory activity in callus, somaclonal variant, and normal green shoot tissues of *Catharanthus roseus* (L) g. Don. *Molecules* 2020, 25 (21), 4945. ISSN 1433-1373.
88. HEMMATI, N., M. CHENIANY IR A. GANJEALI. Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge. *Botanica Serbica*. 2020, 44 (2), 163-173. ISSN 1821-2638.
89. HOSSEINI, N.S., Z.G. HAGH IR H. KHOSHGHALB. Morphological, antioxidant enzyme activity and secondary metabolites accumulation in response of polyethylene glycol-induced osmotic stress in embryo-derived plantlets and callus cultures of *Salvia leriifolia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2020, 140 (1), 143-155. ISSN 1573-5044.
90. SARICA OGLU, F.T., S. TURHAN. Antimicrobial activity and antioxidant capacity of thyme, rosemary and clove essential oils and their mixtures. *The Journal of Food*. 2018, 2 (1), 25-33. ISSN 1309-6273 .
91. LIU, M., at al. Proliferation, accumulation of polyphenols, and antioxidant activities of callus from the 'Anji Baicha' cultivar of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.]. *Horticultural Science & Technology*. 2017, 35 (2), 252-264. ISSN 2465-8588.
92. POUREBAD, N., at al. The influence of TDZ concentrations on *in vitro* growth and production of secondary metabolites by the shoot and callus culture of *Lallemantia iberica*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2015, 122 (2), 331-339. ISSN 1573-5044.
93. KULUS, D. Influence of growth regulators on the development, quality, and physiological state of *in vitro*-propagated *Lamprocapnos spectabilis* (L.) Fukuhara. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2020, 56 (4), 447-457. ISSN 1543-706X.

94. FORNARI, T., et al. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J Chromatogr A*. 2012, 1250, 34-48. ISSN 1873-3778.
95. REEDIJK, J. Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering: *Supercritical fluid extraction*. Oxford, Elsevier, 2014. ISBN 012409547X.

Priedai

1 priedas. Mitybinės *Murashige Skoog* (MS) mitybinės terpės sudėtis [72]

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

b - 50 ml tirpalo pilame į terpę; c – 5 ml tirpalo į terpę